



University of Guilan

University of Guilan with collaboration of Iranian
Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 8, No. 1, 2022, pages: 11-24
DOI: 10.22124/janb.2023.22385.1169



Effects of adding dietary *Lactobacillus plantarum* on efficient performance of soybean meal in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hematological and immune indices

Asal Dabbagh^{*1} Hosein Oraji¹, Abdolsamad Keramat Amirkolaie¹, ZARBAKHT Ansari²

1- Department of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Mazandaran, Iran

2- Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Mazandaran, Iran

Received 16 December 2021

Revised 12 March 2022

Accepted 16 March 2022

KEYWORDS

Rainbow trout
soybean meal
Lactobacillus plantarum
Neutrophil burst activity
Blood indices
Immunology

ABSTRACT

In the present study, the effects of probiotic (0 and 1) in rainbow trout fed with different levels of soybean meal (SBM; 0, 20 and 40%) were evaluated on hematological and immune indices. A total of 300 fry with average initial weight of 20.05 ± 0.20 g by density of 25 fish per tank assigned to 12 tanks for 90 days. Blood was taken from fish on days 0, 45 and 90, afterward hematological and immune indices were estimated. According to hematological results in day 45, fish fed with SBM 0 demonstrated greatest number of white blood cells and hematocrit among treatments ($p < 0.05$). In day 90, the highest number of red blood cells was found in SBM 0 and SBM 20% containing probiotic ($p < 0.05$). Number of white blood cells significantly increased by adding probiotic to different SBM levels ($p < 0.05$). Hematocrit and hemoglobin concentrations decreased in fish fed with SBM 40% ($p < 0.05$). In addition, there were interaction between SBM \times probiotic in white blood cells on day 90 ($p < 0.05$). According to immunological results in day 45, neutrophil burst activity (NBT) was elevated by adding probiotic to SBM levels ($p < 0.05$). The IgM and C₃ levels were significantly enhanced by adding probiotic to SBM 0 and SBM 20%. In day 90, the highest NBT value was observed in SBM 0 (probiotic 0 and 1) and SBM 20% containing probiotic among groups ($p < 0.05$). Addition of probiotic to SBM 0 and SBM 20% caused the elevated lysozyme, IgM, C₃ and C₄ values ($p < 0.05$). Furthermore, interaction between SBM levels and probiotic indicated significant effects on NBT after 90 days ($p < 0.05$). It could be revealed from the current study that *L. plantarum* compensated some adverse effects of SBM replacement on blood and immune indices by enhancing immunity, hence higher replacement of SBM is not suggested without using probiotic.

*Corresponding author: a.dabbagh1401@yahoo.com





دانشگاه گیلان با مشارکت انجمن آبی‌پروری ایران

تغذیه آبزیان

سال هشتم، شماره یکم، بهار ۱۴۰۱، صفحات ۲۴-۱۱

DOI: 10.22124/janb.2023.22385.1169



"مقاله پژوهشی"

بررسی تأثیر افزودن *Lactobacillus plantarum* بر بهبود عملکرد کنباله سویا در جیره قزل‌آلای رنگین‌کمان از طریق ارزیابی شاخص‌های خونی و ایمنی

عسل دباغ*^۱، حسین اورجی^۱، عبدالصمد کرامت امیرکلایی^۱، زربخت انصاری^۲

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، مازندران

۲- گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۵

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۲/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۲۵

کلمات کلیدی

چکیده

در مطالعه کنونی اثرات پروبیوتیک در قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه‌شده با سطوح مختلف سویا (صفر، ۲۰ و ۴۰٪) بر فراسنجه‌های خونی و ایمنی بررسی شد. ۳۰۰ بچه‌ماهی (۰/۲ ± ۲۰/۰۵ گرم) با تراکم ۲۵ عدد در ۱۲ مخزن به مدت ۹۰ روز ذخیره‌سازی شدند. در روزهای صفر، ۴۵ و ۹۰ خون‌گیری از ماهیان انجام و شاخص‌های خونی و ایمنی ارزیابی شدند. طبق نتایج شاخص‌های خونی در روز ۴۵، ماهیان تغذیه‌شده با جیره فاقد سویا بیشترین تعداد گلبول سفید و درصد هماتوکریت را نشان دادند ($p < 0/05$). در روز ۹۰، بیشترین تعداد گلبول قرمز در جیره‌های فاقد سویا و ۲۰٪ سویا حاوی پروبیوتیک به دست آمد ($p < 0/05$). تعداد گلبول سفید با افزودن پروبیوتیک به سطوح مختلف سویا به‌طور معنی‌دار افزایش یافت ($p < 0/05$). غلظت‌های هماتوکریت و هموگلوبین در ماهیان تغذیه‌شده با ۴۰٪ سویا کاهش یافت ($p < 0/05$). همچنین، در روز ۹۰ اثرات متقابلی بین سویا × پروبیوتیک در تعداد گلبول‌های سفید مشاهده شد ($p < 0/05$). طبق نتایج شاخص‌های ایمنی در روز ۴۵، انفجار تنفسی نوتروفیل (NBT) با افزودن پروبیوتیک به درصدهای مختلف سویا افزایش یافت ($p < 0/05$). مقادیر IgM و C_3 با افزودن پروبیوتیک به سویای صفر و ۲۰٪ به‌طور معنی‌دار ارتقا یافتند ($p < 0/05$). در روز ۹۰، NBT در تیمارهای فاقد سویا (پروبیوتیک صفر و ۱) و سویای ۲۰٪ حاوی پروبیوتیک به‌طور معنی‌دار بالاتر از دیگر تیمارهای آزمایشی بود ($p < 0/05$). افزودن پروبیوتیک به جیره سویای صفر و ۲۰٪ سبب افزایش مقادیر لیوزیم، IgM، C_3 و C_4 شد ($p < 0/05$). علاوه بر این، اثرات متقابل بین سطوح سویا و پروبیوتیک بر شاخص‌های ایمنی نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار بر NBT در روز ۹۰ بود ($p < 0/05$). با توجه به نتایج می‌توان بیان کرد که *L. plantarum* با تحریک ایمنی به جبران تأثیرات منفی جایگزینی سویا بر شاخص‌های خونی و ایمنی کمک کرده و لذا جایگزینی مقادیر بالای سویا بدون استفاده از پروبیوتیک توصیه نمی‌شود.

مقدمه

قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) از بازارپسندی خوبی در ایران برخوردار است. جیره این گونه به دلیل رژیم گوشت‌خواری حاوی درصد زیادی پروتئین است، به طوری که نیاز پروتئین در قزل‌آلای رنگین‌کمان از ۴۰ تا ۴۵٪ جیره متغیر است (Halver and Hardy, 2002). آرد ماهی یک ماده اولیه غذایی بسیار مهم در جیره آبزیان پرورشی به عنوان یک منبع تأمین‌کننده پروتئین، اسید آمینه‌های ضروری، مواد معدنی، چربی و ویتامین‌ها محسوب می‌شود (Miles and Chapman, 2006). آرد ماهی قیمت بالایی داشته و تأمین آن به صید از دریا وابسته است که منجر به مصرف ماهیان غیرمصرفی و کم ارزش برای گونه‌های پرورشی می‌شود. صید جهانی به دلایلی چون افزایش صید بی‌رویه و کاهش ذخایر، روندی رو به کاهش دارد. بنابراین، کاهش قیمت جیره و آبی‌پروری پایدار به استفاده از منابع جایگزین و کاهش وابستگی به آرد ماهی نیازمند است.

