

## تأثیر پیش تیمار الیگوساکارید رافینوز و باکتری *Pediococcus acidilactici* بر برخی از شاخص های خونی ماهی کاراس (*Carassius auratus*) در مواجهه با نانو ذره نقره

فاطمه زهرا جعفری<sup>۱\*</sup>، سیدعلی اکبر هدایتی<sup>۱</sup>، سید حسین حسینی فر<sup>۱</sup>، علی جعفر نوده<sup>۱</sup>، طاهره باقری<sup>۲</sup>

\*jafarizahra293@yahoo.com

۱- دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.  
 ۲- مرکز تحقیقات شیلاتی آبهای دور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، چابهار، ایران

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۶

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۷

### چکیده

هدف از تحقیق حاضر بررسی اثرات باکتری *Pediococcus acidilactici* و الیگوساکارید رافینوز بر برخی از شاخص های خونی ماهی کاراس (*Carassius auratus*) در مواجهه با نانو ذرات نقره در شرایط آزمایشگاهی بود. بر این اساس تعداد ۳۰۰ عدد ماهی کاراس در چهار تیمار توزیع و به مدت ۶ هفته تغذیه شدند. بعد از پایان دوره تغذیه به تیمارهای آزمایش میزان ۵۰ درصد غلظت کشنده نانو نقره (۰/۵ میلی گرم بر لیتر) اضافه و در پایان دوره ۱۴ روزه مواجهه با نانو ذرات نقره، نمونه برداری از خون ماهیان صورت گرفت. شاخص های بازوفیل، نوتروفیل، مونوسیت و گلبول قرمز در تیمارهای مختلف اختلاف معنی داری با هم نداشت ( $p > 0/05$ )، ولی تعداد گلبول های سفید، هموگلوبین و هماتوکریت در تیمارهای مختلف اختلاف معنی داری با گروه شاهد داشت ( $p < 0/05$ ). بررسی نتایج شاخص ائوزینوفیل در مواجهه تحت کشنده با نانوذرات نقره بیانگر تأثیر معنی دار مکملهای غذایی بر افزایش میزان ائوزینوفیل خون است ( $p < 0/05$ )، به طوریکه باکتری و سین بیوتیک عملکرد یکسانی داشتند ولی رافینوز توانسته اثر فزاینده ای داشته باشد. بررسی شاخص هماتوکریت نشان داد که مکملهای غذایی در مواجهه تحت کشنده با نانوذرات نقره اثر معنی داری بر شاخص هماتوکریت و افزایش آن داشته است ( $p < 0/05$ ). نتایج شاخص هموگلوبین نشان داد که مواجهه تحت کشنده با نانوذرات نقره اثر معنی داری بر شاخص هموگلوبین داشته است ( $p < 0/05$ ) و مکملهای غذایی اثر مثبتی بر سیستم ایمنی ماهی کاراس طلایی داشته است و موجب افزایش هموگلوبین در مواجهه با نانو ذرات نقره شده است. به طوریکه رافینوز و گروه شاهد عملکرد یکسانی داشته است ولی باکتری توانسته اثر فزاینده ای بر این شاخص داشته باشد. باتوجه به نتایج به دست آمده از شاخص های مورد آزمایش، مکمل غذایی باکتری بیشترین تأثیر را بر شاخص هموگلوبین داشته است و به میزان مساوی با سایر مکمل ها در شاخص مونوسیت خون موثر بوده است. مکمل غذایی رافینوز بیشترین تأثیر را بر گلبول قرمز و ائوزینوفیل داشته است. و در بین مکملهای مذکور سین بیوتیک با تأثیر بر شاخص های خونی هماتوکریت، گلبول سفید، نوتروفیل و لنفوسیت در بین مکمل های غذایی موثرتر عمل کرده است.

**لغات کلیدی:** باکتری، نانوذرات نقره، شاخص های خونی، ماهی کاراس طلایی

\*نویسنده مسئول

## مقدمه

باکتری‌های مفید به عنوان مکمل‌های غذایی شناخته شده اند که از طریق بهبود ارزش غذایی و ارتقای رشد، توزیع آنزیمی جهت هضم مواد غذایی، مهار موجودات (میکرو ارگانیسم) بیماری‌زای فرصت طلب، فعالیت ضدسرطانی و افزایش پاسخ ایمنی برای موجود میزبان سودمند هستند (Verschuere et al., 2000).

باکتری *Pediococcus acidilactici* یک باکتری غیربیماری‌زا، گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است که می‌تواند در دامنه وسیعی از دما، pH و فشار اسمزی به خوبی رشد کند. تکثیر سریع این باکتری در دستگاه گوارش و توانایی کلنیزه شدن آن، سبب حذف رقابتی عوامل بیماری‌زا و کاهش خطر ابتلا به بیماری می‌گردد. نتایج استفاده از این باکتری افزایش بقا و کاهش چشمگیر تلفات ناشی از بیماری‌های عفونی است. همچنین این مکمل غذایی موجب تعادل جمعیت فلور باکتریایی روده و تحریک پاسخ ایمنی غیراختصاصی می‌شود (Ferguson et al., 2010).

