DOI: 10.22092/vj.2017.109873
شماره ۱۱۶ پاییز ۱۳۹۶
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

تاثیر مکمل غذایی کیتوزان بر رشد، خون شناسی، بیوشیمی سرم خون و ایمنی ذاتی ماهی کفال خاکستری *(Mugil cephalus)*

• **پریا اکبری(نویسنده مسئول)**
گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی
و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران
• **آسیه یونسی**
گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی
و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران
تاریخ دریافت: ۲۶-۰۵-۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: ۰۶-۰۷-۱۳۹۵
Email: paria.akbary@gmail.com

چکیده

تحقیق حاضر به‌منظور بررسی اثر مکمل غذایی کیتوزان بر شاخص‌های رشد، خون‌شناسی و بیوشیمیایی سرم خون و ایمنی ذاتی ماهی کفال خاکستری (Mugil cephalus) به مدت ۶۰ روز صورت گرفت. در این مطالعه، تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی کفال خاکستری با میانگین وزنی ۱/۰۴±۱۲/۰۱ گرم در یک طرح کاملا تصادفی به چهار تیمار آزمایشی و سه تکرار (با تعداد ۱۰ قطعه در هر تکرار) تقسیم شدند و به‌ترتیب با رژیم‌های غذایی حاوی صفر، پنج، ۱۰ و ۱۵ گرم کیتوزان بر کیلوگرم غذا مورد تغذیه قرار گرفتند. نتایج حاصله نشان داد که رژیم‌های حاوی ۱۰ و ۱۵ گرم کیتوزان بر کیلوگرم غذا، تفاوت معنی‌داری در شاخص‌های رشد و تغذیه در مقایسه با تیمار شاهد و تیمار حاوی پنج گرم کیتوزان بر کیلوگرم غذا نشان دادند (P<۰/۰۵). بالاترین وزن نهایی، شاخص وضعیت، نسبت کارایی پروتئین، افزایش وزن به‌دست آمده و تعداد گلبول‌های قرمز در تیمار حاوی ۱۰ گرم کیتوزان بر کیلوگرم غذا مشاهده شدکه با بقیه تیمارها دارای تفاوت معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). بیشترین هموگلوبین، تعداد گلبول‌های سفید، هموگلوبین متوسط گلبول‌های قرمز خون، حجم متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز خون، پروتئین تام، گلوبین و فعالیت لیزوزیم در تیمارهای حاوی ۱۰ و ۱۵ گرم کیتوزان بر کیلوگرم غذا مشاهده شد که با بقیه تیمارها تفاوت معنی‌داری را نشان دادند (P<۰/۰۵). در مجموع بر اساس نتایج این تحقیق، افزودن ۱۰ و ۱۵ گرم مکمل غذایی کیتوزان بر کیلوگرم جیره غذایی ماهی کفال خاکستری به‌منظور بهبود شاخص-های رشد، خون‌شناسی، پاسخ‌های بیوشیمیایی خون و ایمنی ذاتی در این ماهی پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: ماهی کفال خاکستری، کیتوزان، شاخص‌های رشد، خون‌شناسی، پاسخ‌های بیوشیمیایی خون، ایمنی ذاتی

● Veterinary Researches & Biological Products No 116 pp: 194-203

Effect of dietary supplementation of Chitosan on growth, hematology and innate immunity of grey Mullet ***(Mugil cephalus)***

By: Akbary, P., (Corresponding Author) Fisheries Department, Marine Sciences Faculty, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran. and Younesi, A., Fisheries Department, Marine Sciences Faculty, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran.

Email: paria.akbary@gmail.com

Received: 2016-08-16 Accepted: 2016-09-27

This experiment was conducted to evaluate the effect of dietary supplementation of chitosan on growth performance, blood and serum biochemical indices and innate immunity of grey mullet (*Mugil cephalus*) for 60 days. In this experiment, 120 grey mullets (with average weight of 12.01±1.04 g) were divided into four treatments and three replicates (n=10 in each replicate) in a completely randomized design and fed with diets containing 0, 5, 10 and 15 g chitosan / kg food, respectively. The present results showed that diets containing 10 and 15 g chitosan/ kg food had a significant difference in growth and feed indices compared with control and the diet containing 5 g/kg chitosan (P<0.05). The highest final weight, condition factor,weight gain, protein efficiency ratio and red blood cellwere observed in the diet containing 10 g/kg chitosan which had a significant difference compared with other treatments (P<0.05). The highest heamoglobulin, white blood cell, Mean Corpuscular Volume, Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration, total protein, globulin and lysozyme activity were observed in treatments containing 10 and 15 g/kg chitosan, which showed a significant difference compared with other treatments (P<0.05). Finally, the present results suggests that diets containing 10 and 15 g/kg dietary chitosan can improve growth, hematology and blood biochemical indices and innate immunity responses of grey mullet.

Key words: *Mugil cephalus,* Kitosan, Growth indexes, Haematology, Blood biochemical responses, innate immunity

مقدمه

استرس حاصل از افزایش تراکم ماهی در سیستم پرورشی باعث تهدید سلامت و رشد ماهی می‌گردد (۲۲). علاوه بر آن، مشخص شده است که تغذیه نقش مهمی را در عملکرد سیستم ایمنی و مقاومت در برابر بیماری‌ها ایفا می‌کند. در نتیجه، کیفیت غذا و مدیریت تغذیه بسیار حساس و حائز اهمیت می‌باشد (۹). لذا استفاده از محرک‌های رشد و ایمنی در آبزیان در سال‌های اخیر رشد بی‌سابقه‌ای یافته است (۱۱). محرک‌های رشد نمی‌توانند جایگزین غذا و مواد مغذی موثر در جیره غذایی ماهیان باشند، ولی در افزایش جذب غذا و افزایش میزان رشد آبزیان بسیار موثر واقع می‌شوند و دلیل اساسی و منطقی استفاده از این محرک‌ها کاهش ضریب تبدیل غذایی، افزایش رشد، افزایش تولید، پیش‌گیری و کنترل بیمارها و دست‌یابی به محصولی با کیفیت بالاتر می‌باشد (۲۴). امروزه استفاده از محرک‌های رشد با منشاء طبیعی به‌دلیل عواملی نظیر ارزش اقتصادی و کم هزینه بودن تولید آن‌ها، نداشتن اثرات تخریبی بر محیط زیست (داروهای ارگانیک)، کم بودن عوارض جانبی در مقایسه با داروهای شیمیایی و عدم ایجاد مقاومت نسبی عوامل بیماری‌زا به این محرک‌ها منجر شده تا این منابع ارزشمند دارویی از ارزش و جایگاه خاصی در درمان برخوردار باشند (۴). محرک‌هایی مانندگلوکان (Glucan)، لاکتوفرین (Lactoferin)، کیتین (Chitin)، کیتوزان و لوامیزول (Levamisole) باعث تحریک سیستم ایمنی ماهی و میگو می‌شوند. این محرک‌ها سبب تسهیل عمل بیگانه‌خواری سلول‌های فاگوسیت‌کننده و افزایش فعالیت ضد باکتریایی آن‌ها می‌شوند (۱۴).

