



مقاله علمی - پژوهشی:

اثر پروبیوتیک *Saccharomyces cerevisiae* بر شاخص‌های خونی، بازماندگی و مقاومت به شوری در بچه ماهی کوی (*Cyprinus carpio* L.)

سیده زهرا سادات^{۱*}، محمدرضا ایمانیپور^۱، رقیه صفری^۱

*sy.zahra.sadat.m@gmail.com

۱- گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: آذر ۱۴۰۳

تاریخ پذیرش: بهمن ۱۴۰۳

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی تأثیر افزودن پروبیوتیک *Saccharomyces cerevisiae* بر شاخص‌های خونی، بازماندگی و مقاومت به شوری در بچه ماهی کوی انجام شد. تعداد ۱۳۲ قطعه بچه ماهی با وزن اولیه مشابه پس از یک دوره سازگاری به مدت هشت هفته با جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف این پروبیوتیک (صفر، ۰.۱، ۰.۵ و ۱ درصد) تغذیه شدند. در پایان دوره، شاخص‌های خونی (گلبول‌های قرمز و سفید، غلظت هموگلوبین و هماتوکریت)، اندازه گیری شدند. همچنین ماهیان تحت شرایط شوری (۱۲ گرم در لیتر) قرار گرفتند تا میزان مقاومت به شوری و بازماندگی آنها ارزیابی شود. نتایج نشان داد که استفاده از پروبیوتیک *S. cerevisiae* و یواسل موجب افزایش معنادار در تعداد گلبول‌های قرمز و سفید، غلظت هموگلوبین و هماتوکریت در ماهیان شد. این افزایش در شاخص‌های خونی می‌تواند به عنوان نشانه‌ای از بهبود وضعیت سلامت و عملکرد فیزیولوژیک ماهیان باشد. همچنین در شرایط شوری، ماهیان تیمار شده با پروبیوتیک، نرخ بازماندگی بالاتری نسبت به گروه‌های شاهد نشان دادند. این نتایج نشان می‌دهند که پروبیوتیک *S. cerevisiae* و یواسل می‌تواند به عنوان یک مکمل غذایی مؤثر برای بهبود شاخص‌های خونی، افزایش رشد و تقویت مقاومت به شرایط استرس‌زا (شوری)، در بچه ماهیان کوی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، *Saccharomyces cerevisiae*، یواسل، شاخص‌های خونی، مقاومت به شوری، ماهی کوی

مقدمه

پرورش ماهیان زینتی به عنوان یکی از بخش‌های نوظهور و با ارزش افزوده بالا در صنعت آبی‌پروری، طی سال‌های اخیر رشد چشم‌گیری داشته و نقش قابل توجهی در ایجاد اشتغال، توسعه صادرات و افزایش درآمدهای محلی ایفاء کرده است (Zakariaee et al., 2021). در این میان، ماهی کوی^۱ به واسطه رنگ آمیزی زیبا، سازگاری با شرایط پرورشی و محبوبیت جهانی، از جایگاه ویژه‌ای در میان ماهیان زینتی برخوردار است (Mohammadi et al., 2015). با این حال، چالش‌هایی همچون رشد نامطلوب، حساسیت به تنش‌های محیطی و کاهش بقاء، موانعی جدی در مسیر توسعه پایدار پرورش این گونه به شمار می‌آیند. یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی در آبی‌پروری، تغییرات شوری آب است که می‌تواند با اختلال در تنظیم فشار اسمزی، افزایش مصرف انرژی، کاهش اشتها، کاهش ایمنی و افزایش مرگ‌ومیر ماهیان همراه باشد (Ziaienejad et al., 2005). به‌ویژه در گونه‌هایی مانند ماهی کوی که از لحاظ فیزیولوژیک نسبت به تغییرات محیطی حساس هستند، تغییرات شوری می‌تواند تأثیرات منفی شدیدی بر عملکرد عمومی و بقاء داشته باشد. این مسأله اهمیت استفاده از راهکارهای مدیریتی و تغذیه‌ای را برای افزایش مقاومت به شوری دوچندان می‌کند. در این زمینه، استفاده از مکمل‌های زیستی (پروبیوتیک‌ها)، به عنوان یکی از رویکردهای کارآمد برای ارتقاء سلامت، افزایش بقاء و کاهش اثرات منفی تنش‌های محیطی، مورد توجه قرار گرفته است (Blacazar et al., 2007). پروبیوتیک‌ها با بهبود تعادل میکروبی روده، کاهش التهاب، تحریک ایمنی ذاتی و افزایش بازدهی تغذیه‌ای، قادر به افزایش بقاء در ماهیان هستند (Zheng et al., 2017). همچنین این ترکیبات زیستی از طریق تأثیر بر باکتری‌های مفید، کاهش کلونیزاسیون عوامل بیماری‌زا و بهبود جذب مواد مغذی، نقش کلیدی در سلامت عمومی آبزیان ایفاء می‌کنند. از میان پروبیوتیک‌های مورد استفاده در آبی‌پروری، *Saccharomyces cerevisiae*^۲ به دلیل ویژگی‌هایی مانند غیر بیماری‌زا بودن، تحمل بالا به شرایط محیطی و توانایی تولید ترکیبات زیست‌فعال (بتا-گلوکان‌ها و مانان‌الیگوساکاریدها)، جایگاه ویژه‌ای یافته است. این مخمر علاوه بر اثرات مثبت بر رشد و هضم، با افزایش تنوع میکروبی روده و ارتقاء سیستم

