

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

مژگان امتیازجو<sup>۱\*</sup>؛ همایون حسین زاده صحافی<sup>۲</sup>، داود ضرغام<sup>۱</sup>، طیبیه باشتی<sup>۳</sup> و کمیل رزمی<sup>۱</sup>

۱- دانشکده علوم و فنون 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 بیولوژیک و طبیعی باعث 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 حاضر که در زمستان سال ۱۳۸۶ در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان سردابی شهید مطهری یاسوج انجام شد اثر مخمر *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 5052 به طور خالص به عنوان پروبیوتیک در کاهش نرخ تلفات و افزایش در صد بقای لاروهای قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این تحقیق ۸۴۰۰ لارو دارای کیسه زرده در ۴ تیمار و ۳ تکرار تقسیم شدند. نسبت مخمر موجود در ۳ تیمار آزمایش به ترتیب  $10^6$ ،  $10^7$ ،  $10^8$  مخمر در هر گرم غذای ماهی برای تیمارهای A, B, C بود. نتایج نشان داد که میانگین ماندگاری تیمارها برای تیمار شاهد ۸۷٫۸٪، تیمار A ۹۲٫۸٪، تیمار B ۹۳٪ و تیمار C ۹۵٫۴٪ می باشد. پس از آنالیز آماری داده ها تنها بین تیمار شاهد و تیمار C اختلاف معنی دار مشاهده شد. ( $P < 0.05$ ). به کار گیری مخمر *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 5052 به مقدار  $10^8$  مخمر در هر گرم غذای ماهی اثر مثبت و معنی داری بر درصد بقا بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان دارد.

واژگان کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، (*Onchorhynchus mykiss*)، پروبیوتیک، ماندگاری، *Saccharomyces cerevisiae*

### مقدمه

قزل‌آلای رنگین‌کمان 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

ای هستند که وجودشان در غذای سالم ضروری است. در پرورش قزل آلا و به طور کلی همه آبزیان، پرورش دهندگانی موفق ترند که بتوانند با برنامه ریزی مناسب، ماهی بازاری را در زمان مناسب و با قیمت مناسب به بازار عرضه کنند و با هزینه 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 بیولوژیک و طبیعی باعث افزایش تولید در واحد سطح می شود. (قشقایی و لایق ۱۳۸۳). طی ۵۰ سال گذشته پروبیوتیکها به منظور ارتقاء تعادل میکروبی روده به کار گرفته شده اند. (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 بهتری در به کار گیری 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 زندگی موجود و دوران لاروی می باشد و بیشترین تلفات نیز در این دوران دیده می شود. در تحقیق حاضر اثر مخمر PTCC 5052 *Saccharomyces cerevisiae* (و نه به شکل یک ترکیب تجاری ناخالص) به عنوان پروبیوتیک در کاهش نرخ تلفات و افزایش در صد بقای لاروهای قزل آلا رنگین کمان و بدون حضور عوامل بیماریزای باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت تا نتیجه حاصل اثر این مخمر را در بهبود شرایط زیستی و نه قدرت مقابله آن بر ضد یک باکتری خاص، نشان دهد.

## مواد و روش کار

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

برای انجام این تحقیق ۸۴۰۰ لارو دارای کیسه زرده ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) در نظر گرفته شد. این لاروها در ۴ تیمار تقسیم شدند و برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. لاروها به آرامی به داخل سینی های پرورش لارو قزل آلا منتقل شدند. بدین ترتیب ۱۲ سینی و در هر سینی ۷۰۰ بچه ماهی آماده شد. بچه ماهیهای مورد استفاده، حاصل تکثیر مخلوط چند مولد نر و چند مولد ماده بودند تا بدینوسیله از درصد خطای آزمایش کاسته شود. طی اندازه گیری های متعدد در طول آزمایش، دمای آب تقریباً ثابت و در حدود ۱۰/۵ درجه سانتیگراد و PH نیز ثابت و برابر با 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 صنعتی ایران بصورت آمپول لیوفیلیزه تهیه گردید. ابتدا سینتیک رشد مخمر بررسی شد. بدین منظور مخمر در محیط کشت Yeast mold agar کشت داده شد و در فواصل یکساعته، میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج 550 nm اندازه گیری و یادداشت گردید.

