فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۳۲، جلد ۹، شماره ۱، زمستان۹۴، صفحه ۲۷ تا ۳۷

تاثیر ویتامین ریبوفلاوین(B2) بر رشد و شاخص های ایمنی بچه ماهی شیپ *(Acipenser nudiventris)*

علیرضا عاشوری[۱]، میرحامدسیدحسنی[۲]، اسماعیل حسین نیا [۱]

۱- کارشناس ارشد شیلات، ایستگاه تحقیقات تاسماهیان دریای خزر چابکسر، گیلان. ایران. **Alireza.ashouri52@gmail.com**

۲-کارشناس ارشد شیلات، موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، بخش آبزی پروری، گیلان،رشت. ایران.

تاریخ دریافت: ۹٤/۱۰/٤ تاریخ پذیرش:۹٤/۱۲/۵

چکیده

مقدمه و هدف: در این مطالعه تاثیر سطوح مختلف ویتامین ریبوفلاوین بر شاخص های رشد، هماتولوژی و ایمنی بچه ماهی شیپ مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: تعداد۱۲۰ عدد بچه ماهی شیپ با وزن ابتدایی(۱/۲۸±۳۰/٦ گرم) با ٤ جیره غذایی(پروتئین: ٤۹ درصد، چربی: ١٤ درصد و انرژی:۲۱/۱ مگاژول در هر کیلوگرم) با الحاق ریبوفلاوین در سطوح ۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی گرم/ کیلوگرم(RB_0 ، RB_{15}، RB_{20} و RB_{25}) به مدت ۸ هفته تا حد سیری مورد تغذیه قرارگرفتند. بیومتری در فواصل ۱۵ روز انجام گرفت. در پایان دوره تغذیه از ماهیان نمونه خون گرفته و جهت سنجش شاخص های ایمنی به آزمایشگاه ارسال شد.

یافته ها: الحاق ریبوفلاوین به جیره موجب افزایش معنی دار وزن نهایی در مقایسه با تیمار شاهد گردید(p ۰/۰۵). درصد افزایش وزن و ضریب رشد ویژه در ماهیان تغذیه شده با جیره ۲۰ میلی گرم ریبوفلاوین در کیلوگرم(RB_{20}) به طور معنی داری بیش ازماهیان تیمار شاهد و ماهیان این گروه آزمایشی بیشترین نسبت بازده پروتئین و کمترین ضریب تبدیل غذا را دارا بودند(p ۰/۰۵). هم چنین نتایج بیان گر این نکته می باشند که ریبوفلاوین اضافه شده به جیره بر سیستم ایمنی ماهیان تاثیرگذاراست، به نحوی که تعداد گلبول سفید و فعالیت کامپلایمنت CH_{50} در ماهیان تغذیه شده از جیره الحاقی ریبوفلاوین به میزان۲۰ میلی گرم در کیلوگرم(RB_{20}) به طور معنی داری بر ماهیان تیمارشاهد برتری دارد(p ۰/۰۵).

نتیجه گیری: نتایج این آزمایش نشان می دهد که افزودن ریبوفلاوین به جیره فرموله شده تاسماهی شیپ اثرات سودمندی بر شاخص های رشد و سیستم ایمنی این گونه دارد.

واژه های کلیدی: تاسماهی شیپ، ریبوفلاوین، شاخص های رشد، ضریب تبدیل غذا، سیستم ایمنی.

مقدمه

صنعت پرورش ماهیان خاویاری در کشور ما صنعتی جوان، اما به سرعت در حال توسعه است، تا قبل از سال ۱۳۸۸ پرورش تاسماهیان در مقیاس تجاری صورت نمی-گرفت. در این سال تنها۲۰ تن گوشت تولید گردید، اما با افزایش صدور پروانه های بهره‌برداری و استقبال عمومی، میزان تولید گوشت و خاویار به ترتیب از سال ۹۱ به ۹۲ از۴۵۶ به۶۰۰ تن و از۴۰۰ به ۱۲۰۰ کیلوگرم افزایش یافت، درحال‌حاضر تعداد ۴۵ مزرعه پرورش ماهیان خاویاری در کشور مشغول به کار بوده و قادر به تولید ۳۴۷۸ تن گوشت و بیش از ۱۵ تن خاویار می باشند. گونه عمده پرورشی در این مزارع عمدتاً فیلماهی، تاسماهی سیبری و در کنار آن ها تاسماهی شیپ است(۱). یکی از اهداف تولیدکنندگان ماهیان پرورشی جهت رسیدن به صرفه اقتصادی، کاهش مرگ و میر و تلفات بچه ماهیان، بالا بردن سرعت رشد و تولید بیشتر در واحد سطح است(۲۵)، که رشد بهینه ارتباط نزدیکی به نوع غذا و کیفیت مواد غذایی مورد استفاده آن دارد(۱۸). متاسفانه در پرورش ماهیان سردابی و ماهیان خاویاری، بیشترین توجه بر مواد کلان غذایی (ماکرونوترینت ها) متمرکز و توجهی به عناصر خرد