در این میان، پروتئین‌های گیاهی بهترین جایگزین برای آرد ماهی در جیره‌های غذایی ماهیان پرورشی محسوب می‌شوند (Soltan et al. 2008). آرد سویا بهترین خوراک گیاهی مورد استفاده برای جایگزینی آرد ماهی در جیره‌های غذایی گونه‌های آبی‌پروری است و امروزه به عنوان اصلی‌ترین گزینه برای جایگزینی پروتئین‌های گیاهی به جای آرد ماهی در جیره‌های غذایی به‌شمار می‌رود (Storebakken et al. 2000; Tibaldia et al. 2006; Uran et al. 2008). با وجود این، کنجاله سویا حاوی متیونین بسیار کمی بوده و به تنهایی تأمین‌کننده نیاز ماهی نیست (Francis et al. 2001). از دیگر مواد ضدتغذیه‌ای موجود در سویا می‌توان به اسید فایتیک اشاره کرد که دسترسی به فسفر و مواد معدنی کاتیونی را از طریق باند کردن آنها کاهش می‌دهد. همچنین، دسترسی به ویتامین‌ها در ماهیان تغذیه شده با سویا کاهش می‌یابد. ترکیبات سمی آرد سویا بر روی تمایز یاخته‌های بافت پوششی روده انتهایی اثر گذار بوده و ممکن است موجب کاهش هضم‌پذیری مواد مغذی در ماهیان آزاد تغذیه شده با آرد سویا شود (Bakke-McKellep et al. 2000). تغییر پروتئین جیره به پروتئین گیاهی می‌تواند بر روی جمعیت باکتریایی بومی و غیربومی قزل‌آلای رنگین‌کمان تأثیر بگذارد.

پروبیوتیک‌ها ریزموجودات مکملی مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها هستند که با متعادل کردن فلور میکروبی دستگاه گوارش، سلامت میزبان را افزایش می‌دهند (Fuller, 1992). این ریزموجودات زنده اگر به میزان مناسب استفاده شوند می‌توانند سبب بهبود وضعیت سلامت میزبان شوند (Ghosh et al. 2008). پروبیوتیک‌ها باعث افزایش مقاومت و ایمنی و پیشگیری از ابتلا به بسیاری از بیماری‌ها در جانوران مختلف می‌شوند. احتمالاً ترکیب استفاده از پروبیوتیک‌ها همراه با رژیم تماماً سویا برای افزایش جمعیت باکتریایی بافت پوششی می‌تواند مؤثر باشد که پس از مدتی به بازسازی دوباره سد دفاعی در مقابل عوامل بیماری‌زا کمک کند (Merrifield et al. 2009). ایمنی هومورال در ماهی شامل ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی است. کمپلمان و لیزوزیم اجزای مهم غیر اختصاصی دستگاه ایمنی هومورال و IgM از اجزای اختصاصی دستگاه ایمنی هومورال محسوب می‌شوند (Wilson et al. 1995; Uribe et al. 2011). انفجار تنفسی نوتروفیل یک معیار اندازه‌گیری اکسایش نوتروفیل به شمار می‌رود و شاخصی برای تعیین درستی انجام بیگانه-خواری توسط نوتروفیل است. کشتن درون‌یاخته‌ای توسط فرآیندهای وابسته به اکسیژن، به مولکول‌های سمی تولید شده بستگی دارد که انفجار اکسیداتیو نام دارد (Sawyer et al. 1996; Roitt et al. 1989). انتخاب باکتری مناسب به واسطه ظرفیت‌هایی مانند تولید آنزیم‌های مورد نیاز دارای اهمیت است. باکتری‌های باسیلوس و لاکتوباسیلوس برای انجام عمل تخمیر ارجحیت دارند (Yang et al. 2007).

Valipour و همکاران (۲۰۱۹) ارتقای شاخص‌های خونی و ایمنی از جمله لیزوزیم را در خرچنگ دراز آب شیرین تغذیه‌شده با *Lactoballus plantaurum* گزارش کردند. Kordi و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که *Lactoballus plantaurum* پوشش‌دار، تعداد گلبول سفید را افزایش داد، ولی تأثیری بر دیگر شاخص‌های خونی، ACH₅₀ و IgM نداشت. علاوه بر این، تقویت دستگاه ایمنی و کاهش تخریب روده‌ای با تخمیر آرد سویا به کمک باکتری‌های پروبیوتیک در باس دریایی ژاپنی (*Lateolabrax japonicus*) گزارش شد (Rahimnejad et al. 2018). بنابراین، هدف اصلی تحقیق حاضر، ارتقای اثر سویا با افزودن *Lactoballus*

- تیمار ۳: جیره حاوی آرد سویا ۲۰٪ + پروبیوتیک صفر
 تیمار ۴: جیره حاوی آرد سویا ۲۰٪ + پروبیوتیک ۱
 تیمار ۵: جیره حاوی آرد سویا ۴۰٪ + پروبیوتیک صفر
 تیمار ۶: جیره حاوی آرد سویا ۴۰٪ + پروبیوتیک ۱

بر اساس رفتار تغذیه‌ای بچه‌ماهیان، غذادهی به میزان ۳-۴٪ وزن بدن در کل دوره آزمایش در حد سیری در سه نوبت روزانه در ساعات ۸، ۱۲ و ۱۷ انجام شد.

اندازه‌گیری فراسنجه‌های فیزیکی شیمیایی آب

فراسنجه‌های کیفی آب شامل درجه حرارت (درجه سانتی-گراد) به صورت روزانه و اکسیژن محلول (مدل AQUALYTIC AL15)، pH (مدل Sartorius PB11)، کل مواد جامد محلول (TDS)، هدایت الکتریکی (HACH sension5)، شوری و نیتريت به صورت هفتگی اندازه‌گیری و به این صورت گزارش شدند: میانگین دما 12.5 ± 1.25 درجه سانتی‌گراد، pH 7.39 ± 0.08 ، اکسیژن محلول 7.55 ± 0.39 میلی‌گرم در لیتر، نیتريت 0.13 ± 0.02 میلی‌گرم در لیتر، هدایت الکتریکی 212 ± 50.2 موس بر سانتی‌متر، شوری 0.25 قسمت در هزار (ppt) و TDS 333 ± 256.2 میلی‌گرم در لیتر.

