



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره ششم، شماره اول، بهار ۹۷

<http://jair.gonbad.ac.ir>

تأثیر مکمل غذایی پری‌بیوتیکی بر عملکرد رشد، فراسنجه‌های خونی و بیان ژن TGF- β بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)

سیما اسکندری^۱، سیدمحمدعلی جلالی^{۲*}، آذر همت‌زاده^۲

^۱دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
^۲استادیار دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ ارسال: ۹۶/۵/۸؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۲۱

چکیده

این آزمایش به منظور مطالعه اثرات استفاده از دو نوع پری‌بیوتیک الف و ب (الف ترکیبی از ۱۶ درصد بتاگلوکان و ۸۰ درصد مانان‌الیگوساکارید، و ب ترکیبی از ۳۰ درصد بتاگلوکان و ۱۸ درصد مانان‌الیگوساکارید) بر افزایش وزن، ضریب تبدیل خوراک، درصد زنده مانی، راندمان لاشه آماده پخت، فراسنجه‌های خونی، بیان ژن TGF- β غده فوق کلیه و مرفولوژی روده بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) انجام شد. تعداد ۱۸۰۰ قطعه بچه ماهی انگشت قد با وزن اولیه ۶ گرم، به‌طور کاملاً تصادفی در ۹ وان پلی‌اتیلن ۳۰۰ لیتری با تعداد ۲۰۰ ماهی در هر وان، تقسیم شدند. ماهی‌ها به مقدار ۳/۵ درصد توده وزن بدن به‌صورت روزانه با یکی از سه جیره آزمایشی شامل جیره شاهد فاقد پری‌بیوتیک و جیره‌های آزمایشی الف و ب به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. جیره‌های آزمایشی الف و ب به ترتیب دارای مقدار ۱ و ۲ گرم در کیلوگرم پری‌بیوتیک الف و ب بودند که سطح پری‌بیوتیک هر دو جیره برابر ۰/۹۶ گرم در کیلوگرم بود. نتایج در پایان آزمایش نشان داد که عملکرد رشد ماهی‌ها تحت تأثیر مکمل‌های پری‌بیوتیکی قرار نگرفت اما راندمان لاشه آماده پخت و زنده‌مانی ماهی‌ها با تغذیه پری‌بیوتیک‌ها افزایش معنی‌دار یافت. آلبومین، پروتئین کل و گلبولین سرم خون ماهی‌ها در اثر تغذیه با جیره دارای پری‌بیوتیک الف و ب افزایش معنی‌دار داشت و مکمل پری‌بیوتیکی ب اثرات بیشتری را نشان داد. ترکیب پری‌بیوتیکی مورد استفاده به‌طور معنی‌داری سبب افزایش لنفوسیت‌ها و نسبت طول به ارتفاع پرز روده ماهی‌ها شد. بیان ژن TGF- β ۱ غده فوق کلیه نیز در اثر تغذیه پری‌بیوتیک‌ها افزایش معنی‌دار داشت به‌طوری‌که تیمار تغذیه شده با جیره دارای پری‌بیوتیک الف موجب افزایش شدت بیان ژن در این تیمار شد. این

*نویسنده مسئول: Fish.nutritionist@gmail.com

پژوهش نشان داد که استفاده از مکمل غذایی پری‌بیوتیکی الف سبب بهبود ایمنی و راندمان لاشه ماهی قزل-آلای رنگین‌کمان انگشت‌قد شد و پاسخ فیزیولوژیکی ماهی، بر اساس ترکیب پری‌بیوتیک متفاوت خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: *O. mykiss*، پری‌بیوتیک، زنده مانی، فراسنجه‌های فیزیولوژیکی

مقدمه

موفقیت در آبی پروری با بهبود ژنتیک، تغذیه و کنترل بیماری‌ها در گونه‌های پرورشی میسر شده است شاخص‌هایی مانند رشد ویژه، ضریب تبدیل خوراک و میزان مرگ و میر، نقشی کلیدی در ارزیابی یک سیستم آبی‌پروری دارد و با کیفیت خوراک مصرفی در ارتباط است (Merrifield *et al.*, 2010). ماهی‌ها به‌طور مداوم در معرض عوامل بیماری‌زا مانند باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها قرار دارند و به‌طور کلی بهبود و ارتقاء سیستم ایمنی حیوان، سبب افزایش سلامتی آن شده و در آبی‌پروری نیز تأمین سلامت آبی اهمیت زیادی دارد. یکی از عواملی که سبب تحریک سیستم ایمنی آبیان می‌شود، پری‌بیوتیک‌ها هستند که از کربوهیدرات‌های غیرقابل هضمی تشکیل شده‌اند و از طریق تحریک رشد یا فعال کردن یک یا تعداد محدودی از باکتری‌هایی که در روده وجود دارند، اثرات سودمندی بر میزبان داشته و سلامتی آن را بهبود می‌بخشند (Akrami *et al.*, 2009). عمده پری‌بیوتیک‌ها از پلی‌ساکاریدهایی با ساختار بتا دی‌گلوکان و مانان‌الیگوساکاریدها تشکیل شده‌اند (Cerezuela *et al.*, 2008) که به‌طور گسترده در طبیعت از جمله در دانه غلاتی مثل جو و جو دوسر یافت می‌شوند. این ترکیبات در دیواره‌های سلولی قرار گرفته‌اند که عمدتاً از دیواره سلولی مخمر نانوبی (*Saccharomyces cerevisiae*) مشتق شده (Welker *et al.*, 2007) و می‌تواند به انواع مختلف سلول‌های سیستم ایمنی غیراختصاصی، از جمله ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها متصل شده و به‌عنوان عامل تنظیم‌کننده ایمنی و تعدیل‌کننده پاسخ بیولوژیکی ارزیابی می‌شوند (Rufchaie *et al.*, 2012). پری‌بیوتیک‌ها باعث بهبود و تعادل میکروفلور روده و افزایش مکانیسم دفاعی میزبان می‌شوند (Akrami *et al.*, 2009). مهم‌ترین محصول حاصل از متابولیسم پری‌بیوتیک‌ها، اسیدهای چرب زنجیر کوتاه (نظیر استات، پروپیونات و اسید لاکتیک) هستند (David *et al.*, 1999) که از طریق اپیتلیوم روده جذب می‌شوند و به‌عنوان یک منبع انرژی مهم برای میزبان تلقی شده و سبب تقویت انتروسیته‌ها و بهبود جذب مواد غذایی می‌شوند. این مواد همچنین با کاهش pH روده، شرایط مناسب برای رشد باکتری‌های اسید لاکتیک را فراهم می‌کنند (Schely and Field, 2002). در پژوهش‌های مختلف، جهت بررسی اثر پری‌بیوتیک‌ها بر ماهیان، اغلب یک نوع پری‌بیوتیک تجاری در سطوح مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته و سطح مناسب مصرف آن در جیره مشخص شده است. بطور مثال نتیجه پژوهش محمدیان و همکاران (Mohammadian *et al.*,

