



## اثر مکمل‌سازی جیره با اسیدهای آمینه ال-پرولین و ال-آلانین بر ایمنی، شاخص‌های خون‌شناسی و بازماندگی در مواجهه با تنش شوری در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

تقی تازیکی<sup>۱</sup>، ولی‌اله جعفری<sup>۲\*</sup>، محمد مازندرانی<sup>۲</sup>، سیدحسین حسینی‌فر<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران  
<sup>۲</sup> دانشیار، گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

### چکیده

استفاده از اسیدهای آمینه آزاد در جیره غذایی ماهیان، به‌طور معمول باعث تغییر در رفتار غذایی شده و مصرف و کارایی بیشتر غذا را در پی خواهد داشت. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات سطوح مختلف اسید آمینه ال-پرولین و ال-آلانین بر شاخص‌های خون‌شناسی و بازماندگی مواجهه با تنش شوری در ماهی کپور معمولی می‌باشد. به‌همین منظور تعداد ۴۵۰ قطعه بچه‌ماهی کپور معمولی با وزن متوسط (۱۴±۰/۲ گرم) به‌طور تصادفی در ۳۰ مخزن ۳۰۰ لیتری توزیع شدند. ماهیان به‌مدت ۶۰ روز با ۱۰ تیمار غذایی (تیمار شاهد، سه تیمار پرولین (۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد)، سه تیمار آلانین (۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد) و سه تیمار ترکیبی (۰/۲۵+۰/۲۵، ۰/۵+۰/۵، ۰/۷۵+۰/۷۵ درصد پرولین-آلانین) تغذیه شدند. جهت بررسی مقاومت بچه‌ماهیان در برابر تنش شوری، در انتهای دوره به‌مدت یک هفته در معرض شوری ppt ۱۵ قرار گرفتند. بالاترین مقدار گلبول قرمز خون در تیمار ترکیبی ۰/۷۵+۰/۷۵ پرولین-آلانین مشاهده شد که با تیمارهای پرولین و تیمار ۱ و ۰/۵ درصد آلانین تفاوت معنی‌داری را نشان داد ( $p < 0.05$ ). مقدار گلبول سفید خون در تیمارهای ترکیبی و شاهد در بالاترین مقدار بود که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت ( $p < 0.05$ ). مقدار هموگلوبین، هماتوکریت، لیزوزیم، ایمنوگلوبین، پروتئین کل و آنزیم‌های کبدی در تمام تیمارها تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ( $p > 0.05$ ). مقدار MCH در تیمار ۱ درصد پرولین در بالاترین مقدار بود که تفاوت معنی‌داری با تیمار ترکیبی ۰/۷۵+۰/۷۵ پرولین-آلانین داشت ( $p < 0.05$ ). مقدار MCV در تیمار ترکیبی ۰/۷۵+۰/۷۵ پرولین-آلانین با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت. بالاترین مقدار لنفوسیت در تیمارهای ترکیبی ۰/۵+۰/۵، ۰/۷۵+۰/۷۵ پرولین-آلانین مشاهده شد. بالاترین مقدار نوتروفیل در تیمار ۱ درصد پرولین مشاهده شد. در مقدار مونوسیت و ائوزینوفیل هم در بین تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود داشت. همچنین بالاترین درصد بازماندگی در تیمارهای ترکیبی ۰/۷۵+۰/۷۵ و ۰/۵+۰/۵ پرولین-آلانین به‌دست آمد که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت. با توجه به نتایج فوق و وجود تفاوت معنی‌دار در برخی از نتایج به‌دست آمده به‌نظر می‌رسد دو اسید آمینه ال-پرولین و ال-آلانین در سطح ترکیبی ۰/۵+۰/۵ درصد می‌تواند در بهبود شاخص‌های خون‌شناسی و بازماندگی در بچه ماهی کپور معمولی مؤثر واقع شود.

### واژه‌های کلیدی:

اسیدهای آمینه آزاد، ماهی کپور معمولی، شاخص‌های خون‌شناسی، بازماندگی

### نوع مقاله:

پژوهشی اصیل

### تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۸/۰۸/۰۸

پذیرش: ۹۸/۰۹/۱۸

### نویسنده مسئول مکاتبه:

ولی‌اله جعفری، دانشیار، گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران  
ایمیل: v.jafari.sh110@gmail.com

### ۱ | مقدمه

آبزی‌پروری به‌لحاظ بهبود سطح کیفی تغذیه جوامع انسانی، سوددهی بالا، کسب درآمدهای ارزی (صادرات) و ایجاد فرصت‌های شغلی در بسیاری از کشورها نقش حیاتی ایفا می‌کند. افزایش جمعیت جهان و تقاضا برای مصرف گوشت سالم موجب اقبال انسان به منابع پروتئینی جدید به خصوص ماهی شده است (Siro et al., 2008; Ngo et al., 2011). ماهیان به‌واسطه کیفیت بالای پروتئین، کلسترول پایین، اسید-

های چرب غیراشباع، ویتامین‌ها و مواد معدنی ضروری یکی از اجزای مهم سبد غذایی جامعه محسوب می‌گردد (Haliloglu et al., 2004). پروتئین‌های بافتی که حاوی ۲۰ اسیدهای آمینه متفاوت شامل ضروری و غیرضروری می‌باشد، دارای اهمیت تغذیه‌ای هستند. اسیدهای آمینه نقش حیاتی به‌عنوان سازنده پروتئین‌ها و نیز به‌عنوان حدواسط در سوخت‌وساز بازی می‌کنند (Suvitha et al., 2015).

پرورشی داشتند به این نتیجه رسیدند که ماهیانی که از جیره محتوای مکمل ترکیبی لیزین و متیونین تغذیه کرده بودند در شاخص‌های رشد، غلظت هموگلوبین، گلبول قرمز، مقدار گلبول سفید اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد داشتند. تنش با مختل کردن تعادل سیستم‌های داخلی باعث ایجاد اثرات مخرب در بافت، رفتار، رشد، تولید مثل، عملکرد سیستم ایمنی و مقاومت در برابر بیماری می‌شود (Tanck *et al.*, 2005, Morales *et al.*, 2000). با در نظر گرفتن این نکته که ممکن است ناملایمات زیادی تحت شرایط پرورشی کنترل شده وجود داشته باشد، لذا شرایط ایجاب می‌کند که برای ارتقاء میزان مقاومت آن‌ها و همچنین افزایش درصد بازماندگی از ترکیبات مناسبی در جیره غذایی این گونه استفاده شود تا در نهایت تولیدات آنها افزایش یابد. بنابراین هدف از این بررسی تأثیر افزودن دو اسید آمینه پرولین و آلانین در جیره غذایی کپور معمولی جوان بر عوامل بیوشیمیایی سرم خون و شاخص‌های خون‌شناسی و بازماندگی پس از مواجهه با شوری باتوجه به اینکه اسید آمینه پرولین در گیاهان در مواجهه با تنش شوری و خشکی مؤثر می‌باشد، صورت گرفت.

## ۲ | مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر در بهار سال ۱۳۹۷ در سالن آبی‌پروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. بچه‌ماهی‌های کپور معمولی با میانگین وزنی  $14 \pm 0.2$  گرم از مراکز مربوطه تهیه شدند و ابتدا به مدت یک هفته عمل سازگاری در مخازن ۳۰۰ لیتری انجام گرفت. در این تحقیق، از جیره پایه شرکت فرادانه با (پروتئین ۳۲ درصد، چربی ۸ درصد، فیبر ۶ درصد، رطوبت ۱۰ درصد، خاکستر ۱۰ درصد و فسفر ۱ درصد) استفاده شد. اسیدهای آمینه را با یک درصد ژلاتین مخلوط کرده و به روی تیمارهای جیره غذایی اسپری شدند، همچنین ژلاتین به جیره شاهد هم اضافه شد تا شرایط مشابهی با سایر جیره‌ها داشته باشد. جیره‌ها بعد از آماده سازی تا زمان مصرف در فریزر نگهداری شدند. این ماهیان به مدت ۸ هفته به میزان ۳ درصد وزن بدن و ۲ بار در روز از جیره مورد نظر دریافت کردند. تیمارها شامل؛ تیمار شاهد، سه گروه تیمار پرولین (۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد)، سه گروه تیمار آلانین (۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد)، سه گروه تیمار ترکیبی آلانین-پرولین (۰/۲۵+۰/۲۵، ۰/۵+۰/۵، ۰/۷۵+۰/۷۵ درصد) باتوجه به مطالعات بهری (Bahri, 2017) و جعفری و همکاران (Jafari *et al.*, 2018) آماده و هر کدام با سه تکرار در نظر گرفته شد. پس از سازگاری بچه‌ماهی‌ها به منظور انجام بررسی حاضر تعداد ۳۰ تانک فایبرگلاس با حجم مناسب آبیگری و تعداد ۱۵ ماهی به هر کدام از این تانک‌ها (تکرارها) معرفی شد. هوادهی آب از طریق سنگ هوا متصل به کمپرسور مرکزی انجام شد. برای جلوگیری از آلودگی و خارج کردن غذای باقی‌مانده و فضولات، روزانه یک‌بار (صبح) آب تانک‌ها سیفون شد. لازم به ذکر است آب مورد استفاده برای انجام این تحقیق آب شهری بود که جهت کلرزدایی به مدت ۲۴ ساعت درون تانک‌های ذخیره هوادهی می‌شدند. همچنین به صورت هفتگی میزان درجه حرارت، اکسیژن و pH آب مورد اندازه‌گیری