شاخص‌های خونی

در ابتدای پرورش، روز ۴۵ و انتهای دوره روز ۹۰، از هر تکرار به طور تصادفی ۳ عدد ماهی برای خون‌گیری انتخاب، با پودر گل میخک با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیهوش، و خون‌گیری با استفاده از سرنگ از سیاهرگ ناحیه دمی انجام شد. وزن ماهیان در روزهای صفر، ۴۵ و ۹۰ خون‌گیری به ترتیب 20 ± 0.20 ، 20.5 ± 0.74 و 48.33 ± 12.77 و 91.75 ± 12.77 بود. ۲۴ ساعت قبل از خون‌گیری تغذیه ماهیان قطع شد. شاخص‌های خونی مورد بررسی شامل گلبول‌های قرمز (RBC) و سفید (WBC) بر اساس روش Houston (1990) و به کمک لام نئوبار انجام شد. غلظت هموگلوبین (Hb) با استفاده از محلول درابکین و قرائت در دستگاه اسپکتروفوتومتر (UNICO UV-2150) انجام شد. درصد هماتوکریت (Hct) پس از سانتریفیوژ لوله‌های موئینه حاوی خون طبق روش Drabkin (1945) در روز نمونه-برداری با استفاده از خون ماهی اندازه‌گیری شدند. بقیه خون در لوله آزمایش قرار گرفته و پس از لخته‌شدن به منظور استحصال سرم سانتریفیوژ شد. خون در دور ۱۶۰۰

plantaureum بر شاخص‌های خونی و دستگاه ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی مخازن و شرایط آزمایشی

در این مطالعه، ۳۰۰ عدد بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از مرکز پرورش ماهی واقع در روستای تلوکلای کیاسر خریداری و به کارگاه پرورشی واقع در روستای درازمحل ساری منتقل شدند. ماهیان برای رعایت قرنطینه به مدت ۱۰ روز با شرایط محیطی سازگار شدند. در این مدت با جیره تجاری اکستروید مخصوص قزل‌آلا (شرکت بیضا) حاوی ۴۳-۴۶٪ پروتئین، ۱۱-۱۵٪ چربی، ۱۱-۱۵٪ خاکستر و بیشینه ۱۲٪ رطوبت تغذیه شدند. پس از سازگاری، رقم‌بندی ماهیان انجام شد و در هر تکرار ۲۵ عدد بچه‌ماهی با میانگین وزنی 20 ± 0.5 گرم در واحد-های پرورشی ذخیره‌سازی شدند. دوره آزمایشی به مدت ۹۰ روز به درازا انجامید. مخزن‌های پرورشی از جنس فایبرگلاس بود و برای کل آزمایش با توجه به ۶ تیمار و ۲ تکرار، ۱۲ مخزن ۳۰۰ لیتری در نظر گرفته شد. حجم آب در هر مخزن ۲۵۰ لیتر بود. تعویض آب مخازن به صورت روزانه یکبار به میزان ۱۰٪ انجام شد.

ساخت جیره و تیمار بندی

ترکیب مواد اولیه خوراکی برای ساخت جیره غذایی بچه-ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف آزمایشی از مواد در دسترس شامل آرد ماهی، آرد سویا، آرد گندم، روغن سویا، مکمل ویتامینی، مکمل معدنی و نمک طبق جدول ۱ تهیه شد. میزان پروتئین و چربی غذای پایه بر حسب نیاز بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان به ترتیب ۴۴ و ۱۵٪ در نظر گرفته شد (Halver and Hardy, 2002). تیمارهای مختلف آزمایشی بر اساس سطوح مختلف آرد سویا همراه با سطح ۱ پروبیوتیک (10^9 CFU) و فاقد پروبیوتیک تهیه شدند. همچنین، سنجش تقریبی جیره‌های آزمایشی در جدول ۱ ارائه شده است. تیمارها بر اساس مقدار جایگزینی پروتئین سویا (صفر، ۲۰ و ۴۰٪) و سطوح پروبیوتیک (صفر و ۱) در جیره تعریف شد (Uran, 2008).

تیمار ۱: جیره کنترل حاوی آرد ماهی (آرد سویا صفر و پروبیوتیک صفر)،

تیمار ۲: جیره حاوی آرد سویا صفر + پروبیوتیک ۱

g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی (سوپرناتانت) به دقت جداسازی شد و در نهایت در اپندورف نگهداری و در فریزر ۱۸- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (Farsani et al. 2019).

جدول ۱ مواد اولیه و سنجش تقریبی جیره‌های آزمایشی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان

اقلام اولیه	شاهد (سویا صفر)	سویا ۲۰٪	سویا ۴۰٪
پودر ذرت	۱۰	۷	۴/۱
گلوتن گندم	۱۲/۲	۱۵/۹	۳۰
آرد ماهی	۵۰	۳۲	۰
آرد گندم	۱۵	۱۰	۷
پودر سویا	۰	۲۰	۴۰
روغن ماهی	۸	۱۰	۸
ویتامین C	۰/۲	۰/۲	۰/۲
دی‌کلسیم فسفات	۱	۱	۱
کولین کلراید	۰/۶	۰/۶	۰/۶
L-lysine	۰	۰/۳	۱/۷
DL-methionine	۰	۰	۰/۴
مکمل معدنی ^۱	۱/۵	۱/۵	۱/۵
مکمل ویتامینی ^۲	۱/۵	۱/۵	۱/۵
سنجش تقریبی جیره			
چربی	۱۵/۷۵	۱۵/۴۱	۱۵/۲۹
پروتئین	۴۲/۳۲	۴۲/۳۵	۴۲/۲۷
خاکستر	۱۵/۲	۱۴/۹۴	۱۵/۶۷
رطوبت	۹/۰۲	۹/۲۴	۹/۰۷

^۱ مکمل معدنی تشکیل شده از ۲۶۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۶۰۰ میلی‌گرم مس، ۶۰۰۰ میلی‌گرم آهن، ۴۶۰۰ میلی‌گرم روی، ۵۰ میلی‌گرم سلنیوم، ۱۰۰ میلی‌گرم ید، ۵۰ میلی‌گرم کبالت، ۱۰۰۰۰۰ میلی‌گرم کولین کلراید (Adhami et al. 2021).
^۲ مکمل ویتامینی تشکیل شده از ۱۲۰۰۰۰ واحد ویتامین A، ۴۰۰۰۰۰ واحد ویتامین D₃، ۳۰۰۰ واحد ویتامین E، ۵۴۰۰ میلی‌گرم ویتامین C، ۲۰۰ میلی‌گرم ویتامین B₁، ۳۳۶۰ میلی‌گرم ویتامین B₂، ۷۲۰۰ میلی‌گرم ویتامین B₃، ۹۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین B₅، ۲۴۰۰ میلی‌گرم ویتامین B₆، ۶۰۰ میلی‌گرم ویتامین B₉، ۴ میلی‌گرم ویتامین B₁₂ (Adhami et al. 2021).

شاخص‌های ایمنی

اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. از لیزوزیم سفیده تخم مرغ به عنوان منحنی استاندارد استفاده شد. برای اندازه‌گیری کمپلمان‌های C₃ و C₄ در سرم طبق دستورالعمل کیت مخصوص سنجش کمپلمان تهیه‌شده از موسسه زیست‌فناوری Nanjing چین به روش کدورت سنجی ایمنی استفاده شد. طی این فرآیند پادتن (آنتی-بادی) موجود در کیت با C₃ و C₄ سرمی واکنش داده و مجموعه پادتن-پادگن (آنتی-بادی-آنتی‌ژن) حاصل می‌شود. غلظت نوری در دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۳۶۰

آنزیم لیزوزیم با استفاده از سرم و طبق روش ارائه شده توسط Hultmark و همکاران (۱۹۸۰) اندازه‌گیری شد. ۰/۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر *Micrococcus lysodeikticus* با بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار در pH ۶/۴ مخلوط شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول در چاهک‌های مربوطه قرار گرفت و ۲۰ میکرولیتر سرم به آن اضافه شد. کاهش جذب نمونه‌ها در زمان صفر و ۳۰ دقیقه پس از گرمخانه‌گذاری در طول موج ۵۷۰ نانومتر

