بررسی شاخص‌های خون‌شناسی ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با نانوذرات آهن و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس

- **روح ا.. شیخ‌ویسی**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
- **سیدعلی‌اکبر هدایتی***: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
- **طاهره باقری**: گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، صندوق پستی: ٤٩٧١٧٩٩١٥١
- **علی جافرنوده**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: آذر ١٣٩٥ تاریخ پذیرش: اسفند ١٣٩٥

چکیده

تحقیق حاضر جهت ارزیابی شاخص‌های خون‌شناسی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با نانوذرات آهن و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس صورت گرفت. تعداد ٢٥٠ بچه‌ماهی کپورمعمولی به‌مدت ٤٢ روز در سه دسته ماهیان بدون پروبیوتیک و ماهیان دارای پروبیوتیک سطح A (١٠٦) و ماهیان دارای پروبیوتیک سطح B (١٠٧) تقسیم شدند. سپس هرکدام از گروه‌ها ٥٠ درصد غلظت کشنده نانو آهن به‌مدت ده روز اضافه شد. تعداد گلبول‌های قرمز و هم‌چنین میزان M.C.H و M.C.H.C هموگلوبین خون اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت (P<٠/٠٥)، به‌طوری‌که آهن باعث افزایش این شاخص‌ها و پروبیوتیک منجر به کاهش شاخص‌های مذکور گردیده است، ولی هماتوکریت در حضور پروبیوتیک و آهن کاهش معنی‌داری یافت (P<٠/٠٥). مقدار M.C.V در مواجهه با آهن کاهش یافت درحالی‌که پروبیوتیک روند افزایشی M.C.V را به‌دنبال داشت. نتایج حاکی از تاثیر پروبیوتیک بر کاهش لنفوسیت خون بود درحالی‌که آهن منجر به افزایش این میزان گردید. تیمارها بر شاخص ائوزینوفیل خون تاثیر معنی‌داری نداشت (P>٠/٠٥). ولی نتایج حاکی از تاثیر پروبیوتیک و آهن بر افزایش مونوسیت خون بود (P<٠/٠٥). نتیجه‌گیری کلی نشان داد که پروبیوتیک اثر کاهشی بسیاری از شاخص‌های خون‌شناسی داشته ولی در مقابل، آهن اثر افزایشی بر این شاخص‌ها داشت و در صورت ترکیب آهن و پروبیوتیک، اثر کاهشی این شاخص‌ها به‌وسیله پروبیوتیک جبران و یا حتی افزایش یافت که نشان از تاثیر مطلوب پروبیوتیک بر تعدیل اثرات نامطلوب نانوذرات آهن می‌باشد.

کلمات کلیدی: کپورمعمولی، خون‌شناسی، نانو ذرات فلزی، پروبیوتیک

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Hedayati@gau.ac.ir

مقدمه

پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی میکروبی زنده‌ای هستند که با بهبود بخشیدن به تعادل میکروبی میزبان، اثرات سودمندی بر سلامت آن دارند (Fuller، ۱۹۸۹). پس از مشخص شدن رابطه بین سلامتی و توازن باکتریایی روده، ایده‌ای تحت عنوان پروبیوتیک مطرح گردید که هدف از آن تغییر بالانس باکتریایی روده به سمت باکتری‌های بالقوه مفید بود (Colida و همکاران، ۲۰۰۲). به‌دنبال شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک در فلور باکتریایی روده ماهی و میگو در دهه اخیر و مشخص شدن نقش آن‌ها در سلامتی و رشد میزبان، اهمیت آن‌ها بیش از پیش مشخص شده و ایده‌ای به نام پروبیوتیک شکل گرفت (Gibson و Robertfroid، ۱۹۹۵).

توسعه سریع نانو و نانو تکنولوژی در سال‌های اخیر افق جدیدی به روی بسیاری از صنایع و بخش‌های مختلف گشوده که سرچشمه انقلاب صنعتی جدید گردیده است. اندازه کوچک این ذرات می‌تواند به تغییرات اساسی در ساختار و خواص این عناصر منجر شود به‌طوری که تا امروز صدها تولیدات جدید برای اهداف مختلف در زمینه فناوری نانو ساخته‌شده است. ورود این فناوری به عرصه آبزی‌پروری و استفاده کاربری از آن در بسیاری از کشورها گسترش یافته است. نانو ذرات می‌توانند از جدار رگ‌های خونی و هم‌چنین جفت عبور کنند در نتیجه، به‌راحتی می‌توانند با ملکول‌های مستقر بر روی سطح یا داخل سلول‌ها تعامل داشته باشند. این مسئله باعث می‌شود سلامتی موجودات زنده زیادی تحت تاثیر قرار گیرد (Cheraghi و همکاران ، ۲۰۰۴).