غذایی نظیر ویتامین ها نگردیده و تصور بر این است که وجود آن ها در غذا اضافه و به طور طبیعی از مواد خام به کار رفته در غذا تامین می گردد(۷،۱۹)، اما وجود ویتامین‌ها به میزان کافی در پرورش متراکم ضروری بوده و در تراکم های بالای پرورش که مواد غذایی طبیعی فقط برای حفظ حیات جمعیت کفایت می کنند و یا به طور کل موجود نمی باشد، افزودن ویتامین به جیره از اهمیت خاصی برخورداراست(۱۵،۴۳)، اما مدارک مستندی در دست است که سطوح میکرونوترینت ها در مواد خام به کار رفته در جیره غذایی(آرد ماهی، آرد گوشت و کنجاله های گیاهی) متغیر و از اندازه ماهی، سن، روند رشد و سلامتی، فاکتورهای محیطی و فعل و انفعالات غذایی تاثیر می پذیرد(۱۱،۳۱). از سوی دیگر چند سالی است که به منظور کاهش هزینه غذا، از جیره-های پرانرژی(حاوی ۲۵ تا ۲۸ درصد لیپید) در تغذیه ماهیان سردابی(۱۴) و ماهیان خاویاری(۳۴) استفاده می-شود، بنابراین، با اعمال تغییرات عمده در جیره غذایی ماهیان خاویاری در سالیان اخیر(معرفی غذاهای پرانرژی) ضرورت تعیین نیازمندی ویتامین ها و تاثیر الحاق آن ها بر روند رشد و شاخص های فیزیولوژیک این ماهیان را پیش از پیش گوش زد می نماید. ریبوفلاوین مولکولی با رنگدانه زرد است که به عنوان بخشی از گروه آنزیمی به نام فلاوپروتئین ها عمل می کند. فلاوین مونو نوکلئوتید(FMN) و فلاوین آدنین دی نوکلئوتید(FAD) دو کوآنزیم مهم از ریبوفلاوین ها هستند که در واکنش-های اکسیداسیون – احیای موثر در آزادسازی انرژی از سلول(۳)، تجزیه پیروات، اسیدهای چرب و آمینواسیدها و در فرآیند انتقال الکترون ها شرکت داشته(۵۲) و به تبع آن نقش مهمی در متابولیسم اسیدهای‌چرب، کربوهیدرات و پروتئین دارند(۱۰). عارضه های کمبود ریبوفلاوین در ماهیان شامل کم خونی و رشد ضعیف است(۳۱). از دیگر عوارض کمبود ریبوفلاوین در گونه های مختلف ماهیان می توان به بیماری های چشمی، رنگ غیرعادی پوست، کم‌خونی، کوتاه شدن سرپوش آبششی و خوردگی باله(۱۶)، تجمع چربی و دژنره شدن لوزالمعده با رسوب ملانین در سیم دریایی(*Sparus Aurata*)(۳۶) اشاره نمود، در صورتی که در ماهی کپور معمولی این عوارض شامل خون ریزی در لوزالمعده می-باشد(۵). هم چنین گزارشاتی در دست است که به دلیل خاصیت انرژی‌زایی ریبوفلاوین، الحاق این ویتامین به جیره غذایی کپور معمولی(۵)(۴۱)، گربه ماهی کانال(۴۵) و ماهی باس طلایی(۱۰) موجب بهبود شاخص‌های رشد، کارایی غذا و نسبت بازده پروتئین در این ماهیان شده است. علاوه بر نقش کوآنزیمی ویتامین ریبوفلاوین، مطالعات انجام شده در آزاد ماهی اقیانوسی(*Salmo salar* L) بر این نکته دلالت داشت که با کاهش غلظت ویتامین های گروهB کارکرد سیستم ایمنی در این گونه به شدت به خطر می افتد(۲۴،۴۹). بنابراین از آن جایی که درصد تلفات ماهی شیپ تغذیه شده با جیره تجاری متداول در مقایسه با سایرگونه های پرورش داخل کشور(تاسماهی سیبری و فیلماهی) بالاتر بوده و پرورش‌دهندگان از این گونه جهت پرورش کمتر استقبال می کنند، این آزمایش به منظور بررسی تاثیر افزودن مکمل ریبوفلاوین(۰، ۱۵ ،۲۰ و۲۵ میلی گرم/ کیلوگرم) بر شاخص های رشد و سیستم ایمنی این گونه در یک دوره ۸ هفته‌ای به مرحله اجرا درآمد.

مواد و روش ها

تهیه ریبوفلاوین و اجزای اولیه غذایی

ریبوفلاوین از شرکت پدیده کالای باستان تهران(هرکیلوگرم رومیت حاوی۴۰۰۰ میلی گرم ریبوفلاوین)، پودرماهی، پودر گوشت و روغن ماهی از شرکت پودرماهی خزر– کیاشهر، پرمیکس ویتامینی و پرمیکس معدنی از شرکت سیانس– قزوین، لستین سویا

از شرکت ارس بازار و نشاسته گندم و ذرت از قنادی های محلی خریداری شد.

فرمولاسیون و ساخت غذا

براساس انرژی آزاد شده از اجزای اولیه غذایی(پروتئین: ۵/۶۵، چربی: ۹/۵ و کربوهیدرات:۴/۱ کیلوکالری برگرم) و با استفاده از برنامه ریزی خطی در محیط Excel، ۴ جیره غذایی با سطوح پروتئین و انرژی یکسان(۴۹ درصد پروتئین و ۱۸/۵ مگاژول انرژی درکیلوگرم) ساخته شد، پودرماهی، پودر گوشت و پودرخون به عنوان منبع پروتئین، روغن ماهی و روغن ذرت به عنوان منبع چربی و نشاسته ذرت و گندم به عنوان منبع کربوهیدرات به کار رفت(۵۱). پرمیکس ویتامینی دارای مقادیر ناچیزی ریبوفلاوین به عنوان منبع تامین کننده ویتامین و پرمیکس معدنی تامین کننده نیازهای معدنی ماهی بود. جهت ساخت غذا ابتدا اجزای درشت(پودرماهی، پودرگوشت، پودرخون، نشاسته ذرت و گندم) در دستگاه آسیاب (Damicar Co., Tehran, Iran)، آسیاب و سپس با اجزای تر(شامل روغن ماهی و روغن گیاهی) مخلوط و به خوبی میکس شدند(۲۲). سپس اجزای خرد غذا(پرمیکس ویتامینی و معدنی، لستین سویا و سلولز) با یک همزن برقی مخلوط (Pooya Nootash Machenery Co, Mashhad) و به مخلوط قبلی اضافه و آسیاب گردید. سپس ریبوفلاوین درمقادیر مورد نظر(۰، ۱۵،۲۰ و ۲۵ میلی گرم در کیلوگرم) براساس تحقیقات انجام شده در مورد تعیین حد بهینه ویتامینB_2(۵) در یک لیتر آب مقطر محلول و به مخلوط قبلی اضافه و به خوبی با یک همزن مکانیکی هم زده و سپس با استفاده از دستگاه پلت زن (California Pellet Mill Co Sanfranciso,CA) با توجه به اندازه دهان ماهی به قطر۲میلی‌متر تبدیل شد. یک ساعت پیش از توزیع غذا در وانها جیره‌های ساخته شده از فریزر خارج و در دمای اتاق نگهداری و به ماهیان داده شد.

