



اثر اولترا ای مکس بر فرایندهای رسیدگی جنسی، فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی سرم خون در فیل ماهیان پروراری (*Huso huso*) در خلیج گرگان

مجید رضایی^۱، حجت الله جعفریان^{۱*}، هادی رئیسی^۱، سید مصطفی عقیلی نژاد^۲

^۱ گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

^۲ مرکز بهره برداری ماهیان خاویاری استان گلستان، گرگان، ایران

چکیده

نوع مقاله:

پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۸/۰۲/۳۱

اصلاح: ۹۸/۰۵/۱۳

پذیرش: ۹۹/۱۱/۰۲

کلمات کلیدی:

استروئیدی

پری بیوتیک

فاکتورهای خونی

فیل ماهی

هورمون

مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر پری بیوتیک تجاری اولترا ای مکس بر شاخصهای خون شناسی، بیوشیمیایی و سطوح هورمونهای استروئیدی سرم خون فیل ماهیان پروراری (*Huso huso*) در مرکز صید و فرآوری آشوراده انجام شد. آزمایش با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در قالب گروه شاهد (فاقد هرگونه افزودنی) و ۲ تیمار آزمایشی شامل سطح ۱g/kg از پری بیوتیک اولترا ای مکس در هر کیلوگرم جیره مکمل سازی شد. هر تیمار با ۳ تکرار و به تعداد ۱۰ عدد فیل ماهی در هر قفس و در یک دوره پرورش ۱۲۰ روزه با میانگین وزنی $4/55 \pm 0/37$ کیلوگرم انجام شد. نتایج حاصله سبب بهبود معنی دار سطوح هورمونهای استروئیدی سرم خون فیل ماهیان در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد شد. ($p < 0/05$). آنالیز پارامترهای خون شناسی و بیوشیمیایی سرم نیز تحت تأثیر پری بیوتیک اولترا ای مکس تغییرات مثبت معنی داری را در پارامترهایی نظیر هموگلوبین، تعداد گلبولهای قرمز، حجم متوسط گلبولی، میانگین هموگلوبین گلبولی، غلظت متوسط هموگلوبین گلبولی، هماتوکریت، اتوزونوفیل و ایمنوگلوبین، آمیلاز، کراتینین، اوریک اسید نشان داد ($p < 0/05$). در مجموع، نتایج این تحقیق نشان داد که افزودن ۱ گرم در کیلوگرم پری بیوتیک اولترا ای مکس می تواند به عنوان یک مکمل غذایی مفید برای بهبود پارامترهای خون شناسی و بیوشیمیایی و میزان سطوح هورمونهای استروئیدی سرم خون فیل ماهیان پروراری پرورشی استفاده گردد.

مقدمه

در طی دهه های اخیر بهره برداری از منابع زنده دریاها باعث شده تا فراوانی گونه های کلیدی اکوسیستم های آبی بیش از هر زمان دیگری کاهش یابد تا جایی که طبق گزارش ها، تا سال ۲۰۱۱ میلادی بیش از ۶۰ درصد ذخایر گونه های شیلاتی دنیا به طور کامل برداشت شده اند (Worm and Branch, 2013). ماهیان خاویاری از با ارزش ترین انواع آبزیان در جهان محسوب می شوند که بالغ بر ۲۵۰ میلیون سال قدمت داشته و تقریباً ۹۰ درصد ذخائر این ماهیان در حوضه دریای خزر زندگی می کنند. (Askarian et al., 2007). از بین تاس ماهیان موجود در خزر، گونه فیل ماهی به دلیل بومی بودن، رشد نسبتاً سریع،

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: hojat.jafaryan@gmail.com

امکان تولیدمثل در شرایط اسارت، تأمین آسان لارو و بچه ماهی با هزینه کمتر نسبت به سایر گونه‌های ماهیان خاویاری، ارجحیت دارد (Rosental, 2012).

تخریب زیستگاه‌های طبیعی به واسطه آلودگی‌های محیطی و فعالیت‌های انسانی، صید بی‌رویه و قاچاق توسط کشورهای حاشیه خزر و حضور شانه‌دار در دریای خزر و بالا بودن سن بلوغ در فیل ماهیان (اغلب پس از ۱۲ سال به سن بلوغ رسیده و وارد چرخه تولیدمثل می‌گردند) (Lombardo *et al.*, 2011). از جمله عواملی هستند که منجر به کاهش جمعیت و احتمال خطر انقراض نسل گونه‌های منحصر به فرد و با ارزش فیل ماهیان در دریای خزر گردیده است (Carmona *et al.*, 2009). با توجه به کاهش بسیار زیاد میزان صید فیل ماهیان، یکی از راه‌حل‌های موجود، توجه به پرورش این ماهیان جهت کاهش فشار به ذخایر طبیعی می‌باشد که طی آن تمامی امور مولدسازی، تکثیر، پرورش، تولید گوشت و خاویار در مزارع پرورش ماهی صورت می‌پذیرد (Ustaoglu and Okumu, 2004). در این بین، پرورش در محیط محصور پن، به دلیل نزدیک بودن شرایط محیطی در این سیستم با شرایط طبیعی زندگی فیل ماهیان می‌تواند پتانسیل خوبی نسبت به سایر روش‌های پرورش داشته باشد.

هورمون‌های جنسی از مهم‌ترین هورمون‌های استروئیدی محسوب می‌شوند که شامل تستوسترون، پروژسترون و استرادیول است. هورمون‌های استروئیدی به عنوان هورمون‌های درون‌ریز (اندوکراین) در توسعه گنادی هماهنگ با هورمون‌های گنادوتروپین هیپوفیز شناخته شده‌اند. یکی از این هورمون‌های استروئیدی که ساخت آن‌ها در سلول‌های غیرجنسی گنادها صورت می‌گیرد، هورمون تستوسترون است که باعث اعمال عملکردهای مکمل در طول توسعه بیضه در جنس نر و فعالیت‌های مرتبط با تولیدمثل در جنس ماده می‌گردد (Cabrita *et al.*, 2009). در این بین ۱۷ بتا استرادیول از جمله هورمون‌های استروئیدی است که نقش کلیدی آن در سنتز و تحریک ساخت پروتئین‌های زرده‌ای ویتلوژنین در هیپاتوسیت‌های کبد بسیار برجسته است (Thomas *et al.*, 2007). همچنین این هورمون در توسعه عصبی، رشد، رسیدگی جنسی، کنترل فرایندهای تولیدمثلی و تنظیم تکثیر سلولی در بافت‌های عادی و سرطانی نیز نقش ایفا می‌نماید (Martyniuk *et al.*, 2006).