باتوجه به محدودیت سطوح مستعد پرورش و هزینه‌های بالای تهیه خوراک، بی‌تردید جهت بهبود عملکرد ماهیان پرورشی، استفاده از محرک‌های رشد در جیره بسیار راه‌گشا می‌باشد (Canibe *et al.*, 2003). افزودن مواد جاذب در جیره غذایی با تحریک گیرنده‌های چشایی و بویایی باعث افزایش مصرف جیره غذایی توسط ماهی شده و از هدر رفتن غذا و آلودگی محیطی جلوگیری می‌کند و در عین حال رشد آن‌ها افزایش می‌یابد (Takeda and Takii, 1992; Kasumyan, 2002). اسیدهای آمینه فعالیت‌های زیستی بسیار متنوعی را در سلول‌های زنده بر عهده دارند. شواهد اخیر نشان می‌دهد که برخی از اسیدهای آمینه غیرضروری و متابولیت‌های آن‌ها در مسیرهای سوخت و ساز بدن تنظیم‌کننده‌های مهمی هستند، که برای رشد، نگهداری، مصرف غذا، استفاده از مواد مغذی، سیستم ایمنی، رفتار و تولیدمثل و همچنین مقاومت به تنش‌های محیطی و ارگانسیم-های بیماری‌زا در ماهی‌های مختلف لازم است (Wu *et al.*, 2011).

کپور معمولی از ماهیان استخوانی و متعلق به خانواده‌ی کپور-ماهیان (Cyprinidae) است، در حوضه‌های آبریز دریای مازندران، تجن و تمام حوضه‌های آبریز ایران پراکنش دارد (Sattari *et al.*, 2003) و از مهم‌ترین گونه‌های پرورش دنیا محسوب می‌شوند که به علت صرفه اقتصادی و طعم مناسب در اغلب کشورها از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. ترکیباتی که در آزمایشات رفتارشناسی در ارتباط با سیستم چشایی کپور معمولی معرفی شده‌اند شامل: اسیدهای آمینه پرولین، آلانین، سیستین، اسید گلوتامیک، اسید آسپارتیک و گلوتامین هستند و در میان چهار مزه اصلی، مزه‌های ترش و تلخ بیشترین جذابیت را برای این گونه داشته‌اند (Kasumyan and Morsi, 1996).

شاخص‌های خونی ماهی ارتباط نزدیکی با واکنش‌های ماهی در برابر عوامل محیطی و بیولوژیکی دارد (Deng *et al.*, 2006). در واکنش به شرایط اکولوژیکی و فیزیولوژیکی تغییرات عمده‌ای در ترکیب خون ماهی صورت می‌گیرد، مانند نوسان‌هایی که در مقادیر گلبول‌های قرمز خون، گلبول‌های سفید، هورمون‌ها، هموگلوبین، هماتوکریت و دیگر اجزای خون ایجاد می‌شود، در نتیجه آنالیز شاخص‌های خونی در ارزیابی وضعیت فیزیولوژیکی ماهی بسیار مؤثر است (Alyakrinskyaya and Dolgova, 1984). براساس نتایج به‌دست‌آمده از تحقیقات بهری (Bahri, 2017) و جعفری و همکاران (Jafari *et al.*, 2018)، به ترتیب اثرات مثبت افزودن اسید آمینه آرژنین و گلیسین بر شاخص‌های خونی و ایمنی، شاخص‌های رشد و بازماندگی ماهی کپور معمولی در مواجهه با شوری به اثبات رسیده است.

قلیچی و همکاران (Ghelichi *et al.*, 2011) با مطالعه بر روی تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) مشخص کردند که اسید آمینه آل-آلانین می‌تواند کارآیی رشد و برخی شاخص‌های خونی را در این گونه تحت تأثیر قرار دهد. راحتی (Rahati, 2011) در خصوص تأثیر اسید آمینه آلانین بر تاس‌ماهی ایرانی جوان گزارش کرد که با افزایش شاخص هماتوکریت در سطح ۲ درصد آلانین در جیره، سلامت و سیستم ایمنی تاس‌ماهی ایرانی افزایش یافته است. همچنین محسنی و همکاران (Mohseni *et al.*, 2014) با تحقیقی که بر فیل‌ماهی جوان

استفاده شد و با روش الیزاساندویچی سنجش و اندازه‌گیری گردید (Moss and Henderson, 1999).

بررسی اثرات شوری در هفته انتهایی پرورش در بازماندگی بچه- ماهی کپور: جهت بررسی مقاومت بچه‌ماهی در برابر تنش شوری، در انتهای دوره، ماهیان در تیمارها به مدت یک هفته در معرض شوری ۱۵ppt قرار گرفتند.

**تجزیه و تحلیل داده‌ها:** طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. در ابتدا نرمال بودن داده با استفاده از آزمون کولمو-گراف-اسمیرنوف بررسی و تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون Tukey و با استفاده از نرم‌افزار SPSS-21 در سطح ۰/۰۵ انجام گرفت. از نرم‌افزار Excel-2013 برای رسم نمودارها استفاده شد.

### ۳ | نتایج

بر اساس نتایج به دست آمده در جدول (۱) بالاترین مقدار گلبول قرمز خون در تیمار ترکیبی (۰/۷۵+۰/۷۵) پرولین-آلانین مشاهده شد که با سایر تیمارهای ترکیبی و تیمار ۱/۵ درصد آلانین تفاوت معنی‌داری نشان نداد ( $p < 0.05$ ). اما با سایر تیمارها به خصوص تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان داد. مقدار گلبول سفید خون در تیمارهای ترکیبی و شاهد در بالاترین مقدار بود که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود داشت ( $p > 0.05$ ). مقدار هموگلوبین، هماتوکریت خون در بین تمام تیمارها و تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ( $p < 0.05$ ).

قرار گرفت که به ترتیب مقادیر  $24 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد،  $0.67 \pm 0.12$  میلی‌گرم در لیتر و  $0.5 \pm 0.5$  به دست آمد.

**نحوه نمونه‌برداری برای مطالعات خون‌شناسی:** در پایان دوره آزمایش به منظور بررسی فراسنجه‌های خونی از هر تیمار ۶ عدد بچه‌ماهی به صورت تصادفی انتخاب گردید و پس از بیهوشی با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک، با استفاده از سرنگ ۲ سی‌سی آغشته به هپارین از ساقه‌دمی خون‌گیری و نمونه‌های خون به تیوپ-های ۱/۵ سی‌سی انتقال یافت.

**مطالعات خون‌شناسی:** آزمایش (CBC (complete blood count خون شامل گلبول قرمز خون، گلبول سفید خون، هماتوکریت، هموگلوبین و همچنین متوسط حجم گلبول قرمز (MCV-Mean Corpuscular Volume)، متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCH-Mean corpuscular hemoglobin) و متوسط غلظت هموگلوبین سلولی (MCHC-Mean corpuscular hemoglobin concentration) طبق روش محاسبه استاندارد اندازه‌گیری گردید (Klontz, 1994).

**شاخص‌های بیوشیمیایی خون:** این شاخص‌ها شامل؛ برای اندازه-گیری لیزوزیم از روش توصیه‌شده (Ellis, 1990) و جهت سنجش میزان ایمونوگلوبولین M از روش پیشنهادی (Yamamoto and Yonemasa, 1990) و پروتئین کل به وسیله کیت‌های تجاری (پارس آزمون) و با کمک دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد (Siwicki and Anderson, 1994).

