اثر پروبیوتیک (Saccharomyces cerevisiae *PTCC5052*) بر افزایش نرخ ماندگاری بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Onchorhyncus mykiss)

مژگان امتیازجو[1]*؛ همایون حسین زاده صحافی[2]، داود ضرغام[1]، طیبه باشتی[3] و کمیل رزمی[1]

۱- دانشکده علوم وفنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

۲- موسسه تحقیقات شیلات ایران

۳- مرکز تکثیر و پرورش ماهیان سردابی شهید مطهری یاسوج

چکیده

استفاده از پروبیوتیکها را می توان یکی از دستاوردهای مثبت پژوهشگران دانست که به صورت بیولوژیـک و طبیعـی باعـث افزایش تولید در واحد سطح می شود. طی ۵۰ سال گذشته پروبیوتیکها در محدوده وسیعی از گونه ها به منظور ارتقاء تعادل میکروبی روده جهت ارتقاء رشد ، جذب نوترینتها ، افزایش ایمنی و نیز بالا بردن بقاء به کار برده شده اند. در تحقیق حاضـر که در زمسـتان سـال ۱۳۸۶ در مرکـز تکثیـر و پـرورش ماهیـان سـردابی شـهید مطهـری یاسـوج انجـام شـد اثـر مخمـر *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 5052 به طور خالص به عنوان پروبیوتیک در کاهش نرخ تلفات و افزایش در صد بقائ لاروهای قزل آلای رنگین کمان(*Onchorhyncus mykiss*) مورد بررسی قرار گرفت . برای انجام این تحقیـق ۸۴۰۰ لارو دارای کیسه زرده در ۴ تیمار و ۳ تکرار تقسیم شدند.نسبت مخمر موجود در ۳ تیمار آزمایش به ترتیب ۱۰^۶ ، ۱۰^۷ ، ۱۰^۸ مخمر در هر گرم غذای ماهی برای تیمارهای B,A C بود. نتایج نشان داد که میانگین ماندگاری تیمارهـا برای تیمار شاهد ٪۸۷,۸ ، تیمار A ٪۹۲,۸ ، تیمار B ٪۹۳ و تیمار C ٪۹۵,۴ می باشد .پس از آنالیز آماری داده هـا تنهـا بین تیمار شاهد و تیمار C اختلاف معنـی دار مشـاهده شـد.($P<0.05$) .بـه کـار گیـری مخمـر *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 5052 به مقدار ۱۰^۸ مخمر در هر گرم غذای ماهی اثر مثبت و معنی داری بر درصـد بقـا بچـه ماهیان قزل آلای رنگین کمان دارد .

واژگان کلیدی: قزل آلای رنگـین کمـان،(*Onchorhyncus mykiss*) ، پروبیوتیـک، مانـدگاری، *Saccharomyces cerevisiae*

مقدمه

قزل آلای رنگین کمان نخستین گونه از خانواده آزاد ماهیان است که به عنوان غذای اصلی انسان رام شد و پرورش یافت.در حال حاضر این ماهی سهم با ارزشی در تامین غذای انسان دارد.ماهی های خانواده آزاد ماهیان غنی از چربیهای اشباع نشده

* مسئول مکاتبات Moz_emtyazjoo@yahoo.com

ای هستند که وجودشان در غذای سالم ضروری است.درپرورش قزل آلا و به طور کلی همه آبزیان،پرورش دهندگانی موفـق ترند که بتوانند با برنامه ریزی مناسب، ماهی بازاری را در زمان مناسب و با قیمت مناسب به بازار عرضـه کننـد و بـا هزینـه تولید پایین تر به سود بیشتری دست یابند. (سدویک، ۱۳۷۹) .

استفاده از پروبیوتیکها را می توان یکی از دستاوردهای مثبت پژوهشگران دانست که به صورت بیولوژیـک و طبیعـی باعـث افزایش تولید در واحد سطح می شود. (قشقایی و لایق ۱۳۸۳) .طی ۵۰ سال گذشته پروبیوتیکها به منظـور ارتقـاء تعـادل میکروبی روده به کـار گرفتـه شـده انـد. (Rengpipat et al., 1998; Tovar-ramirez, 2004; Lacoste et al., 2002; Ringo, 1999, Siwicki, 1994;Jorgensen, 1993) .

