13 (3) 269-276, Autumn 2021

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

The effects of singular or combined administration of *Pediococcus acidilactici* and *Raffinos* on blood and non-specific immune parameters of goldfish (*Carassius auratus*)

Delara Sepehrfar* *, Seyed Hossein Hoseinifar, Ali Jafarnodeh

Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Key Words
Adjuvant
Blood characteristics
Non-specific serum immunity
Carassius auratus

Abstract

Introduction: Examination of blood and immune indicators is one of the most important items in the field of aquatic health and nutrition plays an important role in maintaining aquatic health conditions by regulating the non-cellular and humoral immune systems. This study was performed to investigate the effect of singular or combined administration of *Pediococcus acidilactici* and *Raffinos* on blood indices and non-specific immune parameters in the diet of goldfish (*Carassius auratus*).

Materials & Methods: 180 goldfish with an average weight of 26.0±3.18, after 10 days of adaptation to laboratory conditions, were fed in 4 treatments with 3 repetitions for 2 months. Experimental treatments included: commercial diet (control group), commercial diet supplemented with 0.9 g kg^{-1} *P. acidilactici*, 10 g kg^{-1} Raffinos and simultaneously supplemented with *P. acidilactici* and *Raffinos*.

Result: According to the results, there was no significant difference between the treatments in the blood indicators compared to the control group (P>0.05). The comparison was with the control group, however, there was no significant difference between the control group and the treatments (P>0.05). At the end of the study, the results revealed no significant differences with this dose amongst blood indices and non-specific immune parameters in any of the experimental groups (P>0.05).

Conclusion: Therefore, it is necessary to use the right dose of the desired adjuvant, because if irrelevant doses are used, no changes in the aquatic immune system may occur. Excessive doses suppress the immune response, and lower doses do not affect pathogens.

* Corresponding Author's email: delara.sepehrfar@gmail.com
Received: 20 June 2020; Reviewed: 22 July 2020; Revised: 23 September 2020; Accepted: 3 November 2020
(DOI): 10.22034/AEJ.2020.254009.2383

مقاله پژوهشی

تأثیر استفاده مجزا و تلفیقی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پربیوتیک *Raffinos* بر برخی شاخص‌های خونی و شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی سرم در ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus*)

دل‌آرا سپهرفر*، سیدحسین حسینی‌فر، علی جافرنوده

گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

کلمات کلیدی

محرک ایمنی
شاخص‌های خونی
ایمنی غیراختصاصی سرم
ماهی کاراس

چکیده

مقدمه: بررسی شاخص‌های خونی و ایمنی یکی از موارد بسیار مهم در زمینه بررسی سلامت آبزیان است و تغذیه نقش مهمی در حفظ شرایط بهداشتی آبزیان با تنظیم سیستم ایمنی غیرسلولی و هومورال دارد. این تحقیق به‌منظور بررسی اثر استفاده مجزا و تلفیقی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پربیوتیک *Raffinos* در جیره غذایی بر شاخص‌های خونی و ایمنی غیراختصاصی سرم در ماهی طلایی (*Carassius auratus*) انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۸۰ قطعه ماهی طلایی با میانگین وزنی ۳/۱۸±۲۶/۰ گرم، پس از ۱۰ روز دوره سازگاری با شرایط آزمایشگاه در ٤ تیمار با ۳ تکرار به‌مدت ۲ ماه تغذیه شدند. تیمارهای آزمایش شامل: جیره تجاری (گروه شاهد) و به‌ترتیب غذای تجاری مکمل شده به *P. acidilactici* (۰/۹ گرم برکیلوگرم)، *Raffinos* (۱۰ گرم برکیلوگرم) وغذای تجاری حاوی سین‌بیوتیک *P. acidilactici* و *Raffinos* بودند.

نتایج: طبق نتایج در شاخص‌های خونی هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین تیمارها نسبت به گروه شاهد دیده نشد (P>۰/۰۵)، هم‌چنین بالاترین مقدار ایمونوگلوبولین سرم و فعالیت سیستم کمپلمان سرم در تیمار سین‌بیوتیک مشاهده شد و بیش‌ترین فعالیت لیزوزیمی در تیمار پربیوتیک در مقایسه با گروه شاهد بود، با این‌حال اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد و تیمارها وجود نداشت (P>۰/۰۵). در پایان دوره، نتایج تجزیه و تحلیل شاخص‌های خونی و شاخص‌های ایمنی غیر اختصاصی در ماهی کاراس طلایی هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری را بین تیمارهای مختلف با این میزان دوز نشان نداد (P>۰/۰۵).

نتیجه‌گیری و بحث: در نتیجه به‌کارگیری دوز مناسب از محرک ایمنی مورد نظر ضروری می‌باشد چرا که در صورت استفاده از دوزهای نامربوط ممکن است هیچ‌گونه تغییری در سیستم ایمنی آبزی ایجاد نشود. مقادیر بیش از حد موجب سرکوب پاسخ ایمنی می‌گردد و دوزهای پایین‌تر هیچ تاثیری بر عوامل بیماری‌زا نمی‌گذارد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: delara.sepehrfar@gmail.com

تاریخ دریافت: ۳۱ خرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۱ مرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۲ مهر ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳ آبان ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/AEJ.2020.254009.2383

