فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی 25، جلد 7، شماره 2، بهار93، صفحه 11 تا 22

بررسی اثر پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر (*Saccharomyces cerevisia*) بر تغییرات شاخص‌های خونی و ایمنی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین-کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

محمد اعتصامی پور[1]، عباسعلی زمینی[2]، مسعود فرخ روز[2]
1- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه شیلات، لاهیجان. ایران.
Mohammadeatisamipour@gmail.com
2- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، استادیار گروه شیلات، لاهیجان. ایران.

تاریخ دریافت:93/1/16 **تاریخ پذیرش: 93/2/27**

چکیده

زمینه وهدف: پری‌بیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی بالقوه‌ای هستند که اثرات زیان بار عوامل عفونت‌زا را کاهش و تاثیرات مفیدی بر سلامتی میزبان دارند. هدف از این تحقیق بررسی اثر پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر(*Saccharomyces cerevisia*) بر شاخص-های خونی و ایمنی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان است.

روش کار: برای انجام تحقیق 120 قطعه بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان با میانگین وزنی 0/12±3/61 گرم به مدت 8 هفته به صورت تصادفی در سه تیمار 1٪، 1/5٪، 2٪ پری بیوتیک و شاهد، با 3 تکرار پرورش داده شدند. در پایان دوره پرورش شاخص‌های خونی و ایمنی بچه ماهیان مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: اختلاف معنی داری در میزان گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت و نوتروفیل بین تیمار 2٪ و سایر تیمارها و گروه شاهد مشاهده گردید (P<0/05). در فاکتورهای میانگین حجم گلبول قرمز و سایر فاکتورهای خونی اختلاف معنی داری در تیمارها دیده نشد (P>0/05). هم‌چنین نتایج نشان داد که شاخص‌های ایمنی غیر اختصاصی در خون نظیر لیزوزیم و ایمنی اختصاصی نظیر IgM و Ig اختلاف معنی‌داری بین گروه تیماری تغذیه شده با 2٪ پری بیوتیک دیواره سلولی مخمر با سایر تیمارها و گروه شاهد داشتند (P<0/05).

نتیجه‌گیری: پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر در سطح 2٪ به‌کار رفته در جیره غذایی به‌دلیل افزایش قابل توجه در شاخص‌های ایمنی و برخی از پارامترهای خونی مورد بررسی، می تواند نقش مهمی در عملکرد ایمنی و بهبود شاخص‌های خونی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان ایفا نماید.

واژه های کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، پری‌بیوتیک، دیواره سلولی مخمر، شاخص‌های خونی، شاخص‌های ایمنی.

مقدمه

قزل‌آلای رنگین‌کمان نخستین گونه از خانواده آزاد ماهیان است که به عنوان غذای اصلی انسان پرورش یافته و در حال حاضر سهم با ارزشی در تامین غذای انسان دارد(35). در مراحل ابتدایی رشد این ماهی شرایطی ویژه و بحرانی وجود دارد. ایجاد شرایط مناسب در این مراحل می‌تواند ضامن سلامت ماهی در مراحل بعدی پرورش باشد(3). در سال‌های اخیر استفاده از مکمل‌های غذایی که در بالا بردن سیستم ایمنی نقش دارند از جمله راه کارهایی می‌باشند که علاوه بر تأمین مواد مغذی لازم می‌توانند در افزایش سلامت، مقاومت نسبت به استرس و عوامل بیماری‌زا مفید واقع شوند(43). در این رابطه، ترکیباتی که مورد استفاده قرار می‌گیرند، زیست یارهای غیر حیاتی هستند که پری‌بیوتیک نامیده می‌شوند. این ترکیبات به عنوان مواد غذایی تخمیر پذیر و غیر قابل هضم به‌طور مؤثری از طریق تحریک یا محدود کردن رشد و فعالیت باکتری‌ها بر سلامت میزبان اثر می‌گذارد(5، 4). بنابراین هر ماده غذایی که به روده می‌رسد مثل کربوهیدرات-

های غیر قابل هضم، بعضی از پپتیدها و پروتئین‌ها می-توانند کاندیدای مناسب برای پری‌بیوتیک باشند(20). پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر در واقع دیواره سلولی استخراج شده از مخمر *Saccharomyces cerevisia* می‌باشد. دیواره سلولی مخمر، منشأ دو ماده‌ی محرک ایمنی مهم بتاگلوکان β-Glucan (3→1) و مانان اولیگوساکارید (MOS) هستند(19). تحقیقات نشان داده است که بتاگلوکان و مانان اولیگوساکارید باعث افزایش فعالیت سلول‌های بیگانه‌خوار نظیر نوتروفیل‌ها، فعال‌سازی گلبول‌های سفید، ماکروفاژها، اینترفرون‌ها و لیزوزیم‌ها و در نهایت افزایش سطح ایمنی سلول‌های بدن می‌شود(16). گزارش‌های متعددی نشان داده‌اند که گیرنده‌های گلوکان در ماهیان روی ماکروفاژها قرار داشته و قادرند از طریق فعال سازی مستقیم ماکروفاژها باعث ارتقاء ایمنی غیر اختصاصی شوند(33). تاثیر پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر بر شاخص‌های خون و ایمنی بچه ماهیان انگشت قد کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در سه سطح ۱،۲ و 3٪ به جیره غذایی بچه ماهیان در 8 هفته رشد قابل ملاحظه ای را در تیمار 3٪ بر شاخص‌های خون و ایمنی نشان داد (13). در تحقیقی سطوح1، 2، 3% پری بیوتیک اینولین در جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد سنجش قرار گرفت. پس از 8 هفته تغذیه نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم‌های سرم خون در تیمارهای آزمایشی با گروه شاهد وجود ندارد (P>0/05)(1). در مطالعه دیگری اثرات سطوح ۱،۵،۱۰٪ گرم در کیلوگرم مخمر آبجو(*S.cerevisiae*) در جیره غذایی ماهی سیم دریایی(*Sparus aurata*) بر میزان IgM سرم خون آزمایش گردید و مشاهده شد که مخمر به دلیل داشتن بتاگلوکان باعث افزایش سیستم ایمنی اختصاصی و IgM در این ماهی می‌شود. استفاده از سطوح پایین‌تر این پری بیوتیک توصیه شد(15). در طی یک مطالعه، سطوح 0، 0/5، 1 و 1/5% پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر *Saccharomyces cerevisiae* در جیره غذایی بچه ماهیان انگشت قد شیپ مورد آزمایش قرار گرفت. پس از 8 هفته تغذیه تاثیر این پری‌بیوتیک بر روی پارامترهای خونی و ایمنی بررسی شد. نتایج نشان داد که در تیمار 1/5٪ شاخص-های خونی و پارامترهای ایمنی بهبود یافته بودند(11). طی تحقیقی با استفاده از سطوح مختلف 2/4، ۰/۶، ۰/۰، 0/8 و1٪ مانان اولیگوساکارید (MOS) در جیره غذایی تیلاپیاهای جوان پرورشی مورد بررسی قرار گرفت که در نهایت فاکتورهای خونی را تغییر نداد(34). هم‌چنین طی 8 هفته، مطالعه بر روی بچه فیل ماهیان 95 گرمی تغذیه شده با دوزهای 1 و 3 ٪ محرک ایمنی ایمنواستر و ایمنووال حاوی (MOS و بتاگلوکان) به بررسی فاکتورهای خونی آن‌ها پرداخته و مشاهده شد که دوز 3٪ ایمنواستر و ایمنووال دوز مناسبی برای پرورش می-باشد(10). بچه ماهیان روهو *Labeo rohita* به مدت 8 هفته با جیره حاوی 0، 5، 7/5 و 10 درصد مخمر نانوایی آزمایش و نتایج نشان داد که مخمر استفاده شده در جیره غذایی ماهیان به عنوان یک شبیه ساز ایمنی به خوبی واکنش‌های ایمنی را پشتیبانی می‌کند(39). بنابراین هدف از انجام این مطالعه ایجاد یک ایمنی بالاتر، سطوح مناسب در شاخص‌های خونی و شرایطی مناسب در مراحل ابتدایی رشد ماهی قزل‌آلای رنگین-کمان و نیز تعیین سطح مؤثر پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر اضافه شده به جیره غذایی بچه ماهیان قزل‌آلا در روند ایمنی و سلامت آن‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به مدت 8 هفته در کارگاه تکثیر و پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان متعلق به شرکت شفق داروی پارسیان واقع در شهرستان صومعه‌سرا در تابستان 1391 صورت پذیرفت. برای انجام تحقیق، بچه ماهیان قزل-