پروبیوتیکها در محدوده وسیعی از گونه ها برای ارتقاء رشد ، جذب نوترینتها ، افزایش ایمنی و نیز بالا بردن بقاء مؤثر هستند (Macey & Coyne, 2005) .نتایج تحقیقات گذشته امیدوار کننده بوده و نوید پیشرفتهای بهتـری در بـه کـار گیـری پروبیوتیکها می دهد (Rengpipat et al., 1998) .

در پرورش قزل آلا و به طور کلی همه انواع آبزیان پرورشی ، حساس ترین دوران پرورش مربوط به اوایل زنـدگی موجـود و دوران لاروی می باشد و بیشترین تلفات نیز در این دوران دیـده مـی شـود.در تحقیـق حاضـر اثـر مخمـر PTCC 5052 *Saccharomyces cerevisiae* به طور خالص(و نه به شکل یک ترکیب تجـاری نـا خـالص) بـه عنـوان پروبیوتیـک در کاهش نرخ تلفات و افزایش در صد بقائ لاروهای قزل آلای رنگین کمان و بدون حضور عوامل بیمـاریزای باکتریـایی مـورد بررسی قرار گرفت تا نتیجه حاصل اثر این مخمر را در بهبود شرایط زیستی و نه قدرت مقابله آن بر ضد یک باکتری خـاص، نشان دهد.

مواد و روش کار

این تحقیق در زمستان سال ۱۳۸۶، در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان سردابی شهید مطهری یاسوج واقـع در منطقـه دشـت روم در ۲۶ کیلومتری جنوب شهر یاسوج انجام شد.

برای انجام این تحقیق ۸۴۰۰ لارو دارای کیسه زرده ماهی قزل آلای رنگین کمان(*Onchorhyncus mykiss*) در نظـر گرفته شد.این لاروها در ۴ تیمار تقسیم شدند و برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد.لاروها به آرامی بـه داخـل سـینی های پرورش لارو قزل آلا منتقل شدند.بدین ترتیب ۱۲ سینی و در هر سینی ۷۰۰ بچه ماهی آماده شد.بچه ماهیهای مـورد استفاده ، حاصل تکثیر مخلوط چند مولد نر و چند مولد ماده بودند تا بدینوسیله از درصد خطای آزمایش کاسته شود. طـی اندازه گیری های متعدد در طول آزمایش ، دمای آب تقریبا ثابت ودرحدود ۱۰/۵ درجه سانتیگراد و PH نیز ثابت و برابر بـا ۸ بود. اکسیژن محلول در آب بین ۶/۲ تا ۷/۵ میلی گرم در لیتر متغیر بود.

مخمر PTCC 5052 *Saccharomyces cerevisiae* از سازمان پژوهشهای علمی و صـنعتی ایـران بصـورت آمپـول لیوفیلیزه تهیه گردید. ابتدا سینتیک رشد مخمر بررسی شد .بدین منظور مخمر در محـیط کشـت Yeast mold agar کشت داده شد و در فواصل یکساعته ، میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج 550 nm اندازه گیـری و یادداشت گردید.

(Tovar et al., 2002). به طور همزمان تعداد مخمرها در واحد حجم با اسـتفاده از لام هموسـیتومتری Neobar شمارش و ثبت شد.

پس از ۲۷ ساعت از رشد مخمر ، نمودار رشد مخمر ترسیم گردید .برای این آزمایش مخمری که در شروع فاز ثابت (Early stationary phase) قرار دارد مد نظر بود.بنابر این مخمر در محیط کشت yeast mold agar بـه طـور انبـوه کشـت داده شد و پس از رسیدن به فاز ثابت ، با غذای ماهی ترکیب شد.غذای ماهی از نوع پلت فرانسوی بود.برای ایـن آزمـایش ۳ تیمار و یک تیمار شاهد در نظر گرفته شد.نسبت مخمر موجود در ۳ تیمار آزمایش به ترتیب ۱۰^۶ ، ۱۰^۷ ، ۱۰^۸ مخمر در هر گرم غذای ماهی برای تیمارهای C,B,A بـود. (Tovar et al.,2002 ; Gatesoupe, 2007; Ziaei nejad et al., 2006)

غذای تیمار شاهد فاقد مخمر بود.