(2015) نشان داد که از بین سطوح مختلف صفر، ۰/۵، ۱/۵ و ۱/۵ درصد پری‌بیوتیک ایمونوژن (Imunogen) در جیره غذایی ماهی شیریت، سطح ۱/۵ درصد سبب ایجاد تغییر در فلور باکتریایی دستگاه گوارش و افزایش لاکتوباسیلوس روده گردید. با استفاده از سطوح مختلف پری‌بیوتیک داینامیون (Dinamune) در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) (صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ گرم در کیلوگرم) نشان داده شد که سطح یک گرم در کیلوگرم جیره سبب بهبود ضریب تبدیل خوراک ماهی شد (Ramzani et al., 2014).

نتایج مطالعه آفتابگرد و همکاران (Aftabgard et al., 2013) نشان داد که افزودن پری‌بیوتیک ایمنواستر (Immunoster) در سطح صفر، ۲ و ۴ درصد جیره غذایی ماهی سفید دریای خزر سبب افزایش سطح ایمنی ماهی گردید و لوکوسیت‌های خون و لنفوسیت‌ها تحت تاثیر جیره‌های آزمایشی قرار گرفت. در پژوهشی دیگر لقمانی جهرمی و همکاران (Loghmani Jahromi et al., 2014) با بررسی سطوح صفر، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵ و ۰/۲ درصد پری‌بیوتیک ایمونوژن (Immunogen) در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) نشان دادند که سطح ۰/۱۵ تا ۰/۲ درصد تاثیر مثبتی بر عملکرد رشد و ضریب تبدیل خوراک ماهی داشت و افزایش تعداد گلبول‌های قرمز، سفید و درصد لنفوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها در اثر تغذیه با این پری‌بیوتیک مشاهده شد.

باتوجه به تنش‌های ناشی از پرورش متراکم ماهی و نیز شیوع بیماری‌های باکتریایی و ویروسی مختلف در ماهیان که سبب تلفات ماهی می‌گردد، پژوهش در زمینه بهبود کیفیت خوراک مصرفی با هدف بهبود و ارتقا ایمنی ماهی با اهمیت است. در این زمینه تعیین اثر تغذیه پری‌بیوتیک‌های مختلف و مقایسه اثر هر کدام بر ماهی به دلیل ترکیب و منشا متفاوت آنها اهمیت زیادی دارد. این پژوهش نیز به بررسی اثر دو نوع پری‌بیوتیک با ترکیبی که یکی دارای مانان الیگوساکارید و دیگری دارای بتاگلوکان بیشتری است انجام گرفت تا اثرات آنها بر عملکرد رشد، فراسنجه‌های سرمی و هماتولوژیکی، مورفولوژی روده و بیان ژن TGF-β1 (Transforming Growth Factor-beta) در ماهی قزل‌آلای-رنگین‌کمان (*O. mykiss*) مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مدیریت سیستم آزمایشی: این پژوهش در پایلوت تحقیقاتی شرکت فرادانه واقع در مزرعه پرورش ماهی دشت‌آبی رستم آباد شهرستان اردل در استان چهارمحال و بختیاری به‌مدت ۱۰ هفته انجام گرفت. از بین ۴۰۰۰ قطعه ماهی پرورشی در سالن تحقیقاتی، تعداد ۱۸۰۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) با وزن اولیه ۶ گرم توزین و سپس به‌صورت تصادفی به ۹ عدد وان پلی‌اتیلنی (۲۰۰ ماهی در هر وان) به حجم ۳۰۰ لیتر واقع در سالن تقسیم شدند. ماهی‌ها برای تطابق‌پذیری با

شرایط آزمایش به مدت دو هفته با جیره شاهد فاقد پری‌بیوتیک تغذیه شدند. وضعیت دمای آب به‌طور روزانه ثبت گردید و در مدت آزمایش در دامنه ۱۱-۱۳ درجه سانتی‌گراد قرار داشت و ویژگی‌های آب شامل pH با میانگین ۸ و میزان اکسیژن ۶/۵ میلی‌گرم در لیتر بود. جیره آزمایشی شامل جیره شاهد (فاقد پری‌بیوتیک)، جیره دارای ترکیب پری‌بیوتیکی الف (ترکیبی از ۱۶٪ بتاگلوکان و ۸۰ درصد مانان‌الیگوساکارید) به مقدار ۱ گرم در کیلوگرم و جیره دارای ترکیب پری‌بیوتیکی ب (۳۰ درصد بتاگلوکان و ۱۸ درصد مانان‌الیگوساکارید) به مقدار ۲ گرم در کیلوگرم بود. ماهی‌ها به مدت ۸ هفته به مقدار ۳/۵ درصد وزن بدن بصورت روزانه در ۵ وعده غذایی تغذیه شدند. هر دو هفته یک بار، همراه با قطع خوراک به مدت ۲۴ ساعت، وزن گروهی ماهی‌های هر وان اندازه‌گیری و برای دو هفته بعدی خوراک دهی براساس توده زنده تصحیح شد. در کل دوره پرورش تلفات ماهی‌ها به‌صورت روزانه ثبت شد.