کپور ماهیان گروهی از با ارزش ترین ماهیان آب شیرین از لحاظ اقتصادی می‌باشند و فراوانی بسیار زیادی در آب‌های شیرین دارند. این ماهیان به‌صورت گسترده در سرتاسر نقاط دنیا، مورد تکثیر و پرورش قرار می‌گیرند. احتمالاً ماهی کپورمعمولی اولین گونه‌ای از ماهیان است که از زادگاهش به سایر نقاط دنیا معرفی شده است. وجود دو جفت سبیلک در اطراف دهان، باله پشتی ممتد و ۳۴ تا ۴۰ فلس بر روی خط جانبی از مشخصات ویژه کپور معمولی است (Billard، ۱۹۹۵). Behara و همکاران (۲۰۱۳) طی تحقیقی از نانو آهن به‌عنوان ماده افزودنی به غذای ماهی کپور هندی، *Labeo rohita* استفاده نمودند و پارامترهای ایمنی و خونی این ماهی را مورد بررسی قرار دادند. هدایتی و همکاران (۱۳۹۲) به بررسی اثرات سمیت کشنده نانواکسید روی، نانو اکسید مس (CuO NPs) و نانو دی‌اکسید تیتانیوم و بررسی اثرات سمیت تحت کشنده آن‌ها بر فاکتورهای خون و بافت آبشش ماهی قرمز، کپور معمولی و کلمه (*Rutilus rutilus*) پرداختند. لذا با توجه به نوظهور بودن فلزات سنگین آن‌هم در مقیاس نانو و اثر سمیت آن‌ها و از طرف دیگر تاثیرات مثبت پروبیوتیک در تقویت آبزیان در برابر آلاینده‌ها این تحقیق به‌منظور بررسی شاخص‌های خون ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با نانوذرات آهن و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس صورت گرفت.

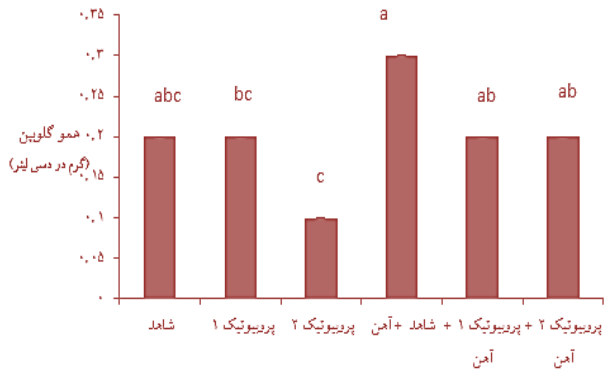
مواد و روش‌ها

این تحقیق به‌مدت ۶۰ روز (یک هفته برای آداپته شدن،۴۲ روز تغذیه با پروبیوتیک،۱۰روز در معرض نانو ذرات آهن) در محل مرکز تحقیقات آبزی‌پروری شهید ناصر فضلی برآبادی گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. ابتدا تعداد ۲۵۰ بچه ماهی کپورمعمولی با محدوده وزنی حدود ۲۰ گرم از مراکز تکثیر و پرورش بخش خصوصی تهیه گردید. بعد از ضدعفونی و آماده‌سازی آکواریوم‌ها، آبگیری آن‌ها صورت گرفت. سپس به آکواریوم‌های آزمایشگاه منتقل شدند. برای سازگار شدن با محیط آزمایش به‌مدت یک هفته در داخل مخازن پرورشی نگه‌داری شدند. در طول دوره آزمایش فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب اندازه‌گیری شد که شامل دمای آب ۱±۲۱ درجه سانتی‌گراد، pH ۶/۷-۷/۹، غلظت اکسیژن محلول ۹-۷ میلی‌گرم در لیتر و سختی آب ۲۱۰ میلی‌گرم کربنات کلسیم در لیتر بود. بعد از گذشت یک هفته از دوره سازگاری، ماهیان در سه دسته ماهیان بدون پروبیوتیک و ماهیان دارای پروبیوتیک سطح A (10^6) و ماهیان دارای پروبیوتیک سطح B (10^7) تقسیم شدند. اضافه کردن پروبیوتیک لاکتو باسیلوس به غذا با روش اسپری کردن به‌میزان یک گرم بر کیلوگرم صورت گرفت، به این صورت که ابتدا میزان ۲ گرم پودر ژلاتین را به آب اضافه کرده و پس از حل شدن پودر در آب مقادیر مورد نیاز پروبیوتیک را که از قبل توزین و آماده شده بود، به محلول آب و پودر ژله اضافه شد. در نهایت پس از حل شدن پروبیوتیک، محلول آماده شده بر غذای تجاری اسپری شد. بعد از گذشت ۴۲ روز به هرکدام از گروه‌ها ۵۰ درصدغلظت کشنده نانو آهن به‌مدت ده روز اضافه شد که در مجموع ۶ تیمار با ۳ تکرار طراحی شد. هم‌چنین لازم به یادآوری است تعویض آب روزانه ۷۰ درصد حجم مخازن صورت گرفت و غلظت سم در هر یک از تیمارها حفظ شد. غذادهی روزانه ۲/۵ درصد وزن بدن صورت گرفت (Di Giulio و Hinton، ۲۰۰۸). در پایان آزمایش و بعد از طی دوره ۵۲ روز، از هر تیمار ۳ نمونه ماهی خون گرفته شد. جهت نمونه‌برداری، ماهیان در داخل تشت‌های پلاستیکی محتوی آب هم‌سان با آکواریوم هر ماهی که دارای ماده بی‌هوش کننده یوژینول بود، بی‌هوش شدند. جهت اندازه‌گیری فاکتورهای خونی، با استفاده از سرنگ از ماهی (از ورید ساقه‌دمی) خونگیری صورت گرفت (Fiess و همکاران، ۲۰۰۷). پس از خونگیری، خون به ویال‌های ۱/۵ سی‌سی منتقل شد. ویال‌ها در

