بررسی اثرات گلوکان بر ایمنی، پاره ای از شاخص‌های خونی و میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*)

رودابه روفچائی*[۱]؛ سید حسین حسینی‌فر[۲]؛ محمد صیاد بورانی [۳]؛ حسن مقصودیه کهن [٤]؛ عباسعلی زمینی[۵] و منیره فئید[٦]

R_rufchaie@yahoo.com

۱،۳، ٤ و ٦ –پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی، بندر انزلی، صندوق پستی: ٦٦

۲– گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۳۳٦

۵–دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، صندوق پستی: ١٦١٦

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۱

چکیده

هدف از این تحقیق بررسی اثرات گلوکان بر برخی شاخص‌های خونی و ایمنی بچه ماهی سفید *Rutilus frisii kutum* بود. از ماده Hoplite بعنوان محرک ایمنی با ماده موثره گلوکان به نسبت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ درصد به جیره پایه تهیه شده برای ماهی سفید اضافه شد. ۲۵ عدد بچه ماهی با میانگین(± انحراف معیار) وزنی (۰/۰۶± ۱/۱۵) گرم به تانک‌های ۱۰۰ لیتری با حجم آبگیری ۸۰ لیتر وارد گردیدند. طول دوره بررسی ۶۰ روز بود و زیست‌سنجی هر ۱۵ روز یکبار انجام می‌شد. در انتهای دوره از بچه ماهی‌ها خونگیری بعمل آمد و شاخص‌های خونی، تعداد گلبول‌های قرمز، تعداد گلبول‌های سفید و انواع آن، درصد هماتوکریت و میزان هموگلوبین، شاخص‌های ایمنی (ایمونوگلوبولین و لیزوزیم) بررسی شد. بررسی فاکتورهای خونی حاکی از آن بود که بچه ماهی‌های تیمار ۱/۵ درصد بیشترین میزان ایمونو گلوبین و ائوزینوفیل را داشتند اگرچه از نظر آماری این ختلاف معنی‌دار نبود. بیشترین میانگین غلظت هموگلوبین داخل گلبولی (MCHC)، درصد هماتوکریت و میزان هموگلوبین در تیمارهای ۰/۵ و ۱ درصد و بیشترین میانگین حجم متوسط گلبولی (MCV) و تعداد گلبول قرمز در تیمار ۰/۵ درصد بدست آمد. بیشترین میانگین تعداد گلبول سفید، نوتروفیل و مونوسیت نیز در تیمار ۲ درصد و بیشترین و کمترین میزان لیزوزیم بترتیب در تیمار ۱ و صفر درصد مشاهده شد. تراکم تعداد کل باکتری‌ها و لاکتو باسیلوس‌ها افزایش معنی‌داری در تیمار ۰/۵ درصد داشت. نتایج نشان دادند مکمل غذایی استفاده شده محرک ایمنی غیراختصاصی مناسبی برایبچه ماهی سفید است.

لغات کلیدی: فاکتورهای خونی، فیزیولوی ماهی، تغذیه، ایران

*نویسنده مسئول

مقدمه

امروزه در صنعت آبزی‌پروری برای بهبود سلامت و افزایش مقاومت آبزیان در برابر بیماری‌ها استفاده از مکمل‌های غذایی جهت ارتقای رشد و ایمنی متداول گردیده است (Gatlin & Li, 2004). بررسی‌های بعمل آمده نشان داده است که استفاده از الیگوساکاریدهای غیرقابل هضم (پری‌بیوتیک‌ها) در ارتقاء سیستم ایمنی ماهی تأثیر بسزایی دارد (Schley & Field, 2002). استفاده از مکمل‌های غذایی مانند پرو و پری بیوتیک‌ها علاوه بر کاهش نیاز به استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری بعنوان محرک رشد و ایمنی مطرح هستند (Merrifield *et al.*, 2010). گلوکان‌ها (به دو شکل شیمیایی بتا و آلفا)، گلیکو الیگو ساکاریدهایی هستند که سبب افزایش رشد باکتری‌های اسید لاکتیک و بهبود وضعیت سلامت و ایمنی میزبان می‌شوند (Gibson *et al.*, 2004).

بتا گلوکان نقش مهمی در فعال شدن ایمنی ذاتی و اکتسابی آبزیان دارد. گلوکان ایمنی ذاتی را به گونه‌ای تحریک می‌کند که نه تنها مانع عملکرد میکروارگانیسم‌های مضر شده بلکه روند عملکرد سیستم ایمنی را بهبود می‌بخشد (Sakai, 1999). همچنین بتاگلوکان با اتصال مستقیم به گیرنده‌های پروتئینی موجود بر سطح ماکروفاژها و سایر سلول‌های خونی از جمله نوتروفیل‌ها و فعال کردن آنها سبب حفظ و تقویت سیستم ایمنی می‌گردد (Herre *et al.*, 2004).

پس از مشخص شدن اثرات گلوکان روی افزایش ایمنی انسان و پستاندارانی مانند موش، خوک، خرگوش، گوسفند و گاو (Di Luzio 1985; Nakagawa *et al.*, 2003; Soltanian *et al.*, 2009)، در سالهای اخیر مطالعاتی در زمینه تأثیر بتا گلوکان بر ماهی‌ها انجام شده است (Meena *et al.*, 2012).

نتایج مطالعات نشان‌دهندی اثر بتا گلوکان بر افزایش رشد ماهی *Pink snapper* و کپور ماهی هندی (*Labeo rohita*) (Cook *et al.* 2003; Misra *et al.*, 2006b)، درصد بقا و مقاومت در برابر بیماری گربه ماهی روگاهی (*Ictalurus punctatus*) و ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (Welker *e t al.*, 2007; Sealey *et al.*, 2007). همچنین افزایش سیتوکیناز و ماکروفاژها در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان می‌باشد.