کیتوزان یکی از محرک‌های رشد و ایمنی مناسب در آبزیان است (۷).از نظر ساختارشیمیایی پلیمری از گلوکز آمین می‌باشد و از استیل‌زدایی کیتین به‌دست می‌آید (۱۵). حلالیت کیتوزان در آب و سایر حلال‌های قطبی نسبت به کیتین بیشتر است و دارای خواص بیولوژیکی مانند افزایش تحریک و تعدیل ایمنی (۱۸)، ضد توموری(۲۲)، افزایش رشد (۱۶) و فعالیت ضد میکروبی (۲۱) می‌باشد.

گزارشات متعدد و بعضا متناقضی از اثر کیتوزان بر شاخص‌های رشد (۱۰، ۱۸، ۱۹) و فاکتورهای خونی آبزیان (۱۹، ۲۰) وجود دارد. به عنوان مثال، تحقیقات صورت گرفته بر روی کپور معمولی *(Cyprinus carpio)* (۹، ۱۲)، کفشک ماهی زیتونی *(Parallichthys olivaseus)*

(۶) و کپور روهو *(Labeo rohita)* (۱) نشان داده است که استفاده از کیتوزان منجر به بهبود عملکرد رشد می‌شود، در حالی‌که استفاده از سطوح مختلف کیتوزان (دو، پنج و ۱۰ درصد) بر رشد گونه‌های تیلاپیا *(Orechromis niloticus)* و *(Orechromis auratus)* نه تنها باعث افزایش رشد این ماهی نشده بلکه موجب کاهش رشد آن نیز گردیده است (۲۳). هم‌چنین هاریکریشنانو همکاران (۱۳) نشان دادند که تجویز خوراکی کیتوزان در ماهی هامور صخره‌ای *(Epinephelus bruneus)* منجر به افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های قرمز خون، تعداد گلبول‌های سفید، هماتوکریت و هموگلوبین شد، در حالی‌که کاهش معنی‌داری در شاخص‌های گلبولی (حجم متوسط گلبول قرمز خون، هموگلوبین متوسط گلبول‌های قرمز خون و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز خون) در مقایسه با کنترل در مواجهه با باکتری *Vibrio alginolyticus* مشاهده شد. با این حال، طبق تحقیقات صورت گرفته، استفاده از کیتوزان در جیره غذایی بر فاکتورهای خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *(Oncorhynchus mykiss)* و کپور معمولی تاثیر معنی‌داری نداشت (۹). طافی و همکاران (۲۵) نشان دادند که استفاده از ۰/۲۵ درصد کیتوزان در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، به‌طور معنی‌داری فعالیت لیزوزیم و مقدار گلوتاتیون پراکسیداز سرم را نسبت به گروه شاهد افزایش داد.

ماسکود و همکاران (۲۰) نیز گزارش نمودند که استفاده از دو درصد کیتوزان در جیره غذایی ماهی کپور معمولی منجر به افزایش فعالیت سیستم ایمنی غیر اختصاصی، کاهش مرگ و میر و افزایش رشد ماهی تحت شرایط استرس گردید. درتحقیقی دیگر با بررسی اثر تجویز خوراکی کیتوزان بر شاخص‌های رشد، خون‌شناسی و بیوشیمیایی ماهی کپور روهو *(Labeo rohita)* مشخص گردید که استفاده از ۱۰ گرم کیتوزان بر کیلوگرم غذا منجر به بهبود ضریب رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی، پروتئین تام، آلبومین گلوبولین، لیزوزیم سرم خون و هموگلوبین گردید (۱).

یکی از عمده‌ترین مسائلی که پرورش دهندگان ماهی با آن مواجه هستند عدم رشد، کاهش میزان ماندگاری و بقای ماهیان به‌خصوص در پرورش متراکم می‌باشد (۱). بر این اساس تقویت سیستم ایمنی بدن و استفاده از محرک‌های رشد به‌ویژه در گونه‌های با ارزش اقتصادی از اصلی‌ترین نیازهای پرورش دهندگان و مهم‌ترین رویکرد محققان می‌باشد (۹). لذا به نظر می‌رسد یکی از گزینه‌ها با توجه به شرایط کشور، استفاده از کیتوزان استحصالی از پوسته میگو (به‌عنوان یکی از محرک‌های رشد و ایمنی) گزینه مناسبی در این ارتباط می‌باشد.

هدف از این تحقیق، بررسی سطوح مختلف کیتوزان بر رشد، ایمنی ذاتی و برخی از شاخص‌های خونی ماهی کفال خاکستری به‌عنوان یکی از گونه‌های با ارزش اقتصادی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ماهی و شرایط پرورش

این پژوهش در اواخر آذرماه ۱۳۹۴ در کارگاه تکثیر و پرورش ماهی موسسه تحقیقات شیلات چابهار انجام شد. تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی کفال خاکستری از ساحل بریس (واقع در شهرستان چابهار) به کمک صیاد توسط تور پره صید و به محل آزمایش، انتقال داده شد. در طول دوره، پارامترهای آب اندازه‌گیری شد. به‌طور میانگین در کل دوره درجه حرارت آب ۱/۳۴±۲۸/۸ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۰/۸۲± ۶/۹۵ میلی‌گرم بر لیتر، pH آب ۰/۳±۷/۵ و شوری ۳۵ گرم بر لیتر بود. در طی دوره آزمایش، دوره نوری به‌صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود. به‌منظور هوادهی و نیاز اکسیژن ماهی‌ها به هر یک ازمخزن‌ها یک سنگ هوا که به منبع هواده متصل بود، نصب گردید. همچنین روزانه تعویض آب (۸۰ درصد) صورت گرفت.

طراحی آزمایش و شرایط تغذیه

بعد از دو هفته سازگاری، ماهی‌ها با میانگین وزنی ۱/۰۴±۱۲/۰۱ گرم به‌طور تصادفی به چهار تیمار با سه تکرار برای هر تیمار در داخل مخازن ۶۰ لیتری (عمق ۵۰ سانتی‌متر) که متصل به سیستم هوادهی قابل کنترل مرکزی بودند، تقسیم‌بندی شدند (۱۰ قطعه ماهی در هر تکرار). تیمار یک به‌عنوان گروه شاهد تنها از غذای پلت شده (ساخت شرکت ۲۱ بیضاء شیراز، ۳۶ درصد پروتئین، ۱۸ درصد چربی، ۱۰ درصد خاکستر، ۴۰ درصد فیبر، یک درصد فسفر و ۱۱ درصد رطوبت) استفاده نمود. تیمارهای دو، سه و ۴ به‌ترتیب با پنج، ۱۰ و ۱۵ گرم بر هر کیلوگرم غذا تغذیه شدند. سپس سطوح مشخص کیتوزان در اسید استیک یک درصد حل و با اسپری‌کننده‌های جداگانه به سطح غذا اسپری شدند. پس از ۴۸ ساعت جیره‌های خشک جمع‌آوری و در نایلون‌های مجزا در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. تیمار شاهد تنها با یک درصد اسید استیک اسپری شد (۲).