نتایج

نتایج حاصل از بررسی شاخص‌های خونی طبق جدول ۲ نشان داد که تعداد گلبول قرمز (RBC)، گلبول سفید (WBC)، هماتوکریت (Hct) و هموگلوبین (Hb) تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی در روزهای ۴۵ و ۹۰ پرورش قرار گرفتند ($p < 0/05$). در روز ۴۵، بیشترین مقدار گلبول قرمز با افزودن پروبیوتیک به جیره بدون سویا مشاهده شد و به طور معنی‌داری از تیمار حاوی ۴۰٪ سویا فاقد پروبیوتیک بیشتر بود ($p < 0/05$)، در حالی که با دیگر تیمارها اختلاف معنی‌دار نداشت ($p > 0/05$). ماهیان تغذیه‌شده با سویا صفر درصد (پروبیوتیک صفر و ۱) بالاترین تعداد گلبول سفید و درصد هماتوکریت را در مقایسه با دیگر تیمارها نشان دادند ($p < 0/05$). مقدار هموگلوبین در تیمارهای حاوی سویا صفر درصد (پروبیوتیک صفر و ۱) به طور معنی‌دار بالاتر از تیمار حاوی ۴۰٪ سویا بدون پروبیوتیک بود ($p < 0/05$)، در حالی که با دیگر تیمارها تفاوت معنی‌دار نداشت ($p > 0/05$). در روز ۹۰، بیشترین تعداد گلبول قرمز در جیره‌های فاقد سویا (پروبیوتیک صفر و ۱) و جیره ۲۰٪ سویا همراه یا پروبیوتیک در مقایسه با دیگر جیره‌های آزمایشی مشاهده شد ($p < 0/05$). تعداد گلبول سفید با افزودن پروبیوتیک به سطوح مختلف سویا به طور معنی‌دار افزایش یافت و کمترین تعداد، مربوط به ماهیان تغذیه‌شده با ۴۰٪ سویا بدون پروبیوتیک بود ($p < 0/05$). مقادیر هماتوکریت و هموگلوبین در ماهیان تغذیه‌شده با ۴۰٪ سویا کاهش یافت و بیشترین مقادیر در همه تیمارهای حاوی سویا صفر و ۲۰٪ (پروبیوتیک صفر و ۱) مشاهده شد ($p < 0/05$). جدول ۳ اثرات متقابل سویا × پروبیوتیک را بر گلبول سفید در روز ۹۰ نشان داد؛ به طوری که افزودن پروبیوتیک به سطوح مختلف سویا منجر به افزایش معنی‌دار در تعداد گلبول سفید شد ($p < 0/05$).

طبق نتایج شاخص‌های ایمنی ارائه‌شده در جدول ۴ در روز ۴۵، انفجار تنفسی نوتروفیل (NBT) با افزودن پروبیوتیک به درصدهای مختلف سویا افزایش یافت و کمترین مقدار در سویا ۴۰٪ فاقد پروبیوتیک یافت شد ($p < 0/05$). این در حالی است که لیزوزیم تفاوت معنی‌داری بین جیره‌های آزمایشی نشان نداد ($p > 0/05$). مقدار ایمونوگلوبولین و C_3 در تیمارهای حاوی سویا صفر (پروبیوتیک ۱) و سویا ۲۰٪ حاوی پروبیوتیک به طور معنی‌دار افزایش یافتند ($p < 0/05$). کمترین مقادیر مذکور در سویا ۴۰٪ (پروبیوتیک صفر و ۱)

نانومتر قرائت شد. مقادیر C_3 و C_4 با مقایسه غلظت نوری نمونه با استاندارد کیت بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر بیان شد.

مقدار IgM سرم با روش کدورت‌سنجی ایمنی و به کمک کیت پارس آزمون اندازه‌گیری شد. در این روش، غلظت IgM توسط اندازه‌گیری فتومتریک واکنش بین پادتن‌های حساس‌شده علیه IgM موجود در کیت و پادگن موجود در سرم تعیین می‌شود. طبق دستورالعمل سازنده پس از تهیه کالیبراتور از طریق رقیق‌سازی نمونه با سرم فیزیولوژی ۲۰ میکرولیتر کالیبراتور با ۵۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی به مدت ۳ الی ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه گرمخانه‌گذاری شده و جذب نوری اولیه کالیبراتورها و نمونه‌ها در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. جذب نوری ثانویه کالیبراتورها و نمونه‌ها پس از ترکیب با ۵۰ میکرولیتر محلول رقیق‌سازی شده نسبت به نمونه آب مقطر به عنوان بلانک محاسبه شد.

انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها

تولید رادیکال اکسیداتیو توسط بیگانه‌خوارها طی انفجار تنفسی از طریق روش NBT (نیترو بلو تترازولیوم) اندازه‌گیری شد (Anderson and Siwicki, 1995). خون و ۲٪ NBT (سیگما، آمریکا) با نسبت مساوی مخلو، و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق گرمخانه‌گذاری شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از آن در لوله‌های شیشه‌ای توزیع شد. یک میلی‌لیتر دی‌متیل فرم‌امید به محلول اضافه، و در دور ۶۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت، مایع رویی (سوپرناتانت) در ۵۴۰ نانومتر اسپکتروفتومتر خوانده شد. از دی‌متیل فرم‌امید به عنوان بلانک استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا نرمال بودن داده‌ها با روش کولموگروف-اسمیرنوف آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن در حدود اطمینان ۹۵٪ انجام شد. داده‌ها با استفاده از روش آزمون واریانس دو طرفه در قالب 3×2 فاکتوریل برای تعیین اثر متقابل سطوح پروبیوتیک و سطوح آرد سویا استفاده شد.

علاوه بر این، اثرات متقابل بین سطوح سویا و پروبیوتیک بر شاخص‌های ایمنی طبق جدول ۵ نشان‌دهنده تأثیر معنی-دار بر NBT در روز ۹۰ بود ($p < 0/05$). افزایش سطح سویا منجر به کاهش NBT شد، درحالی که مقدار مذکور در جیره ۲۰٪ سویا حاوی پروبیوتیک افزایش یافت ($p < 0/05$). در دیگر شاخص‌های ایمنی اثرات متقابلی بین سطوح سویا و پروبیوتیک مشهود نبود ($p > 0/05$).

و سویا ۲۰٪ بدون پروبیوتیک مشاهده شد ($p < 0/05$). بالاترین غلظت C4 در ماهیان تغذیه‌شده با سویا صفر و ۲۰٪ (پروبیوتیک صفر و ۱) مشاهده شد ($p < 0/05$). در روز ۹۰، NBT در تیمارهای فاقد سویا (پروبیوتیک صفر و ۱) و سویا ۲۰٪ حاوی پروبیوتیک به‌طور معنی‌دار بالاتر از دیگر تیمارهای آزمایشی بود و کمترین NBT در دیگر تیمارها مشاهده شد ($p < 0/05$). همچنین، افزودن پروبیوتیک به جیره سویا صفر و ۲۰٪ سبب افزایش مقادیر لیزوزیم، IgM، C3 و C4 در مقایسه با دیگر تیمارها شد ($p < 0/05$).