**آنزیم‌های کبدی:** برای تعیین آنزیم‌های کبدی (ALP, ALT, AST) از کیت‌های مخصوص این آنزیم‌ها (شرکت پارس آزمون)

جدول ۱- نتایج شاخص‌های خونی ماهی کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف اسید آمینه ال-پرولین و ال-آلانین

تیمارها	گلبول قرمز ( $\times 10^6$ میلی متر مکعب)	گلبول سفید ( $\times 10^3$ میلی متر مکعب)	هموگلوبین (گرم بر دسی لیتر)	هماتوکریت (درصد)
شاهد	$1.72 \pm 0.39^{bcd}$	$11.44 \pm 0.73^{abc}$	$9.52 \pm 0.59^a$	$33.33 \pm 3.05^a$
۰.۵ درصد پرولین	$1.8 \pm 0.39^{abcd}$	$10.29 \pm 0.79^c$	$9.78 \pm 1.95^a$	$35 \pm 4^a$
۱ درصد پرولین	$1.4 \pm 0.3^d$	$10.56 \pm 0.9^bc$	$10.07 \pm 1.34^a$	$33 \pm 2^a$
۱.۵ درصد پرولین	$1.57 \pm 0.64^{bcd}$	$9.96 \pm 0.8^c$	$9.42 \pm 0.76^a$	$34.33 \pm 2.08^a$
۰.۵ درصد آلانین	$1.54 \pm 0.4^{cd}$	$10.80 \pm 1.41^{abc}$	$10.21 \pm 1.09^a$	$36.66 \pm 3.08^a$
۱ درصد آلانین	$2.08 \pm 0.39^{abcd}$	$10.68 \pm 0.6^bc$	$9.33 \pm 1.91^a$	$34.66 \pm 2.51^a$
۱.۵ درصد آلانین	$2.28 \pm 0.33^{abc}$	$10.24 \pm 0.51^c$	$9.75 \pm 1.83^a$	$35.33 \pm 2.51^a$
۰.۲۵+۰.۲۵ ترکیبی	$2.05 \pm 0.29^{abcd}$	$11.42 \pm 0.23^{abc}$	$9.38 \pm 1.95^a$	$35.33 \pm 2.51^a$
۰.۵+۰.۵ ترکیبی	$2.47 \pm 0.34^{ab}$	$12.18 \pm 0.9^a$	$10.66 \pm 2.03^a$	$34.66 \pm 3.51^a$
۰.۷۵+۰.۷۵ ترکیبی	$2.56 \pm 0.31^a$	$11.93 \pm 1.05^a$	$9.91 \pm 1.29^a$	$33.33 \pm 3.05^a$

\* حروف لاتین متفاوت در هر ستون نشانه معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

MCHC در بین تمام تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان نداد. بالاترین مقدار لنفوسیت در تیمار ترکیبی (۰/۷۵+۰/۷۵، ۰/۵+۰/۵) پرولین-آلانین مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها به ویژه تیمار شاهد داشت. بالاترین مقدار نوتروفیل در تیمار ۱ درصد پرولین و کمترین مقدار در تیمارهای ترکیبی (بدون تفاوت معنی‌دار) مشاهده شد

مطابق با جدول (۲) مقدار MCH در تیمار ۱ درصد پرولین در بالاترین مقدار بود که تفاوت معنی‌داری با تیمار ترکیبی (۰/۷۵+۰/۷۵) پرولین-آلانین داشت اما با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان نداد. مقدار MCV در تیمار ترکیبی (۰/۷۵+۰/۷۵) پرولین-آلانین و ۰/۵ درصد پرولین با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت. همچنین مقدار

که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها داشتند. کمترین مقدار مونوسیت در تیمارهای ترکیبی (۰/۷۵+۰/۷۵، ۰/۵+۰/۵) پرولین-آل‌آنین) مشاهده شد که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشتند. همچنین بالاترین مقدار ائوزینوفیل در تیمار ترکیبی مشاهده شد که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود داشت.

مطابق با جدول (۳) تفاوت معنی‌داری در مقدار لیزوزیم، ایمنو-گلوبین و پروتئین کل مشاهده نشد. نتایج بررسی آنزیم‌های کبدی تفاوت معنی‌داری در مقدار آنزیم‌های کبدی (ALP, AST, ALT) در بین تیمارها نشان نداد.

جدول ۲- نتایج شاخص‌های خونی ماهی کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف اسید آمینه ال-پرولین و ال-آل‌آنین

تیمارها	MCV (فمتولیتتر)	MCH (پیکوگرم)	MCHC (گرم در دسی لیتر)	مونوسیت	نوتروفیل	لنفوسیت	ائوزینوفیل
شاهد	۲/۰۱±۳/۸۶ <sup>c</sup>	۵۷/۷۶±۹/۸۲ <sup>ab</sup>	۲۸/۶۸±۱/۰۲ <sup>a</sup>	۵/۰۱±۰/۰۰ <sup>b</sup>	۲۴/۰۲±۰/۰۱ <sup>d</sup>	۷۰/۱۰±۰/۰۰ <sup>c</sup>	۰/۴۴±۰/۰۰ <sup>d</sup>
۰,۵ درصد پرولین	۱/۳۲±۳/۰۶ <sup>b</sup>	۵۲/۸۵±۹/۶۹ <sup>ab</sup>	۲۷/۹۴±۲/۴۱ <sup>a</sup>	۵±۰/۰۰ <sup>b</sup>	۲۴±۰/۰۰ <sup>d</sup>	۷۰/۰۳±۰/۰۳ <sup>c</sup>	۰/۴۲±۰/۰۱ <sup>d</sup>
۱ درصد پرولین	۲/۴۲±۲/۹۳ <sup>ab</sup>	۷۴/۷۸±۱۲/۳۵ <sup>a</sup>	۳۰/۷۶±۳/۴۲ <sup>a</sup>	۵/۰۱±۰/۰۱ <sup>b</sup>	۲۵/۱۶±۰/۰۴ <sup>a</sup>	۶۹/۲۴±۰/۰۲ <sup>d</sup>	۰/۴۵±۰/۰۰ <sup>d</sup>
۱,۵ درصد پرولین	۲/۴۲±۵/۲۷ <sup>ab</sup>	۶۶/۹۹±۱۳/۵۷ <sup>ab</sup>	۲۸/۱۶±۲/۰۱ <sup>a</sup>	۵/۰۲±۰/۰۰ <sup>b</sup>	۲۵±۰/۰۰ <sup>b</sup>	۶۹/۰۷±۰/۰۳ <sup>d</sup>	۰/۴۵±۰/۰۰ <sup>d</sup>
۰,۵ درصد آل‌آنین	۲/۵۱±۴/۷۰ <sup>ab</sup>	۷۰/۶۸±۱۴/۷۲ <sup>ab</sup>	۲۷/۸۱±۱/۰,۸ <sup>a</sup>	۵±۰/۰۰ <sup>b</sup>	۲۴/۰۳±۰/۰۱ <sup>d</sup>	۷۰/۰۴±۰/۰۲ <sup>c</sup>	۰/۴۷±۰/۰۰ <sup>d</sup>
۱ درصد آل‌آنین	۱/۷۵±۳/۰۲ <sup>ab</sup>	۴۶/۳۵±۶/۶۳ <sup>ab</sup>	۲۶/۸۳±۲/۴۴ <sup>a</sup>	۵/۰۳±۰/۰۱ <sup>ab</sup>	۲۴/۰۲±۰/۰۲ <sup>d</sup>	۷۰/۰۴±۰/۰۲ <sup>c</sup>	۰/۴۷±۰/۰۰ <sup>d</sup>
۱,۵ درصد آل‌آنین	۱/۵۷±۱/۵۹ <sup>ab</sup>	۴۳/۰۴±۴/۴۶ <sup>ab</sup>	۲۷/۵۳±۲/۳۰ <sup>a</sup>	۵/۰۵±۰/۰۱ <sup>a</sup>	۲۴/۰۴±۰/۰۱ <sup>d</sup>	۷۰/۰۳±۰/۰۳ <sup>c</sup>	۰/۴۹±۰/۰۰ <sup>bc</sup>
ترکیبی ۰,۲۵+۰,۲۵	۱/۷۴±۱/۴۹ <sup>ab</sup>	۴۶/۷۸±۸/۴۰ <sup>ab</sup>	۲۶/۸۹±۴/۲۷ <sup>a</sup>	۵±۰/۰۰ <sup>b</sup>	۲۴/۲۴±۰/۰۵ <sup>d</sup>	۷۰/۰۷±۰/۰۶ <sup>c</sup>	۰/۴۸±۰/۰۰ <sup>bc</sup>
ترکیبی ۰,۵+۰,۵	۱/۴۳±۲/۰۳ <sup>ab</sup>	۴۳/۷۷±۵/۸۱ <sup>ab</sup>	۳۱/۱۹±۴/۸۱ <sup>a</sup>	۴/۰۱±۰/۰۰ <sup>c</sup>	۲۴/۲۷±۰/۰۹ <sup>d</sup>	۷۱/۱۵±۰/۰۸ <sup>a</sup>	۰/۵۰±۰/۰۰ <sup>ab</sup>
ترکیبی ۰,۷۵+۰,۷۵	۱/۳۱±۱/۲۵ <sup>b</sup>	۳۸/۷۷±۲/۱۷ <sup>b</sup>	۳۰/۰۹±۳/۸۰ <sup>a</sup>	۴/۰۵±۰/۰۰ <sup>c</sup>	۲۴/۱۹±۰/۰۳ <sup>c</sup>	۷۱/۱۳±۰/۰۱ <sup>a</sup>	۰/۵۱±۰/۰۰ <sup>a</sup>