بلافاصله پس از شروع شنای بچه ماهیها و آمادگی برای تغذیه ، غذای مورد نظر در اختیار آنها قرار گرفت.

غذادهی ۸ بار در روز انجام شد .مدت زمان آزمایش ۵۰ روز در نظر گرفته شـد (Li & Gutlin, 2003; Tovar et al., 2002) .

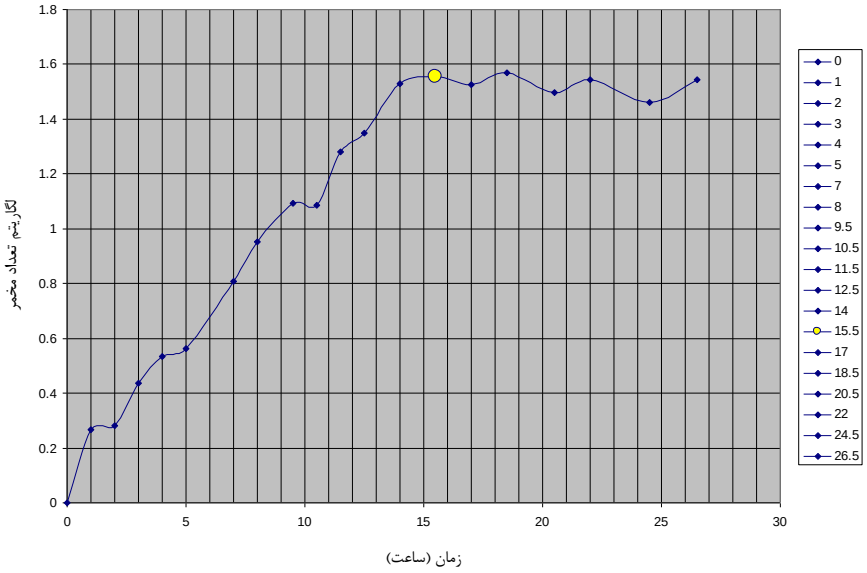
تلفات روزانه هر سینی در ابتدای صبح هر روز گرفته می شد و تعداد آنها به تفکیک هر سینی ثبت می گردید.در نهایت پس از ۵۰ روز تعداد ماهیهای باقیمانده هر تیمار و هر تکرار مشخص گردید و در دوره های ۱۰ روزه بررسی شد. (Tovar et al .,2002)

نتایج حاصله با استفاده از برنامه نرم افزاری SPSS و تست آنالیز واریانس یکطرفه در سطح ۹۵٪ بررسی شد.ضـمنا بـرای مقایسه جداگانه تیمارها، از تست Tukey استفاده شد.

