University of Guilan with collaboration of Iranian Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 6, No. 2, 2020, pages: 63-74

The effect of vitamins E, C and selenium as stimulants of the immune system on blood factors, growth and immunity of Asian cates (*Lates calcarifer*)

Mehrdad Mohammadidust[*1], Mina Ahangarzadeh[1], Hossein Houshmand[1], Fatemeh Hekmatpour [1], Mohammad Khosravi [2], Takavar Mohammadian[3], Lefteh Mohseninejad[1]

1- Aquaculture Research Center-South of Iran, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran

2- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

3- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received 28 March 2020 Accepted 30 June 2020

KEYWORDS

Immune system

Supplement

Asian sea bass

Biochemical

Vitamin C

Vitamin E

Selenium

ABSTRACT

This study was performed to evaluate the effect of immune system stimulants (vitamins E, C and selenium) on biochemical and immunity indices of *Late calcarifer*. For this purpose, two treatments were selected. Treatment 1 or control group was fed with food without immune stimulant and treatment 2 with diet containing vitamins E, C and selenium at 2% of the biomass weight. Finally, growth efficiency indices were compared in two treatments. Results showed final weight of the control and treatment groups was 761.33 ± 35.8 g and 850.00 ± 5.77 g, respectively. The specific growth rate of the control and treatment groups was 1.3 ± 0.02 and 1.35 ± 0.01 but the feed conversion ratio did not show a significant difference. Hemoglobin and erythrocytes showed a significant increase compared to the control in treatments containing immune stimulants and supplementation ($p<0.05$). White blood cells ranged from 41417 ± 2964.84 in the treatment to 42500 ± 683.13 in the control treatment. The number of red blood cells in the control treatment was 2810000 ± 19.1763 and the recipient treatment was 3951667 ± 14588.84. Immune system stimulants including vitamins E, C and selenium can play a role in improving the growth, blood, biochemical and safety indices of farmed *Late calcarifer*.

*Corresponding author: mmohammadidoust@yahoo.com

دانشگاه گیلان با مشارکت انجمن آبزی‌پروری ایران

تغذیه آبزیان

سال ششم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۹، صفحات ۷۴-۶۳

تأثیر ویتامین‌های E، C و سلنیوم به‌عنوان محرک سیستم ایمنی بر فاکتورهای خونی، رشد و ایمنی ماهی سی باس آسیایی (*Lates calcarifer*)

مهرداد محمدی دوست*[۱]، مینا آهنگرزاده[۱]، حسین هوشمند[۱]، فاطمه حکمت‌پور[۱]، محمد خسروی[۲]، تکاور محمدیان[۳]، لفته محسنی‌نژاد[۱]

۱- پژوهشکده آبزی پروری آبهای جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، خوزستان، ایران

۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، خوزستان، ایران

۳- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، خوزستان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۱/۰۹ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۴/۱۰

چکیده

این مطالعه به منظور ارزیابی تاثیر محرک سیستم ایمنی آبزیان (ویتامین‌های E، C و سلنیوم) بر شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی و ایمنی سی‌باس آسیایی (*Lates calcarifer*) انجام گرفت. به این منظور، ۲ تیمار شاهد (غذای بدون محرک سیستم ایمنی) و تیمار با جیره غذایی حاوی ویتامین‌های E، C و سلنیوم به میزان ۲٪ وزن توده زنده تغذیه شدند. در پایان دوره، وزن نهایی گروه شاهد ۳۵/۸ ± ۷۶۱/۳ گرم و گروه تیمار ۵/۷۷ ± ۸۵۰ گرم و نرخ رشد ویژه گروه‌های شاهد و تیمار به ترتیب ۰/۰۲ ± ۱/۳ و ۰/۰۱ ± ۱/۳۵ بود، ولی ضریب تبدیل غذایی اختلاف معنی‌داری نشان نداد. تعداد گلبول‌های قرمز و مقدار هموگلوبین در تیمارهای حاوی محرک‌های ایمنی و دریافت‌کننده مکمل افزایشی معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان دادند ($p<0/05$) ولی درصد هماتوکریت و تعداد گلبول-های سفید بین تیمارها اختلاف معنی‌دار نشان نداد ($p>0/05$). گلبول‌های سفید از ۲۹۶۴/۸۴ ± ۴۱۴۱۷ در تیمار دریافت کننده مکمل تا ۶۸۳/۱۳ ± ۴۲۵۰۰ در تیمار شاهد متغیر بود و تعداد گلبول‌های قرمز در تیمار شاهد ۱۹۱۷۶۳/۷۴ ± ۲۸۱۰۰۰۰ و تیمار دریافت کننده مکمل ۱۴۵۸۸/۸۴ ± ۳۹۵۱۶۶۷ شمارش گردید. بنابراین مشخص شد که این محرک سیستم ایمنی حاوی ویتامین‌های E، C و سلنیوم می‌تواند نقشی را در بهبود شاخص‌های رشد، خونی، بیوشیمیایی و ایمنی ماهی سی‌باس آسیایی پرورشی ایفا نماید.