همچنین گلوکان کارآیی بیشتری در مقایسه با سایر محرکهای ایمنی از جمله لاکتوفرین، لوامیزول و ویتامین C بر افزایش ایمنی غیراختصاصی خونی و سلولی گربه ماهی دارد (Kumari & Sahoo, 2006). با این وجود هنوز اثرات پری بیوتیک‌ها بر بسیاری از جنبه‌های فیزیولوژیکی و شاخص‌های خونی، ایمنی و میکروبیوتای روده‌ای ماهی مشخص نشده است و مستلزم مطالعات بیشتری است (حسینی‌فر و همکاران ۱۳۹۰؛ Burr & Gatlin, 2005).

هدف از این تحقیق، ارزیابی اثرات بکارگیری گلوکان بر شاخص‌های خونی و پاسخ ایمنی بچه ماهی سفید بود.

مواد و روش کار

این بررسی در ایستگاه تغذیه و غذای زنده شمال کشور واقع در ساحل غازیان بندر انزلی انجام شد. بچه ماهیان سفید با میانگین (± انحراف معیار) وزنی (۰/۰۶± ۱/۱۵ گرم) پس از تأمین به مدت ۳ هفته در شرایط ایستگاه جهت سازگاری نگهداری شدند و سپس با تراکم ۰/۳ گرم در لیتر در ۱۵ تانک فایبرگلاس ۱۰۰ لیتری (با حجم آبگیری ۸۰ لیتر) توزیع گردیدند. این بررسی در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با یک گروه کنترل و ۴ گروه تیماری ۰/۵، ۱، ۱/۵و ۲ درصد محرک رشد و ایمنی تجاری Hoplite با ماده موثره گلوکان (آلفا و بتا گلوکان، ۳۴/۱ درصد) با سه تکرار انجام شد. بچه ماهی‌های سفید به مدت ۶۰ روز با جیره‌های آزمایشی غذادهی شدند. برای ساخت جیره پایه (جدول ۱) ابتدا موادی که نیاز به الک داشتند مثل آرد سویا، پودر ماهی، آرد ذرت، آرد گندم، پودر گاماروس و پودر صدف مجدداً آسیاب و سپس الک شدند و با توجه به درصد ماده‌ی مورد نیاز در ۱ کیلوگرم تمامی مواد بجز روغن ماهی وزن شدند. سپس کم‌کم به میزان ۲۰ درصد آب اضافه و بعد از مخلوط شدن در سایه خشک شده و نهایتاً از چشمه ۱۲۰ میکرون عبور داده شد. پودر حاصله پس از خشک شدن کامل در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری و هر روز به مقدار مورد نیاز از جیره‌ها برداشت گردید و براساس ۳ تا ۵ درصد وزن توده زنده در ۳ نوبت غذادهی شدند.

میانگین (± انحراف معیار) دما، اکسیژن محلول و pH در طول دوره پرورش بترتیب ۰/۰۱±۹/ ۲۳ درجه سانتیگراد، ۰/۱±۶/۸۵ میلی‌گرم در لیتر و ۰/۲±۷/۵ بود. در انتهای دوره به منظور بررسی شاخص‌های خونی بصورت تصادفی خونگیری از ۱۲ ماهی به روش قطع ساقه دمی انجام شد (Cataldi *et al.*, 1999).

این مقدار خون به ۲ دسته اپندورف حاوی هپارین و فاقد هپارین، یک دسته برای سنجش فاکتورهایی مانند تعداد گلبول‌های قرمز و سفید، هماتوکریت، هموگلوبین و دسته دیگر بدون هپارین برای جداسازی سرم جهت سنجش میزان کل ایمونوگلوبولین‌ها و لیزوزیم سرم انتقال یافت. برای جداسازی سرم از سلول‌های خونی از سانتریفوژ (مدل RLEC-131) ساخت شرکت ایتالیا به مدت ۵ دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه استفاده گردید. سرم جدا شده در ویال‌ها ریخته شده و تا زمان بررسی در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

جدول ۱: اجزاء و آنالیز جیره غذایی پایه بچه ماهی سفید

اجزا سازنده	نسبت اجزا (درصد)
پودر ماهی جنوب	٤٢
پودر گاماروس *Pontogammarus maeoticus*	٢
پودر سویا	٣٠
پودر گندم	٥
پودر ذرت	٥
روغن ماهی	٩
ویتامین[1]	٤
مواد معدنی[2]	١
پودر صدف *Crastoderma lamarki*	١
ترکیب بیوشیمیایی(درصد)	
پروتین خام	٤٢
چربی خام	١٧
خاکستر	١٩/٢
رطوبت	٢٢/٨

۱: مکمل ویتامینه پلاس مینرال شرکت ایران دارو (میلی‌گرم در کیلوگرم) : ویتامین A: ٦٠٠٠ واحد بین‌المللی بر کیلوگرم، ویتامین D: ٤٠٠٠ واحد بین‌المللی بر کیلوگرم، ویتامین E: ٤٥٠ واحد بین‌المللی بر کیلوگرم، ویتامین K: ١٠٠ واحد بین‌المللی بر کیلوگرم، ویتامین B: ١٢٢ میلی‌گرم بر کیلوگرم، تیامین: ٥، ریبوفلاوین: ١٥، پریدوکسین: ١٠، اسید پانتوتنیک: ٣٠، کولین کلرید: ٣٠٠، نیاسین: ١٥٠، اسید فولیک: ٥، بیوتین: ٢، اینوسیتول

۲ : مکمل معدنی شرکت سیانس (میلی‌گرم در کیلوگرم):

CaHPO4: 15, 2H2O: 20, CaCO3: 10, KH2PO4: 1, KCl:6, NaCl: 35, MnSO4H2O: 5.0, FeSO4 7H2O: 5.0, MgSO4: 3, KlO3: 3, CuSO4 5H2O: 10, ZnCO3: 35, CoCl2: 0027.0, Na2SeO3:1.