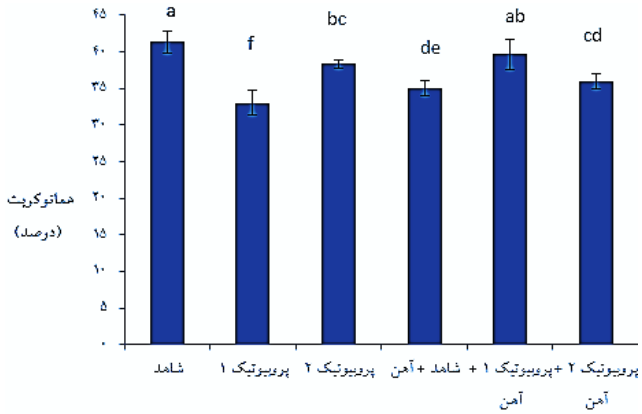
مجاورت یخ جهت تعیین میزان هموگلوبین، درصد هماتوکریت، شمارش افتراقی گلبول‌های سفید، مقادیر گلبول‌های قرمز و سفید خونی داخل لوله هپارینی جداگانه نگه‌داری و شاخص‌های مورد نظر سنجیده شد. برای شمارش افتراقی پس از تهیه گسترش مناسب از خون، گسترش‌ها به‌روش گیمسا رنگ‌آمیزی شدند. هموگلوبین به روش سیان مت‌هموگلوبین با اسپکتوفتومتر سنجیده شد. درصد هماتوکریت نمونه‌های خون، پس از سانتریفوژ کردن تعیین گردید، دراین‌روش لوله‌های هماتوکریت در شیارهای مخصوص در سانتریفیوژ قرار گرفت به‌طوری‌که انتهای مسدود لوله به سمت خارج از مرکز و کاملاً در تماس با محیط محوطه سانتریفوژ بود. سپس درپوش را قرار داده، لوله‌ها به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند (Lee و همکاران، ۲۰۰۶). تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون چند دامنه دانکن انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار spss نسخه ۱۶ در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام شد. نتایج به‌صورت میانگین± انحراف معیار بیان گردید.

نتایج

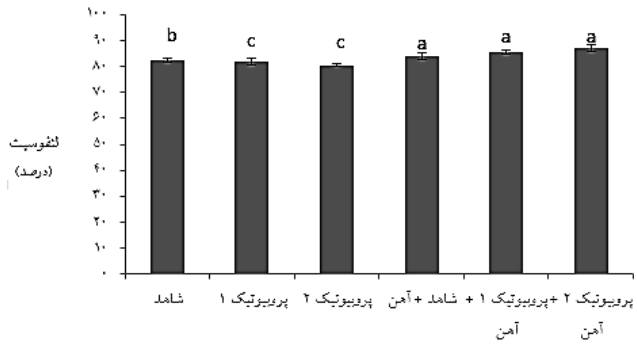
بررسی تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر شاخص هموگلوبین خون تاثیر معنی‌داری داشت ($P<0/05$)، به‌طوری‌که هموگلوبین خون با میزان ۰/۳ در تیمار چهار بالاترین و ۰/۱ در تیمار سه پایین‌ترین میزان را داشت که پروبیوتیک منجر به کاهش هموگلوبین گردید، درحالی‌که آهن به تنهایی منجر به افزایش هموگلوبین خون گردیده است. در تیمارهای ترکیبی، پروبیوتیک به‌خوبی توانسته بود اثرات افزایشی آهن را تعدیل نموده و به‌میزان اولیه برساند (شکل۱).



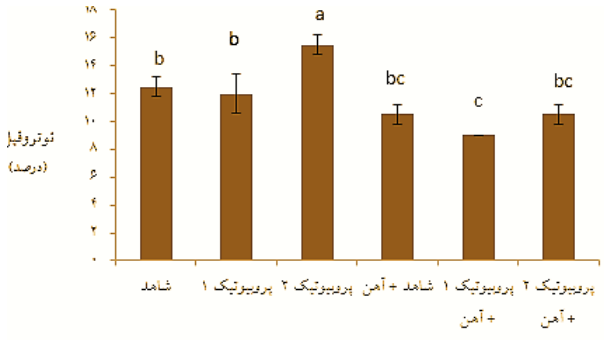
شکل ۱: میزان هموگلوبین خون ماهی کپور معمولی در تیمارهای مختلف آزمایشی



شکل ۲: میزان هماتوکریت خون ماهی کپور معمولی در تیمارهای مختلف آزمایشی



شکل ۳: میزان لنفوسیت خون ماهی کپور معمولی در تیمارهای مختلف آزمایشی



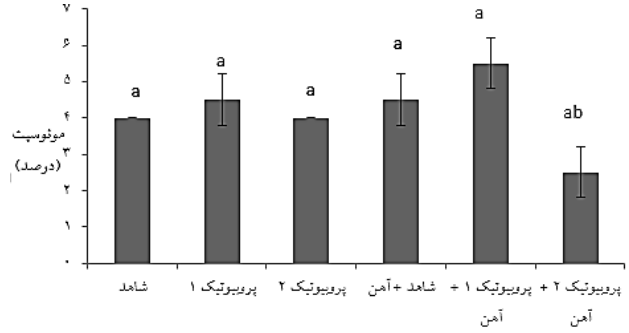
شکل ۴: میزان نوتروفیل خون ماهی کپور معمولی در تیمارهای مختلف آزمایشی

حروف انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است.