رافینوز ماده غذایی غیرقابل هضمی است که از طریق تحریک رشد و فعالیت یک یا تعداد محدودی از باکتری‌های موجود در روده، اثرات سودمندی برای میزبان دارد و می‌تواند سلامتی میزبان را بهبود بخشد (Schrezenmeir and De Vrese, 2001). طبق نظر (Wang, 2009) معیارهای انتخاب رافینوزها غیرقابل هضم بودن آنها است و رافینوزها باید در برابر اسید معده، هیدرولیز توسط آنزیم‌های پستانداران و جذب در دستگاه گوارش مقاوم باشند (Gibson et al., 2004). عناصر غذایی که شامل تخمیر انتخابی توسط باکتری‌های مفید در روده می‌باشند، می‌توانند مانند رافینوزها طبقه‌بندی شوند (Wang, 2009).

پارامترهای خون یکی از شاخص‌های مهم و قابل اطمینان در بررسی وضعیت سلامت و کنترل زیستی آبزیان می‌باشد، چنانچه میزان طبیعی پارامترهای سلولی خون انواع ماهیان در شرایط اقلیمی یا فیزیولوژیک هر منطقه در دسترس باشد، بررسی فاکتورهای خون شناسی می‌تواند نقش مهمی در تشخیص بیماری‌های آبزیان ایفا کند. از

این رو در کنار مطالعات آسیب شناسی بافتی، مطالعات عوارض هماتولوژیک روش مناسبی جهت ارزیابی اثرات محیطی آلاینده‌ها روی ماهی‌ها می‌باشد (Stentiford et al., 2003). لذا با توجه به نوظهور بودن نانو ذرات و اثر سمیت آن‌ها و از طرف دیگر تأثیرات مثبت باکتری و الیگوساکاریدها در تقویت آبزیان در برابر آلاینده‌ها این تحقیق به منظور بررسی شاخص‌های خون شناسی ماهی کاراس طلایی در مواجهه با نانوذرات نقره و باکتری پدیوکوکوس اسید لاکتیکی صورت گرفت.

## مواد و روش کار

این پژوهش به مدت ۶۰ روز در مرکز تحقیقات آبی‌پروری شهید فضلی گروه تکثیر و پرورش آبزیان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان صورت گرفت. ۳۰۰ عدد بچه ماهی کاراس از یک کارگاه خصوصی واقع در استان گیلان تأمین و پس از یک دوره آداپتاسیون، بچه ماهیان زیست‌سنجی شدند و با میانگین وزنی  $26/3 \pm 0/18$  گرم به تعداد ۱۵ عدد در ۱۲ تانک فایبرگلاس با ظرفیت ۱۰۰۰ لیتر نگهداری شدند. در این تحقیق الیگوساکارید رافینوز به عنوان پروبیوتیک از کشور چین تأمین گردید. باکتری مورد استفاده در این تحقیق *Pediococcus acidilactici*، از خانواده لاکتوباسیلوس-ها (گرم مثبت)، به صورت تجاری از بانک اطلاعاتی میکروارگانیسم ایران تهیه شد و با غلظت باکتری CFU/g  $10^7 \times 0/9$  استفاده گردید (Castex et al., 2010).

برای آزمایش از غذای تجاری ماهی کپور (فراذانه) استفاده شد. ترکیب و درصد اجزا جیره تجاری مورد استفاده در تغذیه بچه ماهیان در جدول ۱ ارائه شده است. برای تیمارهای آزمایش، باکتری *P. acidilactici* و رافینوز ابتدا توزین سپس در محلول ژلاتین ۴ درصد حل گردید و به غذای تجاری کپور اسپری شد (جافرنوده، ۱۳۹۵) سپس در مجاورت هوا در محیط استریل شده خشک شد و در محیط خلا در یخچال نگهداری گردید.

غذای مورد نیاز هر تانک با توجه به نتایج بدست آمده از زیست‌سنجی هر تانک پرورشی محاسبه و تنظیم گردید. بچه ماهیان روزانه در ۳ وعده غذادهی شدند، میزان

میکروهماتوکریت و با سانتیفریژ و خط‌کش مخصوص هماتوکریت خون سنجیده شد. در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتیفریژ شد و در انتها میزان گلبول قرمز بر حسب درصد با خط‌کش میکروهماتوکریت تعیین گردید (غیائی و همکاران، ۱۳۸۸).