\* حروف لاتین متفاوت در هر ستون نشانه معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

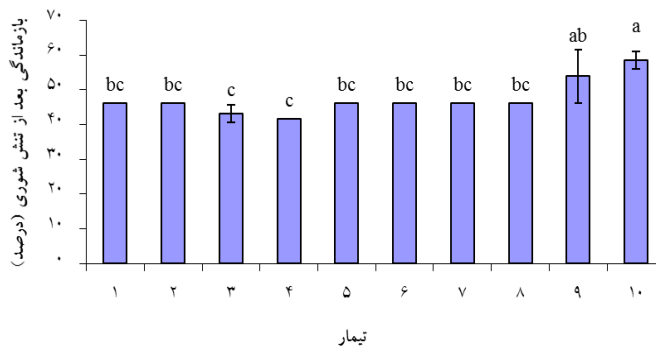
جدول ۳- نتایج شاخص‌های ایمنی و آنزیم‌های کبدی ماهی کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف اسید آمینه ال-پرولین و ال-آل‌آنین

تیمارها	پروتئین کل (گرم بر دسی لیتر)	لیزوزیم (واحد در میلی لیتر در دقیقه)	ایمونوگلوبین (میلی گرم بر میلی لیتر)	ALP (واحد بر میلی لیتر)	AST (واحد بر میلی لیتر)	ALT (واحد بر میلی لیتر)
شاهد	۳/۹۹±۰/۸۱ <sup>a</sup>	۳۵/۶۶±۳/۰۵ <sup>a</sup>	۳۴/۶۶±۳/۰۵ <sup>a</sup>	۵۶/۸۹±۶/۵۰ <sup>a</sup>	۶۴/۴۲±۷/۷۴ <sup>a</sup>	۴۳۷±۰/۷۸ <sup>a</sup>
۰,۵ درصد پرولین	۳/۷۶±۰/۵۶ <sup>a</sup>	۳۷/۶۶±۱/۵۳ <sup>a</sup>	۳۵±۱ <sup>a</sup>	۵۳/۹۹±۱۲/۸۵ <sup>a</sup>	۶۲/۹۳±۱۳/۶۸ <sup>a</sup>	۵/۵۶±۰/۸۱ <sup>a</sup>
۱ درصد پرولین	۳/۶۴±۱/۱۰ <sup>a</sup>	۳۸±۲ <sup>a</sup>	۳۵/۳۳±۱/۵۲ <sup>a</sup>	۵۹/۲۳±۸/۲۵ <sup>a</sup>	۶۸/۲۹±۱۲/۶۴ <sup>a</sup>	۵/۲۷±۰/۶۰ <sup>a</sup>
۱,۵ درصد پرولین	۳/۷۵±۰/۴۳ <sup>a</sup>	۳۹±۲ <sup>a</sup>	۳۵/۶۶±۲/۰۸ <sup>a</sup>	۶۴/۲۳±۱۱/۹۱ <sup>a</sup>	۶۵/۹۵±۷/۶۲ <sup>a</sup>	۵/۰۱±۲/۴۹ <sup>a</sup>
۰,۵ درصد آل‌آنین	۳/۷۶±۱/۱۰ <sup>a</sup>	۳۷/۶۶±۱/۵۳ <sup>a</sup>	۳۶/۶۶±۲/۰۸ <sup>a</sup>	۵۸/۳۸±۶/۲۸ <sup>a</sup>	۶۷/۶۳±۱۰/۹۵ <sup>a</sup>	۴/۵۹±۰/۵۷ <sup>a</sup>
۱ درصد آل‌آنین	۴/۰۴±۰/۷۹ <sup>a</sup>	۳۵/۳۳±۲/۵۱ <sup>a</sup>	۳۶±۳ <sup>a</sup>	۶۵/۰۶±۶/۹۰ <sup>a</sup>	۶۷/۴۴±۱۱/۴۸ <sup>a</sup>	۴/۸۸±۱/۰۹ <sup>a</sup>
۱,۵ درصد آل‌آنین	۴/۰۷±۰/۴۸ <sup>a</sup>	۳۷±۱ <sup>a</sup>	۳۸±۳ <sup>a</sup>	۶۳/۹۴±۱۶/۴۶ <sup>a</sup>	۵۷/۲۲±۶/۶۲ <sup>a</sup>	۴/۸۹±۱/۳۴ <sup>a</sup>
ترکیبی ۰,۲۵+۰,۲۵	۴/۱۷±۰/۹۳ <sup>a</sup>	۳۷/۶۶±۱/۵۳ <sup>a</sup>	۳۵/۶۶±۲/۰۸ <sup>a</sup>	۶۰/۲۳±۱۰/۴۵ <sup>a</sup>	۵۸/۸۱±۶/۹۸ <sup>a</sup>	۴/۷۴±۰/۴۱ <sup>a</sup>
ترکیبی ۰,۵+۰,۵	۴/۱۴±۰/۹۳ <sup>a</sup>	۳۷/۶۶±۳/۲۱ <sup>a</sup>	۳۵/۳۳±۲/۵۱ <sup>a</sup>	۵۹/۸۰±۱۱/۱۷ <sup>a</sup>	۵۹±۵/۳۶ <sup>a</sup>	۴/۶۸±۱/۵۱ <sup>a</sup>
ترکیبی ۰,۷۵+۰,۷۵	۴/۵۶±۱/۳۰ <sup>a</sup>	۳۵/۶۶±۳/۰۵ <sup>a</sup>	۳۸±۳ <sup>a</sup>	۵۵/۰۶±۵/۱۳ <sup>a</sup>	۶۰/۱۹±۴/۰۱ <sup>a</sup>	۵/۶۷±۱/۹۱ <sup>a</sup>

\* حروف لاتین متفاوت در هر ستون نشانه معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

نتایج درصد بازماندگی در مواجهه با شوری بعد از یک هفته: مطابق با شکل (۱) بالاترین درصد بازماندگی (۵۸/۶۰±۱/۴۶) در تیمار ترکیبی (۰/۷۵+۰/۷۵) پرولین-آل‌آنین) به دست آمد که با تمام تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت. همچنین درصد بازماندگی در تیمار ترکیبی

(۰/۵+۰/۵) پرولین-آل‌آنین) به مقدار (۵۳/۸۴±۴/۴۱) بود که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار داشت. مابقی تیمارها با هم تفاوت معنی‌داری نداشتند.



شکل ۱- درصد بازماندگی بچه‌ماهی کپور معمولی در مواجهه با تنش شوری بعد از یک هفته

## ۴ | بحث و نتیجه گیری

در سال‌های اخیر پرورش آبزیان در کنار رشد سریع همواره با مشکلات فراوانی از جمله تغییرات کیفیت آب، شیوع بیماری، مشکلات تغذیه‌ای و هزینه‌های بالای تهیه غذا روبه رو بوده است. بررسی شاخص‌های خونی می‌تواند نقش مهمی در تشخیص بیماری‌های عفونی، خونی و مسمومیت‌های آبزیان داشته باشد. محققان بر این باورند که عوامل خونی و سرمی در گونه‌های مختلف با هم تفاوت دارند و ارتباط فراوانی با شرایط محیط زندگی، اندازه و سن ماهی، نوع گونه، کمیت و کیفیت غذا دارند. شاخص‌های خونی ابزار مفیدی برای نظارت بر رشد و سلامت آبزی است که توسط بسیاری از عوامل داخلی و خارجی نظیر میزان متابولیک، درجه حرارت آب و تغذیه و دیگر شرایط تحت تأثیر قرار می‌گیرد.

گلبول‌های سفید خون یکی از مهمترین سلول‌هایی هستند که می‌توانند واکنش‌های ایمنی غیراختصاصی و ایمنی سلولی را در ماهیان تحریک کنند (Soltani, 2008). در ماهیان سیستم ایمنی ذاتی یا غیراختصاصی یک مکانیسم دفاعی اساسی در برابر عوامل بیماری‌زا محسوب می‌گردد. تقویت این سیستم برای ماهیان پرورشی بسیار ارزشمند است چرا که ماهیان در شرایط پرورشی به دلیل تراکم زیاد در برابر بسیاری از عوامل باکتریایی فرصت طلب آسیب‌پذیرند (Stetand, Dixon, 2001). تعداد لنفوسیت‌ها تنها در اثر تنش و طولانی شدن کمبود اکسیژن محلول در آب، در خون ماهیان کاهش نشان می‌دهند (Kazemi et al., 2010) و این موضوع نشان می‌دهد که آب محیط پرورش از کیفیت خوبی برخوردار بوده است. نتایج این مطالعه شواهدی از توانایی کپور در تشخیص طعم‌های خاص در گرفتن طعمه را نشان می‌دهد. ترکیباتی مانند اسیدهای آمینه آزاد، می‌توانند از نظر طعم برای کپور معمولی (جذاب تا بازدارنده) کاملاً متفاوت باشند. نتایج این مطالعه نشان داد افزودن دو اسید آمینه آلانین و پرولین در رژیم غذایی ماهی کپور معمولی تحت تنش شوری در نتایج شاخص‌های خونی تغییرات قابل توجهی ایجاد می‌کنند. از طرفی هم مطالعه در مورد اسید-آمینا پرولین در آبزیان به ندرت وجود دارد، بنابراین مقایسه و تجزیه و تحلیل نتایج ما کمی دشوار است.

