

## بررسی اثر کلم بروکلی (*Brassica oleracea gemmifera* L.) در جیره غذایی بر عملکرد رشد و برخی پارامترهای خونی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

- حمیدرضا نادری فارسانی\*: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵
- عبدالمجید حاجی مرادلو: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵
- وحید تقی زاده: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵
- محمدرضا ایمانیپور: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۲

### چکیده

این تحقیق به منظور بررسی تاثیر سطوح مختلف کلم بروکلی (۰، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد) بر پارامترهای خون شناختی، بیوشیمیایی و شاخص های رشد ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) انجام شد. در این تحقیق ۳۰۰ ماهی کپور در ۱۲ تانک فایبرگلاس ۴۰۰ لیتری (هر تانک شامل ۲۵ ماهی) با وزن متوسط اولیه  $24 \pm 2/11$  گرم به مدت ۸ هفته به میزان روزانه ۳ درصد از وزن بدن مورد تغذیه قرار داده شدند. نتایج نشان داد، شاخص های رشد، نرخ کارایی پروتئین (PER)، شاخص وزن بدن (BWI)، کارایی غذا (EF) و نرخ رشد (GR) در همه تیمارها نسبت به گروه شاهد بیش تر بود اما تنها میزان نرخ رشد ویژه (SGR) در تیمار با ۰/۲ درصد کلم بروکلی نسبت به شاهد افزایش معنی داری نشان داد ( $P < 0/05$ ). در ارتباط با تعداد گلبول های سفید خون (WBC)، پروتئین کل و گلبولین (GLU) در تیمار با سطح ۰/۵ درصد از کلم بروکلی نسبت به سایر تیمارها و گروه شاهد افزایش معنی داری نشان داد ( $P < 0/05$ ). همچنین، تعداد گلبول های قرمز خون (RBC)، هموگلوبین (Hb)، هماتوکریت (HCT) و اتوزینوفیل در همه تیمارها نسبت به گروه شاهد افزایش پیدا کرد اما این افزایش معنی دار نبود ( $P > 0/05$ ). در پایان می توان نتیجه گرفت که، به نظر می رسد که میزان ۰/۵ درصد کلم بروکلی در جیره غذایی کپور معمولی، می تواند باعث بهبود شاخص های رشد و پارامترهای خون شناختی و بیوشیمیایی خون این ماهی گردد.

**کلمات کلیدی:** کلم بروکلی، خون شناختی، بیوشیمیایی، رشد، کپور معمولی



## مقدمه

تراکم بیش از حد ماهی در شرایط پرورش، تغذیه نامناسب، استرس‌های بیش از حد در طول دوره پرورش، فلور باکتریایی آب و... باعث گردیده است که محیط‌های آبی منبع غنی از باکتری‌های بیماری‌زا شود و به همین دلیل ماهی‌ها نسبت به حیوانات دیگر بیش‌تر در معرض عفونت باکتریایی قرار گیرند (Trust, 1986). بنابراین، بحث بیماری در صنعت آبی‌پروری به‌طور چشمگیری افزایش یافته است (Declercq و همکاران، 2013؛ Mohammed و همکاران، 2013). تحقیقات زیادی برای رفع این مشکل صورت گرفته است. یکی از مواردی که می‌تواند باعث بهبود این مشکل شود، تقویت سیستم ایمنی غیراختصاصی می‌باشد. ترکیبات سیستم ایمنی غیراختصاصی شامل: موکوس (پوست، آبشش، مخاط‌روده) و اجزاء تشکیل‌دهنده خون (سلول‌های فاگوسیتوزکننده و کشنده طبیعی) می‌باشند (Ross و همکاران، 2000؛ Yano, 1997).

خون‌شناختی برای مشخص کردن وضعیت فیزیولوژیک سلول‌های خونی می‌باشد که در آن با خون‌گیری از ماهی و تعیین پارامترهای خونی و مقایسه کردن آن‌ها با شرایط محیط طبیعی، می‌توان از آن به‌عنوان یک ابزار پاراکلینیکی در تشخیص سلامت و درمان بیماری‌ها استفاده کرد (Knowles و همکاران، 2006؛ Fernandes و Mason, 2003). از جمله عواملی فیزیکی و شیمیایی محیطی که تاثیر بسیاری بر روی فاکتورها، آنزیم‌ها و شاخص‌های پلازما و سرم خون می‌گذارد شامل: دما، pH، شوری، قلیائیت، سن، گونه، جنس، سیکل تولیدمثل، کیفیت و کمیت غذا و... و هم‌چنین عوامل بیماری‌زای عفونی را نیز می‌توان ذکر کرد (Knowles و همکاران، 2006؛ Steinhagen و همکاران، 1990). براساس تحقیقات Stoskopf در سال 1993، بررسی سلول‌های خونی، بیوشیمی خون و هورمون‌ها می‌تواند برای تشخیص بیماری‌ها و آگاهی از وضعیت فیزیولوژیکی ماهی مورد استفاده قرار گیرد.

در این زمینه، مطالعات زیادی در زمینه بهبود تغذیه که باعث بهبود پارامترهای خون‌شناختی و بیوشیمیایی خون و در نتیجه باعث افزایش سطح سیستم ایمنی غیراختصاصی می‌گردد در ماهی‌ها صورت گرفته است. بعضی از این مطالعات، تاثیر پروبیوتیک‌ها (Nayak, 2010؛ Sharifuzzaman و Austin, 2009)، ویتامین‌ها (Ai و همکاران، 2006؛ Shaoo و Mukherjeet, 2002 a,b)، گیاهان دارویی (Zhang و همکاران، 2010؛ Yin و همکاران، 2009) را در افزایش ایمنی بدن مورد بررسی قرار

داده‌اند. اما امروزه داروهای گیاهی و طبیعی به‌دلیل عواملی چون ارزش اقتصادی و کم هزینه بودن تولید آن‌ها، کم بودن عوارض جانبی در مقایسه با داروهای شیمیایی و... باعث شده تا این منابع ارزشمند دارویی از ارزش و جایگاه خاصی در درمان برخوردار باشند (Pirbalouti Ghasemi, 2009). از سوی دیگر افزایش مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، تخریب و تحدید محیط زیست بخصوص در مواقعی که آنتی‌بیوتیک‌ها به آب‌های سطحی راه می‌یابند و عوارض جانبی این داروها بر بدن ماهی از جدی‌ترین تهدیدات استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد (Harikrishanan و همکاران، 2003؛ Nakanishi و Iwama, 1996).