جدول ۳ اثرات متقابل سطوح مختلف کنجاله سویا (صفر، ۲۰ و ۴۰٪) و پروبیوتیک (صفر و ۱٪) بر شاخص‌های خونی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان

شاخص	RBC	WBC	HCT	Hb	RBC	WBC	HCT	Hb
	۹۰ روز				۴۵ روز			
سویا	۰/۰۷۶	۰/۰۰۲	۰/۰۱۳	۰/۰۴۴	۰/۰۱۷	۰/۰۰۰	۰/۰۰۲	۰/۰۰۶
پروبیوتیک	۰/۱۲۵	۰/۷۰۶	۰/۰۷۹	۰/۱۲۹	۰/۰۲۲	۰/۰۰۰	۰/۰۶۰	۰/۰۵۹
سویا+پروبیوتیک	۰/۹۹۰	۰/۸۹۳	۰/۸۶۵	۰/۷۶۹	۰/۹۳۷	۰/۰۰۰	۰/۹۲۱	۰/۴۳۸

اعداد کمتر از ۰/۰۵ نشان‌دهنده اثر معنی‌دار هستند. در غیر این صورت، اثر انفرادی یا متقابل معنی‌دار نیستند ($p > 0/05$).

جدول ۲ شاخص‌های خونی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه‌شده با سطوح مختلف کنجاله سویا (صفر، ۲۰ و ۴۰٪) و پروبیوتیک (صفر و ۱) به مدت ۹۰ روز

روز ۴۵							
شاخص	روز صفر	شاهد (سویا صفر٪)	سویا صفر٪ + پروبیوتیک	سویا ۲۰٪	سویا ۲۰٪ + پروبیوتیک	سویا ۴۰٪	سویا ۴۰٪ + پروبیوتیک
گلبول قرمز ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	۱/۱۴ ± ۰/۰۵	۰/۸۳ ± ۰/۰۲ ^{ab}	۰/۸۹ ± ۰/۰۸ ^a	۰/۷۶ ± ۰/۰۲ ^{ab}	۰/۸۱ ± ۰/۰۲ ^{ab}	۰/۷۴ ± ۰/۰۳ ^b	۰/۷۹ ± ۰/۰۶ ^{ab}
گلبول سفید ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	۹/۵۲ ± ۰/۲۴	۷/۷۶ ± ۰/۲۳ ^a	۸/۰۶ ± ۰/۱۹ ^a	۴/۶۷ ± ۱/۳ ^b	۵/۰۲ ± ۰/۸۱ ^b	۵/۱۵ ± ۰/۶۳ ^b	۵/۰۲ ± ۰/۸۱ ^b
هماتوکریت (درصد)	۳۲/۶۶ ± ۱/۳۶	۳۱/۵ ± ۰/۷ ^{ab}	۳۴ ± ۱/۴ ^a	۲۸/۵ ± ۲/۱۲ ^{bc}	۳۰ ± ۰/۰ ^{bc}	۲۷/۵۰ ± ۲/۱۲ ^c	۲۹ ± ۱/۱۴ ^{bc}
هموگلوبین (g/dL)	۷/۲۹ ± ۰/۳۲	۸ ± ۰/۱۴ ^a	۸/۲۵ ± ۰/۰۷ ^a	۷/۰۰ ± ۱/۱۳ ^{ab}	۷/۵۰ ± ۰/۲۸ ^{ab}	۶/۶۲ ± ۰/۳۱ ^b	۷/۳۹ ± ۰/۱۴ ^{ab}
روز ۹۰							
شاخص	شاهد (سویا صفر درصد)	سویا صفر درصد + پروبیوتیک	سویا ۲۰٪	سویا ۲۰٪ + پروبیوتیک	سویا ۴۰٪	سویا ۴۰٪ + پروبیوتیک	سویا ۴۰٪ + پروبیوتیک
گلبول قرمز ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	۰/۸۲ ± ۰/۰۴ ^{ab}	۰/۹۲ ± ۰/۰۳ ^a	۰/۷۴ ± ۰/۰۳ ^{bc}	۰/۸۲ ± ۰/۰۴ ^{ab}	۰/۶۹ ± ۰/۰۸ ^c	۰/۷۷ ± ۰/۰۲ ^{bc}	۰/۷۷ ± ۰/۰۲ ^{bc}
گلبول سفید ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	۷/۷ ± ۰/۱۴ ^b	۸/۲۵ ± ۰/۲۱ ^a	۴/۶۵ ± ۰/۰۷ ^{cd}	۸/۰۶ ± ۰/۱۹ ^{ab}	۴/۳۲ ± ۰/۱۷ ^d	۴/۷۷ ± ۰/۰۳ ^c	۴/۷۷ ± ۰/۰۳ ^c
هماتوکریت (٪)	۳۳/۵ ± ۰/۷ ^{ab}	۳۴/۵۰ ± ۰/۷ ^a	۳۳/۵ ± ۰/۷ ^{ab}	۳۵ ± ۱/۴ ^a	۲۹/۵ ± ۰/۷ ^c	۳۱ ± ۱/۴ ^{bc}	۳۱ ± ۱/۴ ^{bc}
هموگلوبین (g/dL)	۷/۵ ± ۰/۵۶ ^{ab}	۸/۴ ± ۰/۴۲ ^a	۷/۳۹ ± ۰/۱۴ ^{ab}	۸ ± ۰/۴۲ ^a	۶/۵ ± ۰/۴۲ ^b	۶/۶۲ ± ۰/۳۱ ^b	۶/۶۲ ± ۰/۳۱ ^b

میانگین (± انحراف معیار)، حروف غیرمشابه در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است ($P < 0/05$).

جدول ۴ شاخص‌های ایمنی ماهیان قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با سطوح مختلف کتاله سویا (صفر، ۲۰ و ۴۰٪) و پروبیوتیک (صفر و ۱) به مدت ۹۰ روز