پارامترهای خون‌شناسی، همانند وضعیت فیزیولوژیکی یک موجود زنده، ابزار ارزشمندی جهت بررسی وضعیت سلامت ماهیان به شمار می‌آیند و می‌توانند تحت تأثیر تغذیه باشند (Abdollahi and Imanpoor, 2011). بخشی از این تغییرات وابسته به ویژگی‌های گلبول قرمز است مانند تغییر در اندازه سلول و میزان ذخیره هموگلوبین و بخشی دیگر به غلظت پلاسما بستگی دارد که می‌تواند اثر خود را به صورت تغییر در تعداد گلبول‌ها در واحد حجم و همچنین تغییر میزان هماتوکریت نشان دهد (Milligan and Wood, 1982). تغییر غلظت خون، تغییر در مقدار شاخص‌های خونی را به دنبال دارد. این تغییر می‌تواند هم غلظت پلاسما و هم حجم گلبول‌ها را تحت تأثیر قرار دهد که متعاقب آن تغییراتی در مقدار هماتوکریت و هموگلوبین خواهد شد (Milligan and Wood, 1982). با استفاده از مطالعات خون‌شناسی

می‌تواند تغییرات ایجاد شده در بافت‌ها و وضعیت فیزیولوژیکی به وجود آمده در ماهی را تعیین نمود (Yazdani Sadati et al., 2013). تقریباً تمامی اکسیژنی که در خون حیوانات حمل می‌گردد به هموگلوبین موجود در گلبول قرمز خون متصل می‌باشد (Shakoori et al., 2010). افزایش غلظت هموگلوبین بر قابلیت انتقال گازهای تنفسی در خون، بازده قلب و افزایش وزن ماهی مؤثر است (Gazerani, Farahani, 2009). شاخص‌های مربوط به خون مانند گلبول قرمز و سفید یکی از بخش‌های اصلی سیستم ایمنی غیراختصاصی سلولی هستند که نوسان در تعداد آن‌ها می‌تواند به عنوان یک شاخص مناسب در ارتباط با پاسخ ماهیان به عوامل تنش مطرح باشد (Stoskopf, 1993). درصد هماتوکریت مهره‌داران در حالت استراحت بسته به گونه، بسیار متغیر (۳۵-۱۰) است (Baker et al., 2005). این مقدار در ماهیان عموماً در محدوده ۲۰ تا ۴۵ درصد قرار دارد. هماتوکریت شاخص سلامت و ایمنی در ماهیان می‌باشد. تغییر در شمارش افتراقی گلبول‌های سفید می‌تواند شاخصی برای ارزیابی ایمنی بدن در مواجهه با مواد آلاینده باشد (Adedeji et al., 2009). نقش نوتروفیل در خون، فاگوسیتوز عوامل مضر است (Razmara et al., 2014) و همچنین عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در مقدار مونوسیت و نوزینوفیل که نقش‌های مختلفی مانند بیگانه‌خواری، ترشح هیستامین و ایجاد حالت ضد حساسیت و به‌طور کلی مقاومت در برابر عوامل بیگانه را ایفا می‌کنند (Houston, 1990).

طبق جدول (۱) بالاترین مقدار گلبول قرمز خون در تیمار ترکیبی (۷۵+۰/۷۵ پرولین-آلانین) مشاهده شد که با سایر تیمارهای ترکیبی و تیمار ۱/۵ درصد آلانین تفاوت معنی‌داری نشان نداد اما با دیگر تیمارها به‌خصوص تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان داد. مقدار گلبول سفید خون در تیمارهای ترکیبی در بالاترین مقدار بود که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود داشت که مطابق با نتایج سردار و همکاران (Sardar et al., 2009) میزان گلبول قرمز و سفید در تیمارهای لیزین، متیونین، متیونین + لیزین نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشته و بیشترین میزان در تیمار ترکیبی متیونین و لیزین مشاهده شده است. همچنین با نتایج مثبت در میزان گلبول سفید و قرمز با استفاده از اسید آمینه ال-آلانین بر روی تاس‌ماهی ایرانی توسط قلیچی و همکاران (Ghelichi et al., 2011) مطابقت دارد. بهری (Bahri, 2017) گزارش کردند که اسید آمینه ال-آرژنین باعث تفاوت معنی‌دار در میزان گلبول سفید و قرمز و افزایش قدرت سیستم ایمنی در کپور ماهیان می‌گردد که با نتایج ما مطابقت دارد. روزتی و همکاران (Rozati et al., 2007) تأثیر مثبت درصد‌های مختلف اسید آمینه متیونین بر شاخص‌های خونی بچه فیل‌ماهی پرورشی را گزارش کردند که با نتایج ما مطابقت دارد. همچنین اثر مثبت اسید-آمینا گلایسین بر میزان گلبول قرمز و سفید ماهی کپور معمولی توسط جعفری و همکاران (Jafari et al., 2018) گزارش گردیده است که با نتایج ما مطابقت دارد. مقدار هموگلوبین، هماتوکریت خون در تمام تیمارها

خون ماهی سالمون و قزل‌آلای رنگین‌کمان شود. مطابق تحقیق رانر (Ronner, 1991) تأثیر آرژنین بر میزان انسولین خروجی بدن در شرایط آزمایشگاهی کوتاه مدت است ولی تزریق آرژنین به صورت داخلی تأثیرات طولانی مدتی در انسولین پلاسمای خون دارد (Carneiro *et al.*, 1993). نتایج نشان داده که مکمل دهی ال-آرژنین باعث افزایش سطوح اکسید نیتریک شده است. اکسید نیتریک، گاز تولیدشده توسط انواع سلول‌ها در بدن است و در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک مشارکت دارد که توسط واکنش ال-آرژنین با آنزیم اکسید نیتریک سنتاز تولید می‌شود و اثر گشاد کنندگی بر عروق و بنابراین افزایش جریان خون به عضلات در حال فعالیت و بافت‌ها را دارد (Bescos *et al.*, 2012).

**آنزیم‌های کبدی:** طبق جدول (۱) تفاوت معنی‌داری در مقدار آنزیم‌های کبدی (ALP, AST, ALT) در بین تیمارها مشاهده نشد. این آنزیم‌ها به‌طور معمول در تشخیص بیماری‌های انسانی به‌کار برده می‌شود. این آنزیم‌ها در حالت طبیعی در غشای سلولی، سیتوپلاسم و میتوکندری وجود دارند. در صورت آسیب دیدن غشای سلولی و یا نکرز سلول، این آنزیم‌ها به بیرون راه پیدا کرده و میزان آنها در سرم خون افزایش می‌یابد. البته این نکته ضروری است که آنزیم‌های سرمی تحت تأثیر فاکتورهای فیزیولوژیک و محیطی نیز قرار می‌گیرند. برای مثال نوع جیره غذایی، دمایی، محیط، سن ماهی و شوری در میزان آنزیم‌های سرمی و فعالیت آن‌ها موثر است. لذا همواره موارد مورد مطالعه با گروه شاهد ضرورت دارد (Costillas and Smith, 1977; Hrubec *et al.*, 1997). تغییرات آنزیم‌های سرمی ماهی در بیماری‌ها از جمله ویبریوز و آلودگی به بعضی از انگل‌ها و سموم گزارش شده است (Kurovskaya, 1986; Richards and Pichering, 1979). جینی و همکاران (Jeney *et al.*, 1992) نیز گزارش کرده‌اند افزایش فعالیت ALT و AST در ماهی شبیه بقیه مهره‌داران است و ALP شاخص خوبی برای ضایعات کبدی است. طبق نتایج به‌دست آمده از این تحقیق تفاوت معنی‌داری در مقدار این آنزیم‌ها در بین تیمارهای مختلف مشاهده نشده است که نشان‌دهنده مناسب بودن ترکیب جیره غذایی و تعادل مناسب مکمل اسیدآمین‌های پرولین و آلانین در جیره کپور ماهیان پرورشی بوده است. تحقیقات بیشتری برای توسعه راهبردهای مؤثر مکمل‌های غذایی با پرولین یا هیدروکسی پرولین ضروری است تا به سلامت، رشد و توسعه حیوانات و انسان‌ها منجر شود. استفاده از انواع اسیدهای آمینه به‌منظور ارتقای شاخص‌های رشد و بهبود پارامترهای خونی و ایمنی ماهیان نیاز به مطالعات بیشتر و بررسی در سنین مختلف گونه‌های ماهیان دارد تا بتوان نتایج ضد و نقیض محققان را تفسیر نمود و با این وجود، تفاوت موجود در نتایج تحقیقات دانشمندان مختلف را می‌توان به نوع گونه پرورشی، سن، طول دوره پرورش، اندازه، شرایط محیطی، رفتارهای تغذیه‌ای، خصوصیات فیزیولوژیک گونه، نوع مواد اولیه به کار رفته در تهیه جیره‌های غذایی، کمیت و کیفیت آن‌ها، نوع اسیدهای آمینه و میزان سطح مورد استفاده ربط داد.