یکی از این گیاهان که به‌دلیل داشتن مقادیر بالایی از مواد معدنی، آلی و ویتامین‌ها ارزش دارویی بالایی دارد، کلم بروکلی (*Brassica oleracea gemmifera L.*) می‌باشد. ترکیبات کلم بروکلی شامل: رطوبت، نیتروژن، آمینواسیدها (آرژنین، سیستئین، متیونین، هیستدین، ایزولوسین، لوسین، لیزین، فنیل‌آلانین، تیروزین، ترونین، تربیتوفان، والین)، چربی، فیبر، خاکستر، سیلیسیم، بور، سولفور، کلسیم، فسفر، سدیم، پتاسیم، منیزیم، کلر، فلور، برم، ید، روی، آلومینیوم، منگنز، آهن، مس، ملیبدون، آلفاتوکوفرول، بتاکاروتن، سلنیوم، تیامین، ریوفلاوین، نیاسین، پیریدوکسین، کلسیم پانتوتینیک، اسیدفولیک، بیوتین، کولین کلراید و اینوزیتول می‌باشد (calloway و Munson, 1961). این گیاه هم‌چنین دارای مقدار زیادی فیبر، کاروتنوئید، کلسیم، گلوکوزینولات، فلاونوئید، سلنیوم، ویتامین‌های C, E, B1, A, K است (Jeffery و همکاران، 2009؛ Borowski و همکاران، 2008؛ Moreno و همکاران، 2006؛ Jeffery و همکاران، 2003؛ Cohen و همکاران، 2000). تحقیقات نشان می‌دهند که میزان بهره‌برداری کلسیم کلم را می‌توان با کلسیم شیر مقایسه کرد (Kung و همکاران، 1939؛ Kao و همکاران، 1938؛ Fincke و Sherman, 1935). آزمایش‌های دیگر بیان می‌کنند که کلم بروکلی یک آنتی‌اکسیدان قوی می‌باشد (Yuk و همکاران، 2007؛ Zhang و همکاران، 2005؛ Koskivaara و همکاران، 1991). هم‌چنین کلم بروکلی را می‌توان به‌عنوان منبعی سرشار از کلروفیل و پروتئین معرفی کرد (Moniruzzaman و همکاران، 2007).

با توجه به منابع در دسترس تاکنون تحقیقی در ارتباط با تاثیر کلم بروکلی در سیستم ایمنی ماهی یافت نشده است اما تحقیقات نشان می‌دهند که وجود سلنیوم، کلسیم، روی، نیاسین، ویتامین‌های A, K, E, C و B... که به مقدار



خطکش با دقت ۱ میلی‌متر) اندازه‌گیری می‌شد. در پایان دوره شاخص‌های رشد شامل: میزان نرخ رشد ویژه<sup>۱</sup> (Wahli و همکاران، ۲۰۰۳)، نرخ کارایی پروتئین<sup>۲</sup> (Bai، ۲۰۰۱)، شاخص وزن بدن<sup>۳</sup> (Wang و همکاران، ۲۰۰۳)، کارایی غذا<sup>۴</sup> (Bai، ۲۰۰۱)، نرخ رشد<sup>۵</sup> (Tacon، ۱۹۹۰) و نرخ تبدیل غذا<sup>۶</sup> (Lim و همکاران، ۲۰۰۰) اندازه‌گیری شد.

#### اندازه‌گیری پیراسنجه‌های خون‌شناختی و بیوشیمیایی

**خون:** ابتدا ماهی به وسیله عصاره گل میخک با مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر بی‌هوش شدند. هم‌چنین برای کاهش احتمال اثرات تغذیه بر وضعیت متابولیسم، تغذیه ماهی در ۲۴ ساعت قبل از نمونه‌گیری متوقف شد (Baker و همکاران، ۲۰۰۵). در حدود ۲ میلی‌لیتر خون از ناحیه ساقه دمی جمع‌آوری گردید و به لوله‌های هیپارینه و غیرهیپارینه انتقال داده شد. شاخص‌های خون‌شناختی: میانگین حجم گلبول‌های قرمز<sup>۷</sup>، میانگین غلظت هموگلوبین خون<sup>۸</sup>، میانگین هموگلوبین<sup>۹</sup>، شمارش گلبول‌های قرمز خون<sup>۱۰</sup> و شمارش گلبول‌های سفید<sup>۱۱</sup> اندازه‌گیری و مورد بررسی قرار گرفت تا بتوان براساس آن‌ها به افزایش قدرت ایمنی و سلامت ماهی در تیمارهای مختلف دست یافت (Campbell، ۲۰۰۴). برای انجام این کار، شمارش اریتروسیت‌ها و لکوسیت‌ها با استفاده از لام هموسیتمتر نئوبار صورت گرفت. میزان هموگلوبین (Hb) به روش سیانومت هموگلوبین و با استفاده از محلول درایکین با اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Blaxhall و Daisley، ۱۹۷۳). هموگلوبین بر حسب گرم بر دسی‌لیتر بیان شد. بیان هماتوکریت به روش لوله‌های میکروهماتوکریت استاندارد و نیز سانتروفیوژ میکروهماتوکریت به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و با خطکش مخصوص و بر حسب درصد بیان گردید (Snieszko، ۱۹۶۰). شمارش افتراقی گلبول‌های سفید به طریق تهیه گسترش خونی و رنگ‌آمیزی با محلول گیمسا ۰/۱ نرمال و با استفاده از محلول رقیق‌کننده دیس و لام نئوبار توسط میکروسکوپ نوری انجام شد. هم‌چنین شمارش گلبول‌های قرمز با رقت‌سازی با محلول

قابل توجه در کلم بروکلی نیز وجود دارند به صورت جداگانه باعث بهبود سیستم ایمنی ماهی می‌شود (Zhou و همکاران، ۲۰۱۲؛ Hamre، ۲۰۱۱).

لذا تحقیق حاضر به منظور بررسی اثر کلم بروکلی بر فاکتورهای خون‌شناختی، بیوشیمیایی خون و هم‌چنین شاخص‌های رشد ماهی کپور معمولی صورت گرفته است.

#### مواد و روش‌ها

**تهیه ماهی:** ماهی کپور معمولی از مرکز تکثیر و پرورش ماهی کلمه سیجوال در استان گلستان تهیه و به آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انتقال داده شد. تعداد ۳۰۰ ماهی کپور در ۱۲ تانک فایبرگلاس ۴۰۰ لیتری (هر تانک شامل ۲۵ ماهی) در وزن متوسط  $24 \pm 0.11$  گرم به مدت ۸ هفته مورد تغذیه قرار داده شد. شرایط محیطی در طول آزمایش تقریباً یکسان بود (دما  $24.82 \pm 0.48$  درجه سانتی‌گراد؛ pH  $8.65 \pm 0.08$ ؛ هدایت الکتریکی  $456.75 \pm 56.73$  میکروزیمنس؛ شوری  $0.14 \pm 0.05$  ppt و اکسیژن ۷-۸ میلی‌گرم در لیتر).