برای تعیین میزان غذای روزانه، ابتدا وزن توده زنده (بیوماس) هر مخزن محاسبه گردید. بیوماس از حاصل‌ضرب متوسط وزن ماهی‌های موجود در هر مخزن در تعداد ماهی به‌دست آمد و با تقسیم سه درصد بیوماس بر عدد دو (تعداد وعده‌های غذایی) (هشت صبح و ۱۶ عصر) مقدار غذایی که در هر وعده در اختیار ماهی‌های هر مخزن قرار گرفت محاسبه شد. به-منظور خروج بقایای مواد غذایی و دفعی هر روز یک‌بار قبل از غذادهی کف مخزن‌ها سیفون شد. تلفات هر مخزن، روزانه شمارش و ثبت گردید (۱۳).

زیست‌سنجی و بررسی پارامترهای رشد و تغذیه

به‌منظور اندازه‌گیری شاخص‌های رشد، در انتهای آزمایش، وزن (با دقت۰/۰۱ گرم) و طول (با دقت یک میلی‌متر) ماهی‌های هر مخزن ثبت گردید. با استفاده از داده‌های حاصل از زیست‌سنجی‌ها، افزایش وزن بدن، ضریب رشد ویژه، شاخص وضعیت، ضریب تبدیل غذایی، نسبت بازدهی پروتئین و درصد بقاء (۳) تعیین شد.

Specific growth ratio (SGR) (٪ day۱-)= (LnWf- Ln Wi)/t × ۱۰۰

SGR= ضریب رشد ویژه

W i = وزن اولیه (گرم)

Wf = وزن نهایی (گرم)

t= طول دوره پرورش (روز)

FCR= feed consumed/ WG

ضریب تبدیل غذایی (FCR)

WG = افزایش وزن بدست آمده (گرم)

Feed consumed = غذای مصرف شده (گرم)

Protein efficiency ratio (PER) = WG/ crude protein intake

PER = نسبت بازدهی پروتئین

Crude protein intake= میزان پروتئین مصرفی

WG= افزایش وزن بدست آمده (گرم)

Condition factor (CF) (٪) = ۱۰۰× (wet weight / (length) ۳)

CF = شاخص وضعیت

wet weight = وزن مرطوب (گرم)

length = طول (سانتی‌متر)

WG= افزایش وزن به‌دست آمده

Weight gain (WG) (٪) = (Wf- Wi)/ Wi×۱۰۰

W i = وزن اولیه (گرم) Wf = وزن نهایی (گرم)

Survival rate (SR) (٪) = N۰/ N۱۰۰×۱

Survival rate= میزان بقاء

N۰= تعداد اولیه ماهی

N۱ = تعداد نهایی ماهی

خون‌گیری از ماهی

برای سنجش خون‌شناسی و پاسخ ایمنی ذاتی به‌صورت تصادفی از نه قطعه ماهی هر تیمار پس از بیهوشی با عصاره گل میخک (دو گرم بر لیتر) خون‌گیری از قلب با استفاده از سوزن و سرنگ هپارینه و غیر هپارینه شده صورت گرفت. سپس سرنگ حاوی خون هپارینه شده وارد میکروتیوب مورد نظر شد و از جداره میکروتیوب خون در داخل آن ریخته شد و با بستن درب میکروتیوب، به کمک انگشتان اشاره و شست، ظرف حاوی خون به آهستگی و به روش نیم دورانی به بالا و پایین تکان داده شد تا خون کاملا با هپارین مخلوط شود و در دمای ۴ - درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۳). خون فاقد هپارین پس از جمع‌آوری در میکروتیوب با دور ۳۰۰۰ بر دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (Hettich مدل DV۲۰۰، ساخت کشور ژاپن) و سرم آن جدا گردید و در دمای ۷۰- °C نگهداری شد (۱۳).

سنجش پارامترهای خون‌شناسی

شمارش کلی گلبول‌های سفید به روش مستقیم (با استفاده از لام هموسیتوتر) با رقیق کردن خون به نسبت یک به ۲۰۰ با محلول رقیق کننده پروچازکا و اسکروباک (Prochazka and Skrobak) (۳/۸۸ گرم کلرید سدیم، ۲/۵ گرم سولفات سدیم، ۲/۹۱ گرم دودکاهیدرات مونوهیدروفسفات سدیم، ۰/۲۵ میلی‌لیتر دی هیدروفسفات پتاسیم، ۷/۵ میلی‌لیتر فرمالدیید۳۷ درصد و ۰/۱ گرم بریلیانت کرزیل بلو در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر)، صورت گرفت. پس از انتقال نمونه رقیق شده به لام هموسیتومتر تعداد گلبول‌های سفید در چهار مربع بزرگ اطراف شمارش گردید و سپس تعداد کل گلبول‌های سفید در میلی‌متر مکعب خون محاسبه شد (۲۳).

برای رقیق نمودن خون جهت شمارش تعداد گلبول قرمز از پیپت حبابدار (ملانژور) استفاده گردید. تعداد گلبول‌های قرمز با استفاده از لام نئوبار بعد از رقیق سازی خون هپارینه با محلول داسیس (۱۰ میلی‌لیتر فرمالدیید، ۳۱/۳ گرم تری‌سیترات سدیم و یک گرم بریلیانت کرزیل بلو، در یک لیتر آب مقطر) (رقت ۱/۲۰۰) شمارش شد. از مربع میانی (پنج مربع از ۲۵ مربع میانی) لام نئوبار برای شمارش گلبول قرمز استفاده و عدد به‌دست آمده در عدد ۱۰۰۰۰ ضرب شد و تعداد گلبول قرمز در یک میلی‌متر مکعب خون محاسبه گردید (۲۳).

برای تعیین میزان هموگلوبین، طبق روش سیانومت هموگلوبین، ابتدا ۱۰ میلی لیتر محلول درآبکین (۲۰۰ میلی‌گرم فری‌سیانایدپتاسیم، ۵۰ میلی‌گرم سیانایدپتاسیم و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بی‌کربنات سدیم در یک لیتر آب مقطر) در لوله آزمایش ریخته و ۲۰ میکرولیتر از خون به آن اضافه شد. لوله‌ها به‌مدت پنج دقیقه روی شیکر قرار گرفته تا محلول و خون کاملا مخلوط شوند. سپس غلظت با استفاده از دستگاه طیف سنج در طول موج ۵۴۰ نانومتر تعیین و بر اساس گرم در دسی‌لیتر به‌دست آمد (۱۱).

برای تعیین میزان هماتوکریت از روش میکروهماتوکریت استفاده گردید (۱۱). شاخص‌های گلبولی یعنی حجم متوسط گلبولی (Mean Corpuscular Volume)، میزان متوسط هموگلوبین گلبولی (Mean Corpuscular Hemoglobin) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration) با استفاده از فرمول‌های استاندارد موجود محاسبه گردید (۱۳).

MCV= تعداد گلبول‌های قرمز (میلی‌لیتر در مترمکعب) /۱۰ × هماتوکریت (٪)

MCH= تعداد گلبول‌های قرمز (میلی‌لیتر بر مترمکعب) / هموگلوبین (گرم بر دسی‌لیتر) × ۱۰

MCHC= هماتوکریت (٪) / هموگلوبین (گرم بر دسی‌لیتر) ×۱۰۰

سنجش پارامترهای بیوشیمیایی خون

مقدار پروتئین تام سرم با استفاده از کیت تشخیصی شرکت پارس آزمون و به روش بیوره مورد سنجش قرار گرفت و جذب نوری در طول موج ۵۵۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (UV/-WPAS۲۰۰۰ VIS, Cambridge, UK) قرائت شد. و میزان پروتئین تام بر حسب گرم بر دسی‌لیتر محاسبه گردید (۵).