(Tovar et al., 2002). به طور همزمان تعداد مخمرها در واحد حجم با استفاده از لام هموسیتومتری 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. بنابراین این مخمر در محیط کشت yeast mold agar به طور انبوه کشت داده شد و پس از رسیدن به فاز ثابت، با غذای ماهی ترکیب شد. غذای ماهی از نوع پلت فرانسوی بود. برای این آزمایش ۳ تیمار و یک تیمار شاهد در نظر گرفته شد. نسبت مخمر موجود در ۳ تیمار آزمایش به ترتیب  $10^8$ ،  $10^7$ ،  $10^6$  مخمر در هر گرم غذای ماهی برای تیمارهای A, B, C بود. (Tovar et al., 2002; Gatesoupe, 2007; Ziaei nejad et al., 2006)

غذای تیمار شاهد فاقد مخمر بود.

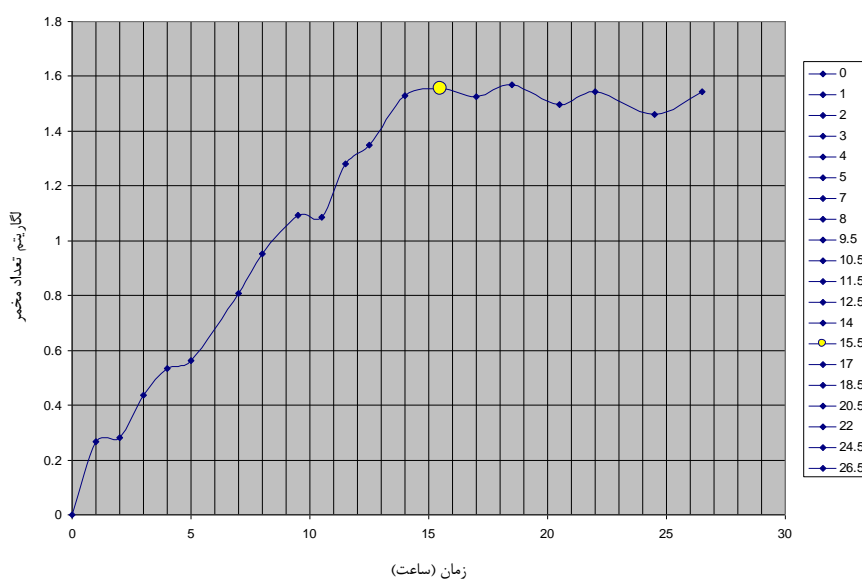
بلافاصله پس از شروع شنای بچه ماهیها و آمادگی برای تغذیه، غذای مورد نظر در اختیار آنها قرار گرفت. غذادهی ۸ بار در روز انجام شد. مدت زمان آزمایش ۵۰ روز در نظر گرفته شد. (Li & Gutlin, 2003; Tovar et al., 2002).

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 ۰.۰۵٪ بررسی شد. ضمناً برای مقایسه جداگانه تیمارها، از تست Tukey استفاده شد.