کلمات کلیدی

محرک ایمنی

سی باس آسیایی

شاخص‌های ایمنی و خونی

ویتامین C

ویتامین E

سلنیوم

نویسنده مسئول: mmohammadidoust@yahoo.com

مقدمه

ماهی سی باس (*Lates calcarifer*) یک ماهی با ارزش اقتصادی بالا در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری آسیا و اقیانوس آرام است. این گونه به صورت تجاری در تایلند، مالزی، سنگاپور، اندونزی، هنگ‌کنگ و تایوان در استخرهای آب لب‌شور و شیرین همچنین، در قفس‌های مستقر در آب-های ساحلی پرورش می‌یابد. به‌دلیل ارزش بازاری نسبتاً بالا در مقیاس کوچک تا بزرگ محیط پرورشی تولید می‌شود. در گذشته بخشی از پرورش آن بر اساس تهیه لارو از طبیعت صورت می‌گرفت. این امر با نوسانات وسیع از سالی به سال دیگر روبه رو بود. در نتیجه برنامه‌ریزی تولید را با مشکل مواجه می‌ساخت. در اوایل سال ۱۹۷۰ محققین تایلندی موفق به تکثیر سی‌باس در شرایط پرورشی شدند. کارایی رشد لاروهای تولید شده در کارگاه تکثیر با لاروهای جمع‌اوری شده از محیط طبیعی قابل مقایسه بود (Jerry, 2013). بدن این گونه از طرفین فشرده، ساقه دمی عمیق، سر کشیده، ناحیه پشتی مقعر در جلوی ناحیه باله پشتی محدب می‌شود. تکثیر و پرورش ماهی سی باس برای اولین بار در کشورهای تایلند، اندونزی، سنگاپور، مالزی، هنگ کنگ، فلیپین و طور عمومی گسترش یافت. پس از آن تحقیقات بیشتری در فیلیپین، سنگاپور و استرالیا انجام گرفت (Garza-Gil at al. 2009). سرمایه‌گذاری در صنعت پرورش ماهی سی‌باس یکی از مهمترین بخش‌های پویا و با منافع اقتصادی بالقوه در بین صنایع تولید آبزی در آب شور و لب‌شور در جنوب شرق آسیا می‌باشد. در استرالیا سی‌باس را در سیستم‌های مدار بسته نیز تولید می‌نمایند (Whitehead, 1984). با توجه به مقاومت و تحمل بالا نسبت به تراکم و تغییرات فیزولوژیک تکثیر، نسباً ساده این ماهی همچنین، عادت به تغذیه با غذای پلت به‌خصوص در ماهیان جوان و سرعت رشد بالا، گونه فوق ایده‌ال برای آبزی پروری بوده به طوری که در اکثر کشورهای دنیا تکثیر و پرورش آن در حال توسعه می‌باشد. ایران با توجه به نوار ساحلی منحصر به فرد خود دارای موقعیتی ممتاز در زمینه پرورش ماهیان دریایی می باشد و با توجه به افزایش جمعیت و محدودیت منابع پروتئینی می‌توان این ماهی را به عنوان منبع ارزشمند پروتئـین محسوب کرد. استان خوزستان به لحاظ دارا بودن منابع آبی گسترده همچون رودخانه‌های آب شیرین و تالاب‌های شادگان و هورالعظیم از دیدگاه صنعت آبزی پروری بسیار حائز اهمـیت می‌باشد. با توجه به تنوع اقلیمی و نیز اختلاف پارامترهای آب در نقاط متفاوت استان شرایـط اجرای طرح‌هایی در زمینه امکان سنجی تکثیر و پرورش آبزیان شور و لب شور در منابع آبی استان فراهم می-باشد. ماهی سی‌باس از گونه‌های اقتصادی حائز اهمیت بوده و برای استان توصیه می‌شود. با توجه به بازارپسندی سی باس آسیایی و نیز تکثیر آسان آن می‌توان به عنوان یکی از گزینه‌های پرورش در نظر گرفته شود. اوجی فرد و همکاران در سال ۱۳۹۳ ارزیابی پتانسیل پرورش ماهی سی باس آسیای در استخرهای خاکی چوئبده آبادان را انجام دادند. نتایج نشان داد که شرایط و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب برای ماهی سی‌باس پرورشی در خوزستان مناسب می-باشد و در مدت پنج ماه از سال دمای آب بیش از ۲۵ درجه سانتی‌گراد بوده و رشد این ماهی به ۵۰۰ گرم می‌رسد. در مطالعه انجام شده توسط محمدی دوست و همکاران (۱۳۹۹) بهترین تراکم مناسب ماهی سی‌باس آسیایی در استان خوزستان ۱۳ قطعه در متر مربع معرفی شد. با توجه به توسعه صنعت آبزی‌پروری به خصوص ماهی سی‌باس آسیایی که از مهمترین ماهیان پرورشی با ارزش اقتصادی بالاست، استفاده از رژیم غذایی با کیفیت بالا و ضرورت ویتامین‌ها که برای تقویت آبزی‌پروری امری حیاتی ذکر شده.است. ویتامین‌ها مواد آلی هستند که برای رشد و نگهداری سلامت حیوانات از جمله ماهی ضروری می باشند (Khara et al. 2016). ثابت شده است که ویتامین‌ها یکی از مهم‌ترین مواد مغذی هستند که از جنبه‌های مختلف شامل سیستم ایمنی، رشد و بقا ماهی را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Khara et al. 2016). اسید اسکوربیک (ویتامین C) برای همه حیوانات مهره‌دار مورد نیاز است. ویتامین C نقش مهمی در رشد، تشکیل کلاژن، آهن و متابولیسم، هماتولوژی، تولیدمثل، پاسخ به استرس‌ها، بهبود زخم و پاسخ ایمنی دارد (NRC , 2011). تاثیر ویتامین C در افزایش گلبول قرمز خون می‌تواند موجب انتقال و عرضه بیشتر اکسیژن در خون ماهی و در نهایت در بافت‌ها شده و موجب ارائه پاسخ فیزیولوژیک بهتر در ماهی شود (Affonso et al. 2004). همچنین، این ویتامین باعث افزایش مقاوت ماهی در برابر استرس‌های محیطی می‌گردد و

بر روی فراسنجه‌های خونی موثر است (رحیمی و همکاران،۱۳۹۱) همان طور که گفته شده ویتامین C باعث تحریک پاسخ ایمنی مانند فعالیت‌های ماکروفاژ، تکثیر سلولی، فعالیت کمپلمان، سطح لایزوزیم، فعالیت فاگوسیتیک لوکسیت، تولید سیتوکین و سطح آنتی بادی می‌گردد، با اینکه ثابت شده است که ویتامین E پاسخ‌های ایمنی را در برخی گونه ماهی کاهش می‌دهد ولی در برخی گونه‌ها نقش کلیدی در ایمنی ماهی دارد. ضمن این که نقش آنتی‌اکسیدانی ویتامین‌های C و E در برابر اکسیداسیون توسط رادیکال‌های آزاد به خوبی ثابت شده است (Khara et al. 2016). بدین منظور در این تحقیق اثرات ویتامین‌های C و E و سلنیوم بر شاخص‌های خونی، رشد و ایمنی ماهی سی‌باس آسیایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