برای تعیین اندیس‌های خونی با استفاده از میزان هماتوکریت و تعداد اریتروسیت‌ها (RBC) از روابط ریاضی استفاده شد. شمارش گلبول‌های سفید در خون ماهی با رقیق کردن خون هپارینه توسط محلول‌ها نیز میسر است. محلول بکار برده شده برای رقیق کردن خون، محلول ریس (رنگ Brilliantcresyl / Blue ۰/۱ گرم، سیترات سدیم ۳/۸ گرم، فرمالین ۴۰ درصد ۰/۲ سی سی، آب مقطر تا ۱۰۰ سی سی) بود. برای شمارش افتراقی (Diff) گلبول‌های سفید گسترش ثابت تهیه شد و برای رنگ آمیزی از محلول گیمسا (ساخت شرکت مرک آلمان) با رقت ۰/۱ استفاده شد و بسته به نوع واکنش سلول‌ها با رنگ، انواع گلبول‌های سفید (گرانولوسیت‌ها شامل بازوفیل، ائوزینوفیل و نوتروفیل و آگرانولوسیت‌ها شامل لنفوسیت و مونوسیت) از یکدیگر متمایز و شمارش شدند (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۲).

اطلاعات حاصل از آنالیزهای خون‌شناسی و رشد با استفاده از نرم‌افزار Spss 20 و با انجام آزمون ANOVA یک طرفه و پس آزمون دانکن در سطح معنی داری ۵ درصد ( $p < 0.05$ ) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. همه نتایج به دست آمده به وسیله میانگین  $\pm$  انحراف معیار محاسبه شدند.

## نتایج

بررسی نتایج هموگلوبین ماهی کاراس طلایی نشان داد که مواجهه تحت کشنده با نانوذرات نقره اثر معنی داری بر شاخص هموگلوبین داشته است ( $p < 0.05$ ) که تیمار سین بیوتیک (تیمار ۴) با میزان ۸/۹ میلی گرم بر لیتر کمترین و تیمار باکتری با میزان ۱۰/۸۱ میلی گرم بر لیتر بیشترین هموگلوبین را داشته است (شکل ۱). در مجموع مکمل‌های غذایی اثر مثبتی بر سیستم ایمنی ماهی کاراس طلایی داشته و موجب افزایش هموگلوبین در مواجهه با

غذادهی ۳٪ وزن بدن و طول دوره آزمایش ۶۰ روز به طول انجامید. آزمایش در قالب ۴ تیمار شامل تیمار اول (شاهد) فقط با غذای تجاری و مابقی تیمارها با غذای تجاری مکمل شده به باکتری *P. acidilactici* و رافینوز به ترتیب حاوی تیمار دوم (۱ گرم بر کیلوگرم باکتری)، تیمار سوم (۱۰ گرم بر کیلوگرم رافینوز)، تیمار چهارم (۱ گرم بر کیلوگرم باکتری و ۱۰ گرم بر کیلوگرم رافینوز) انجام گرفت.

جدول ۱: ترکیب و درصد اجزا جیره تجاری مورد استفاده در

تغذیه بچه ماهیان

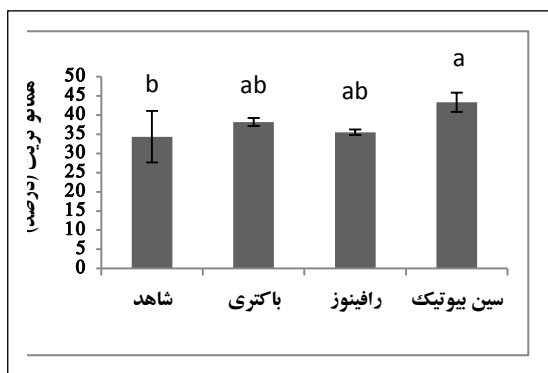
Table 1: Composition and percentage of commercial diet components used in fish feeding.

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

بعد از پایان دوره ۶ هفته‌ای غذادهی با رافینوز و باکتری پدیوکوکوس اسید لاکتیکی، دوره مواجهه ماهیان با نانو ذرات نقره آغاز شد. طی دوره دوهفته‌ای با توجه به مقدار آب در تانکرها ۵۰٪ از  $LC_{50}$  نانو ذرات نقره اضافه شد. نانوذره نقره به صورت محلول کلئیدی ۴۰۰۰ ppm از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان، مشهد خریداری شد. طبق بررسی با میکروسکوپ الکترونی TEM، نانو ذرات مورد بررسی دارای محدوده اندازه ۲۰-۵۵ نانومتر با میانگین اندازه ۳۶ نانومتر بودند. هر دو روز در میان حجم آب سیفون و نصف ماده اولیه استفاده شده به تانکر اضافه شد. (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۲). در پایان دوره ۱۴ روز مواجهه، جهت بررسی شاخص‌های خون‌شناسی، از هر تیمار ۸ عدد ماهی صید و پس از زیست‌سنجی و خشک کردن، به کمک سرنگ ۲ سی سی هپارینه از ساقه دمی ماهیان خونگیری بعمل آمد و برخی از شاخص‌های خونی مورد بررسی قرار گرفت. پس از تانکهای آزمایش به صورت متمرکز به مخزن سرازیر شده و پس از تصفیه اولیه و استریل سازی خارج گردیدند.