مقدمه

در سنجش پارامترهای خونی و بیوشیمیایی سرم عواملی هم‌چون فاکتورهای محیطی، عوامل کیفی آب شامل درجه حرارت، اکسیژن، pH و عوامل بیولوژیکی مثل سن، وزن، جنس، تغذیه، باکتری‌ها و پارازیت‌ها، گونه و فاکتورهای دیگر اثرگذارند (Kovacik و همکاران، ۲۰۱۹). شاخص‌های خونی از موارد مناسب جهت ارزیابی سلامت میزبان است و شناخت آن‌ها می‌تواند توجیه اقتصادی در شناسایی بیماری‌ها و تعیین وضعیت بهداشت و سلامت ماهیان داشته باشد (Behringer و همکاران، ۲۰۲۰). براساس مطالعات انجام شده مکمل‌های غذایی نقش موثری بر عملکرد آن‌ها داشته است (Harsij و همکاران، ۲۰۲۰)، از این‌رو مکمل‌های غذایی مثل پروبیوتیک‌ها، پربیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها برای بهبود سلامت آبزیان پیشنهاد شده‌اند (Amenyogbe و همکاران، ۲۰۲۰). استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند علی‌رغم افزایش تولید و اصلاح کیفیت آب، به عنوان مبارز بیولوژیک با میکروارگانیسم‌های آبزی موجب تقویت سیستم ایمنی میزبان نیز گردد (Van Doan و همکاران، ۲۰۲۰)، هم‌چنین افزودن پروبیوتیک‌ها به جیره غذایی موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و تحریک اشتها می‌گردد (Tarkhani و همکاران، ۲۰۲۰). پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* یک باکتری غیربیماری‌زاست که با اتصال به دیواره روده با باکتری‌های مضر رقابت کرده و به‌عنوان یک میکروارگانیسم زنده سبب بهبود وضعیت سلامت میزبان می‌شود و با تحریک سیستم ایمنی مانع تکثیر باکتری‌های بیماری‌زا در لوله گوارش می‌گردد (Chelliah و همکاران، ۲۰۲۰). پربیوتیک‌ها نیز اجزای غذایی غیرقابل هضمی هستند که به‌عنوان منبع غذایی برای پروبیوتیک‌ها (بیفیدوباکترها، لاکتوباسیلوس‌ها و باکتروئیدها) مطرح بوده که با افزایش رشد باکتری‌های مفید سبب بهبود وضعیت سلامت و ایمنی میزبان می‌گردند (Sanders و همکاران، ۲۰۱۹). باکتری‌های ساکن روده با تخمیر انتخابی پربیوتیک‌ها، اسیدهای چرب آزاد کوتاه زنجیره مانند استات، بوتیرات و پروپیونات و لاکتات تولید می‌کنند که موجب افزایش سلامت میزبان در برابر عوامل بیماری‌زا می‌شود (Peng و همکاران، ۲۰۱۷). اسیدهای چرب آزاد کوتاه زنجیره، با جذب از طریق اپیتلیوم روده به‌عنوان یک منبع انرژی مهم برای میزبان تلقی شده و سبب تقویت انتروسیت‌ها و بهبود جذب مواد مغذی می‌شوند و با محدود کردن جمعیت پاتوژن‌ها شرایط مناسبی برای رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک (ازجمله بیفیدوباکترها) را فراهم می‌کند (Shabani و همکاران، ۲۰۱۹). در این تحقیق پربیوتیک *Raffinos* بیش‌تر براساس توانایی‌اش در افزایش رشد میکروارگانیسم‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک انتخاب شده است. ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus*) قدیمی‌ترین ماهی پرورش یافته در چین بوده و امروزه به‌عنوان ماهی مدل یکی از رایج‌ترین کپورماهیان (Cyprinidae) برای انجام تحقیقات است که در سراسر دنیا پراکنش دارد و معمولا همه‌چیزخوار بوده و دارای رژیم غذایی متنوعی می‌باشد. از مشکلات مهم در پرورش کپورماهیان افزایش رشد، بقاو ایمنی در برابر بیماری‌های مختلف است (عادلیان و همکاران، ۱۳۹۸). به‌رغم مطالعات گذشته هم‌چون تحقیق کنعانی و همکاران (۱۳۹۹)، سپهرفر و همکاران (۱۳۹۷)، عطایی و همکاران (۱۳۹۷)، خمامی و همکاران (۱۳۹۶)، نیسی و همکاران (۱۳۹۴) و خوش‌قلب و همکاران (۱۳۹۲) که تاثیر این پروبیوتیک را بر شاخص‌های مختلف هم‌چون رشد، ایمنی موکوس، هیستومورفولوژی روده، فعالیت‌های آنزیمی در ماهیانی مثل قزل‌آلای رنگین‌کمان، کپورمعمولی و گرین ترور بررسی کردند، در زمینه اثر سین‌بیوتیکی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پربیوتیک *Raffinos* روی شاخص‌های خونی و پاسخ ایمنی غیراختصاصی سرم در ماهی کاراس طلایی، گزارشی منتشر نشده است. لذا بدین خاطر هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی به‌کارگیری اثرات مجزا و تلفیقی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پربیوتیک *Raffinos* بر شاخص‌های خونی و پاسخ ایمنی در ماهی کاراس طلایی بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به‌مدت ۹۰ روز در مرکز تحقیقات آبزی‌پروری شهید فضلی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان صورت گرفت. بدین‌منظور تعداد ۱۸۰ قطعه ماهی طلایی با میانگین وزنی ۳/۱۸±۲۶/۰ گرم پس از یک‌دوره ده روزه آداپتاسیون، به تعداد ۱۵ عدد در ۱۲ مخزن فایبرگلاس ۴۰۰ لیتری با حجم آبگیری ۱۰۰ لیتر نگه‌داری شدند. در این آزمایش از غذای تجاری ماهی کپور (شرکت فرادانه) استفاده شد (ترکیب جیره غذایی در جدول ۱ نشان داده شده است) و برای تیمارهای آزمایش، پروبیوتیک *P. acidilactici* (ساخت شرکت لاملند فرانسه) و پربیوتیک *Raffinos* (شرکت شهرآزما در تهران) ابتدا توزین سپس در محلول ژلاتین ۴ درصد حل گردید و به غذای تجاری کپور اسپری شد (جافرنوده، ۱۳۹۵)، سپس در مجاورت هوا خشک شده و در زیپ کیپ پلاستیکی در یخچال نگه‌داری شدند.