^۱ *Cyprinus carpio* var. *koi*^۲ *Saccharomyces cerevisiae*

ایمنی، در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از شوری و ارتقاء مقاومت به شرایط سخت محیطی مؤثر واقع می‌شود. پژوهش‌های متعدد نشان داده‌اند که استفاده از *S. cerevisiae* می‌تواند با افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی مانند آمیلاز و پروتئاز، بهبود جذب مواد مغذی و تحریک سیستم ایمنی ذاتی به افزایش شاخص‌های رشد، بهبود ضریب تبدیل غذایی و افزایش بقاء در گونه‌های مختلف ماهیان منجر شود (FAO, 2020). همچنین شاخص‌های خونی به عنوان شاخص‌های کلیدی برای ارزیابی وضعیت فیزیولوژیک و ایمنی ماهیان، کاربرد گسترده‌ای در مطالعات تغذیه‌ای دارند. شاخص‌هایی نظیر هماتوکریت، هموگلوبین و شمارش گلبول‌های سفید، می‌توانند تعیین کننده تأثیر مکمل‌های غذایی از جمله پروبیوتیک‌ها بر سلامت عمومی و توان مقابله با تنش‌های محیطی مانند شوری باشند. *S. cerevisiae* با بهبود وضعیت هماتولوژیک، می‌تواند به ارتقاء ایمنی و بهبود سازگاری ماهی در شرایط تنش‌زا کمک نماید.

با رشد روزافزون جمعیت جهانی و محدودیت منابع طبیعی، تأمین پایدار پروتئین حیوانی به یکی از مهم‌ترین چالش‌های پیش‌روی جوامع بشری تبدیل شده است. در این میان، صنعت آبی‌پروری به عنوان یکی از سریع‌ترین بخش‌های در حال رشد در حوزه کشاورزی، نقش مهمی در تأمین نیازهای غذایی، اشتغال‌زایی و توسعه اقتصادی ایفاء می‌کند. سهم آبی‌پروری از تولید جهانی محصولات شیلاتی از ۲۵/۷ درصد در سال ۲۰۰۰ به بیش از ۴۹ درصد در سال ۲۰۲۰ افزایش یافته است که نشان‌دهنده اهمیت فزاینده این بخش در بازار جهانی غذاست (Rezaei et al., 2018). با این حال، چالش‌هایی نظیر رشد ناکافی، شیوع بیماری‌ها، استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها و فشارهای محیطی (تغییرات شوری، همواره عملکرد و پایداری این صنعت را تهدید می‌کنند (Imanpour et al., 2015; Karimpour et al., 2020). در زمینه غلبه بر چالش‌های مذکور، استفاده از افزودنی‌های غذایی طبیعی و ایمن نظیر پروبیوتیک‌ها به عنوان جایگزینی مؤثر برای آنتی‌بیوتیک‌ها، مورد توجه ویژه پژوهشگران قرار گرفته است (Durchschein et al., 2016).

پروبیوتیک‌ها با بهبود تعادل میکروبی روده، افزایش بازده هضم، تقویت ایمنی و کاهش عوامل بیماری‌زا، موجب ارتقاء عملکرد رشد و سلامت عمومی آبزیان می‌شوند (Siwicki et al., 1994). در این میان، مخمر *S. cerevisiae* به دلیل توانایی بالا

تیمار ۱ (شاهد): جیره بدون پروبیوتیک *S. cerevisiae* ویواسل

تیمار ۲: جیره با ۰/۱ درصد پروبیوتیک *S. cerevisiae* ویواسل
تیمار ۳: جیره با ۰/۵ درصد پروبیوتیک *S. cerevisiae* ویواسل
تیمار ۴: جیره با ۱ درصد پروبیوتیک *S. cerevisiae* ویواسل
در پایان دوره پرورشی، تمامی ماهیان از هر تیمار برای اندازه‌گیری شاخص‌های خونی مورد بررسی قرار گرفتند.

تهیه جیره‌های آزمایشی

برای تهیه جیره‌های آزمایشی، از غذای پلت تجاری به عنوان جیره پایه استفاده گردید. پروبیوتیک *Saccharomyces cerevisiae* ویواسل با غلظت 1×10^9 CFU/g از شرکت ویوان با مقادیر مختلف (۰، ۰/۱، ۰/۵، ۱٪) به غذای پایه افزوده شد. پس از آماده‌سازی، پلت‌ها در دمای محیط، خشک و به مدت دو ماه در یخچال نگهداری شدند تا از فساد جلوگیری شود.

زیست‌سنجی

در ابتدای دوره پرورش، برای کاهش اختلاف میانگین وزنی ماهیان و سنجش میزان جیره غذایی مصرفی، زیست‌سنجی به طور منظم انجام شد. این فرآیند هر ۱۵ روز یکبار تکرار گردید. برای انجام زیست‌سنجی، ابتدا ماهیان با استفاده از محلول بیهوش‌کننده (اسانس گل میخک) به غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر بیهوش و سپس با استفاده از یک خط‌کش و ترازوی دیجیتال، وزن و طول ماهیان ثبت گردید.

اندازه‌گیری درصد بازماندگی

برای محاسبه درصد بازماندگی بچه ماهیان کوی در پایان دوره آزمایش، تعداد ماهیان زنده در انتهای دوره شمارش و نسبت آن به تعداد اولیه ماهیان محاسبه گردید. این شاخص بر اساس فرمول ذیل تعیین شد:

$$100 \times (\text{تعداد اولیه ماهیان} / \text{تعداد ماهیان در پایان دوره}) = \text{SR} \text{ درصد بقا}$$

در هر آکواریوم، ۱۱ بچه‌ماهی قرار گرفت و تعداد ماهیان زنده در پایان آزمایش به منظور ارزیابی اثر تیمارهای مختلف پروبیوتیک *Saccharomyces cerevisiae* ویواسل بر درصد بقاء ثبت شد. درصد بقاء به عنوان یکی از شاخص‌های مهم در ارزیابی عملکرد کلی تیمارها در شرایط پرورشی در نظر گرفته شد.