مقدار آلبومین تام سرم به روش بروموکرزول سبز و با استفاده از کیت تشخیصی شرکت پارس آزمون مورد سنجش قرار گرفت. جذب نوری این محلول را در طول موج ۶۳۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (UV/VIS, Cambridge, UK-WPAS۲۰۰۰) در مقابل بلانک قرائت گردید و میزان آلبومین برحسب گرم بر دسی‌لیتر محاسبه گردید (۵). از کسر پروتئین تام از آلبومین میزان گلوبولین محاسبه شد (۱۷). میزان نسبت آلبومین به گلوبولین از تقسیم کردن مقادیر آلبومین تام گلوبولین محاسبه شد (۱۷).

سنجش فعالیت لیزوزیم

سنجش فعالیت لیزوزیم سرم نمونه‌ها، بر اساس روش توصیه شده توسط الیس (۸) صورت گرفت. ابتدا ۱۷۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروکوکوس لیزودیکتیکوس *(Micrococcus lysodeikticus)* (محصول

سیگما) (معادل مقدار ۰/۳۷۵ گرم به ازای هر میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم با مولاریته ۰/۰۵ و pH برابر ۶/۲) با میزان ۲۵۰ میکرولیتر از هر نمونه مخلوط و در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد. میزان جذب نوری پس از ۱۵ و ۱۸۰ ثانیه به روش اسپکتروفتومتری و در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت گردید. سپس تفاوت جذب نوری بین اولین و دومین مرحله نورسنجی ثبت شد و نتایج حاصله بر حسب واحد بر میلی‌لیتر به کمک رسم منحنی استاندارد با استفاده از رقت‌های بر مبنای دوی لیزوزیم سفیده تخم مرغ (محصول سیگما) تهیه گردید و در بافر فسفات سدیم محاسبه شد (رقت اولیه ۱/۶ میکرو گرم بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد). هم‌چنین از بافر فسفات سدیم به عنوان بلانک استفاده شد.

آنالیز آماری

ابتدا نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون کالموگراف اسمیرنف بررسی شد. سپس برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از اندازه‌گیری شاخص‌های رشد، هماتولوژی، پارامترهای بیوشیمیایی خون و فعالیت لیزوزیم از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و جهت مقایسه میانگین‌ها (میانگین± خطای معیار) از آزمون مقایسه چند دامنه‌ای دانکن با سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد (α=۰/۰۵). برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS ۱۶ در محیط ویندوز XP استفاده گردید. رسم نمودارها درمحیط Excel (۲۰۱۳) انجام شد.

نتایج

شاخص‌های رشد

نتایج مربوط به شاخص‌های رشد، تغذیه و بقاء تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش در جدول ۴-۱ آورده شده است. ماهی‌ها از میانگین وزن اولیه ۱۲/۰۱ گرم به دامنه میانگین وزن نهایی ۲۱/۶۷ الی ۲۶/۴۳ گرم در طول دوره ۶۰ روزه آزمایش رسیدند. نتایج نشان داد که افزودن مقادیر ۱۰ و ۱۵ گرم کیتوزان در هر کیلوگرم غذا تفاوت معنی‌داری را در میانگین وزن نهایی، ضریب رشد ویژه، افزایش وزن بدن، نسبت بازدهی پروتئین، ضریب تبدیل غذایی و شاخص وضعیت در مقایسه با تیمار شاهد و تیمار تغذیه شده با پنج گرم کیتوزان در هر کیلوگرم غذا ایجاد کرد (P<۰/۰۵). در حالی‌که تیمار دو و شاهد تفاوت معنی‌داری را در کلیه شاخص‌های رشد و تغذیه نشان ندادند (P>۰/۰۵). بیشترین میزان وزن نهایی، شاخص وضعیت، میزان افزایش وزن بدن و نسبت بازدهی پروتئین در تیمار سه مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری با تیمار چهار داشت (P<۰/۰۵). از نظر میزان بقاء بین کلیه تیمارها اختلاف معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

پارامترهای خون‌شناسی

تغییرات میانگین شاخص‌های خون‌شناسی در ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش (روز۶۰) در جدول۲ نشان داده شده است. تعداد گلبول‌های قرمز در تیمارهای تغذیه شده با پنج و ۱۵ گرم کیتوزان در هر کیلوگرم غذا اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان ندادند (P>۰/۰۵). در حالی‌که تعداد گلبول‌های قرمز در تیمار سه افزایش معنی‌داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵)، اگرچه با تیمار دو و چهار اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵). بیشترین تعداد گلبول سفید در تیمار سه و چهار مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با تیمار دو و شاهد نشان داد

جدول۱- میانگین (میانگین± خطای معیار) شاخص های رشد، تغذیه و بقاء ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش (با سه تکرار)

	تیمار			
	۱	۲	۳	۴
وزن اولیه (گرم)	۱۲/۰۳ ±۱/۰۵ a	۱۱/۹۰ ±۱/۱۲ a	۱۲/۰۷ ±۱/۰۸ a	۱۲/۰۳ ±۰/۰۴ a
وزن نهایی (گرم)	۲۱/۶۷ ±۱/۳۳ a	۲۱/۸۴ ±۱/۰۳ a	۲۶/۴۳ ±۱/۲۶ c	۲۴/۷۲ ±۱/۰۸ b
افزایش وزن بدست آمده (درصد)	۸۰/۱۴ ±۱/۷۲ a	۸۳/۸۳ ±۱/۹۰ a	۱۱۹/۰۷ ±۲/۴۸ c	۱۰۵/۵۱ ±۱/۴۸ b
ضریب رشد ویژه	۰/۹۸ ±۰/۰ a	۱/۰۱ ±۰/۰۱ a	۱/۳۰ ±۰/۰۴ b	۱/۲۸ ±۰/۰۱ b
ضریب تبدیل غذا	۱/۷۴ ±۰/۰۳ c	۱/۷۱ ±۰/۰۱ c	۱/۴۲ ±۰/۰۳ a	۱/۵۲ ±۰/۰۱ b
نسبت بازدهی پروتئین	۱/۴۷ ±۰/۰۱ a	۱/۵۴ ±۰/۰۳ a	۲/۱۹ ±۰/۰۴ c	۱/۹۴ ±۱/۲۳ b
شاخص وضعیت	۰/۹۸ ±۰ a	۰/۹۹ ±۰ a	۱/۲۰ ±۰/۰۱ c	۱/۱۲ ±۰/۰۴ b
بقاء (درصد)	۱۰۰ ±۰ a	۹۸/۴۵ ±۰/۲۳ a	۱۰۰ ±۰/۰ a	۹۷/۵۵ ±۰/۵۴ a

حروف نامشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است (p<۰/۰۵). تیمار یک: تیمار شاهد، تیمارهای دو تا چهار به‌ترتیب حاوی پنج، ۱۰ و ۱۵ گرم کیتوزان در هر کیلوگرم جیره غذا بودند.