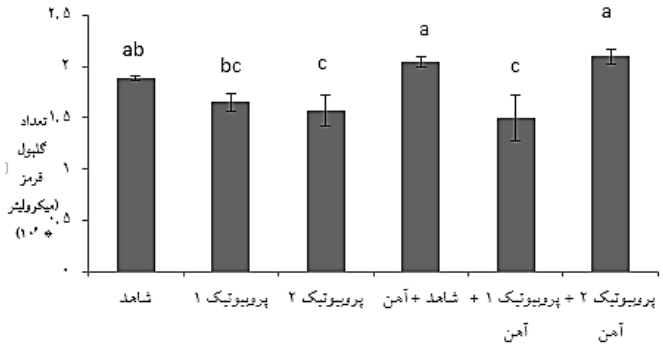
بررسی تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر شاخص هماتوکریت خون تاثیر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که هماتوکریت خون با میزان ۴۱/۳۳ در تیمار یک بالاترین و ۳۳ درصد در تیمار دو پایین‌ترین میزان را داشت که حاکی از تاثیر پروبیوتیک و آهن به تنهایی و به‌صورت ترکیبی بر کاهش هماتوکریت خون بود (شکل۲).

بررسی تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر شاخص لنفوسیت خون تاثیر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که لنفوسیت خون با میزان ۸۷ درصد در تیمار شش بالاترین و ۸۰/۵ درصد در تیمار سه پایین‌ترین میزان را داشت که حاکی از تاثیر پروبیوتیک بر کاهش لنفوسیت خون بوده درحالی‌که آهن به تنهایی و به‌صورت ترکیبی منجر به افزایش لنفوسیت خون گردید (شکل ۳)

بررسی تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر شاخص نوتروفیل خون تاثیر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که نوتروفیل خون با میزان ۱۵/۵ درصد در تیمار سه بالاترین و ۹ درصد در تیمار پنج پایین‌ترین میزان را داشت که حاکی از تاثیر پروبیوتیک بر افزایش نوتروفیل و آهن بر کاهش نوتروفیل خون بود، درحالی‌که تیمار ترکیبی آهن و پروبیوتیک منجر به کاهش لنفوسیت خون گردید (شکل۴). بررسی تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر شاخص مونوسیت خون تاثیر معنی‌داری جزئی داشت (P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که مونوسیت خون با میزان ۵/۵ درصد در تیمار پنج بالاترین و ۲/۵ درصد در تیمار شش پایین‌ترین میزان را داشت که حاکی از تاثیر غیریکنواخت پروبیوتیک و آهن بر تغییرات مونوسیت خون بوده است (شکل ۵).



شکل ۵: میزان مونوسیت خون ماهی کپور معمولی در تیمارهای مختلف آزمایشی



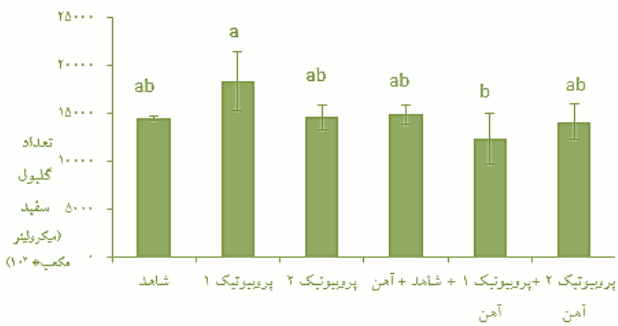
شکل ۶: میزان گلبول قرمز خون ماهی کپور معمولی در تیمارهای مختلف آزمایشی

حروف انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است.

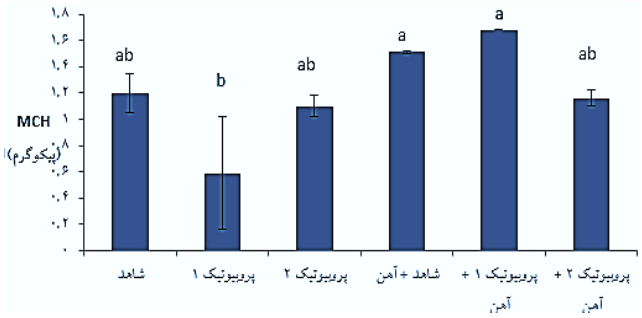
بررسی تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر شاخص ائوزینوفیل خون تاثیر معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵)، به‌طوری‌که ائوزینوفیل خون با میزان ۱/۵ درصد در تیمار دو بالاترین و صفر در تیمار یک، سه، پنج و شش پایین‌ترین میزان را داشت. در مورد گلبول‌های قرمز بررسی تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر شاخص گلبول قرمزخون تاثیر معنی‌داری داشت(P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که گلبول قرمزخون با میزان ۲/۰۴ در تیمار چهار بالاترین و ۱/۵ در تیمار پنج پایین‌ترین میزان را داشت که نشان‌دهنده تاثیر پروبیوتیک بر کاهش تعداد گلبول قرمز و آهن باعث افزایش آن گردید درحالی‌که در تیمار ترکیبی نیز منجر به افزایش گلبول قرمزخون گردید (شکل ۶).