نتایج

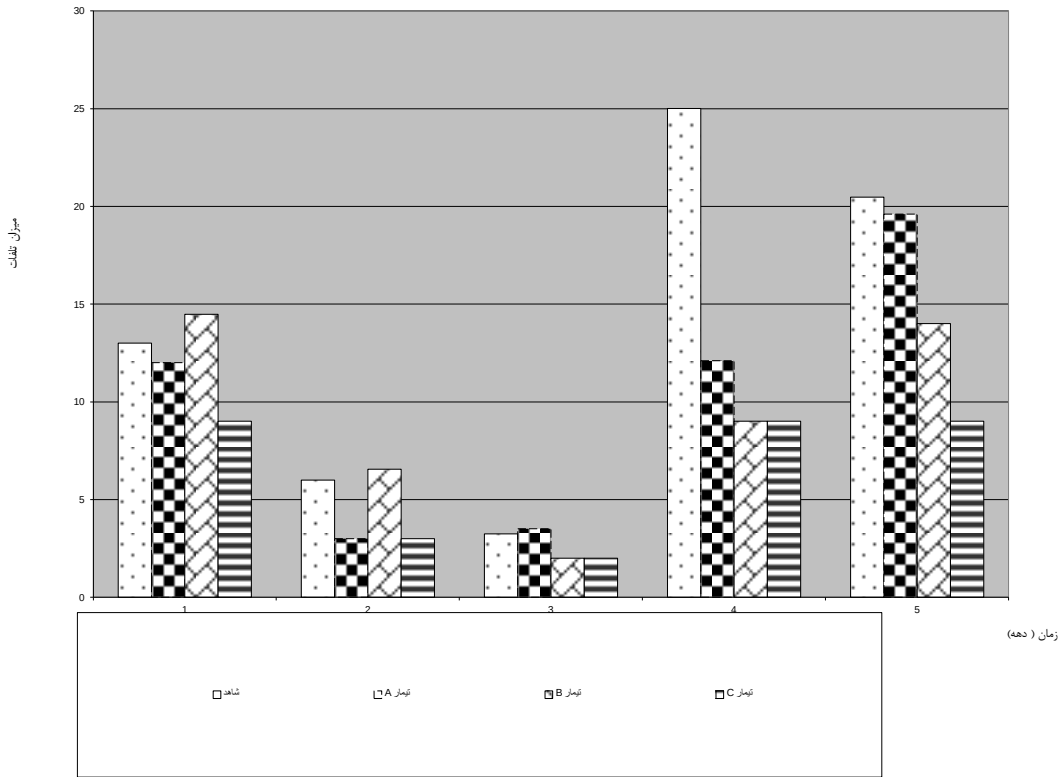
نمودار رشد مخمر

نمودار رشد مخمر *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 5052 پس از گذشت ۲۷ ساعت از شروع کشـت ترسـیم گردید.(شکل ۳-۱)



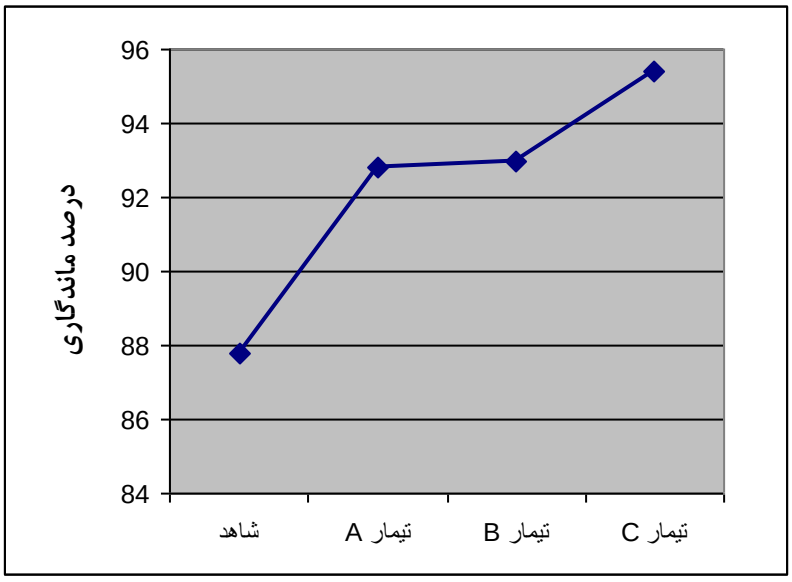
شکل ۳-۱: منحنی رسد مخمر *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 5052. زمان شـروع فـاز ثابت رشد در منحنی به شکل متفاوت علامتگذاری شده است.

نتایج تلفات هر دوره ۱۰ روزه طبق نمودارهای زیر به دست آمد :



شکل ۳-۲ : نمودار تلفات بچه ماهیها (تلفات هر دوره ۱۰ روزه تفکیک گردیده است)

برای نتیجه گیری صحیح از عملکرد کلی پروبیوتیک ،مجموع نتایج کل دوره آزمایش آنالیز گردیددر ابتدا میانگین تلفات هر تیمار در یک نمودار ترسیم گردید :



شکل ۳-۳ :منحنی میانگین درصد ماندگاری تیمارها

میانگین ماندگاری تیمارها به این صورت بود:تیمار شاهد ٪۸۷,۸ ، تیمار A ٪۹۲,۸ ، تیمار B ٪۹۳ ، تیمار C ٪۹۵,۴ .
.نتایج آنالیز واریانس یکطرفه (One Way ANOVA) به همراه تست Tukey به منظور مقایسه آماری تیمارها در زیر آمده است :

ANOVA

SURVIVAL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	86.949	3	28.983	4.318	.044
Within Groups	53.700	8	6.712		
Total	140.649	11			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: SURVIVAL
Tukey HSD

