اثرات لاکتوفرین جیره بر روی عملکرد رشد، تغذیه، فاکتورهای خونی و پاسخ ایمنی غیراختصاصی بچه ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*)

- **وحید مرشدی**: گروه شیلات، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، صندوق‌پستی: ۱۶۵
- **ناصر آق***: گروه شیلات، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، صندوق‌پستی: ۱۶۵
- **جاسم مرمضی**: پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، صندوق‌پستی: ۸۶۶-۶۱۶۴۵
- **فرزانه نوری**: گروه شیلات، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، صندوق‌پستی: ۱۶۵
- **تکاور محمدیان**: گروه بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز. صندوق‌پستی: ۱۳۹

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۴

چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی اثرات سطوح مختلف لاکتوفرین جیره بر عملکرد رشد، تغذیه، فاکتورهای خونی و پاسخ ایمنی غیراختصاصی بچه‌ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*) با میانگین وزنی ۰/۳±۷/۶۴ گرم بود. این مطالعه در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار و ۳ تکرار در داخل مخازن فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری انجام شد. ماهیان به‌مدت ۴۲ روز با جیره‌های حاوی ۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین در هر کیلوگرم غذا تغذیه شدند. در پایان آزمایش نمونه‌های خون، پلاسما و موکوس جمع‌آوری شد. نتایج حاصل نشان داد که لاکتوفرین جیره عملکرد رشد و تغذیه ماهی صبیتی را تغییر نداد (P>۰/۰۵). فعالیت باکتری‌کشی موکوس به‌صورت معنی‌داری در ماهیان تغذیه شده با ۸۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵)، با این‌حال سایر پارمترهای ایمنی غیراختصاصی شامل تعداد گلبول‌های سفید، ایمنوگلوبولین کل، لیزوزیم، کمپلمان، فعالیت باکتری‌کشی پلاسما و موکوس به‌وسیله لاکتوفرین جیره تحت تاثیر قرار نگرفت (P>۰/۰۵). اما میزان هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول‌های قرمز در گروه شاهد با تیمار ۱ و ۲ اختلاف معنی‌دار نشان دادند (P<۰/۰۵). به‌طورکلی، این مطالعه نشان داد که فاکتورهای خونی به‌وسیله لاکتوفرین جیره تحت تاثیر قرار گرفت. با این حال، می توان نتیجه‌گیری کرد که تغذیه ماهی صبیتی با جیره حاوی ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین برای یک دوره ۶ هفته‌ای پاسخ ایمنی غیراختصاصی و عملکرد رشد را افزایش نمی‌دهد.

کلمات کلیدی: لاکتوفرین، سیستم ایمنی غیراختصاصی، رشد، فاکتورهای خونی، ماهی صبیتی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: agh۱۹۶۰@yahoo.com

مقدمه

ماهیان دریایی هم از نظر اقتصادی و هم از لحاظ ارزش غذایی مورد توجه صیادان و متخصصین تغذیه و بهداشت قرار گرفته و به‌همین دلیل تقاضای مصرف آن‌ها در سال‌های اخیر افزایش یافته است. صید بی‌رویه و به‌دنبال آن کاهش شدید ذخایر از تبعات چالش برانگیز این امر می‌باشد، به‌طوری‌که آلودگی دریاها و منابع آبی، از بین رفتن زیستگاه‌ها و مناطق تخم‌ریزی، ورود فاضلاب‌های شهری به آب رودخانه‌ها و دریاها، حضور صیادان سودجو و روش‌های صید نامناسب مثل ترال، بقاء نسل برخی گونه‌های آبزی نظیر ماهی هامور معمولی، شانک زرد باله و صبیتی (که از ارزش اقتصادی بالایی برخوردار می‌باشند) را به خطر انداخته است (Sarvi و همکاران، ۲۰۰۶). تکثیر مصنوعی این گونه‌ها و پرورش بچه‌ماهیان آن‌ها هم به‌منظور رهاسازی جهت بازسازی ذخایر در معرض خطر آن‌ها و هم به‌منظور پرورش در استخر جهت تامین بخشی از تقاضای رو به افزایش بازار آن‌ها مورد توجه محققین و دست‌اندرکاران صنعت آبزی‌پروری قرار گرفته است. در کنار پیشرفت‌های سریع صنعت آبزی‌پروری و تولید متراکم آن، وجود بیماری در مزارع پرورشی بسته به شرایط پرورش از قبیل تراکم، نامناسب بودن فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب و غذا غیرقابل اجتناب می‌باشد. تاکنون درمان اختصاصی برای تعدادی از بیماری‌ها مشخص نشده و نتیجه درمان‌های دارویی در شرایط تجربی اغلب با شرایط طبیعی و عملی یا با توجه به تکنولوژی پرورش متفاوت است. درمان دارویی به این شکل مقرون به‌صرفه نیست. برخی درمان‌ها در دوره‌های مشخصی مثل فصل رشد، در فصل زمستان یا در برخی واحدهای پرورش ماهی (مثل استخرهای بزرگ) قابل اجرا نیستند به این علت پیش‌گیری از بیماری‌ها اهمیت بسیار زیادتری نسبت به درمان و بهبودی دارد (شریف‌روحانی، ۱۳۷۴). به‌علت مشکلات بیان شده امروزه برای پیش‌گیری از بیماری‌های عفونی و غیرعفونی در صنعت آبزی‌پروری به جای دارو درمانی از محرک‌های ایمنی استفاده می‌شود. این مواد به‌عنوان عوامل دارویی برای کنترل بیماری‌ها، از اهمیت زیادی برخوردار هستند چون فاقد هر گونه اثرات منفی موجود در آنتی بیوتیک‌ها و واکسن‌های زنده بر محیط زیست بوده و چون جزء ترکیبات طبیعی محسوب می‌شوند باقی‌مانده‌های داروئی نامطلوب ایجاد نمی‌کنند (Sakai، ۱۹۹۹). انواع گسترده‌ای از ترکیبات مختلف وجود دارند که در ماهی پاسخ ایمنی را تحریک می‌کند. بیش‌تر این ترکیبات فقط از راه تزریق موثرند ولی برخی از راه خوراکی و یا غوطه‌وری نیز تاثیر می‌گذارند که از آن جمله می‌توان به لاکتوفرین اشاره کرد (فاطمی و میرزرگر، ۱۳۸۶).