کلیه مراحل اجرایی تحقیق در مجتمع پرورش میگو چوئبده آبادان در شرکت خصوصی میگو کشت جنوب انجام گرفت. این پروژه به مدت ۱۵۰ روز از خرداد تا آذر ۱۳۹۸ و در ۶ استخر ۰/۷۵ هکتاری در مقیاس تجاری انجام شد. شرایط آماده‌سازی استخرها مطابق با دستورالعمل بهداشتی سازمان دامپزشکی کشور انجام گرفت. بچه ماهیان سی‌باس آسیایی با طول متوسط ۳۸ سانتیمتر و وزن ۱۵۰ گرم با استفاده از بران تانک و کپسول اکسیژن با تراکم ۸ کیلوگرم در مترمکعب با شوری ۳۰ قسمت در هزار با کامیون سردخانه‌دار و مجهز به تنظیم‌کننده دما از شرکت راموز در بوشهر به سایت پرورش میگوی چوئبده آبادان منتقل گردیدند. ماهی‌ها با تراکم‌های یکسان ۵۶۰۰ قطعه در هکتار و در قالب ۲ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار ذخیره‌سازی شدند. بعد از حمل و هم‌دماسازی با وزن ۱۵۰ گرم ذخیره‌سازی شد و به مدت یک هفته ماهی‌ها در استخر به غذادهی جدید سازگار شدند. تیمار ۱ یا گروه شاهد با غذای بدون محرک سیستم ایمنی و تیمار ۲ با جیره غذایی حاوی ویتامین‌های E، C و سلنیوم به میزان ۲ درصد وزن توده زنده به صورت مکمل به غذای مصرفی افزوده شد. مکمل به صورت دستی روزانه به غذایی مصرفی گروه تیمار یک مخلوط و در ۲ وعده غذایی مصرف می‌گردید. هر یک از استخرها دارای ۴ دستگاه هوادهی پروانه‌ای جهت تامین اکسیژن آب در حد استاندارد ۴ میلی‌گرم بر لیتر بودند. برخی پارامترهای آب شامل دما، pH و اکسیژن محلول آب توسط دستگاه EUTECH مدل DO6، شوری (ppt) توسط دستگاه ATAGO مدل E-Mill/S و عمق شفافیت به صورت ۱۴ روز یک بار اندازه‌گیری و ثبت شدند.

برای اضافه کردن سلنیوم به جیره از روغن کانولا استفاده شد. روش مخلوط کردن جیره با ویتامین بر اساس روش روغن پوشش‌سازی (oil coating) بود.

برای بررسی روند رشد ماهیان در تیمارهای مختلف از شاخص‌های رشد شامل ضریب رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و افزایش وزن استفاده شد (بیسواس ،۱۳۸۱).

جدول ۱ آنالیز خوراک استفاده شده جهت تغذیه بچه ماهی‌های مورد بررسی

مواد مغذی		قطر خوراک (mm)	وزن ماهی	پروتئین خام (٪)	چربی خام (٪)	انرژی قابل هضم (kcal/kg)	حداکثر فیبرخام (٪)	فسفر قابل جذب (٪)	حداکثر رطوبت (٪)
نوع خوراک	علامت اختصاری								
رشد دو	2Ex-TG	۳/۳-۲/۴	۷۵-۲۵	۴۴	۱۴/۵	۴۳۰۰	۳/۲	۰/۸	۱۰

ترکیب خوراک و میزان غذادهی

بچه ماهیان با استفاده از خوراک شرکت فرادانه (جدول ۱) بر اساس ۲ درصد زی‌توده غذادهی شدند. همچنین، تیماری که بایستی از غذای دارای محرک ایمنی استفاده می‌شد به صورت روزانه غذا با مکمل مخلوط و غذادهی انجام گرفت. برنامه غذایی پس از هر زیست‌سنجی بر اساس میانگین وزن جدید مشخص گردید.

زیست سنجی

از هر تکرار تعداد ۵۰ عدد بچه ماهی جهت زیست‌سنجی به صورت تصادفی انتخاب شدند. زیست‌سنجی در فاصله زمانی ۳۰ روزه انجام شد. ۲۴ ساعت قبل از زیست‌سنجی غذادهی قطع‌شده و از ماده فنوکسی اتانول برای بی‌هوش کردن ماهیان استفاده شد (پورغلام و همکاران، ۱۳۹۳). در زیست‌سنجی طول کل با تخته زیست‌سنجی با دقت ۰/۱ سانتیمتر، وزن کل با ترازوهای دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم ثبت گردید. شاخص‌های تغذیه و رشد که شامل ضریب رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، درصد افزایش وزن (WG) یزان کارایی پروتئین (PER) و درصد بازماندگی (SVR) مورد بررسی قرار گرفتند.

محاسبه شاخص‌های رشد و تغذیه

FCR = F/(Wt-W0) (Ronyai et al. 1990; Abdelghany & Ahmad, 2002)

F: مقدار غذای مصرف‌شده توسط ماهی

Wt و W0: میانگین بیوماس اولیه و نهایی

SGR = (lnWt -lnW0)/t ×100 (Ronyai et al. 1990)

% BWI = 100 × (BWf - BWi)/BWi (Hung et al. 1989)

BWf و BWi: متوسط وزن اولیه و وزن نهایی در هر وان

GR = (BWf - BWi) - n (Hung et al. 1989)

CF = 100 × (BW/TL3) (Hung et al. 1989)

BW= وزن (g): طول TL(cm) :n تعداد روزهای پرورش

خون‌گیری و اندازه گیری شاخص های خونی

در انتهای دوره با قطع ورید ساقه دمی عملیات خون‌گیری از سیاهرگ دمی انجام گرفت. جهت انجام مطالعات خون‌شناسی از سرنگ‌هایی با حجم ۲ سی سی استفاده گردیدنیم سی سی خون هپارینه جهت مطالعه فاکتورهای خونی ریخته و یک سی سی باقی مانده به داخل تیوب‌های اپندروف غیر هپارینه جهت بررسی شاخص‌های ایمنی ریخته شد (پورغلام و همکاران، ۱۳۹۳). جهت انجام مطالعات سرولوژی خون غیر هپارینه توسط سانتریفوژ (مدل Labofuge) ساخت شرکت Heraeus Sepatch آلمان با دور ۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شده و سرم جداسازی شد. اندازه‌گیری کلیه شاخص‌های خونی و ایمنی در آزمایشگاه انجام گرفت (پورغلام و همکاران، ۱۳۹۳). همچنین، جهت تعیین میزان هماتوکریت نیز از سانتریفیوژ لوله مویین و تعیین نسبت گلبول‌های قرمز به کل خون داخل لوله مویین استفاده شد. اندازه‌گیری هموگلوبین به روش سیان مت هموگلوبین یا سیانید هموگلوبین به علت دقت، راحتی انجام کار و سهولت دسترسی به محلول استاندارد پایدار انجام گرفت. جهت اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین و لیزوزیم نیز از روش ایمونوتوربیدیمتری (Immunoturbidimetric) و دستگاه اسپکتروفوتومتر استفاده گردید (De Silva et al. 2009).