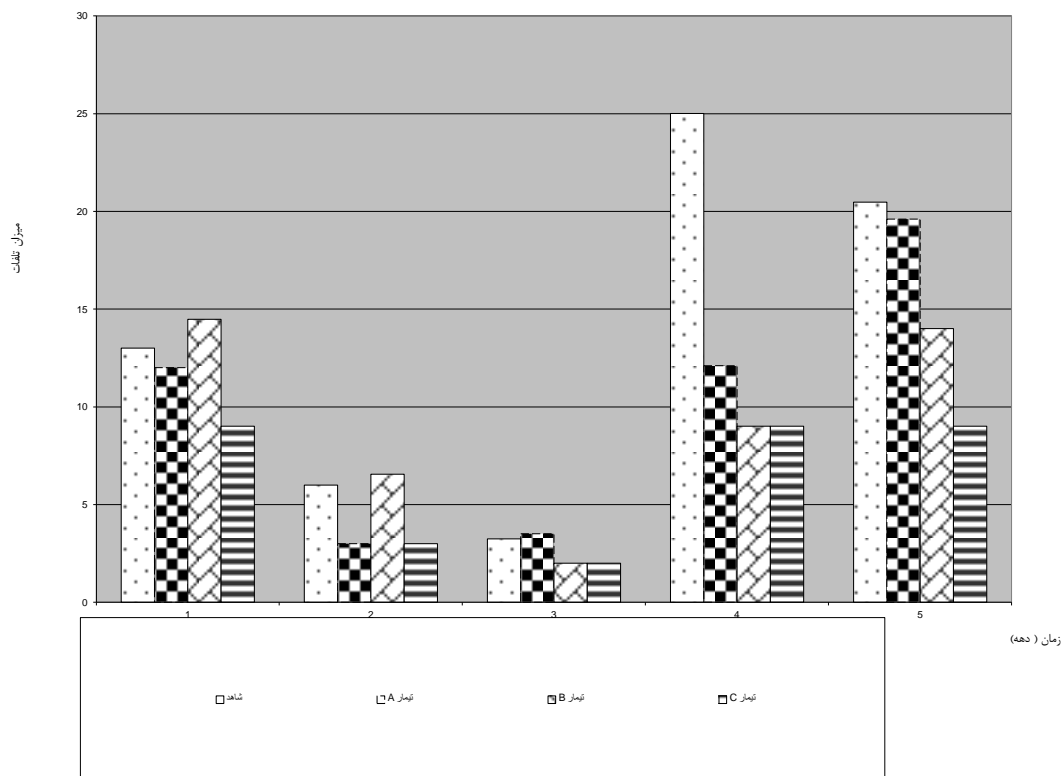
## نتایج

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



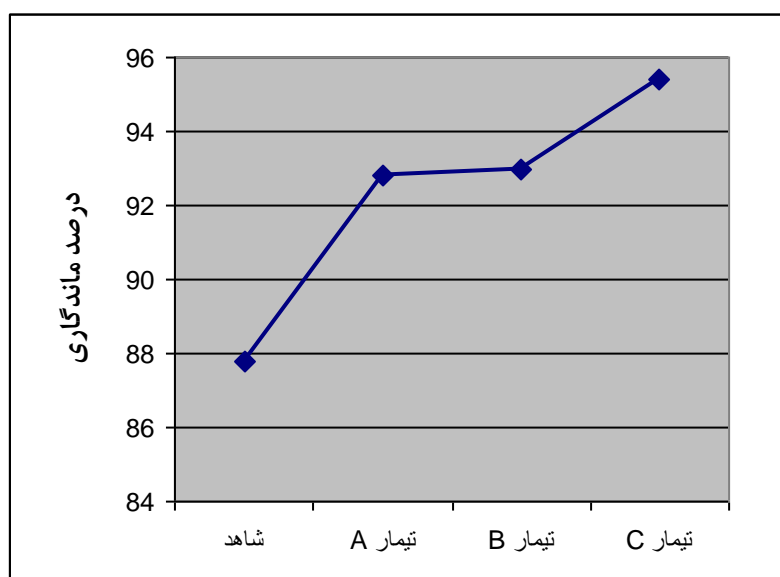
شکل ۱-۳: منحنی رشد مخمر *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 5052. زمان شروع فاز ثابت رشد در منحنی به شکل متفاوت علامتگذاری شده است.