جدول ۱: ترکیب و درصد اجزاء جیره تجاری مورد استفاده در تغذیه در ماهی طلایی (*Carassius auratus*)

اجزای جیره	پروتئین خام	چربی خام	فیبر خام	خاکستر	رطوبت	فسفر کل
درصد اجزاء جیره (٪)	۳۵-۳۸	۴-۸	۴-۷	۷-۱۱	۵-۱۱	۱-۱/۵

تیمارهای آزمایش شامل: تیمار اول (شاهد) فقط با غذای تجاری و مابقی تیمارها با غذای تجاری مکمل شده به پروبیوتیک *P. acidilactici* و پربیوتیک *Raffinos* به‌ترتیب حاوی، تیمار دوم (۰/۹ گرم بر کیلوگرم پروبیوتیک)، تیمار سوم (۱۰ گرم بر کیلوگرم پربیوتیک)، تیمار چهارم (۰/۹ گرم بر کیلوگرم پروبیوتیک و ۱۰ گرم بر کیلوگرم پربیوتیک) بود (سپهرفر و همکاران، ۱۳۹۸). غذای مورد نیاز هر مخزن با توجه به نتایج به‌دست آمده از زیست‌سنجی هر مخزن پرورشی محاسبه و تنظیم گردید. ماهیان روزانه در ۳ وعده غذادهی شدند (ساعت ۸ صبح، ۱۲ ظهر و ۴ بعدازظهر)، میزان غذادهی حدود ۳ درصد وزن بدن محاسبه گردید. قبل از خونگیری تغذیه ماهیان به مدت ۲۴ ساعت قطع شد. به‌منظور ارزیابی فاکتورهای خونی و پاسخ ایمنی در انتهای دوره آزمایش از هر تکرار تعداد ۳ قطعه ماهی طلایی (۹ نمونه برای هر تیمار) به ظاهر سالم به‌صورت تصادفی انتخاب و در داخل محلول پودر گل میخک (غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم به‌ازای هر لیتر آب) قرار داده شد و پس از بی‌هوشی با استفاده از سرنگ ۲ میلی‌لیتر هپارینه و از طریق رگ ساقه دمی واقع در پشت باله مخرجی خونگیری به‌عمل آمد. نمونه خون به دو قسمت تقسیم شد و جهت بررسی شاخص‌های سلولی (CBC) و شاخص‌های بیوشیمیایی خون به میکروتیوب‌های استریل انتقال داده شد. نمونه‌های خون به‌مدت ۷ دقیقه با دور g ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و پس از جدا شدن سوپرناتانت، نمونه‌ها با استفاده از سمپلر به تیوپ‌های جداگانه که از قبل علامت گذاری شده بود انتقال یافت و در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد، سپس برای اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفت (González-Félix و همکاران، ۲۰۱۸). شاخص‌های خونی شامل تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین، تعداد گلبول‌های سفید، متوسط حجم گلبول قرمز (MCV)، متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCH) و متوسط غلظت هموگلوبین سلولی (MCHC) طبق معادلات استاندارد اندازه‌گیری شدند (سپهرفر و همکاران، ۱۳۹۶).

(MCV) حجم متوسط گلبولی (فمتولیتر) $MCV = \frac{PCV \times 10}{RBC}$

(MCH) هموگلوبین متوسط گلبولی (پیکوگرم) $MCH = \frac{Hb \times 10}{RBC}$

$MCHC = \frac{Hb \times 100}{PCV}$

(MCHC) غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (درصد)

تعداد گلبول‌های قرمز برحسب میلیون (RBC)، هماتوکریت (PCV) و هموگلوبین (Hb): تعداد گلبول‌های سفید و گلبول‌های قرمز با استفاده از لام نئوبار مورد سنجش قرار گرفت. هماتوکریت با استفاده از دستگاه میکروسانتریفیوژ به‌مدت ۷ دقیقه با دور g ۳۰۰۰ و با خط‌کش مخصوص محاسبه گردید. هموگلوبین به‌روش سیانومت هموگلوبین با استفاده از کیت هموگلوبین و با استفاده از محلول درابکین محصول شرکت پارس آزمون با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (جافرنوده، ۱۳۹۵). سنجش آنزیم لیزوزیم به‌روش کدورت‌سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد (Rather و همکاران، ۲۰۲۰). برای سنجش این آنزیم از باکتری *میکروکوکوس لوتئوس* (ATCC۴۶۹۸) به‌عنوان سوبسترا استفاده گردید. برای تهیه این سوسپانسیون، باکتری لیوفیلیزه *میکروکوکوس لوتئوس* در بافر فسفات پتاسیم (pH 7)، ۰/۰۴ مولار حل‌شده و جذب این محلول در مقابل شاهد (کووت حاوی بافر فسفات سدیم)، در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر، برابر ۰/۷-۰/۶ تنظیم شد، سپس ۲/۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری به کووت اضافه شد، بعد از ۵-۴ دقیقه به دمای تعادل رسید، سپس به کووت شاهد ۰/۵ میلی‌لیتر بافر و به کووت نمونه ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه سرم خون اضافه شد. محتویات کووت به خوبی مخلوط گردید و کاهش جذب به‌مدت ۱۰ دقیقه در طول موج ۴۵۰ نانومتر ثبت گردید. یک واحد فعالیت آنزیم، به‌صورت مقدار آنزیمی که در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کاهشی معادل ۰/۰۰۱ در دقیقه در جذب سلول‌های *میکروکوکوس لوتئوس* ایجاد می‌کند، بیان گردید. تعیین فعالیت کمپلمان سرم نیز براساس همولیز گلبول‌های قرمز خرگوش (RaRBC) و به کمک روش Waley و North (۱۹۹۷)، Boesen و همکاران (۱۹۹۹) اندازه‌گیری شد. منحنی لیز با کمک کاغذ شطرنجی (Log-Log Graph) رسم شد فعالیت کمپلمان نمونه عبارت است از حجمی از سرم که سبب ۵۰ درصد همولیز شود و از رابطه زیر به‌دست می‌آید:

ACH50 (U/ml) = k × (فاکتور رقت) × ۰/۵

(Alternative pathway total hemolytic complement assay)

در این رابطه k مقداری از سرم برحسب میلی‌لیتر است که سبب ۵۰ درصد همولیز می‌شود، ۰/۵ عدد ثابت بوده و فاکتور رقت در این تست ۰/۰۱ می‌باشد چون سرم ۱۰۰ مرتبه رقیق شده است.

تجزیه و تحلیل آماری: پس از ثبت داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن، از طریق نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ آنالیز آماری انجام شد و با نرم‌افزار ۲۰۱۳ Excel شکل‌ها رسم گردید. تمام داده‌ها براساس انحراف‌معیار±میانگین، ارائه شدند.