(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-5.0667	2.11542	.155	-11.8410	1.7077
	3	-4.6000	2.11542	.210	-11.3743	2.1743
	4	-7.4333(*)	2.11542	.032	-14.2077	-.6590
2	1	5.0667	2.11542	.155	-1.7077	11.8410
	3	.4667	2.11542	.996	-6.3077	7.2410
	4	-2.3667	2.11542	.689	-9.1410	4.4077
3	1	4.6000	2.11542	.210	-2.1743	11.3743
	2	-.4667	2.11542	.996	-7.2410	6.3077
	4	-2.8333	2.11542	.566	-9.6077	3.9410
4	1	7.4333(*)	2.11542	.032	.6590	14.2077
	2	2.3667	2.11542	.689	-4.4077	9.1410
	3	2.8333	2.11542	.566	-3.9410	9.6077

* The mean difference is significant at the .05 level.

شکل ۳-۴ : جدول نتایج آنالیز واریانس یکطرفه و تست Tukey (مقایسه بین تیمارها)

همانطور که در جدول آنالیز واریانس مشخص شده ، اختلاف معنی داری در سطح بالاتر از ٪۹۵ بین تیمارهـا مشـاهده گردید .

برای مشخص شدن جزییات این آنالیز ، از تست Tukey استفاده شد تا هر تیمار به طور مجزا با سایر تیمارها مقایسه شود.همانطور که در جدول تست Tukey مشخص گردیده است ، بین تیمار شاهد و تیمار C اختلاف معنی داری مشاهده می شود ولی بین تیمار شاهد و تیمار A تفاوت معنی داری مشاهده نمی شود . بین تیمار شاهد و تیمار B نیز تفاوت معنی داری مشاهده نمی شود و همچنین بین تیمارهای A و B تفاوت معنی داری وجود ندارد.

بحث

Saccharomyces cerevisiae بعنوان یکی از گونه های مخمر غالب در روده قزل آلا مطرح است.بسیاری از گونه ها به این عنوان شناخته شده اند که پس از معرفی مصنوعی به روده ماهی ، در آنجا ساکن شده و رشد می کنند که از آن میان می توان به گونه هایی نظیر *Saccharomyces cerevisiae* و *Debaryomyces hansenii* درماهی قزل آلا اشاره نمود(Gatesoup, 2007).

تغییرات درجه حرارت در دگرگون کردن میکروفلور طبیعی روده ماهی مؤثر است(Michelle et al., 2006) نوع سیستم پرورش (کانال سیمانی و یا استخر پرورش) و یا سایر شرایط محلی مثل میزان سختی آب نیز می تواند بر روی میکروفلور روده تاثیر گذار باشد. (Michelle et al., 2006)

Gatesoupدر سال۲۰۰۷ بیان نمود که مخمرها می توانند واکنشهای ایمنی را در ماهی تحریک کنند.

افزایش مقاومت در برابر استرسهای دما و pH میتواند از خصوصیات مهم پروبیوتیکها باشد.(Fietto et al., 2004)

همانطور که آنالیز واریانس یکطرفه نشان داد ، در تحقیق حاضر تفاوت مشخصی بین ماندگاری بین تیمارهای پروبیوتیکی و تیمار شاهد وجود داشت.

(Tovar_ramirez et al., 2004) نیز اثر مخمر *Debaryomyces hansenii* HF1 را روی لارو باس دریایی بررسی کرد و نتایج مشابهی گزارش کرد(wache et al., 2006)

Tovarو همکاران نیز اثر دو مخمر *Debaryomyces hansenii* و *Saccharomyces cerevisiae* را روی ماندگاری لارو باس دریایی بررسی کردند.نتایج به این صورت بود که *Debaryomyces hansenii* توانایی بیشتری در افزایش نرخ ماندگاری نسبت به *Saccharomyces cerevisiae* دارا بود.

Li & Gutlin, 2003 نیز مقادیری از *Saccharomyces cerevisiae* را به غذای باس هیبرید راه راه اضافه کردند.زمانی که میزان*Saccharomyces cerevisiae* غذا ۱٪ بود نتایج مثبتی مشاهده شد و زمانی که این میزان ۲٪ بود ، نتایج ماندگاری عالی گزارش گردید.