بررسی تجزیه وتحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر شاخص گلبول سفید خون تاثیر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که میزان گلبول سفید خون با میزان ۱۸۳۲۵ در تیمار دو بالاترین میزان و ۱۲۴۲۵ در تیمار پنج پایین‌ترین میزان را داشت (شکل ۷).

بررسی تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر شاخص MCH خون تاثیر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که MCH خون با میزان ۱/۶۸ در تیمار پنج بالاترین و ۰/۵۹ در تیمار دو پایین‌ترین میزان را داشت که حاکی از تاثیر پروبیوتیک به تنهایی بر کاهش MCH خون و تاثیر آهن به تنهایی بر افزایش MCH بوده درحالی‌که ترکیب پروبیوتیک و آهن تاثیرات کاهشی پروبیوتیک را خنثی نموده و حتی منجر به افزایش MCH خون گردید (شکل ۸).



شکل ۷: میزان گلبول سفید خون ماهی کپور معمولی در تیمارهای مختلف آزمایشی

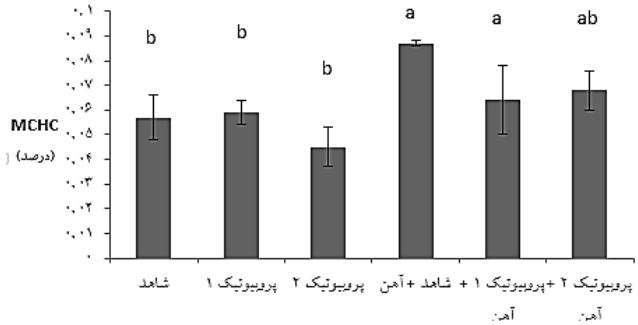


شکل ۸: میزان MCH خون ماهی کپور معمولی در تیمارهای مختلف آزمایشی

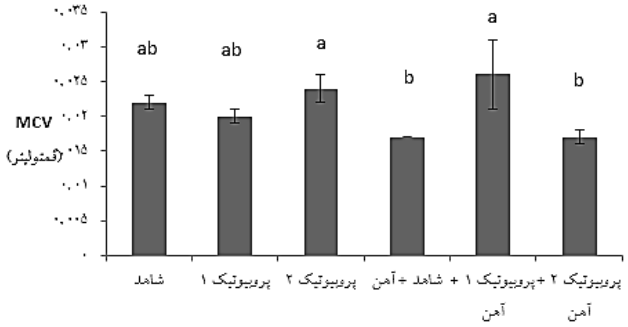
حروف انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است.

بررسی تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر شاخص MCHC خون تاثیر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که MCHC خون با میزان ۰/۰۸۷ در تیمار چهار بالاترین و ۰/۰۴۵ در تیمار سه پایین‌ترین میزان را داشت که حاکی از عدم تاثیر پروبیوتیک به تنهایی بوده درحالی‌که آهن به تنهایی تاثیرات افزایشی داشته ولی ترکیب آهن و پروبیوتیک تاثیرات افزایشی آهن بر MCHC را خنثی نموده است (شکل ۹).

بررسی تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر شاخص MCV خون تاثیر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که MCV خون با میزان ۰/۰۲۶ در تیمار پنج بالاترین و ۰/۰۱۷ در تیمارهای چهار و شش پایین‌ترین میزان را داشت که حاکی از تاثیر آهن بر کاهش MCV خون بوده درحالی‌که پروبیوتیک روند افزایش MCV را به‌دنبال داشت (شکل ۱۰).



شکل ۹: میزان MCHC خون ماهی کپور معمولی در تیمارهای مختلف آزمایشی



شکل ۱۰: میزان MCV خون ماهی کپور معمولی در تیمارهای مختلف آزمایشی

حروف انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است.

بحث

شاخص‌های خونی ماهیان به عوامل مختلفی از قبیل گونه، اندازه، سن، وضعیت فیزیولوژیکی، شرایط محیطی، رژیم غذایی (کمیت و کیفیت غذا، مواد تشکیل‌دهنده جیره، منابع پروتئینی، ویتامین‌ها و محرک‌های رشد) بستگی دارد (Lim و همکاران، ۲۰۰۰). البته مطالعات کمی در مورد شاخص‌های خونی ماهیان در پاسخ به محرک‌های رشد (پروبیوتیک‌ها، اسیدهای آلی) در دسترس می‌باشد (Ringo و همکاران، ۲۰۱۰). در مطالعه حاضر، تعداد گلبول‌های قرمز و هم‌چنین میزان M.C.H و M.C.H.C هموگلوبین خون اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت (P<۰/۰۵). به‌طوری‌که آهن باعث افزایش این شاخص‌ها و پروبیوتیک منجر به کاهش شاخص‌های مذکور گردیده است. ولی هماتوکریت در حضور پروبیوتیک و آهن کاهش یافت که این کاهش هم اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت (P<۰/۰۵). کاهش شاخص‌های اریتروسیتی خون به‌دلیل کم‌خونی رخ می‌دهد. در طی کم خونی، کاهش در تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت مشاهده می‌شود که ممکن است به‌دلیل خونریزی، همولیز یا کاهش تولید گلبول‌های قرمز صورت پذیرد (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۲). که هم‌سو با نتایج حاضر است.