نتایج

تاثیر استفاده مجزا و تلفیقی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پربیوتیک *Raffinos* بر برخی شاخص‌های خونی در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج حاصل هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری در تعداد

گلبول قرمز (RBC)، گلبول‌های سفید (WBC)، میزان هماتوکریت و هموگلوبین،MCV، MCH و MCHC تیمارها نسبت به گروه شاهد نشان نداد (P>۰/۰۵). تاثیر استفاده مجزا و تلفیقی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پربیوتیک *Raffinos* بر برخی شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی سرم در جدول ۳ نشان داده شده است. طبق نتایج به‌دست آمده مقادیر ایمنوگلوبولین کل سرم در تیمارهای حاوی پروبیوتیک و پربیوتیک نسبت به گروه شاهد افزایش یافت و بالاترین مقدار ایمونوگلوبولین سرم در تیمار سین بیوتیک مشاهده شد با این حال اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد و تیمارها وجود ندارد (P>۰/۰۵). میزان فعالیت لیزوزیمی سرم در تمامی تیمارها نسبت به گروه شاهد افزایش یافت و بیش‌ترین فعالیت لیزوزیمی در تیمار پربیوتیک در مقایسه با گروه شاهد بود، با این‌حال تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵). فعالیت سیستم کمپلمان سرم در تیمار سین‌بیوتیک بیش‌ترین مقدار را داشت با این‌حال اختلاف معنی‌داری در هیچ‌یک از تیمارها مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

جدول ۲: مقایسه شاخص‌های خونی در ماهی کاراس طلایی تغذیه شده با پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* (۰/۹ گرم برکیلوگرم) و پربیوتیک *Raffinos* (۱۰ گرم بر کیلوگرم)

شاخص‌های خونی	شاهد	پروبیوتیک	پربیوتیک	سین بیوتیک
گلبول‌های قرمز (سلول/ میلی لیتر^{۶}۱۰×)	۱/۰±۱۸/۲۰ ^{a}	۱/۰±۲۸/۳۶ ^{a}	۱/۰±۴۹/۲۰ ^{a}	۱/۰±۴۶/۳۰ ^{a}
گلبول‌های سفید (سلول/ میلی‌لیتر ^{۳}۱۰ ×)	۹/۱±۶/۱۵ ^{a}	۱۰/۱±۵۳/۹۲ ^{a}	۱۰/۱±۹۶/۵۱ ^{a}	۱۳/۲±۶/۸۳ ^{a}
هماتوکریت (درصد)	۲۷/۲±۷/۸۵ ^{a}	۳۱/۱±۶۶/۵۲ ^{a}	۳۱/۱±۱۶/۸۹ ^{a}	۲۸/۲±۰۰/۰۰ ^{a}
هموگلوبین (گرم/دسی لیتر)	۷/۰±۷۷/۷۲ ^{a}	۸/۰±۶۷/۲۸ ^{a}	۸/۰±۴۲/۷۲ ^{a}	۷/۱±۵۶/۰۶ ^{a}
متوسط حجم گلبول قرمز (فمتولیتر)	۲۳۶/۲±۶۲/۳۶ ^{a}	۲۱۸/۲±۹۳/۱۸ ^{a}	۲۰۷/۲±۰۸/۰۷ ^{a}	۲۱۷/۲±۶۲/۱۷ ^{a}
متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (پیکوگرم)	۶۶/۵±۱۶/۵۶ ^{a}	۷۰/۱۷±۶۷/۴۴ ^{a}	۵۶/۶±۸۲/۶۱ ^{a}	۵۹/۱۷±۶۹/۵۳ ^{a}
متوسط غلظت هموگلوبین سلولی (٪)	۲۸/۵±۴۲/۱۶ ^{a}	۲۷/۱±۴۱/۱۹ ^{a}	۲۷/۱±۰۴/۸۰ ^{a}	۲۶/۱±۱۷/۷۴ ^{a}

جدول ۳: مقایسه شاخص‌های ایمنی غیر اختصاصی در ماهیان طلایی تغذیه شده با پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* (۰/۹ گرم برکیلوگرم) و پربیوتیک *Raffinos* (۱۰ گرم بر کیلوگرم)

شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی	شاهد	پروبیوتیک	پربیوتیک	سین بیوتیک
ایمونوگلوبین سرم (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)	۱۹/۱±۰۲/۸۵ a	۱۹/۲±۲۳/۰۹ a	۱۹/۱±۴۸/۷۷ a	۲۰/۱±۰۱/۷۷ a
فعالیت لیزوزیم سرم (واحد/ میلی‌لیتر)	۴۵/۴±۲۷/۴۹ a	۴۷/۵±۳۷/۸۷ a	۴۸/۳±۵۳/۱۷ a	۴۵/۶±۶۵/۵۲ a
سیستم کمپلمان (واحد/ میلی‌لیتر)	۱۱۸/۲±۷۸/۸۷ a	۱۱۵/۶±۰۰/۰۲ a	۱۱۸/۲±۷۴/۹۵ a	۱۲۱/۳±۸۰/۲۱ a

بحث

بررسی شاخص‌های خونی مثل شمارش گلبول‌های قرمز و سفید، میزان هموگلوبین و هماتوکریت، یکی از آیتم‌های بسیار مهم در زمینه بررسی سلامت آبزیان است که تحت تاثیر مواردی چون نوع گونه پرورشی، اندازه، سن، وضعیت فیزیولوژیکی، شرایط محیطی و رژیم غذایی تغییر می‌کند (Tani و همکاران، ۲۰۲۰). براساس مطالعات انجام شده استفاده و تجویز برخی محرک‌های ایمنی خاص مثل پروبیوتیک‌ها و پربیوتیک‌ها در جیره غذایی جهت جلوگیری از بیماری و تقویت سیستم ایمنی بدن جاندار به‌عنوان رژیم کنترلی وجود دارد. درخصوص تاثیر پروبیوتیک‌ها و پربیوتیک‌ها برفاکتورهای خونی ماهیان تحقیقات بی‌شماری صورت گرفته است و نتایج متفاوتی حاصل شده است. تاثیر تغذیه و مواد افزودنی غذایی بر شاخص‌های خونی در بعضی مطالعات مورد ارزیابی قرار گرفته است (Dügenci و همکاران، ۲۰۰۳؛ Dawood و همکاران، ۲۰۱۹). شاخص‌های خونی، با ارزیابی نیازهای غذایی همراه با جیره‌های خاص و کیفیت غذا یا استراتژی‌های غذادهی مورد بررسی قرار می‌گیرند از طرفی کمبود ویتامین‌ها، مواد معدنی و هم‌چنین سوء تغذیه و سایر عوامل مرتبط با غذا اغلب باعث کم‌خونی در ماهیان می‌گردند (Vilain و همکاران، ۲۰۱۶). تغذیه نقش مهمی در حفظ شرایط بهداشتی آبزیان با تنظیم سیستم ایمنی غیرسلولی و هومورال دارد و در نتیجه موجب افزایش مقاومت در برابر انواع مختلف بیماری‌ها می‌شود (Barman و همکاران، ۲۰۱۳). نتایج این تحقیق نشان داد که افزودن مجزا و تلفیقی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پربیوتیک *Raffinos* برفاکتورهای خونی تاثیر معنی‌داری ندارد. هرچند برخی شاخص‌ها در تیمارهای حاوی پروبیوتیک و پربیوتیک نسبت به گروه شاهد افزایش جزئی داشته است. طبق تحقیق Mazon و همکاران (۲۰۰۲) افزایش تعداد گلبول قرمز و در