شمارش تعداد گلبولهای قرمز و سفید پس از رقیق‌سازی با استفاده از هموسیتومتر انجام شد. همچنین شمارش تفریق انواع گلبول‌های سفید (نوتروفیل، ائوزینوفیل، لنفوسیت و مونوسیت) پس از تهیه گسترش و رنگ‌آمیزی با رنگ گیمسا صورت پذیرفت (عامری مهابادی، ۱۳۷۸). درصد هماتوکریت براساس روش میکروهماتوکریت تعیین شد (Brown, 1998). مقادیر حجم متوسط گلبولی (MCV)، هموگلوبین متوسط سلولی (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) براساس فرمول‌های زیر مشخص گردید.

$$MCV = \frac{\text{هماتوکریت}}{RBC} \times 10$$

$$MCH = \frac{\text{هموگلوبین}}{RBC} \times 10$$

$$MCHC = \frac{\text{هموگلوبین}}{\text{هماتوکریت}} \times 100$$

میزان ایمونوگلوبولین براساس روش (Siwicki & Anderson, 1993) و لیزوزیم سرم براساس روش Ellis (۱۹۹۰) تعیین شد. جهت بررسی تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک و همچنین تعداد کل باکتری‌های بی‌هوازی و کل باکتری‌های زیست‌پذیر در میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی سفید با سطوح مختلف گلوکان بررسی شد. نمونه‌های روده پس از تخلیه کامل محتویات، توزین و به منظور هموژن نمودن به هاون چینی استریل منتقل گردید. پس از هموژن نمودن نمونه‌های روده با استفاده از محلول نمکی استریل (NaCl ۰/۸۷ درصد) رقت‌های $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-۷}$ تهیه گردید. از رقت‌های تهیه شده، تحت شرایط کاملاً استریل حجمی معادل ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شد و به محیط‌های کشت Tryptic Soy Agar یا TSA (به منظور تعیین تعداد کل باکتری‌های موجود در میکروبیوتای روده) و محیط کشت DeMan, Rogosa and Sharpe یا MRS (جهت تعیین تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک) منتقل و در سطح پلیت پخش شدند (Hoseinifar *et al.*, 2011). انکوباسیون پلیت‌ها به مدت ۵ روز در دمای اتاق انجام شد (Mahious *et al.*, 2006). پس از سپری شدن زمان انکوباسیون، باکتری‌های هر پلیت براساس مشخصات فنوتیپی شناسایی و شمارش شده و برحسب واحد کلنی (CFU) در گرم وزن روده محاسبه گردیدند (Peter & Sneath, 1986).

این تحقیق در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شده و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از برنامه‌های Excel و SPSS استفاده گردید. برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون Shapiro-Wilk استفاده شد. پس از مشخص شدن توزیع نرمال داده‌ها، جهت بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌داری بین تیمارها از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (One-Way ANOVA) استفاده گردید.

نتایج

اثرات گلوکان بر شاخص‌های خونی بچه ماهی سفید در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که این پری بیوتیک بر تعداد گلبول قرمز (RBC)، حجم متوسط گلبولی (MCV)، هموگلوبین متوسط گلبولی (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) تأثیر دارد ($P<۰/۰۵$). همانطور که جدول ۳ نشان داده شده است به جز ائوزینوفیل سایر گلبول‌ها اختلاف معنی‌داری را با شاهد نشان می‌دهند. بطوریکه بیشترین تعداد لنفوسیت‌ها (۱/۶۱±۷۵/۸۳ نانو در میلیمترمکعب) در تیمار ۰/۵ درصد و بیشترین میزان گلبول سفید در تیمار ۱ درصد (۱۰۰±۹۱۰۰ نانو در میلیمترمکعب) بدست آمد.

همانطور که در نمودار ۱ و ۲ مشخص شده است، استفاده از گلوکان در جیره غذایی بچه ماهی سفید بر سطوح ایمونوگلوبین سرم تأثیری نداشته ولی میزان لیزوزیم سرم را بطور معنی‌داری تغییر داده است، بطوریکه بیشترین میزان لیزوزیم در تیمار ۱ درصد با ۲/۵۲±۲۹/۶۷ میکروگرم در میلی‌لیتر و کمترین میزان آن با ۱/۰۴±۱۸/۱۷ میکروگرم در میلی‌لیتر در تیمار شاهد بدست آمد. نتایج بررسی میکروبیوتای روده بچه ماهی‌های سفید تغذیه شده با تیمارهای مختلف در نمودار های ۳ تا ۵ نشان داده شده است. بیشترین تعداد لاکتو باسیلوس‌ها در تیمار ۰/۵ درصد و کمترین تعداد در تیمار شاهد مشاهده شد. تیمار ۰/۵ درصد با (۰/۳۵±۴۸۰۰۰۰۰۰ (کلنی باکتری در گرم) بیشترین تعداد کل باکتری را دارا بود. بیشترین میزان باکتری‌های بی‌هوازی اجباری در تیمار شاهد و برابر با (۴۳۵۸۹±۳۰۰۰۰ (کلنی باکتری در گرم) و کمترین میزان در تیمارهای ۰/۵، ۱ و ۲ درصد مشاهده شد. همچنین نتایج بدست آمده موید افزایش معنی‌دار تعداد لاکتوباسیلوس‌ها در تیمار ۰/۵ درصد بود.