**تهیه غذا:** با توجه به کارهای انجام شده (Zhang و همکاران، ۲۰۱۰؛ Yin و همکاران، ۲۰۰۹) در ارتباط با میزان دز موثر گیاهان دارویی در ارتباط با بهبود شاخص‌های رشد و پارامترهای خونی ماهی کپور معمولی، در این تحقیق چهار جیره غذایی با سطوح ۰، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد از کلم بروکلی تهیه گردید. ابتدا کلم بروکلی از مراکز فروش سبزیجات در شهرستان گرگان تهیه گردید. سپس کلم بروکلی به وسیله مخروط‌کن برقی خرد شد و در انکوباتور در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته شد تا رطوبت کاهش یابد. سپس از انکوباتور خارج شد و در هاون چینی به پودر تبدیل شد. پودر کلم بروکلی به میزان ۰، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد (گرم در صد گرم غذا) با ژلاتین ۳ درصد (گرم در ۱۰۰ سی‌سی آب) مخلوط شد و سپس بر جیره غذایی اسپری گردید. در انتها غذا در انکوباتور در دمای ۳۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا خشک شود و پس از آن در کیسه‌های پلاستیکی بسته‌بندی و علامت‌گذاری شد و تا زمان استفاده در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. غذا دهی روزانه ۲ نوبت و به میزان ۳ درصد وزن بدن صورت گرفت.

#### اندازه‌گیری شاخص‌های رشد: برای انجام زیست‌سنجی

ماهیان، هر دو هفته یک‌بار تعداد ۲۰ عدد ماهی از هر تانک به صورت کاملاً تصادفی انتخاب و میزان وزن (با استفاده از دستگاه ترازو دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم) و طول (با استفاده از

<sup>1</sup> Specific Growth Rate (SGR)

<sup>2</sup> Protein Efficiency Ratio (PER)

<sup>3</sup> Body Weight Index (BWI)

<sup>4</sup> Food Efficiency (EF)

<sup>5</sup> Growth Rate (GR)

<sup>6</sup> Feed Conversion Ratio (FCR)

<sup>7</sup> Mean Corpuscular Volume (MCV)

<sup>8</sup> Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC)

<sup>9</sup> Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH)

<sup>10</sup> Red Blood Cells (RBC)

<sup>11</sup> white blood (WBC)



دیس و لام هموسیتومتر و با استفاده از میکروسکوپ نوری انجام شد (Pearse, ۱۹۸۰). برای تعیین درصد نوع لکوسیت‌های خون از روش Blaxhall و همکاران (۱۹۷۳) استفاده گردید. همچنین برای به‌دست آوردن شاخص‌های خونی از فرمول‌های زیر استفاده شد:

$$\text{میانگین حجم گلبول‌های خون} = \frac{10 \times \text{هماتوکریت}}{\text{تعداد گلبول‌های قرمز بر حسب میلیون}}$$

$$\text{میانگین همگلوبین} = \frac{10 \times \text{همگلوبین}}{\text{تعداد گلبول‌های قرمز بر حسب میلیون}}$$

$$\text{میانگین غلظت همگلوبین} = \frac{10 \times \text{همگلوبین}}{\text{هماتوکریت}}$$

اما برای اندازه‌گیری پیراسنجه‌های بیوشیمیایی خون، لوله‌های غیرهپارینه حاوی خون در ۱۳۷۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سپس سرم خون، جداسازی گردید. اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون شامل: پروتئین کل، کلسیم، آلبومین، کلسترول به‌وسیله کیت‌های استاندارد ساخت شرکت پارس آزمون انجام گردید. اما، برای اندازه‌گیری گلبولین از اختلاف پروتئین کل از آلبومین استفاده گردید (Banacee و همکاران، ۲۰۱۰).

**تجزیه و تحلیل آماری:** تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS16 و با روش ONE-WAY ANOVA انجام شد. اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها در سطح ۰/۰۵ مورد بررسی قرار گرفت و برای تعیین اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها از آزمون LSD استفاده گردید. نتایج به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نشان داده شد.

## نتایج

**شاخص‌های رشد:** نتایج به‌دست آمده از تجزیه تحلیل شاخص‌های رشد در جدول ۱ آورده شده است. بعد از ۸ هفته

تغذیه ماهی‌های گروه تیمار با سطوح مختلف کلم بروکلی، میزان نرخ رشد ویژه (SGR)، نرخ کارایی پروتئین (PER)، شاخص وزن بدن (BWI)، کارایی غذا (EF) و نرخ رشد (GR) در همه تیمارها نسبت به گروه شاهد بیش‌تر بود، اما تنها میزان نرخ رشد ویژه (SGR) در تیمار با ۰/۲ درصد از کلم بروکلی نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد ( $P < 0.05$ ). همچنین نرخ تبدیل غذا (FCR) در همه تیمارهای تحت تاثیر کلم بروکلی نسبت به گروه شاهد بیش‌تر بود اما این اختلاف به‌صورت معنی‌دار مشاهده نگردید ( $P > 0.05$ ).

### پارامترهای خون‌شناختی و بیوشیمیایی خون: نتایج

به‌دست آمده از تجزیه و تحلیل پارامترهای خون‌شناختی و بیوشیمیایی خون در بین تیمارهای مختلف (سطوح ۰، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد از کلم بروکلی) و گروه شاهد در جدول ۲ آورده شده است. نتایج پارامترهای خون‌شناختی خون نشان داد که میزان شمارش گلبول‌های سفید (WBC)، شمارش گلبول‌های قرمز (RBC)، همگلوبین (Hb)، هماتوکریت (HCT) و اتوزینوفیل در تیمارهای ۰/۲ و ۰/۵ درصد نسبت به گروه شاهد بیش‌تر بود اما تنها میزان شمارش گلبول‌های سفید (WBC) در تیمار با ۰/۵ درصد از کلم بروکلی نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌دار نشان داد ( $P < 0.05$ ). همچنین میزان نتروفیل در تیمار ۰/۵ نسبت به گروه شاهد بیش‌تر بود اما این میزان به‌صورت معنی‌دار مشاهده نگردید ( $P > 0.05$ ). میزان شمارش گلبول‌های سفید (WBC)، میانگین حجم گلبول‌های قرمز (MCV)، میانگین همگلوبین (MCH) و لمفوسیت در تیمار ۱ درصد نسبت به گروه شاهد بیش‌تر بود اما این میزان به‌صورت معنی‌دار مشاهده نگردید ( $P > 0.05$ ). همچنین اندازه‌گیری میانگین غلظت همگلوبین (MCHC) نشان داد که مقدار MCHC در همه تیمارها نسبت به گروه شاهد کم‌تر بود اما این میزان به‌صورت معنی‌دار نبود ( $P > 0.05$ ).