آلای رنگین‌کمان پس از مدت 1 هفته سازگاری به شرایط کارگاهی، به تعداد 120 قطعه با میانگین وزنی 0/12±3/61 گرم و با تراکم 10 قطعه در هر یک از وان‌ها با حجم 100 لیتر آب رهاسازی شدند. تحقیق با 4 تیمار و 3 تکرار در هر تیمار، در 12 وان فایبرگلاس هر یک با 100 لیتر آب تازه انجام گردید. در مدت تحقیق به طور روزانه نسبت به برداشت فضولات و پس‌مانده‌های غذایی از هر یک از مخازن نگه‌داری اقدام می‌شد. در این بررسی، تیمارها شامل جیره غذایی حاوی 1٪، 1/5٪ و 2٪ پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر و تیمار شاهد(بدون افزودن پری‌بیوتیک به جیره) و هر یک در سه تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند. برای تهیه جیره‌های مورد نظر ابتدا غذا را با آسیاب به صورت پودر درآورده و بعد از محاسبه و اضافه نمودن پری-بیوتیک مورد نظر با دستگاه میکسر(همزن) براساس مقدار مصرف همراه با مقداری آب به صورت خمیر درآورده و بعد آن را از یک چرخ گوشت عبور داده تا به شکل رشته‌های شبیه به ماکارونی درآمد و در نهایت پلت‌ها را در آون (Binder, Germany) قرار داده تا در دمای 30 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت خشک شده و سپس از آن رشته‌ها، پلت‌هایی با قطر متناسب با دهان بچه ماهیان درآورده و در کیسه-های مناسب و غیر قابل نفوذ در دمای 15- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری و یک ساعت قبل از توزیع غذا در وان‌ها، از فریزر خارج و در دمای اتاق نگه‌داری شدند و پس از متعادل شدن درجه حرارت پلت‌ها، با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت 0/01 گرم (Shinko Radwag مدلWTB ساخت کشور ژاپن) توزین شده و با توجه به تیمارهای مورد نظر، غذادهی آن‌ها بر اساس مشاهدات و رفتارهای تغذیه‌ای بچه ماهیان قزل-آلای به میزان 5-3٪ وزن زنده آن‌ها روزانه در 3 نوبت (ساعات 8، 14، 20) در طول شبانه‌روز، در دفعات منظم بر اساس دمای آب، وزن ماهیان و بیوماس و زیست سنجی هر تکرار در هر 2 هفته یک‌بار و ساخت غذا به منظور جلوگیری از افت کیفیت آن هر ماه انجام گرفت. در حقیقت بچه ماهیان به مدت 8 هفته تغذیه شدند و عملیات محاسبه میزان و درصد غذا بر اساس اندازه‌گیری بیوماس به ترتیب در ابتدای دوره با 5% توده زنده در هر تیمار و در انتهای دوره با 3٪ توده زنده به طور کاملاً دستی انجام پذیرفت(30، 9، 6). پارامترهای کیفی آب نیز مانند اکسیژن محلول توسط اکسیژن متر WTW مدل 330i ساخت شرکت Weilheim آلمان با دقت 0/01، درجه حرارت توسط دماسنج دیجیتال 300 ساخت شرکت HM کره جنوبی به صورت روزانه اندازه‌گیری شدند. پس از اتمام طول دوره پرورش به منظور بررسی تاثیر پری‌بیوتیک استفاده شده در بهبود شاخص‌های خونی و ایمنی پس از 24 ساعت و اطمینان از تخلیه کامل محتویات شکمی ماهیان، از هر تیمار و تکرار، 3 عدد به صورت تصادفی انتخاب شده و خون‌گیری از ورید ساقه دمی با سرنگ 2 cc انجام گرفت. در هنگام فرآیند خون‌گیری از مواد بیهوش‌کننده به علت احتمال تاثیر بر شاخص‌های خونی استفاده نشد(40). نمونه‌ها جهت تعیین سطوح ایمنی، شاخص‌های خونی و تشخیص افتراقی گلبول‌های سفید بچه ماهیان به آزمایشگاه تشخیص طبی منتقل گردید. حجم خون برداشت شده به ازاء هر تکرار 1 cc که 0/5 سی سی در اپندورف‌های فاقد هپارین برای جداسازی سرم خون و 0/5 سی سی حاوی ماده ی هپارین ریخته شد(39). به منظور اندازه‌گیری ایمونوگلوبین از روش الایزا با دستگاه Awareness, USA مدل Stat Fax-2100 استفاده شد. مقدار ایمونوگلوبین کل با پروتئین به‌دست آمده از سرم خون که با پلی اتیلن گلیکول سانتریفوژ شده برحسب(mg/ml) به‌دست آمد (40، 22). روش مورد استفاده برای اندازه‌گیری