نتیجه کاهش اندازه آن، نشان‌دهنده کاهش مسیر انتشار اکسیژن به بافت‌هاست، به‌عبارت دیگر با افزایش غلظت گلبول قرمز، قابلیت جذب بیش‌تر اکسیژن از آبشش و انتشار اکسیژن در بافت‌ها بالاتر می‌رود. میزان کم‌تر هموگلوبین و در نتیجه کاهش ظرفیت حمل اکسیژن، ممکن است منجر به کاهش سطح اکسیژن خون در ماهیان گروه شاهد شده باشد در نتیجه توانایی محدودتری در تامین اکسیژن برای بافت‌ها دارند. میزان فعالیت ماهی، تغییرات فصلی، دمای آب، درجه شوری، آلودگی آب، سن و تغذیه ماهی نیز بر غلظت هموگلوبین خون مؤثرند (Qiang و همکاران، ۲۰۱۳). Mohammod Mostakim و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند پایین بودن مقدار MCV می‌تواند به عنوان یک پارامتر خونی مثبت باشد زیرا با کوچک شدن حجم گلبول‌های قرمز حرکت آن‌ها در رگ‌های خونی آسان‌تر و سریع‌تر می‌گردد و از ایجاد لخته جلوگیری می‌کند، هم‌چنین پروبیوتیک به تنهایی باعث کاهش MCH خون می‌گردد. طبق گزارش Plumb و Hanson، (۲۰۱۰)، فراوانی گلبول‌های سفید خون شاخص سلامت ماهی محسوب می‌شود زیرا آمادگی بدن در برابر دفاع سلولی را نمایان می‌سازد. درنتیجه انتظار می‌رود که این ماهیان دارای مقاومت بیش‌تری در برابر بیماری و عوامل استرس‌زا باشند که این نیازمند بررسی بیش‌تر و کامل‌تری است. افزایش تعداد گلبول‌های سفید در کپور هندی (*Labeo rohita*) که با مکمل پروبیوتیک *Bacillus subtilus* تغذیه شده بودند (Nayak و همکاران، ۲۰۰۷) و در تیلاپیا *Oreochromis niloticus* که با مکمل پروبیوتیک *lactobacillus plantarum* تغذیه شده بود(Jatobá و همکاران، ۲۰۱۱) نیز مشاهده شد. نتایج مشابهی در مطالعه اثرات پربیوتیک اینولین بر قزل آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) گزارش شده است (Ortiz و همکاران، ۲۰۱۳)، هم‌چنین در تحقیقی دیگر افزودن پربیوتیک مانان الیگوساکارید به جیره غذایی گربه ماهی رودگاهی (*Ictalurus*) تاثیری بر شاخص‌های خونی مثل تعداد گلبول قرمز و سفید، هماتوکریت، هموگلوبین نداشت (Welker و همکاران، ۲۰۰۷). هم‌چنین افزودن سطوح مختلف پربیوتیک مانان اثر معنی‌داری بر فاکتورهای خونی ازجمله گلبول قرمز و سفید، هماتوکریت، هموگلوبین، متوسط حجم گلبول قرمز، متوسط هموگلوبین گلبول قرمز و متوسط غلظت هموگلوبین سلولی نداشت (Sado و همکاران، ۲۰۰۸). درک مکانیسم‌های تنظیم سیستم ایمنی برای کشف عوامل موثر بر رژیم غذایی الزامی است و درنهایت منجر به بهبود اثرات ایمنی در ماهیان می‌شود (Nayak، ۲۰۱۰). از راه‌حل‌های کاهش خطر ابتلا ماهیان به بیماری‌های مختل کننده سیستم ایمنی و افزایش کارایی آن، افزودن آنزیم‌های ضدمیکروبی در رژیم‌غذایی است (Ramaswamy و همکاران، ۲۰۰۷). در ماهی‌ها به‌دلیل محدودیت‌های ایمنی اکتسابی، ناشی از خونسرد بودن، محدود بودن آنتی‌بادی‌ها و تا حدی کند بودن تکثیر لنفوسیت‌ها، ایمنی غیراختصاصی بسیار حائز اهمیت است (Cipriano و Austin، ۲۰۰۶). ایمونوگلوبولین‌ها آنتی‌بادی‌های طبیعی هستند که در غیاب محرک آنتی‌ژنیک خارجی تولید می‌شوند و در برابر عوامل بیماری‌زا محافظت فوری و گسترده‌ای را ایجاد می‌کنند. این ویژگی آن‌ها را به‌عنوان یکی از بخش‌های حیاتی سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهی تبدیل کرده است (Magnadóttir، ۱۹۹۸). ایمونوگلوبولین در ماهیان از سلول‌های B ترشح می‌شوند که یکی از مؤلفه‌های ایمنی ذاتی می‌باشد. لیزوزیم یک آنزیم ضدباکتریایی قوی در سیستم ایمنی غیراختصاصی می‌باشد که در موکوس و سرم وجود دارد و یک عامل ضدمیکروبی طبیعی محسوب می‌شود زیرا هیدرولیز اوربیتال‌های گلیکوزییدی و موکوپلی ساکاریدی در دیواره سلولی باکتریایی را کاتالیز می‌کند. لیزوزیم در بافت‌های ماهی مانند سرم، آبشش، دستگاه گوارش و بافت غنی از لکوسیت‌ها مانند کلیه و طحال یافت می‌شود. اگرچه این آنزیم بر باکتری‌های گرم مثبت مؤثر می‌باشد اما باکتری‌های گرم منفی نیز می‌توانند توسط این آنزیم لیز شوند. در مطالعه صحرایی و همکاران (۱۳۹۸)، تاثیر محرک ایمنی گالاکتوالیگوساکارید را در جیره غذایی ماهی قرمز بررسی کردند که نتایج نشان داد که میزان آنزیم لیزوزیم در ماهیان تغذیه شده با گالاکتوالیگوساکارید افزایش یافته است. سیستم کمپلمان حاوی پروتئین‌های پلاسمای مختلفی است که از طریق انواع مختلفی سلول مثل هپاتوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های اپی‌تلیال روده تولید می‌شود. برخی پروتئین‌های کمپلمان به ایمونوگلوبولین‌ها یا ترکیبات غشایی می‌چسبند و ترکیب می‌شوند. سیستم کمپلمان بخشی ضروری و مؤثر در سیستم ایمنی ابتدایی بوده و می‌تواند باکتری‌ها را به‌سرعت تشخیص دهد و از طریق فاگوسیتوز یا اختلال در غشاء آن‌ها را نابود کند (Hoseinifar و همکاران، ۲۰۱۹). Zhang و همکاران (۲۰۱۳)، نشان دادند افزایش فعالیت کمپلمان در پلاسمای خون، نشان‌دهنده بهبود توانایی سیستم ایمنی ماهی است. برخی محققین، افزایش فعالیت کمپلمان را در اثر استفاده از محرک‌های ایمنی مختلف گزارش نمودند (Liو همکاران، ۲۰۱۳؛ Valero و همکاران، ۲۰۱۹؛ Andriamialinirina و همکاران، ۲۰۲۰). در حال حاضر، استفاده و تجویز روتین برخی محرک‌های ایمنی خاص ازجمله پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پربیوتیک *Raffinos* در آبزی‌پروری، نیازمند تحقیقات بیش‌تری است. بسیاری از این فاکتورها ازجمله: نوع محرک ایمنی، دوز به‌کار رفته، نوع آماده‌سازی و افزودن به جیره، گونه پرورشی و عوامل بیماری‌زا را باید درنظر گرفت. به‌کارگیری دوز مناسب از محرک ایمنی موردنظر ضروری می‌باشد چراکه درصورت استفاده از دوزهای نامربوط ممکن است هیچ‌گونه تغییری در سیستم ایمنی آبزی ایجاد نشود. مقادیر بیش از حد موجب سرکوب پاسخ ایمنی می‌گردد و دوزهای