در تولید آنزیم‌ها، ویتامین‌ها و خواص محرک ایمنی، یکی از شناخته‌شده‌ترین پروبیوتیک‌های مورد استفاده در جیره غذایی آبزیان به‌شمار می‌رود (Ghosh et al., 2007; Blacazar et al., 2007). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که استفاده از این پروبیوتیک می‌تواند اثرات مثبتی بر شاخص‌های خونی و مقاومت ماهیان در برابر استرس‌های محیطی به‌ویژه شوری داشته باشد. بنابراین، با توجه به چالش‌های موجود در پرورش بچه ماهیان کوی و اثرات بالقوه پروبیوتیک *S. cerevisiae* بر وضعیت خونی، نرخ بقاء و مقاومت به شوری، مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر این پروبیوتیک بر عملکرد فیزیولوژیک و مقاومت به استرس در این گونه طراحی و اجرا شد. با وجود مطالعات فراوان در زمینه استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبی‌پروری، بسیاری از تحقیقات هنوز تأثیرات دقیق و جامع پروبیوتیک‌ها بر ماهیان زینتی به‌ویژه ماهی کوی را در شرایط تنش‌های محیطی (تغییرات شوری)، مورد بررسی قرار نداده‌اند. همچنین نیاز به تحقیقات بیشتر در خصوص اثرات ترکیبات زیست‌فعال تولیدی به‌وسیله *S. cerevisiae* و نحوه تعامل این پروبیوتیک با سیستم ایمنی و بقاء ماهیان در شرایط طبیعی و پرورشی احساس می‌شود. مطالعه حاضر با هدف پر کردن این شکاف علمی و ارائه راهکارهای مؤثر در بهبود عملکرد فیزیولوژیک و مقاومت به شوری در ماهی کوی طراحی شده است. انتظار می‌رود نتایج این تحقیق بتواند راهکارهای مؤثری برای بهینه‌سازی تغذیه، ارتقاء سلامت و افزایش پایداری تولید در پرورش ماهیان کوی فراهم سازد.

مواد و روش‌ها

شرایط آزمایش

این تحقیق بر ۱۳۲ قطعه بچه ماهی کوی با وزن اولیه $20 \pm 1/6$ گرم که از مرکز تکثیر و پرورش بخش خصوصی تامین شده بودند، صورت گرفت. ماهیان به مدت یک هفته تحت شرایط سازگاری در آکواریوم‌های مجهز قرار گرفتند. پس از دوره سازگاری، ماهیان به طور تصادفی در ۱۲ آکواریوم تقسیم شدند (۱۱ ماهی در هر آکواریوم). تیمارها در قالب طرح کاملاً تصادفی به چهار گروه (سه تکرار) تقسیم شدند. دوره پرورش به مدت دو ماه به طول انجامید که طی آن ماهیان با جیره‌های آزمایشی حاوی پروبیوتیک *Saccharomyces cerevisiae* تغذیه شدند. تیمارها به شرح ذیل مورد تغذیه قرار گرفتند:

بررسی شاخص‌های خونی

در انتهای دوره پرورش، به منظور ارزیابی شاخص‌های خونی ماهیان، خونگیری از ورید ساقه دمی ماهیان انجام شد. از هر تیمار، سه ماهی (در مجموع ۹ ماهی برای هر تیمار) انتخاب گردید. این فرآیند با استفاده از سرنگ‌های ۲ سی‌سی و سوزن‌های استریل هپارین شده صورت گرفت و نمونه‌های خون پس از جمع‌آوری، شماره‌گذاری شده و جهت بررسی به آزمایشگاه منتقل شدند.

در آزمایشگاه، شاخص‌های مختلف خون شامل تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، تعداد گلبول‌های سفید (WBC)، انواع لوکوسیت‌ها (نوتروفیل‌ها، لنفوسیت‌ها، ائوزینوفیل‌ها)، میزان هموگلوبین (Hb)، هماتوکریت (HCT)، حجم متوسط گلبولی (MCV)، وزن هموگلوبین داخل گلبولی (MCH) و درصد غلظت هموگلوبین داخل گلبولی (MCHC) اندازه‌گیری شد. شمارش گلبول‌های قرمز و سفید با استفاده از روش لام هموسیتمتری انجام گرفت و گسترش خون برای شمارش گلبول‌های سفید روی لام تهیه و با رنگ‌آمیزی گیمسا بررسی شد. همچنین میزان هماتوکریت و غلظت هموگلوبین به روش‌های میکروهماتوکریت و سیانومت هموگلوبین اندازه‌گیری گردید.

اندازه‌گیری هموگلوبین (Hb)

برای اندازه‌گیری هموگلوبین، از روش سیانومت هموگلوبین استفاده گردید که ۲۰ میکرولیتر خون با ۵ میلی‌لیتر محلول درابکین رقیق شد. محلول درابکین از انحلال ۰/۲ گرم فری‌سیانیدپتاسیم، ۰/۰۵ گرم سیانیدپتاسیم و ۰/۱۴ گرم فسفات‌دی‌هیدروژن‌پتاسیم در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد. پس از رقیق‌سازی خون، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شدند تا دیواره گلبول‌های قرمز از بین برود (لیز شوند). سپس غلظت هموگلوبین با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Goldenfarb *et al.*, 1971).