ایمونوگلوبین M روش Nephelometry می‌باشد. در این روش IgM موجود در سرم با آنتی بادی پلی‌کلونال موجود در محلول‌های تامپون تشکیل کمپلکس داده و باعث کدر شدن محلول می‌شود. شدت کدورت ایجاد شده با مقدار IgM رابطه مستقیم داشته و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Minineph (Binding site U)، در طول موج 340nm خوانده شد. در واقع نفلومتر نور تک رنگ موازی در طول موج‌های بین 400 تا 800 نانومتر به این محلول تابانده که پس از برخورد به کمپلکس آنتی بادی و آنتی ژن متفرق شده که میزان تفرق با مقدار IgM نسبت مستقیم دارد(45، 23، 7). برای اندازه‌گیری میزان فعالیت لیزوزیم از دستگاه Elisa Reader (Awareness, USA) مدل Stat Fax-2100 و به روش کدورت سنجی استفاده شد. نتایج از طریق تحلیل باکتری‌های گرم مثبت به‌دست آمد و بر حسب (mg/ ml^{-1}) محاسبه گردید (27). در پایان کلیه داده‌های خام به منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها در گروه‌ها و تکرارها جهت تشکیل تیمارها از آزمون Shapiro-Wilk و رسم نمودار هیستوگرام و جهت مقایسه میانگین گروه‌ها با یک‌دیگر از آزمون دانکن با سطح اطمینان 5% استفاده شد. کلیه تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه 17 و جهت رسم نمودارها از نرم افزار Excel 2003 استفاده شد.

نتایج

بر اساس اندازه‌گیری روزانه فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب میانگین درجه حرارت در طول دوره پرورش3/11 ± 17/75 درجه سانتی‌گراد، pH 0/41 ± 7/35، اکسیژن 1/2 ± 7/2 میلی‌گرم در لیتر و سختی آب 0/52 ± 282/5 میلی‌گرم در لیتر کربنات کلسیم بودند. با توجه به نتایج و آنالیزهای آماری در پایان تحقیق مشاهده گردید که از شاخص‌های مورد بررسی در تشخیص افتراقی گلبول‌های سفید خون بچه ماهیان، اختلاف معنی‌داری در میانگین تعداد گلبول‌های سفید و نوتروفیل وجود داشت($P<0/05$)(جدول1). در مقایسه دو به دو گروه‌ها با یک‌دیگر میزان گلبول‌های سفید خون بچه ماهیان در تیمار 3 (655/74±9500 mm^3) بیشتر از شاهد و سایر تیمارها، میانگین نوتروفیل خون بچه ماهیان در تیمار 3 (0/88 ± 39/33 درصد) از بیشترین میزان برخوردار بوده و تیمار 2 (1 /20 ± 30/33 درصد) نیز در جایگاه بعدی قرار دارد و به طور کلی میانگین نوتروفیل به ترتیب در تیمار 3 و 2 بیشتر از تیمار 1 و شاهد بود. در بررسی میزان لنفوسیت، مونوسیت و ائوزینوفیل از نظر آماری اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید($P>0/05$)(جدول 1). در این میان تیمار 2٪ از وضعیت بهتری در میزان لنفوسیت (3/84± 50/67 درصد)، مونوسیت (0/57± 4 درصد) و ائوزینوفیل با میزان (0/33± 1/33 درصد) نسبت به بقیه تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد برخوردار بوده است. بنابراین شاخص‌های افتراقی گلبول‌های سفید در تیمار 2٪ پری‌بیوتیک نسبت به تیمار شاهد و سایر تیمارهای آزمایشی بهبود یافته است. در بررسی سایر شاخص‌های خونی مورد مطالعه در تحقیق و با توجه به نتایج حاصله از آنالیزهای آماری در میانگین تعداد گلبول‌های قرمز بچه ماهیان، میزان هموگلوبین و میزان هماتوکریت اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید($P<0/05$). در مقایسه دو به دو گروه‌ها با یک‌دیگر میزان گلبول‌های قرمز خون بچه ماهیان در تیمار3 (39849/72± 800000 mm^3) و 2 (18036/99± 717000 mm^3) بیشتر از تیمار 1 و شاهد، هموگلوبین خون بچه ماهیان در تیمار2 (0/15± 6 gr/dl) و 3 (0/15± 6/5 gr/dl) و هماتوکریت خون بچه ماهیان در تیمار 1 (0/26± 4/77 درصد) و شاهد کمتر (0/2± 4/4 درصد) از تیمار 2 و 3 بوده است. اما در بررسی میزان حجم متوسط گلبولی خون بچه ماهیان (MCV)، میزان غلظت متوسط

هموگلوبین در گلبول قرمز(MCH) و میزان غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) اختلاف معنی دار مشاهده نگردید(P>0/05)(جدول 2). میزان (MCV) در تیمار 1/5٪ با (418/33± 5/04)، میزان (MCH) در تیمار1/5% (83/33 ± 0/33) و میزان (MCHC) در تیمار 1% (20/36 ± 0 /43) بیشتر از سایر گروه‌های تیماری بوده است.