جدول۲: مقادیر شاخص‌های خونی بچه ماهی سفید در تیمارهای مختلف

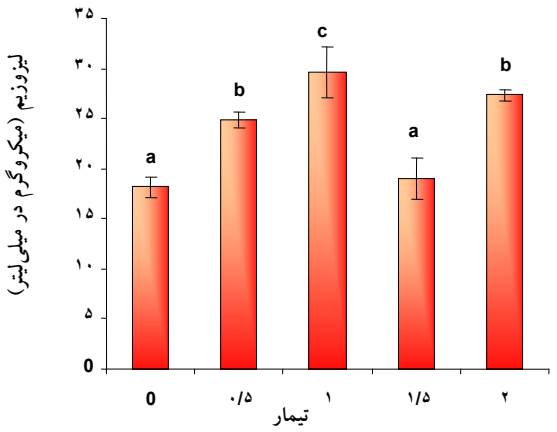
	تیمار صفر درصد	تیمار ۰/۵ درصد	تیمار ۱ درصد	تیمار ۱/۵ درصد	تیمار ۲ درصد
تعداد گلبول‌های فرمز (نانو در مترمکعب) × $۱۰^{۳}$	۹۶۳/۳۰±۵۵/۰۷ ^{a}	۱۴۰۰±۱۰۰ ^{d}	۱۹۴۶/۶۰±۴۵/۰۹ ^{c}	۱۷۸۰±۱۹۶/۷ ^{c}	۱۱۷۳/۳۰±۲۵/۱۶ ^{b}
هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر)	۴/۸۳±۰/۰۶ ^{a}	۸/۹۷±۰/۴ ^{d}	۸/۱۷±۰/۳ ^{d}	۶/۷۰±۰/۱ ^{c}	۶/۴۷±۰/۱۵ ^{b}
هماتوکریت (درصد)	۲۱/۳۰±۱/۵ ^{a}	۳۱/۳۰±۱/۱ ^{c}	۳۰/۳۰±۲/۵ ^{c}	۲۵/۳۰±۲/۵ ^{b}	۲۱±۱/۷ ^{a}
MCH (pg)	۴۵/۳۳±۱/۵۳ ^{a}	۶۶/۶۷±۱/۵۳ ^{b}	۶۵/۳۳±۱/۱۶ ^{b}	۴۶/۳۳±۱/۱۶ ^{a}	۴۱/۳۳±۳۰/۲ ^{a}
MCHC (درصد)	۲۵±۱ ^{a}	۲۶/۶۷±۳/۲ ^{b}	۲۸/۳۳±۲/ ^{c}	۲۶±۱/۷۳ ^{b}	۲۲±۲ ^{a}
MCV (fl)	۱۵۳±۵/۲ ^{a}	۲۵۳/۳۰±۱۰/۴ ^{d}	۲۱۵±۳/۶ ^{c}	۱۷۸/۷۰±۱/۱۵ ^{b}	۱۷۹±۱ ^{b}

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵).

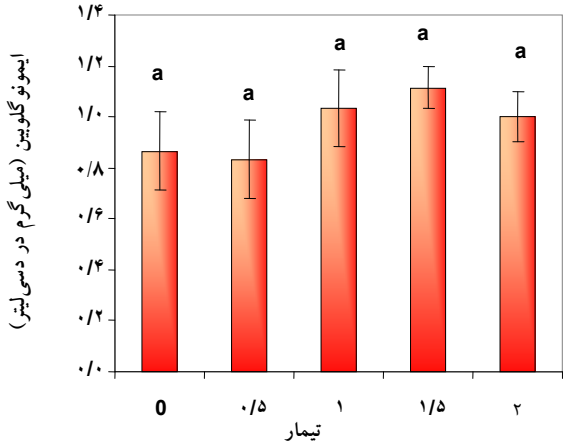
جدول ۳: شمارش افتراقی و تعداد کل گلبولهای سفید بچه ماهی سفید در تیمارهای مختلف گلوکان و شاهد

	تیمار صفر **درصد**	تیمار ۰/۵ **درصد**	تیمار ۱ **درصد**	تیمار ۱/۵ **درصد**	تیمار ۲ **درصد**
نوتروفیل (**درصد**)	۱۸±۱ ^{a}	۱۹/۶۷±۰/۵۸ ^{a}	۲۸/۱۷±۱/۷۶ ^{b}	۲۹/۳۳±۱/۱۶ ^{b}	۳۸/۴۰±۱/۶ ^{c}
ائوزینوفیل (**درصد**)	۱/۳۷±۰/۴ ^{a}	۱/۴۶±۰/۱۵ ^{a}	۱/۴۰±۰/۴ ^{a}	۱/۶۰±۰/۱۷ ^{a}	۱/۱۰±۰/۳ ^{a}
لنفوسیت (**درصد**)	۷۹/۴۰±۴/۱۳ ^{c}	۷۵/۸۳±۱/۶۱ ^{c}	۶۷/۴۳±۱/۵ ^{b}	۶۵/۳۰±۱/۵۳ ^{b}	۵۶±۲/۶۵ ^{a}
مونوسیت (**درصد**)	۱/۷۰±۰/۲۷ ^{a}	۲/۸۳±۰/۷۶ ^{b}	۲/۷۷±۰/۲۵ ^{b}	۳/۲۷±۰/۶۴ ^{b}	۴/۲۰±۰/۲ ^{c}
گلبول‌های سفید (نانو در مترمکعب)	۷۲۱۶/۶±۱۸۹/۶ ^{a}	۸۲۶۶/۶۷±۲۵۱/۶ ^{b}	۹۱۰۰±۱۰۰ ^{c}	۹۳۰۰±۵۱۹/۶ ^{c}	۹۴۶۶/۶۰±۴۵۰/۹ ^{c}

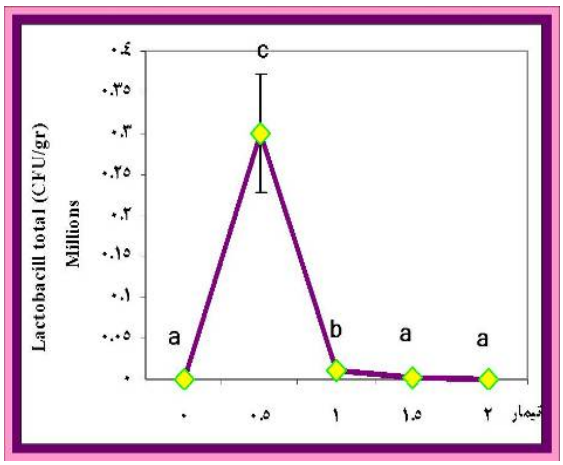
حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵).