تهیه بچه ماهیان و شرایط پرورش

تعداد ۱۴۰ عدد ماهی شیپ با وزن اولیه۲ ±۲۵ گرم از موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر به سایت چابکسر انتقال و در وان های فایبرگلاس ذخیره و به منظور سازگاری با شرایط جدید با جیره بیومار فرانسه به مدت۲ هفته تغذیه شدند. پس از طی این دوره تعداد۱۲۰عدد ماهی با متوسط وزن ۱/۲۸± ۳۰/۶ گرم انتخاب و به صورت تصادفی بدون دارا بودن اختلاف معنی دار آماری در شاخص وزن در ۱۲ وان فایبرگلاس دوتنی آبگیری شده با مخلوطی از آب چاه و رودخانه، مجهز به سیستم هوادهی و ریتم فتوپریود ۱۲ساعت روشنایی و تاریکی رهاسازی(P ۰/۰۵) و به مدت ۸ هفته روزانه به میزان ۳ تا ۵ درصد وزن بدن(تا حدسیری) در سه نوبت(ساعات ۸ ،۱۶ و۲۱) با جیره غذایی(ارائه شده در جدول ۱) تغذیه شدند. هم چنین در فواصل ۱۵ روزه با محلول گل میخک بیهوش و با استفاده از یک خط کش چوبی و ترازوی دیجیتال با دقت۰/۱ گرم مورد زیست سنجی قرار گرفتند و بر اساس وزن به دست آمده میزان غذای داده شده برای ۱۵روز بعد تنظیم گردید. در پایان دوره تغذیه پس از گذشت ۲۴ساعت، از۳۰ درصد جمعیت ماهیان با استفاده از سرنگ های۲ سی‌سی از باله دمی خون‌گیری به عمل آمد و نمونه‌های خون به تیوب‌های اپندروف آغشته به ماده ضد انعقاد خون(هپارین) ریخته، به آزمایشگاه فیزیولوژی مؤسسه منتقل و به وسیله سانتریفوژ(مدل Heraeus Labofuge12 sepatch آلمان)، با دور ۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و سرم خون جدا گردید، سپس نمونه های حاصل به آزمایشگاه دکتر فدایی رشت جهت بررسی شاخص های هماتولوژیک و ایمنی منتقل شدند.

آنالیز شیمیایی و آماری

آنالیز بیوشیمیایی جیره و مواد غذایی با استفاده از دستورالعمل کتابچه Association of Official Analytical Chemists, AOAC, 1995 تعیین گردید،

بر این اساس ماده خشک با سوزاندن در دمای ۱۰۵ درجه سانتی گراد به مدت۲۴ ساعت (AOAC Official Method 930.15 , 1995) پروتئین خام با استفاده از روش کجلدال درسه مرحله هضم، تقطیر، تیتراسیون و ضرب نمودن ازت به دست آمده از هر گرم ماده خشک در عدد ۶/۲۵ (AOAC Official Method 975.05 , 1995)، خاکستر مواد با سوزانده شدن در کوره الکتریکی مدل(Muffle Furances, RHF 16/3/3216 P1 Model, Made in England) در دمای ۵۵۰ درجه سانتی گراد(AOAC Official Method 942.05, 1995)، چربی خام با استخراج چربی بروش سوکسله با استفاده ازحلال اتر با رسیدن به نقطه‌جوش ۵۰ تا ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴ تا ۶ ساعت (AOAC Official Method 932.02 , 1995)در استخراج کننده سوکسله(Gerhart soxthoterm Made in Germany SOX , Model,) اندازه گیری و انرژی کل با استفاده از بمب کالری‌متر(Bak model, Made in USA) به دست آمد(۴).نمونه های خون به آزمایشگاه فیزیولوژی موسسه منتقل و توسط سانتریفوژ (Heraeus sepatch company, Lebofuge model, Made in Germany) با ۳۰۰۰ دور دردقیقه به مدت ۱۰دقیقه سانتریفوژ گردید تا سرم خون جدا گردد، شمارش گلبول های سفید(WBC) با استفاده از لام هموسیتومتر نئوبار با استفاده از لنز۴۰ و با لنز۲۰ نیکون میکروسکوپ نوری نیکون مدل E600 شمارش شد(۲۳). لیزوزیم ها، کمپلامنت, CH_{50} و توتال ایمونوگلوبین پلاسما با استفاده از دستگاه (company, Technicon Made in USA ,Auto Analyzer Technicon R.A.1000) و کیت های پارس آزمون نوع ISC وILT مورد سنجش قرار گرفت و مقدار ویتامین در جیره پایه با استفاده از دستگاه HPLC(مدل CECIL-1100 SERES) به روش اسپکتروفتومتری تعیین شد(۹).

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بررسی توزیع نرمال داده ها در گروه ها و تکرارها جهت تشکیل تیمارها از آزمون Kolmogorov-Smirnov استفاده شد. به منظور مقایسه آماری داده های حاصل از شاخص های رشد، و شاخص های سیستم ایمنی،آزمون آنالیز واریانس یک طرفه(Oneway Anova) و جهت مقایسه گروه‌ها با یک دیگر از آزمون دانکن استفاده گردید، کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰صورت گرفت. با انجام زیست سنجی های یک ماهه و با توجه به اطلاعات به دست آمده از طول و وزن ماهیان، شاخص های رشد و ضریب تبدیل غذای ماهیان براساس فرمول های زیر محاسبه شد. (Ronyai et al., 1990; Xue et al .,2006 ; Hung et al., 1989)

$K = (BWF/ TL^3) \times 100$

K: درصدشاخص وضعیت،BWF : متوسط وزن نهایی(گرم)، TL: طول کل(سانتی متر)

$BWI = (BWf – BWi)/BWi \times 100$

BWI :درصد افزایش وزن بدن، BWF:متوسط وزن نهایی(گرم)،BWi متوسط وزن اولیه(گرم)

$F.C.R = F/(Wt-W0)$

F.C.R:ضریب تبدیل غذا، F: مقدار غذای مصرف شده توسط ماهی،W0 : میانگین بیوماس اولیه(گرم)، Wt: میانگین بیوماس نهایی(گرم)

$S.G.R =(lnWt -lnW0)/t \times 100$

T: دوره زمانی(روز)، Wt: میانگین بیوماس نهایی(گرم)، W0: میانگین بیوماس اولیه(گرم)

PER=(Bwf-Bwi)/protein intake

BWi: متوسط وزن اولیه(گرم)، BWF: متوسط وزن نهایی)، Protein intake: کل پروتئین مصرفی هر ماهی(گرم)

جدول ۱-اجزا وترکیب شیمیایی جیره های غذایی(n=۳)