جدول 1- مقایسه میانگین تعداد گلبول سفید، نوتروفیل، مونوسیت، لنفوسیت و ائوزینوفیل بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در پایان هشت هفته تغذیه با پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر

شاخص / تیمار	شاهد	1	2	3
گلبول سفید(میلی متر مکعب)	5250 ± 250[a]	5800 ± 208 /16 [a]	7533/33 ± 240/37[b]	9500 ± 655/74[c]
درصد نوتروفیل	20 ±1[a]	21 ± 0/57 [a]	30/33 ± 1/20[b]	39/33 ± 0/88[c]
درصد لنفوسیت	78 ± 1	73/33 ± 3/28	67 ± 1/15	50/67 ± 3/84
درصد مونوسیت	1/5 ± 0/5	1/66 ± 0/33	2/33 ±0/33	4 ± 0/57
درصد ائوزینوفیل	0/33 ± 0/33	0/66 ± 0/33	0/33 ± 0/33	1/33 ± 0/33

حروف لاتین غیر مشترک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در آزمون دانکن در سطح 5 درصد است

جدول 2- مقایسه میانگین تعداد گلبول قرمز، میزان هموگلوبین، میزان هماتوکریت، حجم متوسط گلبولی خون، غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در پایان هشت هفته تغذیه با پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر

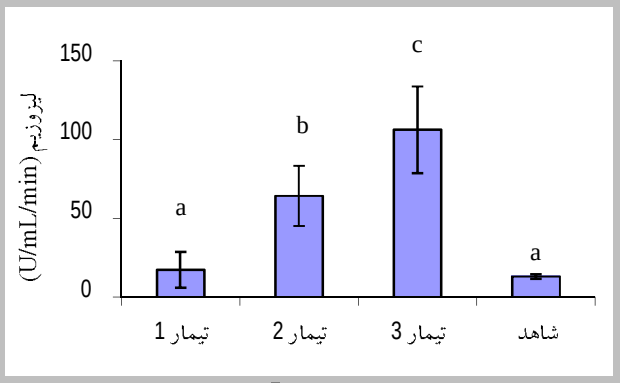
شاخص / تیمار	شاهد	1		3
گلبول قرمز(میلی متر مکعب)	541250 ± 45706/26[a]	586666/67 ±10837/18 [a]	717000 ±18036/99 [ab]	800000 ±39849/72 [b]
میانگین هموگلوبین(gr.dcl)	4/4 ±0/2[a]	4/77 ±0/26 [a]	6 ±0/15[b]	6/5 ±0/15[b]
درصد هماتوکریت	23/50 ± 0/5[a]	23/33 ±0/88 [a]	30 ±0/58 [b]	32/67 ±1/33 [b]
حجم متوسط گلبولی(فمتولیتر)	414/5 ± 1/5	397 ± 10/26	418/33± 5/04	408/33 ± 10/39
غلظت هموگلوبین در گلبول قرمز (pp)	82 ±1	80/66 ± 3/84	83/33 ± 0/33	81 ± 2/08
غلظت هموگلوبین درگلبول‌های قرمز (gr.dcl)	19 ± 1	20/36 ±0/43	19/96 ±0/20	19/9 ± 0/36

حروف لاتین غیر مشترک نشان دهنده اختلاف معنی دار آماری در آزمون دانکن در سطح 5 درصد است

در بررسی نتایج حاصل از تحلیل‌های آماری، بین تیمارها و گروه شاهد از نظر میزان لیزوزیم اختلاف معنی‌داری وجود دارد(نمودار 1)، به‌طوری‌که بیشترین میزان لیزوزیم در تیمار 2% با 15/82± 106 U/ml/min و کم‌ترین میزان در گروه شاهد با 1 ± 13 U/ml/min بوده است و به لحاظ آماری اختلاف معنی‌دار بین شاهد با تیمار 1/5٪ و 2٪ درصد مشاهده گردید (P<0/05).

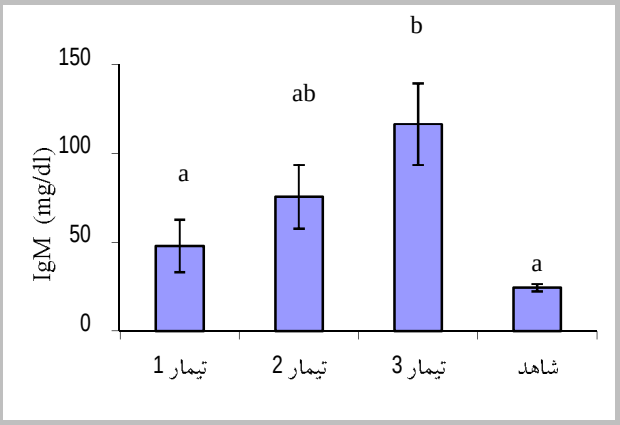
در بررسی ایمونوگلوبین M (IgM) اختلاف معنی داری بین تیمارها و گروه شاهد مشاهده گردید (نمودار 2). بیشترین میزان IgM در تیمار 2٪ با 19/06± 67/ 116 میلی‌گرم بر دسی‌لیتر و کم‌ترین میزان آن در تیمار شاهد با 24/5 میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بوده و به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین تیمار 3 با شاهد و سایر تیمارها مشاهده شد

بر اساس تحلیل‌های آماری در میزان ایمونوگلوبین کل(Ig) اختلاف معنی‌داری بین تیمارها و گروه شاهد وجود دارد(نمودار 3). بیشترین میزان Ig در تیمار 2٪ با 22/33 ±1/85 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و کم‌ترین میزان آن در تیمار شاهد با 16 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (P<0/05).



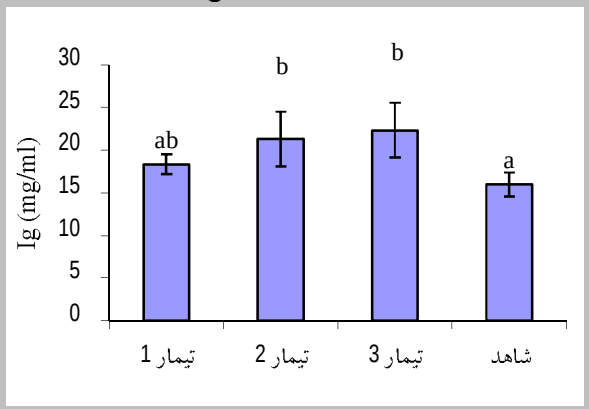
نمودار 1- مقایسه میانگین میزان لیزوزیم در بچه ماهیان قزل‌آلای تغذیه شده با پری بیوتیک دیواره سلولی مخمر

(حروف لاتین غیر مشترک نشان دهنده اختلاف معنی دار آماری در آزمون دانکن در سطح 5 درصد است)



نمودار 2- مقایسه میانگین میزان IgM در بچه ماهیان قزل‌آلای تغذیه شده با پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر

(حروف لاتین غیر مشترک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در آزمون دانکن در سطح 5 درصد است)



نمودار 3- مقایسه میانگین میزان Ig در بچه ماهیان قزل‌آلای تغذیه شده با پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر

(حروف لاتین غیر مشترک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در آزمون دانکن در سطح 5 درصد است)