پایین‌تر هیچ تاثیری بر عوامل بیماری‌زا نمی‌گذارد. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده مجزا و تلفیقی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پربیوتیک *Raffinos* در جیره غذایی در ماهی طلایی (*Carassius auratus*) با دوزهای (۰/۹ گرم بر کیلوگرم پروبیوتیک و ۱۰ گرم بر کیلوگرم پربیوتیک) هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری را بین تیمارها ایجاد نمی‌کند، پیشنهاد می‌شود از دوزهای بالاتر استفاده گردد.

منابع

۱. **اسدی‌خمامی، س.؛ مورکی، ن. و ولی‌پور، ع.، ۱۳۹۶.** تاثیر پروبیوتیک*Pediococcus acidilactici* بر رشد و شاخص‌های خونی بچه ماهی سیم. مجله علوم و فنون شیلات. دوره ۶، شماره ۱، صفحات ۱ تا ۱۲.

۲. **بهروز خوش‌قلب، م.؛ آذری‌تاکامی، ق.؛ خارا، ح. و کاظمی، ر.، ۱۳۹۲.** بررسی تاثیر سطوح مختلف *Pediococcus acidilactici* در جیره غذایی بر فاکتورهای ایمنی خون بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین کمان. مجله فیزیولوژی و تکوین جانوری. دوره ۶، شماره ۳، صفحات ۵۳ تا ۶۶.

۳. **جافرنوده، ع.، ۱۳۹۵.** بررسی خواص سینرژیستی برخی اسیدهای آلی با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی (*Lactobacillus casei*) در پرورش بچه‌ماهیان انگشت‌قدقزل‌آلای‌رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). رساله دکتری، دانشگاه ارومیه. ۱۵۰ صفحه.

۴. **کنعانی، ا.؛ شعبانی، ع. و صفری، ر.، ۱۳۹۹.** اثرات استفاده مجزا و تلفیقی از نمک پروپیونات سدیم و پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر برخی فاکتورهای رشد و بیان برخی ژن‌های مرتبط با رشد در بچه‌ماهی کپور معمولی. فصلنامه محیط زیست جانوری. دوره ۱۲، شماره ۱، صفحات ۲۹۳ تا ۲۹۸.

۵. **سپهرفر، د.؛ حسینی‌فر، س.ح. و جافرنوده، ع.، ۱۳۹۸.** تاثیر استفاده مجزا و تلفیقی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پربیوتیک *Raffinos* بر کارایی رشد و برخی خصوصیات زیست شناختی تخمک و پارامترهای اسپرم شناختی در ماهیان طلایی (*Carassius auratus*). نشریه توسعه آبزی پروری. دوره ۱۳، شماره ۴، صفحات ۶۹ تا ۷۹.

۶. **سپهرفر، د.؛ سروی‌مغانلو، ک.؛ حسینی‌فر، س.ح. و کلنگی میاندره، ح.، ۱۳۹۶.** تاثیر استفاده مجزا و تلفیقی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پودر قارچ *Agaricus bisporus* بر برخی شاخص‌های خونی و شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی سرم در بچه ماهی کپور معمولی پرورشی (*Cyprinus carpio*). مجله علمی شیلات ایران. دوره ۲۶، شماره ۵، صفحات ۶۱ تا ۷۰.

۷. **سپهرفر، د.؛ سروی‌مغانلو، ک.؛ حسینی‌فر، س.ح. و کلنگی میاندره، ح.، ۱۳۹۷.** تاثیر استفاده مجزا و تلفیقی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پودر قارچ *Agaricus bisporus* بر شاخص‌های ایمنی موکوس و هیستومورفولوژی روده در بچه ماهی کپور معمولی پرورشی (*Cyprinus carpio*). مجله فیزیولوژی و تکوین جانوری. دوره ۱۱، شماره ۲، صفحات ۲۷ تا ۳۶.