(P<۰/۰۵). بین تیمار سه و چهار از نظر تعداد گلبول‌های سفید تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵) هم‌چنین بین تیمار دو و تیمار شاهد این اختلاف معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). تیمار تغذیه شده با پنج گرم کیتوزان در هر کیلوگرم غذا (تیمار دو) از نظر تعداد گلبول‌های سفید اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان نداد (P>۰/۰۵). بین تیمارهای تغذیه شده با پنج گرم کیتوزان در هر کیلوگرم غذا و شاهد تفاوت معنی‌داری از نظر میزان هموگلوبین مشاهده نشد (P>۰/۰۵). هم‌چنین بین تیمار سه و چهار اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵) و بیشترین میزان هموگلوبین در تیمار سه و چهار مشاهده شد. میزان هماتوکریت در تیمارهای تغذیه شده با کیتوزان تفاوت معنی‌داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان ندادند (P>۰/۰۵) و بین کلیه تیمارها این اختلاف معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). حجم متوسط گلبول قرمز در کلیه تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵) (شکل ۲ الف). بین تیمارهای تغذیه شده با کیتوزان در هر کیلوگرم غذا از نظر هموگلوبین متوسط گلبول قرمز خون و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵).

پارامترهای بیوشیمیایی خون

تغییرات میانگین (± خطای معیار) پروتئین تام ، آلبومین و گلوبولین سرم خون ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف، در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰)، در شکل ۱ نشان داده شده است. میزان پروتئین تام در تیمارهای سه و چهار اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵) و بیشترین میزان پروتئین تام در تیمار تغذیه شده با ۱۵ گرم کیتوزان در هر کیلوگرم غذا مشاهده شد و بین تیمارهای سه و چهار این اختلاف معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵) (شکل ۱ الف). میزان آلبومین در تیمارهای سه و چهار افزایش معنی‌داری را در مقایسه با تیمارهای دو و شاهد نشان داد (P<۰/۰۵) در حالی‌که این اختلاف بین تیمار یک و دو معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵) و بیشترین میزان آلبومین در تیمار چهار مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با تیمار سه نشان داد (P<۰/۰۵) (شکل ۱ ب). کمترین میزان گلوبولین در تیمار شاهد مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با تیمار دو نشان نداد (P>۰/۰۵). هم‌چنین بین تیمار دو و سه این اختلاف معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). بیشترین میزان گلوبولین در تیمار چهار مشاهده شد در حالی‌که اختلاف معنی‌داری را با تیمار سه نشان نداد (P>۰/۰۵) (شکل ۱ ج).

فعالیت لیزوزیم

تغییرات میانگین (± خطای معیار) فعالیت آنزیم لیزوزیم سرم خون ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف در پایان دوره ازمایش (روز ۶۰)، در شکل ۲ نشان داده شده است. فعالیت لیزوزیم در تیمارهای سه و چهار افزایش معنی‌داری را در مقایسه با تیمار شاهد و تیمار دو نشان داد (P<۰/۰۵)، در حالی‌که بین تیمارهای سه و چهار این اختلاف معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). هم‌چنین در بین تیمارهای دو و یک اختلاف معنی‌داری بین فعالیت لیزوزیم مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

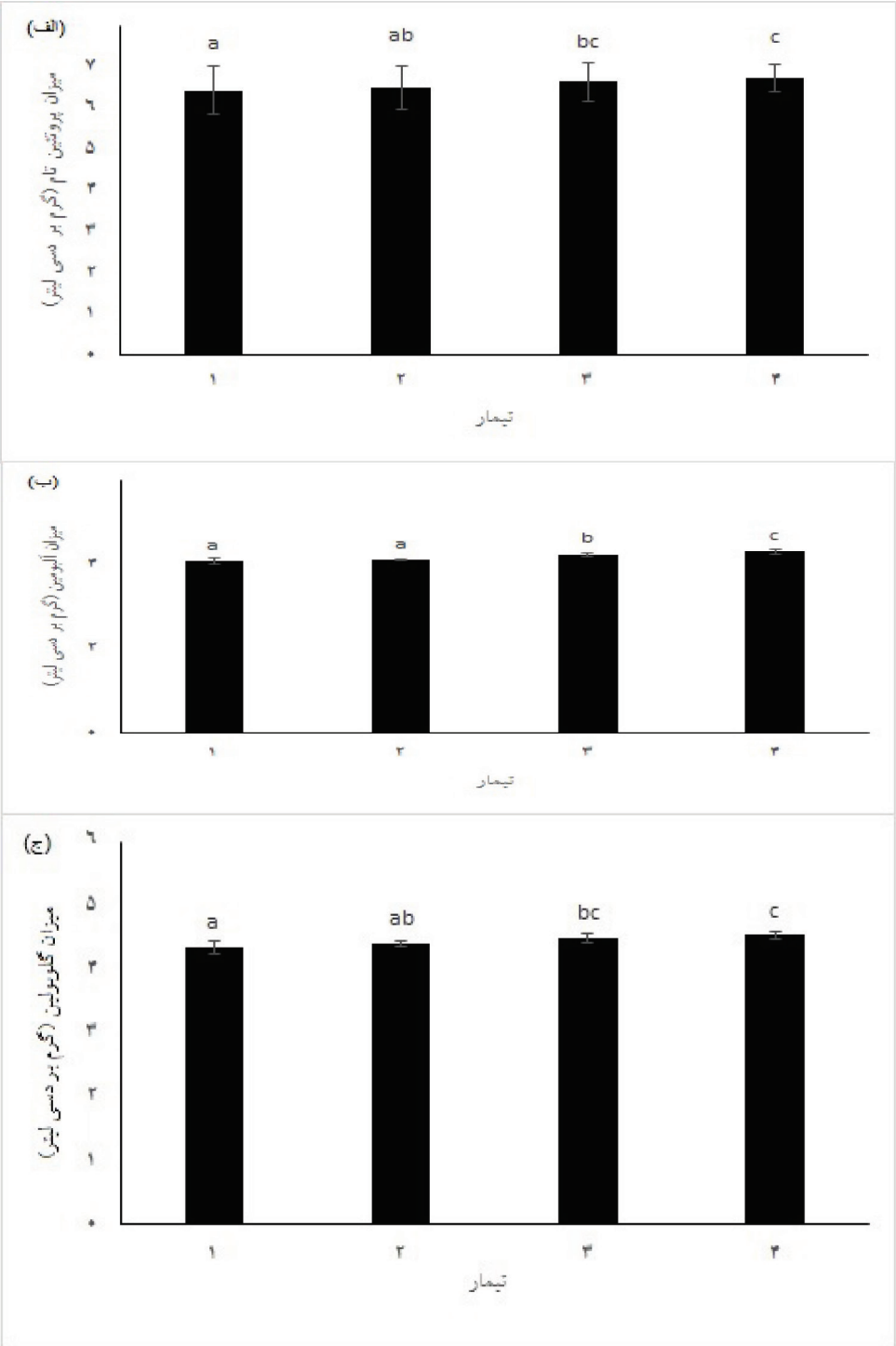
بحث و نتیجه‌گیری

امروزه استفاده از محرک‌های رشد و ایمنی یکی از روش‌هایی است که به‌منظور هضم و جذب بهتر مواد غذایی، افزایش رشد، افزایش تولید

جدول ۲- میانگین و خطای معیار شاخص‌های خون‌شناسی ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش (روز۰۶، با سه تکرار).