بحث و نتیجه‌گیری

شناخت فاکتورهای خونی در شناخت بیماری‌ها و تعیین سلامت ماهی مفید است(14). در تحقیق حاضر اختلاف معنی‌داری را در تعداد کل گلبول‌های سفید مشاهده گردید که با افزایش مقدار دوز پری‌بیوتیک (2٪) این مقدار بیشتر شده و تیمار شاهد کم‌ترین تعداد گلبول سفید را دارا بوده و این خود بیان‌گر تحریک سیستم ایمنی و ارتقاء آن می‌باشد. تعداد گلبول‌های سفید و نسبت انواع آن‌ها یکی از شاخص‌های مهم سلامتی و وضعیت سیستم ایمنی در جانوران است (36). با توجه به نتایج به‌دست آمده از تحقیق اختلاف معنی‌داری در بین انواع گلبول‌های سفید (لنفوسیت، مونوسیت و ائوزینوفیل) در بین تیمارها در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نشد($P>0/05$). اما از نظر میانگین نوتروفیل در بین تیمارها افزایش معنی‌دار آماری نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید که خود می تواند نشان از تاثیر مثبت این دسته از گرانولوسیت‌ها در ایمنی غیر اختصاصی و پاسخ التهابی باشد و در واقع این یاخته‌ها نسبت به سایر گرانولوسیت‌ها بسیار بیگانه خوارترند و عمده‌ترین فعالیت نوتروفیل‌ها انجام عمل فاگوسیتوز فعال می‌باشد(12). در واقع تمام تیمارهای پری‌بیوتیکی، دارای تعداد بیشتری از نوتروفیل در مقایسه با شاهد می‌باشند که این مقدار در تیمار 2٪ بیشتر از سایر گروه-ها است. هم‌چنین مقدار لنفوسیت در شاهد بیشتر از تیمارهای دیگر است، این کم بودن یا ناشی از استرس-های مزمن است و یا به علت قدرت عوامل ایجاد کننده ایمنی غیر اختصاصی است(تا دیگر نیاز به تولید بیشتر لنفوسیت نباشد). قدرت بیگانه‌خواری ائوزینوفیل‌ها در مقایسه با یاخته‌های نوتروفیلی کمتر بود ولی نقش بسیار مهمی در از بین بردن انگل‌های بافتی دارند (12). میزان ائوزینوفیل‌ها در تیمار 3 (2٪) دارای بیشترین مقدار است. همان‌طور که از این نتایج مشاهده شد، تیمارهای تغذیه شده با این پری‌بیوتیک افزایش غیر معنی‌داری را در یاخته‌های سفید فاگوسیتوزکننده نسبت به تیمار شاهد داشتند که این خود باعث افزایش بیگانه‌خواری و تحریک سیستم ایمنی غیر اختصاصی در ماهیان شده است. پارامترهای خون‌شناسی به طور معنی‌داری تحت تأثیر فاکتورهای محیطی و بیولوژیک می‌باشند، لذا آگاهی از اثر فاکتورهای مذکور بر پارامترهای خون-شناسی در موقع تفسیر نتایج ضرورت دارد(25). تعداد گلبول‌های قرمز در تیمار 2٪ اختلاف معنی‌داری را با شاهد و تیمار 1 درصد داشت که نشان‌دهنده‌ی تأثیر پری‌بیوتیک در بهبود اکسیژن‌رسانی به بافت‌ها و فرآیند سوخت و ساز و انتقال Co_2 از بافت‌ها به بیرون بدن می‌باشد(12). از آن‌جایی که هموگلوبین پروتئینی است که 95 درصد گلبول قرمز را تشکیل می‌دهد، نتایج هموگلوبین با تعداد گلبول قرمز مطابقت دارد(44). هماتوکریت نیز تابعی از گلبول قرمز بوده و رابطه‌ی مستقیمی با آن دارد(38). میزان هماتوکریت در شاهد اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داده است که می‌توان نتیجه گرفت که مواد محرک ایمنی می-تواند اثر معنی‌داری بر شاخص‌های هماتولوژیک داشته باشند(38). شاخص‌های MCV، MCH، MCHC تغییرات معنی‌داری را در تیمارها از خود نشان ندادند($P>0/05$). شاخص میانگین حجم گلبول قرمز (MCV) در تیمارهای تغذیه شده با پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر در برخی موارد روند کاهشی نسبت به شاهد داشتند که کاهش حجم گلبول‌های قرمز نشان دهنده‌ی عدم وجود التهاب است که سبب تسهیل حرکت و تعلیق گلبول‌های قرمز شده و سرعت رسوب آن‌ها و تشکیل لخته‌های درون رگی را کاهش می‌دهد که یک ویژگی مثبت در فیزیولوژی دستگاه گردش خون محسوب می‌شود. اما همان گونه که از نتایج مشاهده شد، میزان هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH)