فعالیت آنتی تریپسینی سرم

میزان ۱۰ میکرولیتر از سرم به ۱۰۰ میکرولیتر از محلول Tris-HCl (۱۰۰ میکرولیتر از ۵۰ میلی مولار pH ۸/۲) محتوی ۲۰ گرم تریپسین اضافه شد. در نمونه کنترل سرم ۱۰ میکرولیتر از سرم به ۱۰۰ میکرولیتر از محلول Tris-HCl اضافه شد و در نمونه کنترل مثبت محلول Tris-HCl محتوی ۲۰ گرم تریپسین فاقد سرم بود. نمونه‌ها با اضافه نمودن Tris-HCl به حجم ۲۰۰ میکرولیتر رسانده شدند و یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. پس‌ازآن ۲ میلی‌لیتر از سوبسترای DL-arginine- BAPNA(Na-benzoyl- p-nitroanilide HCl) با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار در Tris-HCl و محتوی ۲۰ میلی مولار کلرید کلسیم به همه نمونه‌ها اضافه شد. پس از پانزده دقیقه با اضافه نمودن ۵۰۰ میکرولیتر از اسید استیک ۳۰ درصد واکنش متوقف شد و جذب نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد ممانعت از تریپسین با محاسبه تفاضل طول موج نمونه کنترل

مثبت فاقد سرم از هر نمونه، تقسیم بر نمونه کنترل مثبت فاقدسرم محاسبه شد (اورجی و همکاران، ۱۳۹۲).

فعالیت باکتری کشی سرم

ابتدا از کشت شبانه سوسپانسیون باکتری *Micrococcus lysodeikticus* در محیط TSA نمک‌دار، چند کلونی برداشته شد و در PBS استریل کدورت آن به غلظت نیم مک فارلند رسانده شد. در ادامه در پلیت ۹۶ خانه‌ای الایزا، ۲۵ میکرولیتر PBS استریل به تمامی گوده‌ها اضافه گردید. سپس ۲۵ میکرولیتر از سرم‌ها جداگانه به هر گوده اضافه شد. در مرحله بعد ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری ویبریو هاروئی (نیم مک فارلند) به تمام گوده‌ها اضافه و پلیت به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر محیط کشت TSB نمک‌دار استریل به تمامی گوده‌ها اضافه شد. سه گوده (در سه تکرار) به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. به یک گوده ۱۰۰ میکرولیتر PBS و ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌ها اضافه شد. به گوده دیگر ۱۰۰ میکرولیتر PBS و ۵۰ میکرولیتر محیط کشت TSB اضافه شد (جهت اطمینان از عدم آلودگی). به گوده آخر نیز ۵۰ میکرولیتر PBS، ۵۰ میکرولیتر محیط کشت TSB و ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری (جهت اطمینان از رشد باکتری) اضافه گردید. پلیت در دمای ۳۰ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. جذب نوری پلیت در زمان صفر و ۱۲ ساعت پس از انکوباسیون در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد. جذب نوری در هر نمونه پس از دوازده ساعت از میزان آن در زمان صفر کسر شد و عدد نهایی به عنوان میزان ممانعت سرم از رشد باکتری در نظر گرفته شد (Gisbert et al. 2015; Khosravi et al. 2018).

ارزیابی فعالیت مایلوپراکسیداز

مقدار ۱۵ میکرولیتر سرم به ۱۳۵ میکرولیتر بافر HBSS مخلوط شد؛ ۲۵ میکرولیتر TMB۲۰ میلی مولار + ۲۵ میکرولیتر H_2O_2 ۲۰ میلی مولار به هر گوده اضافه شد و بعد از ۲ دقیقه ۵۰ میکرولیتر H_2SO_4 (۴ مولار) به محتویات اضافه گردید و در نهایت جذب نوری مایع رویی در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد (Sahoo et al. 2002).

اندازه‌گیری میزان کلی ایمونوگلوبولین سرم

جهت ارزیابی میزان کلی ایمونوگلوبولین سرم از روش رسوب با سولفات روی استفاده شد؛ ابتدا بافر ۰/۷ میلی‌مولار سولفات روی تهیه شد و pH آن به ۵/۸ رسانده شد. سپس، در میکروتیوب‌های استریل ۱۲/۵ میکرولیتر از سرم‌های زمان-های صفر، ۳۰ و ۶۰ به صورت جداگانه ریخته شد و ۸۵۰ میکرولیتر از سولفات روی به هر میکروتیوب اضافه و به خوبی مخلوط شدند؛ بعد از ۲ ساعت قرار گرفتن در دمای اتاق، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول فوق در پلیت ۹۶ خانه‌ای الایزا ریخته شد و در طول موج ۵۹۰ نانومتر جذب نوری قرائت شد. جهت تهیه نمودار استاندارد میزان کلی ایمونوگلوبولین نمونه‌های سرم با حجم مساوی (هر نمونه ۲۰ میکرولیتر) با هم مخلوط شدند و پس از تهیه رقت‌های دو برابر مطابق روش ذکرشده و به‌صورت هم‌زمان بررسی شدند. میزان ایمونوگلوبولین در نمونه اولیه ۲۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد (Affonso et al. 2004).

فعالیت مسیر فرعی کمپلمان

جهت بررسی فعالیت کمپلمان، ۲۵ میکرولیتر از سرم‌های فعال و غیرفعال (نیم ساعت در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد) زمان‌های مختلف (صفر و ۳۰ روز) در میکروتیوب استریل به صورت جداگانه ریخته شد و سپس ۳۷۵ میکرولیتر از بافر PBS حاوی ۵ میلی‌مولار منیزیوم کلرید و ۱/۵ میلی‌مولار کلسیم کلرید به هر میکروتیوب اضافه شد. متعاقبا ۱۰۰ میکرولیتر از گلبول قرمز ۵٪ شسته شده خرگوش به هر میکروتیوب اضافه شد و میکروتیوب‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفتند. در ادامه میکروتیوب‌ها سانتریفیوژ و ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی هر میکروتیوب در گوده‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد، به نحوی که در یک ستون از سرم فعال و در ستون کناری آن از سرم غیرفعال یک زمان خاص استفاده شده بود. در نهایت جذب نوری پلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد (Leiro et al. 2004).