	تیمار			
	۱	۲	۳	۴
گلبول قرمز (تعداد بر سانتی متر مکعب)×۱۰۶	۲۵۵/۶۷ ±۵/۹۶ a	۲۶۰ ±۴/۷۶ a	۲۶۳/۳۳ ±۵/۴۷ a	۲۶۱/۳۳ ±۶/۴۵ a
گلبول سفید (تعداد بر سانتی متر مکعب)×۱۰۴	۱۵۴ ±۳/۷۴ a	۱۵۸ ±۵/۴۸ a	۲۶۷/۶۷ ±۹/۲۳ b	۲۶۵/۳۳ ±۱۱/۷۹ b
هموگلوبین (گرم بر دسی‌لیتر)	۴/۴۰ ±۰/۴ a	۶/۹ ±۰/۳۲ b	۶/۵۶ ±۰/۴۵ b	۷ ±۰/۷ b
هماتوکریت (درصد)	۲۹/۷۵ ±۲/۱۴ a	۲۹/۹۸ ±۱/۷۶ a	۳۰/۵۸ ±۱/۵۲ a	۳۰/۲۵ ±۱/۷۶ a
حجم متوسط گلبول قرمز (فمتولیتر)	۱۱۶/۴۰ ±۱/۸۶ a	۱۱۵/۳۲ ±۱/۲۰ a	۱۱۶/۱۵ ±۱/۵۲ a	۱۱۵/۷۹ ±۲/۱۴ a
هموگلوبین متوسط گلبول قرمز خون (پیکوگرم)	۷۴/۲۱ ±۱/۲۰ a	۱۶۰/۰۲ ±۱/۵۳ b	۱۱۱/۵۱ ±۰/۷۹ b	۱۱۵/۴۵ ±۱/۹۰ b
متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (درصد)	۶۳/۷۶ ±۰/۹۷ a	۱۰۰/۶۵ ±۲/۳۹ b	۹۶/۰۵ ±۱/۸۵ b	۹۹/۷۶ ±۲/۴۱ b

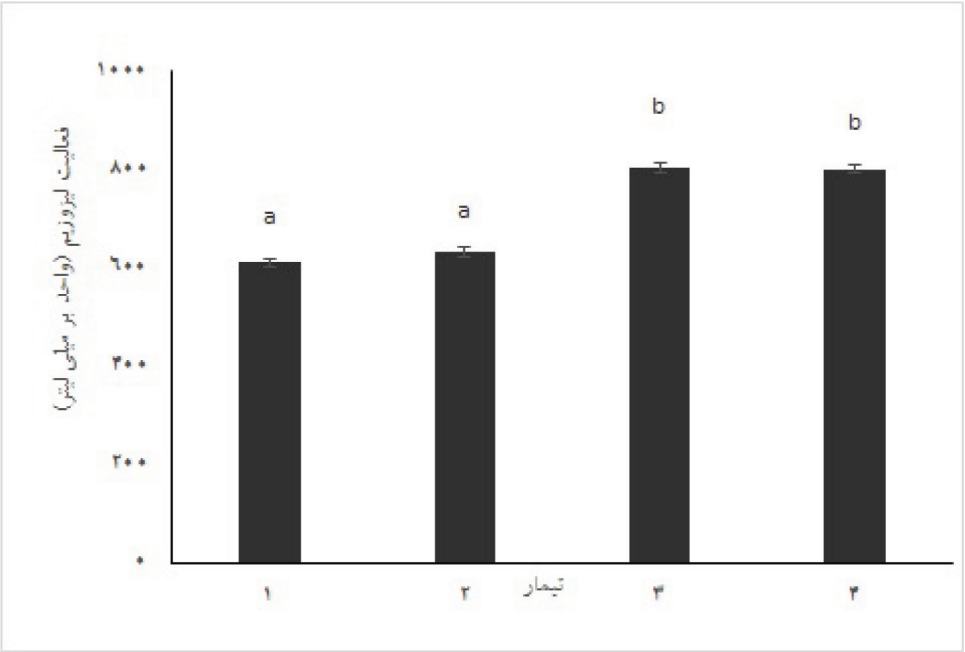
حروف نامشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است (p<۰/۰۵). تیمار یک: تیمار شاهد، تیمارهای دو تا چهار به‌ترتیب حاوی پنج، ۱۰ و ۱۵ گرم کیتوزان در هر کیلوگرم جیره غذا بودند.



شکل ۱- میانگین و خطای معیار پروتئین تام (الف)، آلبومین (ب) و گلوبولین (ج) سرم خون ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش(روز ۶۰، با سه تکرار). حروف نامشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است. تیمار یک: تیمار شاهد، تیمارهای دو تا چهار به‌ترتیب حاوی پنج، ۱۰ و ۱۵ گرم کیتوزان در هر کیلوگرم جیره غذا بودند.

و دستیابی به محصولی با کیفیت بالاتر به‌کار می‌رود (۲۴). نتایج حاصل از تغییرات شاخص های رشد در بین تیمارهای مختلف نشان داد که که افزودن مقادیر ۱۰ و ۱۵ گرم کیتوزان در هر کیلوگرم غذا تفاوت معنی‌داری را در شاخص‌های رشد و تغذیه در مقایسه با تیمار شاهد و تیمار تغذیه شده با پنج گرم کیتوزان در هر کیلوگرم غذا ایجاد کرد و بیشترین میزان وزن نهایی، شاخص وضعیت، میزان افزایش وزن بدن و نسبت بازدهی پروتئین در تیمار حاوی ۱۰ گرم کیتوزان بر کیلوگرم غذا مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد.گاپالاکنن و آرل و (۱۲) گزارش کردند که کیتوزان با افزایش هضم و جذب غذا باعث رشد بیشتر و کاهش ضریب تبدیل غذایی در گونه کپور معمولی *(Cyprinus carpio)* تغذیه شده با ۱۰ گرم کیتوزان بر کیلوگرم غذا شد که با نتایج به‌دست آمده از این تحقیق و تحقیقات مشابه صورت گرفته بر روی کپور معمولی تغذیه شده با ۱۰ گرم کیتوزان بر کیلوگرم غذا (۹)، کفشک ماهی زیتونی *(Parallichthys olivaseus)* تغذیه شده با یک درصد کیتوزان (۶) و کپور روهو تغذیه شده با ۱۰ گرم کیتوزان بر کیلوگرم غذا (۱) همخوانی داشت. هر چند کیتوزان به‌عنوان محرک ایمنی در برخی گونه‌های آبزیان آثار مثبت و معنی‌داری بر شاخص‌های رشد و تغذیه نشان داده است، اما تمام گونه‌هایی که تاکنون در تحقیقات انجام شده توسط محققین مختلف، کیتوزان دریافت نموده‌اند، افزایش رشد مثبت و رضایت بخشی را نشان نداده‌اند. به‌عنوان مثال، کونو و همکاران (۱۶) ماهیان سیم قرمز *(Abramis brama)*، مارماهی ژاپنی *(Anguilla japonica)* و ماهی دم زرد *(Zebrasoma xanthurum)* را با جیره حاوی ۱۰ درصد کیتوزان تغذیه نمودند و گزارش کردند کیتوزان تاثیر قابل ملاحظه و معنی‌داری بر افزایش رشد این گونه‌ها نداشته است. هم‌چنین تحقیق صورت گرفته بر روی هیبریدی از گونه‌های تیلاپیای تغذیه شده با سطوح مختلف کیتوزان (دو، پنج و ۱۰ درصد) نشان داد که کیتوزان نه تنها باعث افزایش رشد ماهی نشد بلکه موجب کاهش رشد این گونه نیز گردید که که دلیل این امر را نقش ممانعت کنندگی کیتوزان از جذب کامل چربی‌ها و کربوهیدرات‌های جیره غذایی در دستگاه گوارش ماهی مورد مطالعه بیان نمود (۲۳). هم‌چنین دلیل مغایرت نتایج را نیز می توان به عواملی نظیر اختلاف در روش استحصال کیتوزان، تفاوت فیزیولوژی گونه ماهی مورد بررسی، تفاوت گونه میگویی که کیتوزان از آن استخراج شده و میزان خلوص کیتوزان حاصل نسبت داد (۹، ۱۸). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که کاهش میزان وزن نهایی، نسبت بازدهی پروتئین، شاخص وضعیت و افزایش وزن به‌دست آمده در تیمار حاوی ۱۵ گرم کیتوزان بر کیلوگرم غذا در مقایسه با تیمار حاوی ۱۰ گرم کیتوزان بر کیلوگرم غذا را می توان به اثر بازدارندگی کیتوزان در غلظت‌های بالا نسبت داد (۱۸).