تأثیر مکمل پرولین و آلانین بر بازماندگی ماهی کپور معمولی در

تفاوت معنی‌داری وجود نداشت که مطابق با نتایج بهری (Bahri, 2017) و قلیچی و همکاران (Ghelichi *et al.*, 2011) است. همچنین تفاوت معنی‌داری در مقدار لیزوزیم، ایمونوگلوبین و پروتئین کل در بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد که با نتایج (Brunt *et al.*, 2007; Newaj-Fyzul *et al.*, 2007; Bandyopadhyay and Mohapatra, 2009) هم‌خوانی دارد. شاخص‌های MCV, MCH و MCHC که تابعی از تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین هستند، با تغییر در مقدار این فاکتورها، تغییر می‌یابند. کاهش شاخص MCH نشان می‌دهد که میزان هموگلوبین درون گلبول‌ها نسبت به گروه‌های دیگر کمتر است. به عبارت دیگر می‌توان گفت که سرعت تکثیر گلبول‌های قرمز با سرعت سنتز هموگلوبین مطابقت نداشته، سلول‌ها فرصت کافی برای تولید مقدار متناسب هموگلوبین نداشتند. از طرف دیگر با افزایش تعداد گلبول‌های قرمز و کاهش هماتوکریت شاخص MCV کاهش می‌یابد که خود نشان‌دهنده کوچک‌تر بودن اندازه سلول‌ها نسبت به گروه‌های دیگر است. به عبارت دیگر می‌توان این گونه بیان داشت که با افزایش سرعت تکثیر سلول‌ها، گلبول‌ها با اندازه کوچک‌تری به داخل خون آزاد شده‌اند (Rozati *et al.*, 2014). مقدار MCH در تیمار ۱ درصد پرولین در بالاترین مقدار بود که تفاوت معنی‌داری با تیمار ترکیبی (۰/۷۵+۰/۷۵ پرولین-آلانین) داشت اما با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان نداد. مقدار MCV در تیمار ترکیبی (۰/۷۵+۰/۷۵ پرولین-آلانین) و ۰/۵ درصد پرولین با سایر تیمارها که با هم تفاوت معنی‌داری نداشتند، تفاوت معنی‌داری داشت. همچنین مقدار MCHC در بین تمام تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان نداد. راحتی (Rahati, 2011) در خصوص تأثیر آلانین بر تاس‌ماهی ایرانی جوان گزارش کرد که با افزایش شاخص هماتوکریت در سطح ۲ درصد آلانین در جیره، سلامت و سیستم ایمنی تاس‌ماهی ایرانی افزایش یافته است. همچنین محسنی و همکاران (Mohseni *et al.*, 2014) با تحقیقی که بر روی فیل‌ماهی جوان پرورشی داشتند به این نتیجه رسیدند که ماهیانی که از جیره محتوای مکمل ترکیبی لیزین و متیونین تغذیه کرده بودند در شاخص‌های رشد، غلظت هموگلوبین، گلبول قرمز، مقدار گلبول سفید اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد داشتند. بالاترین مقدار لنفوسیت در تیمار ترکیبی (۰/۵+۰/۵)، (۰/۷۵+۰/۷۵ پرولین-آلانین) مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها به‌ویژه تیمار شاهد داشت که با نتایج تنگستانی و همکاران (Tangestani *et al.*, 2011)، صلابی و همکاران (Salaby *et al.*, 2006) و اشرف و گودا (Ashraf and Goda, 2008) مطابقت دارد. بالاترین مقدار نوتروفیل در تیمار ۱ درصد پرولین و کمترین مقدار در تیمارهای ترکیبی (بدون تفاوت معنی‌دار) مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها نداشتند. کمترین مقدار مونوسیت در تیمارهای ترکیبی (۰/۷۵+۰/۷۵ پرولین-آلانین) مشاهده شد که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشتند. همچنین بالاترین مقدار ائوزینوفیل در تیمار ترکیبی مشاهده شد که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت. مطابق مطالعات پلیتسکایا و همکاران (Plisetskaya *et al.*, 1991) اسیدآمین‌ها آرژنین می‌تواند موجب افزایش انسولین پلاسمای

معمولی، ارتقاء شاخص‌های خونی و بازماندگی در برابر تنش شوری پیشنهاد کرد.

#### پست الکترونیک نویسنده

mttazike@gmail.com

تقی تازیکی:

v.jafari.sh110@gmail.com

ولی‌اله جعفری:

mazandarani57@gmail.com

محمد مازندرانی:

hossein.hoseinifar@gmail.com

سیدحسین حسینی‌فر:

#### REFERENCES

- Abdollahi M., Imanpoor M.R. 2011. Blood Serum biochemical parameters of *Caspiomyzon wagneri* (Kessler, 1870). Iranian Journal of Biology, 24 (6): 915-924.
- Adedeji O.B., Adeyemo O.K., Agbede S.A. 2009. Effects of diazinon on blood parameters in the African catfish (*Clarias gariepinus*). African Journal of Biotechnology, 8(16): 3940-3946.
- Alyakrinskyaya I.O., Dolgova S.N. 1984. Hematological features of young sturgeons. Vopr Ikhtiology, 4: 135-139.
- Asadi M., Azari-Takami G.H., Sajjadi M., Moezi M., Niroomand M. 2010. The effects of enriched Rotifers with Betaine and Concentrate diet supplemented by Betaine on the growth, survival and stress-resistance in Indian white shrimp larvae (*Fenneropenaeus indicus*). Iranian Journal of Fisheries, 3: 1-10. (In Persian).
- Ashraf M.A., Goda S. 2008. Effect of Dietary Ginseng Herb (Ginsana-G115) supplementation on growth, feed utilization, and hematological indices of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), fingerlings. Journal of the World Aquaculture Society, 39: 205-214.
- Bahri A. 2017. Effects of different dietary levels of L-Arginine on growth indices, hematological parameters and salinity stress in fingerling common carp (*Cyprinus carpio*). M.Sc. Thesis, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources Faculty of Fisheries. Gorgan, Iran.
- Baker D.W., Wood A.M., Litvak M.K., Kieffer J.D. 2005. Haematology of juvenile (*Acipenser oxyrinchus*) and (*Acipenser brevirostrum*) at rest and following forced activity. Journal of Fish Biology, 66: 208-221.
- Bescos R, Sureda A, Tur Ja, Pons A. 2012. The Effect of Nitric- Oxide-Related Supplements on Human Performance. Sports Medicine (Auckland, Nz), 42(2): 99-117.
- Brunt J., Newaj-Fyzul, A., Austin, B. 2007. The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases, 30(10): 573-579.
- Canibe N., Ricarda M.E., Jensen B.B. 2003. An overview of the effect of organic acids on gut flora and gut health. Danish Institute of Agricultural Sciences, Research Centre Foulum, Denmark. 14 p.
- Carneiro N.M., Navarro I., Gutiérrez J., Plisetskaya E.M. 1993. Hepatic extraction of circulating insulin and glucagon in brown trout (*Salmo trutta fario*) after