لاکتوفرین (Lf) یک نوع گلیکوپروتئین با وزن مولکولی ۸۰ کیلو دالتون با باندهای آهن است و شامل زنجیره‌های پپتیدی منفرد با دو لوب کروی در هر مولکول است، که هر کدام دارای یک جایگاه برای باند شدن با آهن است (Kumari و همکاران، ۲۰۰۳). لاکتوفرین یکی از مولفه‌های مهم سیستم ایمنی غیراختصاصی است که نقش‌های فیزیولوژیک بسیاری به آن نسبت داده شده که از جمله تنظیم متابولیسم آهن (Welker و همکاران، ۲۰۰۷)، حفاظت در مقابل عفونت‌های باکتریائی (Sakai، ۱۹۹۳)، تنظیم عملکرد ایمنی (Chand و همکاران، ۲۰۰۶؛ Esteban و همکاران، ۲۰۰۵)، تحریک پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی (Kamilya و همکاران، ۲۰۰۶) می‌باشد. لاکتوفرین مقاوم به حرارت بوده هم‌چنین تا حدودی مقاوم به تجزیه پروتئولیتیک است، که نشان دهنده این امر است که می‌تواند بر شرایط تولید غذا، مایعات اسیدی معده و پروتئولیتیک روده فائق آید. با توجه به این خصوصیات، تجویز خوراکی آن‌را که امکان تیمار توده‌ای ماهیان را داده و با استرس‌های دستکاری کم‌تری همراه است، فراهم می‌آورد (Kumari و همکاران، ۲۰۰۳). نتایج تحقیقات Eslamloo و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که عملکرد رشد و سیستم ایمنی تاس ماهی سیبری بعد از ۵۶ روز تغذیه با سطوح مختلف لاکتوفرین تغییری نکرد. Rahimnejad و همکارن (۲۰۱۲) بیان کردند که افزودن لاکتوفرین گاوی به غذای قزل‌آلا پرواری بر رشد ماهی تاثیرگذار نبود اما تقویت سیستم ایمنی ماهیان را موجب شد. Esteban و همکاران (۲۰۰۵) با مطالعه فعالیت فاگوسیتیک و فعالیت همولیتیک کمپلمان سرم ماهی سی‌باس سرطلائی (*Sparus aurata*) بیان کردند که لاکتوفرین جیره هیچ نوع تاثیر معنی‌داری بر رشد نداشت، اما میزان محتوی پراکسیداز سرم در هر یک از تیمارها در مقایسه با تیمار کنترل بعد از ۲ هفته وابسته به غلظت افزایش یافت. در مار ماهی ژاپنی (*Anguilla japonica*) تغذیه شده با جیره حاوی ویتامین C به‌همراه مکمل لاکتوفرین بیشترین فعالیت لیزوزیم سرم و فعالیت ضدباکتریایی موکوس مشاهده گردید (Ren و همکاران، ۲۰۰۷).

خون به‌عنوان یک بافت سیال، یکی از مهم‌ترین مایعات بیولوژیک بدن بوده که تحت تأثیر حالات مختلف فیزیولوژیک و پاتولوژیک ترکیبات آن دستخوش نوسان و تغییر می‌گردد. لذا در اختیار داشتن مقادیر طبیعی پارامترهای خونی و بررسی چگونگی تغییرات آن می‌تواند در شناسایی بیماری‌ها، تعیین شرایط بهداشتی و سلامت آبزیان مفید باشد (Affonso و همکاران، ۲۰۰۲). سنجش پارامترهای خونی برای تعیین احتیاجات غذایی، اجزای غذایی

جدید و سایر افزودنی‌ها می‌توانند مفید واقع شوند (Affonso و همکاران، ۲۰۰۲). با توجه به این‌که ماهی صبیتی جزء یکی از کاندیداهای مهم جهت پرورش ماهیان دریایی در کشور می‌باشد و استفاده از محرک‌های ایمنی مانند لاکتوفرین کم‌تر بر روی ماهیان دریایی مورد تحقیق قرار گرفته است. لذا، این تحقیق تاثیر سطوح مختلف لاکتوفرین بر شاخص‌های رشد، تغذیه، فاکتورهای خونی و پاسخ ایمنی غیراختصاصی بچه‌ماهیان صبیتی را مورد بررسی قرار می‌دهد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در تیرماه ۱۳۹۱ با همکاری پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور و در بخش تکثیر و پرورش ماهیان دریایی بندر امام خمینی انجام شد. بچه ماهیان با وزن ۰/۳±۷/۶۴ گرم از تکثیر بهار مولدین پرورشی مرکز مذکور تامین و در مخازن فایبرگلاس ۴۰۰۰ لیتری در بخش تکثیر و پرورش این مرکز در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. جهت انجام این آزمایش ۳ تیمار مختلف غذایی با ۳ تکرار در نظر گرفته شد. برای هر تکرار ۴۵ قطعه بچه ماهی صبیتی انتخاب به‌صورت کاملاً تصادفی در بین مخازن فایبرگلاس با ظرفیت ۳۰۰ لیتر (آبگیری تا ۲۵۰ لیتر) محتوی آب دریای فیلتر و تیمار شده با اشعه فرابنفش توزیع شدند. سپس ماهیان به‌مدت ۶ هفته با تیمارهای غذایی به شرح زیر تغذیه شدند:

۱. غذای کنسانتره فاقد لاکتوفرین (گروه شاهد)

۲. غذای کنسانتره حاوی ۴۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین به‌ازاء هر کیلوگرم غذا (تیمار ۱)

۳. غذای کنسانتره حاوی ۸۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین به‌ازاء هر کیلوگرم غذا (تیمار ۲)

از جیره غذایی تجاری (شرکت ۲۱ بیضاء، شیراز) با اندازه ۲ میلی‌متر استفاده شد (جدول ۱). لاکتوفرین از شرکت Biopole SA/NV بلژیک خریداری شد و پس از توزین مقدار مورد نیاز لاکتوفرین برای هر تیمار روی غذا اسپری شد. سپس غلظت ۳ درصد ژلاتین نیز برای پوشش‌دار کردن غذا و جلوگیری از هدر رفت افزودنی‌ها بر روی آن اسپری شد. پس از آماده‌سازی، غذا درون یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد تا از فساد آن جلوگیری گردد. غذادهی ماهیان روزانه در دو نوبت با فاصله زمانی مناسب در حد ۴/۵ درصد وزن بدن انجام شد. شرایط محیطی شامل دما، نور، اکسیژن محلول، شوری و pH در تمام طول آزمایش برای تمام مخازن یکسان بود (جدول ۲). زیست‌سنجی طول و وزن ماهیان در روزهای شروع آزمایش، وسط و پایان آزمایش صورت گرفت. در طول آزمایش شاخص‌های رشد و تغذیه با استفاده از فرمول‌های زیر تعیین شد (Abdelghany و Ahmad، ۲۰۰۳؛ Marcouli و همکاران، ۲۰۰۶):

= نرخ رشد ویژه وزن نهایی

تعداد روزهای پرورش/۱۰۰×(Ln وزن اولیه بدن-ln وزن نهایی بدن)