اندازه‌گیری هماتوکریت (HCT)

مقدار هماتوکریت که نشان‌دهنده حجم گلبول‌های قرمز خون است، به روش میکروهماتوکریت اندازه‌گیری گردید. بدین ترتیب، پس از همگن‌سازی خون، لوله‌های میکروپیپت از خون هپارینه پر شدند و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه در سانتریفیوژ قرار گرفتند. میزان هماتوکریت در پایان با استفاده از

خط‌کش ویژه هماتوکریت اندازه‌گیری شد (Leonard and McCormick, 1999).

شمارش گلبول‌های قرمز (RBC)

گلبول‌های قرمز خون ماهیان که هسته‌دار هستند، با استفاده از روش لام هموسیتمتری شمارش شدند. بنابراین، خون با محلول دایس (ترکیب ۰/۱ گرم بریلیانت کریزل بلو، ۳/۸ گرم سدیم‌سیترات، ۰/۲ سی‌سی فرمالین ۴۰ درصد و ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر) رقیق شد. پس از رقیق‌سازی، شمارش گلبول‌های قرمز با استفاده از لام هموسیتمتر (لام نئوبار) انجام گرفت و تعداد گلبول‌ها در واحد حجم با ضرب در عدد ثابت ۱۰۰۰۰ محاسبه شد (Benfey and Sutterlin, 1984).

مشخصه‌های گلبول‌های قرمز خون

مشخصه‌های گلبول‌های قرمز شامل، میانگین حجم گلبول‌های قرمز (MCV)، میانگین هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCH) و میانگین غلظت هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) با استفاده از فرمول‌های ذیل محاسبه شدند (۲۱):

$$MCV = Hct \times 10 / RBC \text{ (million)}$$

$$MCH = Hb \times 10 / RBC \text{ (million)}$$

$$MCHC = Hb \times 10 / Hct$$

برای شمارش گلبول‌های سفید، خون به نسبت ۲۰ برابر با محلول دایس رقیق شد و سپس شمارش گلبول‌های سفید با استفاده از لام هموسیتمتر (لام نئوبار) در چهار خانه مربوط انجام شد. تعداد کل گلبول‌های سفید در واحد حجم با ضرب در عدد ثابت ۵۰ محاسبه گردید (Benfey and Sutterlin, 1984).

ارزیابی مقاومت به شوری

در پایان آزمایش، مقاومت به شوری با افزودن نمک به آب آکواریوم‌ها و قرار دادن ماهیان در شرایط شوری ۱۲ گرم در لیتر به مدت یک هفته مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان بقا و شرایط فیزیولوژیک ماهیان در این شرایط اندازه‌گیری شد.

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های حاصله با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ۱۶ و برای رسم نمودارها از نرم افزار EXCEL استفاده گردید. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. تمامی نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش گردید.

نتایج

اثرات پروبیوتیک *Saccharomyces cerevisiae* و یواسل

بر شاخص‌های خونی

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از سطوح مختلف پروبیوتیک *S. cerevisiae* و یواسل تأثیر معنی‌داری بر برخی شاخص‌های خونی بچه ماهیان کوی داشت ($p < 0.05$) به‌ویژه تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، تعداد گلبول‌های سفید (WBC)، غلظت هموگلوبین (Hb) و میزان متوسط غلظت هموگلوبین در یک گلبول قرمز (MCHC) در تیمارهای

دریافت‌کننده پروبیوتیک افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان دادند.

بیشترین مقدار گلبول‌های قرمز و سفید در تیمارهای ۰/۵ و ۱ گرم پروبیوتیک بر کیلوگرم جیره غذایی مشاهده شد. به طور کلی، تیمار ۰/۱ گرم بیشترین میانگین هموگلوبین را نشان داد، اگرچه تیمارهای ۰/۵ و ۱ نیز از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد داشتند. میزان MCHC نیز در این تیمارها به ترتیب برابر با 35.7 ± 4.79 ، 38.1 ± 2.58 و 35.88 ± 1.87 بود. بالاترین مقدار حجم متوسط هموگلوبین (MCH) در تیمار ۰/۱ گرم (49.7 ± 8.67) مشاهده گردید که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد داشت.

در مقابل، سطوح مختلف پروبیوتیک تأثیر معنی‌داری بر سایر شاخص‌ها از جمله درصد هماتوکریت (HCT)، حجم متوسط گلبولی (MCV)، درصد لنفوسیت، نوتروفیل، مونوسیت و ائوزینوفیل نداشتند ($p > 0.05$). نتایج کامل مرتبط با شاخص‌های خونی در تیمارهای مختلف در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱: مقایسه شاخص‌های خونی بچه ماهیان کوی تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک
Table 1: Comparison of blood factors of koi fry fed with different levels of probiotics