ساخت جیره‌های آزمایشی: جیره‌های آزمایشی و شاهد با استفاده از خوراک پایه اکسترود بدون روغن تهیه شده از شرکت فرادانه (SFT) آماده گردید. چون پری‌بیوتیک الف دارای ۱۶ درصد بتاگلوکان و ۸۰ درصد مانان‌الیگوساکارید (مجموعاً ۹۶ درصد الیگو ساکارید) و پری‌بیوتیک ب دارای ۳۰ درصد بتاگلوکان و ۱۸ درصد مانان‌الیگوساکارید (مجموعاً ۴۸ درصد الیگو ساکارید) بود، مقدار سطح مصرف آنها در جیره‌های آزمایشی به ترتیب ۱ و ۲ گرم در کیلوگرم جیره در نظر گرفته شد تا مجموع الیگو ساکارید افزوده شده به جیره الف و ب با یکدیگر برابر و به مقدار ۰/۹۶ گرم در کیلوگرم خوراک باشد. بسته به نوع جیره آزمایشی و سطح پری‌بیوتیک در جیره، پری‌بیوتیک‌های الف و ب به‌طور مجزا با روغن ماهی مخلوط گردید. روغن مصرفی در جیره شاهد نیز کاملاً مشابه با جیره‌های آزمایشی بود ولی به آن پری‌بیوتیکی اضافه نگردید. به جیره تجاری اکسترود فاقد روغن (۹۰ درصد) براساس نوع جیره که شامل جیره‌های شاهد، آزمایشی الف و ب بود به‌طور مجزا ۱۰ درصد روغن ماهی به ترتیب بدون پری‌بیوتیک، با پری‌بیوتیک الف و ب اضافه شد.

زیست‌سنجی و نمونه برداری: در پایان آزمایش پس از یک روز قطع خوراک دهی، ماهی‌ها با استفاده از پودر گل میخک با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر بیهوش شده و زیست‌سنجی انفرادی آن‌ها شامل اندازه‌گیری طول استاندارد با دقت ۰/۱ سانتی‌متر و وزن ماهی‌ها با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم انجام شد. سپس از هر وان ۱۰ عدد ماهی به‌صورت تصادفی انتخاب و خونگیری از ماهیان با استفاده از سرنگ از ساقه دمی صورت گرفت. پس از خون‌گیری بخشی از نمونه بلافاصله به داخل میکروتیوپ ۲ سی‌سی منتقل و بخش دیگری از خون به داخل لوله‌های دارای ماده ضد انعقاد (هپارینه) منتقل شد. پس از تشکیل لخته در میکروتیوپ‌ها، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ

شدند تا سرم از خون جدا شود. پس از جداسازی سرم، نمونه‌های سرم در فریزر با دمای -20°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Ahmadian *et al.*, 2015).

سنجش فاکتورهای مورد آزمایش: فراسنجه‌های خونی مانند پروتئین تام و آلبومین سرم با روش نورسنجی و استفاده از کیت‌های درمان کاو (Darman kave) و با دستگاه اسپکتوفتومتر مدل Technicon RA-1000 ساخت آمریکا انجام شد. برای اندازه‌گیری پروتئین از روش بیورت (biuret) استفاده شد که در این حالت پروتئین در محیط قلیایی با یون‌های مس تشکیل یک کمپلکس لاجوردی رنگ می‌دهد که شدت رنگ ایجاد شده متناسب با مقدار پروتئین در نمونه می‌باشد. آلبومین موجود در سرم با Bromocresol Green (در pH اسیدی) یک کمپلکس رنگی سبز-آبی ایجاد می‌کند که شدت رنگ ایجاد شده متناسب با مقدار آلبومین در نمونه می‌باشد. مقدار گلوبولین سرم خون نیز با تفاضل آلبومین از پروتئین تام سرم خون محاسبه گردید (Jalali Haji-abadi *et al.*, 2010).

جهت اندازه‌گیری شاخص‌های هماتولوژی مانند هماتوکریت (PCV)، تعداد گلبول قرمز (RBC) و سفید (WBC)، شمارش افتراقی گلبول‌های سفید، غلظت هموگلوبین (Hb)، فاگوسیتوز و تعداد جرم فاگوسیتوز از نمونه خون دارای ماده ضد انعقاد استفاده شد (Nazari Farsani *et al.*, 2015). شاخص اریتروسیت‌ها مانند متوسط حجم گلبول قرمز (MCV)، متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز خون (MCH) و متوسط هموگلوبین در حجم مشخص از گلبول‌های قرمز (MCHC) با استفاده از روابط زیر محاسبه شد (Vázquez and Guerrero, 2007):

$$\begin{aligned} \text{MCV} &= (\text{PCV} \times 10) / \text{RBC} \\ \text{MCH} &= (\text{Hb} \times 10) / \text{RBC} \\ \text{MCHC} &= (\text{Hb} \times 100) / \text{PCV} \end{aligned}$$

محاسبه شاخص‌های رشد و تغذیه

نرخ رشد ویژه (%) = $(\text{Ln وزن نهایی (گرم)} - \text{Ln وزن اولیه (گرم)}) \times 100 / \text{دوره پرورش (روز)}$

افزایش وزن = وزن نهایی (گرم) - وزن اولیه (گرم)

ضریب تبدیل خوراک = خوراک مصرفی در طول دوره پرورشی (گرم) ÷ افزایش وزن ماهی (گرم)

شاخص کبدی = [وزن کبد (گرم) ÷ وزن کل بدن (گرم)] × 100

راندمان لاشه آماده پخت = [وزن لاشه بدون اندام‌های داخلی و با سر و دم (گرم) ÷ وزن کل بدن

(گرم)] × 100

اندازه‌گیری بیان ژن: جهت بررسی بیان ژن TGF- β 1، از بافت فوق کلیه 4 ماهی از هر وان خونگیری شد و بلافاصله در تانک ازت مایع و سپس تا شروع آزمایش به فریزر -70°C درجه سانتی‌گراد منتقل شد. برای طراحی پرایمرهای اختصاصی ژن، ابتدا توالی ژن کدکننده TGF- β 1 (ژن هدف) و توالی ژن Beta

Actin (ژن مرجع) از پایگاه داده‌ای مرکز ملی برای اطلاعات بیوتکنولوژی استخراج شد سپس با استفاده از نرم افزار Fast PCR اقدام به طراحی جفت پرایمر گردید (جدول ۱). جهت استخراج RNA از بافت، تعیین غلظت و خلوص آن، کل RNA از بافت فوق کلیه ماهی‌ها با استفاده از روش پیشنهادی کیت Qiagen RNA Isolation Kit، ساخت شرکت کیاژن (تهران-ایران) استخراج گردید.