= شاخص وضعیت

^{3}(میانگین طول نهایی بدن)/۱۰۰×میانگین وزن نهایی بدن

پروتئین مصرف شده/افزایش وزن= بازده پروتئین

افزایش وزن/غذای مصرف شده= ضریب تبدیل غذایی

به‌منظور سنجش و بررسی پاسخ ایمنی در پایان آزمایش نمونه‌برداری به‌عمل آمد. برای نمونه‌برداری، ماهیان سریعاً در داخل محلول ۲ فنوکسی اتانول با غلظت ۰/۵ میلی‌لیتر به‌ازای هر لیتر آب قرار می‌گیرند و پس از بی‌هوشی اقدام به زیست‌سنجی ماهیان شد و سپس از ماهیان خون‌گیری شد. ابتدا جهت تهیه پلاسما نمونه‌های خون ماهیان با سرعت ۱۶۰۰ گرانش و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ می‌شوند تا نمونه‌های پلاسما جمع‌آوری شوند (Webb و همکاران، ۲۰۰۷). موکوس ماهیان جهت اندازه‌گیری فعالیت ضدباکتریایی جمع‌آوری شد. برای این کار ابتدا سه ماهی از هر تکرار برداشته شد و به‌مدت یک دقیقه در فسفات بافر نمکی ۱۰ میلی‌مول (PBS, pH ۷٫۵, containing ۱۱۵ mM NaCl) قرار داده شد و سپس موکوس از سطح پوست ماهیان به‌وسیله یک تکه پنبه استریل جمع‌آوری شد. موکوس‌های جمع‌آوری شده به‌میزان ۴ برابر با PBS رقیق شد و پس از به‌هم خوردن به‌مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ گرانش و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند (Aranishi و Nakane، ۱۹۹۷). نمونه پلاسما و موکوس داخل فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای انجام آزمایش‌ها نگه‌داری می‌شوند. فعالیت لیزوزیم سرم براساس روش Kim و Austin (۲۰۰۶) و بر مبنای لیز باکتری گرم مثبت حساس به آنزیم لیزوزیم یعنی *میکروکوکوس لیزودیکتکوس* اندازه‌گیری می‌شود. جهت اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان از آزمایش همولیز در ژل آگاروز استفاده شد (Brata، ۱۹۹۳). برای این کار ابتدا آگاروز ۱/۵ درصد در بافر فسفات (حاوی ۰/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم و ۱/۵ میلی‌مول کلریدکلسیم با pH= ۷/۲) تهیه شد. مقدار ^{8}۱۰×۱ گلبول قرمز خرگوش شسته شده با بافر فسفات در دمای ۵۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد به آگارز اضافه شد. مخلوط آگارز حاوی گلبول‌های قرمز خرگوش داخل پلیت‌ها توزیع گردید. پلیت‌ها به‌مدت یک شب در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس حفرات به قطر ۳ میلی‌متر و با فاصله ۲ سانتی‌متر از هم در آگارز ایجاد شد و در هر حفره میزان ۲۰ میکرولیتر از سرم نمونه ریخته شد. پلیت‌ها در محیط مرطوب و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت انکوبه شده و

پس از آن قطر هاله لیز گلبولی با خط‌کش مخصوص اندازه‌گیری شد. ایمنوگلوبولین کل با روش Siwicki و همکاران (۲۰۰۴) اندازه‌گیری شد. در این روش گلوبولین‌ها با استفاده از محلول ۱۲ درصد پلی اتیلن گلیکول رسوب داده شد و براساس تفاوت محتوای پروتئین در طول موج ۵۹۰ نانومتر در قبل و بعد از ترسیب، میزان ایمنوگلوبولین کل محاسبه گردید. پروتئین کل براساس روش بیوره و با استفاده از کیت شرکت زیست‌شیمی اندازه‌گیری شد. برای تعیین میزان ایمنی غیراختصاصی در ماهیان، فعالیت ضدباکتریایی پلاسما و موکوس بر علیه باکتری *Aeromonas hydrophila* به‌عنوان یک باکتری بیماری‌زای رایج در آبزی‌پروری براساس روش Rao و همکاران (۲۰۰۶) اندازه گیری شد.

نمونه‌های خونی از سیاهرگ دمی واقع در انتهای باله مخرجی و با استفاده از سرنگ ۲ سی‌سی گرفته شد و به‌منظور مطالعات خون‌شناسی به تیوب‌های آغشته به هپارین به آزمایشگاه بخش هماتولوژی دانشگاه خلیج فارس بوشهر منتقل گردید و بلافاصله فاکتورهای خونی شامل مقادیر WBC و RBC به‌وسیله لام هموسیتومتر نئوبار، هموگلوبین با روش Blaxhall و Daisley (۱۹۸۳) و به‌وسیله کیت مخصوص شرکت پارس آزمون و با طول موج ۵۴۰نانومتر در دستگاه اسپکتوفتومتر (مدل ۱۰۰۰-RA، شرکت Technicon، ساخت آمریکا) و درصد هماتوکریت با سانتریفیوژ میکروهماتوکریت اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (version ۱۵,۱) تحت سیستم عامل Windows انجام گرفت. از آزمون Kolmogrove-Smirnove به‌منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها و از آزمون لیون برای تعیین برابری واریانس‌ها استفاده شد. تفاوت‌های احتمالی بین تیمارها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و پس آزمون Tukey بررسی شد. در همه آزمون‌های آماری سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

جدول ۱: ترکیب شیمیایی جیره مصرفی در طول آزمایش (میانگین ± خطای استاندارد)

	درصد در ماده خشک			
ترکیب	رطوبت	پروتئین	چربی	خاکستر
میزان	۱۰±۰/۱۷	۴۷/۸±۰/۴۱	۱۳/۹۲±۰/۲۲	۹/۲۳±۰/۱۲

جدول۲: فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب محیط پرورش (میانگین ± خطای استاندارد)

دما (درجه سانتی گراد)	اکسیژن محلول (ppm)	pH	شوری (ppt)	تعویض روزانه آب (درصد)
۲۷/۱±۰/۹	۶/۳ ± ۰/۵۵	۷/۵±۰/۱۵	۴۸ ± ۰/۵	۱۰-۳۰

نتایج

نتایج مربوط به اندازه‌گیری پارامترهای فیزیکو شیمیایی آب در جدول ۲ آمده است. همان‌طورکه در جدول مشاهده می‌شود تمام پارامترها شامل pH، دما، اکسیژن و شوری آب در محدوده نرمال قرار داشتند. نتایج مربوط به بررسی شاخص‌های رشد در جدول ۳ ارائه شده است. وزن نهایی، طول نهایی و شاخص وضعیت هیچ اختلاف معنی‌داری در پایان آزمایش نشان ندادند (P>۰/۰۵). بیش‌ترین میزان وزن نهایی و شاخص وضعیت در تیمار ۲ گزارش شد. نتایج مربوط به شاخص‌های تغذیه‌ای در جدول ۴ ارائه شده است. ضریب نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و ضریب کارایی پروتئین هیچ اختلاف معنی‌داری در پایان آزمایش بین تیمارها نشان ندادند (P>۰/۰۵).

نتایج مربوط به پارامترهای ایمنی غیراختصاصی تیمارهای مختلف در جدول ۵ و شکل‌های ۱ و ۲ آمده است. ایمنوگلوبولین کل، فعالیت لیزوزیم و فعالیت کمپلمان پلاسما اختلاف معنی‌داری را بین گروه شاهد و تیمارهای ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم لاکتوفرین نشان ندادند (P>۰/۰۵). فعالیت باکتری‌کشی پلاسما هیچ اختلاف معنی‌داری را بین تیمار شاهد و تیمارهای ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین نشان نداد (شکل ۱، P>۰/۰۵). هم‌چنان‌که در شکل ۲ مشاهده می‌شود فعالیت باکتری‌کشی موکوس به‌صورت معنی‌داری در تیمار ۸۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین بالاتر از تیمار شاهد بود (P<۰/۰۵). اثرات سطوح مختلف لاکتوفرین بر روی فاکتورهای خونی شامل هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول‌های قرمز و سفید در شکل‌های ۳ تا ۶ آورده شده است. غلظت هموگلوبین، درصد هماتوکریت و تعداد گلبول‌های قرمز در پایان آزمایش اختلاف معنی‌داری را بین گروه شاهد و تیمار ۱ و ۲ نشان داد (P<۰/۰۵). هم‌چنین یک روند افزایشی از نظر میزان این پارامترها در طول آزمایش بین تیمارهای آزمایشی وجود داشت، طوری‌که بیش‌ترین میزان این سه پارامتر در تیمار ۳ و کم‌ترین میزان آن در گروه شاهد مشاهده شد. تعداد گلبول‌های سفید بین تیمارهای مختلف لاکتوفرین و گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵).