استفاده از مکمل‌های غذایی که در بالا بردن سیستم ایمنی نقش دارند، از جمله راهکارهایی است که علاوه بر تأمین مواد مغذی لازم در جهت حمایت از رشد و تکامل موجودات آبی، می‌تواند در افزایش سلامت، مقاومت نسبت به استرس و عوامل بیماری‌زا مفید واقع شود (Gatlin, 2002). از جمله این مکمل‌ها می‌توان به انواع پروبیوتیک، پری‌بیوتیک و سین‌بیوتیک‌ها اشاره کرد. این مکمل‌های غذایی ضمن ایجاد محافظت غیراختصاصی در برابر عوامل بیماری‌زا به عنوان عوامل ارتقاء دهنده رشد نیز فعالیت می‌کنند (Das *et al.*, 2017). همچنین به دلیل اثر پری‌بیوتیک‌ها بر یون‌ها، آنزیم‌ها، اسیدهای چرب و غیره، که همگی عوامل مؤثر بر عملکرد تولیدمثلی هستند. بررسی شاخص‌های تولیدمثلی ماهیان جهت تولید بیشتر لارو و یا افزایش کیفیت و بازماندگی آن‌ها تا مرحله بازاری و در نتیجه افزایش بهره‌وری اقتصادی ارزشمند خواهد بود (Sattari, 2002).

تاکنون مطالعاتی روی اثر پری‌بیوتیک اولترا ای مکس در سطوح هورمون‌های استروئیدی در فیل ماهیان جوان انجام نشده است؛ اما در تحقیقات مشابه انجام شده در مورد اثرگذاری پری‌بیوتیک‌ها بر شاخص‌های تولیدمثلی می‌توان به پژوهش Nagahama و Yamashita (2008) اشاره کرد که بیان کردند به کارگیری پری‌بیوتیک و پروبیوتیک‌ها در آبزیان موجب افزایش سرعت فرآیند اسپرما توژن در ماهیان شده و میزان حجم و کیفیت اسپرم را در آن‌ها افزایش می‌دهند. همچنین Lombardo و همکاران (2011) اثرات پروبیوتیک لاکتوباسیلوس ره‌مانوسس (*Lactobacillus rhamnosus*) را بر تولیدمثل کیلی فیش (*Fundulus heteroclitus*) مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعه نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار هم‌آوری و مقادیر بالاتر شاخص گنادوسوماتیک نسبت به گروه شاهد بود.

با توجه به اهمیت ماهیان خاویاری و به خصوص گونه فیل ماهی، در این تحقیق تأثیر پری‌بیوتیک ای مکس اولترا، بر پارامترهای خونی و میزان هورمون‌های استروئیدی سرم خون فیل ماهیان پرورشی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر به مدت ۱۲۰ روز در مرکز صید و فرآوری تاس ماهیان آشوراده (چالاشت) واقع در حوضه جنوبی دریای خزر واقع در خلیج گرگان با استفاده از ۶۰ قطعه فیل ماهی جوان پرورشی با میانگین وزنی $4/55 \pm 0/37$ کیلوگرمی انجام شد. ماهیان در ابتدای کار با استفاده از روش اولترا سونوگرافی تعیین جنسیت و علامت‌گذاری شدند (Falahatkar et al., 2011). سپس فیل ماهیان جوان در ۶ قفس توری در ابعاد $2 \times 1 \times 1/20$ متر با حجم آب تقریبی $1/8$ مترمکعب با تراکم ۱۰ قطعه فیل ماهی (در هر قفس ۵ قطعه فیل ماهی نر و ۵ قطعه فیل ماهی ماده) در هر قفس قرار داده شدند. جهت تغذیه فیل ماهیان در طول دوره آزمایش از غذای کنستانتره کوپنز با قطر $1/5$ mm و ترکیبات تقریبی ۵۰ درصد پروتئین خام، ۲۰ درصد چربی خام، ۷/۵ درصد خاکستر، ۷ درصد فیبر خام، ۱۵/۵ درصد مواد غیر از ته و $22/33$ مگا ژول بر کیلوگرم انرژی خام استفاده شد. به منظور سازگاری با جیره‌های مورد استفاده، شروع عملیات غذادهی با جیره‌های مکمل‌سازی شده بعد از گذشت ۷ روز از تغذیه فیل ماهیان جوان با جیره پایه (فاقد هرگونه ماده افزودنی) انجام شد. غذادهی به صورت دستی انجام گرفت. مقدار غذای دریافتی روزانه توسط فیل ماهیان با توجه به درصد وزن بدن (توده زنده) محاسبه و معادل ۵ درصد وزن بدن تغذیه شدند.