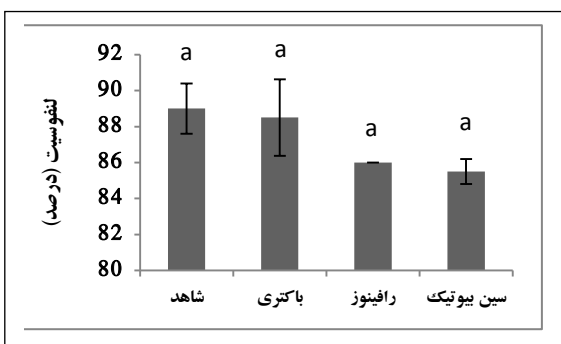
برای اندازه‌گیری هموگلوبین از روش سیان مت - هموگلوبین استفاده گردید. تعیین هماتوکریت نیز با روش

میزان ۸۹/۰۰ میلی گرم بر لیتر بیشترین لنفوسیت خون را داشته است (شکل ۳).



شکل ۲: میزان هماتوکریت خون ماهی کاراس طلائی در تیمارهای مختلف آزمایشی. حروف یکسان به معنای عدم اختلاف و حروف متفاوت به معنای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است.

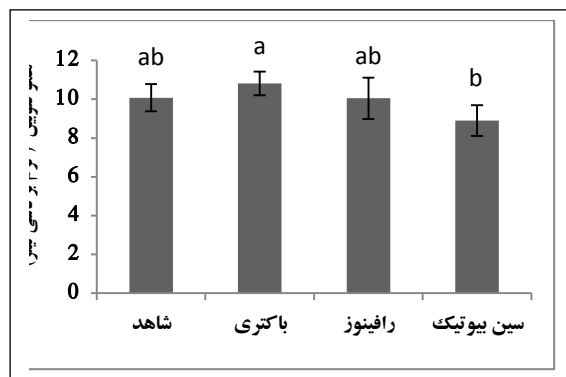
Figure 2: Hematocrite levels of Goldfish in different experimental treatments. The same letters mean no difference and different letters mean a significant difference at the 5% level between experimental treatments.



شکل ۳: میزان لنفوسیت خون ماهی کاراس طلائی در تیمارهای مختلف آزمایشی. حروف یکسان به معنای عدم اختلاف و حروف متفاوت به معنای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است.

Figure 3: Lymphocyte levels of Goldfish in different experimental treatments. The same letters mean no difference and different letters mean a significant difference at the 5% level between experimental treatments.

نانونقره شده است به طوریکه رافینوز شاهد عملکرد یکسانی داشته ولی باکتری توانسته اثر فزاینده‌ای داشته باشد.



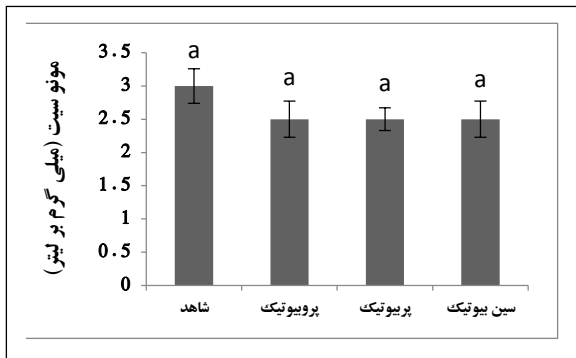
شکل ۱: میزان هموگلوبین خون ماهی کاراس طلائی در تیمارهای مختلف آزمایشی. حروف یکسان به معنای عدم اختلاف و حروف متفاوت به معنای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است.

Figure 1: Hemoglobin levels of Goldfish in different experimental treatments. The same letters mean no difference and different letters mean a significant difference at the 5% level between experimental treatments.

بررسی نتایج شاخص هماتوکریت ماهی کاراس طلائی نشان داد که مواجهه تحت کشنده با نانوذرات نقره اثر معنی داری بر شاخص هماتوکریت خون داشته است ( $p < 0.05$ ). تیمار شاهد با میزان ۳۳/۳۴ میلی گرم بر لیتر کمترین و تیمار سین بیوتیک با میزان ۴۳/۳۳ میلی گرم بر لیتر بیشترین هماتوکریت خون را داشته است (شکل ۲). نتایج بیانگر تأثیر مکملهای غذایی بر افزایش میزان هماتوکریت خون است به طوریکه باکتری و رافینوز عملکرد یکسانی داشته اند ولی سین بیوتیک توانسته اثر فزاینده‌ای داشته باشد.