RNA به‌دست‌آمده از هر نمونه تا زمان استفاده در یخچال فریزر ۷۰- ذخیره گردید. با استفاده از دستگاه پیکودراپ (Pico200, UK) غلظت و خلوص RNA به‌دست آمده از هر نمونه تعیین گردید. برای این منظور ۳ میکرولیتر از RNA به‌دست آمده از هر نمونه در زمان ساخت cDNA برای تعیین غلظت و خلوص RNA مورد استفاده قرار گرفت. برای رفع آلودگی احتمالی با DNA ژنومیک، ۱ میکروگرم از RNA کل استخراج شده به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مجاورت آنزیم DNA آز (Fermentase, GmbH, Germany) قرار گرفت. یک میکرولیتر EDTA با غلظت ۲۵ میلی‌مول به تیوب اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد روی پلیت حرارتی نگهداری شد. اولین رشته cDNA از روی RNA استخراج شده در مرحله قبل با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (Maxima Reverse Transcriptase) از کیت ساخت cDNA (Maxima® First Strand) cDNA Synthesis Kit ساخت شرکت ترمو (Thermo Scientific, GmbH, Germany) تولید شد. برای بررسی کمی بیان ژن با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با کمک دستگاه StepOne Real-Time PCR System (Life Technologies, USA) و کیت SYBR® Green I PCR Master Mix همراه با رنگ زمینه‌ای ROX طبق چرخه دمایی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه و در ادامه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه برای ۴۰ چرخه انجام شد. هر تیوب ۱۰۰ میکرولیتری (Real-Time PCR) (MicroAmp Optical 8-Cap Strip, Life Technologies, USA) حاوی ۱۰ میکرولیتر مواد مورد نیاز برای واکنش qPCR بود. در نهایت به‌منظور تأیید اختصاصیت محصول تکثیر شده و عدم تشکیل پرایمر دایمر برای هر جفت پرایمر منحنی ذوب در فاصله دمایی ۹۹-۶۰ درجه سانتی‌گراد رسم شد. هر واکنش برای هر یک از نمونه‌ها دو بار انجام شد. از روش $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (2- $\Delta\Delta C_T$ Method) برای بررسی بیان کمی - نسبی ژن TGF- β 1 استفاده شد. نتایج ژل الکتروفورز ژنها در شکل ۱ آورده شده است.

$$\text{Relative fold change in gene expression} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$\Delta C_T = C_T \text{ target gene} - C_T \text{ reference gene}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ test sample} - \Delta C_T \text{ Control sample}$$

بافت‌شناسی روده: از انتهای روده ماهی پس از خونگیری، حدود یک سانتی‌متر از روده جدا و به فرمالین ۱۰ درصد منتقل و به‌مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد. با استفاده از الکل آبگیری از نمونه‌ها انجام و با انتقال آنها به گزین و سپس قرار دادن در پارافین، امکان برش با استفاده از میکروتوم مهیا و

تأثیر مکمل غذایی پری‌بیوتیکی بر عملکرد رشد، فراسنجه‌های خونی و بیان ژن...

رنگ‌آمیزی و پایداری با هماتوکسیلین-اُوزین انجام شد. شاخص‌های پرز روده مانند طول، عرض، ارتفاع و ضخامت ماهیچه اندازه‌گیری و نسبت طول به ارتفاع پرزها محاسبه شد (Yarahmadi *et al.*, 2016).

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده جهت همسانه‌سازی ژن TGF- β 1 و Beta Actin

اندازه قطعه ژنی مورد نظر	توالی پرایمرها	پرایمر
۲۲۵ جفت باز (bp)	F: 5'- GCTCGTCACCTACGACCTC -3' R: 5'- TGTACCGCGTCTTCACCAC -3'	جفت پرایمر ژن هدف (TGF- β 1)
۱۹۹ جفت باز (bp)	F: 5'- AGGCTGTGCTGTCCCTGTAT -3/ R: 5'- GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA -3'	جفت پرایمر ژن مرجع (Beta Actin)



شکل ۱- نتایج ژل الکتروفورز ژنها

روش تجزیه و تحلیل آماری: آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار انجام گرفت و داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از برنامه SAS و رویه GLM تجزیه واریانس و مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام شد.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی اثر پری‌بیوتیک‌ها بر فاکتورهای رشد و عملکرد لاشه و کبد در ماهی انگشت‌قد قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که مصرف خوراک، افزایش وزن، شاخص رشد ویژه، ضریب تبدیل خوراک و شاخص وضعیت ماهی‌ها تحت تأثیر هیچ‌کدام از پری‌بیوتیک‌ها قرار نگرفت ($p > 0/05$) و افزودن پری‌بیوتیک به جیره غذایی بر وزن کبد، لاشه و وزن نسبی کبد اثر معنی‌داری نداشت ($p > 0/05$) اما وزن نسبی لاشه با تغذیه هر دو ترکیب پری‌بیوتیکی الف و ب افزایش معنی‌داری یافت ($p < 0/05$). درصد زنده‌مانی ماهی‌ها با تغذیه هر دو پری‌بیوتیک بهبود یافت به طوری که پری‌بیوتیک الف موجب افزایش معنی‌دار درصد زنده‌مانی ماهی‌ها شد (جدول ۲).