برای تهیه سوسپانسیون‌های پری‌بیوتیکی ابتدا مقدار ۱ گرم از پری‌بیوتیک ای‌مکس اولترا پس از توزین با ترازوی دیجیتالی با دقت $0/01$ گرم از طریق کوبیدن در هاون چینی کاملاً به صورت پودر تبدیل شد. مقادیر تهیه‌شده از پری‌بیوتیک‌ها با ۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل در بشرهای شیشه‌ای جداگانه حل شد و توسط همزن برقی به مدت ۵ دقیقه به خوبی هم زده شدند و پس از انتقال به افشانه، روی یک کیلوگرم غذای اکسترو اسپری و درون دستگاه میکسر به خوبی باهم مخلوط شدند. جیره‌های تهیه‌شده پس از یکنواخت شدن، درون دستگاه خشک‌کن با دمای 40 درجه سانتی‌گراد (Ghosh et al., 2003) به مدت ۵ ساعت خشک (دارای ۱۰ درصد رطوبت) و در کیسه‌های پلاستیکی از جنس پلی‌اتیلن به رنگ مشکی بسته‌بندی و شماره‌گذاری شدند. پس از انتقال جیره‌های مکمل‌سازی شده درون ظروف درب دار تا زمان مصرف در فریزر با دمای -20 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

در پایان دوره آزمایش، ابتدا از هر تکرار تعداد ۶ نمونه (در مجموع ۳۶ نمونه) به صورت تصادفی انتخاب شد. سپس فیل ماهیان در محلول پودر گل میخک به میزان $0/7$ گرم در هر لیتر آب به مدت $7/5$ دقیقه بی‌هوش شدند و نمونه‌برداری از خون ماهیان انجام شد. سپس خون‌گیری با استفاده از سرنگ‌های 5 سی‌سی، از طریق سیاهرگ دمی و از پشت باله مخرجی انجام گرفت. در هر مرحله مقدار 3 سی‌سی خون از ماهیان دریافت و جهت مطالعات هماتولوژی و سرولوژی به آزمایشگاه خون‌شناسی بخش فیزیولوژی و بیوشیمی انستیتو منتقل گردید. هر نمونه خون به دو ویال مجزا (یکی جهت بررسی سلول‌های خونی و دیگری جهت بررسی فاکتورهای سرمی خون) منتقل گردید. قبل از خون‌گیری یک قطره هپارین برای جلوگیری از انعقاد خون به سرنگ‌ها اضافه شد. برای جلوگیری از فساد خون‌های گرفته شده تا رسیدن به آزمایشگاه نمونه‌ها در یخچال نگهداری شدند. پس از انتقال لوله‌های آزمایش درب‌دار حاوی 3 سی‌سی خون به آزمایشگاه، جداسازی سرم از سلول‌های خونی توسط سانتریفیوژ (مدل 200 Labofuge ساخت شرکت Heraeus sepatech ساخت آلمان) به مدت ۱۰ دقیقه در 3000 دور انجام گرفت. سپس با استفاده از پیپت پاستور، سرم به ظروف اپندورف‌های شماره‌گذاری شده و با مشخصات کامل منتقل و تا زمان سنجش پارامترهای هماتولوژی و بیوشیمیایی سرم خون در دمای 80 - درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Patriche et al., 2011).

روش کار آزمایشگاهی به این شرح است: تعداد کل گلبول‌های سفید (WBC) و گلبول‌های قرمز (RBC) به ترتیب با استفاده از لام هموسیتمتر و لام نئوبار با کمک میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $400 \times$ پس از رقیق‌سازی خون به وسیله بافر فسفات نمک با نسبت‌های مشخص شمارش شد (Barros et al., 2002). اندازه‌گیری هماتوکریت (Hct) با لوله‌های موئینه هماتوکریت و دستگاه سانتریفیوژ هماتوکریت انجام شد (Rehulka, 2003). همچنین اندازه‌گیری اندیس‌های گلبولی شامل: حجم متوسط گلبولی (MCV)، هموگلوبولین متوسط گلبولی (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبولین گلبول‌های قرمز (MCHC) با استفاده از فرمول‌های مربوطه و میزان گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت محاسبه شدند (Asadi et al., 2012). میزان

هموگلوبین نیز به روش استاندارد سیانومیت هموگلوبین و پس از مخلوط کردن ۰/۰۲ خون با مقدار ۵ CC از محلول درابکین (معرف سیانیت هموگلوبین) محاسبه شد (Feldman *et al.*, 2000). همچنین شمارش افتراقی لکوسیت‌ها شامل: نوتروفیل (هتروفیل) و مونوسیت نیز با تهیه گسترش خون و طبق روش توصیه شده توسط Borges و همکاران (۲۰۰۴) صورت پذیرفت. اندازه‌گیری سطوح هورمون‌های استروئیدی به روش الیزا و با دستگاه الیزا ریدر انجام شد. ارزیابی شاخص‌های بیوشیمیایی سرم شامل پروتئین کل، آلومین، گلوبولین، گلوکز، کورتیزول، کلسترول، تری گلیسیرید، اوریک اسید، کراتینین، آمیلاز و لیپاز طبق روش‌های معمول آزمایشگاهی با استفاده از کیت‌های تجاری شرکت پارس آزمون (کرج- ایران) و دستگاه Autoanalyse مدل Eurolyser ساخت شرکت هوشمند فناور تهران انجام شد (Whicher, 1996).

تجزیه و تحلیل آماری

این مطالعه در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. در این مطالعه برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک و برای همگنی واریانس‌ها از تست لون استفاده شد. در مواردی که داده‌ها نرمال نبودند، داده به $\log(x+1)$ منتقل شد. برای بررسی معنی‌داری بین تیمارها از تجزیه واریانس یک طرفه و برای مطالعه اثر متقابل بین تیمار و زمان از تجزیه واریانس دو طرفه استفاده شد.