Ziaei nejad et al .,2006 نیز اثر .*Bacillus spp* را بعنوان پروبیوتیک بر روی میگوی سفید هندی *F. indicus* آزمایش کرد.او این کار را به دو صورت انجام داد: ۱.اضافه کردن به آب ۲.غنی سازی آرتمیا و تغذیه میگو با آن.او گزارش کرد که نتایج ماندگاری به میزان معنی داری بالا رفت.ولی (Sharrif et al., 2001) و (McIntosh et al., 2000) نتایج او را در آزمایش بر روی *P.monodon* و *L.vannamei* به دست نیاوردند.

Lacoste وهمکاران در سال۲۰۰۲ و Malham و همکاران در سال ۲۰۰۳نشان دادند که در صدفهای *C.gigas* و *Haliotis tuburculata* که سیستم ایمنی آنها تقویت شده ، رابطه مستقیمی بین موقعیت سیستم ایمنی و تاثیر گذاری بر استرس برقرار است .همچنین پاسخ سیستم ایمنی نسبت به عفونت سریعتر و شدیدتر از حالت عادی است.

این نتایج مثبت در زمانی که یک عامل بیماریزا به ماهی معرفی شود نیز بررسی و در اکثر موارد تایید شده است.
به عنوان مثال Macey & Coyne, 2005 اثر یک باکتری و دو مخمـر را بـه طـور تـوام بـر روی مانـدگاری صـدف *H.midea* بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که پس از معرفی *Vibrio anguillarum* بقاء تیمارها بسیار بالاتر بوده است.
Rengpipat و همکاران در سال ۲۰۰۰نیـز بـه ایـن نتیجـه رسـیدند کـه میگـوی *P.monodon* تغذیـه شـده بـا *Bacillus* S11 در مقابل ویبریو مقاومت بیشتری داشته است.
تاثیر توام مخمر و Grobiotic AE در مقابل سایر پاتوژنها و قدرت آنها در افزایش سلامت بدن نیز بـه اثبـات رسـیده است(Li & Gutlin, 2004).آنها اثر مخمر را در مقابله ماهی با *Streptococcus iniea* بیان کردند.
مخمرهای آبجو ساز بعنوان تقویت کننده سیستم ایمنی در ماهی آزاد آتلانتیک(Engsted et al ., 1992). و گربـه ماهی آفریقایی(Yoshida et al .,1995) و قزل آلای رنگین کمان (Siwicki et al., 1994) و (Jorgensen et al., 1993) معرفی شده اند.
Gatesoupe در سال ۲۰۰۷بیان داشت که بسته به شرایط آزمایش هم پاسخهای ایمنـی سـلولی و هـم Humoral توسط مخمرها افزایش می یابد.
افزایش پاسخهای ایمنی توسط مخمرها به عواملی نسبت داده میشود مانند اینکه مخمرها مخزن اسیدهای نوکلییـک و پلی ساکاریدها هستند(Li & Gutlin, 2003) . Tovar و همکاران در سال ۲۰۰۲نیز بلوغ روده لارو باس دریایی را به پلی آمینهای مترشحه توسط *Debaryomyces hansenii* نسبت دادند.
Ortuno و همکاران در سال ۲۰۰۲بیان کرد که ترکیبات بتا گلوکان و اسید نوکلییک و الیگو ساکاریدهای تولید شده توسط مخمر *Saccharomyces cerevisiae* برای افزایش پاسخهای ایمنی در گونه های زیادی از ماهیان مؤثرنـد و می توانند بعنوان ارتقاء دهنده سلامت بدن ماهی در پرورش به کار گرفته شوند.(Siwicki et al., 1994) .
Jorgensen et al.,1993 بررسی کردند زمانی که ۱٪ بتا ۱و۳ گلوکان به قزل آلای رنگین کمان تزریـق شـد، تولیـد سوپر اکسید آنیون برون سلولی به طور قابل ملاحظه ای توسط سلولهای فوق کلیوی افزایش یافت.
Rumsey et al., 1992 تحقیق کردند که فراورده حاوی RNA استخراج شده از مخمر، سطح اسید نوکلییک هـای کبدی را در قزل آلا بالا می برد.
در سالهای اخیر گزارشات زیادی نشاندهنده اینست که افزودن غذایی نوکلیوتیدها در بالا بردن محرکهای ایمنی و مقابله با بیماری در گونه های زیـادی از ماهیـان مـؤثر اسـت.ماننـد بـاس راه راه (Sakai et a.,l 2001 , Burrels et al 2001.,) Li & Gutlin 2004 نیز گفتند که مخمر آبجوساز و Grobiotic AE از طرق مشابهی بر روی واکنشهای ایمنی تاثیر گذار است.