مواجهه با تنش شوری: با توجه به نتایج تنش شوری و مقایسه آن با نتایج داده‌های خونی مبنی بر افزایش قدرت سیستم ایمنی بدن و وضعیت سلامت کیپور ماهیان، می‌توان به این نتیجه رسید که مصرف ترکیبی دو اسیدآمینه پرولین و آلانین تا سطح (۰/۷۵+۰/۷۵) و (۰/۵+۰/۵ درصد) می‌تواند به صورت چشم‌گیری موجب افزایش بازماندگی و تحمل تنش شوری در کیپور ماهیان شود. بنابراین ترکیب دو اسیدآمینه پرولین و آلانین تا سطح (۰/۷۵+۰/۷۵) و (۰/۵+۰/۵ درصد) می‌تواند به عنوان یک مکمل قوی جهت افزایش طول عمر ماهیان و استقامت آن‌ها در برابر تنش در جیره غذایی آن‌ها استفاده شود. در مجموع نتایج بررسی حاضر نشان داد که اسیدآمینه پرولین و آلانین سبب افزایش معنی‌دار مقاومت در برابر تنش شوری در بچه‌ماهی کیپور معمولی شد، که قابل توجه است و نیازمند مطالعات بیشتر جهت مشخص شدن تأثیر پرولین و آلانین بر افزایش ایمنی و مقاومت ماهیان در مواجه شدن با تنش‌های مختلف نظیر آمونیاک، دما و ... می‌باشد. که در مطالعات انجام شده تأثیر بتائین در کاهش مرگ و میر در برابر تنش شوری و دما در میگوی سفید هندی (*Fenneropenaeus indicus*) (Asadi et al., 2010)، ماهی قزل‌آلا (*Oncorhynchus mykiss*) (Polat and Beklevik, 1999; Niroomand et al., 2011) به اثبات رسیده است. همچنین نتایج مثبت مطالعه ما در مورد بازماندگی ماهیان در مواجهه با تنش شوری با نتایج ژو و همکاران (Xie et al., 2014) بر روی بچه‌میگوی سفید هندی و جعفری و همکاران (Jafari et al., 2018) بر روی کیپور معمولی با استفاده از اسیدآمینه گلیسین مطابقت دارد.

همچنین حسینی و همکاران (Hoseini et al., 2010) با بررسی اثر تریپتوفان در کنترل تنش‌اسمزی ماهی‌کیپور گزارش دادند که تریپتوفان می‌تواند تحمل ماهیان را نسبت به تغییرات شوری افزایش دهد همچنین اثر تریپتوفان جیره بر تنظیم اسمزی بچه‌ماهیان کیپور، گزارش کردند که گروه‌های تغذیه شده با تریپتوفان، مقاومت بالاتری نسبت به بالا رفتن شوری داشتند. به طور متداول در مطالعات تغذیه‌ای، تنش شوری برای تعیین کیفیت بچه‌ماهیان استفاده می‌شود (Roohi et al., 2015). درصد بازماندگی نشان‌دهنده ایمنی در مقابل عوامل بیماری‌زا و تنش‌های محیطی می‌باشد (Salze et al., 2008).

افزودن مواد محرک به جیره باعث افزایش مطلوبیت، کارایی و پذیرش آن توسط موجود می‌شود. همچنین با توجه به بحران کمبود منابع آبی در دنیا، برای بهینه کردن مصرف آب و جلوگیری از افزایش بار آلی متابولیت‌های مزارع پرورشی که بخشی از آن از غذاهای نامطلوب مصرف نشده و یا جذب نشده منشأ می‌گیرد، نیز کاربردی است. ترکیبات محرک تغذیه‌ای با افزایش در مصرف غذا و نیز کاهش چشم‌گیر در هدر رفت مواد آلی موجود در غذا به محیط شده و در مدیریت کیفی آب نیز موثر خواهند بود. از این رو مطابق با نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان استفاده از ترکیب دو اسیدآمینه پرولین و آلانین تا سطح (۰/۵+۰/۵ درصد) جهت افزایش مطلوبیت جیره ماهی کیپور

- glucose and arginine injection. *Journal of Experimental Zoology*, 267(4): 416-422.
- Costillas E., Smith L.S. 1977. Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout. *Journal of fish Biology*, 10: 481-491.
- Deng J., Mai K., Ai Q., Zhang Z., Wang X., Xu W., Liufu Z. 2006. Effects of replacing fish meal with soy protein concentrate on feed intake and growth of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, *Aquaculture*, 258: 503-513.
- Dixon B., Stet R.J.M. 2001. The relationship between major histocompatibility receptors and in-nate immunity in teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 25: 683-700.
- Ellis A.E. 1990. Lysozyme assays. In: Stolen, J.S., Fletcher, D.P., Anderson, B.S. and Van Muiswinkel, W.B. 1990. *Techniques in Fish Immunology*. SOS Publication, USA. pp: 101-103.
- Gazerani Farahani S.H. 2009. The survey of amount of hematological factors in Acipenseridae family. *Journal of Animal Biology*, 2(1): 57-63.
- Ghelichi A., Kazemi R., Rahati. M. 2011. Effect of L-alanine amino acid on some blood indices in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fingerling. *Journal of Fisheries, Islamic Azad University, Azadshahr Branch*, 5(3): 17-27.
- Haliloglu H.I., Bayir A., Sirkecioglu A.N., Aras N.M., Atamanalp M. 2004. Comparison of fatty acid composition in some tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) living in seawater and freshwater. *Food Chemistry*, 86(1): 55-59.
- Hoseini S.M., Hosseini S.A., Soudagar M. 2010. Dietary tryptophan changes serum stress markers, enzyme activity, and ions concentration of wild common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to ambient copper. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38: 1419-1426.
- Houston A. 1990. Blood and circulation. In: Shreck C.B. and Moyle P.B. (Eds.). *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA. pp: 273-322.
- Hrubec T.C., Robertson J.L., Smith S.A. 1997. Effects of temperature on hematologic and serum biochemical profiles of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *American Journal of Veterinary Research*, 58(2): 126-130.
- Jafari V.A., Noorgholopur S., Imanpoor M.R., Hosseinifar S.H. 2018. Effects of Different Levels of Glycine Amino Acid on Growth Indices, Nutrition, Survival Rate and Salinity Stress in (*cyprinus carpio*). *Journal of Animal Environmental Research*, 11 (2): 197-203.
- Jeney Z.S., Nemcsok J., Jeney G., Olah J. 1992. Acute effect of sublethal ammonia on adernalin and noradrenalin levels in different organs. *Aquaculture*, 104(0): 139-148.
- Kasumyan A. 2002. Sturgeon food searching behavior evoked by chemical stimuli: a reliable sensory mechanism. *Journal of Applied Ichthyology*, 18: 685-690.
- Kasumyan A.O., Morsi A.M.Kh. 1996. Taste Sensitivity of the Carp (*Cyprinus carpio*) to Free Amino Acids and Classic Taste Substances. *Vopr Ikhtology*, 36: 386-399.
- Kazemi R.A., Poordehghani M., Yusefi joordehi A., Yarmohammadi M., Nasritajan M. 2010. Physiology of the Aquatic Circulatory System and Applied Fish Hematology Techniques. *Rasht: Bazargan*, 4(2): 210.
- Klontz G.W. 1994. Fish hematology. In: Stolen, J.S., Fletcher T.C., Rowley A.F., Kelikoff T.C., Kaatari S.L., Smith S.A. 1994. *Techniques in fish immunology*. Vol. 3. SOS Publications, Fair Haven, New Jersey, USA. pp: 121-132.
- Kurovskaya L.A. 1986. Physiological, biochemical features of the white Amur infested with helminthes. *Soveit Journal of Ecology*, 17(3): 168-177.
- Mohseni M., Pourkazemi M., Bai S.C. 2014. Effects of dietary inorganic copper on growth performance and immune response of juvenile beluga, *Huso huso*. *Aquaculture Nutrition*, 20: 547-556.
- Morales A.E., Cardenete G., Abellan E., Garcia-Rejon L. 2005. Stress-related physiological responses to handling in common dentex (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758). *Aquaculture Research*, 36: 33-40.
- Moss D.W. Henderson E.R. 1999. Digestive enzyme of pancreatic organ. *Tietztext book of clinical chemistry 3rd Ed.* pp: 689 -708.
- Newaj-Fyzul A., Adesiyun A.A., Mutani A., Ramsuhag A., Brunt J. Austin B. 2007. *Bacillus subtilis* AB1 controls Aeromonas infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Applied Microbiology*, 103(5): 1699-1706.
- Ngo D.H., Wijesekara I., Vo T.S., Van Ta, Q., Kim S.K. 2011. Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: An overview. *Food Research International*, 44(2): 523-529.
- Niroomand M., Sajjadi M., Yahyavi M., Asadi M. 2011. The impact of different levels of Betaine on growth factors of ration, survival, the chemical composition of the body and the resistance of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Iranian Journal of Fisheries*, 1: 135-146. (In Persian).
- Bandyopadhyay P., Mohapatra P.K.D. 2009. Effect of a probiotic bacterium *Bacillus circulans* PB7 in the formulated diets: on growth, nutritional quality and immunity of *Catla catla* (Ham.). *Fish physiology and biochemistry*, 35(3): 467-478.
- Plisetskaya E.M., Buchelli-Narvaez L.I., Hardy R.W., Dickhoff W.W. 1991. Effects of injected and dietary arginine on plasma insulin levels and growth of Pacific salmon and rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 98(1): 165-170.
- Polat A., Beklevik G. 1999. The importance of betaine and some attractive substances as fish feed additives, In: *Feed Manufacturing in the Mediterranean Region: Recent Advances in Research and Technology* Zaragoza (Brufu, J. and Tacon, A.eds), CIHEAM, IAMZ, Spain. pp:217-220.
- Rahati M. 2011. The effect of L-alanine amino acid on some blood and liver parameters of Iranian sturgeon (*Acipenser persicus*). M.Sc. Thesis, *Aquaculture Reproduction*, Islamic Azad University.
- Razmara P., Peykan Heyrati F., Dorafshan S. 2014. Effect of Silver Nanoparticles on Some Hematological Indices of Rainbow Catfish (*Pangasius hypophthalmus*). *Journal of Cell and Tissue (JCT)*, 5(3): 263-272.
- Richards R.H., Pichering A.D. 1979. Cheng in serum parameter of saprolegnia infection brown *salmo trutta*, L.