جدول۳: وزن، طول استاندارد و شاخص وضعیت بچه‌ماهیان صبیتی در شروع، وسط و پایان آزمایش براساس تیمارهای مختلف (میانگین±خطای استاندارد)

	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲
وزن (گرم)			
روز ۰	۷/۶۲±۰/۰۱	۷/۵۵±۰/۰۶	۷/۶۳±۰/۰۳
روز ۲۱	۱۲/۰۲±۰/۰۸	۱۲/۳۰±۰/۲۰	۱۲/۳۳±۰/۳۳
روز ۴۲	۱۶/۰۶±۰/۲۶	۱۵/۶۷±۰/۳۱	۱۶/۱۱±۰/۰۳
طول (سانتی‌متر)			
روز ۰	۷/۲۶±۰/۰۱	۷/۲۹±۰/۰۱	۷/۳۷±۰/۰۱
روز ۲۱	۷/۵۹±۰/۰۸	۷/۴۵±۰/۱۷	۷/۴۵±۰/۱۳
روز ۴۲	۸/۷۷±۰/۲۲	۸/۶۰±۰/۱۱	۸/۴۲±۰/۰۷
شاخص وضعیت			
روز ۰	۱/۹۹±۰/۰۱	۱/۹۵±۰/۰۱	۱/۹۰±۰/۰۱
روز ۲۱	۲/۷۴±۰/۱۰	۲/۹۸±۰/۱۶	۲/۹۷±۰/۰۸
روز ۴۲	۲/۳۹±۰/۲۰	۲/۴۶±۰/۱۰	۲/۶۹±۰/۰۷

نبود حروف در هر ردیف نشانه عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

جدول۴: ضریب تبدیل غذایی، ضریب کارایی پروتئین و نرخ رشد ویژه بچه‌ماهیان صبیتی در طول آزمایش براساس تیمارهای مختلف (میانگین±خطای استاندارد)

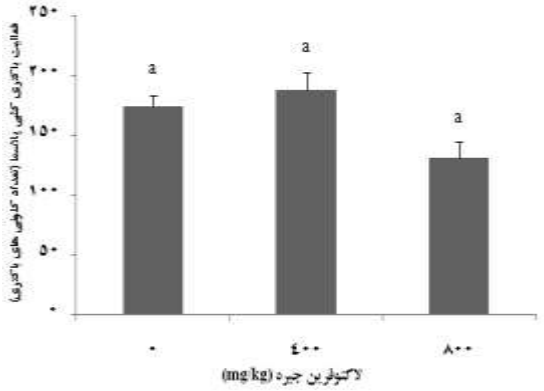
	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲
ضریب تبدیل غذایی			
دوره ۱	۳/۷۹±۰/۲۶	۳/۴۶±۰/۰۷	۳/۶۴±۰/۱۴
دوره ۲	۴/۶۱±۰/۰۸	۴/۸۴±۰/۱۲	۴/۹۰±۰/۱۳
کل	۴/۲۰±۰/۱۳	۴/۱۵±۰/۰۸	۴/۲۷±۰/۱۹
ضریب کارایی پروتئین			
دوره ۱	۰/۵۵±۰/۰۵	۰/۵۷±۰/۰۱	۰/۵۵±۰/۰۲
دوره ۲	۰/۴۵±۰/۰۱	۰/۳۷±۰/۰۲	۰/۳۷±۰/۰۴
کل	۰/۵۱±۰/۰۳	۰/۴۸±۰/۰۱	۰/۴۶±۰/۰۲
نرخ رشد ویژه (٪ در روز)			
دوره ۱	۲/۲۷±۰/۰۳	۲/۴۳±۰/۰۴	۲/۳۹±۰/۱۳
دوره ۲	۱/۴۴±۰/۱۱	۱/۲۰±۰/۰۳	۱/۳۳±۰/۰۵

نبود حروف در هر ردیف نشانه عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

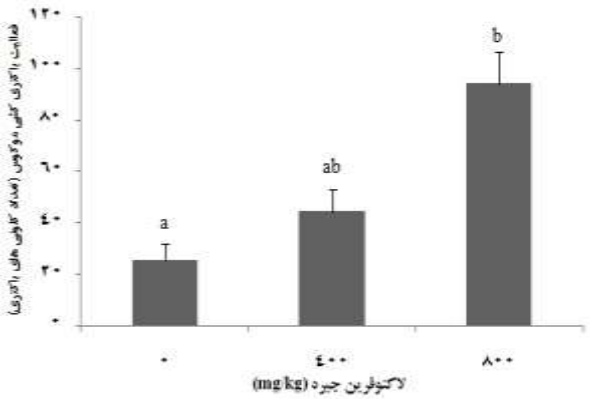
جدول ۵: پاسخ ایمنی غیراختصاصی پلاسما بچه‌ماهیان صبیتی در پایان آزمایش براساس تیمارهای مختلف (میانگین ± خطای استاندارد)

	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲
ایمنوگلوبولین کل (گرم/ دسی‌لیتر)	۵/۳۹±۰/۴۲	۵/۵۰±۰/۹۸	۵/۴۸±۰/۶۳
فعالیت لیزوزیم پلاسما (میکروگرم/میلی‌لیتر)	۲۶/۶۷±۱/۸۵	۲۸±۸/۱۸	۲۳±۴/۱۶
فعالیت کمپلمان پلاسما (شعاع هاله عدم رشد (میلی‌متر مربع))	۴۰/۲۶±۳/۳۹	۶۱/۹۰±۵/۸۲	۵۰/۷۸±۱/۷۸

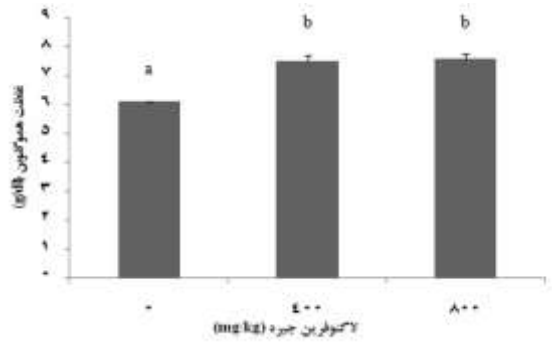
نبود حروف در هر ردیف نشانه عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد



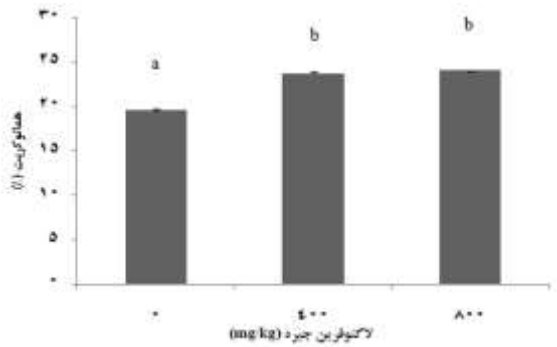
شکل ۱: نمودار فعالیت باکتری‌کشی پلاسما بچه‌ماهیان صبیتی بعد از ۴۲ روز تغذیه با سطوح مختلف لاکتوفرین (میانگین±خطای استاندارد)