زمان استفاده از مخمر از اهمیت زیادی برخوردار است.شواهد زیادی وجود دارد که مخمرها زمانی بایـد مـورد اسـتفاده قرار گیرند که میکرو فلور روده هنوز به طور کامل تشکیل نشده است ، تا بتوانند با چسبیدن به موکوس روده ، علاوه بر ترشح آنزیمها و متابولیتهای مخصوص خود به عنوان مانعی نیز برای چسبندگی پاتوژنهای بیماریزا عمل کنند.

Gatesoup, 2007 گفت که افزودن مخمر در اولین غذاها باعث بلوغ سیستم گوارش و نحوه کلونی سـازی روده مـی شود.

Ziaei nejad و همکاران در سال ۲۰۰۶نیز گفتند که افزودن پروبیوتیک در مراحـل هچـری میگـوی سـفید هنـدی دررشد وماندگاری موجود مؤثر بود ولی زمانی که پرو بیوتیک فقط در مرحله پرواری اضافه شد، مؤثر نبود

در تحقیق حاضر نیز مخمر بلافاصله پس از شروع تغذیه و در اولین غذا به ماهی معرفی شد

همانطور که مشاهده شد تیمار A و B تغییر محسوسی را در ماندگاری ایجاد نکردند ولی این تغییر در تیمار C کـاملا معنی دار بود.علت این مسأله را می توان به میزان مخمر موجود در غذا نسبت داد.

Ziaei nejad et al .,2006 نیز به همین مسأله اشاره دارند.آنها وجود رابطه بین بالاتر بـودن تعـداد بـاکتری هـا بـا فعالیت بیشتر آنزیمهای گوارشی و بالا رفتن ماندگاری را در یکی از تیمارها بیان کردند.و اظهار داشتند که ایـن رابطـه قویا این پیشنهاد را می دهد که افزودن میزان کافی پروبیوتیک در مراحل هچری برای رساندن ماندگاری بـه حـد اکثـر میزان ممکن ضروری است.

به عنوان شاهد دیگر نیز می توان به مشابه بودن تعداد مخمرهای تیمار سوم (C) با میزان طبیعی باکتریهای موجود در فلور روده اشاره کرد.Ringo , 1995گفت محوطه گوارشی ماهی دربرگیرنده تعداد باکتری بسیار بـالاتر از آب اطـراف است.چیزی بیش از ۱۰^۸ سلول در هر گرم.تعداد مخمرهای تیمار C نیز دقیقا برابر با این میزان است.

همچنین در شکل ۳-۲ دیده می شود که کمترین تلفات در حدود روزهای ۲۰-۳۰ می باشد.این آمار با زمان بلوغ روده که Tovar و همکاران در سال ۲۰۰۲اشاره کرده اند مطابقت دارد و می توان بلوغ روده در این زمان را عامـل کـاهش تلفات ذکر کرد.

در پایان لازم به ذکر است که قابلیت چسبندگی مخمر ها به روده قزل آلا بسته به مخمر و شرایط پرورش تفاوت دارد. Gatesoup ,2007 نیز اینطور بیان می کند که راندمان پروبیوتیکی *Saccharomyces cerevisiae* بستگی به سویه آن دارد.

این تحقیق نشان داد که مخمر *Saccharomyces cerevisiae* PTCC5052 در دوزهای ۱۰^۶ و ۱۰^۷ مخمر در هر گرم غذا تأثیر معنی داری بر ماندگاری بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان ندارد ولی درتیمار سوم با دوز بالاتر مخمر (۱۰^۸ عدد مخمر در هر گرم غذا) تأثیر مخمر معنی دار است.

تشکر و قدر دانی

از ریاست محترم مرکز تکثیر و پرورش ماهیان سردابی شهید مطهری یاسوج جناب آقای دکتر عین ا... گرجی پور و پرسنل آن مرکز تشکر و قدردانی میگردد.همچنین از جناب آقای دکتر امیر عبدا... مهرداد شریف سرپرست دانشکده علوم و فنون دریایی دانشگاه آزاد اسلامی صمیمانه تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

سدویک، استفان دروموند، ۱۳۷۹، راهنمای پرورش و تکثیر ماهی قزل آلا، مترجم عبدا... مشایی، مهرداد. انتشارات نوربخش، تهران.
قشقایی، رضا. لایق، مهدی. ۱۳۸۳، پروبیوتیکها، انتشارات نقش مهر، تهران.