اجزای غذایی	شماره جیره (٪)			
	RB_0	RB_{15}	RB_{20}	RB_{25}
آرد ماهی [1]	۴۹/۸	۴۹/۸	۴۹/۸	٤۹/۸
پودر گوشت [2]	۸	۸	۸	۸
پودر خون [3]	۳/۵	۳/۵	۳/۵	۳/۵
نشاسته ذرت	۱۱/۵	۱۱/۵	۱۱/۵	۱۱/۵
نشاسته گندم	۱۱/۵	۱۱/۵	۱۱/۵	۱۱/۵
مخمر	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
روغن ماهی	۳/۵	۳/۵	۳/۵	۳/۵
روغن ذرت	۳/۵	۳/۵	۳/۵	۳/۵
لستین	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
بتافین	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
پرمیکس ویتامینی	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
پرمیکس معدنی	۱	۱	۱	۱
سلولز	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷
ریبوفلاوین	۰	۱۵	۲۰	۲۵
جمع کل	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
ترکیب شیمیایی (٪)				
ماده خشک	۹۳/۶	۹۴/۱	۹۴/۵	۹٤/۸
پروتئین	۴۹/۰۶	۴۸/۸۵	۴۹/۰۸	٤۸/۵
چربی	۱۲/۳۵	۱۲/۶۸	۱۲/۲	۱۲/۲۵
خاکستر	۱۰/۶	۱۰/۵	۱۰/۴	۱۰/٦
فیبر	۳/۱۵	۳/۰۰	۳/۰۶	۳/۵
کربوهیدرات	۱۸/۵	۱۸/۵	۱۸/۸۳	۱۹/۰۱
انرژی کل(مگاژول برکیلوگرم)	۱۸/٦۳	۱۸/٤۸	۱۸/٥٤	۱۸/۵۸

۱- آرد ماهی:۶۱ درصد پروتئین، ۲- پودر گوشت : ۴۸ درصد پرو تئیت، ۳: پرو تئین کنسانتره سویا: ۶۸ درصد پروتئین، ۴- نشاسته ذرت ۱۳٪ پرو تئین، ۵- نشاسته گندم: ۱۱٪ پرو تئین ۳: ویتامین پرمیکس (برحسب IU یا میلی گرم در کیلوگرم): د- ال- آلفا توکوفرول استات ۶۰ ای. یو،د- ال – کولکلسیفرول ۳۰۰۰ ای. یو. تیامین ۱۵ میلی گرم در کیلوگرم، ریبو فلاوین ۵ میلی گرم در کیلو گرم، پیرودوکسین ۱۵ میلی گرم در کیلوگرم، ویتامین B12 ۰/۰۵ میلی گرم در کیلوگرم، نیکوتینیک اسید ۱۷۵ میلی گرم در کیلوگرم، اسیدفولیک ۵ میلی گرم در کیلوگرم، اسیداسکوربیک ۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم، اینوزیتول ۱۰۰۰ میلی گرم در کیلوگرم، بیوتین ۲/۵ میلی گرم در کیلوگرم، کلسیم پنتوتات۵۰میلی گرم در کیلوگرم، کولین کلراید ۲۰۰۰میلی گرم در کیلوگرم .

نتایج

الف: تاثیر مکمل های ریبوفلاوین برشاخص های رشد و ضریب تبدیل غذای تاسماهی شیپ

نتایج حاصل از تاثیر مکمل های ریبوفلاوین بر شاخص های رشد و ضریب تبدیل غذای ماهیان درجدول ۲ آورده شده است. با افزایش سطوح مکمل ریبوفلاوین در جیره، شاخص های وزن نهایی و ضریب چاقی ماهیان در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی داری روند صعودی را نشان داد، به طوری که تاسماهیان شیپ تغذیه شده ازجیره۳(۲۰ میلی گرم در کیلوگرم

مکمل ریبوفلاوین)(RB_{20}) دارای بیشترین وزن نهایی به میزان (۰/۱۴±۷۲/۵ گرم) و بیشترین ضریب چاقی از آن ماهیان تغذیه شده از جیره ۴(RB_{25}) بودند(P ۰/۰۵). شاخص های درصد افزایش وزن بدن و ضریب رشد ویژه ماهیان در تیمارهای(RB_0, RB_{15} و RB_{25}) به ترتیب فاقد مکمل، ۱۵ و ۲۵ میلی گرم درکیلوگرم ریبوفلاوین) دارای اختلاف معنی دار آماری نبود، اما درصد افزایش وزن بدن و ضریب رشد ویژه ماهیان تغذیه شده از جیره (RB_{20}) (۲۰ میلی گرم در کیلوگرم مکمل ریبوفلاوین) به ترتیب (۰/۸±۱۳۵/۰۲ درصد) و(۰/۱±۱/۴۲ درصد در روز) به طور معنی داری از ماهیان تیمارهای دیگر بیشتر بود(P ۰/۰۵). هم چنین افزودن مکمل ریبوفلاوین به میزان ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم موجب گردید که ضریب تبدیل غذا در ماهیان این تیمار(۰/۰۱۷±۲/۳۶) به طور معنی داری در مقایسه با تیمار شاهد بهبود یابد(P ۰/۰۵). مطلوب ترین نسبت بازده پروتئین به میزان(۰/۰۰۶±۰/۸۶) در ماهیانی مشاهده شد که ازجیره۳ (۲۰ میلی گرم در کیلوگرم مکمل ریبوفلاوین) تغذیه نموده بود که دارای اختلاف معنی دار آماری با تیمارهای دیگر بود(P ۰/۰۵). نتایج حاصل از تاثیر مکمل های ریبوفلاوین بر شاخص های رشد و ضریب تبدیل غذای ماهیان درجدول ۳ آورده شده است.

جدول ۲-تاثیر مکمل های ریبوفلاوین برشاخص های رشد و ضریب تبدیل غذای تاسماهیان شیپ در یک دوره ۸ هفته ای

شاخص ها	جیره ۱(RB_0)	جیره ۲ (RB_{15})	جیره ۳ (RB_{20})	جیره ٤ (RB_{25})
وزن اولیه (W_1) (گرم)	۲۹/۳۷±۲/ ۶۵^{a}	۳۰/۸۵± ۰/۲۱^{a}	۳۰/۸۵±۰/۰۷^{a}	۳۱/۳۵±۰/۴۲^{a}
وزن نهایی(W_2)(گرم)	۵۱/۲±۰/۲۸^{C}	۶۰/۶۵±۰/۲۱^{b}	۷۲/۵±۰/۱۴^{a}	۶۰/۸۵±۰/۷۷^{b}
(TL_1) (سانتی متر)	۲۱/۵±۰/۴۲^{a}	۲۱/۳۲±۰/۴۲^{a}	۲۱/۴۷±۰/۱۷^{a}	۲۱/۳۶±۰/۴۱^{a}
(TL_2) (سانتی متر)	۲۴/۳±۰/۰۵^{d}	۲۵/۲±۰/۰۷^{b}	۲۹/۷۵±۰/۱۴^{a}	۲۴/۷±۰/۵^{d}
(K)	۰/۳۵±۰/۰۰۵^{d}	۰/۳۷±۰/۰۰۱^{c}	۰/۳۳±۰/۰۵^{d}	۰/۴۰±۰/۰۰۵^{b}
(WG)	۷۵/۰۵±۱۶/۷۶^{b}	۹۶/۵۸±۰/۶۶^{b}	۱۳۵/۰۲±۰/۸^{a}	۹۴/۰۹±۰/۱۴^{b}
(SGR)	۰/۹۲±۰/ ۱۵^{b}	۱/۱±۰/۰۹^{b}	۱/۴۲±۰/۱^{a}	۱/۱±۰/۰۱۲^{a}
(FCR)	۳/۷۳±۰/۶۰^{a}	۳/۰۵±۰/۰۲^{ab}	۲/۳۶±۰/۰۱۷^{b}	۳/۱±۰/۰۳۲^{ab}
(PER)	۰/۵۵±۰/۰۰۸^{b}	۰/۶۶±۰/۰۰۱^{b}	۰/۸۶±۰/۰۰۶^{a}	۰/۶۳±۰/۰۰۶b

اعداد با حروف مشابه دارای اختلاف معنی دار آماری نیستند (P ۰/۰۵).