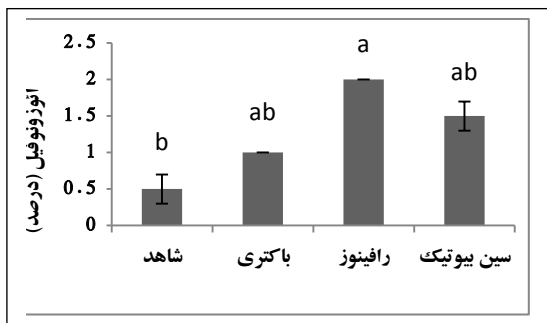
بررسی نتایج شاخص لنفوسیت ماهی کاراس طلائی نشان داد که مواجهه تحت کشنده با نانوذرات نقره اثر معنی داری بر شاخص لنفوسیت خون نداشته است ( $p > 0.05$ ). اما در بررسی عددی مشخص شد که تیمار سین بیوتیک با میزان ۸۵/۵ میلی گرم بر لیتر کمترین و تیمار شاهد با

شاهد با میزان ۰/۵ میلی گرم بر لیتر کمترین و تیمار رافینوز با میزان ۲ میلی گرم بر لیتر بیشترین ائوزونوفیل خون را داشته است (شکل ۶). نتایج بیانگر تاثیر مکملهای غذایی بر افزایش میزان ائوزینوفیل خون است به طوریکه باکتری و سین بیوتیک عملکرد یکسانی داشته ولی رافینوز توانسته اثر فزاینده ای داشته باشد.



شکل ۵: میزان مونوسیت خون ماهی کاراس طلائی در تیمارهای مختلف آزمایشی. حروف یکسان به معنای عدم اختلاف و حروف متفاوت به معنای اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است.

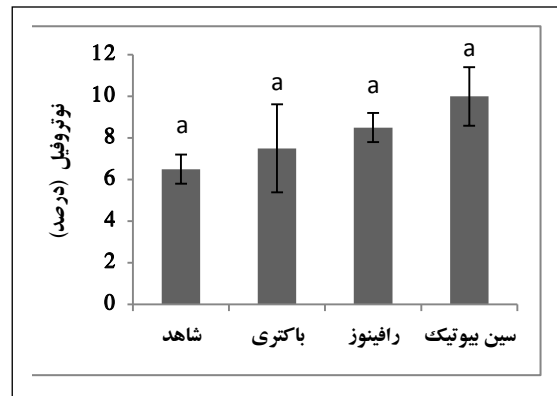
Figure 5: Monocyte levels of Goldfish in different experimental treatments. The same letters mean no difference and different letters mean a significant difference at the 5% level between experimental treatments.



شکل ۶: میزان ائوزینوفیل خون ماهی کاراس طلائی در تیمارهای مختلف آزمایشی حروف یکسان به معنای عدم اختلاف و حروف متفاوت به معنای اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است.

Figure 6: Eosinophil levels of Goldfish in different experimental treatments. The same letters mean no difference and different letters mean a significant difference at the 5% level between experimental treatments.

بررسی نتایج شاخص نوتروفیل ماهی کاراس طلائی نشان داد که مواجهه تحت کشنده با نانوذرات نقره اثر معنی داری بر شاخص نوتروفیل خون نداشته است ( $p > 0.05$ ). اما در بررسی عددی مشخص شد که تیمار شاهد با میزان ۶/۵ میلی گرم بر لیتر کمترین و تیمار سین بیوتیک با میزان ۱۰ میلی گرم بر لیتر بیشترین هماتوکریت خون را داشته است (شکل ۴).

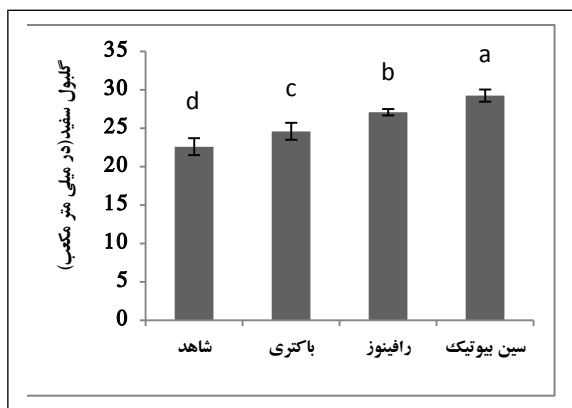


شکل ۴: میزان نوتروفیل خون ماهی کاراس طلائی در تیمارهای مختلف آزمایشی حروف یکسان به معنای عدم اختلاف و حروف متفاوت به معنای اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است.

Figure 4: Neutrophil levels of Goldfish in different experimental treatments. The same letters mean no difference and different letters mean a significant difference at the 5% level between experimental treatments.