جدول ۱: مقدار شاخص‌های رشد بین تیمارهای مختلف و گروه شاهد (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

تیمارها	نسبت رشد ویژه (گرم/روز)	نسبت رشد (گرم/روز)	نسبت کارایی پروتئین (%)	کارایی غذا (%)	شاخص وزن بدن (%)	نسبت تبدیل غذا
۰	۱/۱۷ $\pm$ ۰/۱۶	۰/۰۶ $\pm$ ۰/۰۱	۱/۵۳ $E^2 \pm$ ۷/۲۸	۶۲/۷۶ $\pm$ ۲/۹۸	۱/۷۹ $E^2 \pm$ ۷/۳۸	۱/۶۰ $\pm$ ۰/۰۸
۰/۲	۱/۶۰ $\pm$ ۰/۱۶	۰/۰۷ $\pm$ ۰/۰۱	۱/۷۵ $E^2 \pm$ ۲/۴۸	۷۱/۸۸ $\pm$ ۸/۴۰	۲/۱۰ $E^2 \pm$ ۳۶/۵۷	۱/۴۱ $\pm$ ۰/۱۸
۰/۵	۱/۳۴ $\pm$ ۰/۰۹	۰/۰۷ $\pm$ ۰/۰۰	۱/۵۷ $E^2 \pm$ ۲/۴۴	۶۴/۴۶ $\pm$ ۸/۷۹	۱/۸۲ $E^2 \pm$ ۴۶/۶۶	۱/۵۷ $\pm$ ۰/۲۲
۱	۱/۰۴ $\pm$ ۰/۲۸	۰/۰۶ $\pm$ ۰/۰۱	۱/۵۵ $E^2 \pm$ ۶/۱۵	۶۳/۳۹ $\pm$ ۲/۵۲	۱/۸۸ $E^2 \pm$ ۲۵/۶۷	۱/۵۸ $\pm$ ۰/۰۶

میزان E در جدول برابر با ۱۰ می‌باشد.



جدول ۲: مقدار پارامترهای خون شناختی بین تیمارهای مختلف و گروه شاهد (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

شاخص‌های خونی اندازه‌گیری شده	۰	۰/۲	۰/۵	۱
شمارش گلبول سفید (تعداد/میکرولیتر)	$1/18E^4 \pm 1422/44$	$1/39E^4 \pm 781/03$	$1/41E^4 \pm 1284/15$	$1/26E^4 \pm 1311/49$
شمارش گلبول قرمز (تعداد/میکرولیتر)	$1/37E^6 \pm 1/00E^5$	$1/47E^6 \pm 2/20E^5$	$1/63E^6 \pm 1/97E^5$	$1/20E^6 \pm 0/77E^5$
هموگلوبین (گرم/دسی‌لیتر)	$7/57 \pm 0/45$	$8/10 \pm 0/87$	$8/70 \pm 1/71$	$6/73 \pm 0/35$
هماتوکریت (درصد)	$23/67 \pm 1/15$	$26/00 \pm 4/26$	$27/70 \pm 3/22$	$21/30 \pm 1/06$
میانگین حجم گلبول‌های خون (فمتولیترا)	$1/73E^2 \pm 4/25$	$1/76E^2 \pm 2/98$	$1/70E^2 \pm 2/20$	$1/78E^2 \pm 2/93$
میانگین هموگلوبین (پیکوگرم)	$55/27 \pm 0/78$	$55/23 \pm 2/58$	$52/93 \pm 4/44$	$56/30 \pm 0/70$
میانگین غلظت هموگلوبین (گرم/دسی‌لیتر)	$32/00 \pm 0/36$	$31/33 \pm 1/96$	$31/07 \pm 2/75$	$31/63 \pm 0/45$
نتروفیل (درصد)	$9/00 \pm 1/73$	$9/00 \pm 2/00$	$9/33 \pm 1/16$	$8/67 \pm 1/16$
لمفوسیت (درصد)	$90/67 \pm 1/16$	$89/67 \pm 0/58$	$89/67 \pm 0/58$	$91/33 \pm 1/16$
ائوزینوفیل (درصد)	$0/33 \pm 0/58$	$1/33 \pm 1/53$	$1/00 \pm 1/00$	$0/00 \pm 0/00$

میزان E در جدول برابر با ۱۰ می‌باشد.

با ۰/۲ درصد از کلم بروکلی نسبت به گروه شاهد بیش تر بود اما این میزان به صورت معنی‌دار مشاهده نگردید ( $P > 0/05$ ). هم‌چنین میزان گلبولین و پروتئین کل در تیمارهای ۰/۲ و ۱ درصد نسبت به گروه شاهد بیش تر بود اما اختلاف معنی‌دار بیان نگردید ( $P > 0/05$ ).

از سوی دیگر، تجزیه و تحلیل پارامترهای بیوشیمیایی خون در جدول ۳ آورده شده است. تجزیه و تحلیل پارامترهای بیوشیمیایی خون نشان داد که غلظت پروتئین کل و گلبولین در تیمار ۰/۵ درصد از کلم بروکلی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار را نشان داد ( $P < 0/05$ ). میزان کلسترول در تیمار ۰/۵ درصد، کلسیم در تیمار ۱ درصد و آلومین در تیمار

جدول ۳: مقدار پارامترهای بیوشیمیایی خون بین تیمارهای مختلف و گروه شاهد (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

شاخص‌های بیوشیمیایی خون	۰	۰/۲	۰/۵	۱
کلسیم (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	$6/60 \pm 1/10$	$6/37 \pm 1/77$	$7/62 \pm 2/13$	$6/82 \pm 2/77$
پروتئین کل (گرم/دسی‌لیتر)	$8/51 \pm 1/22$	$9/86 \pm 0/11$	$10/21 \pm 1/21$	$9/33 \pm 0/55$
آلبومین (گرم/دسی‌لیتر)	$2/97 \pm 0/06$	$3/10 \pm 0/77$	$2/67 \pm 0/48$	$2/52 \pm 0/47$
گلبولین (گرم/دسی‌لیتر)	$5/54 \pm 1/17$	$6/75 \pm 0/78$	$7/54 \pm 1/08$	$6/82 \pm 0/50$
کلسترول (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	$1/73E^2 \pm 26/78$	$1/60E^2 \pm 30/54$	$1/96E^2 \pm 29/59$	$1/52E^2 \pm 7/76$

میزان E در جدول برابر با ۱۰ می‌باشد.