Firdaus و همکاران (۱۹۹۴) نشان دادند که فقدان آهن در رژیم غذایی یک نوع گربه ماهی (*Heteropneustes Fossilis*) باعث کاهش تعداد گلبول‌های خون گردید که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. Mohan و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که غلظت هموگلوبین خون جوجه‌های گوشتی با افزایش سطوح مختلف پروبیوتیک کاهش یافت که‌علت آن به‌خاطر رقابت پروبیوتیک با بدن برای تحصیل اسیدفولیک غذا ذکر شده است، بـه این صورت که اسیدفولیک غذا کم‌تر در دسترس بدن قرار می‌گیرد و به ایجاد علائم کم‌خونی منجر می‌شود. ناصری‌پور و همکاران (۱۳۸۷) نشان دادند که گلبول‌های قرمز و هموگلوبین در ماهیانی که با جیره غذایی حاوی آهن و پروبیوتیک تغذیه شده بودند، مقادیر بالاتری نسبت به تیمارهایی داشت که دارای سطوح کمی پروبیوتیک و آهن بودند که با نتایج حاضر مطابقت دارد. Raida و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که استفاده از بیوپلاس ۲-ب در قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر بیماری Yersinia ruckeri، اختلاف معنی‌داری در هماتوکریت تیمارهای پروبیوتیکی به‌وجود نمی‌آورد. Lim و Klesius (۲۰۰۰) نشان دادند که درصد هماتوکریت در گربه ماهی کانالی تغذیه شده با آهن اضافی در غذا، بیش‌تر می‌باشد.

مطالعه شاخص‌های M.C.H و M.C.H.C و M.C.V می‌تواند در تشخیص انواع کم‌خونی‌ها مفید باشد. در تحقیق حاضر میزان M.C.H و M.C.H.C بین تیمار شاهد و تیمارهای مورد آزمایش تاثیر معنی‌داری بود (P<۰/۰۵). پروبیوتیک به تنهایی باعث کاهش MCH خون و تاثیر آهن به تنهایی باعث افزایش MCH بوده درحالی‌که ترکیب پروبیوتیک سطح بالا و آهن تاثیرات افزایشی آهن را خنثی نموده و حتی منجر به کاهش MCH خون گردیده است. در ارتباط با M.C.H.C نتایج حاکی از عدم تاثیر پروبیوتیک به‌تنهایی بوده درحالی‌که آهن به‌تنهایی تاثیرات افزایشی داشته ولی ترکیب آهن و پروبیوتیک تاثیرات افزایشی آهن بر MCHC را کاهش داده است. پایین بودن مقدار M.C.V می‌تواند به‌عنوان یک پارامتر خونی مثبت باشد زیرا با کوچک شدن حجم گلبول‌های قرمز حرکت آن‌ها در رگ‌های خونی آسان‌تر و سریع‌تر می‌گردد و از ایجاد لخته جلوگیری می‌کند (آذری‌تاکامی، ۱۳۹۰). در تحقیق حاضر مقدار M.C.V در مواجهه با آهن باعث کاهش M.C.V خون شده درحالی‌که پروبیوتیک روند افزایشی M.C.V را به‌دنبال دارد.

شاخص‌های لوکوسیتی خون شامل گلبول‌های سفید از جمله لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها و ائوزینوفیل‌ها یکی از بخش‌های سیستم ایمنی غیراختصاصی سلولی هستند که نوسان در تعداد آن‌ها می‌تواند به‌عنوان یک شاخص مناسب در ارتباط با پاسخ ماهیان به عوامل استرس مطرح باشد (Ferguson و همکاران، ۲۰۱۰). فراوانی گلبول‌های سفید خون شاخص سلامت ماهی محسوب می‌گردد، زیرا آمادگی بدن در برابر دفاع سلولی را نمایان می‌سازد. اما افزایش شدید گلبول‌ها نیز بیانگر التهاب بالینی بوده و هجوم انگل‌ها و باکتری‌ها را نشان می‌دهد (Savari و همکاران، ۲۰۱۳). در پاسخ به استرس‌های موجود در محیط آبی، کاهش تعداد گلبول‌های سفید می‌تواند بیانگر سرکوب ایمنی موجود و افزایش میزان آن‌ها نشان‌دهنده پاسخ به استرس یا عفونت باشد (Adams، ۲۰۰۲). تحقیق حاضر نشان داد که تیمارهای آزمایش با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که پروبیوتیک‌باعث افزایش و آهن منجر به کاهش گلبول‌های سفید گردیده است.

لنفوسیت غالب‌ترین لوکوسیت افتراقی‌ماهیان و مسئول بسیاری از عملکردهای سیستم ایمنی است. لنفوسیت‌ها نسبت به سایر لکوسیت‌ها طول عمر زیادتری دارند و اغلب در مواجهه با آلودگی کاهش پیدا می‌کنند. در تحریک یا سرکوب سیستم ایمنی، لنفوسیت‌ها نشانگرهای زیستی کارآمدی محسوب می‌شوند (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۲). نتایج تحقیق حاضر حاکی از تاثیر پروبیوتیک بر کاهش لنفوسیت خون بوده درحالی‌که آهن منجر به افزایش این میزان گردیده است. به‌دلیل کاهش ائوزینوفیل و مونوسیت در خون، شناسایی آن‌ها بسیار مشکل است و استفاده از این شاخص‌ها در ردیابی اثرات آلاینده‌ها بسیار مشکل است (Evans، ۲۰۰۸). ائوزینوفیل ماهی همانند پستانداران در فاگوسیتوز و از بین بردن پاتوژن‌ها نقش دارد، اگرچه کاهش معنی‌دار ائوزینوفیل همگام با غلظت‌های مختلف آلاینده‌ها کم‌تر مشاهده شده است (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۲). که هم‌سو با نتایج تحقیق حاضر است.