تیمار ۱	تیمار ۰/۵	تیمار ۰/۱	گروه شاهد	متغیر / تیمار
$80.82 \pm 2.26 \times 10^6$ a	$19924 \pm 2.31 \times 10^6$ a	$57838 \pm 2.15 \times 10^6$ b	$26457 \pm 2.17 \times 10^6$ b	تعداد گلبول‌های قرمز خون (RBC)
$2886 \pm 6.23 \times 10^4$ a	$6466 \pm 6.29 \times 10^4$ a	$1100 \pm 4.1 \times 10^4$ b	$1205 \pm 3.98 \times 10^4$ b	تعداد گلبول‌های سفید خون (WBC)
115 ± 28.66 a	378 ± 26.66 a	173 ± 30.00 a	208 ± 28.33 a	هماتوکریت (HCT)
0.91 ± 10.3 a	0.75 ± 10.1 a	1.37 ± 10.7 a	1.1 ± 7.26 b	هموگلوبین (Hb)
4.63 ± 126.34 a	17.39 ± 115.09 a	9.35 ± 139.53 a	8.36 ± 130.51 a	MCV
3788 ± 45.39 ab	3761 ± 43.57 ab	767 ± 49.87 a	493 ± 33.47 b	MCH
187 ± 35.88 a	258 ± 38.1 a	479 ± 35.71 a	471 ± 25.78 b	MCHC
3746 ± 86.00 a	602 ± 86.33 a	152 ± 85.33 a	0.57 ± 87.33 a	لنفوسیت
100 ± 8.00 a	152 ± 8.66 a	152 ± 7.33 a	152 ± 6.33 a	نوتروفیل
100 ± 5.00 a	371 ± 5.33 a	371 ± 5.66 a	100 ± 5.00 a	مونوسیت
0.57 ± 1.66 a	0.57 ± 1.33 a	115 ± 0.66 a	0.57 ± 1.33 a	ائوزینوفیل

a-b-c: میانگین هر ردیف با حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌داری است ($p < 0.05$).

a-b-c: The mean of each row with dissimilar letters has a significant difference ($p < 0.05$).

cerevisiae و یواسل تأثیر معنی‌داری بر درصد بازماندگی بچه ماهیان کوی تحت تنش شوری داشت ($p < 0.05$). در دو روز ابتدایی (روز اول و دوم)، تمامی تیمارها از جمله تیمار شاهد،

اثرات پروبیوتیک *Saccharomyces cerevisiae* و یواسل

بر مقاومت به شوری

نتایج حاصل از آزمون مقاومت به شوری (با غلظت ۱۲ گرم در لیتر آب) نشان داد که مصرف سطوح مختلف پروبیوتیک *S.*

بازماندگی ۱۰۰ درصدی نشان دادند و تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد ($p < 0.05$).

با این حال، از روز سوم به بعد، تفاوت‌ها نمایان شد. در روز سوم، درصد بازماندگی در تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت در حالی که تیمارهای دریافت‌کننده پروبیوتیک (۰/۱، ۰/۵ و ۱ گرم در کیلوگرم غذا) همچنان بازماندگی کامل (۱۰۰ درصد) داشتند. در روزهای چهارم و پنجم نیز الگوی مشابهی مشاهده گردید به‌طوری‌که درصد بقاء در تیمار شاهد کاهش بیشتری داشت و در سایر تیمارها ثابت باقی ماند.

در روزهای ششم و هفتم، بازماندگی در تیمارهای ۰/۵ و ۱ گرم در کیلوگرم غذا همچنان ۱۰۰ درصد باقی ماند، اما در تیمار ۰/۱

درصد کاهش یافت. کاهش معنی‌دار درصد بازماندگی در تیمار شاهد، در این دو روز مشهود بود ($p < 0.05$). همچنین بین تیمار ۰/۱ و تیمارهای ۰/۵ و ۱ تفاوت معنی‌داری از نظر بازماندگی مشاهده گردید که بیانگر اثربخشی بیشتر دوزهای بالاتر پروبیوتیک در افزایش مقاومت به تنش شوری بود.

به طور کلی، نتایج نشان می‌دهند که استفاده از پروبیوتیک *S. cerevisiae* و یواسل به‌ویژه در سطوح ۰/۵ و ۱ گرم در کیلوگرم جیره غذایی، موجب بهبود معنی‌دار مقاومت بچه‌ماهیان کوی در برابر شوری می‌گردد. این تأثیر می‌تواند ناشی از تقویت سیستم ایمنی و حفظ تعادل اسمزی بهتر در نتیجه مصرف این پروبیوتیک باشد. نتایج کامل در جدول ۲ ارائه شده‌اند.

جدول ۲: مقایسه درصد مقاومت به شوری بچه ماهی کوی تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک

Table 2: Comparison of the percentage of salinity resistance of koi fry fed with different levels of probiotics

تیمار ۱	تیمار ۰/۵	تیمار ۰/۱	گروه شاهد	متغیر / تیمار
۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	روز اول
۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	روز دوم
۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۱/۰۰ ± ۹۰ ^b	روز سوم
۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۰/۵۷ ± ۹۰/۳۳ ^b	روز چهارم
۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۰/۵۷ ± ۸۰/۳۳ ^b	روز پنجم
۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۰/۳۳ ± ۹۰/۳۳ ^b	۰/۳۳ ± ۸۰/۳۳ ^c	روز ششم
۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۰/۵۷ ± ۹۰/۳۳ ^b	۰/۵۷ ± ۸۰/۳۳ ^c	روز هفتم

a-b-c: میانگین هر ردیف با حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌داری است ($p < 0.05$).

a-b-c: The mean of each row with dissimilar letters has a significant difference ($p < 0.05$).