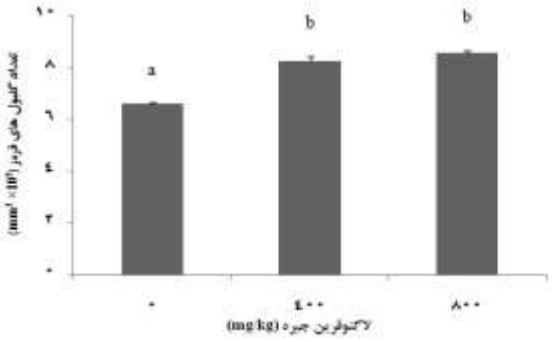
شکل ۲: نمودار فعالیت باکتری‌کشی موکوس بچه‌ماهیان صبیتی بعد از ۴۲ روز تغذیه با سطوح مختلف لاکتوفرین (میانگین ± خطای استاندارد)



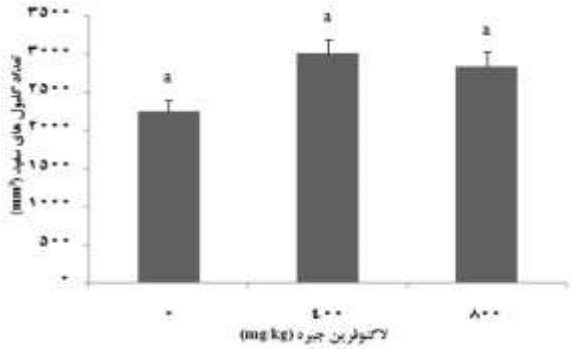
شکل ۳: غلظت هموگلوبین بچه‌ماهیان صبیتی بعد از ۴۲ روز تغذیه با سطوح مختلف لاکتوفرین (میانگین ± خطای استاندارد)



شکل ۴: درصد هماتوکریت بچه‌ماهیان صبیتی بعد از ۴۲ روز تغذیه با سطوح مختلف لاکتوفرین (میانگین ± خطای استاندارد)



شکل ۵: تعداد گلبول‌های قرمز بچه‌ماهیان صبیتی بعد از ۴۲ روز تغذیه با سطوح مختلف لاکتوفرین (میانگین ± خطای استاندارد)



شکل ۶: تعداد گلبول‌های سفید بچه‌ماهیان صبیتی بعد از ۴۲ روز تغذیه با سطوح مختلف لاکتوفرین (میانگین ± خطای استاندارد)

بحث

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که تحت شرایط آزمایشی حاکم در این تحقیق افزودن لاکتوفرین به جیره در دو سطح هیچ گونه تاثیر معنی‌داری بر شاخص‌های رشد و تغذیه بچه ماهی صبیتی ندارد. Welker و همکاران (۲۰۰۷) به بررسی تاثیر لاکتوفرین بر افزایش وزن بدن و میزان غذاگیری ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) پرداخته و اختلاف معنی‌داری را بین تیمارها مشاهده نکردند. Esteban و همکارانش در سال ۲۰۰۵

تاثیر لاکتوفرین را در طول دو هفته بر نرخ رشد ویژه ماهی سی‌باس سرطلایی مورد بررسی قرار داده و تاثیر معنی‌داری را مشاهده نکردند. Yokoyama و همکاران (۲۰۰۵ و ۲۰۰۶) تاثیر لاکتوفرین را بر عملکرد رشد ماهی هامور خالدار نارنجی (*Epinephelus coioides*) و کفشک ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) مورد بررسی قرار دادند و بعد از یک دوره تغذیه‌ای ۳۰ روزه هیچ‌گونه تاثیر معنی‌دار وابسته به لاکتوفرین را مشاهده نکردند. با این‌حال، Kakuta (۱۹۹۶) تاثیر مثبت و معنی‌داری از لاکتوفرین جیره را بر رشد ماهی گلدفیش کرده است. با توجه به نامشخص بودن مکانیسم تاثیرگذاری لاکتوفرین بر شاخص‌های رشد، اثرات متقابل لاکتوفرین با سایر اجزای جیره ممکن است بهبود عملکرد رشد را موجب شود. هم‌چنین تفاوت در نتایج تحقیقات مختلف می‌تواند به عواملی مانند گونه ماهی، اندازه، میزان لاکتوفرین جیره، ترکیبات جیره، شرایط پرورشی و اختصاصات سیستم گوارشی نسبت داده شود (Yokoyama و همکاران، ۲۰۰۶). در مطالعه حاضر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در عملکرد رشد و تغذیه را می‌توان به کم بودن سطوح انتخابی لاکتوفرین جیره و کوتاه بودن طول دوره آزمایش نسبت داد.

سیستم کمپلمان در ماهیان از مهم‌ترین اجزای تشکیل‌دهنده ایمنی غیراختصاصی هستند و در پاسخ به تغییرات فیزیولوژیک و پاتولوژیک تغییر می‌کنند (Ellise، ۱۹۹۹). کمپلمان ماهی دارای مشخصاتی متفاوتی از کمپلمان پستانداران است برای مثال در برابر حرارت ناپایدار است و برای ایجاد واکنش نیاز به درجه حرارت پائین‌تری داشته و در میان ماهیان مختلف برای برخی از گونه‌های ماهیان اختصاصی‌تر است(سلطانی، ۱۳۸۷). میزان فعالیت کمپلمان ماهی آزاد اقیانوس اطلس پس از ۱۹ روز تغذیه با سطوح مختلف لاکتوفرین تغییر معنی‌داری نکرد (Lygren و همکاران، ۱۹۹۹). لاکتوفرین جیره هیچ نوع تاثیر معنی‌داری روی فعالیت همولیتیک کمپلمان سرم ماهی سی‌باس سرطلائی (*Sparus aurata*) نداشت (Esteban و همکاران، ۲۰۰۵). هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگر مشخص شد که میزان فعالیت کمپلمان ماهی تیلاپیای نیل پس از ۸ هفته تغذیه با سطوح مختلف لاکتوفرین تغییر نمی‌کند (Welker و همکاران، ۲۰۰۷). یکی از نقش‌های فیزیولوژیک لاکتوفرین تحریک پاسخ ایمنی غیراختصاصی (Kamilya و همکاران، ۲۰۰۶) می‌باشد. در مطالعه حاضر میزان فعالیت کمپلمان در ماهیان در تیمار های مختلف اختلاف معنی‌داری نشان نداد، اما میزان آن به شکل قابل توجهی در تیمارهای ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بالاتر از گروه شاهد بود. به نظر می‌رسد که کم بودن سطوح انتخابی لاکتوفرین جیره یکی از علل این امر باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که لاکتوفرین جیره تاثیر معنی‌داری بر فعالیت لایزوزیم پلاسما ندارد.