در ارتباط با ائوزینوفیل و مونوسیت نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر شاخص ائوزینوفیل خون تاثیر معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). ولی در مورد مونوسیت نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر شاخص مونوسیت خون تاثیر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵)، و نتایج حاکی از تاثیر پروبیوتیک و آهن بر افزایش مونوسیت خون بوده است. در واکنش به القای آلودگی، نوتروفیل به کمک مولکول‌های چسبنده سطحی که با اپیتلیوم آوندی پیوند دارد به بافت‌ها وارد می‌شود. نوتروفیل وظایف زیادی از جمله فاگوسیتوز ذرات کوچک، پاسخ به التهاب، تجزیه آلاینده و پروسه‌های متابولیکی نظیر نابود کردن سلول‌ها را به‌عهده دارد. بنابراین افزایش نوتروفیل در مواجهه با آلاینده‌ها دور از انتظار نیست (Evans، ۲۰۰۸). که نتایج تحقیق حاضر با سایر محققان متفاوت است. بررسی تجزیه و تحلیل آماری داده‌های تحقیق حاضر نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر شاخص نوتروفیل خون تاثیر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵)، حاکی از تاثیر آهن بر کاهش نوتروفیل خون بوده درحالی

که پروبیوتیک (مخصوصاً پروبیوتیک ^{7}۱۰) منجر به افزایش لنفوسیت خون گردیده است.

نتیجه‌گیری کلی این تحقیق نشان داد که پروبیوتیک اثر کاهشی بر هموگلوبین، گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، M.C.H، M.C.H.C و لنفوسیت داشته ولی در مقابل، آهن اثر افزایشی بر این شاخص‌ها داشت و درصورت ترکیب آهن و پروبیوتیک، اثرافزایشی این شاخص‌ها به‌وسیله پروبیوتیک جبران و یا حتی افزایش یافت، به‌جز هماتوکریت که پروبیوتیک و آهن باعث کاهش آن شدند. هم‌چنین اثر پروبیوتیک بر M.C.V، گلبول سفید، مونوسیت و نوتروفیل افزایشی بود ولی آهن برخلاف پروبیوتیک اثر کاهشی بر این شاخص‌ها داشته به‌جز مونوسیت که آهن همانند پروبیوتیک باعث افزایش آن گردیده است. تفاوت‌های موجود در نتایج تحقیق و نتایج سایر محققان احتمالاً به گونه پرورشی، اندازه، سن، گونه پرورشی، طول دوره پرورش، شرایط محیطی، رفتارهای تغذیه‌ای و خصوصیات فیزیولوژیک آبزی پرورشی مرتبط دانست.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد و با حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان صورت گرفت.

منابع

۱. **آذری‌تاکامی، ق.؛ حقیقی، ع. و بهمنش، ش.، ۱۳۹۰.** بررسی مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با مقادیر مختلف باکتوسل در مواجهه با بیماری استرپتوکوکوزیس، انتشارات سازمان دامپزشکی کشور.

۲. **فرحبخش، ا.؛ نعیمی، ا.؛ موحدی، ع.؛ احرار، ا.؛ مظفری، م. و صحتی، ن.، ۱۳۸۵.** مقدمه‌ای بر نانو تکنولوژی. ۵۰۳ صفحه.

۳. **ناصری، س.؛ نظامی، ش.؛ خارا، ح.؛ فروزانفر، ع. و شکوری، ه.، ۱۳۸۷.** تاثیر سطوح مختلف پروبیوتیک و آهن بر برخی فاکتورهای خونی آلوین قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علوم زیستی واحد لاهیجان. شماره ۲، صفحات ۷۳ تا ۸۱.

۴. **هدایتی، ع.؛ قربانی، ر.؛ باقری، ط.؛ احمدوند، ش. و جهانبخشی، ع.، ۱۳۹۲.** بررسی اثرات سمیت کشنده نانواکسیدروی (ZnO NPs)، نانواکسیدمس (CuONPs) و نانو دی اکسیدتیتانیوم (TiO2 NPs) و بررسی اثرات سمیت تحت کشنده آن‌ها بر فاکتورهای خون و بافت آبشش ماهی قرمز، کپور معمولی و کلمه. طرح پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۲۹ صفحه.

۵. **هدایتی، ع.؛ جهانبخشی، ع. و قادری‌رمازی، ف.، ۱۳۹۲.** سم شناسی آبزیان. جلد اول، چاپ اول. صفحات ۷۰ تا ۷۶.

٦. **Adams, S.M., 2002.** Biological indicators of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society and Ramya, V.I. 2011. Nanotechnology: A Novel Tool for Aquaculture. Aquaculture Journal. Vol. 16, pp: 1-5.