Burrells, C., William, P.D., Forno, P.F., 2001. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds 1. Effects on resistance to diseases in salmonids. Aquaculture 199, 159–169.

Engstad, R.E., Robertsen, B., Frivold, E., 1992. Yeast glucan induces increase in activity of lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish Shellfish Immunology. 2, 287–297.

Fietto, J.L.R., Araujo, R.S., Valadao, F.N., Fietto, L.G., Brandao, R.L., Neves, M.J., Gomes, F.C.O., Nicoli, J.R., Castro, I.M., 2004. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. Can. J. Microbiology. 50, 615-621.

Gatesoupe, F.J., Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction and their effects on fish health and development, Aquaculture 267 (2007) 20-30.

Jorgensen, J.B., Lunde, H., Robertsen, B., 1993. Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon. J. Fish Disease. 16, 313–325.

Jorgensen, J.B., Sharp, J.E., Secombes, C.J., Robertsen, B., 1993. Effect of a yeast-cell-wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. Fish Shellfish Immunology. 3, 267– 277.

Li, P., Gatlin III, D.M., 2003. Evaluation of brewers yeast (Saccharomyces cerevisiae) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops _ M. saxatilis*). Aquaculture 219, 681– 692.

Li, P., Gatlin, D.M., 2004. Dietary brewers yeast and the prebiotic Grobiotic AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. Aquaculture 231, 445– 456.

Macey B.M., Coyne V.E., Improved growth rate and disease resistance in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment, Aquaculture 245 (2005) 249– 261.

McIntosh, D., Samocha, T.M., Jones, E.R., Lawrence, A.L., McKee, D.A., Horowitz, S., Horowitz, A., 2000. The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density

culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. Aquaculture. England. 21, 215– 227.

Michelle J. Pond ., David M. Stone, David J. Alderman, 2006, Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Aquaculture 261 (2006) 194 -203.

Ortuno, J., Cuesta, A., Rodrý´guez, A., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2002. Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (Sparus aurata L.).Vet. Immunol. Immunopathol. 85, 41–50.

Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P., 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiotic bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture 191, 271–288.

Ringo, E., Strom, E., Tabachek, J.A., 1995. Intestinal microflora of salmonids: a review. Aquaculture. Res. 26, 773–789.

Rumsey, G.L., Winfree, R.A., Hughes, S.G., 1992. Nutritional values of dietary nucleic acids and purine bases to rainbow trout. Aquaculture 108, 97–110.

Sakai, M., Taniguchi, K., Mamoto, K., Ogawa, H., Tabata, M., 2001. Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. J. Fish Disease. 24, 433– 438.

Shariff, M., Yusoff, F.M., Devaraja, T.N., Srinivasa Rao, S.P., 2001.The effectiveness of a commercial microbial product in poorly prepared tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius), ponds. Aquaculture. Res. 32, 181– 187.

Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Rumsey, G.L., 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Vet. Immunol. Immunopathology. 41, 125–139.

Tovar-Ramírez, D., Zambonino Infante, J., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vázquez-Juárez, R., 2004. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. Aquaculture 234, 415– 427.

Tovar-Ramírez, D., Zambonino, J., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vázquez-Juárez, R., Lésel, R., 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquaculture 204, 113–123.

Waché, Y., Auffray, F., Gatesoupe, F.J., Zambonino, J., Gayet, V., Labbé, L., Quentel, C., 2006. Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. Aquaculture 258, 470–478.

Yoshida, T., Kruger, R., Inglis, V., 1995. Augmentation of non-specific protection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long-term oral administration of immunostimulants. J. Fish Disease. 18, 195– 198.

Ziaei-Nejad, Saeed., Habibi Rezaei, Mehran., Azari Takami, Ghobad.,. Lovett, Donald L., Mirvaghefi, Ali-Reza., Shakouri, Mehdi., The effect of Bacillus spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*, Aquaculture 252 (2006) 516– 524.