جدول ۲- تاثیر استفاده از ترکیب پری‌بیوتیکی بر عملکرد رشد، لاشه و کبد در ماهیان انگشت‌قد قزل‌آلای - رنگین‌کمان (*O. mykiss*)

فراسنجه	شاهد	ترکیب پری بیوتیک (الف)	ترکیب پری بیوتیک (ب)	سطح احتمال
وزن اولیه (گرم)	۶/۸۰±۰/۱۱۵	۶/۷۳۳±۰/۱۳۳	۶/۵۸۳±۰/۱۰۹	Ns
وزن نهایی (گرم)	۴۲/۴۱۳±۰/۶۵۳	۴۲/۹۰۴±۰/۲۳۸	۴۳/۱۹۵±۱/۶۸۰	Ns
مصرف خوراک (گرم/ماهی در روز)	۰/۴۵۲±۰/۰۰۸	۰/۴۴۵±۰/۰۰۵	۰/۴۳۷±۰/۰۲۶	Ns
افزایش وزن (گرم/ماهی در روز)	۰/۶۶۲±۰/۰۲۳	۰/۶۴۳±۰/۰۱۳	۰/۶۴۵±۰/۰۱۸	Ns
ضریب تبدیل خوراک	۰/۶۸۴±۰/۰۱۱	۰/۶۹۲±۰/۰۰۸	۰/۶۷۹±۰/۰۲۰	Ns
شاخص رشد ویژه	۳/۰۵۹±۰/۰۳۱	۳/۰۲۲±۰/۰۳۸	۳/۱۱۶±۰/۱۰۲	Ns
وزن کبد (گرم)	۰/۵۰۱±۰/۰۵۱	۰/۴۵۸±۰/۰۳۸	۰/۵۷۳±۰/۰۴۹	Ns
وزن لاشه (گرم)	۳۷/۷۶±۲/۱۶	۴۳/۰۷±۲/۵۲	۴۳/۵۹±۳/۳۱	Ns
وزن نسبی کبد (درصد)	۱/۱۲۷±۰/۱۲۱	۱/۰۸۱±۰/۱۰۴	۱/۲۵۷±۰/۱۱۲	Ns
راندمان لاشه آماده پخت (درصد)	۸۲/۹۳±۱/۰۱ ^b	۹۰/۸۶±۱/۶۰ ^a	۹۰/۸۹±۰/۵۲ ^a	**
شاخص وضعیت	۱/۰۹۷±۰/۰۱۴	۱/۰۸۹±۰/۰۱۵	۱/۱۱۲±۰/۰۱۳	Ns
زنده مانی (درصد)	۹۶/۳۳±۰/۷۲ ^b	۹۸/۵۰±۰/۵۷ ^a	۹۷/۶۶±۰/۱۶ ^{ab}	*

حروف متفاوت بر روی اعداد (میانگین ± خطای استاندارد) هر سطر نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است.

Ns ($p < 0/05$): غیر معنی‌دار * ($p < 0/05$) **: ($p < 0/01$) ***: ($p < 0/001$)

تأثیر مکمل غذایی پری بیوتیکی بر عملکرد رشد، فراسنجه‌های خونی و بیان ژن...

نتایج تأثیر ترکیب پری بیوتیکی بر فاکتورهای خونی در ماهی انگشت‌قد قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) در جدول ۳ نشان داده شده است. آلبومین، پروتئین کل و گلبولین سرم خون ماهی‌ها در اثر تغذیه جیره دارای پری بیوتیک افزایش معنی‌داری داشت که اثر ترکیب پری بیوتیکی ب بیشتر بود هر چند تعداد گلبول‌های سفید ماهی تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت، اما تغذیه جیره‌های دارای پری بیوتیک به‌طور معنی‌داری سبب افزایش درصد لنفوسیت‌ها و کاهش درصد نوتروفیل‌ها و تعداد جرم در فاگوسیتوز شد ($p < 0.05$).

جدول ۳- تأثیر استفاده از ترکیب پری بیوتیکی بر فراسنجه‌های خونی و هماتولوژی در ماهیان انگشت‌قد قزل-آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*)

فراسنجه	شاهد	ترکیب پری بیوتیک (الف)	ترکیب پری بیوتیک (ب)	سطح احتمال
تعداد گلبول‌های قرمز (میکرولیتر/ $10^6 \times$)	4/10 ± 0/216	4/12 ± 0/205	4/74 ± 0/206	Ns
هموگلوبین (گرم/دسی لیتر)	10/88 ± 0/546	11/36 ± 0/299	12/24 ± 0/593	Ns
تعداد گلبول‌های سفید (میکرولیتر/ $10^3 \times$)	1438 ± 1016	1301 ± 656	1542 ± 222	Ns
نوتروفیل (درصد)	19/75 ± 0/75 ^a	14/83 ± 1/046 ^b	14/40 ± 0/812 ^b	**
لنفوسیت (درصد)	74/00 ± 1/303 ^b	77/83 ± 0/945 ^a	79/16 ± 0/872 ^a	***
منوسیت (درصد)	4/33 ± 0/494	4/60 ± 0/812	3/60 ± 0/400	Ns
ائوزینوفیل (درصد)	1/83 ± 0/307	2/00 ± 0/365	2/25 ± 0/478	Ns
فاگوسیت (درصد)	15/75 ± 1/652 ^a	11/00 ± 1/581 ^b	13/20 ± 1/019 ^{ab}	*
تعداد جرم در فاگوسیتوز	11/75 ± 1/108 ^a	7/20 ± 0/734 ^b	6/20 ± 1/157 ^b	**
حجم متوسط گلبول‌های قرمز (میکرومتر مکعب)	116/76 ± 3/444	114/59 ± 2/606	117/47 ± 5/461	Ns
وزن متوسط هموگلوبین در سلول (پیکوگرم)	26/57 ± 0/489	26/08 ± 0/502	25/83 ± 0/690	Ns
میانگین غلظت هموگلوبین سلولی (گرم/دسی لیتر)	22/71 ± 0/424	22/23 ± 0/229	22/16 ± 0/404	Ns
آلبومین (گرم/دسی لیتر)	1/44 ± 0/017 ^c	1/57 ± 0/023 ^b	1/69 ± 0/026 ^a	***
گلوبولین (گرم/دسی لیتر)	1/36 ± 0/026 ^b	1/57 ± 0/049 ^a	1/60 ± 0/010 ^a	**
پروتئین کل (گرم/دسی لیتر)	2/80 ± 0/014 ^c	3/15 ± 0/030 ^b	3/29 ± 0/017 ^a	***