مشابه با نتایج تحقیق حاضر Lygren و همکاران (۱۹۹۹) تاثیر دوز ۱۴۰ میلی‌گرم لاکتوفرین در کیلوگرم غذا را همراه با دو دوز ویتامین C بر روی فعالیت لیزوزیم سرم و فعالیت لیزوزیم بخش قدامی کلیه در ماهی آزاد اطلس مورد بررسی قرار دادند. نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد که لاکتوفرین جیره تاثیر معنی‌داری بر شاخص های ایمنی بررسی شده ندارد. میزان فعالیت لایزوزیم سرم در ماهی تیلاپیای نیل و در ماهی آزاد پس از تغذیه با سطوح متفاوت لاکتوفرین اختلاف معنی‌دار نشان نداد (Welkerو همکاران، ۲۰۰۷؛ Lygren و همکاران، ۱۹۹۹). Kumari و همکاران (۲۰۰۳) تاثیر سه دوز لاکتوفرین شامل ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا را بر پاسخ ایمنی غیراختصاصی گربه‌ماهی آسیایی در طول دو هفته مورد بررسی قرار دادند. نتایج آزمایشات آن‌ها نشان داد که لاکتوفرین در سطوح ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم باعث افزایش معنی‌دار سطوح لیزوزیم سرم در مقایسه با تیمار شاهد در پایان هفته اول می‌شود، با این‌حال، در پایان هفته دوم سطوح لیزوزیم در تیمارهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم نسبت به دو گروه دیگر بالاتر بود اما اختلاف آن‌ها معنی‌دار نبود. در مقابل Ren و همکاران (۲۰۰۷) گزارش دادند که فعالیت لایزوزیم در سرم مارماهی ژاپنی با تغذیه از سطوح مختلف لاکتوفرین افزایش می‌یابد. در مورد مکانیزم عمل لاکتوفرین بر فعالیت لایزوزیم اطلاعاتی در دسترس نیست. مطالعات نشان داده است که عوامل متعددی بر میزان و نیز قدرت ضدباکتریائی لیزوزیم بافت‌های مختلف ماهیان تاثیرگذار است، که از آن جمله میتوان به فصل، جنس، گونه، سن، عوامل کیفی آب به ویژه درجه حرارت، تغذیه، مرحله بلوغ جنسی، تحریک آنتی‌ژنی و عوامل استرس‌زا اشاره کرد (سلطانی،۱۳۸۷؛ Saurabh و Sahoo، ۲۰۰۸).

فعالیت ضد باکتریایی لاکتوفرین بر علیه طیف وسیعی از باکتری‌ها شامل گرم منفی یا مثبت به اثبات رسیده است (Jenssen و Hancock، ۲۰۰۹). Welker و همکاران (۲۰۰۷) دریافتند اضافه کردن لاکتوفرین به جیره تیلاپیای نیل میزان بقا آن‌ها را در مواجه با باکتری *Streptococcus iniae* افزایش می‌دهد. استفاده از لاکتوفرین در جیره ماهی قزل‌آلا مقاومت آن را در برابر عفونت‌های باکتریایی *Vibrio anguillarutn* افزایش داد (Sakai و همکاران، ۱۹۹۳). در سوی دیگر در مطالعه Lygren و همکاران (۱۹۹۹) اختلاف معنی‌داری در مقاومت ماهی آزاد اقیانوس اطلس در برابر باکتری *Aeromonas salmonicida* پس از ۱۹ روز تغذیه با سطوح مختلف لاکتوفرین و ویتامین C مشاهده نشد. در این مطالعه به‌دلیل ارزشمند بودن گونه امکان انجام آزمایش رویارویی باکتریایی برای ماهیان وجود نداشت. اما میزان فعالیت ضدباکتریایی موکوس و پلاسما بر علیه باکتری *Aeromonas hydrophila* ماهی صبیتی به

عنوان یک شاخص مهم ایمنی مورد ارزیابی قرار گرفت. در مطالعه حاضر میزان فعالیت ضدباکتریایی پلاسما و موکوس ماهیان به‌صورت معنی‌داری تغییر نکرد، هرچند که تعداد کلونی‌های باکتری در تیمار ۸۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری بالاتر بود. با توجه به این‌که سطح ۴۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین تاثیر معنی‌داری بر روی میزان فعالیت ضدباکتریایی موکوس نداشت و به‌علاوه لاکتوفرین یک محرک ایمنی به‌حساب می‌آید و اضافه کردن آن به جیره اصولاً نباید کاهش فعالیت ضدباکتریایی موکوس را به‌همراه داشته باشد. لذا می‌توان استنباط کرد که اختلاف مشاهده شده در میزان فعالیت ضدباکتریایی موکوس تیمار ۲ با گروه شاهد احتمالاً بازتابی از خطای ناشی از تعداد کم نمونه‌های پلاسما برای آنالیز (به‌دلیل اختلافات فردی بین گونه‌ای در ماهیان) یا خطای دستگاهی یا انسانی در حین انجام سنجش پارامتر مذکور باشد. در همین راستا Eslamloo و همکاران (۲۰۱۲) تأثیر تغذیه با لاکتوفرین در ۵ دوز شامل ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا در طول هشت هفته را بر ایمنی غیراختصاصی هومورال تاس‌ماهی سیبری مورد بررسی قرار دادند. نتایج آزمایشات این محققین نیز نشان داد که میزان فعالیت ضدباکتریایی موکوس و پلاسما ماهیان تحت تأثیر لاکتوفرین جیره قرار نگرفت.

پروتئین‌های پلاسما در برگیرنده عناصر خونی سیستم ایمنی غیراختصاصی مثل ایمیونوگلوبولین‌ها هستند. ایمونوگلوبین‌های پلاسما یکی از ترکیبات اساسی در سیستم دفاعی هستند (Watts و همکاران، ۲۰۰۱). میزان ایمونوگلوبین کل پلاسما ماهیان در مطالعه حاضر با تغییر سطح لاکتوفرین جیره اختلاف معنی‌داری را نشان نداد با این وجود میزان Ig کل به شکل جالب توجهی در تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم نسبت سایر تیمارها افزایش یافت. میزان IgM تاس ماهی سیبری در مطالعه اسلاملو و همکاران (۱۳۹۲) با تغییر سطح لاکتوفرین جیره اختلاف معنی‌داری را نشان نداد که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. در یک مطالعه مشخص شد که میزان ایمونوگلوبین‌های موش (IgA و IgG) با استفاده از لاکتوفرین به شکل خوراکی افزایش می‌یابد (Debbabi و همکاران، ۱۹۹۸). در مورد دیگر پستانداران، افزایش میزان ایمونوگلوبین در گاوهایی که به‌مدت ۶ هفته با جیره‌های حاوی لاکتوفرین تغذیه کرده بودند مشاهده شد (Prenner و همکاران، ۲۰۰۷)، در سوی دیگر کاهش میزان ایمونوگلوبین سرم در سگ‌هایی که با لاکتوفرین تغذیه کرده بودند نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد (Handl و همکاران، ۲۰۰۸). سیستم ایمونوگلوبین‌های ماهیان دارای تفاوت‌هایی با پستانداران است، متاسفانه مطالعه‌ای در مورد اثرات لاکتوفرین بر ایمونوگلوبین کل سرم ماهیان در دست نیست و مطالعات بیش‌تری برای روشن شدن اثرات لاکتوفرین بر ایمونوگلوبین‌های ماهیان نیاز است.