در تیمارهای حاوی پری‌بیوتیک افزایش یافته است که نشان دهنده‌ی اثر مثبت پری‌بیوتیک بر میزان هموگلوبین و قابلیت انتقال گازهای تنفسی توسط هموگلوبین است(38). طبق نتایج به‌دست آمده میزان لنفوسیت‌ها اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشته و ایمونوگلوبین (Ig) و ایمونوگلوبینM (IgM) بین تیمارها و شاهد اختلاف معنی‌داری داشته است (P<0/05). در واقع تاثیر بتاگلوکان استخراج شده از دیواره سلولی مخمر باعث افزایش فعالیت ایمنی در تیمارهای تغذیه شده با این پری‌بیوتیک شده است. طی مطالعه‌ای تأثیر دیواره سلولی مخمر را بر روی فاکتورهای خونی قزل‌آلای رنگین‌کمان در یک دوره-ی 30 روزه بررسی گردید و مشاهده شد که نوتروفیل، لنفوسیت، مونوسیت، میزان لیزوزیم، Ig، تعداد گلبول-های سفید، تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین در تیمارهای حاوی دیواره سلولی مخمر آبجو در جیره، اختلاف معنی‌داری با جیره ی شاهد نداشتند که با نتایج تحقیق حاضر به‌جز تعداد گلبول-های سفید و میانگین نوتروفیل مطابقت دارد(41). این اختلاف مربوط به تفاوت در نوع گونه، جیره مصرفی، طول دوره و تأثیر فاکتورهای محیطی بر پارامترهای خون شناسی می‌باشد(25). تأثیر مخمر *S. cerevisiae* در سطوح 5، 7/5 و 10 درصد بر روی فاکتورهای خونی کپور ماهی هندی روهو *Labeo rohita* بررسی و مشخص شد که در تعداد گلبول‌های سفید و قرمز اختلاف معنی‌داری در تیمارهای آزمایشی با گروه شاهد وجود دارد (39). در تحقیقی اثرات سطوح 100، 250، 500 میلی‌گرم در کیلوگرم بتاگلوکان را بر سیستم ایمنی، رشد و بقای بچه ماهیان انگشت قد روهو *Labeo rohita* مورد مطالعه قرار گرفت و ثابت شد که 3 بار تزریق، 1 میلی‌گرم در وزن بدن، بتاگلوکان باعث ارتقاء سیستم ایمنی و افزایش مقاومت در باکتری‌های آئوروموناس هیدروفیلا و ادواردزیلاتاردا می‌شود(28). هم‌چنین اضافه کردن MOS به جیره‌های غذایی تأثیرات متفاوتی بر روی ماهیان مختلف گذاشت(32). در گربه ماهی کانال فاکتورهای ایمنی و هماتولوژی و مقاومت در برابر *Edwardsiella ictaluri* اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشتند(44، 29). ولی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان فعالیت لیزوزیم و آنتی بادی افزایش معنی‌داری یافت (37). میزان فعالیت لیزوزیم سرم به عنوان یک معرف با اهمیت ایمنی غیر اختصاصی در ماهی می‌باشد(31). افزایش آن پس از مصرف مواد محرک ایمنی مانند گلوکان‌ها و تحریک آنتی‌ژنی افزایش می‌یابد(8). میزان فعالیت لیزوزیم در تیمار3 (2٪) پری‌بیوتیک افزایش معنی‌داری را نسبت به شاهد داشته که می‌توان علت آن‌را این طور تفسیر نمود که منشاء بیشترین مقدار تولیدی لیزوزیم از نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها می‌باشد، حال همان طور که نتایج پیداست بیشترین مقدار این یاخته‌های بیگانه‌خوار در تیمار 2٪ هستند و هم‌چنین بتاگلوکان و مانان اولیگوساکارید طبق گزارشاتی بر فعالیت لیزوزیم تأثیرگذار می‌باشند (32، 16). در تحقیق دیگری تاثیر مخمر*S.cerevisiae* و بتاگلوکان را بر روی فاکتورهای ایمنی تیلاپیاهای 100-800 گرمی به مدت 21 روز مورد بررسی قرار دادند و مشاهده نمودند که اختلاف معنی‌داری در میزان لیزوزیم سرم خون وجود ندارد(P>0/05)(18، 17). طی تحقیقی بر روی بچه ماهیان انگشت قد کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر، شاخص‌های خونی و ایمنی نظیر لیزوزیم، Ig و IgM بررسی گردید و نتایج نشان داد که افزایش این پری‌بیوتیک در سطح 3٪ جیره غذایی می‌تواند باعث افزایش سطوح ایمنی در بچه ماهیان کپور معمولی گردد و نیز در تیمارها به جز میانگین ائوزینوفیل اختلاف معنی‌داری با شاهد مشاهده

شد(P<0/05)(13). طی مطالعه 8 هفته‌ای بر روی بچه ماهیان شیپ تغذیه شده با دیواره سلولی مخمر مشاهده شد، که در شاخص‌های خونی و ایمنی به‌جز میانگین گلبول‌های سفید و قرمز شاخص‌هایی نظیر میانگین هموگلوبین و هماتوکریت، حجم متوسط گلبولی، میانگین هموگلوبین گلبول قرمز، غلظت هموگلوبین سلولی، شاخص‌های افتراقی گلبول سفید و فاکتورهای ایمنی نظیر لیزوزیم، Ig و IgM اختلاف معنی‌دار آماری بین گروه‌های تیماری با شاهد وجود نداشت که در برخی شاخص‌ها با نتایج تحقیق مطابقت دارد و این مسئله حاکی از آن است که افزایش میزان پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر در جیره غذایی می‌تواند باعث افزایش سطوح ایمنی گردد(11). طی بررسی 4 هفته‌ای خوراکی 1، 5 و 10 gr/kg مخمر آبجو در ماهی سیم دریایی(*Sparus aurata*)100 تا 200 گرمی، میزان IgM خون بالا رفت. نتیجه این که مخمر به دلیل دارا بودن بتاگلوکان، باعث افزایش سیستم ایمنی اختصاصی در این ماهی شده است(14). البته باید در نظر داشت که مقدار IgM با توجه به اندازه، سن ماهی، شرایط محیطی یا وجود بیماری تغییر می کند(26). هم‌چنین در تحقیقی تأثیر مخمر آبجو در سطوح 0، 1 و 2 درصد جیره بر روی بچه فیل ماهیان به مدت 60 روز بر روی فاکتورهای خونی مورد بررسی قرار گرفته شد و مشخص گردید که در میزان هموگلوبین، هماتوکریت، MCH ، MCV ، MCHC و تشخیص افتراقی گلبول-های سفید، گلوکز و پروتئین کل هیچ اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارها و گروه شاهد مشاهده نشده است که برخی از آن‌ها با یافته‌های این تحقیق مطابقت دارد(21). با افزودن سطوح 2، 4 و 6 گرم در کیلوگرم MOS در جیره غذایی ماهی باس دریایی(*D. labrax*) با میانگین وزنی 60 گرم طی مدت 8 هفته گزارش کردند که فعالیت بیگانه‌خواری در گروه‌های تغذیه شده با MOS افزایشی نسبت به گروه شاهد داشت(40). این افزایش می‌تواند به دلیل حضور گیرنده‌های مانوز باشد. گیرنده‌ی مانوز یک گیرنده‌ی داخل سلولی ماکروفاژها و سلول‌های اندوتلیال بوده که لیگاندهای حاوی مانوز با سایر گیرنده‌ها متصل شده و سبب فعال شدن گلبول‌های سفید و تولید سیتوکین‌های ضد التهابی می‌شوند(24). نتایج حاصل از تحقیق نشان می‌دهد که افزایش پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر در سطح 2% جیره غذایی بچه ماهیان انگشت قد قزل‌آلای رنگین-کمان می‌تواند باعث بالا رفتن شاخص‌های ایمنی نظیر لیزوزیم، Ig و IgM و تاثیر مثبت بر شاخص‌های افتراقی گلبول‌های سفید و بهبود شاخص‌های خونی گردد که خود سیستم ایمنی این ماهیان را تحریک می‌کند. در مجموع اختلافات موجود در نتایج این تحقیق را با یافته‌های دیگر محققان را می‌توان به عوامل محیطی خصوصاً به علت خونسرد بودن ماهی نظیر (فصول، سال، شوری، دوره نوری، درجه حرارت، تراکم)، عوامل فیزیولوژیکی(گونه آبزی، سیکل تولید مثلی و وضعیت بلوغ، سن، جنس و شرایط تغذیه‌ای) و ژنتیکی، زمان نمونه‌گیری، فرمولاسیون جیره‌های غذایی، نوع پری‌بیوتیک، درجه خلوص آن و میزان استفاده از آن در جیره، روش‌های مختلف اضافه کردن به جیره، دقت و حساسیت روش‌های اندازه‌گیری، ربط داد. این عوامل خود می‌تواند بر فعالیت شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی و ایمنی تأثیر گذاشته و باعث اختلاف در تفسیر نتایج محققین شوند(42، 2). بنابراین هر چند در برخی از پارامترها اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد، اما مشاهدات نشان می‌دهد که کاربرد پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر در جیره غذایی بچه ماهیان انگشت قد قزل‌آلای رنگین‌کمان تاثیر مثبت بر شاخص‌های خونی به‌خصوص گلبول‌های سفید خون و شاخص‌های ایمنی بچه ماهیان گذاشته که با توجه به