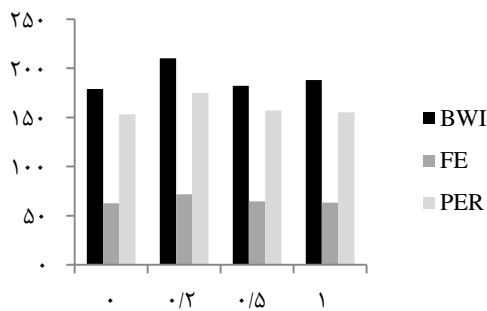
## بحث

انسان و موجودات دیگر (Ambrosone و همکاران، ۲۰۰۴؛ Christine و همکاران، ۲۰۰۴؛ Joseph و همکاران، ۲۰۰۴؛ Cohen و همکاران، ۲۰۰۰) و هم‌چنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن در صنایع غذایی صورت گرفته است (Borowski و همکاران، ۲۰۰۸).

این مطالعه برای بررسی اثر سطوح مختلف کلم بروکلی (۰، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد) بر پارامترهای شاخص‌های رشد، خون

همان‌طور که در مقدمه بیان شد، کلم بروکلی دارای مقادیر زیادی از مواد آلی، معدنی و ویتامین‌ها می‌باشد. اما با توجه به بررسی‌ها انجام شده تاکنون مطالعه‌ای در ارتباط با اثر کلم بروکلی بر شاخص‌های رشد و سیستم ایمنی در ماهی‌ها مشاهده نگردید؛ اما کارهای زیادی در ارتباط با اثر کلم بروکلی بر سیستم ایمنی

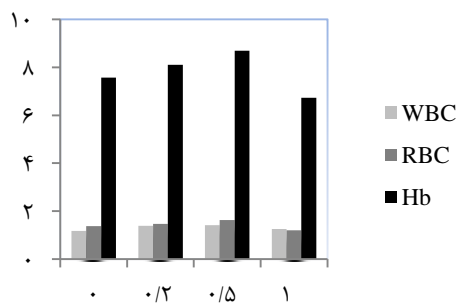




شکل ۱: نمودار مقادیر شاخص‌های کارایی غذا (FE)(%)، نرخ کارایی پروتئین (PER)(%) و شاخص وزن بدن (BWI)(%) بین تیمارها و گروه شاهد

از سوی دیگر، تجزیه و تحلیل نتایج پارامترهای خون‌شناختی نشان دادند که میزان پارامترهای WBC، RBC، Hb و HCT در تیمارهای ۰/۲ و ۰/۵ درصد به ترتیب افزایش پیدا کردند اما این مقادیر در تیمار با سطح ۱ درصد نسبت به سطح ۰/۵ درصد کاهش پیدا کرد.

هم‌چنین در ارتباط با پارامترهای بیوشیمیایی خون، میزان TOP، GLU، CHLO و Ca در تیمار ۰/۵ درصد نسبت به تیمارهای دیگر و گروه شاهد میزان بیش‌تری را نشان داد و مقادیر این پارامترها در تیمار ۱ درصد از کلم بروکلی نسبت به تیمار ۰/۵ درصد کم‌تر بود.



شکل ۲: نمودار مقادیر شاخص‌های شمارش گلبول‌های سفید (WBC) (تعداد/میکرولیتر)، شمارش گلبول‌های قرمز (RBC) (تعداد/میکرولیتر)، هماتوکریت (HCT) (%). هموگلوبین (Hb) (گرم/دسی‌لیتر) بین تیمارها و گروه شاهد ( $\times 10^6$ ) RBC و ( $\times 10^4$ ) WBC

شناختی و بیوشیمیایی خون ماهی کیور معمولی برای مطالعه اثر این گیاه بر سلامتی ماهی انجام گردید. نتایج این تحقیق در ارتباط با رشد نشان داد که میزان ۰/۲ درصد از کلم بروکلی در جیره غذایی، اثر معنی‌داری بر SGR دارد ( $P < 0.05$ ). هم‌چنین میزان SGR در سطوح ۰/۵ و ۱ درصد نسبت به گروه شاهد بیش‌تر بود اما در سطح ۱ درصد نسبت به تیمار ۰/۲ و ۰/۵ درصد میزان کم‌تری را نشان داد. از سوی دیگر شاخص‌های BWI و GR، FE، PER در تیمار ۰/۲ نسبت به سایر تیمارها و گروه شاهد میزان بیش‌تری را نشان داد و با افزایش کلم بروکلی در جیره غذایی این مقادیر کاهش پیدا کردند و اگرچه مقدار این شاخص‌ها در تیمارهای ۰/۵ و ۱ درصد نسبت به تیمار ۰/۲ درصد کم‌تر بود اما نسبت به گروه شاهد بیش‌تر بود.

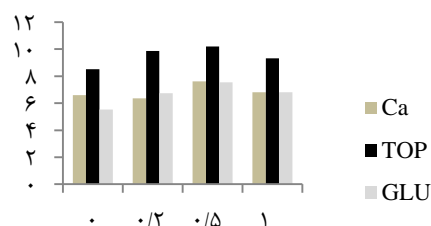
هم‌چنین میزان FCR در تیمار ۰/۲ درصد نسبت به سایر تیمارها و گروه شاهد مقدار کم‌تری را نشان داد و در سطوح ۰/۵ و ۱ درصد این میزان افزایش یافت اما نسبت به گروه شاهد میزان کم‌تری را نشان داد. به‌نظر می‌رسد که بهبود شاخص‌های رشد در تیمارهای حاوی کلم بروکلی ناشی از وجود مواد آلی (اسیدآمین، اسیدهای چرب، فیبر و...)، مواد معدنی (کلسیم، سلنیوم، فسفر، پتاسیم، سدیم و...)، ویتامین‌ها (A، B، E، K) و C و سایر عوامل ناشناخته رشد باشد که در ارتباط با هر یک از این مواد و اثر مثبت این مواد بر رشد ماهی تحقیقات زیادی صورت گرفته است (Zhou و همکاران، ۲۰۱۲؛ Jalili و همکاران، ۲۰۰۸؛ Zhong و همکاران، ۲۰۰۸). James (۲۰۰۸) در تحقیقی بیان کرد که حضور ویتامین E در جیره غذایی ماهی گلدفیش (*Carassius auratus*) باعث بهبود شاخص‌های وزن می‌گردد. اما کاهش این شاخص‌ها در تیمارهای حاوی بیش از ۰/۲ درصد کلم بروکلی می‌تواند به‌دلیل وجود بیش از حد موادی چون سلنیوم، اینوزیتول،  $\alpha$ -تکوفورول و سایر عوامل ناشناخته رشد باشد. برای مثال، سلنیوم به‌عنوان یک ریز مغذی ضروری در جیره غذای ماهی عمل می‌کند و می‌تواند باعث بهبود وظایف سیستم ایمنی گردد (Lin و Shiao، ۲۰۰۵؛ Beck و همکاران، ۱۹۹۵؛ Lorentzen و همکاران، ۱۹۹۴). به‌علاوه در تحقیقات دیگر بر سایر حیوانات بیان شده است که سلنیوم باعث بهبود رشد، تکامل، مقاومت نسبت به عفونت‌ها و سیستم ایمنی می‌گردد (Zeng و همکاران، ۲۰۰۸؛ Popham و همکاران، ۲۰۰۵، Whanger، ۲۰۰۴)؛ اما از سوی دیگر، مطالعات در ارتباط با آبیان نشان می‌دهد که وجود مقادیر بالای سلنیوم در جیره غذای ماهی می‌تواند به‌عنوان یک سم برای ماهی عمل کند (Hamilton، ۲۰۰۳؛ Hilton و همکاران، ۱۹۸۰).



کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و سایر دوستانی که در این پروژه یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

## منابع

1. **Ai, Q.; Mai, K.; Tan, B.; Xu, W.; Zhang, W.; Ma, H. and Liufu, Z., 2006.** Effects of dietary vitamin C on survival, growth and immunity of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture*. Vol. 261, pp: 327-336.
2. **Ambrosone, C.B.; McCann, S.E.; Freudenheim, J.L.; Marshall, J.R.; Zhang, Y. and Shields, P.G., 2004.** Breast cancer risk in premenopausal women is inversely associated with consumption of broccoli, a source of isothiocyanates, but is not modified by GST genotype. *J Nutr*. Vol. 134, pp: 1134-1138.
3. **Baker, D.W.; Wood, A.M.; Litvak, M.K. and Kieffer, J.D., 2005.** Hematology of juvenile *Acipenser oxyrinchus* and *Acipenser brevirostrum* at rest following forced activity. *J Fish Biol*. Vol. 66, pp: 208-221.
4. **Banaee, M.; Mirvagefei, A.R.; Rafei, G.R. and Sureda Gomila, A., 2010.** Effects of oral administration of silymarin on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fisheries, Iranian Journal of Natural Res*. Vol. 63, No. 4, pp: 271-286.
5. **Bai, S.C., 2001.** Requirements of L-ascorbic acid in a viviparous marine teleost, Korean rockfish, *Sebaster schlegeli*. In: (K. Dabrowski ed). *Ascorbic acid in aquatic organisms*. CRC press. pp: 69-85.
6. **Beck, M.; Kolbeck, P.; Rohr, L.; Shi, Q.; Morris, V. and Levander, O., 1995a.** Benign human enterovirus becomes virulent in selenium-deficient mice. *J. Med. Virol*. Vol. 43, pp: 166-170.
7. **Beck, M.; Shi, Q.; Morris, V. and Levander, O., 1995b.** Rapid genomic evolution of a non-virulent coxsackievirus B3 in selenium deficient mice results in selection of identical virulent isolates. *Nat. Med*. Vol. 1, pp: 433-441.
8. **Blaxhall, P.C. and Daisley, K.W., 1973.** Routine hematological methods for use with fish blood. *J Fish Biol*. Vol. 5, pp: 771-781.
9. **Borowski, J.; Szajdek, A.; Borowska, E.J.; Ciska, E. and Zielinski, H., 2008.** Content of selected bioactive components and antioxidant



شکل ۳: نمودار مقادیر شاخص‌های کلسیم (Ca) (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)، پروتئین کل (TOP) (گرم/دسی‌لیتر) و گلوبولین (GLU) (گرم/دسی‌لیتر) بین تیمارها و گروه شاهد

همان‌طور که در ارتباط با دلایل افزایش و کاهش مقادیر شاخص‌های خون بیان شد، به نظر می‌رسد که افزایش مقادیر پارامترهای خون‌شناختی و بیوشیمیایی خون نیز به دلیل وجود مواد آلی، معدنی، ویتامین‌ها و سایر عوامل ناشناخته باشد اما کاهش این مقادیر در سطوح بالا به دلیل وجود مقادیر بیش از حد سلنیوم، اینوزیتول و سایر عوامل ناشناخته باشد. هم‌چنین تحقیقات دیگر نشان می‌دهند که بهبود شاخص‌های رشد و پاسخ‌های سیستم ایمنی در ماهی وابستگی مستقیمی به وجود مکمل‌هایی مانند ویتامین E (Obach و همکاران، ۱۹۹۳؛ Hardie و همکاران، ۱۹۹۰)، ویتامین A (Thompson و همکاران، ۱۹۹۴)، ویتامین C (Hardie و همکاران، ۱۹۹۱؛ Lovell، ۱۹۸۵)، فیبر (Graham و همکاران، ۱۹۸۸)، کولین کلراید و کلسیم پانتوتنات (Yano و همکاران، ۱۹۸۸)، روی و مس (Shiau و Lee، ۲۰۰۶؛ Jiangu و Shiau، ۲۰۰۲) در جیره غذایی دارد.

در پایان می‌توان براساس نتایج به دست آمده از این آزمایش بیان کرد که به نظر می‌رسد اضافه کردن ۰/۵ درصد از کلم بروکلی در جیره غذایی ماهی کپور معمولی نسبت به تیمارهای دیگر و گروه شاهد ممکن است باعث بهبود شاخص‌های رشد و پارامترهای بیوشیمیایی و خون‌شناختی خون و در نهایت باعث تقویت سیستم ایمنی ماهی گردد. لذا برای تایید این پیشنهاد، باید کارهای بیش‌تری صورت گیرد.

## تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از جناب آقای مهندس علی جعفر، مهندس کشیری، مهندس نعیمی مسئولین محترم آزمایشگاه علوم