نتایج

نتایج پارامترهای خون‌شناسی

نتایج به دست آمده از تأثیر پری‌بیوتیک تجاری اولترا ای مکس بر پارامترهای خون‌شناسی فیل ماهیان پروراری در قالب جدول ۱ گردآوری و دسته بندی شده است.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده نشان داد که در پارامترهایی نظیر هموگلوبین، تعداد گلبول‌های قرمز، حجم متوسط گلبولی، میانگین هموگلوبین گلبولی، غلظت متوسط هموگلوبین گلبولی و مابین تیمارهای کنترل و تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p < 0/05$). به طوری که بیشترین میزان هموگلوبین، تعداد گلبول‌های قرمز و غلظت متوسط

جدول ۱. تغییرات شاخص‌های خون‌شناسی فیل ماهیان جوان (انحراف معیار \pm میانگین)

تیمار	شاهد ماده	شاهد نر	اولترا ماده	اولترا نر
WBC (10^3 mm^{-3})	$0/76 \pm 0/10^a$	$0/71 \pm 0/05^a$	$0/91 \pm 0/17^a$	$0/83 \pm 0/15^a$
RBC (10^6 mm^{-3})	$885/0 \pm 2469/14^a$	$10375/0 \pm 2292/56^a$	$8675/0 \pm 4169/23^a$	$8825/0 \pm 3388/58^a$
Hb (g/dL)	$4/74 \pm 0/63^b$	$5/67 \pm 0/75^b$	$6/19 \pm 0/41^a$	$5/35 \pm 0/96^b$
HCT (%)	$28/75 \pm 2/21^b$	$29/75 \pm 2/87^b$	$39/75 \pm 5/37^a$	$25/50 \pm 5/06^b$
MCV (fl)	$381/52 \pm 34/20^b$	$414/15 \pm 15/37^{ab}$	$437/22 \pm 28/60^a$	$307/65 \pm 21/84^c$
MCH (pg)	$62/6 \pm 3/79^b$	$78/75 \pm 5/10^a$	$68/92 \pm 10/00^b$	$64/65 \pm 2/12^b$
MCHC (%)	$16/47 \pm 1/12^c$	$19/02 \pm 0/79^b$	$15/70 \pm 1/37^c$	$21/07 \pm 1/25^a$
Lym (10^6 mm^{-3})	$62/75 \pm 11/35^a$	$69/50 \pm 9/57^a$	$61/50 \pm 17/71^a$	$71/50 \pm 7/89^a$
Neu (10^6 mm^{-3})	$10/50 \pm 3/14^a$	$5/75 \pm 2/68^a$	$7/00 \pm 2/94^a$	$6/50 \pm 1/04^a$
Eos (10^6 mm^{-3})	$26/75 \pm 9/06^a$	$24/75 \pm 6/39^a$	$31/50 \pm 19/27^a$	$22/00 \pm 8/90^a$

*حروف نامشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($p < 0/05$).

هموگلوبین گلبولی در تیمار اولترا ای‌مکس ماده مشاهده شد اما در شاخص‌هایی نظیر حجم متوسط گلبولی و میانگین هموگلوبین گلبولی بیشترین میزان در تیمارهای شاهد رؤیت شد و تیمارهای پری‌بیوتیکی از تیمار شاهد کمتر بوده‌اند.

بر اساس نتایج به دست آمده از جدول فوق در پارامترهای هماتوکریت، تعداد گلبول‌های سفید، لنفوسیت، نوتروفیل، ائوزونوفیل اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای شاهد با تیمارهای پری‌بیوتیکی دیده نشد ($p > 0.05$). همچنین بیشینه میزان هماتوکریت، ائوزونوفیل و ایمنوگلوبین در تیمارهای پری‌بیوتیکی رؤیت شد؛ به نحوی که پری‌بیوتیک تجاری اولترا ای‌مکس در فیل‌ماهیان ماده موجب بهبود شاخص‌های هموگلوبین، هماتوکریت و حجم متوسط گلبولی نسبت به تیمار شاهد گردیدند اما در فیل‌ماهیان نر سبب تأثیر منفی در مقایسه با تیمار شاهد شدند.

نتایج پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون

بر اساس نتایج آنالیزهای آماری که در جدول ۱ آورده شده است، پری‌بیوتیک تجاری اولترا ای‌مکس موجب بهبود پارامترهایی نظیر آمیلاز، کراتینین، اوریک اسید نسبت به تیمارهای کنترل می‌شود ($p < 0.05$). همچنین بیشترین مقدار آمیلاز در تیمار اولترا نر و بیشینه مقادیر کراتینین و اوریک اسید در تیمار اولترا ماده مشاهده شد.

اما در شاخص‌هایی نظیر پروتئین کل، گلوکز، آلبومین، گلوبولین، تری‌گلیسیرید، کلسترول و لیپاز تیمارهای کنترل تأثیر بهتری نسبت به تیمارهای پری‌بیوتیکی داشتند ($p > 0.05$).

نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که پری‌بیوتیک تجاری اولترا ای‌مکس بر میزان ترشح هورمون تستوسترون در فیل‌ماهیان نر تأثیر مثبتی داشته و موجب افزایش چشمگیر ترشح این هورمون در این ماهی گردید.

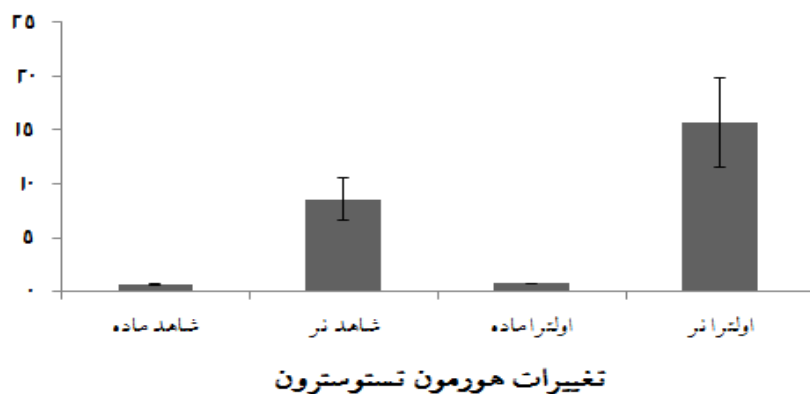
تجزیه و تحلیل نتایج، حاکی از افزایش قابل ملاحظه میزان ترشح هورمون پروژسترون در فیل‌ماهیان نر و ماده پروراری تیمار پری‌بیوتیکی اولترا ای‌مکس است. همچنین بیشترین میزان هورمون پروژسترون در تیمار اولترا ای‌مکس ماده (0.407 ± 0.03) و کمترین میزان این هورمون در تیمار شاهد نر (0.142 ± 0.00) رؤیت شد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که همانند هورمون‌های تستوسترون و پروژسترون پری‌بیوتیک اولترا ای‌مکس در میزان ترشح هورمون ۱۷ بتا استرادیول مؤثر است؛ به نحوی که بیشترین میزان ترشح این هورمون در فیل‌ماهیان ماده تیمار پری‌بیوتیکی (0.472 ± 0.061) و کمترین میزان آن در فیل‌ماهیان نر (0.089 ± 0.004) اولترا دیده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در هر سه سطح هورمون تستوسترون، پروژسترون و ۱۷ بتا استرادیول بین تیمار پری‌بیوتیکی با تیمار شاهد بود ($p < 0.05$).