تجزیه تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار SPSS 16 (Version 16) انجام گردید. نرمال بودن توزیع داده‌ها به وسیله آزمون مشخص گردید. نتایج بر اساس میانگین ± اختلاف استاندارد ارائه گردیده‌است. تجزیه تحلیل آماری بین دو تیمار شاهد و آزمایشی بر اساس تست Paired T-test صورت گرفت.

نتایج

در این بخش پس از نمونه‌برداری در پایان ۱۲۰ روز تغذیه ماهیان با جیره‌های غذایی حاوی مکمل ایمنی و بدون مکمل به جمع‌آوری، تجزیه و تحلیل داده‌های کارایی رشد، تغذیه، شاخص‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی سرم پرداخته شده‌است.

جدول ۲ پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب استخرهای پرورش

روز پرورش	pH	اکسیژن (ppm)	دما (درجه سانتی‌گراد)	عمق شفافیت (cm)	شوری (ppt)
۱	۸/۴	۵/۵	۲۸	۴۰	۲۰
۱۴	۸/۶	۵/۷	۲۹/۲	۴۵	۲۰
۲۸	۸/۷	۵/۹	۳۰	۴۰	۲۲
۴۲	۸/۸	۵/۵	۳۰	۳۵	۲۴
۵۶	۸/۶	۵	۳۲	۳۰	۲۶
۷۰	۸/۵	۴/۷	۳۳	۳۰	۲۷
۸۴	۸/۷	۴/۸	۳۰	۲۵	۲۹
۹۸	۸/۴	۴/۵	۲۷	۲۵	۳۰
۱۱۲	۸/۵	۴	۲۶	۲۰	۳۰
۱۲۰	۸/۷	۴/۲	۲۶	۲۰	۳۰

اثر جیره آزمایشی بر شاخص‌های رشد و بقا

ماهیان در طول دوره پرورش از حدود ۱۵۰ گرم به وزنی در دامنه ۸۵۰/۰۰-۷۶۱/۳۳ گرم رسیدند. بین تیمارها از نظر وزن نهایی، طول کل، طول استاندارد، نرخ رشد ویژه، درصد بقا و ضریب تبدیل غذایی اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد (p>۰/۰۵). میزان بقا از ۹۳/۸۳ در تیمار دریافت کننده مکمل تا ۹۱ درصد در تیمار شاهد ثبت گردید. در تیمار دریافت کننده مکمل درصد وزن‌گیری (۱۰/۸۹ ± ۴۲۵) به طور معنی‌دار از تیمار شاهد (۱۴/۹۲ ± ۳۹۶/۱۱) بیشتر بود (p<۰/۰۵). ضریب تبدیل غذایی بدون تأثیر معنی‌دار مکمل بر ضریب تبدیل غذایی از ۱/۵ تا ۱/۳۲ متغیر بود.

اثر جیره آزمایشی بر شاخص‌های خونی

از میان شاخص‌های خونی سنجش شده هموگلوبین، گلبول قرمز در تیمار دریافت کننده مکمل به طور معنی‌دار از تیمار شاهد بیشتر بودند (p<۰/۰۵؛ جدول ۴)، ولی هماتوکریت و تعداد گلبول‌های سفید بین تیمارها اختلاف معنی‌دار نشان ندادند (p>۰/۰۵).

اثر جیره آزمایشی بر شاخص‌های بیوشیمیایی سرم

فعالیت آنتی تریپسینی تیمار دریافت کننده مکمل به طور معنی‌دار از تیمار شاهد بیشتر بود (p<۰/۰۵؛ جدول ۵). فعالیت باکتری‌کشی در مقابل باکتری آئروموناس و ویبریو بین تیمارها فاقد اختلاف معنی‌دار بود (p>۰/۰۵)، در حالی‌که فعالیت باکتری‌کشی در برابر باکتری استرپتوکوک در تیمار شاهد به طور معنی‌دار از تیمار دریافت کننده مکمل بیشتر بود (p<۰/۰۵). فعالیت مایلوپراکسیداز و فعالیت مسیر فرعی کمپلمان به طور معنی‌دار در تیمار دریافت کننده مکمل از تیمار شاهد بیشتر بود (p<۰/۰۵). میزان کلی ایمونوگلوبولین در تیمار شاهد بدون اختلاف معنی‌دار با تیمار دریافت کننده مکمل سنجش شد (p>۰/۰۵).

جدول ۳ شاخص رشد و بقا ماهیان سی باس تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی (n=۱۲، میانگین ± خطای استاندارد)

شاخص‌های کارایی	تیمار شاهد	تیمار دریافت کننده مکمل	P
وزن اولیه (گرم)	۱۵۰ ± ۰/۳	۱۴۹ ± ۰/۴	
طول اولیه (سانتیمتر)	۳۸ ± ۰/۰۴	۳۷ ± ۰/۲	
وزن نهایی (گرم)	۷۶۱/۳۳ ± ۳۵/۸	۸۵۰/۰۰ ± ۵/۷۷	۰/۱۶۳
طول کل (میلی‌متر)	۳۷۶/۳۳ ± ۱۴/۴	۳۹۸/۳۳ ± ۱۹/۱۳	۰/۱۹۳
طول استاندارد (میلی‌متر)	۳۳۱ ± ۱۳/۷	۳۳۷/۱۷ ± ۱۶/۲۱	۰/۷۴۱
درصد وزن‌گیری	۳۹۶/۱۱ ± ۱۴/۹۲	۴۲۵/۰۰ ± ۱/۸۹	۰/۰۱۵
نرخ رشد ویژه	۱/۳ ± ۰/۰۲	۱/۳۵ ± ۰/۰۱	۰/۱۵۸
درصد بقا	۹۱ ± ۱	۹۳/۸۳ ± ۰/۱۷	۰/۳۶۱
ضریب تبدیل غذایی	۱/۵۲ ± ۰/۰۴	۱/۳۲ ± ۰/۰۱	۰/۴۵۸

اعداد P در هر ردیف در صورت بالاتر بودن از ۰/۰۵ نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ بین تیمارها می‌باشند.