شاخص	شاهد (سویا صفر درصد)	سویا صفر درصد + پروبیوتیک	سویا ۲۰٪	سویا ۲۰٪ + پروبیوتیک	سویا ۴۰٪	سویا ۴۰٪ + پروبیوتیک
روز صفر						
(mg/dL) NBT	۱/۱۹ ± ۰/۰۷	۱/۷۲ ± ۰/۰۵ ^b	۱/۸۶ ± ۰/۰۴ ^a	۱/۵۶ ± ۰/۰۲ ^c	۱/۸۱ ± ۰/۰۵ ^{ab}	۱/۴۱ ± ۰/۰۱ ^d
لیزوزیم (U/ml/min)	۲۸/۶۵ ± ۱/۲	۳۰/۹ ± ۲/۸۲ ^a	۳۳/۶ ± ۱/۸۲ ^a	۳۲/۰۵ ± ۲/۰۵ ^a	۳۴/۰۵ ± ۰/۶۳ ^a	۳۳/۳ ± ۰/۵۶ ^a
(mg/dL) IgM	۴۷/۵۵ ± ۲/۴۷	۶۰ ± ۰/۴۲ ^{ab}	۶۱/۹۵ ± ۰/۷۷ ^a	۵۸/۶ ± ۰/۴۲ ^{bc}	۶۲/۰۵ ± ۱/۶۲ ^a	۵۶/۵ ± ۱/۵۵ ^c
C ₃ (mg/dL)	۳۵/۹۵ ± ۰/۷۷	۴۲/۲۵ ± ۰/۶۳ ^{ab}	۴۴/۱۵ ± ۱/۴۸ ^a	۴۰/۰۵ ± ۱/۶۲ ^{bc}	۴۳/۸۵ ± ۰/۴۹ ^a	۳۹/۸ ± ۰/۷ ^{bc}
C ₄ (mg/dL)	۸/۸۰ ± ۰/۴۲	۱۰/۶۵ ± ۰/۲۱ ^{ab}	۱۱/۲ ± ۰/۱۴ ^a	۱۰/۱ ± ۰/۴۲ ^{ab}	۱۱ ± ۰/۹۸ ^a	۹/۸ ± ۰/۱۴ ^b
روز ۹۰						
(mg/dL) NBT	۱/۴۲ ± ۰/۰۱ ^a	۱/۴۶ ± ۰/۰۱ ^a	۱/۰ ± ۳۰/۰۱ ^b	۱/۴۲ ± ۰/۰۳ ^a	۱/۳۲ ± ۰/۰۱ ^b	۱/۳۷ ± ۰/۰۶ ^b
لیزوزیم (U/ml/min)	۳۵/۱۵ ± ۰/۶۳ ^b	۳۸/۵۵ ± ۱/۴۸ ^a	۳۳/۱۵ ± ۰/۳۵ ^{bc}	۳۷/۴ ± ۰/۹۸ ^a	۳۱/۱ ± ۰/۵۶ ^c	۳۲/۹۵ ± ۰/۳۵ ^c
(mg/dL) IgM	۵۸/۶ ± ۱/۵۵ ^{bc}	۶۸/۰۵ ± ۱/۲ ^a	۵۶ ± ۰/۵۶ ^c	۶۲/۷۵ ± ۵/۸۶ ^{ab}	۵۲/۹۵ ± ۰/۳۵ ^c	۵۴/۴۵ ± ۰/۲۱ ^c
C ₃ (mg/dL)	۴۶/۸۵ ± ۳/۴۶ ^{bc}	۵۱/۹۵ ± ۱/۲۵ ^a	۴۶/۳۵ ± ۰/۶۳ ^{bc}	۴۹/۵۵ ± ۱/۶۳ ^{ab}	۴۳/۵۰ ± ۰/۴۲ ^c	۴۵/۰۵ ± ۰/۷۷ ^{bc}
C ₄ (mg/dL)	۱۲/۳ ± ۰/۸۴ ^b	۱۴/۲۰ ± ۰/۹۸ ^a	۱۱/۶۲ ± ۰/۲۱ ^{bc}	۱۳/۲۵ ± ۰/۶۳ ^{ab}	۱۰ ± ۰/۵۶ ^c	۱۱/۵۵ ± ۰/۴۹ ^{bc}

میانگین (± انحراف معیار)، حروف غیرمشابه در هر سطر نشان دهنده تفاوت معنی دار است (p < ۰/۰۵).

جدول ۵ اثرات متقابل سطوح مختلف کنجاله سویا (صفر، ۲۰ و ۴۰٪) و پروبیوتیک (صفر و ۱) بر شاخص‌های ایمنی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان

شاخص	NBT	Lzm	IgM	C ₃	C ₄	NBT	Lzm	IgM	C ₃	C ₄
	۹۰ روز					۴۵ روز				
سویا	۰/۰۰۰	۰/۸۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳	۰/۰۲۷	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۵	۰/۰۱۶	۰/۰۰۵
پروبیوتیک	۰/۰۰۱	۰/۰۷۷	۰/۰۲۲	۰/۰۰۶	۰/۰۹۳	۰/۰۰۴	۰/۰۰۱	۰/۰۰۷	۰/۰۱۹	۰/۰۰۵
سویا+پروبیوتیک	۰/۲۲۸	۰/۹۰۹	۰/۲۹۶	۰/۲۸۸	۰/۵۵۳	۰/۰۰۴	۰/۱۹۹	۰/۱۶۰	۰/۴۲۲	۰/۹۲۵

اعداد کمتر از ۰/۰۵ نشان‌دهنده اثر معنی‌دار هستند. در غیر این صورت اثر انفرادی یا متقابل معنی‌دار نیستند (p>۰/۰۵).

بحث

مدت ۵۶ روز به‌کار بردند و نشان دادند بالاترین مقدار هماتوکریت و فعالیت باکتری‌کشی در جیره حاوی ۳۰٪ آرد سویا همراه با پروبیوتیک مشاهده می‌شود؛ غلظت هموگلوبین در ماهیان تغذیه‌شده با سویا ۴۵٪ کاهش یافت، درحالی‌که افزودن ۱٪ پروبیوتیک مقدار هموگلوبین را جبران کرد. تحقیق مشابهی در قزل‌آلای رنگین‌کمان با مکمل حاوی باکتری غیرفعال‌شده *Enterococcus faecalis* رخ داد که سبب افزایش هماتوکریت شد (Rodriguez-Estrada et al. 2013). دلیل این امر کارایی پروبیوتیک در حفظ آهن ذکر شد و مطالعه حاضر با این یافته‌ها همخوانی داشت.

طبق مطالعه حاضر به نظر می‌رسد افزایش سطح سویا در جیره قزل‌آلای رنگین‌کمان منجر به کاهش شاخص‌های ایمنی (IgM، NBT) و کمپلمان) شد، اگرچه لیزوزیم در روز ۴۵ تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت. در روز ۴۵، افزودن پروبیوتیک در سطح ۲۰٪ سویا توانست شاخص‌های ایمنی را بهبود بخشد؛ درحالی‌که در دیگر سطوح سویا افزایش جزئی مشاهده شد. در روز ۹۰ بهبود با پروبیوتیک در سطوح صفر و ۲۰٪ سویا مشهود بود، ولی به نظر می‌رسد پروبیوتیک نتوانست در سطح ۴۰٪ به خوبی عمل کند. تأثیر درازمدت سویا در سرکوب ایمنی و پروبیوتیک در ارتقای شاخص‌های ایمنی در مطالعه حاضر نشان‌دهنده اهمیت زمان تغذیه از این باکتری‌هاست. استفاده از پروتئین سویا به دلیل داشتن مواد ضد مغذی، سبب سرکوب دستگاه ایمنی در ماهی می‌شود (Burrells et al. 1999; Lin and Luo, 2011). پروبیوتیک می‌تواند با افزایش بیان ژن‌های ایجادکننده پاسخ ایمنی (Smoragiewicz et al. 1993) و تولید برخی مواد مانند ویتامین‌ها، اسیدهای آلی و باکتریوسین‌ها (Anastasiadou et al. 2008; Ferguson et al.)