طبق نتایج به‌دست آمده از این تحقیق در پارامترهای خون‌شناسی به‌استثنای تعداد گلبول‌های سفید در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت‌های معنی‌داری مشاهده شد. مطالعات Kakuta (۱۹۹۸)، Ren و همکاران (۲۰۰۷)، Welker و همکاران (۲۰۰۷) و Eslamloo و همکاران (۲۰۱۲) به‌ترتیب تاثیر لاکتوفرین جیره را بر شاخص‌های خونی کپورمعمولی، مارماهی ژاپنی، تیلاپیا نیل و تاس‌ماهی سیبری بررسی کردند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که سطوح مختلف لاکتوفرین جیره تاثیر معنی‌داری بر روی تعداد گلبول‌های قرمز، میزان هماتوکریت و هموگلوبین در مقایسه با گروه شاهد ندارند. این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر هم‌خوانی ندارد. به‌نظر می‌رسد که عواملی مانند شرایط فیزیولوژیک جانور و هم‌چنین میزان آهن موجود در غذا، در قابلیت بهبود بخشیدن به پارامترهای هماتولوژیک توسط لاکتوفرین موثر است (اسلاملو و همکاران، ۱۳۹۲). متغیرهایی نظیر گونه ماهی، جنس، سن، سیکل بلوغ جنسی، شرایط تغذیه‌ای، شرایط سلامت بدن و استرس نیز می‌توانند پارامترهای هماتولوژی را تغییر دهند (McCarthy و همکاران، ۱۹۷۳). مطالعه Kawakami و همکاران (۱۹۸۸) با مطالعه بر روی موش بیان کردند که لاکتوفرین با اثراتی که بر جذب آهن می‌گذارد باعث بهبود کمخونی و افزایش میزان هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبولهای قرمز خون می‌شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تعداد گلبول‌های قرمز و میزان هماتوکریت و هموگلوبین در تیمارهای تغذیه شده با لاکتوفرین بالاتر از گروه شاهد بود که این موضوع تاییدکننده اثرات مثبت لاکتوفرین جیره بر شاخص‌های خونی ماهی صبیتی است. هرچند مکانیسم دقیق اثر فوق‌الذکر نامشخص بوده اما احتمالاً به اثرات لاکتوفرین در جذب آهن ارتباط دارد. Welker و همکاران (۲۰۰۷) و Eslamloo و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی تاثیر لاکتوفرین بر شاخص‌های خونی گزارش دادند که تعداد گلبول سفید بین ماهیان تغذیه شده با لاکتوفرین و گروه شاهد اختلاف معنی‌دار نشان نداد. این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. در مطالعه حاضر تعدادگلبول‌های سفید اختلاف معنی‌دار را بین هیچ‌یک از تیمارها نشان نداد. این نتیجه در راستای تایید نتایج پاسخ ایمنی می‌باشد، چرا که سطوح مختلف لاکتوفرین جیره تاثیری بر روی شاخص‌های ایمنی نداشت و گلبول‌های سفید به‌عنوان یکی از پارامترهای مهم پاسخ ایمنی غیراختصاصی ماهیان به‌حساب می‌آید. این مسئله بیان‌گر این است که لاکتوفرین جیره یا سطوح انتخابی آن نمی‌توانند در ماهی صبیتی سیستم ایمنی را تحریک کند.

به‌طورکلی از مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که لاکتوفرین جیره تاثیر معنی‌داری بر عملکرد رشد و تغذیه بچه‌ماهی صبیتی در طول دوره مورد مطالعه ندارد. پاسخ ایمنی غیراختصاصی ماهیان نیز به‌صورت معنی‌داری تحت تاثیر لاکتوفرین جیره قرار نگرفت، با این‌حال، نتایج به‌دست آمده نشان داد که با افزودن لاکتوفرین به جیره فعالیت ضدباکتریایی موکوس ماهیان و شاخص‌های خونی نسبت به تیمار شاهد که با جیره فاقد لاکتوفرین تغذیه شدند بهبود یافت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از جناب آقای مهندس نجف‌آبادی رئیس ایستگاه تکثیر و پرورش ماهیان دریایی بندر امام خمینی و سایر پرسنل محترم این مجموعه به جهت همکاری در مراحل عملی و آزمایشگاهی نهایت تشکر و قدردانی را داشته باشند.

منابع

۱. **سلطانی، م.، ۱۳۸۷.** ایمنی‌شناسی ماهیان و سخت پوستان. انتشارات دانشگاه تهران. چاپ اول. ۶۹ صفحه.

۲. **اسلاملو، خ.؛ فلاحتکار، ب.؛ یوکویاما، س. و عباس علیزاده، ع.، ۱۳۹۲.** اثر تغذیه با سطوح مختلف لاکتوفرین گاوی بر عملکرد رشد و فعالیت لایزوزیم سرم و موکوس تاس‌ماهی سیبری جوان. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۹، شماره ۲، صفحات ۵ تا ۱۶.

۳. **شریف‌روحانی، م.، ۱۳۷۴.** تشخیص، پیشگیری و درمان بیماری‌ها و مسمومیت‌های ماهی. معاونت تکثیر و پروش آبزیان. اداره کل آموزش و ترویج. چاپ اول. ۷۶ صفحه.

۴. **فاطمی، س.؛ میرزرگر، ا. و سیدس. س.، ۱۳۸۶.** فارماکولوژی کاربردی ماهیان (ترجمه)، انتشارات دانشگاه تهران. چاپ اول. ۱۲۳ صفحه.

۵. **Abdelghany, A.E. and Ahmad, M.H., ۲۰۰۲.** Effects of feeding rates on growth and production of Nile tilapia, common carp and silver carp polycultured in fertilized ponds. Aquaculture Research. Vol. ۳۳, pp: ۴۱۵-۴۲۳.

۶. **Affonso, E.G.; Polez, V.L.P.; Correa, C.F.; Mazoa, A.F.; Araujo, M.R.R. and Moraes, G., ۲۰۰۲.** Blood parameters and metabolites in teleost fish colossoma macropomum exposed to sulfide or hypoxia. Comparative Biochemistry and Physiology. Vol. ۳۳, pp: ۳۷۵-۳۸۲.

۷. **Aranishi, F. and Nakane, M., ۱۹۹۷.** Epidermal protease of the Japanese eel. Fish Physiology and Biochemistry. Vol. ۱۶, pp: ۴۷۱-۴۷۸.

۸. **Barata, O., ۱۹۹۳.** Veterinary clinical immunology laboratory, Bar- Lab Inc, Vol ۲, Section. Vol. ۳, pp: ۲۴-۲۵.

۹. **Blaxhall, P.C. and Daisley, K.W., ۱۹۸۳.** Routine hematological methods for use with fish blood. Journal of Fish Biology. Vol. ۵, pp: ۷۷۱-۷۸۱.

۱۰. **Chand, R.K.; Sahoo, P.K.; Kumari, J.; Pillai, B.R. and Mishra, B.K., ۲۰۰۶.** Dietary administration of bovine lactoferrin influences the immune ability of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) and its resistance against *Aeromonas hydrophila* infection and nitrite stress. Fish & Shellfish Immunology. Vol. ۲۱, pp: ۱۱۹-۱۲۹.

۱۱. **Debbabi, H.; Dubarry, M.; Rautureau, M. and Tome, D., ۱۹۹۸.** Bovine lactoferrin induces both mucosal and systemic immune response in mice. Journal of Dairy Research. Vol. ۶۵, pp: ۲۸۳-۲۹۳.

۱۲. **Ellise, A.E., ۱۹۹۹.** Immunity to bacteria in fish. Fish & Shellfish Immunology. Vol. ۹, pp: ۲۹۱-۳۰۸.

۱۳. **Eslamloo, K.; Falahatkar, B. and Yokoyama, S., ۲۰۱۲.** Effects of dietary bovine lactoferrin on growth, physiological performance, iron metabolism and non-specific immune responses of Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. Fish & Shellfish Immunology. Vol. ۳۲, pp: ۹۷۶-۹۸۵.

۱۴. **Esteban, M.A.; Rodrıguez, A.; Cuesta, A. and Meseguer, J., ۲۰۰۵.** Effects of lactoferrin on non-specific immune responses of gilthead seabream (*Sparus auratus*). Fish & Shellfish Immunology. Vol. ۱۸, pp: ۱۰۹-۱۲۴.