جدول ۴ شاخص‌های خونی ماهیان سی باس تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی (n=۱۲، میانگین ± خطای استاندارد)

شاخص‌های خونی	تیمار شاهد	تیمار دریافت کننده مکمل	P
هموگلوبین (g/dL)	۸/۰۸ ± ۰/۴۵	۹/۳۶ ± ۰/۳۳	۰/۰۱۹
هماتوکریت (٪)	۴۳ ± ۷/۵۰	۴۵ ± ۱/۰۷	۰/۰۸۱
گلبول سفید	۴۲۵۰۰ ± ۶۸۳/۱۳	۴۱۴۱۷ ± ۲۹۶۴/۸۴	۰/۷۳۹
گلبول قرمز	۲۸۱۰۰۰۰ ± ۱۹۱۷۶۳/۷۴	۳۹۵۱۶۶۷ ± ۱۴۵۸۸/۸۴	۰/۰۱۵

اعداد P در هر ردیف در صورت بالاتر بودن از ۰/۰۵نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ بین تیمارها می‌باشد.

جدول ۵ شاخص‌های بیوشیمیایی سرم ماهیان سی باس تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی (n=۱۲، میانگین ± خطای استاندارد)

شاخص های سرمی	تیمار شاهد	تیمار دریافت کننده مکمل	P
فعالیت آنتی تریپسینی	۴۴/۲۲ ± ۰/۹۸	۵۳/۶۲ ± ۲/۳۰	۰/۰۱۱
فعالیت باکتری‌کشی[۱]	۰/۲۳ ± ۰/۰۱	۰/۲۱ ± ۰/۰۲	۰/۴۶۳
فعالیت باکتری‌کشی[۲]	۰/۱۴ ± ۰/۰۱	۰/۱۴ ± ۰/۰۱	۰/۶۹۱
فعالیت باکتری‌کشی[۳]	۰/۰۹ ± ۰/۰۱	۰/۰۶ ± ۰/۰۲	۰/۰۴۹
فعالیت مایلوپراکسیداز	۰/۲۶ ± ۰/۰۲	۰/۵۳ ± ۰/۰۸	۰/۰۲۶
میزان کلی ایمونوگلوبولین	۲۴/۶۱ ± ۱/۹۱	۲۸/۶۵ ± ۲/۷۶	۰/۳۱۵
فعالیت مسیر فرعی کمپلمان	۰/۰۸ ± ۰/۰۰	۰/۱۰ ± ۰/۰۱	۰/۰۱۳

۱: باکتری آئروموناس، ۲: باکتری ویبریو، ۳: باکتری استرپتوکوک؛ اعداد P در هر ردیف در صورت بالاتر بودن از ۰/۰۵نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ بین تیمارها می‌باشد.

بحث

نتایج بررسی حاضر نشان داد افزایش ویتامین‌های C و E و سلنیوم در جیره غذایی ماهی سی‌باس آسیایی به صورت ترکیبی باعث بهبود شاخص‌های خونی می‌شود. به طوری که با افزودن ویتامین بسیاری از شاخص‌های خونی از جمله گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت افزایش یافت. همچنین، ویتامینC به جذب آهن از دستگاه گوارش کمک می‌کند (Faramarzi, 2012). بنابراین، افزایش در گلبول-

های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در گروه‌های اضافه شده ویتامین ممکن است به دلیل این عمل باشد. همچنین، ویتامین C یک آنتی‌اکسیدان قوی است که در برابر آسیب-های اکسیداتیو به بافت‌های مختلف ماهی مانند گلبول قرمز نقش حفاظتی دارد (Khara et al. 2016). ویتامین C باعث افزایش گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت خون ماهی قزل آلای رنگین کمان گردید (Miar et al. 2013). از طرفی گزارش شده است که ویتامین E هم به عنوان آنتی‌اکسیدان محافظت از غشای سلولی شامل گلبول قرمز را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو انجام می‌دهد (Sahoo et al. 2002). در هم‌سویی نتایج تحقیق جاری، جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف ویتامین‌های C و E در ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) باعث افزایش تعداد گلبول قرمز گردید (تاتینا و همکاران ۱۳۸۸). مشخص شده ویتامین E اثر معنی‌داری بر روی میزان هماتوکریت، هموگلوبین، گلبول قرمز، مونوسیت و ائوزینوفیل بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) دارد (اورجی و همکاران، ۱۳۹۲). در مطالعه غیاثوند و همکاران (۱۳۹۵) بدنبال مصرف مکمل حاوی سلنیوم افزایش شاخص-های ایمنی مشاهده شد و باعث بهبود اکثر فاکتورهای رشد، بازماندگی و برخی فاکتورهای ایمنی ماهی (*Barbonymus schwanenfeldii*) گردیده و می‌تواند به عنوان یک افزودنی مناسب توصیه شود که با نتایج این مطالعه هم‌خوانی دارد و هم افزایش شاخص های رشد و بازماندگی و هم در مورد شاخص های ایمنی هم‌خوانی دارد. افزایش میزان فعالیت آنتی‌تریپسینی و فعالیت مایلوپراکسیداز و افزایش میزان ایمونوگلوبولین‌ها و فعالیت مسیر فرعی کمپلمان نشان بر افزایش دفاع و مقاومت بدن و افزایش توان مقابله در برابر عوامل استرس زا ی محیط می باشد و این با افزایش شاخص-های رشد و بازماندگی هم‌خوانی دارد. افزایش میزان ایمونوگلوبولین‌ها با افزایش وزن، نشان دهنده تکامل سلول-های خونی و اندام‌های خون‌ساز و در نتیجه افزایش کارایی سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان است. بررسی اثر مکمل غذای حاوی ویتامین A در ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) موجب افزایش فعالیت عامل مکمل، لیزوزیم، سرم آنتی‌پروتئاز، فاگوسیتوز و فعالیت‌های ضدباکتریایی می‌شود (Thompson et al. 2004). گزارش شده ویتامین E هم به عنوان آنتی‌اکسیدان محافظت از غشای سلولی شامل گلبول قرمز را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو انجام می‌دهد (Sahoo et al. 2002) در هم-سویی نتایج تحقیق جاری، جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف ویتامین C و E در ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) باعث افزایش تعداد گلبول قرمز گردید (تاتینا و همکاران، ۱۳۸۸). یافته‌های اورجی و همکاران (۱۳۹۲) مشخص شده که ویتامین E اثر معنی‌داری بر روی میزان هماتوکریت، هموگلوبین، گلبول قرمز، مونوسیت و ائوزینوفیل بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان دارد. روند تولید ایمنوگلوبولین‌ها در ماهی، وقوع مجموعه ای از واکنش‌ها بین سلول‌های ارائه دهنده آنتی‌ژن، سلول‌های T کمک کننده فعال شده و اینترلوکین است که سبب تحریک لنفوسیت B می شود. ویتامین C یک آنتی اکسیدان قوی است که در برابر آسیب های اکسیداتیو به بافت های مختلف ماهی مانند گلبول قرمز نقش حفاظتی دارد (Khara et al. 2016). در مطالعه حاضر نیز با مصرف مکمل حاوی ویتامین‌های C و E و سلنیوم بود. شاخص‌های خونی و هموگلوبین، گلبول قرمز ماهی سی باس آسیایی و معنی‌دار نشان داد . در همین راستا میرشاه ولد و همکاران (۱۳۹۵) گزارش کردند که افزایش ویتامین C در جیره ماهی کوی باعث افزایش گلبول قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، نوتروفیل و مونوسیت و در ماهی آکواریومی بارب حلب (*Barbonymus schwanenfeldii*) باعث افزایش گلبول قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت و گلبول‌های سفید گردید(غیاثوند و همکاران، ۱۳۹۵). افزایش ویتامین E به جیره غذایی بچه ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) میزان گلبول قرمز، هماتوکریت، فعالیت لایزوزیم و ایمونوگلوبین را افزایش داد (عاشوری و همکاران، ۱۳۹۳). افزایش ویتامین های C وE به جیره غذایی ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) باعث افزایش فعالیت لایزوزیم و ایمونوگلوبین می‌شود (Khara et al. 2016).