- teleost. Observations on cells of the red series. J Zool. Vol. 179, pp: 355-383.
22. **Hamilton, S.J., 2003.** Review of residue based selenium toxicity thresholds for freshwater fish. Ecotoxicol Environ Safe. Vol. 56, pp: 201-210.
  23. **Harikrishnan, R.; Nisha, M.R. and Balasundaram, C., 2003.** Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture. Vol. 221, pp: 41-50.
  24. **Hardie, L.J.; Fletcher, T.C. and Secombes, C.J., 1990.** The effect of vitamin E on the immune responses of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture. Vol. 87, pp: 1-13.
  25. **Hardie, L.J.; Fletcher, T.C. and Secombes, C.J., 1991.** The effect of dietary vitamin C on the immune responses of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture. Vol. 95, pp: 201-214.
  26. **Hilton, J.W.; Hodson, P.V. and Slinger, S.J., 1980.** The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J Nutr. Vol. 110, pp: 2527-2535.
  27. **Iwama, G. and Nakanishi, T., 1996.** Innate immunity in fish. The Fish Immune System. Academic Press, London, UK. pp: 73-114.
  28. **Jalali, M.A; Hosseini, S.A. and Imanpour, M.R., 2008.** Effect of vitamin E and highly unsaturated fatty acid-enriched *Artemia urmiana* on growth performance, survival and stress resistance of Beluga (*Huso huso*) larvae. Aquaculture Research. Vol. 39, No. 12, pp: 1286-1291.
  29. **James, R.; Vasudhevan, I. and Sampath, K., 2008.** Effect of Dietary Vitamin E on Growth, Fecundity, and Leukocyte Count in Goldfish (*Carassius auratus*). Aquaculture Bamidgah. Vol. 60, No. 2, pp: 121-127.
  30. **Jeffery, E.H.; Brown, A.F.; Kurilich, A.C.; Keck, A.S.; Matusheski, N.; Klein, B.P. and Juvik, J.A., 2003.** Variation in content of bioactive components in broccoli. Journal of Food Composition and Analysis. Vol. 16, pp: 323-330.
  31. **Jeffery, E.H. and Araya, M., 2009.** Physiological effects of broccoli. Phytochemical Reviews. Vol. 8, pp: 283-298.
  32. **Joseph, M.A.; Moysich, K.B.; Freudenheim, J.L.; Shields, P.G.; Bowman, E.D.; Zhang, Y.; Marshall, J.R. and Ambrosone, C.B., 2004.** Cruciferous vegetables, genetic polymorphisms in glutathione s-transferases properties of broccoli (*brassica oleracea* L.). Eur Food Res Technol. Vol. 226, pp: 459-465.
  10. **Borowski, J.; Szajdek, A.; Borowska, E.J.; Ciska, E. and Zielinski, H., 2008.** Content of selected bioactive components and antioxidant properties of broccoli (*brassica oleracea* L.). Eur Food Res Technol. Vol. 226, pp: 459-465.
  11. **Calloway, D.H. and Munson, A.H., 1961.** Response of cereal-fed guinea pigs to dietary broccoli supplementation and x-irradiation. J. Nutrition. Vol. 73, pp: 191-197.
  12. **Campbell, T.W., 2004.** Hematology of lower vertebrates. In: Proceedings of the 55th Annual meeting of the American college of veterinary pathologists (ACUPC).
  13. **Christine, O.; Ambrosone, C.B.; Susan, E.; McCann, S.E.; Freudenheim, J.L. and Shields, P.G., 2004.** Breast Cancer Risk in Premenopausal Women Is Inversely Associated with Consumption of Broccoli, a Source of Isothiocyanates, but Is Not Modified by GST Genotype. The Journal of Nutrition. Vol. 134, pp: 1134-1138.
  14. **Cohen, J.H.; Kristal, A.R. and Stanford, J.L., 2000.** Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. J Natl Cancer Inst. Vol. 92, pp: 61-68.
  15. **Declercq, A.M.; Haesebrouck, F.; Van den Broeck, W.; Bossier, P. and Decostere, A., 2013.** Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions. Veterinary research. Vol. 44, No. 1, pp: 27-35.
  16. **Hamre, K., 2011.** Metabolism, interactions, requirements and functions of vitamin E in fish. Aquaculture Nutrition. Vol. 17, No. 1, pp: 98-115.
  17. **Fernandes, M.N. and Mason, A.F., 2003.** Environmental pollution and fish gill morphology. In: Val AL, Kapoor, B.G (eds) Fish adaptation. Science Publishers, Enfield. pp: 203-231.
  18. **Fincke, M.L. and Sherman, H.C., 1935.** The availability of calcium from some typical foods. J. Biol. Chem. Vol. 110, pp: 421-428.
  19. **Ghasemi Pirbalouti, E., 2009.** Survey and recognition of the medicine and aromatic plants. The Press of Islamic Azad University. 500 p.
  20. **Graham, H.; Löwgren, W.; Pettersson, D. and Åm, P., 1988.** Effect of enzyme supplementation on digestion of a barley pollard based pig diet. Nutr. Rep. Vol. 38, No. 5, pp: 1073-1079.
  21. **Haider, G., 1973.** Comparative studies of blood morphology and haemopoiesis of some





- M.M., 2007. Effect of boron and nitrogen on yield and hollow stem of broccoli. *J. Soil Nature*. Vol. 1, No. 3, pp: 24-29.
44. **Moreno, D.A.; Carvajal, M.; López Berenguer, C. and García-Viguera, C., 2006.** Chemical and biological characterization of nutraceutical compounds of broccoli. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol. 41, pp: 1508-1522.
  45. **Nayak, S.K., 2010.** Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*. Vol. 29, pp: 2-14.
  46. **Obach, A.; Quentel, C. and Baudin Laurencin, F., 1993.** Effects of alpha-tocopherol and dietary oxidized fish oil on the immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Dis. Aquat. Organ.* Vol. 13, pp: 175-185.
  47. **Ross, N.; Firth, K.; AnPing, W.; Burka, J. and Johnson, S., 2000.** Changes in hydrolytic enzyme activities of naive Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. *Diseases of Aquatic Organisms*. Vol. 41, No. 1, pp: 43-51.
  48. **Pearse, A.G.E., 1980.** Histochemistry Theoretical and Applied, vols. I and II. Churchill Livingstone (Ed). London. 1055 p.
  49. **Peng, S.; Chen, L.; Qin, J.G.; Hou, J.; Yu, N.; Long, Z.; Li, E. and Ye, J., 2009.** Effects of dietary vitamin E supplementation on growth performance, lipid peroxidation and tissue fatty acid composition of black sea bream (*Acanthopagrus schlegeli*) fed oxidized fish oil. *Aquaculture Nutrition*. Vol. 15, No. 3, pp: 329-337.
  50. **Popham, H.J.R.; Shelby, K.S. and Popham, T.W., 2005.** Effect of dietary Se supplementation on resistance to baculovirus infection. *Biol Control*. Vol. 32, pp: 419-426.
  51. **Sahoo, P.K. and Mukherjee, S.C., 2002a.** Influence of high dietary a-tocopherol intakes on specific immune response, non-specific resistance factors and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquaculture Nutrition*. Vol. 8, pp: 159-167.
  52. **Sahoo, P.K. and Mukherjee S.C., 2002b.** The effect of dietary glucan, levamisole, ascorbic acid and a-tocopherol on disease resistance and non-specific immunity level in aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita*). In: *The Fifth Indian Fisheries Forum Proceedings* (ed. by S. ml and tl, and prostate cancer risk. *Nutr Cancer*. Vol. 50, pp: 206-213.
  33. **Kao, H.C.; Connerandh, R.T. and Sherman, C., 1938.** The availability of calcium from Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*. Rupr.). *J. Biol. Chem*. Vol. 123, pp: 221-228.
  34. **Knowles, S.; Hrubec, T.C.; Smith, S.A. and Bakal, R.S., 2006.** Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*). *Veterinary Clinical Pathology*. Vol. 35, No. 4, pp: 434-440.
  35. **Koskivaara, M.; Tellervo, E.V. and Prost, M., 1991.** Seasonal occurrence of gyrodactylid monogeneans on the roach (*Rutilus rutilus*) and variations between four lakes of differing water quality in Finland. *Aqua Fenn*. Vol. 21, pp: 47-55.
  36. **Kung, L.C.; Yeh, H.L. and Adolph, W.H., 1938.** The availability of calcium in vegetable food materials. *Chinese J. Physiol*. Vol. 13, pp: 307-316.
  37. **Lee, M.H. and Shiau, S.Y., 2002.** Dietary copper requirement of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune responses. *Fish Shellfish Immunol*. Vol. 13, pp: 259-270.
  38. **Li, Y. and Lovell, R.T., 1985.** Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. *J. Nutr*. Vol. 115, pp: 123-131.
  39. **Lim, C.; Klesius, P.H.; Li, M.H. and Robinson, E.H., 2000.** Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture*. Vol. 185, pp: 313-327.
  40. **Lin, Y.H. and Shiau, S.Y., 2005.** Dietary selenium requirements of juvenile grouper *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture*. Vol. 250, pp: 356-363.
  41. **Lorentzen, M.; Maage, A. and Julshamn, K., 1994.** Effects of dietary selenite or selenomethionine on tissue selenium levels of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*. Vol. 121, pp: 359-367.
  42. **Mohammed, H.; Olivares-Fuster, O.; LaFrentz, S. and Arias. C.R., 2013.** New attenuated vaccine against columnaris disease in fish: Choosing the right parental strain is critical for vaccine efficacy. *Vaccine*. Vol. 31, No. 45, pp: 5276-5280.
  43. **Moniruzzaman, M.; Rahman, S.M.L.; Kibria, M.; Grahman, M.A. and Hossain,**