ب: تاثیر مکمل های ریبوفلاوین برشاخص های سیستم ایمنی بچه تاسماهی شیپ

مکمل های ریبوفلاوین به طور معنی داری موجب بهبود شاخص های ایمنی در این گونه گردیدند. به طوری که تعداد گلبول سفید در تاسماهیان شیپ تغذیه شده از جیره RB_{20}(۲۰ میلی گرم در کیلوگرم ریبوفلاوین) در مقایسه با تعداد گلبول های سفید ماهیان تغذیه شده با جیره فاقد مکمل به طور معنی‌داری افزایش یافت(P ۰/۰۵). هم چنین غلظت لیزوزیم پلاسمای ماهیان تغذیه شده با جیره۳(RB_{20})(۲۰میلی گرم در کیلوگرم ریبوفلاوین) به طور معنی داری برتیمارهای دیگر برتری داشت(P ۰/۰۵). فعالیت کامپلایمنت CH_{50} پلاسمای ماهیان تحت تاثیر مکمل های ریبو فلاوین بود. بیشترین مقدار آن در ماهیان تیمار RB_{20}(۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ریبوفلاوین) ثبت گردید که دارای برتری معنی‌دار آماری با تیمارهای دیگر بود(P ۰/۰۵)، هرچند که با افزودن مکمل ریبوفلاوین به جیره مقادیر عددی ایمونوگلوبین کل افزایش یافت، اما اختلاف معنی داری در تیمارهای آزمایشی مشاهده نگردید(P ۰/۰۵)(جدول ۳).

جدول ۳- تاثیر مکمل های ریبو فلاوین بر شاخص های سیستم ایمنی بچه تاسماهی شیب در یک دوره ۸ هفته ای

شاخص ها	(RB_0)	(RB_{15})	(RB_{20})	(RB_{25})
گلبول سفید (میلی گرم/دسی لیتر)	۷/۲±۲/۳[a]	۶/۴±۲/۵۵[a]	۸/۰۶±۲/۵۱[a]	۶/۲۶±۲/۹۱[b]
ایمونوگلوبین کل(میلی گرم/دسی لیتر)	۴۲/۰۰±۱۱/۸[a]	۵۷/۰۰±۲۱/۸[a]	۴۷/۰۰±۱۴/۴۲[a]	۶۰/۰۰±۱۶/۲۸[a]
لیزوزیم (U/ ML/MIN)	۳۲/۱±۴/۰۹[b]	۱۴/۲۳±۳/۶۶[c]	۴۹/۳۳±۱۰/۲۹[a]	۸/۱±۱/۵[c]
کمپلایمنت (ACH_{50}) (٪)	۳۲/۱±۴/۰۹[b]	۱۴/۲۳±۳/۶۶[c]	۴۹/۳۳±۱۰/۲۹[a]	۸/۱±۱/۵[c]

اعداد با حروف مشابه دارای اختلاف معنی دار آماری نیستند (P ۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

ویتامین A و سایر ویتامین های محلول در آب نظیر ویتامین های گروه B نقشی مهم در متابولیسم سلولی داشته و در این میان ویتامین های گروه B به عنوان کوآنزیم عمل نموده و نقش مهمی در متابولیسم کربوهیدرات، پروتئین و چربی ایفا می نمایند(۲۵). هم چنین ریبوفلاوین در کاهش فعل و انفعال های اکسیداسیون مشارکت داشته که برای همه جانوران ضروری است(۱۰). در این آزمایش با افزایش سطوح مکمل ریبوفلاوین در جیره، شاخص های وزن نهایی و ضریب چاقی ماهیان در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی داری روند صعودی را نشان داد، هم چنین افزودن مکمل ریبوفلاوین به میزان ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم موجب گردید که ضریب تبدیل غذا در ماهیان این تیمار به طور معنی داری در مقایسه با تیمار شاهد بهبود یابد(P ۰/۰۵). با افزایش ریبوفلاوین به میزان۲۰ میلی گرم در کیلوگرم، شاخص های افزایش وزن(WG) و ضریب رشد ویژه (SGR) به طور معنی داری بهبود یافتند که هماهنگ با نتایج به دست آمده در مورد تاثیر ریبوفلاوین بر بهبود این شاخص ها درکپور معمولی(۴۱، ۵)، گربه ماهی کانال(۴۵) و ماهی باس طلایی(۱۰) می-باشد، نتایج مشابهی نیز از Li و همکاران(۲۰۱۰)(۲۷) گزارش شده است که شاخص های رشد واریته ای ازکپور معمولی با نام Jian carp (*Cyprinus Carpio* Var. Jian)از جیره های ریبوفلاوین تاثیر پذیرفته و ارتباط نزدیکی میان میزان جذب غذا و درصد افزایش وزن و ضریب رشد ویژه داشته، به طوری که با افزایش ریبوفلاوین به۴/۲۲ میلی گرم درکیلوگرم، شاخص های درصد افزایش وزن و ضریب رشد ویژه در این گونه به طور معنی داری بهبود یافت. در آزمایش حاضر نیز با افزایش سطوح ریبوفلاوین تا سطح۲۰ میلی گرم در کیلوگرم در جیره، علاوه برآن که میزان ضریب تبدیل غذا کاهش یافته، شاخص های ضریب رشد ویژه و درصد افزایش وزن به طور معنی داری بهبود یافت که احتمالاً به دلیل تاثیر گذاری ریبوفلاوین الحاقی بر میزان فعالیت آنزیم های گوارشی است که وظیفه هضم و جذب مواد غذایی را بر عهده دارند(۲۹). نتایج Li و همکاران(۲۰۱۰)(۲۷) بر این نکته دلالت داشت که فعالیت تریپسین، لیپاز و آلفا آمیلاز در دستگاه گوارش با افزایش مکمل ریبوفلاوین درجیره Jian carp (*Cyprinus carpio* Var. Jian) افزایش یافته و افزایش فعالیت تریپسین، لیپاز و آلفاآمیلاز در دستگاه گوارش ماهیان منجر به افزایش روند رشد و بهبود شاخص های لوزالمعده ماهیان تغذیه شده با ریبوفلاوین خواهد گردید. اگرچه ماهیان خاویاری دارای سیستم گوارشی پیش رفته‌ای هستند(۸)، اما لوزالمعده در این ماهیان نقش مهمی در هضم و جذب غذا داشته و هایپرتروفی لوزالمعده و هایپرپلازی ممکن است برفعالیت آنزیم های پروتئاز، لیپاز و فعالیت آمیلاز تاثیر و در نتیجه بر هضم پروتئین تاثیر منفی داشته باشد(۵۳). در گونه های دیگر نیز کاهش فعالیت آنزیم های هضم کننده غذا ارتباط مستقیمی با شاخص های رشد دارد و بنابراین می توان توضیح داد که چرا نتایج به دست آمده در مورد ماهی