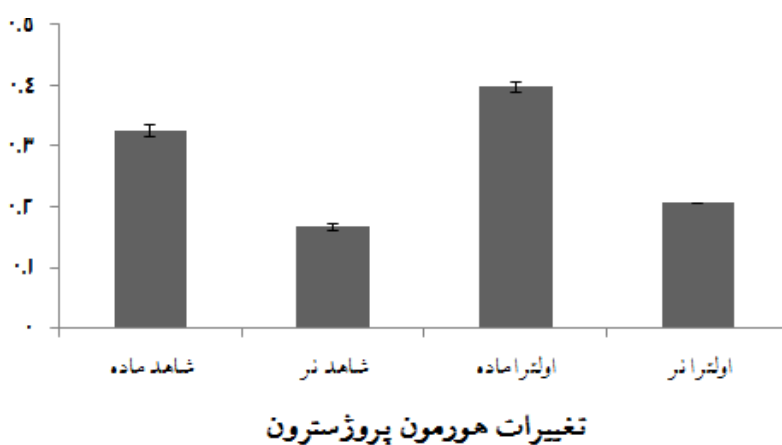
جدول ۲. تغییرات شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون فیل‌ماهیان جوان (انحراف معیار \pm میانگین)

تیمار	شاهد ماده	شاهد نر	اولترا ماده	اولترا نر
پروتئین کل (g/dl)	4.11 ± 0.65^a	4.15 ± 0.15^a	2.55 ± 0.35^b	2.87 ± 0.15^b
گلوکز (mg/dl)	35.85 ± 2.15^b	44.6 ± 5.8^a	39.25 ± 0.95^b	37.45 ± 6.35^b
آلبومین (g/dl)	0.72 ± 0.10^b	1.27 ± 0.05^a	0.86 ± 0.05^b	0.69 ± 0.05^b
گلوبولین (mg/dl)	3.42 ± 0.75^a	2.83 ± 0.20^a	1.76 ± 0.30^b	2.62 ± 0.20^a
تری‌گلیسیرید (mg/dl)	138.35 ± 10.05^b	209.60 ± 11.80^a	132.20 ± 22.50^b	71.05 ± 6.55^c
کلسترول (mg/dl)	58.55 ± 0.95^b	77.10 ± 5.80^a	66.75 ± 4.65^b	38.95 ± 7.65^c
اوریک اسید (mg/dl)	3.22 ± 0.75^a	4.33 ± 1.20^a	6.70 ± 0.25^a	4.58 ± 1.25^a
کراتینین (mg/dl)	1.14 ± 0.25^a	0.88 ± 0.25^a	1.22 ± 0.15^a	1.18 ± 0.05^a
آمیلاز (U/L)	12.60 ± 1.10^a	11.05 ± 0.05^b	11.20 ± 0.30^b	13.05 ± 0.45^a
لیپاز (U/L)	17.85 ± 5.05^a	9.35 ± 0.85^b	6.70 ± 2.50^b	10.25 ± 2.15^b

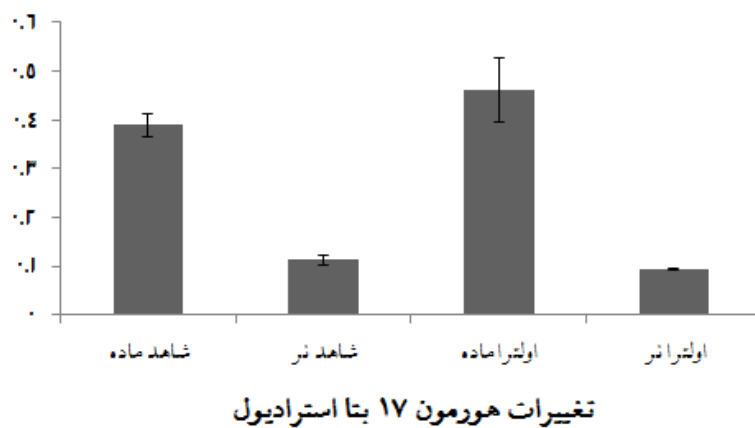
*حروف نامشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($p < 0.05$).



شکل ۱. نمودار تغییرات هورمون تستوسترون در فیل ماهیان جوان تغذیه شده با پری بیوتیک اولترا ای مکس



شکل ۲. نمودار تغییرات هورمون پروژسترون در فیل ماهیان جوان تغذیه شده با پری بیوتیک اولترا ای مکس



شکل ۳. نمودار تغییرات هورمون ۱۷ بتا استرادیول در فیل ماهیان جوان تغذیه شده با پری بیوتیک اولترا ای مکس

بحث

علیرغم انجام مطالعات فراوان در زمینه اثرات مکمل‌های غذایی میکروبی شامل پری بیوتیک‌ها، پروبیوتیک‌ها و سین بیوتیک‌ها بر کارایی رشد و ایمنی و مقاومت در برابر بیماری ماهیان، مطالعات محدودی در زمینه اثرات احتمالی و مکانیسم اثر

مکمل‌های غذایی میکروبی بر میزان شاخص‌های بیوشیمیایی و هورمونی سرم خونی ماهیان انجام شده است (Ghosh *et al.*, 2007).