بحث

با توجه به رشد فزاینده جمعیت جهانی و نقش حیاتی محصولات شیلاتی در تأمین امنیت غذایی، پرورش آبزیان در دهه‌های اخیر به سرعت گسترش یافته است. افزایش تراکم در مزارع پرورش آبزیان، یکی از راهکارهای افزایش بازده تولید به‌شمار می‌رود. با این حال، این امر می‌تواند موجب بروز بیماری‌ها، کاهش کیفیت آب و شرایط استرس‌زا گردد که اغلب ناشی از عفونت‌های باکتریایی است و منجر به تضعیف سیستم ایمنی آبزیان می‌شود. یکی از روش‌های رایج مقابله با بیماری‌ها، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌هاست، اما مصرف بی‌رویه آن‌ها با انتقادات جدی از جمله: افزایش مقاومت باکتری‌ها، آسیب به فلور طبیعی روده، هزینه‌های بالا و عوارض جانبی، مواجه شده است. به‌علاوه، برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث سرکوب سیستم ایمنی می‌شوند و آبزیان

را مستعد ابتلا به عفونت‌های باکتریایی، ویروسی و انگلی می‌کنند (Karimpour et al., 2020).

به دنبال این نگرانی‌ها، سیاست‌گذاری‌های جدیدی در ایالات متحده و اروپا منجر به کاهش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و جایگزینی آن‌ها با راهکارهای ایمن‌تر همچون استفاده از افزودنی‌های غذایی طبیعی، پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها، سین‌بیوتیک‌ها، اسیدهای آلی، عصاره‌های گیاهی و سایر ترکیبات تغذیه‌ای شده است (Ramzannejad et al., 2021). در این

عرصه، مطالعه حاضر به بررسی اثرات پروبیوتیک *Saccharomyces cerevisiae* بر شاخص‌های خونی، مقاومت به شوری و بقاء در بچه‌ماهیان کوی پرداخته است. پروبیوتیک‌ها به عنوان جایگزینی مؤثر برای آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت آبی‌پروری معرفی شده‌اند و از مهم‌ترین مزایای آن‌ها، بهبود

cerevisiae به طور معناداری موجب افزایش بقاء در شرایط تنش شوری (۱۲ گرم در لیتر) در بچه ماهیان کوی شد. این نتایج با مطالعات Balcázar و همکاران (۲۰۰۷)، Samarawardane و همکاران (۲۰۲۱)، Dawood و همکاران (۲۰۱۷)، Zheng و همکاران (۲۰۱۷) همخوانی دارد. به نظر می‌رسد پروبیوتیک‌ها با ارتقاء مکانیسم‌های تنظیم اسمزی و کاهش آسیب‌های ناشی از تنش، نقش مؤثری در بهبود مقاومت به شوری ایفا می‌کنند.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از پروبیوتیک *Saccharomyces cerevisiae* و یواسل در رژیم غذایی بچه ماهیان کوی منجر به بهبود قابل توجهی در برخی شاخص‌های خونی از جمله افزایش تعداد گلبول‌های قرمز و سفید، هموگلوبین، MCH و MCHC گردید. این تغییرات بیانگر ارتقاء وضعیت فیزیولوژیک و ایمنی ماهیان تحت تأثیر مصرف پروبیوتیک است. همچنین تیمارهای حاوی پروبیوتیک به‌ویژه در سطوح ۰/۵ و ۱ درصد، توانستند درصد بازماندگی بالاتری را در شرایط تنش شوری نسبت به گروه شاهد حفظ کنند که نشان‌دهنده نقش حمایتی این افزودنی در افزایش مقاومت ماهی به تنش‌های محیطی است.

منابع

- Akbari Nargesi, E., Falahatkar, B. and Mohammadi, M. 2019. Growth performance and hematological indices in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Exclusive study of probiotic effect on male broodstock, Iranian Scientific Fisheries Journal, 30, 458-468. <https://doi.org/10.22092/isfj.2019.119093>.
- Asadi, T., Meshkini, S. and Ahmadifard, N., 2023. Dietary effects of procyanidin and Bio-Aqua® on hematological and immune indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Research Forum*, 20, 178-195. <https://doi.org/10.30466/vrf.2023.1972329.3678>.

عملکرد رشد و افزایش ارزش تغذیه‌ای جیره غذایی است (Davoodi and Safari, 2019).

S. cerevisiae با تولید آنزیم‌هایی نظیر آمیلاز و پروتئاز، به تجزیه کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها در دستگاه گوارش کمک می‌کند و موجب افزایش قابلیت هضم و جذب مواد مغذی می‌شود. افزون بر این، اثرات تعدیل‌کننده ایمنی این مخمر نیز گزارش شده است (Brown, 2017).

مطالعات متعددی نیز در تأیید یافته‌های این تحقیق انجام شده‌اند. برای مثال، Sotoudeh (۲۰۲۰) نشان داد که افزودن پروبیوتیک Bio-Aqua به جیره قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث افزایش معنی‌دار وزن نهایی می‌شود. نتایج مشابهی نیز در مطالعات Jamali (۲۰۱۵)، Mocanu و همکاران (۲۰۲۲) و Ramzannejad و همکاران (۲۰۲۱) در گونه‌های مختلف ماهی گزارش شده است.

با این حال، برخی از مطالعات نتایجی متفاوت با تحقیق حاضر ارائه داده‌اند. این تفاوت‌ها ممکن است ناشی از عوامل متعددی چون گونه ماهی، سن، دوز، نحوه مصرف، مدت زمان تغذیه و شرایط محیطی باشند (Larsen, 1964).

از نظر شاخص‌های خونی، مطالعه حاضر نشان داد که در تیمارهای ۰/۵ و ۱ درصد، تعداد گلبول‌های قرمز و سفید، غلظت هموگلوبین، MCH و MCHC به طور معناداری افزایش یافته‌اند. یافته‌هایی که با نتایج مطالعات Ramzannejad و همکاران (۲۰۲۱)، Panahi و همکاران (۲۰۱۹) و Asadi و همکاران (۲۰۲۳) همخوانی دارند. در مقابل، تحقیقات Hosseini و همکاران (۲۰۱۴) و Welker و همکاران (۲۰۰۷) نشان‌دهنده عدم تأثیر معنی‌دار مکمل‌های پروبیوتیکی بر این شاخص‌ها بوده‌اند.