بررسی نتایج شاخص مونوسیت ماهی کاراس طلائی نشان داد که مواجهه تحت کشنده با نانوذرات نقره اثر معنی داری بر شاخص مونوسیت خون نداشته است ( $p > 0.05$ ). اما در بررسی عددی مشخص شد که تیمارهای باکتری و رافینوز و سین بیوتیک با میزان ۲/۵ میلی گرم بر لیتر کمترین و تیمار شاهد با میزان ۳ میلی گرم بر لیتر بیشترین مونوسیت خون را داشته است (شکل ۵).

بررسی نتایج شاخص ائوزونوفیل ماهی کاراس طلائی نشان داد که مواجهه تحت کشنده با نانوذرات نقره اثر معنی داری بر شاخص ائوزونوفیل خون داشته است ( $p < 0.05$ ). اما در بررسی عددی مشخص شد که تیمار



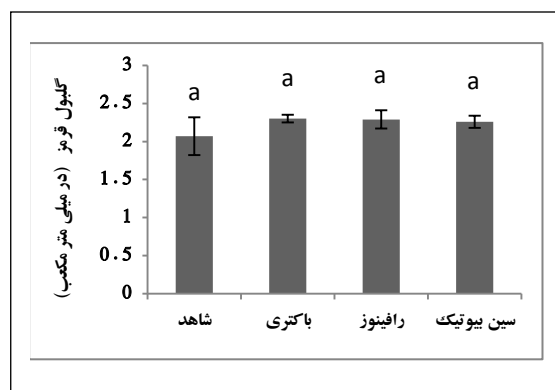
شکل ۸: میزان گلبول سفید خون ماهی کاراس طلایی در تیمارهای مختلف آزمایشی. حروف یکسان به معنای عدم اختلاف و حروف متفاوت به معنای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است.

Figure 8: W.B.C levels of Goldfish in different experimental treatments. The same letters mean no difference and different letters mean a significant difference at the 5% level between experimental treatments.

## بحث

شاخص‌های خونی ماهیان به عوامل مختلفی از قبیل گونه، اندازه، سن، وضعیت فیزیولوژیکی، شرایط محیطی، رژیم غذایی (کمیت و کیفیت غذا، مواد تشکیل دهنده جیره، منابع پروتئینی، ویتامین‌ها و محرک‌های رشد) بستگی دارند (Lim *et al.*, 2000). البته مطالعات کمی در مورد شاخص‌های خونی ماهیان در پاسخ به محرک‌های رشد (باکتری‌ها، اسیدهای آلی) در دسترس می‌باشد. جوهری و حسینی (۱۳۹۳)، در نتایج حاصل از بررسی سمیت تغذیه‌ای کلونید نانو ذرات در ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مشاهده کردند بلع نانو ذرات ممکن است بر سلامت ماهیان اثر منفی بگذارد. بنابراین جلوگیری از ورود این مواد جدید به چرخه غذایی آبزیان ضروری به نظر می‌رسد. در بررسی اثر نانو ذرات نقره بر برخی شاخص‌های خون شناسی گربه ماهی رنگین کمان (*Pangasius hypophthalmus*) توسط رزم آرا و همکاران (۱۳۹۳) تغییر معنی‌دار RBC، هماتوکریت، هموگلوبین، WBC، فراوانی آن‌ها و میزان گلوکز در دوز

بررسی نتایج شاخص گلبول قرمز ماهی کاراس طلایی نشان داد که مواجهه تحت کشنده با نانوذرات نقره اثر معنی‌داری بر شاخص گلبول قرمز خون نداشته است ( $p > 0.05$ ). اما در بررسی عددی مشخص شد که تیمار شاهد با میزان ۲/۰۷ میلی گرم بر لیتر کمترین و تیمار رافینوز با میزان ۲،۲۹ میلی گرم بر لیتر بیشترین گلبول قرمز خون را داشته است (شکل ۷).



شکل ۷: میزان گلبول قرمز خون ماهی کاراس طلایی در تیمارهای مختلف آزمایشی حروف یکسان به معنای عدم اختلاف و حروف متفاوت به معنای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است.

Figure 7: R.B.C levels of Goldfish in different experimental treatments. The same letters mean no difference and different letters mean a significant difference at the 5% level between experimental treatments.

بررسی نتایج گلبول سفید ماهی کاراس طلایی نشان داد که مواجهه تحت کشنده با نانوذرات نقره اثر معنی‌داری بر شاخص گلبول سفید نداشته است ( $p < 0.05$ ) که تیمار شاهد با میزان ۲۲/۶ میلی گرم بر لیتر کمترین و تیمار سین بیوتیک با میزان ۲۹/۲۶ میلی گرم بر لیتر بیشترین گلبول سفید را داشته است (شکل ۸). در مجموع مکمل‌های غذایی اثر مثبتی بر سیستم ایمنی ماهی کاراس طلایی داشته و موجب افزایش گلبول سفید در مواجهه با نانوذرات نقره شده است.