- levels of dietary vitamin C on growth and tissue ascorbic acid changes in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). *Aquaculture*. Vol. 215, pp: 203-211.
66. Whanger, P.D., 2004. Selenium and its relationship to cancer: an update. *Br J Nutr*. Vol. 91, pp: 11-28.
  67. Yano, T., 1997. The Nonspecific Immune System: Humoral Defense. *Fish Physiology*. Vol. 15, pp: 105-157.
  68. Yano, T.; Nakao, M.; Furuichi, M. and Yone, Y., 1988. Effects of dietary choline, pantothenic acid and vitamin C on the serum complement activity of red sea bream. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*. Vol. 54, pp: 141-144.
  69. Yin, G.; Ardo, L.; Thompson, K.; Adams, A.; Jeney, J. and Jeney, G., 2009. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp (*Cyprinus carpio*) and protection against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*. Vol. 26, No. 1, pp: 140-145.
  70. Yuk, M.; Li, H.; Yin, E.C.; Yu, H. and Zhen, Y., 2007. Chen Broccoli (*Brassica oleracea botrytis L.*) improves the survival and up-regulates endogenous antioxidant enzymes in *Drosophila melanogaster* challenged with reactive oxygen species. *Journal the Science of Food and Agriculture*. Vol. 88, No. 3, pp: 499-506.
  71. Zeng, H; Combs, J.G.F., 2008. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *J Nutr Biochem*. Vol. 19, pp: 1-7.
  72. Zhang, N.; Li, L.; Hu, Y.; Cheng, G.; Zhu, X.; Liu, F.; Zhang, Y.; Liu, Z. and Xu, J., 2010. Effects of *astragalus polysaccharide* on the immune response to foot-and-mouth disease vaccine in mice. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 82, No. 3, pp: 680-686.
  73. Zhong, Y.; Lall, S.P. and Shahidi, F., 2008. Effects of dietary oxidized oil and vitamin E on the growth, blood parameters and body composition of juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* (Linnaeus 1758). *Aquaculture Research*. Vol. 39, No. 15, pp: 1647-1657.
  74. Zhou, Q.; Wang, L.; Wang, H.; Xie, F. and Wang, T., 2012. Effect of dietary vitamin C on the growth performance and innate immunity of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Fish and shellfish immunology*. Vol. 32, No. 6, pp: 969-975.
  - Ayyappan, J.K. Jena & M. Mohan Joseph). pp: 119-126.
  53. Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*. Vol. 172, pp: 63-92.
  54. Watanuki, H.; Ota, K.; Malina, A.C.; Tassakka, A. and Sakai, M., 2006. Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*. Vol. 258, pp: 157-163.
  55. Sharifuzzaman, S.M. and Austin, B., 2009. Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol*. Vol. 27, pp: 440-445.
  56. Shiau, S.Y. and Jiang, L.C., 2006. Dietary zinc requirements of grass shrimp, *Penaeus monodon* and effects on immune responses. *Aquaculture*. Vol. 254, pp: 476-482.
  57. Snieszko, S.F., 1960. Microhaematocrit as a tool in fisheries management. Special Scientific Report Fisheries. No. 314. US Department of the Interior Fish and Fisheries Wildlife Special Scientific Report. 15 p.
  58. Steinhagen, D.; Kruse, P. and Ko'rtling, W., 1990. Some haematological observations on carp *Cyprinus carpio L.*, experimentally infected with *Trypanoplasma Borelli* Laveran & Mesnil, 1901 (Protozoa: Kitenoplastida). *J Fish Dis*. Vol. 14, pp: 157-162.
  59. Stoskopf, M.K., 1993. *Fish medicine*. WB Saunders Company. Philadelphia, PA. 882 p.
  60. Raa, J., 1996. The use of immuno-stimulatory substances in fish and shellfish farming. *Rev. Fish. Sci*. Vol. 4, pp: 229-288.
  61. Tacon, A.G., 1990. Standard method for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. *Argent Laboratories Press*. USA. 454 p.
  62. Thompson, I.; Fletcher, T.C.; Houlihan, D.F. and Secombes, C.J., 1994. The effect of dietary vitamin A on the immunocompetence of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Fish Physiol. Biochem*. Vol. 12, pp: 513-523.
  63. Trust, T.J., 1986. Pathogenesis of infectious diseases of fish. *Annual Reviews in Microbiology*. Vol. 40, No. 1, pp: 479-502.
  64. Wahli, T.; Verlhac, V.; Girling, P.; Gabaudan, J. and Aebischer C., 2003. Influence of dietary vitamin C on the wound healing process in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. Vol. 225, pp: 371-386.
  65. Wang, X.; Kim, K.W.; Bai, S.C.; Huh, M.D. and Cho, B.Y., 2003. Effect of the different