ترکیبات خونی در شرایط فیزیولوژیک و آسیب‌شناختی مختلف تغییر می‌یابد. به همین دلیل، مطالعات خونی می‌تواند در تشخیص بیماری‌ها در آبزیان کمک کند (Khageh and Peyghan, 1386). در روز ۴۵ تعداد گلبول قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین در ماهیان تغذیه‌شده با سویا ۴۰٪ فاقد پروبیوتیک کمتر از دیگر تیمارها بود. جایگزینی سطوح سویا منجر به کاهش تعداد گلبول‌های سفید نیز شد. در روز ۹۰، تعداد گلبول‌های سفید با افزودن پروبیوتیک به سطوح سویا به‌طور معنی‌دار افزایش یافت. از طرفی، بیشترین مقدار هماتوکریت و هموگلوبین با افزودن پروبیوتیک به سویا صفر و ۲۰٪ مشاهده شد. هموگلوبین نقش مهمی در انتقال اکسیژن به بافت بدن ایفا می‌کند و افزایش آن ممکن است در نتیجه دسترسی و تأمین بیشتر اکسیژن برای بدن باشد (Adorian et al. 2018). افزایش گلبول‌های سفید با افزودن پروبیوتیک به سویا در روز ۹۰ با توجه به نقش آنها در دستگاه ایمنی و مقاومت در برابر عفونت‌ها ممکن است نشان‌دهنده بهبود دستگاه دفاعی ماهی باشد. اگرچه، تغذیه با پروبیوتیک در طی ۴۵ روز سبب افزایش گلبول سفید نشد، ولی در روز ۹۰ این مقدار جبران شد. بنابراین، باید زمان استفاده از پروبیوتیک را در نظر داشت. به‌طور مشابه، ارتقای شاخص‌های خونی تحت تأثیر مصرف پروبیوتیک در مطالعات متعددی بر روی باس دریایی آسیایی (*Lates calcarifer*)، قزل‌آلای رنگین‌کمان و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) گزارش شده است (Mocanu et al. 2010; Adorian et al. 2019; Ahmadifar et al. 2018; Dawood et al. 2018). و همکاران (۲۰۱۴) باکتری لاکتوباسیلوس پلانتروم کشته شده با گرما را در جیره حاوی سطوح صفر، ۱۵، ۳۰ و ۴۵٪ آرد سویا در *Seriola dumerili* Amberjack به

فعالیت لیزوزیم و C₃ در باس دریایی ژاپنی در مقایسه با جایگزینی با ۸۰٪ سویا فاقد پروبیوتیک شد (Rahimnejad et al. 2018). Li و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که هنگام تغذیه ماهی توربوت با ۴۵٪ پودر ماهی، سویا و یا سویای تخمیر شده با باکتری *Enterococcus faecium* به مدت ۷۹ روز، پس از شاهد بالاترین C₃ و لیزوزیم در سویای تخمیر شده با پروبیوتیک به دست آمد. تخمیر سویا توسط باکتری‌های پروبیوتیکی با تجزیه پروتئین سویا به پپتیدهای زیستی فعال می‌تواند به عنوان محرک دستگاه ایمنی عمل کند (Zhuo et al. 2014). Lin و Mui (۲۰۱۷) گزارش کردند که تخمیر آرد سویا با باکتری لاکتوباسیلوس و جایگزینی با ۲۵٪ آرد ماهی پس از ۱۲ هفته از سرکوب دستگاه ایمنی ایجاد شده به وسیله آرد سویا در میگوی سفید (*Litopenaeus vannamei*) جلوگیری کرد. مطالعه حاضر با مطالعات مذکور همخوانی داشت با این تفاوت که درصد بالاتر از ۲۰٪ سویا در جیره قزل‌آلای رنگین‌کمان سبب سرکوب ایمنی شد که می‌تواند به دلیل تفاوت گونه‌ای و یا حذف کامل آرد ماهی باشد. به طور کلی، با توجه به تحقیق حاضر می‌توان بیان کرد *Lactobacillus plantarum* با تحریک ایمنی به جبران تأثیرات منفی جایگزینی سویا بر شاخص‌های خونی و ایمنی کمک کرده و جایگزینی مقادیر بالای سویا بدون استفاده از پروبیوتیک توصیه نمی‌شود.

منابع

- Adhami, B., Amirkolaei, A.K., Oraj, H., Kazemifard, M., Mahjoub, S. 2021. Effects of lysophospholipid on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth, biochemical indices, nutrient digestibility and liver histomorphometry when fed fat powder diet. *Aquaculture Nutrition* 27: 1779-1788.
- Adorian, T.J., Jamali, H., Farsani, H.G., Darvishi, P., Hasanpour, S., Bagheri, T., Roozbehfar, R. 2019. Effects of probiotic bacteria *Bacillus* on growth performance, digestive enzyme activity, and hematological parameters of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 11: 248-255.
- Ahmadifar, E., Sadegh, T.H., Dawood, M.A.O., Dadar, M., Sheikhzadeh, N. 2019. The effects of dietary *Pediococcus pentosaceus* on growth performance, hemato-immunological parameters and digestive enzyme activities of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 516: 734656.
- Anastasiadou, S., Papagianni, M., Filiouis, F., Ambrosiadis, I., Koidis, P. 2008. Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide

(2010) دستگاه ایمنی را تحریک کند. علاوه بر این، مطالعات نشان‌دهنده افزایش قابلیت استفاده از کنجاله سویا پس از تخمیر است و فرآیند تخمیر توسط پروبیوتیک‌ها می‌تواند به کم‌شدن تأثیر ضدمغذی‌ها و افزایش دسترسی زیستی مواد مغذی کمک کند (Egounlety and Aworh, 2003; Hotz and Gibson, 2007; Wang et al. 2016).

Dawood و همکاران (۲۰۱۴) همچنین نشان دادند که فعالیت لیزوزیم در ماهیان Amberjack تغذیه‌شده با ۱۵ و ۳۰٪ آرد سویا همراه با باکتری بالاترین مقدار بود، در حالی که فعالیت باکتری‌کشی در جیره ۳۰٪ آرد سویا حاوی باکتری مشاهده شد. مشابه این مطالعه در تحقیق کنونی مقادیر NBT، لیزوزیم، IgM، C₃ و C₄ در سطح ۲۰٪ کنجاله سویا حاوی پروبیوتیک با گروه شاهد (سویا صفر بدون پروبیوتیک) به‌خصوص در روز ۹۰ تفاوت معنی‌داری نداشت، اگرچه از ماهیان تغذیه‌شده با سویا صفر حاوی پروبیوتیک کمتر بود. Wang و همکاران (۲۰۱۶) *Lactobacillus plantarum* را بر روی توربوت (*Scophthalmus maximus*) آزمایش کردند و گزارش کردند پس از ۶۶ روز فعالیت لیزوزیم در ۳۰ و ۴۵٪ آرد سویای تخمیرشده توسط باکتری به جیره شاهد (سویا صفر) رسید و به طور کل با افزودن پروبیوتیک به سطوح ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰٪ آرد سویا فعالیت آنزیم لیزوزیم بالاتر از درصدهای مشابه سویا بدون پروبیوتیک بود. همچنین، استفاده از جیره‌های جایگزین‌شده با ۴۰ و ۸۰٪ آرد سویا تخمیر شده با پروبیوتیک‌های *Bacillus pumillus* و *Pseudozyma aphidis* به مدت ۸ هفته سبب افزایش