با توجه به نیاز یه توسعه صنعت آبزی‌پروری بخصوص ماهی سی باس که هم در آب‌های شیرین و هم درآب شور و لب شور قابلیت پرورش داشته و هم جزء ماهیان با ارزش می باشد

و قابلیت پرورش در قفس و استخرهای خاکی را دارد، استفاده از مکمل های غذایی حاوی ویتامین‌های C، E و سلنیوم می‌تواند افزایش با افزایش شاخص‌های ایمنی و خونی باعث افزایش شاخص‌های رشد و بازماندگی و بهره‌وری بیشتر در تولید شده و افزایش توان دفاعی ماهی، مقاومت آن در برابر عوامل استرس‌زای و پاتوژن محیطی افزایش یافته و کمتر دچار بیماری شوند.

منابع

اوجی‌فرد، ا.، حسینی، ع.، محمدی‌دوست، م.، سعدونی، ع. ۱۳۹۳. ارزیابی پتانسیل پرورش ماهی سی‌باس آسیایی (*Lates calcarifer*) در استخرهای خاکی چوئبده، آبادان. بوم شناسی آبزیان ۳: ۵۰-۴۱.

اورجی، م.، رحیمی، ح .۱۳۹۲ . اثر ویتامین E بر شاخص-های رشد میزان بقا و تغییرات هماتولوژی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان. شیلات ۲: ۱-۱۰.

بیسواس ، اچ.پی. ۱۳۸۱. مبانی زیست شناسی ماهی، ترجمه افشین عادلی، انتشارات نقش مهر. ۱۳۱ صفحه.

پورغلام، ی.، خارا، ح.، محسنی، م .۱۳۹۳. بررسی اثرات سطوح مختلف ویتامین C بر فاکتورهای خونی و ایمنی بچه تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*). فیزیولوژی و تکوین جانوری ۷: ۸۵-۷۹.

تاتینا، م.، بهمنی، م.، سلطانی، م.، ابطحی، ب.، قریب خانی، م. ۱۳۸۸. تاثیر جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف بر میزان گلبول‌های قرمز خون ماهی E و C ویتامین-های استرلیاد پرورشی. بیولوژی دریا ۱: ۳۴-۲۳

رحیمی، م.، سوداگر، م.، اورجی، ح.، حسینی، س.ع.، تقی‌زاده، و. ۱۳۹۱. تاثیر ویتامین C بر پارامترهای خونی، رشد و پاسخ به استرس دمایی در بچه ماهیان قزل الای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). تحقیقات دامپزشکی ۶۷: ۳۸۰-۳۷۳.

عاشوری، ع.، خارا، ح.، یزدانی ساداتی، م.ع.، کاظمی، ر.، ا. ۱۳۹۳. بررسی تاثیر ویتامین‌های توکوفرول (E) و ریبوفلاوین (B2) برفاکتورهای خونی و ایمنی بچه ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*). فیزیولوژی و تکوین جانوری ۸: ۲۷-۱۷.

غیاثوند، ز.، احمدی، ز.، علامه، م.، چنگیزی، ر. ۱۳۹۵. اثر سطوح مختلف ویتامینc بر رشد، تغذیه، بازماندگی و برخی پارامترهای خونی و ایمنی ماهی آکواریومی بارب حلب (*Barbonymus schwanenfeldii*). پژوهش-های جانوری ۲۹: ۳۲۶-۳۱۸ .

محمدنژاد، م.، شاهرخی، س.، قلیچی، ا. ۱۳۹۷. بررسی برخی شاخص‌های خونی، آنزیمی و ایمنی ماهی کپور (*Cyprinus carpio*) تغذیه شده با سطوح مختلف ویتامین‌های E و C. فیزیولوژی و تکوین جانوری ۱۱: ۸۵-۷۵.

محمدی دوست، م.، یونس زاده فشالمی، م.، حکمت پور، ف.، مرتضوی، س.، ع.، محسنی نژاد، ل. ۱۳۹۹. بررسی تراکم‌های مختلف پرورش ماهی سی‌باس آسیایی (*Lates calcarifer*) در استخرهای میگو چوئبده آبادان. محیط زیست جانوری ۱۲: ۲۰۸-۲۰۱.