در خصوص شاخص‌هایی چون هماتوکریت، MCV و ترکیب لکوسیتی خون (لنفوسیت، نوتروفیل، مونوسیت و ائوزینوفیل)، این پژوهش تفاوت معنی‌داری بین تیمارها و گروه شاهد نشان نداد که با یافته‌های برخی مطالعات از جمله Welker و همکاران (۲۰۰۷)، Pongpet و همکاران (۲۰۱۶) و Iwashita و همکاران (۲۰۱۵) همخوانی دارد. اما مطالعاتی نیز وجود دارند که خلاف این موضوع را گزارش کرده‌اند (Ramzannejad و همکاران، ۲۰۲۱؛ Dima و همکاران، ۲۰۲۲؛ Mocanu و همکاران، ۲۰۲۲).

توانایی تحمل شوری یکی از ویژگی‌های مهم فیزیولوژیک در ماهیان است. یافته‌های این پژوهش نشان داد که استفاده از *S.*

- Balcázar, J.L., Rojas-Luna, T. and Cunningham, P., 2007.** Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96(2), 147-150. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.04.008>.
- Benfey, T. and Sutterlin, A., 1984.** The haematology of triploid landlocked Atlantic salmon, *Salmo solar L.* *Journal of Fish Biology*, 24(3), 333-338. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1984.tb04804.x>.
- Brown, T.L., 2017.** The effects of dietary inclusion of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product in a commercial catfish ration on growth, immune readiness, and columnaris disease susceptibility. *Auburn University* 24(3), 333-338. <http://dx.doi.org/10.1080/10454438.2018.1499576>.
- Dawood, M.A., Koshio, S., Ishikawa, M., El-Sabagh, M., Yokoyama, S., Wang, W.L., Yukun, Z. and Olivier, A., 2017.** Physiological response, blood chemistry profile and mucus secretion of red sea bream (*Pagrus major*) fed diets supplemented with *Lactobacillus rhamnosus* under low salinity stress. *Fish Physiology and Biochemistry*, 43, 179-192. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0277-4>.
- Davoodi Sefidkouhi, F. and Safari, A., 2019.** Introduction of *Saccharomyces cerevisiae* yeast and its uses in the aquaculture industry. *8th National Conference of Ichthyology of Iran*. 71(1):12-18. <https://doi.org/10.2208>.
- Dima, M.F., Sîrbu, E., Patriche, N., Cristea, V., Coadă, M.T. and Plăcintă, S., 2022.** Effects of multi-strain probiotics on the growth and hematological profile in juvenile carp.) *Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758. <https://doi.org/10.34302/crpjfst/2022.14.2.1>.
- Durchschein, F., Petritsch, W. and Hammer, H.F., 2016.** Diet therapy for inflammatory bowel diseases: The established and the new. *World Journal of Gastroenterology*, 22(7), 2179. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i7.2179>.
- FAO, 2020.** FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2020. <https://doi.org/10.4060/cc7493en>.
- Ghosh, S., Sinha, A. and Sahu, C., 2007.** Effect of probiotiv on proformance in female livebearing ornamental fish. *Aquaculture Research*, 38, 518-526. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01696.x>.
- Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E. and Brosious, E., 1971.** Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology*, 56(1), 35-39. <https://doi.org/10.1093/ajcp/56.1.35>.
- Hosseini, A., Orazi, H., Yegane, S. and Shahabi, H. 2014.** The effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on growth performance, blood and some serum parameters in Caspian salmon (*Salmo trutta caspius*). 54(5), 1218-1230. <https://dor.isc.ac/dor/20.1001.1.15622916.2017.16.1.12.3>.
- Imanpour, M.R., Roohi, Z., Salaghi, Z., Beekzadeh, A. and Davodipour, A.R., 2015.** Effect of prebiotic Primilac on growth indices, blood biochemical parameters, survival and resistance to salinity stress of juvenile common sea carp. *Fisheries Science and Technology*, 4, 3, 17-28., (in persian) <https://doi.org/10.22092/isfj.2015.103133>.