۸. **صحرایی، ح.؛ پیرعلی، ا.؛ آیت‌الهی، ف.؛ شعیب، ف. و هدایتی، ع.ا.، ۱۳۹۸.** اثرات پربیوتیک گالاکتو الیگوساکارید جیره بر روی عملکردرشد و مورفولوژی روده در ماهی قرمز (*Carassius auratus*). نشریه زیست شناسی جانوری. دوره ۱۱، شماره ۳، صفحات ۳۳ تا ۴۳.

۹. **عادلیان، م.؛ ایمانپور، م. و جعفری، و.، ۱۳۹۸.** اثرات مولتی آنزیم کمبو در جیره غذایی بر شاخص‌های رشد، بازماندگی و عملکرد تولیدمثلی ماهی قرمز. فصلنامه محیط زیست جانوری. دوره ۱۱، شماره ۱، صفحات ۲۷۳ تا ۲۸۲.

۱۰. **عطایی، خ.؛ جلالی، س.م.ع.؛ یداللهی، ف. و همت‌زاده، آ.، ۱۳۹۷.**اثرات پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر هماتولوژی، فراسنجه‌های خونی و هیستوپاتولوژی روده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان. مجله فیزیولوژی و تکوین جانوری. دوره ۱۱، شماره ۴، صفحات ۲۷ تا ۳۵.

۱۱. **نیسی، ع.؛ رفیعی، غ.؛ نعمت‌الهی، م.ع. و رضوی، س.ه.، ۱۳۹۴.** تاثیر پروبیوتیکی *Pediococcus acidilactici* بر شاخص رشد، فعالیت آنزیمی دستگاه گوارش و ترکیب بیوشیمیایی کل لاشه بچه ماهی گرین ترور. نشریه شیلات (منابع طبیعی ایران). دوره ۶۸، شماره ۴، صفحات ۶۳۵ تا ۶۴۸.

12. **Amenyogbe, E.; Chen, G.; Wang, Z.; Huang, J.; Huang, B. and Li, H., 2020**. The exploitation of probiotics, prebiotics and synbiotics in aquaculture: present study, limitations and future directions: a review. Aquaculture International. Vol. 28, pp: 1017-1041.

13. **Andriamialinirina, H.J.T.; Irm, M.; Taj, S.; Lou, J.H.; Jin, M. and Zhou, Q., 2020**. The effects of dietary yeast hydrolysate on growth, hematology, antioxidant enzyme activities and non-specific immunity of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 121, pp: 168-175.

14. **Barman, D.; Nen, P.; Mandal, S.C. and Kumar, V., 2013.** Immunostimulants for aquaculture health management. J Marine Sci Res Dev. Vol. 3, No. 3, pp: 1-11.

15. **Behringer, D.C.; Wood, C.L.; Krkošek, M. and Bushek, D., 2020.** Disease in fisheries and aquaculture. Marine Disease Ecology. 183 p.

16. **Boesen, H.T.; Pedersen, K.; Larsen, J.L.; Koch, C. and Ellis, A.E., 1999.** *Vibrio anguillarum* resistance to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum: role of O-antigen

northern snakehead fish (*Channa argus*). Aquaculture. Vol. 501, pp: 473-481.

27. **Magnadóttir, B., 1998.** Comparison of immunoglobulin (IgM) from four fish species. Icel. Agric. Sci. Vol. 12, pp: 47-59.
28. **Mazon, A.F.; Monteiro, E.A.S.; Pinheiro, G.H.D. and Fernadez, M.N., 2002.** Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. Brazilian Journal of Biology. Vol. 62, No. 4a, pp: 621-631.
29. **Mohammod Mostakim, G.; Zahangir, M.; Monir Mishu, M.; Rahman, M. and Islam, M.S., 2015.** Alteration of blood parameters and histoarchitecture of liver and kidney of silver barb after chronic exposure to quinalphos. Journal of toxicology. doi: 10.1155/2015/415984.
30. **Nayak, S.K., 2010.** Probiotics and immunity: a fish perspective. Fish and shellfish immunology. Vol. 29, No. 1, pp: 2-14.
31. **Nayak, S.K.; Swain, P. and Mukherjee, S.C., 2007**. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). Fish and shellfish immunology. Vol. 23, No. 4, pp: 892-896.
32. **Ortiz, L.T.; Rebolé, A.; Velasco, S.; Rodríguez, M.L.; Treviño, J.; Tejedor, J.L. and Alzueta, C., 2013.** Effects of inulin and fructooligosaccharides on growth performance, body chemical composition and intestinal microbiota of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture Nutrition. Vol. 19, No. 4, pp: 475-482.
33. **Peng, M. and Biswas, D., 2017.** Short chain and polyunsaturated fatty acids in host gut health and foodborne bacterial pathogen inhibition. Critical reviews in food science and nutrition. Vol. 57, No. 18, pp: 3987-4002.
34. **Plumb, J.A. and Hanson, L.A., 2010.** Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Blackwell sciences Ltd. London,UK. 492 p.
35. **Qiang, J.; Yang, H.; Wang, H.; Kpundeh, M.D. and Xu, P., 2013.** Interacting effects of water temperature and dietary protein level on hematological parameters in Nile tilapia juveniles, *Oreochromis niloticus* (L.) and mortality under *Streptococcus iniae* infection. Fish & shellfish immunology. Vol. 34, No. 1, pp: 8-16.
36. **Ramaswamy, V.; Cresence, V.M.; Rejitha, J.S.; Lekshmi, M.U.; Dharsana, K.S.; Prasad, S.P. and Vijila, H.M., 2007.** Listeria-review of epidemiology & pathogenesis. Journal of Microbiology Immunology and Infection. Vol. 40, No. 1, pp: 4-10.
37. **Rather, M.A.; Dar, T.A.; Singh, L.R.; Rather, G.M. and Bhat, M.A., 2020.** Structural-functional integrity of lysozyme in imidazolium based surface active ionic liquids. International Journal of Biological Macromolecules. Vol. 156, pp: 271-279.

structure of lipopolysaccharide. Infection and Immunity. Vol. 67, No. 1, pp: 294-301.