- from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: production conditions, purification and characterization. *Bioresource Technology* 99: 5384-5390.
- Anderson, D.P., Siwicki, A.K. 1995. Basic hematology and serology for fish health programs. In: Shariff, M., Arthur, J.R., Subasinghe, R.P. (Eds). *Diseases in Asian aquaculture II. Philippines*, Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, 185-202.
- Bakke-McKellep, A.M., Press, C.M., Baeverfjord, G., Krogdahl, A., Landsverk, T. 2000. Changes in immune and enzyme histochemical phenotypes of cells in the intestinal mucosa of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., with soybean meal-induced enteritis. *Journal of Fish Diseases* 23: 27-115.
- Burrells, C., Williams, P., Southgate, P., Crampton, V. 1999. Immunological, physiological and pathological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increasing dietary concentrations of soybean proteins. *Veterinary Immunology Immunopathology* 72: 277-288.
- Dawood, A.O.M., Shunsuke, K., Ishikawa, M., Yokoyama, S. 2015. Effects of partial substitution of fish meal by soybean meal with or without heat-killed *Lactobacillus plantarum* (LP20) on growth performance, digestibility, and immune response of Amberjack, *Seriola dumerili* juveniles. *BioMed Research International* 11: 1-11.
- Drabkin, D.R. 1945. Crystallographic and optical properties of human hemoglobin: proposal for standardization of hemoglobin. *American Journal of Medicine Science* 209: 268-270.
- Egounlety, M., Aworh, O.C. 2003. Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and ground bean (*Macrotyloma geocarpa* Harms). *Journal of Food Engineering* 56: 249-254.
- Farsani, M.N., Hoseinifar, S.H., Rashidian, G., Farsani, H.G., Ashouri, G., Van Doan, H. 2019. Dietary effects of *Coriandrum sativum* extract on growth performance, physiological and innate immune responses and resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Yersinia ruckeri*. *Fish & Shellfish Immunology* 91: 233-240.
- Ferguson, R.M.W., Merrifield, D.L., Harper, G.M., Rawling, M.D., Mustafa, S., Picchietti, S., 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: 851-862.
- Francis, G., Makkar, H.P.S., Becker, K. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. Review Article. *Aquaculture* 199: 197-227.
- Fuller, R. 1992. *History and Development of Probiotics*. (2nd ed.) Springer, Dordrecht, 1-8.
- Ghosh, S. Sinha, A., Sahu, C. 2008. Dietary probiotic supplementation in growth and health of live-bearing ornamental fishes. *Aquaculture Nutrition* 14: 289-299.
- Halver, J.E., Hardy, R.W. 2002. *Fish Nutrition*, Academic press.
- Houston, A.H. 1990. Blood and circulation. In: Shreck, C.B., Moyle, P.B. (Eds.). *Methods for fish biology*. Bethesda, Maryland: American Fisheries Society, 273-335.
- Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., Boman, H.G. 1980. Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *European Journal of Biochemistry* 106: 7-16.
- Khageh, G.H., Peyghan, R. 1386. Evaluation of some blood serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in

- earthen ponds. *Journal of Veterinary Research* 62: 203-197.
- Kordi, H., Valipour, A.R., Haphezeh, M., Shenavar Masouleg, A.R., Kordi, S. 2018. Evaluating the effects of dietary intake of encapsulated *Lactobacillus plantarum* KC426951 on growth, survival rate, blood and serum factors and gut bacterial flora of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Scientific Fisheries Journal* 27: 27-38.
- Li, C., Zhang, B., Liu, C., Zhou, H., Wang, X., Mai, K., He, G. 2020. Effects of dietary raw or *Enterococcus faecium* fermented soybean meal on growth, antioxidant status, intestinal microbiota, morphology, and inflammatory responses in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 100: 261-271.
- Lin, S., Luo, L. 2011. Effects of different levels of soybean meal inclusion in replacement for fish meal on growth, digestive enzymes and transaminase activities in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Animal Feed Science and Technology* 168: 80-87.
- Lin, Y.H. Mui, J.J. 2017. Comparison of dietary inclusion of commercial and fermented soybean meal on oxidative status and non-specific immune responses in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, *Fish & Shellfish Immunology* 63: 208-212.
- Merrifield, D.L., Harper, G.M., Dimitroglou, A., Ringo, E., Davies, S.J. 2009. Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. *Aquaculture Research* 41: 1268-1272.
- Miles, R.D., Chapman, F.A. 2006. The Benefits of Fish Meal in Aquaculture Diets. Institute of Food and Agricultural Sciences Extension, University of Florida, 1-6.
- Mocanu, M., Cristea, V., Dediu, L., Bocioc, E., Grecu, R.I., Ion, S., Vasilean, I. 2010. The effect of probiotic diet on growth and hematology parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792). *Lucrari Stiintifice-Sera Zootheniie* 59: 258-263.
- Rahimnejad, S., Lu, K., Wang, L., Song, K., Mai, K., Davis, D.A., Zhang, C. 2018. Replacement of fish meal with *Bacillus pumillus* SE5 and *Pseudozyma aphidis* ZR1 fermented soybean meal in diets for Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). *Fish & Shellfish Immunology* 84: 987-997.
- Rodriguez-Estrada, U., Satoh, S., Haga, Y., Fushimi, H., Sweetman, J. 2013. Effects of inactivated *Enterococcus faecalis* and mannan oligosaccharide and their combination on growth, immunity, and disease protection in rainbow trout, *North American Journal of Aquaculture* 75: 416-428.
- Smoragiewicz, W., Bielecka, M., Babuchowski, A., Boutard, A. Dubeau H., 1993. Les probiotiques. *Canadian Journal of Microbiology* 39: 1089-1095.
- Soltan, M.A., Hanafy, M.A., Wafa, M.I.A. 2008. Effect of replacing fish meal by a mixture of different plant protein sources in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) diets. *Global Veterinaria* 2: 157-164.
- Storebakken, T., Refstie, S., Ruyter, B. 2000. Soy products as fat and protein sources in fish feeds for intensive aquaculture. In: Drackley, J.K. (Ed.), *Soy in Animal Nutrition*, Federation of Animal Science Societies, Champaign, 127-170.
- Tibaldia, E., Hakim, Y., Uni Z., Tulli, F., Francesco, M., Luzzana, U., Harpaz, Sh. 2006. Effects of the partial substitution of dietary fish meal by differently processed soybean meals on growth performance, nutrient digestibility and activity of intestinal brush border enzymes in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 261: 182-193.
- Uran, P.A. 2008. Etiology of soybean-induced enteritis in fish. Ph.D. Thesis. Wageningen University, The Netherlands. 174 p.

- Uribe, C. Folch, H. Enriquez, R. Moran, G. 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinary Medicine (Praha)* 56: 486-503.
- Valipour, A., Nedaei, S., Noori, A., Khanipour, A.A., Hoseinifar, S.H. 2019. Dietary *Lactobacillus plantarum* affected on some immune parameters, air-exposure stress response, intestinal microbiota, digestive enzyme activity and performance of narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*, Eschscholtz). *Aquaculture* 504: 121-130.
- Wang, L., Zhou, H., He, R., Xu, W., Mai, K., He, G. 2016. Effects of soybean meal fermentation by *Lactobacillus plantarum* P8 on growth, immune responses, and intestinal morphology in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* 464: 87-94.
- Wilson, M.R. van Ravenstein, E. Miller, N.W. Clem, L.W. Middleton, D.L. Warr, G.W. 1995. cDNA sequences and organization of IgM heavy chain genes in two holostean fish. *Developmental and Comparative Immunology* 19: 153-164.
- Yang, Y.X., Kim, Y.G., Lohakare, J.D., Yun, J.H., Lee, J.K., Kwon, M.S., Park, J.K., Choi, J.Y., Chae. B.J. 2007. Comparative efficacy of different soy protein sources on growth performance, nutrient digestibility, and intestinal morphology in weaned pigs. *Asian-Australian Journal of Animal Science* 20: 775-783.
- Zhuo, L.C., Kevin, L., Lin, L.H. 2014. Fermentation by *Lactobacillus* spp. can improve apparent digestibility and degrade the protein of soybean meal for white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Taiwan Fisheries Society* 41: 177-122.