میرشاه ولد، ف.، کاظمیان، م .۱۳۹۵ تاثیر سطوح مختلف ویتامین C بر برخی پارامترهای رشد و تعدادی از شاخص‌های هماتولوژی سرم خون ماهی کوی. علوم و فنون دریایی ۱۱: ۶۸-۵۸.

Abdelghany, A.E. Ahmad, M.H. 2002. Effects of feeding rates on growth and production of Nile Tilapia, common carp and silver carp polycultured in fertilized ponds. Aquaculture Research 33: 415-423.

Affonso, E.G., Polez, V.L.P., Mazon, A.F., Araújo, M.R.R., Moraes, G., Rantin F.T. 2004. Physiological responses to sulfide toxicity by the air-breathing catfish, *Hoplosternum littorale* (Siluriformes, Callichthyidae). Comparative Biochemistry and Physiology 139: 251-257.

De Silva, S.S., Anderson, T.A. 2009. Fish nutrition in aquaculture. Springer Science & Business Media.

Faramarzi, M. 2012. Effect of dietary vitamin c on growth and feeding parameters, carcass composition and survival rate of

common carp (*Cyprinus carpio*). Global Veterinaria, 8: 507-510.

Fuente, Mdela., Miranda, C.D., Jopia, P., Gonzalez-Rocha, G., Guiliani, N., Sossa, K., Urrutia, H. 2015. Growth Inhibition of bacterial fish pathogens and quorum-sensing blocking by bacteria recovered from Chilean salmonid farms. Journal of Aquatic Animal Health 27: 112-22.

Garza-Gil, M.D., Varela-Lafuente, M., Caballero-Miguez, G. 2009. Price and production trends in the marine fish aquaculture in Spain. Aquaculture Research 40: 274-281.

Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180: 147-165.

Gisbert,E., Skalli, A., Campbell, J., Solovyev, M.,M., Rodriguez, C., Dias, J., Polo, J. 2015. Spray-dried plasma promotes growth, modulates the activity of antioxidant defenses, and enhances the immune status of gilthead sea bream fingerlings. Journal of Animal Science 93: 278-286.

Grenni, P., Ancona, V., Caracciolo, A.B. 2018. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. Microchemical Journal 136: 25-39.

Hoseinifar, S., H., Ringø, E., Shenavar, A., Esteban, M.A. 2016. Probiotic, prebiotic and synbiotic supplements in sturgeon aquaculture: a review. Reviews in Aquaculture 8: 89-102.

Hung, S.S.O., Aikins, K.F., Lutes, P.B. Xu, R. 1989. Ability of juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) to utilize different carbohydrate sources. Journal of Nutrition 119: 272-733.

Ina-Salwany, M., Al-saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F.A., Mohd-Aris, A., Amal, M., Kasai, H., Mino, S., Sawabe, T., Zamri-Saad, M. 2019. Vibriosis in fish: A review on disease development and prevention. Journal of Aquatic Animal Health 31: 3-22.

Jerry, D.R. 2013. Biology and culture of Asian seabass *Lates calcarifer*, CRC Press.

Khara, H., Sayyadborani, M., Sayyad Borani, M. 2016. Effects of α-Tocopherol (vitamin E) and ascorbic acid (vitamin c) and their combination on growth, survival and some haematological and immunological parameters of caspian brown trout, *Salmo trutta caspius* juveniles. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 16: 385-393.

Khosravi, M., Mohammadian, T., Tahmasebifard, M., Boroujeni, M.P. 2018. Correlation between C-reactive protein level, immunology, and hematology of a *Oncorhynchus mykiss* infected with *Lactococcus garvieae*. Aquaculture International 26: 1415-1425.

Leiro, J., Arranz, J.A., Iglesias, R., Ubeira, F., San artın, L. 2004. Effects of the histiophagous ciliate *Philasterides dicentrarchi* on turbot phagocyte responses. Fish and Shellfish Immunology 17: 27-39.

Menezes, G. C., Tavares-Dias, M., Ono, E. A., Andrade, J.I. A., Brasil, E.M., Roubach, R. 2006. The influence of dietary vitamin C and E supplementation onthe physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. Comparative Biochemistry and Physiology 145A: 274-279.

Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S.J., Baker, R.T., Bøgwald, J., Ringo, E. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. Aquaculture 302: 1-18.

Miar, A., Matinfar, A., Shamsae, M., Soltani, M.2013. Effects of different dietary vitamin cand e levels on growth performance and hematological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). World Journal of Fish and Marine Sciences 5: 220-226.

National Research Council. 2011. nutrient requirements of fish and shrimp. National Academy Press, Washington, D.C.

Novriadi, R. 2016. Vibriosis in aquaculture. Omni-Akuatika, 12.

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

Sahoo, P.K., Mukherjee, S.C. 2002. Influence of high dietary atocopherol acetate intakes on specific immune response, nonspecific resistance factors and disease resistance of healthy and Aflatoxin B1-inducedimmunocompromised Indian major Carp, *Labeo rohita* (Hamilton). Aquaculture Nutrition 8: 159-67.

Thompson, F.L., Iida, T., Swings, J. 2004. Biodiversity of vibrios. Microbiology and Molecular Biology Reviews 68: 403-431.

Torres, M., Rubio-Portillo, E., Antón, J., Ramos-Esplá, A. A., Quesada, E., Llamas, I. 2016. Selection of the N-acylhomoserine lactone-degrading bacterium *Alteromonas stellipolaris* PQQ-42 and of its potential for biocontrol in aquaculture. Frontiers in Microbiology 7: 646.

Whitehead, P.J.P. 1984. Centropomidae. In Fischer, W., Bianchi, G. (eds.) FAO species identification sheets for fishery purposes. Western Indian Ocean (Fishing Area 51). vol. 1. [pag. var.] FAO, Rome.

Zhang, Q., Li, F., Wang, B., Zhang, J., Liu, Y., Zhou, Q., Xiang, J. 2016. The mitochondrial manganese superoxide dismutase gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*: Cloning, distribution and expression. Developmental and Comparative Immunology 31: 429-440.

Zhou, S., Zhang, A., Yin, H., Chu, W. 2018. Bacillus sp. QSI-1 Modulate Quorum Sensing Signals Reduce Aeromonas hydrophila Level and Alter Gut Microbial Community Structure in Fish. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 6: 184.