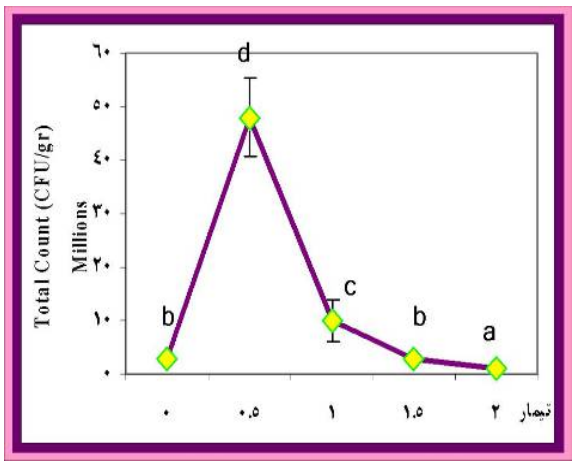
نمودار ۱: تغییرات شاخص ایمنی لیزوزیم خون بچه ماهی سفید در تیمارهای مختلف



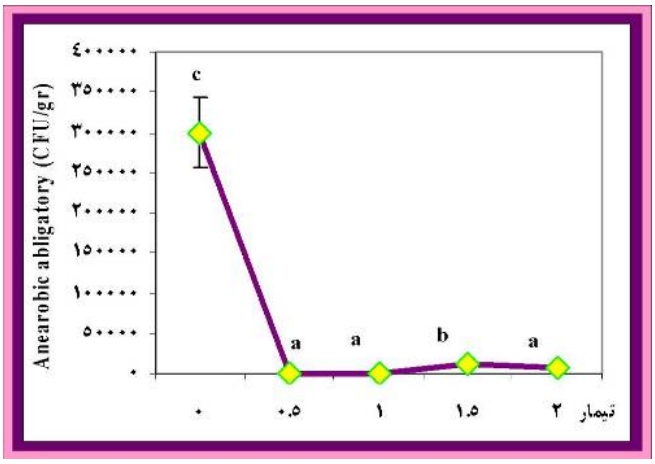
نمودار ۲: تغییرات شاخص ایمونوگلبولین خون بچه ماهی سفید در تیمارهای مختلف



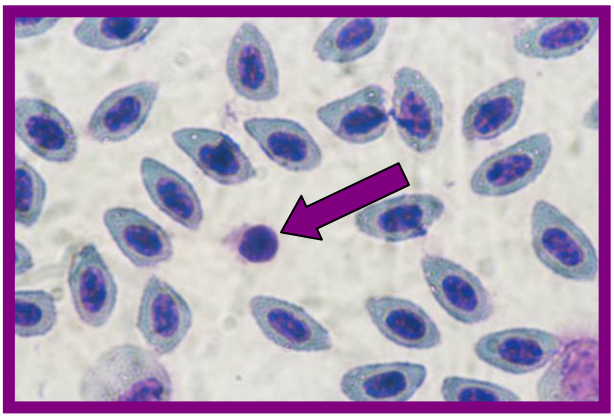
نمودار ۳: تعداد لاکتوباسیلوس‌های میکروبیوتای روده در تیمارهای مختلف
(بارها نمایانگر انحراف معیار هستند)



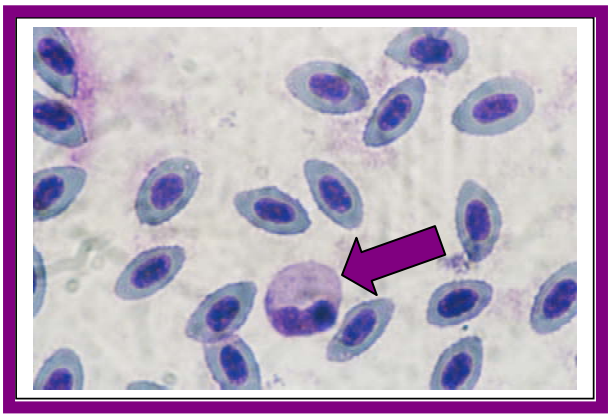
نمودار٤: تعداد کل باکتریهای میکروبیوتای روده در تیمارهای مختلف
(بارها نمایانگر انحراف معیار هستند)



نمودار ۵: تعداد کل باکتری‌های بی‌هوازی میکروبیوتای روده در تیمارهای مختلف



شکل ۱: لنفوسیت خون بچه ماهی سفید با درشت نمایی ۱۰۰



شکل ۲: نوتروفیل خون بچه ماهی سفید با درشت نمایی ۱۰۰

بحث

تقویت سیستم ایمنی ذاتی یا غیراختصاصی برای ماهیان پرورشی بسیار حائز اهمیت است، چرا که ماهی‌ها تحت شرایط پرورشی در برابر بسیاری از عوامل باکتریایی فرصت طلب و دیگر استرس‌ها آسیب‌پذیر هستند. همچنین بیماری‌زایی یک عامل بیماریزای مهاجم به قابلیت سیستم ایمنی میزبان برای مبارزه با آن بستگی دارد (Dixon & Stet, 2001). براساس نتایج بدست آمده بیشترین تعداد گلبول‌های سفید در تیمار ۱ درصد مشاهده شد که بطور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود. گلوکان‌ها از طریق اتصال به رسپتورهای خاصی روی سطح سلول‌های مونوسیت، ماکروفاژ و نوتروفیل بر ایمنی ذاتی اثر می‌گذارند (Muller *et al.*, 2000). بررسی‌ها نشان داده است که تحریک گلبول‌های سفید در ماهیان و صدف‌ها سبب بالارفتن میزان تولید آنتی بادی را سبب می‌شود (Galina *et al.*, 2009). نتایج همچنین حاکی از افزایش معنی‌دار درصد هماتوکریت و تعداد گلبول قرمز در تیمار ۱ درصد بود. در بررسی انجام شده بر گربه ماهی روگاهی (*Ictalurus punctatus*) افزایشی در میزان هماتوکریت و هموگلوبین در تیمار تغذیه شده با سطح ۱ گرم درکیلوگرم ماکروگارد (حاوی بتا گلوکان) درمقایسه با گروه شاهد دیده شده است (Welker *et al.*, 2007). براساس نتایج بدست آمده، بیشترین حجم گلبول قرمز و غلظت هموگلوبین گلبول‌ها در تیمارهای ۰/۵ و ۱ درصد بدست آمد. Andrews و همکاران (۲۰۰۹) اختلاف معنی‌داری را در تعداد گلبول‌های قرمز و میزان هموگلوبین ماهی روهو (*L. rohita*) تغذیه شده با سطوح ۱، ۲ و ۴ درصد مانان الیگوساکارید (محرک ایمنی با منشاء دیواره سلولی مخمر) گزارش نمودند.