۱۵. **Handl, S.; Wehr, U.; Zentek, J. and Krammer-Lukas, S., ۲۰۰۸.** Histological and immunohistochemical evaluation of duodenal and colonic biopsies after oral bovine lactoferrin supplementation in beagle puppies. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. Vol. ۱۰, pp: ۱-۷.

۱۶. **Jenssen, H. and Hancock, B.R., ۲۰۰۹.** Antimicrobial properties of lactoferrin. Biochimie. Vol. ۹۱, pp: ۱۹-۲۹.

۱۷. **Kakuta, I.; Kurokura, H.; Nakamura, H. and Yamauchi, K., ۱۹۹۶.** Enhancement of the nonspecific defense activity of the skin mucus of red sea bream by oral administration of bovine lactoferrin. Suisanzoshoku. Vol. ۴۴, pp: ۱۹۷-۲۰۲.

۱۸. **Kakuta, I., ۱۹۹۸.** Reduction of stress response in carp, *Cyprinus carpio* L., held under deteriorating environmental conditions, by oral administration of bovine lactoferrin. Journal of Fish Disease. Vol. ۲۱, pp: ۱۶۱-۱۶۸.

۱۹. **Kamilya, D.; Ghosh, D.; Bandyopadhyay, S.; Mala, B.C. and Maiti, T.K., ۲۰۰۶.** In vitro effects of bovine lactoferrin, mushroom glucan and Abrus agglutinin on Indian major carp, catla (*Catla catla*) head kidney

leukocytes. Aquaculture. Vol. ۲۵۳, pp: ۱۳۰-۱۳۹.

۲۰. **Kawakami, H.; Hiratsuka, M. and Dosako, S., ۱۹۸۸,** Effects of iron-saturated lactoferrin on iron absorption. Agricultural and Biological Chemistry. Vol. ۵۲, pp: ۹۰۳-۹۰۸.

۲۱. **Kim, D. and Austin, B., ۲۰۰۶.** Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. Fish & Shellfish Immunology. Vol. ۲۱, pp: ۵۱۳-۵۲۴.

۲۲. **Kumari, J.; Swain, T. and Sahoo, P.K., ۲۰۰۳.** Dietary bovine lactoferrin induces changes in immunity level and disease resistance in Asian catfish, *Clarias batrachus*. Veterinary Immunology and Immunopathology. Vol. ۹۴, pp: ۱-۹.

۲۳. **Lygren, B.; Sveier, H.; Hjeltnes, B. and Waagbo, R., ۱۹۹۹.** Examination of the immunomodulatory properties and the effect on disease resistance of dietary bovine lactoferrin and vitamin C fed to Atlantic salmon (*Salmo salar*) for a short-term period. Fish & Shellfish Immunology. Vol. ۹, pp: ۹۵-۱۰۷.

۲۴. **McCarthy, D.H.; Stevensom, J.P. and Roberts, M.S., ۱۹۷۳.** Some blood parameters of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). J. Fish Biology. Vol. ۵, pp: ۱-۸.

۲۵. **Marcouli, P.A.; Alexis, M.N.; Andriopoulou, A. and Georgudaki J., ۲۰۰۶.** Dietary lysine requirement of juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Aquaculture Nutrition. Vol. ۱۲, pp: ۲۵-۳۳.

۲۶. **Prenner, M.L.; Prgomet, C.; Sauerwei, H.; Pfaffl, M.W.; Broz, J. and Schwarz, F.J., ۲۰۰۷.** Effects of lactoferrin feeding on growth, feed intake and health of calves. Archives of Animal Nutrition. Vol. ۱۰۶۱, No. ۱, pp: ۲۰-۳۰.

۲۷. **Rahimnejad, S.; Agh, N.; Kalbassi, M.R. and Khosravi, S., ۲۰۱۲.** Effect of dietary bovine lactoferrin on growth, haematology and non-specific immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture Research. Vol. ۴۳, pp: ۱٤٥۱-۱٤٥۹.

۲۸. **Rao, Y.V.; Das, B.K.; Jyotyrmayee, P. and Chakrabarti, R., ۲۰۰۶.** Effect of Achyranthes aspera on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology. Vol. ۲۰, pp: ۲۶۳-۲۷۳.

۲۹. **Ren, T.; Koshio, Sh.; Ishikawa, M.; Yokoyama, S.; Micheal, F.R.; Uyan, O. and Tung, T.H., ۲۰۰۷.** Influence of dietary vitamin C and bovine lactoferrin on blood chemistry and non-specific immune responses of Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquaculture. Vol. ۲۶۷, pp: ۳۱–۳۷.

۳۰. **Sakai, M.; Otubo, T.; Atsuta, S. and Kobayashi, M., ۱۹۹۳.** Enhancement of resistance to bacterial infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by oral administration of bovine lactoferrin. Journal of Fish Disease. Vol. ۱۶, pp: ۲۳۹-۲۴۷.

۳۱. **Sakai, M., ۱۹۹۹.** Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture. Vol. ۱۷۲, pp: ۶۳-۹۲.

۳۲. **Sarvi, k.; Niksirat, H.; Mojazi Amiri, B.; Mirtorabi, S.M.; Rafiee, G.R. and Bakhtiyari, M., ۲۰۰۶.** Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). Aquaculture. Vol. ۲۵۶, pp: ۵۶۴-۵۶۹.

۳۳. **Saurabh, S. and Sahoo, P.K., ۲۰۰۸.** Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. Aquaculture Research. Vol. ۳۹, pp: ۲۲۳-۲۳۹.

۳۴. **Siwicki, A.K.; Anderson, D.P. and Rumsey, G.L., ۱۹۹۴.** Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Veterinary lmmunology and lmmunopathology. Vol. ۴۱, pp: ۱۲۵-۱۳۹.

۳۵. **Watts, M.; Munday, B.L. and Burke, C.M., ۲۰۰۱.** cDNA sequences and organization of IgM heavy hain genes in two holostean fish. Developmental & Comparative Immunology. Vol. ۱۹, pp: ۱۵۳-۱۶۴.

۳۶. **Webb, M.A.H.; Allert, J.A.; Kappenman, K.M.; Marcos, J.; Feist, G.W.; Schreck, C.B. and Shackleton, C.H., ۲۰۰۷.** Identification of plasma glucocorticoids in pallid sturgeon in response to stress. General and Comparative Endocrinology. Vol. ۱۵۴, pp: ۹۸-۱۰۴.

۳۷. **Welker, T.L.; Lim, C.H.; Yildirim-Aksoy, M. and Klesius, P.H., ۲۰۰۷.** Growth, immune function, and disease and stress resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed graded levels of bovine lactoferrin. Aquaculture. Vol. ۲۶۲, pp: ۱۵۶-۱۶۲.

۳۸. **Yokoyama, S.; Koshio, Sh.; Takakura, N.; Oshida, K.; Ishikawa, M.; Gallardo-Cigarroa, F.J.; Catacutan, M.R. and Teshima, S.H., ۲۰۰۶.** Effect of dietary bovine lactoferrin on growth response, tolerance to air exposure and low salinity stress conditions in orange spotted grouper, *Epinephelus coioides*. Aquaculture. Vol. ۲۵۵, pp: ۵۰۷-۵۱۳.

۳۹. **Yokoyama, S.; Koshio, S.; Takakura, N.; Oshida, K.; Ishikawa, M.; Gallardo-Cigarroa, F.J. and Teshima, S., ۲۰۰۵.** Dietary bovine lactoferrin enhances tolerance to high temperature stress in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture. Vol. ۲۴۹, pp: ۳۶۷-۳۷۳.