کپور معمولی(۴۱، ۵)، ماهی باس طلایی(۱۰) وهم چنین آزمایش حاضر نشان‌دهنده این مطلب است که ماهیان موقعی که مقادیر ناکافی ریبوفلاوین دریافت می کنند دچار کاهش رشد می گردند. درآزمایش انجام شده نسبت بازده پروتئین نیز با افزایش سطوح ریبوفلاوین تا۲۰ میلی گرم در کیلوگرم به طور معنی داری افزایش و سپس با افزایش ریبوفلاوین تا سطح ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم کاهش یافت، نتایج مشابه ای از *Cyprinus* Jian carp *Carpio* Var. Jian) (۲۷)، گربه ماهی کانال (*Ictalurus punctatus*)(۴۵) و ماهی باس‌طلایی sunshine bass (*Morone chrysops, Morone saxatilis*) به دست آمد که آن را به جذب بهینه غذا بدلیل نقش کوآنزیمی ریبوفلاوین در متابولیسم پروتئین، کربوهیدرات و چربی نسبت داده بودند(۷). در این آزمایش مکمل ریبوفلاوین به طور معنی داری موجب بهبود شاخص های ایمنی در تاسماهی شیپ گردید، به طوری که تعداد گلبول سفید در تاسماهیان شیپ تغذیه شده از جیره RB_{20}(۲۰ میلی گرم در کیلوگرم ریبوفلاوین) در مقایسه با تعداد گلبول های سفید ماهیان تغذیه شده با جیره فاقد مکمل به طور معنی‌داری افزایش و بیشترین فعالیت لیزوزیم و کامپلایمنت CH_{50} در ماهیان تغذیه شده از تیمار۳(RB_{20})(۲۰ میلی گرم درکیلوگرم ریبوفلاوین) ثبت گردید. مطالعات دیگر در سالیان دور نیز بر این نکته اذعان داشت که ماهیان کپور انگشت قد تغذیه شده از جیره حاوی مقادیر ناکافی ریبوفلاوین دچار کم‌خونی، کمبود رشد، مرگ و میر بالا و خون ریزی پوست می شوند(۳۵) و هم چنین مواردی در قزل-آلای رنگین کمان(۴۱)، قزل‌آلای جویباری، قهوه ای و دریاچه‌ای (۳۸)، سالمون چینوک(۱۵)، ماهی آزاد اقیانوسی(۳۹)، گربه ماهی کانالی(۱۲)، کپورمعمولی(۳۷، ۵)، قزل آلای رنگین کمان(۳۲،۴۰،۴۱)، مارماهی‌ژاپنی(۶) و سیم قرمز دریایی(۵۵) گزارش شده است. گلبول های سفید(لوکوسیت‌ها) جزء یاخته‌های خونی و بخشی از دستگاه ایمنی بدن به شمار آمده و بدن را از بیماری‌های عفونی محافظت می‌کنند(۵۰)، مطالعات انجام شده در مورد لوکوسیت ها یا گلبول های سفید در گونه قزل‌آلای رنگین کمان نشان داده که افزایش گلبول‌های سفید در خون به عنوان شاخص فعالیت سیستم دفاعی در بدن ماهیان به شمار می آید(۴۲،۵۰). پاره ای از مطالعات نشان داده که افزودن مکمل ویتامین E موجب افزایش معنی دار تعداد گلبول های سفید در گونه تیلاپیای نیل(*Oeochromis niluticus*) گردیده و موجب تقویت و پایداری ماهی در شرایط پرورش متراکم همراه با بار باکتریایی و کیفیت نامناسب آب شده است(۲۱) که هماهنگ با نتایج به دست آمده در این آزمایش است. لیزوزیم یک آنزیم باکتری کش است که به طور گسترده ای در بدن و قسمتی از مکانیسم سیستم دفاعی غیراختصاصی در بسیاری از جانوران از جمله ماهیان وجود دارد. در آزاد ماهیان، لیزوزیم در سرم خون، ترشحات، لایه موکوس و بافت های غنی از لوکوسیت ها عمدتاً در کلیه و دستگاه گوارش یافت می‌شود(۱۳،۲۷)، کارکرد باکتریایی این آنزیم درگیرشدن در هیدرولیز پپتیدوگلیکون های دیواره سلولی باکتری ها می باشد، اما اولین کارکرد ایمنی دفاع در مقابل باکتری های گرم مثبت و گرم منفی می باشد(۴۶)، کاهش لیزوزیم سرم خون ماهیان پرورش در محیط هایی با تراکم بالا موجب افزایش تلفات و مستعد شدن آن ها به بیماری می‌گردد(۳۲). سیستم کامپلیمنت در ماهیان استخوانی به خوبی مهره داران عمدتاً از طریق چسبیدن به آنتی بادی‌ها در دیواره سلولی عمل می-کند(۱۷). مطالعات زیادی نشان داده است که کامپلیمنت نقشی حیاتی در پاسخ های سیستم ایمنی ذاتی درماهیان استخوانی داشته(۵۴) و فعالیت کامپلیمنت، مسئول سیستم ایمنی ماهیان استخوانی در گونه های متعددی نظیر کپورمعمولی(۳۳)، گربه ماهی(۲۰) و آزاد ماهیان(۲۶)