روند افزایشی پارامترهای بررسی شده در تیمار 3 تحقیق می‌توان دوز دیواره سلولی مخمر در جیره غذایی بچه ماهیان انگشت قد قزل‌آلای رنگین‌کمان را 2% پیشنهاد نمود و با توجه به بهبود قابل ملاحظه این شاخص‌ها می توان استفاده از این ترکیب را از نظر اقتصادی توجیه نمود. هم‌چنین می‌توان در تحقیقات دیگر بررسی تاثیرات این پری‌بیوتیک و پری‌بیوتیک‌های دیگر، استخراج و خالص سازی گلوکان و مانان اولیگوساکارید از سایر مواد طبیعی، کاربرد آن‌ها در پرورش سایر آبزیان و تاثیرات پری‌بیوتیک‌ها را بر روی دوران مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و یا سایر ماهیان اقتصادی پیشنهاد نمود.

منابع

1-اکرمی، ر.، قلیچی، ا.، منوچهری ، ح. 1386. تأثیر اینولین به عنوان پربیوتیک بر عملکرد رشد و زنده مانی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علوم و فنون دریایی، صفحات 1 تا 9.

2-اکرمی، ر.، قلیچی، ا.، قوایی، ا. 1389. کاربرد پربیوتیک‌ها در آبزی‌پروری. مجله شیلات. شماره(1). 9 صفحه.

3-افشار، م. 1381. راهنمای عملی تغذیه و نهاده‌های غذایی و دارویی آبزیان در ایران. انتشارات نوربخش. صفحات10 تا 17.

4-پورامینی، م.، حسینی‌فر، ح. 1386. کاربرد پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری. انتشارات موج سبز. 104 صفحه.

5-پورامینی، م. 1387. بررسی اثر تغذیه با مخمر ساکارومایسس سروزیا بر رشد و بازماندگی لارو ماهی قزل‌آلای رنگی‌کمان. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. 101 صفحه.

6-پور علی، ح.ر.، محسنی، م.، آق تومان، و.، توکلیف ،م. 1382. پرورش بچه ماهیان با درصدهای مختلف غذای کنسانتر فرموله شده. مجله علمی شیلات ایران. ویژه نامه اولین سمپوزیوم ملی ماهیان خاویاری. صفحات 37 تا 48 .

7-سقا ، ح. ر. سروش نیا، م. 1382. تجهیزات و فرآورده‌های آزمایشگاهی. انتشارات کتاب میر. 268 صفحه.

8-سلطانی، م. 1387. ایمنی‌شناسی ماهیان و سخت پوستان. انتشارات دانشگاه تهران. 264 صفحه.

9-سوداگر، م.، آذری تاکامی، ق.، پانوماریف، س.، محمدزاده، ه.، عابدیان، ع.، حسینی، ع. 1384. بررسی سطوح مختلف بتائین و متیونین به‌عنوان جاذب بر شاخص‌های رشد و بازماندگی فیل ماهیان جوان و مجله علمی شیلات ایران. شماره 2، صفحات 41 تا 49.

10-طاعتی، ر. 1389. مطالعه مقایسه‌ایی محرک‌های ایمنی Immunoster و Immunowall بر شاخص‌های خونی، شیمیایی و رشد بچه فیل ماهیان پرورشی. رساله دکتری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران. 126 صفحه.

11- عاشورپور، ع.، 1390. تاثیر پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر(*Saccharomyces cerevisiae*) بر شاخص‌های رشد ، فاکتورهای خونی و فراوانی باکتری‌های اسید لاکتیک روده ی ماهیان انگشت قد شیپ(*Acipenser nudiventris*). پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد لاهیجان. 100 صفحه.

12-کاظمی، ر.، ا.، پوردهقانی، م.، یوسفی، ا.، یارمحمدی، م.، نصری تجن، م. 1389. فیزیولوژی دستگاه گردش خون آبزیان و فنون کاربردی خون‌شناسی ماهیان. انتشارات بازرگان. 194 صفحه.

13-میزانی، ف.، 1390. تعیین اثرات پری‌بیوتیکی دیواره سلولی مخمر بر شاخص‌های رشد، فاکتورهای خونی و

تشکر و قدردانی

از همکاری آقایان دکتر علیرضا شناور ماسوله، دکتر جوادی و مهندس جلیل پور قدردانی می نمائیم. از شرکت شفق داروی پارسیان بابت در اختیار گذاشتن فضای کارگاهی و پری‌بیوتیک مصرفی نیز سپاسگزاری می نمائیم.

فلور میکروبی روده ماهیان انگشت قد کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد لاهیجان. 90 صفحه.

14. Bahmani, M., Kazemi, R., Donskaya, P. (2001). Acomparative study of in young reared sturgeons (*Acipenser persicus* and *Huso huso*). Fish Physiology and Biochemistry, 24; 135-140.

15. Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A. (2004). Total serum immunologlobulin M levels are affected by immunomodulators in sea bream (*Sparus auratea*). Veterinary Immunology and Immunopathology, 101; 203-210.

16. Dalmo, A.R., Bogwald, J. (2008). β-glucans as conductors of immune symphonies. Fish and Sellfish Immunology, 25; 384-396.