تأثیر پری‌بیوتیک اولترا ای‌مکس بر شاخص‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی سرم خون در فیل‌ماهیان جوان

در سال‌های اخیر استفاده از محرک‌های سیستم ایمنی در جیره‌های غذایی ماهیان به‌منظور افزایش فعالیت مکانیسم‌های دفاع غیراختصاصی و ایجاد مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Alishahi *et al.*, 2010). پری-بیوتیک‌ها از جمله محرک‌هایی هستند که بر سیستم ایمنی ماهیان اثر گذاشته و موجب فعال شدن سلول‌های مؤثر در ایمنی می‌شوند. از جمله اثرات احتمالی آن‌ها می‌توان به افزایش فعالیت سلول‌های ماکروفاژی، افزایش سلول‌های فاگوسیتوز کننده (نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها)، افزایش تعداد لنفوسیت‌ها و ایمونوگلوبولین‌های سرم و افزایش فعالیت لیزوزیم اشاره کرد. استفاده از این مواد، ابزار مؤثری برای افزایش شاخص‌های رشد، ظرفیت سیستم ایمنی و مقاومت ماهی در برابر بیماری‌های شایع بوده و تحقیق درباره استفاده از مکمل‌ها روندی رو به رشدی دارد (Hosseinfar *et al.*, 2010).

آزمایش‌های هماتولوژی و آنالیز اجزای سرم خون به عنوان ابزاری مناسب برای تشخیص اختلالات متابولیکی، ارزیابی وضعیت سلامتی ماهیان در شرایط پرورشی متراکم، مقاومت غیراختصاصی گونه‌های مختلف ماهی و مولدین، ارزیابی وضعیت تغذیه و ارزیابی تأثیر مواد افزودنی به غذای ماهی استفاده می‌شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از پری‌بیوتیک اولترا ای-مکس در جیره غذایی فیل‌ماهیان ماده دارای تأثیرات مثبت معنی‌داری بر پارامترهای خون‌شناسی و بیوشیمیایی سرم خون داشته است. بر اساس این نتایج مشخص شد که تعداد گلبول‌های قرمز، غلظت هموگلوبین و MCH و MCV و MCHC در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشته است.

Akrami و همکاران (۲۰۱۸) با بررسی اثرات پری‌بیوتیک ای‌مکس در جیره غذایی فیل‌ماهیان پرورشی با میانگین وزنی ۲۸/۷۹ گرم بیان داشتند که بیشترین تعداد گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید، درصد هماتوکریت، لنفوسیت و نوتروفیل در تیمار تحت تأثیر بالاترین غلظت پری‌بیوتیک (۱/۵ g/kg) به دست آمد که در مقایسه با گروه شاهد از اختلاف معنی‌داری برخوردار بود.

Andrews و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که افزودن مانان الیگوساکارید به جیره غذایی ماهی روهو (*Labeo rohita*) در تعداد کل گلبول‌های قرمز و سفید و میزان هموگلوبین افزایش معناداری داشته است. همچنین، نتایج به دست آمده نشان داد که استفاده از پری‌بیوتیک مانان الیگوساکارید در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز موجب افزایش ایمنی شده است (Staykov *et al.*, 2007). در مطالعاتی که پیش‌تر به انجام رسیده مشخص شده است که فاکتورهای هماتولوژی مانند تعداد کل گلبول قرمز، هماتوکریت و به خصوص تعداد کل گلبول‌های سفید در ارتباط با ایمنی غیراختصاصی اند (Tukmechi *et al.*, 2011). در واقع تعداد کل گلبول‌های سفید و نوع آن‌ها از طریق تأثیر در عمل فاگوسیتوز و کمک به تولید آنتی‌بادی‌ها می‌تواند نقش عمده‌ای در بهبود سطح دفاع غیراختصاصی داشته باشد (Sakai, 1999).

در تضاد با نتایج حاضر تأثیرات استفاده از مانان الیگوساکارید در جیره غذایی گربه‌ماهی کانال (*Ictalurus punctatus*) بر عملکرد رشد و فاکتورهای خونی این ماهی تأثیری نداشت (Welker *et al.*, 2007). تأثیرات ۶ سطح از پری‌بیوتیک مانان الیگوساکارید در جیره غذایی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) نیز بیانگر این بود که پری‌بیوتیک مذکور اثر معنی‌داری بر فاکتورهای خونی ندارد. ضمن آن‌که با افزایش سطح پری‌بیوتیک اثرات منفی در فاکتورهای رشد تیلاپیا نیز مشاهده شد (Yujisado and De Almeida, 2008). Gultepe و همکاران (۲۰۱۲) و Sado و همکاران (۲۰۰۸) به ترتیب نشان دادند که جیره‌های غذایی مکمل‌سازی شده با پری‌بیوتیک مانان الیگوساکارید هیچ‌گونه تأثیر معنی‌داری بر پارامترهای خون‌شناسی ماهی سیم دریایی (*Sparus auratus*) و تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) نداشت. همچنین Hoseinfar و همکاران (۲۰۱۱a) و Razeghi Mansour و همکاران (۲۰۱۲) نیز به ترتیب گزارش دادند که استفاده از پری‌بیوتیک‌های فروکتوالیگوساکارید و مانان الیگوساکارید در جیره غذایی فیل‌ماهیان جوان هیچ‌گونه تأثیر معنی‌داری بر پارامترهای

خون‌شناسی در این گونه نداشت.