از آنجاکه افزایش گلبول‌های سفید، هماتوکریت و گلبول قرمز را نیز می‌توان شاخص‌های افزایش ایمنی غیراختصاصی سلولی بیان داشت (Raa *et al.*, 1996) لذا می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از گلوکان در جیره‌ی بچه ماهی سفید افزایش ایمنی غیراختصاصی را بدنبال خواهد داشت. در مطالعات پیشین درخصوص استفاده از گلوکان در آبزی‌پروری نیز در اکثر موارد ایمنی غیراختصاصی سلولی (فعالیت فاگوسیتوزی، لنفوسیت، نوتروفیل و مونوست) و غیراختصاصی خونی (لیزوزیم، میلیو پراکسیداز و هموگلوتینین) افزایش معنی‌دار داشته است (Selvaraj *et al.*, 2005a,b ;Kumari & Sahoo, 2006; Rodriguez *et al.*, 2009 ;Misra *et al.*, 2006a).

نتایج این بررسی نشان دادند که برغم افزایش میزان ایمونوگلبولین در تیمار ۱، ۱/۵ و ۲ درصد اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نشد. در بررسی‌های مشابه در موارد محدودی شاخص‌های ایمنی اختصاصی، افزایش معنی‌داری را پس از مصرف این دسته از مکمل‌های نشان داده‌اند که می‌توان از آن جمله به تحقیق Cuesta و همکاران (۲۰۰۴) بر ماهی سیم دریایی (*Sparus aurata*) با مخمر آبجو (با ماده موثره گلوکان) اشاره کرد که پس از پایان دوره بررسی IgM خون بالا رفت. همچنین در تحقیق دیگری نیز استفاده از پربیوتیک فروکتوالیگوساکارید در پرورش ماهی کلمه سبب افزایش Ig در مقایسه با گروه شاهد شد (Soleimani *et al.*, 2012).

افزایش معنی‌دار لیزوزیم سرم در تیمارهای ۰/۵ و ۱ درصد در این بررسی نشان از افزایش ایمنی غیراختصاصی طی مصرف گلوکان در بچه ماهی سفید است. در بررسی مشابه‌ای روی بچه ماهی انگشت قد *Labeo rohita*، سطوح مصرفی ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بتا گلوکان در کیلوگرم در جیره‌ی غذایی باعث افزایش معنی‌دار لیزوزیم سرم و تعداد گلبول سفید گردید (Misra *et al.*, 2006b). تزریق ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بتاگلوکان طی ۲ هفته ۴ بار در این ماهی سبب افزایش ایمنی غیراختصاصی، افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماریزا *Aearomonas hydrophilla* و *Edvardzilla tarad* شد (Misra *et al.*, 2006a). گزارش‌های متعددی نشان دادند که گیرنده‌های گلوکان در ماهیان روی ماکروفاژها، مونوسیت و نوتروفیل قرار دارند (Raa *et al.*, 1996). اتصال بتاگلوکان به گیرنده‌های سلولی، فرآیند بیگانه خواری را از طریق فعال سازی مسیرهای کمپلمان تقویت می‌کند (Herre *et al.*, 2004).

همانطور که در نمودارهای ۳، ۴ و ۵ نشان داده شده است تحریک رشد باکتری‌های مفید از جمله باکتری‌های اسید لاکتیک در میکروبیوتای روده‌ای طی این بررسی ۶۰ روزه مشاهده گردید که این نتایج هم‌راستا با مطالعات پیشین بوده و موید تأثیر پربیوتیک‌ها بر افزایش تعداد و غالبیت باکتری‌های مفید میکروبیوتای بومی دستگاه گوارش و به تبع آن اثر بر ایمنی غیراختصاصی است (Sang *et al.*, 2011; Soleimani *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). با توجه به این نتایج

ناتوانی میکروبیوتای روده‌ای در تخمیر مقادیر اضافی پربیوتیک و تجمع آنها در روده را می‌توان دلیل احتمالی بی‌تأثیر بودن سطوح بالاتر پربیوتیک در مقایسه با تیمارهای ۰/۵ و ۱ درصد بیان داشت (Olsen *et al.*, 2001 ;Cerezuela *et al.*, 2008). علاوه بر این طول دوره‌ی بررسی، نحوه اجرا، میزان مصرف پربیوتیک، وضعیت فیزیولوژیک، اندازه، سن و گونه‌ی ماهی و شرایط محیطی و رژیم غذایی مورد بررسی می‌تواند نتایج را تحت تاثیر قرار دهد (Ringø *et al.*, ;Ibrahem *et al.*, 2010 2010). بطوریکه مقایسه تأثیر مقدار کم (۰/۰۹درصد) با مقدار زیاد (۰/۱۸ درصد) بتا گلوکان در جیره غذایی ماهی شوریده زرد بزرگ *Pseudosciaena crocea* بر ایمنی غیراختصاصی و نیز ایجاد مقاومت در برابر باکتری *V. harveyi* نشان داد که میزان پایین بطور معنی‌داری منجر به افزایش ایمنی می‌شود (Ai *et al.*, 2007). نتیجه مشابه‌ای نیز در بررسی بر کپور هندی *Catla catla* نیز بدست آمده است (Dibyendu *et al.*, 2008). بیشترین میزان لیزوزیم سرم در تیمار ۰/۵ گرم در کیلوگرم گلوکان در جیره‌ی غذایی بدست آمد و میزان ۱ گرم در کیلوگرم نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.

همچنین در خصوص طول دوره بکارگیری نیز بررسی‌ها حاکی از آن است که اثرات بکارگیری کوتاه مدت (۱۵ روزه) و طولانی مدت (۳۵ هفته) سطح ۰/۱ درصد ماکروگارد (ترکیب حاوی بتاگلوکان و ارگوسان) بر پاسخ ایمنی ماهی سوف دریایی (*D. labrax*) نشان داد که بیشترین میزان لیزوزیم،گلبول‌های سفید بخصوص لنفوسیت‌ها در بررسی‌های کوتاه مدت بدست آمده و استفاده طولانی مدت این اختلاف معنی‌دار را ایجاد نمی‌کند (Bagni *et al.*, 2005).