حروف متفاوت بر روی اعداد (میانگین \pm خطای استاندارد) هر سطر نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است. Ns ($p < 0.05$): غیر معنی‌دار * ($p < 0.05$) ** ($p < 0.01$) *** ($p < 0.001$).

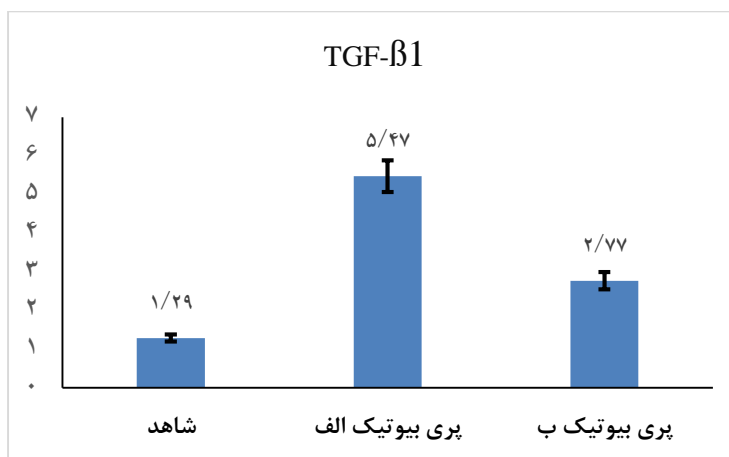
نتایج حاصل از اثر این دو ترکیب پری‌بیوتیکی بر مرفولوژی بافت روده بچه‌ماهیان قزل‌آلای - رنگین‌کمان (*O. mykiss*) در جدول ۴ نشان داده شده است. ضخامت ماهیچه، ارتفاع پرز و طول پرز، روده تحت تاثیر پری‌بیوتیک‌های مصرفی قرار نگرفت ($p > 0.05$) اما نسبت طول به ارتفاع پرز روده ماهی‌ها در اثر هر دو ترکیب الف و ب افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). شکل ۲ به بیان ژن TGF- β 1 در ماهی انگشت‌قد قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) می‌پردازد. هر دو ترکیب الف و ب سبب افزایش شدت بیان این ژن گردید اما اثر تغذیه با پری‌بیوتیک الف بر این ژن نسبت به پری‌بیوتیک ب و شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ($p < 0.05$).

جدول ۴- تأثیر استفاده از ترکیب پری‌بیوتیکی بر مرفولوژی بافت روده در ماهیان انگشت‌قد قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*)

فراسنجه	شاهد	ترکیب پری‌بیوتیک (الف)	ترکیب پری‌بیوتیک (ب)	سطح احتمال
ضخامت ماهیچه (میکرون)	۱/۶۶۶ ± ۰/۲۱۰	۱/۸۳۳ ± ۰/۳۰۷	۲/۴۰۰ ± ۰/۴۰۰	Ns
ارتفاع پرز (میکرون)	۴/۸۰۰ ± ۰/۲۰۰	۴/۳۳۳ ± ۰/۳۳۳	۴/۰۰۰ ± ۰/۳۶۵	Ns
طول پرز (میکرون)	۴۰/۷۵۰ ± ۴/۰۶۹	۵۱/۲۰۰ ± ۴/۲۴۷	۴۵/۵۰۰ ± ۴/۲۱۳	Ns
نسبت طول به ارتفاع	۸/۵۲۵ ± ۰/۵۱۵ ^b	۱۲/۲۸۷ ± ۰/۵۷۰ ^a	۱۳/۱۸۸ ± ۱/۳۹۳ ^a	**

حروف متفاوت بر روی اعداد (میانگین ± خطای استاندارد) هر سطر نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است.

Ns ($p < 0.05$): غیرمعنی‌دار * ($p < 0.05$): ** ($p < 0.01$): *** ($p < 0.001$): ****



شکل ۲- اثر پری‌بیوتیک بر بیان ژن TGF- β 1 فوق کلیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) (اعداد روی هر ستون میانگین نسبت بیان ژن هدف به ژن رفرنس است).

بحث و نتیجه‌گیری

باتوجه به نتایج به‌دست آمده از این پژوهش مشخص شد که وزن نسبی لاشه و درصد زنده مانده بچه‌ماهیان انگشت‌قد قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) بهبود معنی‌دار یافت (جدول ۲). به‌طورکلی، استفاده از پری‌بیوتیک‌ها در جیره غذایی آزادماهیان سبب افزایش جمعیت میکروبه‌های مفید دستگاه گوارش می‌شود (Birkbeck and Ringo, 2005) و مشخص شده که مانان الیگوساکارید منبع تغذیه‌ای مناسب برای رشد و فعالیت باکتری‌های فلور دستگاه گوارش نظیر باکتری‌های اسیدلاکتیک، لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکترها بوده و به‌عنوان منبع انرژی توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک مصرف می‌شود (Staykov *et al.*, 2007). علاوه براین، مهم‌ترین محصول نهایی متابولیسم پری‌بیوتیک‌ها اسیدهای چرب کوتاه زنجیره هستند که از طریق اپیتلیوم روده جذب شده و علاوه بر تامین منبع انرژی برای میزبان، سبب بهبود جذب مواد مغذی می‌شوند (Wache *et al.*, 2006). همچنین مطالعات بیانگر آنست که پری‌بیوتیک‌های مانان الیگوساکاریدی و بتاگلوکانی سبب تولید گلوکز کبده شده که انرژی لازم برای سوخت و ساز بافت‌های بدن را فراهم می‌کند و با ایجاد شرایط مناسب برای فعالیت باکتری‌های اسیدلاکتیک موجود در روده، در نهایت سبب بهبود عملکرد روده ماهی را به دنبال دارد (Andrews *et al.*, 2009). بهبود بقا و درصد زنده مانده ماهیان تغذیه شده با پری‌بیوتیک‌ها (جدول ۲) به‌خصوص ترکیب پری‌بیوتیکی الف، ممکن است مربوط به بهبود وضعیت ایمنی ماهی‌ها باشد (Couso *et al.*, 2003; Dalmo and Bøgvold, 2008) که با پژوهش پیشین که با ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) انجام شده است مطابقت دارد (Yarahmadi *et al.*, 2016).