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 گردید در 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 تیمارها مشاهده 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* در ماهی 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)

Gatesoup در سال ۲۰۰۷ 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)

Tovar و 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 آرتیمیا 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 و همکاران در سال ۲۰۰۲ و Malham و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که در صدفهای *C. gigas* و *Haliotis tuberculata* 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 مخمر را به طور توأم بر روی ماندگاری صدف *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 ۲۰۰۰ نیز به این نتیجه رسیدند که میگوی *P.monodon* تغذیه شده با *Bacillus S11* در مقابل ویبریو مقاومت بیشتری داشته است.

تأثیر توأم مخمر و Grobiotic AE در مقابل سایر پاتوژنها و قدرت آنها در افزایش سلامت بدن نیز به اثبات رسیده 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 گربه ماهی آفریقایی (Yoshida et al., 1995) و قزل آلی رنگین کمان (Siwicki et al., 1994) و (Jorgensen et al., 1993) معرفی شده اند.

Gatesoupe در سال ۲۰۰۷ بیان داشت که بسته به شرایط آزمایش هم پاسخهای ایمنی سلولی و هم Humoral توسط مخمرها افزایش می یابد.

افزایش پاسخهای ایمنی توسط مخمرها به عواملی نسبت داده میشود مانند اینکه مخمرها مخزن اسیدهای نوکلئیک و پلی ساکاریدها هستند (Li & Gutlin, 2003). Tovar و همکاران در سال ۲۰۰۲ نیز بلوغ روده لارو باس دریایی را به پلی آمینهای مترشحه توسط *Debaryomyces hansenii* نسبت دادند.

Ortuno و همکاران در سال ۲۰۰۲ بیان کرد که ترکیبات بتا گلوکان و اسید نوکلئیک و الیگو ساکاریدهای تولید شده توسط مخمر *Saccharomyces cerevisiae* برای افزایش پاسخهای ایمنی در گونه های زیادی از ماهیان مؤثرند 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 ۳ و ۱ گلوکان به قزل آلی رنگین کمان تزریق شد، تولید 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 نوکلئیک های کبدی را در قزل آلا بالا می برد.

در سالهای اخیر گزارشات زیادی نشاندهنده اینست که افزودن غذایی نوکلئوتیدها در بالا بردن محرکهای ایمنی و مقابله با بیماری در گونه های زیادی از ماهیان مؤثر است. مانند باس راه راه (Sakai et al., 2001, Burrels et al., 2001).

(Li & Gutlin 2004, 2001). نیز گفتند که مخمر آبجوساز و Grobiotic AE از طرق مشابهی بر روی واکنشهای ایمنی تأثیر گذار است.

زمان استفاده از مخمر از اهمیت زیادی برخوردار است. شواهد زیادی وجود دارد که مخمرها زمانی باید مورد استفاده 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 سازی روده می شود.

Ziaei nejad و همکاران در سال ۲۰۰۶ نیز گفتند که افزودن پروبیوتیک در مراحل هجری میگوی سفید هندی در رشد و ماندگاری 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 کاملاً 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 بودن تعداد باکتری ها با فعالیت بیشتر آنزیمهای گوارشی و بالا رفتن ماندگاری را در یکی از تیمارها بیان کردند. و اظهار داشتند که این رابطه قویاً این پیشنهاد را می دهد که افزودن میزان کافی پروبیوتیک در مراحل هجری برای رساندن ماندگاری به حد اکثر 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, 1995 گفت محوطه گوارشی ماهی دربرگیرنده تعداد باکتری بسیار بالاتر از آب اطراف است. چیزی بیش از  $10^8$  سلول در هر گرم. تعداد مخمرهای تیمار C نیز دقیقاً 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 ۲۰۰۲ اشاره کرده اند مطابقت دارد و می توان بلوغ روده در این زمان را عامل کاهش 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  $10^6$  و  $10^7$  مخمر در هر گرم غذا تأثیر معنی داری بر ماندگاری بچه ماهی قزل آلا رنگین کمان ندارد ولی در تیمار سوم با دوز بالاتر مخمر ( $10^8$  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., Rodríguez, 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, *Oncorhynchus 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.