براساس نتایج بدست آمده و با توجه به اثرات محرک ایمنی و نیز بهبود ترکیب میکروبیوتای روده‌ای بچه ماهی سفید در اثر استفاده از مکمل غذایی حاوی گلوکان می‌توان استفاده از آن را در مرحله پرورش پیش از رهاسازی به دریا توصیه کرد. با این حال استفاده از این مکمل غذایی تحت شرایط پرورش در استخر پرورشی و از طریق تزریق نیز می‌بایست در تحقیقات آتی بررسی شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از کلیه پرسنل زحمتکش ایستگاه تحقیقاتی تغذیه و غذای زنده‌ی بندر انزلی و جناب آقای مهندس مهران الماسی بدلیل حمایت مالی از این تحقیق تشکر می‌نماییم.

منابع

حسینی‌فر، ح.؛ میرواقفی، ع. و مجازی‌امیری، ب.؛ خوشباوررستمی، ح. و درویش بسطامی، ک.، ۱۳۹۰. بررسی تاثیر پربیوتیک الیگوفروکتوز بر پاره‌ای از شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی، سرمی و آنزیم‌های کبدی بچه فیل ماهی (*Huso huso*). مجله علمی شیلات ایران، سال بیستم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۰، صفحات ۲۷ تا ۳۶.

عامری مهابادی، م.، ۱۳۸۷. روشهای آزمایشگاهی هماتولوژی دامپزشکی. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۱۲۶ صفحه.

Ai Q., Mai K., Zhang L., Tan B., Zhang W., Xu W. and Li H., 2007. Effect of dietary B-1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). Fish and Shellfish Immunology, 22:394-402.

Andrews S.R., Sahu N.P. and Pal A.K., 2009. Growth of *Labeo rohita* fingerlings: Effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. Aquaculture Research, 41:61-69.

Bagni M., Romano N., Finoia M.G., Abelli L., Scapigliati G. and Tiscar P.G., 2005. Short- and long-term effects of a dietary yeast ßglucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Fish and Shellfish Immunology, 18:311-325.

Brown B.A., 1988. Routine hematology procedures. *In*: (B.A. Brown ed.). Hematology: Principle and procedures. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, USA. pp.7-122.

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

Cataldi E., Barzaghi C., Dimarco P., Boglione C., Dini L., Kenzie D.J., Bronz P. and Cataudella S.,1999. Some aspects of osmotic and ionic regulation in Adriatic sturgeon, *Acipenser naccarii*; Ontogenesis of salinity tolerance. Journal of Applied Ichthyology, 15:57-60.

Cerezuela R., Cuesta A., Meseguer J. and Ángeles Esteban M., 2008. Effects of inulin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune parameters. Fish and Shellfish Immunology, 24:663-8.

Cook M.T., Hayball P.J., Hutchinson W., Nowak B.F. and Hayball J.D., 2003. Administration of a commercial immunostimulant preparation, Eco burst Activa TM as a feed supplement enhances macrophage respiratory and growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider) in winter. Fish and Shellfish Immunology, 14:333–345.

Cuesta A., Mesenguer J. and Esteban M.A., 2004. Total serum Immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata* L.). Veterinary Immunology and Immunopathology, 101:203-210.

Dibyendu K., Siddhartha N. Joardar, Bimal C Mal and Tapas K. Maiti, 2008. Effects of a glucan from the edible mushroom (*Pleurotus florida*) as an immunostimulant in farmed Indian major carp (*Catla catla*). Israeli Journal of Aquaculture, 60(1):37-45.

Dixon B. and Stet R.J.M., 2001. The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. Developmental & Comparative Immunology. 25(8-9):683-699.

Di Luzio N., 1985. Update on the immune-modulating activities of glucans. Springer Semin Immunopathology, 8:387–400.

Ellis A.E., 1990. Lysozyme assays. In: J.S. Stolen; D.P. Fletcher; B.S. Anderson and W.B. Van Muiswinkel eds). Techniques in Fish Immunology. SOS Publication, USA. pp.101-103.

Gatlin D.M. III and Li P., 2004. Dietary supplementation of prebiotics for haelth management of hybrid stripped bass *morone chrysops* × *M. saxatilis*. Aqua Feeds Formul Beyond, 1(4):19–21.

Galina J., Yin G., Ardó L. and Jeney Z., 2009. The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. Fish Physiology and Biochemistry, 35(4):669-676.

Gibson G.R., Provert 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, 17:259-275.

Herre J., Gordon S. and Brown G.D., 2004. Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages. Molecular Immunology, 40:869–876.

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

Ibrahem M.D., Fathi M., Mesalhy S. and Abd EA., 2010. Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the resistance of Nile

tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish and Shellfish Immunology, 29:241-246.

Kumari J. and Sahoo P.K., 2006. Dietary immunostimulants influence specific immune response and resistance of healthy and immunocompromised Asian catfish *Clarias batrachus* to *Aeromonas hydrophila* infection. Diseases of Aquatic Organisms, 70 (1-2):63-70.

Mahious A.S., Gatesoupe F.J., Hervi M., Metailler R. and Ollevier F., 2006. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning Turbot (*Psetta maxima*). Aquaculture International, 14:219-229.

Meena D., Das P., Kumar S., Mandal S., Prusty A., Singh S., Akhtar M., Behera B., Kumar K. and Pal A., 2012. ß-Glucan: An ideal immunostimulant in aquaculture (a review). Fish Physiology and Biochemistry, pp.1-27.

Merrifield M., Dimitroglou A., Foey A., Davies S., Baker R., Bøgwald J., Castex M. and Ringø E., 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applicationsfor salmonids. Aquaculture, 302:1–18.

Misra C.K., Das B.K., Mukherjee S.C. and Pattnaik P., 2006a. Effect of multiple injections of ß-glucan on non-specific immune response and disease resistance in *Labeo rohita* fingerlings. Fish and Shellfish Immunology, 20:305-319.