است، به طورمثال آنتی‌بادی‌های آزاد ماهیان، درحضور پروتئین های کامپلیمنت قادر به خنثی‌سازی ویروس های هماتوپویتیک نکروز ویروس (IHNV) و ویرال هموراژی سپتی سمی ویروس (VHSV) می باشند(۳۰)، بنابراین می‌توان اذعان نمود که فعالیت لیزوزیم و کامپلیمنت دلالت بر سلامت عمومی و سیستم هموورال در ماهی دارند(۴۷، ۲۸)، در این آزمایش با اضافه کردن مکمل ریبوفلاوین به میزان ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم، فعالیت لیزوزیم و کامپلمنت در تاسماهی شیپ در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی داری افزایش یافت. نتایج این بررسی نشان داد که برغم افزایش میزان ایمونوگلوبین درتیمارهای ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی گرم/ کیلوگرم ریبوفلاین اختلاف معنی داری با تیمار شاهد مشاهده نشد (P ۰/۰۵). ایمونوگلوبین غالب در اکثر ماهیان IgM می‌باشد(۲)، البته میزان غلظت IgM در ماهیان استخوانی در سطوح پایین قرار دارد(۴۸) و از درجه حرارت آب(۴۴) و کیفیت آب(۳۲) تاثیر می پذیرد، البته تاکنون تحقیقاتی در مورد غلظت IgM در ماهیان خاویاری انجام نشده و باید مطالعات بیشتری این زمینه صورت گیرد. با توجه به اثرات مثبت مکمل ریبوفلاوین برشاخص های رشد و سیستم ایمنی بدن تاسماهی شیپ جوان به نظر می‌رسد که افزودن ریبوفلاوین در جیره تا حد ۲۰ میلی-گرم/ کیلوگرم سودمند و موجب بازماندگی و افزایش بازده تولید این گونه در سیستم های متراکم پرورش می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس گذاری خود را از جناب مهندس هوشنگ یگانه و آقای مهندس محمد پوردهقانی از موسسه تحقیقات بین المللی دریای خزر جهت پرورش ماهیان و تهیه نمونه های خونی و هم چنین آقای هوشنگ ملکی از آزمایشگاه ویرومد رشت که زحمت آنالیز نمونه های خونی را برعهده داشتند ابراز می‌دارند.

منابع

۱–یزدانی ساداتی، م.ر.،پورکاظمی، م.، شکوریان، م.، پورعلی، ح.م.، پیکران مانا ، ن.، سیدحسنی، م.ح. ۱۳۹۰. ترویج و پرورش فیل ماهی به منظور تولید گوشت و خاویار. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۵۹ صفحه.

2.Acton, RT., Weinheimer, PF., Hall, SJ., Niedermeier, W., Shelton, E., Bennett, JC. (1971). Tetrameric immune macroglobulin in three orders of bony fishes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 68; 107–111.

3.Adelekan, DA., Thurnham, D.I. (1998). Glutathione peroxidase (EC 111.1.9) and superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) activities in riboflavin-deficient rats infected with Plasmodium berghei. Malaria British Journal Nutrition, 79; 305–309.

4.AOAC. (1995). Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. AOAC, Arlington.

5.Aoe, H., Masuda, I., Saito, T., Komo, A. (1967). Water-soluble vitamin requirement of carp-I. Requirement for vitamin B2. Bulletin Japanese Society Science Fish, 33; 355–360.

6.Arai, S., Nose, T., Hashimoto, Y. (1972a). Qualitative requirements of young eels Anguilla japonica for water-soluble vitamins and their deficiency symptoms. Bulletin Tokyo Freshwater Fish Research Laboratory, 22; 69-83.

7.Bronstad, I., Bjerka, S., Waagbo, R. (2002). The need for riboflavin supplementation in high and lower energy diets for Atlantic salmon *Salmo salar* L. parr. Aquaculture Nutrition, 8; 209-220.

8.Chebanov, M.S., Galich, E,V. (2011). Sturgeon hatchery manual. Fao Fisheries And Aquaculture Technical Paper. 303 pp,

9.Chimezie, A., Ibukun,A., Teddy,E., Francis, O. (2008). HPLC analysis of nicotinamide, pyridoxine, riboflavin and thiamin in some selected food products in Nigeria. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2; 29-036.

10. Deng, D.F., Wilson, R.P. (2003). Dietary riboflavin requirement of juvenile sunshine bass

(*Morone chrysops* $ × *Morone saxatilis* #). Aquaculture, 218; 695–701.
11. Doroshov, V.I. (1985). Biology and culture of sturgeon: *Acipenseriformes*. In: Advances in Aquaculture. Muir, J. F. and Roberts, R. J., Eds., Westwiew Press, Boulder, Co., 251-274.
12. Dupree, H. K. (1966a). Vitamins essential for growth of channel catfish, *Ictaluarus punctatus*. United State Bulletin Sport Fish Technical Paper, 7; 12 p.
13. Grinde, B., Lie, O., Poppe, T., Salte, R. (1988). Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture. Aquaculture, 68; 299–304.
14. Gumus , E., Ikiz, R. (2009). Effect of dietary levels of lipid and carbohydrate on growth performance, chemical contents and digestibility in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, 1792. Pakistan Vetrinity Journal, 29; 59-63.
15. Halver, J. E. (1957). Nutrition of salmonoid fishes. III. Water-solublevitamin requirements of chinook Salmon. Journal of Nutrition, 62; 225-243. B.
16. Halver, J.E. (1989). The vitamins. In: Fish Nutrition (Halver, J.E. ed.), 2nd edn, pp. 31–109. Academic Press, New York.
17. Holland, M.C., Lambris. JD. (2002). The complement system of teleosts. Fish and Shellfish Immunology, 12; 399–420.
18. Holt, G.J. (2011). Larval Fish Nutrition, (Editor: G. Joan Holt). John Wiley & Sons publication, 448 p.
19. Hung S. S. O ., Aikins K. F., Lutes P. B., Xu,R . (1989). Ability of Juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) to utilize different Carbohydrate source. Journal of Nutrition, 119; 272-733.
20. Jenkins, JA., Ourth, D.D. (1993). Opsonic effect of the alternative complement pathway on channel catfish peripheral blood phagocytes. Veterinary Immunology Immunopathology, 39; 447–459
21. Ispır, U., Yonar, M.E.and OZ, B. (2011). Effect of dietary vitamin supplementation on blood parameters of Nile Tilapia (*Orechromis Niloticus*). The Journal of Animal & Plant Sciences, 21; 566-569.
22. Izquierdo, M.S. (1996). Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. Aquaculture Nutrition, 2; 183–191.
23. Klontz, G.W. (1994). Fish Hematology. In: Techniques in Fish Immunology, Stolen, J.S., T.C.
24. Kitamura, S.T., Suwa, T., Ohara, S. , Nakagawa, K. (1967a). Studies on vitamin requirements of rainbow trout-II. The deficiency symptoms of fourteen kinds of vitamin. [In Japanese English Abstract Bulletin of Japanese Society Science Fish], 33;1120-1125.
25. Lall, S.P. (2000). Nutrition and health of fish. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22.
26. Lammens, M., Decostere, A., Haaesebrouck, F. (2000). Effects of *Flavobaterium psychrophilium* strains and their metabolites on the oxidative activity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* phagocytes. Disease of Aquaculture Organism, 41; 173–179.
27. Li, W., Zhou, X.Q., Feng, L., Liu, Y ., Jiang, J. (2010). Effect of riboflavin on growth , feed utilization, body composition and intestinal activities of juvenile Jian Carp (*Cyprinus Carpio* Var. Jian). Aquaculture Nutrition, 16; 137-143
28. Lie, O., Evensen, O., Sorensen, A., Froysadal, E. (1989). Study on lysozyme activity in some fish species. Disease of Aquaculture Organism, 6; 1–5.
29. Lin, Y., Zhou, X.Q. (2006). Dietary glutamine supplementation improves structure and function of intestine of juvenile Jian carp (C*yprinus carpio* var Jian). Aquaculture, 256; 389–394.
30. Lorenzen. N., LaPatra, SE. (1999). Immunity to rabdovirus in rainbow trout: the antibody response. Fish and Shellfish Immunology, 9; 345–360.
31.NRC. (1993). Nutrient requirements of fish (National Research Council, Committee on Animal Nutrition, Board on Agricultures.). pp. 1–115. *Na*tional Academy Press, Washington, DC.
32. Magnadottir, B., Jonsdottir, H., Helgason, S., Bjornsson, B., Jorgensen, TO., Pilstrom, L. (2001). Immune parameters of immunised cod (*Gadus morhua* L). Fish and Shellfish Immunology, 10; 75–8.
33. Matsuyama, H., Yano, T., Yamakawa, T., Nakao, M. (1992). Opsonic effect of the third complement component (C3) of carp (*Cyprinus carpio*) on phagocytosis by neutrophils. Fish and Shellfish Immunology, 2; 69–78.
34. Mohseni, M., Hassani, M. H., Pourali, F. H.,Pourkazemi, M., Bai, S. C. (2011). The optimum dietary carbohydrate/lipid ratio can spare protein in growing beluga, *Huso huso*. Journal of Applied Ichthyology, 27; 737-742.