- Iwashita, M.K.P., Nakandakare, I.B., Terhune, J.S., Wood, T. and Ranzani-Paiva, M.J.T., 2015. Dietary supplementation with *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* enhance immunity and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* infection in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 43(1), 60-66. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.12.008>.
- Jamali, H., 2015. Effect of probiotic *Bacillus* spp. on growth and feed efficiency of common carp, grass carp and bighead larvae fed with nauplii of different *Artemia* species. *Fisheries Science and Technology*, 4(2), 27-43. <http://dorl.net/dor/20.1001.1.23225513.1394.4.2.3.3>.
- Karimpour, M., Harlioglu, M.M., Khanipour, A.A., Abdolmalaki, S. and Aksu, O., 2020. Present status of fisheries in Iran. *Journal of Fisheries Sciences.Com*, 7(2), 161. DOI:10.3153/jfscom.2013017.
- Larsen, H.N., 1964. Comparison of various methods of hemoglobin determination on catfish blood. *The Progressive Fish-Culturist*, 26(1), 11-15. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1964\)26\[11:COVMOH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1964)26[11:COVMOH]2.0.CO;2).
- Leonard, J. and McCormick, S., 1999. Changes in haematology during upstream migration to American shad. *Journal of Fish Biology*, 54(6), 1218-1230. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1999.tb02050.x>.
- Mocanu, E.E., Savin, V., Popa, M.D. and Dima, F.M., 2022. The effect of probiotics on growth performance, haematological and biochemical profiles in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt, 1869). *Fishes*, 7(5), 239. <https://doi.org/10.3390/fishes7050239>.
- Mohammadi, F., Mousavi, S., Ahmadoradi, E., Zakeri, M. and Jahedi, A., 2015. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on survival rate and growth performance of Convict Cichlid (*Amatitlania nigrofasciata*). *Iranian Journal of Veterinary Research*, 16(1), 59. <https://doi.org/10.22099/ijvr.2015.2925>.
- Panahi, S.H., Esmaili, F.A., Imanpour, M.R., Taheri, M.A., Barari, A. and Kavianpour, M., 2019. Effects of dietary inclusion of prebiotic immunowall and probiotic primalac on growth indices, survival, body composition, and blood biochemical parameters in the Caspian Sea carp, *Cyprinus carpio*, fingerlings. 41(1-2), 125-139. <https://doi.org/10.22059/ijvr.2019.234036.2631>.
- Pongpet, J., Ponchunchoovong, S. and Payooha, K., 2016. Partial replacement of fishmeal by brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in the diets of Thai Panga (*Pangasianodon hypophthalmus* × *Pangasius bocourti*). *Aquaculture Nutrition*, 22(3), 575-585. <https://doi.org/10.1111/anu.12280>.
- Ramzannejad, O., Changizi, R., Vatandoust, S., Safari, R. and Manouchehri, H., 2021. The effect of probiotic Bio-Aqua® on growth performance, haematological and biochemical parameters of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 20(5), 1304-1316. <https://dor.isc.ac/dor/20.1001.1.15622916.2021.20.5.10.7>.
- Rezaei Aminloo, V., Ahmadifard, N., Tukmechi, A. and Agh, N., 2018. Investigation of Microbiota of *Artemia franciscana* Fed by Bacterial Probiotic *Bacillus subtilis* and Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* under Laboratory Conditions. *Fisheries Science and Technology*, 7, 185-189.

- http://dorl.net/dor/20.1001.1.23225513.1397.7.3.3.6.
- Samarawardane, T., Radampola, K. and Rathnapala, S., 2021.** Effect of dietary probiotic supplementation on growth, survival, coloration and stress resistance in guppy (*Poecilia reticulata* Peters, 1859). *Tropical Agricultural Research and Extension*, 24(3).
http://dx.doi.org/10.4038/tare.v24i3.5520.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P. and Rumsey, G.L., 1994.** Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 41(1-2), 125-139. https://doi.org/10.1016/0165-2427(94)90062-0.
- Sotoudeh, E., 2020.** Growth performance and blood indices of juvenile rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fed diets containing Sargassum cristaefolium and Gracilaria pygmaea extracts. *Journal of Applied Ichthyological Research*, 8(1), 80-89.
http://dx.doi.org/10.29252/jair.8.1.80.
- Welker, T.L., 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 subcomponents. *Journal of the world Aquaculture Society*, 38(1), 24-35.
https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2006.00070.x.
- Zakariaee, H., Sudagar, M., Hosseini, S.S., Paknejad, H. and Baruah, K., 2021.** In vitro Selection of Syn biotics and in vivo Investigation of Growth Indices, Reproduction Performance, Survival, and Ovarian Cyp19α Gene Expression in Zebrafish Ex *Danio rerio*. *Frontiers in Microbiology*, 758758, 12.
https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.758758.
- Zheng, X., Duan, Y., Dong, H. and Zhang, J., 2017.** Effects of dietary *Lactobacillus plantarum* in different treatments on growth performance and immune gene expression of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under normal condition and stress of acute low salinity. *Fish and shellfish immunology*, 62, 195-201.
https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.01.015.
- Ziaienejad, S., Azari Takami, Gh., Mirvafei, A.R., Habibi Rezaei, M. and Shakouri, M., 2005.** Application of Bacillus bacteria as probiotics to increase growth and production parameters in ponds of Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Natural Resources of Iran*, 58(4), 843-852. (in persian).
https://sid.ir/paper/23010/fa

Effects of the Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* on Hematological Parameters, Survival Rate, and Salinity Tolerance in Juvenile Koi Carp (*Cyprinus carpio* L.)

Sadat S.Z.^{1*}; Imanpour M.R.¹; Safari R.¹

*sy.zahra.sadat.m@gmail.com

1-Department of Aquaculture and Breeding, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Abstract:

This study evaluated the effects of dietary supplementation with the probiotic *Saccharomyces cerevisiae* on hematological parameters, survival, and salinity tolerance in juvenile koi carp (*Cyprinus carpio* L.). A total of 132 fish with uniform initial weights were fed experimental diets containing different inclusion levels of the probiotic (0, 0.1, 0.5, and 1%) for eight weeks following an adaptation period. At the end of the trial, blood indices including red and white blood cell counts, hemoglobin concentration, and hematocrit were measured. Subsequently, fish were exposed to saline conditions (12 g/L NaCl) to evaluate survival and resistance. Results revealed that supplementation with *S. cerevisiae* significantly increased red and white blood cell counts, hemoglobin concentration, and hematocrit ($P < 0.05$), indicating improved health status and physiological performance. Furthermore, under saline stress, probiotic-fed groups exhibited a higher survival rate compared to the control. These findings suggest that dietary inclusion of *S. cerevisiae* can enhance hematological indices, promote resilience against environmental stressors such as salinity, and improve overall fish performance in koi carp aquaculture.

Keywords: Probiotic, *Saccharomyces cerevisiae*, Hematological parameters, Juvenile koi carp