Misra C.K., Das B.K., Mukherjee S.C. and Pattnaik P., 2006b. Effect of long term administration of dietary ß-glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. Aquaculture, 255(1-4):82-94.

Muller A., Raptis J., Rice P.J., Kalbfleisch J.H., Stout R.D., Ensley H.E., Browder W. and Williams D.L., 2000. The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1→3)-D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line. Glycobiology, 10:339–346.

Nakagawa Y., Ohno N. and Murai T., 2003. Suppression by Candida albicans beta-glucan of cytokine release from activated human monocytes and from T cells in the presence of monocytes. Journal of Infection Diseases, 187:710–730.

Olsen R.E., Myklebust R., Kryvi H., Mauhew T.M. and Ring E., 2001. Damaging effect of dietary inulin on intestinal enterocytes in arctic Charr (*Salvelinus alpinus*). Aquaculture Research, 32:931-934.

Peter H. **and Sneath** A**., 1986.** Bergeys manual of systematic bacteriology, 2:1104-1154.

Raa J., 1996. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. Fisheries Science, 4(3):229-288.

Ringø E., Olsen R., Gifstad T., Dalmo R., Amlund H., Hemre G. and Akkeakke AM., 2010. Prebiotics in aquaculture: A review. Aquaculture Nutrition,16:117-136.

Rodriguez I., Chamorro R., Novoa B. and Figueras A., 2009. ß-Glucan administration enhances disease resistance and some innate immune responses in zebrafish (*Danio rerio*). Fish and Shellfish Immunology, 27:369-373.

Sakai M., 1999. Current research status of fish Imunostimulants. Aquaculture, 172:63–92.

Sang H.M., Fotedar R. and Filer K., 2011. Effects of dietary mannan oligosaccharide on the survival, growth, immunity and digestive enzyme activity of freshwater crayfish. (*Cherax destructor* Clark 1936). Aquaculture Nutrition, 17(2):629-35.

Schley P.D. and Field C.J., 2002. The immune-enhancing effects of dietary fibers and prebiotics. British Journal Nutrition, 87:221–230.

Sealey W.M., Barrows F.T., Johansen K.A., Overturf K., LaPatra S.E. and Hardy R.W., 2007. Evaluation of the ability of partially autolyzed yeast and grobiotic-a to improve disease resistance in rainbow trout. North American Journal of Aquaculture, 69(4):400–406.

Selvaraj V., Sampath K. and Sekar V., 2005a. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology, 19:293–306.

Selvaraj V., Sampath K. and Sekar V., 2005b. Use of glucan from *Saccharomyces cerevisiae* as an immunostimulant in carp: Impact on hematology, phagocyte function and infection with *Aeromonas hydrophila*. Israeli Journal of Aquaculture, 57(1):39-48.

Siwicki A.K. and Anderson D.P., 1993. Non-specific defense mechanisms assay in fish: II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin level in serum. Disease diagnosis and prevention methods, FAO-project GCP/INT/JPA, IFI, Olsztyn, Poland. pp.105-112.

Soleimani N., Hoseinifar H., Merrifield D., Barati M. and Abadi Z., 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 and Shellfish Immunology, 32:316-321.

Soltanian S., Stuyven E., Cox E., Sorgeloos P. and Bossoer P., 2009. ß-Glucan as immunostimulant in vertebrates and invertebrates. Critical reviews in microbiology, 35(2):109–138.

Welker T., Lim C., Yildirim-Aksoy M., Shelby R. and Klesius P.H., 2007. Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri* challenge in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing commercial whole-cell yeast or yeast subcompanents. Journal of the World Aquaculture Society, 38(1):24-35.

Zhang Q., Tan B., Mai K., Zhang W., Ma H. and Ai Q., 2011. Dietary administration of Bacillus (*B. licheniformis* and *B. subtilis*) and isomaltooligosaccharide influences the intestinal microflora, immunological parameters and resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp, *Penaeus japonicus* (Decapoda: Penaeidae). Aquaculture Research, 42:943-52.

The effects of glucan on hematological parameters, immune response and intestinal microbiota of *Rutilus frisii kutum* fry

Rufchaie R.*[(1)]; Hoseinifar S.H.[(2)]; Sayad Borani M.[(3)]; Maghsodie Kohan H.[(4)]; Zamini A.A.[(5)] and Faeed M.[(6)]

R_rufchaie@yahoo.com

1, 3, 4 & 5- Inland Water Aquaculture Research Center, P.O. Box: 66 Bandar Anzali, Iran

2 - Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, P.O.Box: 336 Gorgan, Iran

3- Department of Fisheries and Aquaculture, Islamic Azad University, Lahijan Branch, P.O.Box:1616 Lahijan, Iran

Received: August 2012 Accepted: November 2012

Keywords: Heamatological parameters, Fish physiology, Nutrition, Iran

Abstract

The purpose of this study was to determine the effect of dietary glucan on some haematological parameters, immune response and intestinal microbiota of *Rutilus frisii kutum*. In the present study, various levels of ingredient so called Hoplit (0, 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0%) containing glucan was added to a basal formulated diet. Twenty and five kutum fry with a mean (±SD) weight of 1.15±0.06g were stocked in each experimental tank (100 l capacity) filled with 80 liter of water. Fish were fed on experimental diet for 56 days and biometry was performed every 15 days. At the end of the trial blood samples were collected for measurement of haematological parameters including: Red and white blood cells count, differential count of white blood cells, hematocrit and hemoglobin, and innate immune factors (Immunoglobulin and Lysozyme). Fries in 1.5% treatment had highest serum immunoglobins (Ig) and eosinophil, although when compared with control but with no significant differences. Highest MCHC, hematocrit and hemoglobin were observed in the 0.5 and 1% treatments and the highest MCV and red blood cell count were in 0.5 percent treatment. The highest white blood cells count and neutrophils was observed in 2% treatment. The highest and lowest levels of lysozyme activity were observed in 1% and control treatments, respectively. Evaluation of the total bacteria and LAB counts revealed significant increase in 0.5% treatment. According to these results administration of dietary glucan can be considered for stimulation of innate immune response of white fish fry.

*Corresponding author