- Journal of Fish Diseases, 2(3): 197-206.
- Ronner P. 1991. 2-Deoxyglucose stimulates the release of insulin and somatostatin from the Perfused catfish Pancreas. *General and Comparative Endocrinology*, 81: 276-283.
- Rozati S.A., Haghi N., Avarjeh S. 2014. Hematological Changes By Temperature and Salinity Stresses In Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Physiology and Biotechnology*, 1(2) 96-113.
- Roohi Z., Imapoor M.R., Jafari V.A., Taghizad V. 2015. Effect of Caraway (*Carum carvi*) on Growth Factors and Some Blood Parameters in Common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Animal Environment*, 7 (1): 105-111.
- Salaby S., Das B.K., Pradhan I., Mohapatra B.C., Mishra B.K., Sarangi N. 2006. Effect of *Magnifera indica* kernel as a feed additive on immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Labeo rohita* finger lings. *Fish and Shellfish immunology*, 23: 109-118.
- Salze G., McLean E., Schwarz M.H., Craig S.R. 2008. Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia. *Aquaculture*, 274(1): 148-152.
- Sardar P., Abid M., Randhawa H.S., Prabhakar S.K. 2009. Effect of dietary lysine and methionine supplementation on growth, nutrient utilization, carcass compositions and haemato-biochemical status in Indian Major Carp, Rohu (*Labeo rohita H.*) fed soy protein-based diet. *Aquaculture Nutrition*, 15(4): 339-346.
- Sattari M., Shahsavani D., Shafie SH. 2003. Systematics Ichthyology (2). Hagh Shenaz Publication, Tehran, Iran. 502 p.
- Shakoori M., Motallebi A.A., Gholipoor Nozari S., Tavolo M. 2010. Effects of fish replacment by silkworm pupae on growth, survival and chemical composition of trout (*onchrynchus mykiss*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 19(2): 77-84.
- Siro I., Kápolna E., Kápolna B., Lugasi A. 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite*, 51(3): 456-467.
- Siwicki A.K., Anderson D.P. 1994. Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion. *The Progressive Fish-Culturist*, 56(4): 258-261.
- Soltani M. 2008. Immunology of Fish and Crustaceans. University of Tehran Publications. 264 p.
- Stoskopf M.K. 1993. Clinical pathology in fish medicine. Saunders Company. 89 p.
- Suvitha S., Eswar A., Anbarasu R., Ramamoorthy K., Sankar G. 2015. Proximate, Amino acid and Fatty acid profile of selected twoMarine fish from Parangipettai Coast. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 4: 38-42.
- Takeda M., Takii K. 1992. Gustation and Nutrition in Fishes: Application to Aquaculture, in *Fish Chemoreception*, Hara, T.J., Ed., London: Chapman and Hall, UK. pp:271-287
- Tanck M.W.T., Booms G.H.R., Eding E.H., Bonga S.E., Komen J. 2000. Cold shocks: a stressor for common carp. *Journal of Fish Biology*, 57: 881-894.
- Tangestani R., Alizadeh Doughikollae E., Ebrahimi E., Zare P. 2011. Effects Of Garlic Essential Oils Animmunostimulant On Hematological Indices of Juvenile Beluga (*Huso Huso*). *Journal of Veterinary Research*, 66(3): 209-216.
- Wu G., Bazer F.W., Burghardt R.C., Johnson G.A., Kim S.W., Knabe D.A., Li P., Li X., McKnight J.R., Satterfield M.C. 2011. Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition. *Amino Acids*, 40: 1053-1063.
- Xie S.W., Tian L.X., Jin Y., Yang H.J., Liang G.Y., Liu Y.J. 2014. Effect of glycine supplementation on growth performance, body composition and salinity stress of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* fed low fishmeal diet. *Aquaculture*, 418: 159-164.
- Yamamoto, T. and Yonemasu, K. 1999. Multiple molecular forms of serum immunoglobulin M in a patient with Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clinica Chimica Acta*, 289:173-176.
- Yazdani Sadati M.A. Hooshyar Y., Bani A., Kazemi R., Hallajian A., Pourdehghani M. 2013. Study of Haematological indices season changes in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) on captivity condition. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 2(2): 18-32.

#### نحوه استناد به این مقاله:

تازیکی ت.، جعفری و.ا.، مازندرانى م.، حسینى فر س.ح. اثر مکمل‌سازی جیره با اسیدهای آمینه ال-پرولین و ال-آلانین بر ایمنی، شاخص‌های خون‌شناسی و بازماندگی در مواجهه با تنش شوری در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی دانشگاه گنبدکاووس. ۱۳۹۹. ۸۶-۷۷ (۴): ۸.

Taziki T., Jafari V.O., Mazadarani M., Hoseinifar S.H. Effect of dietary supplementation with L-proline and L-alanine amino acids on immunity, hematological and survival in the face of salinity stress in common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Applied Ichthyological Research*, University of Gonbad Kavous. 2021, 8(4): 77-86.

# Effect of dietary supplementation with L-proline and L-alanine amino acids on immunity, hematological and survival in the face of salinity stress in common carp (*Cyprinus carpio*)

Taziki T<sup>1</sup>, Jafari V.O<sup>\*2</sup>, Mazadarani M<sup>2</sup>, Hoseinifar S.H<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> PhD Student, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

<sup>2</sup> Associate Prof, Dept of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

## Type:

Original Research Paper

## Paper History:

Received: 30-10-2019

Accepted: 09-12- 2019

## Corresponding author:

Jafari V.O. Associate Prof, Dept of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Email: v.jafari.sh110@gmail.com

## Abstract

The use of free amino acids in fish diets typically results in a change in dietary behavior and more feed intake. The purpose of the present study was to investigate the effects of different levels of amino acids L-Proline and L-Alanine on common carp. For this purpose, 450 number of juvenile common carp with an average weight of  $14 \pm 0.2$  g were randomly distributed in 30 tanks 300 liter equipped with aeration system. Fish for 60 day were fed with 10 treatments dietary includes three levels of proline (0.5, 1 and 1.5 %), three levels of alanine (0.5, 1 and 1.5 %), three levels of proline-alanine combination (0.5, 1 and 1.5 %) and basal diet (control). Blood samples were taken at the end of the period. At the end of the period, the treatments were exposed to 15 ppt salinity at the end of the period to evaluate the resistance of the fish to salinity stress. The highest amount of erythrocytes was observed in the combination treatment 0.75 + 0.75 proline-alanine, but there was no significant difference with other combination treatments and 1.5% alanine treatment but with other treatments, especially the control treatment showed a significant difference. White blood cell count was the highest in the combination and control treatments, which was significantly different from the other treatments. Hemoglobin, hematocrit, lysozyme, immunoglobulin, total protein and liver enzymes (ALP, AST and ALT) were not significantly different among all treatments. MCH was highest in 1% proline treatment which had significant difference with combination treatment 0.75 + 0.75 + proline-alanine but did not show any significant difference with other treatments. MCV value in combination treatment 0.75 + 0.75 + proline-alanine was significantly different from other treatments. Also, MCHC values were not significantly different among all treatments. The highest amount of lymphocytes was observed in the combination treatment 0.5 + 0.5 and 0.75 + 0.75 + proline-alanine which was significantly different from other treatments, especially control treatment. The highest amount of neutrophils was observed in 1% proline treatment and the lowest value was in combination treatments (without significant difference) which were significantly different from other treatments. There was also a significant difference in the amount of monocytes and eosinophil between treatments. The highest survival rates were  $58.60 \pm 1.46$  and  $53.84 \pm 4.41$  in combination treatment 0.75 + 0.75 and 0.5 + 0.5 proline-alanine, respectively. Finally, it can be said that there is a significant difference in some of the results, it seems that the two amino acids L-proline and L-alanine at the combined level of 0.5 + 0.5% can be effective in improving hematological and survival parameters in juvenile *cyprinus carpio*.

**Keywords:** Free amino acids, Common carp, Hematological parameters, Survival