17. **Chelliah, R.; Saravanakumar, K.; Daliri, E.B.M.; Kim, J.H.; Lee, J.K.; Jo, H.Y. and Rubab, M., 2020.** Unveiling the potentials of bacteriocin (Pediocin L50) from *Pediococcus acidilactici* with antagonist spectrum in a *Caenorhabditis elegans* model. International Journal of Biological Macromolecules. Vol. 143, pp: 555-572.
18. **Cipriano, R.C. and Austin, B., 2006.** 12 Furunculosis and Other Aeromonad Diseases. Fish diseases and disorders. Vol. 3, 424 p.
19. **Dawood, M.A.; Eweedah, N.M.; Moustafa Moustafa, E. and Shahin, M.G., 2019.** Effects of feeding regimen of dietary *Aspergillus oryzae* on the growth performance, intestinal morphometry and blood profile of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture Nutrition. Vol. 25, No. 5, pp: 1063-1072.
20. **Dügenci, S.K.; Arda, N. and Candan, A., 2003.** Some medicinal plants as immunostimulant for fish. Journal of ethnopharmacology. Vol. 88, No. 1, pp: 99-106.
21. **González-Félix, M.L.; Gatlin III, D.M.; Urquidez Bejarano, P.; de la Reé-Rodríguez, C.; Duarte-Rodríguez, L.; Sánchez, F. and Perez-Velazquez, M., 2018.** Effects of commercial dietary prebiotic and probiotic supplements on growth, innate immune responses, and intestinal microbiota and histology of *Totoaba macdonaldi*. Aquaculture. Vol. 491, pp: 239-251.
22. **Harsij, M.; Kanani, H.G. and Adineh, H., 2020.** Effects of antioxidant supplementation (nano-selenium, vitamin C and E) on growth performance, blood biochemistry, immune status and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under sub-lethal ammonia exposure. Aquaculture. Vol. 521, pp: 734-742.
23. **Hoseinifar, S.H.; Van Doan, H. and Ashouri, G., 2019.** Galactooligosaccharide effects as prebiotic on intestinal microbiota of different fish species. RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries. Vol. 14, No. 3, pp: 266-278.
24. **Jatobá, A.; do Nascimento Vieira, F.; Buglione-Neto, C.C.; Mourino, J.L.P.; Silva, B.C.; Seiftter, W.Q. and Andreatta, E.R., 2011.** Diet supplemented with probiotic for Nile tilapia in polyculture system with marine shrimp. Fish physiology and biochemistry. Vol. 37, No. 4, pp: 725-732.
25. **Kovacik, A.; Tvrda, E.; Miskeje, M.; Arvay, J.; Tomka, M.; Zbynovska, K. and Cupka, P., 2019.** Trace metals in the freshwater fish *Cyprinus carpio*: Effect to Serum Biochemistry and Oxidative Status Markers. Biological trace element research. Vol. 188, No. 2, pp: 494-507.
26. **Li, M.; Zhu, X.; Tian, J.; Liu, M. and Wang, G., 2019**. Dietary flavonoids from *Allium mongolicum Regel* promotes growth, improves immune, antioxidant status, immune related signaling molecules and disease resistance in juvenile

Bacillus licheniformis on innate immunity, antioxidant capability and disease resistance of triangular bream (*Megalobrama terminalis*). Fish and shellfish immunology. Vol. 35, No. 5, pp: 1380-1386.

38. **Sado, R.Y.; Bicudo, Á.J.D.A. and Cyrino, J.E.P., 2008.** Feeding dietary mannan oligosaccharides to juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, has no effect on hematological parameters and showed decreased feed consumption. Journal of the World Aquaculture Society. Vol. 39, No. 6, pp: 821-826.

39. **Sanders, M.E.; Merenstein, D.J.; Reid, G.; Gibson, G.R. and Rastall, R.A., 2019.** Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. Nature reviews Gastroenterology and hepatology. Vol. 16, No. 10, pp: 605-616.

40. **Shabani, A.; Jazi, V.; Ashayerizadeh, A. and Barekatain, R., 2019.** Inclusion of fish waste silage in broiler diets affects gut microflora, cecal short-chain fatty acids, digestive enzyme activity, nutrient digestibility, and excreta gas emission. Poultry science. Vol. 98, No. 10, pp: 4909-4918.

41. **Tani, S.; Matsuo, R.; Imatake, K.; Suzuki, Y.; Takahashi, A. and Matsumoto, N., 2020.** Association of daily fish intake with serum non-high-density lipoprotein cholesterol levels and healthy lifestyle behaviours in apparently healthy males over the age of 50 years in Japanese: Implication for the anti-atherosclerotic effect of fish consumption. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases. Vol. 30, No. 2, pp: 190-200.

42. **Tarkhani, R.; Imani, A.; Hoseinifar, S.H.; Moghanlou, K.S. and Manaffar, R., 2020.** The effects of host-associated *Enterococcus faecium* CGMCC1. 2136 on serum immune parameters, digestive enzymes activity and growth performance of the Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) fingerlings. Aquaculture. Vol. 519, pp: 734-741.

43. **Van Doan, H.; Hoseinifar, S.H.; Ringø, E.; Ángeles Esteban, M.; Dadar, M.; Dawood, M.A. and Faggio, C., 2020.** Host-associated probiotics: a key factor in sustainable aquaculture. Reviews in fisheries science and aquaculture. Vol. 28, No. 1, pp: 16-42.

44. **Valero, Y.; Cortés, J. and Mercado, L., 2019.** NK-lysin from skin-secreted mucus of Atlantic salmon and its potential role in bacteriostatic activity. Fish and shellfish immunology. Vol. 87, pp: 410-413.

45. **Vilain, C.; Baran, E.; Gallego, G. and Samadee, S., 2016.** Fish and the nutrition of rural Cambodians. Asian Journal of Agriculture and Food Sciences. Vol. 4, No. 1, pp: 43-65.

46. **Welker, T.L.; Lim, C.; Yildirim-Aksoy, M.; Shelby, R. and 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. Vol. 38, No. 1, pp: 24-35.

47. **Whaley, K. and North, J., 1997.** Haemolytic assays for whole complement activity and individual components. Complement: A Practical Approach. Vol. 1, pp: 19-47.

48. **Zhang, C.; Jiang, G.; Wang, L. and Liu, W., 2013.** Combined effects of dietary fructooligosaccharide and