بررسی فراسنجه‌های خونی وسیله‌ای مناسب برای سنجش وضعیت سلامتی ماهی می‌باشد (۱۸). اندازه‌گیری فاکتورهای خون‌شناسی در



شکل ۲- میانگین و خطای معیار فعالیت لیزوزیم سرم خون ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰، با سه تکرار). حروف نامشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است. تیمار یک: تیمار شاهد، تیمارهای دو تا چهار به‌ترتیب حاوی پنج، ۱۰ و ۱۵ گرم کیتوزان در هر کیلوگرم جیره غذا بودند.

ماهی، نه تنها برای بررسی وضعیت سلامتی ماهی بلکه برای بررسی احتمالی برخی مواد ضد تغذیه‌ای حائز اهمیت می‌باشد (۹). نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که بیشترین هموگلوبین، تعداد گلبول‌های سفید، هموگلوبین متوسط گلبول‌های قرمز خون و حجم متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز خون، در تیمارهای حاوی ۱۰ و ۱۵ گرم کیتوزان بر کیلوگرم غذا مشاهده شدند که با بقیه تیمارها تفاوت معنی‌داری را نشان دادند که می‌توان گفت که کیتوزان تاثیر مثبتی بر عملکرد بافت خونساز و بهبود شاخص‌های خونی دارد و با تاثیر بر جذب آهن مانع کم خونی می‌شود (۱، ۱۳). از طرف دیگر، تعداد گلبول‌های سفید یکی از شاخص‌های مهم سلامتی و وضعیت سیستم ایمنی در ماهی‌ها است و نقش مهمی در فعالیت‌های فاگوسیتی و پاسخ ایمنی به مبارزات باکتریایی، ویروسی و انگلی دارد(۱، ۱۳). لذا با توجه به افزایش تعداد گلبول سفید در پژوهش حاضر می‌توان گفت که کیتوزان موجب افزایش پاسخ ایمنی غیر اختصاصی در ماهی کفال خاکستری می‌شود. هاریکشنان و همکاران (۱۳) نشان دادند که تجویز خوراکی کیتوزان در ماهی هامور صخره‌ای منجر به افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های قرمز خون، تعداد گلبول‌های سفید، هماتوکریت و هموگلوبین شد که با نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی داشت. در حالی‌که نتایج حاصل از تحقیق صورت گرفته بر روی کپور معمولی نشان داد که تجویز خوراکی سطوح مختلف کیتوزان (دو، پنج و ۱۰ درصد) تاثیر معنی‌داری بر فاکتورهای خونی و شاخص‌های گلبولی نداشت (۹) و نتایج مشابهی از عدم تاثیر کیتوزان خوراکی بر فاکتورهای خونی ماهی قزل آلای رنگین کمان (۲۵) و کپور معمولی (۱۲) نیز گزارش شده است که با نتایج این تحقیق همخوانی نداشت. دلیل مغایرت نتایج به‌دست آمده در این زمینه را می-توان به نسبت کیتوزان مصرفی یا مدت زمان استفاده از آن نسبت داد (۱۹).

حضور پپتیدهای مختلف نظیر لیزوزیم، آنتی‌بادی، عوامل کمپلمان و عوامل دیگر لیتیک در سرم خون به‌عنوان خط اولیه دفاعی نقش مهمی در پیش‌گیری از بیماری‌های عفونی و تقویت سیستم ایمنی غیر اختصاصی دارد (۱۳). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که افزودن از سطوح ۱۰و ۱۵ گرم کیتوزان بر کیلوگرم غذا منجر به افزایش معنی‌دار میزان پروتئین تام، آلبومین و گلوبین سرم خون در مقایسه با تیمار شاهد و تیمار حاوی پنج گرم کیتوزان بر کیلوگرم غذا شد که با نتایج به‌دست آمده از تحقیقات صورت گرفته بر روی ماهی هامور صخره‌ای *(Epinephelus bruneus)* تغذیه شده با یک و دو درصد کیتوزان (۱۳) و کفشک ماهی زیتونی *(Parallichthys olivaseus)* تغذیه شده با یک درصد (۶) کیتوزان همخوانی داشت. گلوبولین نقش مهمی در حفظ سلامت و ایمنی داشته و گاماگلوبولین به‌عنوان منبع همه پروتئین‌های لازم برای عملکرد ایمنی در خون شناخته شده است (۱۳). در حالی‌که آلبومین نقش مهمی در ثبات فشار اسمزی به منظور توزیع مناسب مایعات بدن داشته و به‌عنوان حامل پلاسما و لیگاندهای غیر اختصاصی (به همراه تعدادی جایگاه‌های اتصال) عمل می‌نماید (۱۳). از طرف‌دیگر، افزایش آلبومین سرم خون در این تحقیق را می‌توان نتیجه پاسخ به افزایش انتقال اسید-های چرب از بافت‌ها جهت فرآیند اکسیداسیون دانست که سبب ساخت بیشتر پروتئین و صرفه جویی در مصرف پروتئین توسط بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب شده است (۱، ۱۳).