بررسی فاکتورهای بیوشیمی سرم در این آزمایش نشان که پری‌بیوتیک اولترا ای مکس دارای تأثیرات متفاوتی بر سطح این شاخص‌ها بوده است. Ahmdifar و همکاران (۲۰۱۱) نیز گزارش کردند که سطح گلوکز خون در فیل‌ماهیان تغذیه‌شده با پری‌بیوتیک اینولین افزایش یافته است. این محققین دلیل این نتیجه‌گیری را تغییر در متابولیسم کربوهیدرات‌ها و انجام واکنش گلوکونوزنزیس دانستند. Andrews و همکاران (۲۰۰۹) نیز شاهد افزایش معنی‌دار پروتئین سرم در ماهی روهو (*L. rohita*) تغذیه‌شده با سطوح مختلف پری‌بیوتیک مانان الیگوساکارید در مقایسه با گروه شاهد بودند. در حالی که در مطالعه Akrami و همکاران (۲۰۱۸) استفاده از پری‌بیوتیک ای مکس در جیره غذایی فیل‌ماهیان جوان منجر به کاهش معنی‌دار گلوکز و پروتئین کل در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد گردید. در مطالعه Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۱b) نیز مشخص شد که استفاده از پری‌بیوتیک الیگو فروکتوز دارای پتانسیلی است که سطح کلسترول خون فیل‌ماهیان را کاهش می‌دهد. در تضاد با این نتایج Welker و همکاران (۲۰۰۷) و Sado و همکاران (۲۰۰۸) به ترتیب نشان دادند. که سطح پروتئین پلاسما در گربه‌ماهی کانال و ماهی تیلایپا هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد نداشت. افزایش سطح پروتئین‌های سرم به عنوان شاخص مناسبی برای بررسی وضعیت دفاع ایمنی در ماهیان مطرح است (Yousefian *et al.*, 2012). در مطالعه صورت گرفته روی فیل‌ماهیان جوان مشخص شد که سطح ۱ درصد از پری‌بیوتیک اینولین سبب افزایش سطح پروتئین کل سرم می‌گردد (Akrami *et al.*, 2018). در حالی که در مطالعه Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۱b) سطوح گلوکز و پروتئین کل در فیل‌ماهیان تغذیه‌شده با پری‌بیوتیک فروکتوالیگوساکارید در مقایسه با گروه شاهد تغییر معنی‌داری نشان نداد. تصور می‌شود که افزایش میزان آلومین، گلوبولین و پروتئین سرم بیشتر در ارتباط با تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی میزبان باشد (Wiegertjes *et al.*, 1996).

بر اساس یافته‌های محققان مشاهده شده که فاکتورهایی مانند عوامل محیطی، فصول سال، شوری، دوره نوری، درجه حرارت و تراکم، عوامل فیزیولوژیکی گونه آبی، سیکل تولیدمثلی و وضعیت بلوغ، سن، جنس و شرایط تغذیه‌ای، زمان نمونه‌گیری، چگونگی تهیه نمونه، دقت و حساسیت روش‌های اندازه‌گیری می‌توانند بر فعالیت فراسنجه‌های خونی و شاخص‌های بیوشیمیایی خون تأثیر بگذارند و باعث اختلاف در تفسیر نتایج شوند (Mehdinejad *et al.*, 2013). همچنین ترکیب جیره‌های غذایی، نوع پری‌بیوتیک مصرفی، درجه خلوص پری‌بیوتیک و میزان مورد استفاده آن در جیره، روش‌های مختلف اضافه کردن پری‌بیوتیک به جیره و احتمالاً فلور میکروبی ویژه‌ای که قادر به استفاده از پری‌بیوتیک به عنوان سوسترا هستند نیز به طور قابل ملاحظه‌ای بر خصوصیات ریخت‌شناسی و شاخص‌های بیوشیمیایی آن اثر می‌گذارند. با توجه به نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر پری‌بیوتیک اولترا ای مکس بر برخی فاکتورهای فراسنجه‌های خونی و شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون اثرات مثبتی داشته است که با نتایج بسیاری از محققین مطابقت دارد.

تأثیر پری‌بیوتیک اولترا ای مکس بر شاخص‌های هورمونی سرم خون در فیل‌ماهیان جوان

مطالعات نشان می‌دهد که از جمله مهم‌ترین محصولات نهایی متابولیسم پری‌بیوتیک‌ها توسط باکترهای مفید روده‌ای، اسیدهای چرب می‌باشند که از مؤلفه‌های اساسی در زرده سازی بلوغ اووسیت‌ها می‌باشند (Almansa *et al.*, 2001). به علاوه متابولیسم پری‌بیوتیک‌ها توسط باکترهای مفید روده‌ای علاوه بر تولید اسیدهای چرب، در افزایش جذب مواد معدنی و سنتز ویتامین‌ها به ویژه ویتامین‌های گروه B که در تولیدمثل مؤثر است، در کاهش یا نابودی باکتری‌های مضر روده‌ای از طریق رقابت غذایی یا رقابت در مکان چسبیدن در روده توسط باکتری‌های مفید نقش بسیار مهمی دارند شود (Cejas *et al.*, 2003). نتایج این آزمایش وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمار پری‌بیوتیکی با گروه شاهد را در سطح هورمون‌های استروئیدی در فیل‌ماهیان نر و ماده جوان نشان داد به نحوی که پری‌بیوتیک تجاری اختلاف معنی‌داری در سطح هورمون‌های تستوسترون و پروژسترون و ۱۷ بتا استرادیول ایجاد کردند مشاهده شد ($P < 0.05$).

تحقیقات Yamashita و Nagahama (۲۰۰۸) نشان داد که به‌کارگیری پری‌بیوتیک و پروبیوتیک‌ها در آبزیان موجب افزایش سرعت فرآیند اسپرماتوزن در ماهیان شده و میزان حجم و کیفیت اسپرم را در آن‌ها افزایش می‌دهد. به هر حال در انجام فرایند زرده سازی (ویتیلوژنز) کبد ویتیلوژنین را تولید می‌نماید که این تحت تحریک ۱۷ بتا استرادیول صورت می‌گیرد که از سلول‌های فولیکول آزاد می‌شود. احتمالاً تغییرات صورت گرفته در میزان ترشح این هورمون استروئیدی موجب افزایش در زرده سازی می‌گردد.

Ghosh و همکاران (۲۰۰۷) به این نتیجه رسیدند که پروبیوتیک باسیلوس ساب‌تیلیس (*Bacillus subtilis*) که از روده کپور مریگالا (*Ciphrinus mrigala* Hamilton) مشتق شده سبب بهبود عملکرد مولدین چهار گونه گویی (*Guppy*)، مولی مکزیک (*Mexican molly*)، دم شمشیری سبز (*Green swordtail*)، دم شمشیری جنوبی (*Southern platyfish*) شده است و همچنین نتایج تحقیقات نشان داد که پروبیوتیک مذکور به طور معنی‌داری سبب افزایش شاخص گنادوسوماتیک، هم‌آوری، تولید لارو، طول و وزن لاروها در تیمارهای آزمایشی شد.