براساس نتایج این پژوهش، پروتئین‌های سرم خون (کل، آلبومین و گلوبولین) افزایش معنی‌دار داشت (جدول ۳) که این موضوع ممکن است مربوط به تولید ایمنوگلوبین باشد که در ماهی‌های تغذیه شده با سطح بتاگلوکان بالاتر در جیره با ترکیب پری‌بیوتیکی ب، سطح آلبومین و پروتئین کل بیشتری مشاهده شد. نتایج سایر پژوهش مشخص کرده است که بتاگلوکان‌ها سبب افزایش غلظت آنتی‌بادی‌ها در ماهیان می‌شوند (Chen and Ainsworth, 1992). افزایش معنی‌دار درصد لنفوسیت‌های خون در اثر تغذیه پری‌بیوتیک‌ها نیز مشاهده شد (جدول ۳). بتاگلوکان‌ها یک گیرنده ویژه روی گلبول‌های سفید خون را تشخیص می‌دهند، زمانی که گیرنده توسط بتاگلوکان‌ها اشغال است فعالیت گلبول‌های سفید خون در احاطه کردن، کشتن و هضم کردن باکتری‌های بیماری‌زا بیشتر می‌شود (Andrews *et al.*, 2009). علاوه براین مشخص شده است که پری‌بیوتیک مانان الیگوساکارید و بتاگلوکان از طریق اتصال به گیرنده‌های شبه لکتین روی لکوسیت‌ها و افزایش تکثیر ماکروفاژها سبب تحریک سیستم ایمنی می‌شود (Cerezuela *et al.*, 2008). گلبول‌های سفید در عمل فاگوسیتوز و پاسخ ایمنی نسبت به عوامل انگلی، باکتری و ویروسی و کمک به ترمیم بافت‌های صدمه دیده نقش

مهمی ایفا می‌کنند (Sakai, 1999)، بنابراین تعداد جرم فاگوسیت شونده و نیز فاگوسیتوز کاهش می‌یابد (جدول ۳).

بیان ژن TGF-β1 در بافت فوق کلیه ماهی‌ها در اثر تغذیه با پری‌بیوتیک‌ها افزایش معنی‌دار یافت (شکل ۲). TGF-β1 به‌عنوان یک سیتوکین نقش‌های متفاوتی مانند تنظیم تکثیر، تمایز، بقا و مرگ سلولی در شرایط مختلف فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی دارد. این ترکیب نقش حیاتی در تنظیم ایمنی ذاتی و اکتسابی ایفا می‌کند به‌طوری‌که مانع تکثیر سلول‌های T شده و تولید اینترلوکین ۲ را متوقف می‌کند. نشان داده شده است که بیان TGF-β1 در بافت‌های مرتبط با ایمنی مانند تیموس، غده فوق کلیه و طحال ماهی به خوبی اتفاق می‌افتد (Qi *et al.*, 2016). علاوه بر این TGF-β1 در پاسخ‌های ایمنی تاثیر مثبت دارد به‌طوری‌که این ترکیب نقش‌های کلیدی در تمایز سلول‌های Th17 و Treg دارد. این خصوصیت دوگانه نه تنها در سیستم پستانداران مشاهده شده است بلکه در ماهی‌ها نیز وجود دارد به‌طوری‌که مشخص شده است که TGF-β1 سبب ممانعت از فعال شدن ماکروفاژها شده و در مجموع قادر به کاهش اما تحریک فعالیت انفجار تنفسی ماکروفاژها در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) می‌شود (Maher *et al.*, 2013). در این پژوهش نیز کاهش فعالیت فاگوسیتوزی و تعداد جرم فاگوسیتوز شونده (جدول ۳) همراه با تغذیه پری‌بیوتیک‌ها که افزایش معنی‌دار بیان ژن TGF-β1 را به دنبال داشت (شکل ۲) مشاهده شد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که نسبت طول به ارتفاع پرز روده در ماهی‌های تغذیه شده با ترکیبات پری‌بیوتیکی مصرفی بیشتر بود (جدول ۴). به‌نظر می‌رسد تاثیر پری‌بیوتیک‌ها بر این نسبت به علت جلوگیری مانان الیگوساکارید از تجمع باکتری‌های بیماری‌زا در روده به دلیل تولید ترکیبات ضد باکتریایی باشد. چسبیدن باکتری‌های مضر به روده نقش مهمی در تشکیل کلونی و بیماری‌زایی دارد. سلول‌های موکوسی اپیتلیال روده در برابر اتصال باکتری‌ها دارای مکانیسم‌های دفاعی شامل ترشح موکوس، در برگرفتن باکتری‌ها و فعالیت موسین هستند (Bavington *et al.*, 2004)؛ بنابراین با تغذیه پری‌بیوتیک‌ها افزایش سطح جذبی همراه با افزایش نسبت طول به ارتفاع پرز ممکن است ایجاد شود. در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از ترکیب پری‌بیوتیک داینامیون و ایمونوژن در جیره غذایی سبب بهبود ایمنی، زنده مانی و راندمان لاشه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) انگشت‌قد می‌شود و با تغییر فراسنجه‌های خونی مانند پروتئین کل، لنفوسیت‌ها، فاگوسیتوز و نیز اثر بر پرزهای روده و همچنین افزایش شدت بیان ژن TGF-β1 در فوق کلیه اثرات فیزیولوژیکی و ایمونولوژیکی خود را سبب می‌شوند که البته اثر آنها تا حدودی به ترکیب پری‌بیوتیک مصرفی بستگی دارد.