باتوجه به نتایج بدست آمده از شاخص های خونی ماهی کاراس طلایی باکتری بیشترین اثر را بر روی شاخص های هموگلوبین و به میزان مساوی با سایر مکمل ها در شاخص مونوسیت خون موثر بوده است و مکمل غذایی رافینوز بیشترین اثر را در شاخص های خونی بازوفیل، گلبول قرمز و ائوزونوفیل داشته است. در مجموع مکمل غذایی سین بیوتیک با تاثیر فزاینده بر شاخص های خونی هماتوکریت، گلبول سفید، نوتروفیل و لنفوسیت در بین مکمل های غذایی موثرتر عمل کرده است. بنابراین تیمار مناسبتری برای تحقیقات بیشتر است. همچنین با توجه به نتیجه به دست آمده مبنی بر تاثیر مناسب مکمل غذایی سین بیوتیک بر روی ماهی کاراس، تحقیق گسترده تری بر روی سایر ماهیان پیشنهاد می گردد.

### منابع

جافرنوده، ع.، ۱۳۹۵. بررسی خواص سینرژستی برخی اسیدهای آلی با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی (*Lactobacillus casei*) در پرورش بچه ماهیان انگشت قد قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). پایان نامه دانشگاه ارومیه. ۱۰۹ صفحه.

جوهری، ع. و حسینی، س.، ۱۳۹۳. بررسی سمیت تغذیه ای کلوئید نانو ذرات در ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۳(۱): ۳۰-۳۳

DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110159

رزم آرا، پ.، پیکان حیرت، ف. و درافشان، س.، ۱۳۹۳. بررسی اثر نانو ذرات نقره بر برخی شاخص های خون شناسی گربه ماهی رنگین کمان (*Pangasius hypophthalmus*). مجله سلول و بافت، ۵(۳): ۲۶۳-۲۷۲.

غیائی، ف.، میرزرگر، س.، سالار آملی، ج.، باهنر، ع. و ابراهیم زاده موسوی، ح.، ۱۳۸۸. شاخص های خونی و بیوشیمی سرمی کپور معمولی متعاقب مواجهه با غلظت کم کادمیوم. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱(۶۵): ۶۶-۶۱.

بالای نانو ذرات نقره می تواند نشان دهنده سمیت ترکیب مورد استفاده و بروز تنش در گونه مورد استفاده است. مکمل غذایی سین بیوتیک نسبت به باکتری و رافینوز کمترین تاثیر را بر شاخص اریتروسیتی لنفوسیت داشته و توانسته اثر سو نانو نقره بر لنفوسیت را تا حدودی خنثی کند. نتایج تحقیق حاضر حاکی از تاثیر باکتری بر افزایش لنفوسیت خون بوده در حالی که نقره منجر به کاهش این میزان گردیده است ولی در ترکیب باکتری و رافینوز و به صورت مکمل سین بیوتیک عملکرد بهتری در شاخص مذکور در برابر نانو ذرات نقره داشته است.

ناصری پور و همکاران (۱۳۸۷)، نشان دادند که در ماهیانی که با جیره ی غذایی حاوی آهن و باکتری تغذیه شده بودند، مقادیر بالاتری گلبول های قرمز، نسبت به تیمار هایی که دارای سطوح کمی باکتری و آهن بودند، وجود دارد که با نتایج حاضر مطابقت دارد. هموگلوبین در ماهیانی که با جیره ی غذایی حاوی آهن و باکتری تغذیه شده بودند، مقادیر بالاتری نسبت به تیمار هایی داشت که دارای سطوح کمی باکتری و آهن بودند که با نتایج حاضر مطابقت دارد. نتایج بیانگر تاثیر مکمل های غذایی بر افزایش میزان هماتوکریت خون است به طوری که باکتری و رافینوز عملکرد یکسانی داشته ولی سین بیوتیک توانسته اثر فزاینده ای داشته باشد.

تحقیق حاضر نشان داد که تیمارهای آزمایش با تیمار شاهد اختلاف معنی دار داشت در ( $p < 0.05$ )، بطوری که باکتری باعث افزایش و نقره منجر به کاهش گلبول های سفید گردیده است، زیرا در مواجهه با آلاینده ها تعداد گلبول سفید کم شده و بدن ماهی ضعیف می شود، در ترکیب باکتری و نانوذره مذکور باکتری عملکرد مثبتی نداشت. نتایج بررسی صورت گرفته توسط غیائی و همکاران (۱۳۸۸)، بر روی پارامترهای خون کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) که در معرض غلظت کم کادمیوم قرار گرفته بودند نشان داد که تعداد گلبول های سفید بطور معناداری در روز ۱۵ بعد از مواجهه با کادمیوم کاهش یافته و تعداد گلبول های سفید در ماهیان در روز ۳۰ به شکل معناداری کاهش پیدا کرده است.

- prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(2):259-275. DOI: 10.1079/NRR200479.
- 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*, 185:313-327. DOI: 10.1016/S0044-8486(99)00352-X.
- Schrezenmeir, J. and de Vrese, M., 2001.** Probiotics, prebiotics, and synbiotics approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2): 361s-364s. DOI: 10.1093/ajcn/73.2.361s.
- Stentiford, G.D., Longshaw, M., Lyons, B.P., Jones, G., Green, M. and Feist, S.W., 2003.** Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Marine Environmental Research*, 55: 137-159. DOI: 10.1016/S0141-1136(02)00212-X.
- Verschuere, L., Rombau, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W., 2000.** Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbial and Molecular Research in Biology*, 64: 655-671. DOI: 10.1128/MMBR.64.4.655-671.2000.
- Wang, Y., 2009.** Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research International*, 42(1): 8-12. DOI: 10.1016/j.foodres.2008.09.001.
- ناصری‌پور، س.، بلوچی نظامی، ش.، خارا، ح.، فرزانه فر.ع. و لشتو آقایی، غ.، ۱۳۸۷. بررسی عملکرد رشد لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در استفاده از سطوح متفاوت باکتری و آهن مکمل شده در جیره غذایی. شیلات. ۲(۳): ۲۲-۱۵.
- هدایتی، ع.، قربانی، ر.، باقری، ط.، احمدوند، ش. و جهانبخشی، ع.، ۱۳۹۲. بررسی اثرات سمیت‌کشنده نانواکسید روی (ZnO NPs)، نانواکسید مس (CuO NPs) و نانودی‌اکسید تیتانیوم (TiO<sub>2</sub> NPs) در ماهی قرمز (*Carassius auratus*). کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و کلمه (*Rutilus rutilus*). طرح پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۵۹، صفحه.
- Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N. and Chim, L., 2010.** Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. *Fish and Shellfish Immunology*, 28(4): 622-631. DOI: 10.1016/j.fsi.2009.12.024.
- 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 on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Microbiology*, 109(3): 851-862. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04713.x.
- Gibson, G.R., Probert, H.M., Van Loo, J., Rastall, R.A. and Roberfroid, M.B., 2004.** Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of



**Effect of pre-treatment with Raffinose Oligosaccharide and *Pediococcus acidilactici* bacteria on some hematological indices of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to silver nanoparticles**

Jafari F.Z.<sup>1\*</sup>; Hedayati S.A.A.<sup>1</sup>; Hoseinifar S.H.<sup>1</sup>; Nodeh A.J.<sup>1</sup>; Bagheri T.<sup>2</sup>

jafarizahra293@yahoo.com

1- Agricultural Sciences and Natural Resources University, Gorgan, Iran

2- Offshore Fisheries Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Chabahar, Iran

**Abstract**

The aim of this study was to investigate the protective effect of pre-treatment of bacteria *Pediococcus acidilactici* and *oligosaccharide raffinose* on hematological indices of Goldfish (*Carassius auratus*) during exposure to nanosilver. Accordingly, 300 fish were fed for 6 weeks in four treatments. After the end of the feeding period, 50% of the lethal nano-silver concentration (0.5 mg/L) was added to the treatments for the 14-day exposure, and blood sampling was performed. Neutrophil, monocyte and RBC indices did not differ significantly in treatments ( $P>0.05$ ), but the number of white blood cells, hemoglobin, hematocrit, eosinophil were significantly different with the control group in different treatments ( $P<0.05$ ). The results of eosinophil showed that exposure to silver nanoparticles caused a significant effect of dietary supplements and increased the amount of blood eosinophil ( $P<0.05$ ), so that the bacteria and synbiotics have the same function, but raffinose had a growth-enhancing effect. The study of hematocrit index showed that dietary supplements undergoing exposure to silver nanoparticles had a significant effect on the hematocrit index and its increase ( $P<0.05$ ), so that the bacteria and raffinose had the same function, but synbiotic was able to produce the increasing effect. The results of hemoglobin showed that exposure with silver nanoparticles had a significant effect on hemoglobin ( $P<0.05$ ). Food supplements had a positive effect on goldfish immune system and increased hemoglobin in exposure to nanosilver. The raffinose had the same performance, but the bacteria had an increasing effect. According to the results, the dietary supplement of the bacteria had the highest effect on the hemoglobin indices and it has been effective in co-administration with other supplements in the blood monocyte index. Raffinose supplementation had the greatest effect on RBC, and eosinophilic indices. Among the supplements, the synbiotic food with effect on hematocrit, white blood cell, neutrophil, biochemical among food supplements has more effect.

**Keywords:** Bacteria, Nanosilver, Hematology, Goldfish

---

\*Corresponding author