17. David, J.A., Jenkiss, Cyrill, W.C., Vladimir, V. (1999). Inuline oligofructose and intestinal function. J. Nutr, 129; 1431-1433.

18. EL-Boshy, M.E., El-Ashramb, A.M., Abdel hamid, F.M., Gadalla, H.A. (2010). Immunomodulatory effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae* , β-Glucan and laminaran in mercuric chloride treated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish & Sell fish Immunology, 28; 802-808.

19. Gang, L., Huang, G.L. (2008). Extraction of two active polysaccharides from the Yeast cell wall. Z. Naturforsch, 63c; 919-921.

20. Gibson, G.R. (1998). Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics. British Journal of Nutrition, 80(2); S209-S212.

21. Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A.R., Mojazi Amiri, B., Khoshbavar, H.A., Pooramini, M., Bastami, D. (2011). The probiotic effect of dietary inactive yeast *Saccharomyces cerevisiae var ellipsoideus* on growth factors, survival, body composition and intestinal microbiota of Beluga juvenile (*Huso huso*). K-Iranian Scientific Fisheries Journal, 19(4); 55-66.

22. Huang, S.S.O., Lutes,P.B., Storebakken, T. (1989). Growth and feed efficiency of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) sub0 yearling at different feeding f\rates. Aquacultuer, 80; 147-153.

23. Khoshbavar- Rostami, H.A., Soltani, M. Kazemi, B., Hassan, M.D. (2003). Immune responses of great sturgeon (*Huso huso*) to *Aeromonas hydrophial bacterin*. Journal of Fish Biology, 70; 931-938.

24. Linehan, S.A., Martinez-Pomares, L., Gordon, S. (2000). Macrophage lectins in host defence. Microbes and Infection, 2; 279-288.

25. Luskova, V. (1998). Factors affecting hematological indices in free-living fish populations. Acta Vet, 67; 249-255.

26. Magnadottir, B., Jonsdottir, H., helgason, S., Bjornsson, B., T.O. Jorgensen, T.O., pilstrom, L. (1999). Humoral immune parameters of Atlantic cod (*Gadus morhue*). Vomparative Biochemistry and physiology, 122B; 173-188.

27. Malin, M., Suomalainen, H., Saxelin, M., Isolauri. E. (1996). Promotion of IgA immune response in patients with Crohns disease by oral bacteriotherapy with lactobacillus GC. Annual nutrition and metabolism, 40; 137-45.

28. Merrifield, D.L., Bradley, G., Baker, R.T.M., Dimitroglou, A., Davies, S.J. (2009). Probiotic applications for Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. Aqua. Nutr., Doi, 10.1111/j.1365-2095. 2009.00689.x.Accepted.

29. Misra, CK., Das, BK., Mukherjee, SC., Pattnaik, P. (2006). Effect of long term administration of dietary β-Glucan on immunity. Growth and survival of *Labeo rohita* fingerling. Aquacultuer, 255; 82-84.

30. Mohseni, M., Pourkazemi, M., Bahmani, M., Falahatkar, B., Pourali, H.R., Salehpour, M. (2006). Effects of feeing rate and frequency on growth performance of yearling great sturgeon, *Huso huso*. Journal of Applied Ichthyology, 22; 278-282.

31. Peter, H., Sneath, A. (1986). Bergeys manual of systematic. Bacteriology, 2; 1104-1154.

32. Ringo, E., Olsen, R.E., Gifstad, T.O., Dalmo, R.A., Amlund, H., Hemre, G.I., Bake, A.M. (2010). Prebiotics in aquaculture Nutrition, 16; 117-136.

33. Roberts, R.J., Shepherd. C.J. (1997). Handbook of trout and Salmon diseases. Fishing News Books.

34. Sado, R.Y., Almeida Bicudo, A.J.D., Cyriono, J.E.P. (2008). Feeding dietary mannan oligosaccharides to juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus*, has no effect hematological parameters and showed decreased feed consumption. Journal of World Aquaculture Society, 39(60); 821-826.

35. Sedwick, S.D. (1990). Trout farming handbook, Fifth edition, Fishing News Book.

36. Shalaby, A.M., Khattab, Y.A., Abdel Rahman, A.M. (2006). Effects of Garlic (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis mosambicus*). J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis, 12; 172-201.

37. Staykov, Y., Spring, P., Denev, S., Sweetman, J. (2007). Effect of a manna oligosaccharide on growth performance and immunestatus of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. Int., 15; 153-161.

38. Tangestani, R., Alizadeh Doughikollaee, E., Ebrahimi, E., Zare, P. (2011). Effects of Garlic essential oils an Immunostimulant on

Hematological indices of juvenile beluga (*Huso huso*). Journal of Veterinary Research, 66(3); 209-216.

39. Tewary. A., Patra, B.C. (2011). Oral administration of baker,s yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) acts as a growth prometer and immunodulator in *Labeo rohita* (Ham). J. Aqua. Res. Development, 2; 109.7 p.doi:10.4172/2155-9546.1000109.

40. Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M.J., Montero, D., Gines, R., Sweetman, J., Izquierdo, M.S. (2010). Improved feed utilization, intestinal micus production and Immune parameters in sea bass (*Dicentrachus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). Aquaculture Nutrition, (In press).

41. Tukmechi, A., Rahmati, H.R., Manaffar, R., Sheikhzadeh, N. (2011). Dietary administration of beta-mercapto-ethanol treated *Saccharomyces cerevisiae* enhanced the growth, innate immune response and disease. Fish & Shellfish Immunology, 30; 923- 928.

42. Verdegem, M.C.J., Hilbrands, A.D., Boon, J.H. (1997). Influence of salinity and dietary composition on blood parameter values of hybrid red tilapia (*Oreochromis niloticus*) & (*Oreochromis mosambicus)*. Aquaculture. Res, 28; 453-459.

43. Vulevic, J., Rastall, R.A., Gibson, G.R. (2004). Developing aquantitative approach for determining the in Vitro prebiotic potential of dietary oligosaccharides. FENS Microbiology letters, 236; 153-159.

44. Welker, T., Lim, C., Yildirim- Aksoy, M., Sheby, R., Klesius, P.G. (2007). Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri* challenge in channel catfish, *Ictalutus punctatus*, fed diets containing commercial whole - cell yeast or subcomponets. Journal of the World Aquaculture Society, 38(1); 24-35.

45. Zilva , JF., Pannall, PR. (1984). Clinical chemistry in diagnosis and treatment. Publ. Lioyd-Luke (medical Books) Ltd. London PP348-35.

.