۷. **Behara, T.; Swain, P.; Rangachrulu, P.V. and Samanta, M., 2013.** Nano-Fe as feed additive improves the hematological and immunological parameters of fish, *Labeo rohita* H. J. Applied Nanoscience. Vol. 13, pp: 251-258.

۸. **Billard, R.; Cosson, J.; Perchec, G. and Linhart, O., 1995.** Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquaculture. Vol. 129, No. 1, pp: 95-112.

۹. **Cheraghi, A.; Bohrani, N. and Malekfar, R., 2004.** Technology office of the presidential committee on nanotechnology policy. Applications of Nanotechnology in the Diagnosis and Treatment of Diseases. Vol. 5, pp: 85-94.

۱۰. **Di Giulio, R.T. and Hinton, D.E., 2008.** The Toxicology of Fishes. Taylor Francis. 319-884.dietary inulin and oligo saccharides as prebiotics for weaning Turbot (*Psetta maxima*). Aquaculture International. Vol. 14, pp: 219-229.

۱۱. **Evans, G.O., 2008.** Animal hematotoxicology: a practical guide for toxicologists and biomedical researchers. CRC Press.

۱۲. **Ferguson, R.M.W.; Merrifield, D.L.; Harper, G.M.; Rawling, M.D.; Mustafa, S.; Picchietti, S.; Blacazar, J.L., S. J.L. and Davies, S.J., 2010.** The effect of Pediococcus acidilactici on the gut microbiota and immune status of ongrowing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). Jour. App. Microbio. Vol. 109, No. 3, pp: 851-862.

۱۳. **Fiess, J.C.; Kunkel-Patterson, A.; Mathias, L.; Riley, L.G.; Yancey, P.H.; Hirano, T. and Grau, E.G., 2007.** Effects of environmental salinity and temperature on osmoregulatory ability, organic osmolytes, and plasma hormone profiles in the Mozambiquetilapia (*Oreochromis mossambicus*). Comparative Biochemistry and Physiology. Vol. 146, No. A, pp: 252-264.

۱٤. **Firdaus, S.; Jafri, A.K. and Rahman, N., 1994.** Effects of iron-deficient diet on the growth and haematological characteristics of the catfish Heteropueustes fossilis Bloch. Journal of Aquaculture in the Tropics. Vol. 9, pp: 179-185.

۱٥. **Fuller, R., 1989.** A review: probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol. Vol. 66, pp: 365-378.

۱٦. **Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B., 1995.** Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition. Vol. 125, pp: 1401-1412.

۱۷. **Gisbert, E.; Rodriguez, A.; Cardona, L.; Huertas, M.; Gallardo, M.A.; Sarasquete, C.; Sala-Rabanal, M.; Ibarz, A.; Sanchez, J. and Castello-Orvay, F., 2004.** Recovery of Siberian sturgeon yearlings after an acute exposure to environmental nitrite: changes in the plasmatic ionic balance, Na+/K+ATPase activity, and gill histology. Aquaculture. Vol. 239, pp: 141-154.

۱۸. **Kolida, S.; Tuohy, K. and Gibson, G.R., 2002.** Prebiotic effects of inulin and oligofructose. British Journal of Nutrition. Vol. 87, No. 2, pp: S193-S197.

۱۹. **Lee, K.M.; Kaneko, T.; Katoh, F. and Aida, K., 2006.** Prolactin gene expression and gill chloride cell activity in fugu Takifugu rubripes exposed to a hypoosmotic environment. General and Comparative Endocrinology. Vol. 149, pp: 285-293.

۲۰. **Lim, C. and Klesius, P.H., 1997.** Responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed iron-deficient and replete

diets to *Edwardsiella ictaluri* challenge. Aquaculture. Vol: 157, No: 1-2. pp: 83-93.

۲۱. **Lim, C.; Klesius, P.H.; Li, M.H. and Robinson, E.H., 2000.** Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to Edwardsiella ictaluri challenge. Aquaculture. Vol. 185, pp: 313-327

۲۲. **Mohan, B.R.; Kadirvel, S.K.; Natarajan, R. and Bhaskaran, M., 1996.** Effect of probiotic supplementation on growth nitrogen utilization and serum cholestrol in broilers. British Poultry Science. Vol. 37, pp: 395-401.

۲۳. **Raida, M.K.; Larsen, J.L.; Nielsen, M.E. and Buchmann, K., 2003.** Enhanced resistance of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum), against Yersinia ruckeri challenge following oral administration of Bacillus subtilis and B. licheniformis (BioPlus2B). Journal of Fish Diseases. Vol. 26, pp: 495-498.

۲۴. **Ringo, E.; Olsen, R.E.; Dalmo, R.A.; Amlund, H.; Hemre, G. and Bakke, A. M., 2010.** Prebiotics in aquaculture: a review. Aquaculture Nutrition. Vol. 16, pp: 117-136.

۲۵. **Savari, A.; Hedayati, A. and Safahieh, A., 2011.** Characterization of blood cells and hematological parameters of yellowfin sea bream (*Acanthopagrus latus*) in some creeks of Persian Gulf. World J of Zool. Vol. 6, pp: 26-32.

۲۶. **Stoskopf, M.A., 1993.** Fish medicine. Sounders Company, U.S.A. 882 p.