35. Millikin, M.R. (1982). Qualitative and quantitative nutrient requirement fishes: A review. Fishery Bulletin, 80; 4.

36. Morris, P.C., Davies, S.J. and Lowe, D.M. (1995). Qualitative requirement for B vitamins in diets for the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Animal Science, 61; 419–426.

37. Ogino, C. (1967). B vitamins requirements of carp-II. Requirements for riboflavin and pantothenic acid. [In Japanese ., English. Abstract.] Bullitune of Japanase Society Science Fish, 33; 351-354.

38. Phillips, A.M.J.R., Brockway, D.R. (1957). The nutrition of trout. IV. Vitamin requirements. Progress Fish-Culture, 19; 119-123.

39. Phillips. A. M., JR. (1959a). Vitamin requirement of Atlantic salmon. StateN.Y. Conservative. Departement of Fish Research Bulletin, 22; 79-81.

40. Postone, H.A., Rumsey, G.L ., Ketola, H.G. (1977). The effect of supplemental dietary amino acids. minerals and-vitamins on salmonids fed cataractogenicdiets. Cornell Vetrinirty, 67; 472-509.

41. Takeuchi, L., Takeuchi, T., Ogino, C. (1980). Riboflavin requirements in carp and rainbow trout. Bullutin Jpanase Society Science Fish, 46; 733–737.

42. Ronyai, A., Peteri, A., Radics, F. (1990). Cross breeding of sterlet and Lena River's sturgeon. Aquacult Hungrica (Szarwas), 6; 13-18.

43. Sahoo, P.K., Mukherjee, S.C. (2003). Immunomodulation by dietaryvitamin C in healthy and aflatoxin B_1-induced immune compromised rohu (*Labeo rohita*). Comparative Immunolology. Microbiology Infection Disease, 26;65–76.

44. Sanchez, C., Babin, M., Tomillo, J.,Ubeira,FM., Dominguez. J. (1993). Quantification of low levels of rainbow trout immunoglobulin by enzyme immunoassay using two monoclonal antibodies. Veterinary Immunology and Immunopathology, 36;65–74.

45. Serrini, G., Zhang, Z., Wilson, R.P. (1996). Dietary riboflavin requirement of fingerling channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquaculture, 139; 285–290.

46. Sveinbjornsson, B., Olsen, R., Paulsen, S., (1996). Immuno cytochemical localization of lysozyme in intestinal eosinophilic granule cells (EGCs) of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Journal of Fish Disease, 19; 349–355.

47. Tort, L., Balasch, S. and MacKenzie,S. (2003). Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. Imnninoiogia, 08. 9. Available online at:[http://revista .inmunologia .org/ Upload /Articles/602.pdf] (Accessed: 11.09.08).

48. Uribe, C., Folch., H., Enriquez, R., Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review Veterinarni Medicina, 10; 486–503.

49. Waagbo, R. (1997). The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. A review of Aquaculture Fish Managing, 25; 175-197.

50. Wahli, T., Verlhac, V., Gabaudan, J., Schüep, W., Meier,W. (1998). Influence of combined vitamins C and E on non-specific immunity and disease resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Disease, 21; 127-134.

51. Webster, C.D., C.E., Lim. (2002). Nutrient Requirement and Feeding of Finfish for Aquaculture. CAB International CABI publishing, 418.

52. Xue, M., Wu, X., Ren, Z., Gao, P.,Yu, N., Pearl, G. (2006). Effects of six alternative lipid sources on growth and tissue fatty acid composition in Japanese sea bass (*Lateolabrax Japanicus*). Aquaculture, 206; 206-214.

53. Xu, Q. Y., Wang, C. A., Zhao, Z. G., Luo, L. (2012). Effects of replacement of fish meal by soy protein isolate on the growth, digestive enzyme activity and serum biochemical parameters for Juvenile Amur Sturgeon (*Acipenser schrenckii*). Asian-Australian Journal of Animal Science, 11;1588-1594.

54. Yano, T., Matsuyama, H., Mangindaan R.E.P. (1991). Polysaccharide induced protection of carp *Cyprinus carpio* against bacterial infection. Journal of Fish Disease, 14; 577–582.

55. Yone, Y. (1975). Nutritional studies of red sea bream. Proceeding of First International Conference of Aquaculture Nutrition, 39-64.