منابع

Aftabgard M., Zamini A.A., Ershad Langroudi H., Miralami N. 2013. The study of Immunoster prebiotic effects on biometric factors with emphasis on weight and

- length and differential specification of leukocytes in Caspian Sea *Rutilus kutum* fingerlings. *Journal of Animal Research*, 26: 245-254.
- Ahmadian A., Jalali S.M.A., Pourreza J. 2015. Effect of oil source and dietary supplements of L-carnitine and ractopamine on growth performance and some blood biochemical parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 24: 109-120. (In Persian).
- Akrami R., Ghelichi A., Manuchehri H. 2009. Effect of dietary inulin as prebiotic on growth performance and survival of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Research in Marine Sciences and Technology*, 4: 1-9.
- Andrews S.R., Sahu N.P., Pal A.K., Kumar S. 2009. Hematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. *Aquaculture Research*, 41: 61-69.
- Bavington C.D., Lever R., Mulloy B., Grundy M.M., Page C.P., Richardson N. V., McKenzie J.D. 2004. Anti-adhesive glycoproteins in echinoderm mucus secretions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 139: 607-617.
- Birkbeck T.H., Ringo E. 2005. Pathogenesis and the gastrointestinal tract of growing fish. In: Holzapfel, W., Naughton, P. (Eds.), *Microbial Ecology in Growing Animal*. Elsevier, Edinburgh, UK, pp: 208-234.
- Cerezuela R., Cuesta A., Meseguer J., Esteban A. 2008. Effect of inulin on gilthead seabream (*Sparus aurata*) innate immune parameters. *Fish Shellfish Immunology*, 24: 663-668.
- Chen D., Ainsworth A.J. 1992. Glucan administration potentials immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafineque. *Journal of Fish Disease*, 15: 295-304.
- Couso N., Castro R., Magarinas B., Obach A., Lamas J. 2003. Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. *Aquaculture*, 219: 99-109.
- Dalmo R.A., Børgwald J. 2008. Beta-glucans as conductors of immune symphonies. *Fish Shellfish Immunology*, 25: 384-96.
- David J.A., Jenkiss C.W.C., Vladimir V. 1999. Inulin, oligofructose and intestinal function. *Journal of Nutrition*, 129: 1431-1433.
- Loghmani Jahromi V., Keyvanshokoo S., Salati A.P., Pashazanoosi H. 2014. Effects of Dietary Immunogen Prebiotic on Growth, Hematological Indices and Proximate Composition of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Oceanography*, 5: 11-19.
- Jalali Haji-abadi S.M.A., Mahboobi-sofiani N., Sadegi A.A., Chamani M., Riazi, G.H., 2010. Effects of supplemental dietary L-carnitine and ractopamin on the performance of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*, 103: 1582-1591.
- Maher T., Costa M.M., González Vecino J.L., Wadsworth S., Martin S., Wang T., Secombes C.J. 2013. Transforming growth factor- β 1: A second TGF- β 1 paralogue in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) that has a lower

- constitutive expression but is more responsive to immune stimulation. *Fish Shellfish Immunology*, 34: 420-432.
- Merrifield D.L., Dimitroglou A., Foey A., Davies S.J., Baker R.R., Bøggwald J., Castex M., Ringø E. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302: 1–18.
- Mohammadian T., Rohanzade S., Alishahi M., Alizade P., Abdi E. 2015. Studying the effect of Immunogen on microflora of intestine and carcass composition of *Barbus Grypus*. *Veterinary Journal*, 1: 2-9.
- Nazari Farsani M., Jalali S.M.A., Jafarian Dehkordi M. 2015. Evaluation the meat composition and immunity parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed by dietary different oil sources, l-carnitine and ractopamine supplement, *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*, 10: 108-115.
- Qi P., Xie C., Guo B., Wu C. 2016. Dissecting the role of transforming growth factor- β 1 in topmouth culter immunobiological activity: a fundamental functional analysis. *Scientific Reports*, 6: 271-279.
- Ramzani S., Soltani M., Gholipourkanani H. 2014. Influence of Dietary Dinamune® on Growth Performance and Lysozyme Activity in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fry. *Agriculture Technology and Biological Sciences*, 11: 865-869.
- Rufchaie R., Hoseinifar S.H., Sayad Borani M., Maghsodie Kohan H., Zamini A.A., Faeed M. 2012. The effects of glucan on hematological parameters, immune response and intestinal microbiota of *Rutilus frisii kutum* fry . *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 3: 73- 84. (In Persian).
- Sakai M. 1999. Current research status of fish Immunostimulants. *Aquaculture*, 172:63 92.
- Schely P.D., Feild C.J. 2002. The immuneenhancing effects of dietary fibers and prebiotics. *British Journal Nutrition*, 87: 227-230.
- Staykov Y., Spring P., Denev S., Sweetman J. 2007. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International*, 15:153-161.
- V´azquez G., Guerrero G.A. 2007. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Tissue and Cell*, 39: 151–160.
- Wache Y., Auffray F., Gatesoupe F.J., Zambonino J., Gayet V., Labbe 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.
- Welker T.L., Lim C., Yildirim-Aksoy M., Shelby R., Klesius P.H. 2007. Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri* challenge in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing commercial whole-cell yeast or yeast subcomponents. *Journal of the World Aquaculture Society*, 38: 24-35.
- Yarahmadi P., Kolangi Miandare H., Hoseinifar S.H. 2016. Haemato-immunological and serum biochemical parameters, intestinal histomorphology and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed dietary fermentable fibre (Vitacel®), *Journale of Aquaculture Nutrition*, 22: 1134–1142.