لیزوزیم یکی از پارامترهای دفاع غیر اختصاصی ذاتی مهم می باشد همچنین از دسته آنزیم‌های باکتریسیدال مهم ایمنی ذاتی است که در زمان عفونت با باکتری گرم مثبت و همچنین در شرایط استرس زا به عنوان یک پروتئین فاز حاد عمل می کند و نقش عملکردی آن در مبارزه با عفونتهای مختلف ماهیان گزارش شده است (۱۳، ۲۵). مطالعه حاضر نشان داد که افزودن از سطوح ۱۰و ۱۵ گرم کیتوزان بر کیلوگرم غذا منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت لیزوزیم در مقایسه با تیمار شاهد و تیمار حاوی پنج گرم کیتوزان بر کیلوگرم غذا شد که با نتایج به‌دست آمده از تحقیق صورت گرفته بر روی هامور صخره ای تغذیه شده با یک و دو درصد کیتوزان (۱۳)، ماهی قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با ۰/۲۵ درصد کیتوزان (۲۵)، کپور روهو تغذیه شده با ۱۰ گرم کیتوزان بر کیلوگرم غذا (۱) و کپور معمولی تغذیه شده با دو درصد کیتوزان (۱۶) همخوانی داشت. این موضوع نشان می‌دهد که کیتوزان نیز همانند سایر محرک‌های ایمنی تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر پاسخ‌های ایمنی در آبزیان دارد. درکل، نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان داد که استفاده از سطوح ۱۰ و ۱۵ گرم کیتوزان بر کیلوگرم غذا در جیره غذایی ماهی کفال خاکستری بهینه‌ترین سطوح به‌منظور بهبود شاخص‌های رشد، خون‌شناسی، پاسخ‌های بیوشیمیایی خون و ایمنی ذاتی در این ماهی پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری ریاست و پرسنل محترم موسسه تحقیقات شیلات چابهار و کارشناس محترم پژوهشکده غدد متابولیسم درون ریز دانشگاه شهید بهشتی تهران تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1. Aathi, K., V. Ramasubramanian, V. Uthayakumar and S. Munirasu. 2013. Effect of supplemented diet on survival, growth, hematological, biochemical and immunological responses of indian major carp labeo rohita. *International Research Journal of Pharmacy* 4(5):141-147.

2. Asmita, S. and S. Uday. 2013. Effect of coating of hydrocolloids on chickpea (*Cicer arietinum* L.) and green gram *(Vigna radiate)* splits during deep fat frying. *International Food Research Journal* 20: 565-573.

3. Bai, S. C. 2001. Requirements of L-ascorbic acid in a viviparous marine teleost, Korean rochfish *(Sebaster schlegeli)*. pp. 69-85, In: K. Dabrowski (Eds.), Ascorbic acid in aquatic organism. CRC press.

4. Bricknell, I. and R. A. Dalmo. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology* 19: 457- 472.

5. Burtis, C. A. and E. R. Ashwood. 1994. Tietz Textbook of Clinical Chemistry (2th edition).W. B.Sunders Company, Philadelphia,

USA

6. Cha, S. H., J. S. Lee, C. B. Song and K. J. Lee. 2008. Effects of Chitosan-coated diet on improving water quality and innate immunity in the Oliver flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 278: 110-118.

7. Cheba, B. A. 2011. Chitin and chitosan: marine biopolymers with unique properties and versatile applications. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry* 6: 149-153.

8. Ellis, A. E. 1990. Lysozyme Assays. pp. 78-90 In: J. S. Stolen, T. C. Fletcher, D. P. Anderson, B. S. Roberson, W.B. Van Muiswinkel (eds), Techniques in: Fish Immunology. Fair Haven, NJ: SOS Publications.

9. Esmaeili Rad, A., M. Alishahi, M. Ghorbanpour and M. Zarei. 2014. The effects of oral administration of extracted chitosan from white leg shrimp *(Litopenaeus vannamei*) on hematological and growth indices in common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Veterinary Research* 69(4):385-393. (In Farsi).

10. Geng, X., X. Dong, B. Tan, Q. Yang, S. Chi, H. Liu and X. Liu. 2011. Effects of dietary chitosan and Bacillus subtilis on the growth performance nonspecific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Fish and Shellfish Immunology* 31: 400- 406.

11.Goldenfarb, P. B., F. P. Bowyer, T. Hall and E. Brosious. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory the microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Patholology* 56, 35-39.

12. Gopalakannan, A. and V. Arul. 2006. Effects of dietart intake of Chitin, Chitosan and Levamisol and immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in pond. *Aquaculture* 255: 179-187.

13. Harikrishnan, R., J. Kim, C. Balasundaram and M. Heo .2012. Immunomodulatory effects of chitin and chitosan enriched diets in Epinephelus bruneus against *Vibrio alginolyticus* infection. *Aquaculture* 326: 46-52.

14. Kakuta, I and H. Kurokura. 1995. Defensive effect of orally administered bovine lactoferrin against *Cryptocaryon irritans* infection of red seabream. *Journal of Fish Pathology* 30: 289–290.

15. Kim, S. K. and N. Rajapakes. 2005. Enzymatic production biological activities of chitosan oligo sacharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers* 62: 357-368.

16. Kono, M., T. Matsui and C. Shimizu 1987. Effects of chitin, chitosan and cellulose as diet supplements on the growth of cultured fish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53: 125-129.

17. Kumar, S., N. P. Sahu, A. K. Pal, D. Choudhury, S. Yengkokpam and S. C. Mukherjee. 2005. Effect of dietary carbohydrate on haematology, respiratory burst activity and histological changes in Labeo rohita juveniles. *Fish and Shellfish Immunology* 19: 331-344.

18. Lin, S., Y. Pan, L. Luo and L. Luo. 2011. Effects of dietary b-1, 3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio* koi). *Fish and Shellfish Immunology* 31: 788-794.

19. Lin, S., S. Mao, Y. Guan, L Luo, L., Luo and Y. Pan. 2012. Effects of dietary chitosan oligosaccharidesand Bacillus coagulans on the growth, innateimmunity and resistance of koi *(Cyprinus carpio koi)*. *Aquaculture* 342: 36- 41.

20. Maqsood, S., P. Singh, M. H. Samoon and A. K. Balange. 2010. Effect of dietary chitosan on nonspecific immune response and growth of *Cyprinus carpio* challenged with *Aeromonas hydrophila*. *International Aquatic Research* 2: 77-85.

21. No, H., N. Y. Park, S. H. Lee and S. P. Meyers. 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosanoligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology* 74: 65-72.

22. Qin, C., Y. Du, L. Xiao, Z. Li and X. Gao. 2002. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 31: 111-117.

23. Shiau, S. Y. and Y. P. Ya. 1999. Dietary supplementation of chitin and Chitosan depresses growth in Tilapia, *Orecromis niloticus* × *Orecromis auratus*. *Aquaculture* 179: 439-446.

24. Sukhoverkhov, F. M. 2006. The effect of cobalt, vitamin, tissue preparations and antibiotics on carp production. Available online at. http://www.FAO.com. Accessed 21 April 2006

25. Tafi, A. A., S. Meshkini and A. Tukmechi. 2013. Effects of Chitosan on some immune response of rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* and enhance resistance against a pathogenic Aeromonas hydrophila fallowing experimental infection. *Journal of Animal Research* 26 (4):468-477. (In Farsi)