روند اثرگذاری مکمل‌های غذایی بر سطح هورمون‌های استروئیدی در فیل‌ماهیان نر به این شرح است که پری‌بیوتیک‌ها با تاثیرگذاری بر جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیکی موجب بهبود و افزایش جمعیت این باکتری‌ها در دستگاه گوارش ماهی می‌شوند. باکتری‌های اسید لاکتیکی با ترشح برخی از ترکیبات خارج سلولی خود تاثیرات سودمندی را بر میزبان می‌گذارند؛ از جمله باعث افزایش قابل توجهی در بیان ژن‌های *Leptin*، *dmrt1* و *bdnf* می‌گردند (Valcarse et al., 2015). از سویی دیگر این باکتری‌ها با تحریک محور گناد-هیپوفیز-هیپوتالاموس موجب ترشح هورمون‌های رهاکننده گنادوتروپین از هیپوتالاموس شده و در نتیجه ضمن تسریع در فرایند رسیدگی جنسی گنادهای جنسی نر، موجب ترشح هورمون تستوسترون از آن‌ها می‌شوند (Bone and Moor, 2008). به طور کلی گنادوتروپین‌ها لایه سلولی تکا را برای تولید هورمون تستوسترون تحریک و در ادامه لایه گرانولوزا دیگر هورمون‌های استروئیدی از قبیل ۱۷ بتا استرادیول را تولید می‌کند. این هورمون استروئیدی توسط رگ‌های خونی وارد کبد شده و کبد را برای ویتیلوژنز (فرایند زرده سازی) تحریک می‌کند (Bone and Moor, 2008). هم‌چنین این باکتری‌ها با افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های مرتبط با فرآیند اسپرماتوزن، سبب افزایش قابل توجه حجم اسپرم شده و موجب بهبود شاخص‌هایی نظیر تحرک و کیفیت اسپرم‌ها می‌شود (Valcarse et al., 2015).

شایان ذکر است که پری‌بیوتیک‌ها با تخمیر خود بر اندام‌های مختلف بدن تأثیر می‌گذارند از جمله با تأثیر بر غده هیپوفیز سبب تحریک ترشح LH و FSH می‌شوند که این هورمون‌ها با اثرگذاری بر گنادهای جنسی و تحریک بیان ژن‌هایی نظیر (*bdnf*, *dmrt*, *ara*, *arβ*, *fshr*, *leptin*) در بیضه و (*ihcgr*, *cbc1i*, *paqr8*) در تخمدان موجب ترشح و افزایش سطح هورمون‌های استروئیدی می‌شوند (Gioacchini et al., 2014; Qin et al., 2014; Valcarse et al., 2015; Vilchez et al., 2015).

نتایج این مطالعه بیانگر تأثیر معنی‌دار پری‌بیوتیک بر سطح هورمون‌های استروئیدی و فراسنجه‌های خونی و بیوشیمیایی سرم فیل‌ماهیان بود. با توجه به این که پری‌بیوتیک مورد مطالعه باعث بهبود عملکرد جنسی و ایمنی ماهیان می‌شود می‌توان از این پری‌بیوتیک در جیره غذایی این ماهیان استفاده کرد. قابل ذکر است که فیل‌ماهی در لیست IUCN در معرض خطر انقراض قرار دارد؛ هر مطالعه‌ای که بتواند به بهبود شرایط زندگی این گونه کمک کند می‌تواند به ایجاد شرایطی برای دور کردن این گونه از روند انقراض کمک قابل توجهی کند. این مطالعه پیشنهاد می‌دهد که در مراکز تکثیر مصنوعی که جهت برنامه‌های بازسازی ذخایر این گونه ایجاد شده است می‌توان با استفاده از این پری‌بیوتیک، شرایط بهتر جنسی را برای ماهیان مولد ایجاد کرد.

منابع

- Ahmdifar, E., Akrami, R., Ghelichi, A., Zarejabad, A.M. 2011. Effects of different dietary prebiotic inulin levels on blood serum enzymes, hematologic, and biochemical parameters of great sturgeon (*Huso huso*) juveniles. *Comparative Clinical Pathology*. 20: 447-451.
- Akrami, R., Chitsaz, H., Lakzaei, F. 2018. Effect of dietary A-Max supplementation as a prebiotic on growth performance and hemato-immunological parameters of great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juveniles. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 17(2): 251-266.
- Alishahi, M., Ranjbar, M.M., Ghorbanpour, M., Peyghan, R., Mesbah, M., Razi Jalali, M. 2010. Effects of dietary *Aloe vera* on specific and non-specific immunity of Common carp (*Cyprinus carpio*). *International Journal of Veterinary Research*. 4: 189-195.
- Almansa, E., Martin, M.V., Cejas, J.R., Badia, P., Jerez, S., Lorenzo, A. 2001. Lipid and fatty acid compositions of female *Gilthead seabream* during their reproductive cycle: effects of a diet lacking n-3 HUFA. *Journal of Fish Biology*. 59: 267-286.
- Andrews, S.R., Sahu, N.P., Pal, A.K., Kumar, S. 2009. Haematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. *Aquaculture Research*. 41: 61-69.
- Asadi, M., Mirvaghefi, A., Nematollahi, M., Banaee, M., Ahmadi, K. 2012. Effects of Watercress (*Nasturtium nasturtium*) extract on selected immunological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Open Veterinary Journal*. 2: 32-39.
- Askarian, F., Kousha, A., Shenavar, A., Ringe, E., Bahmani, M., Khorshidi, K., Matinfar, A. 2007. Isolation of lactic acid bacteria as probiotic from gastrointestinal tracts of Beluga (*Huso huso*) and Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). *Proceeding of International Training Course on fish Nutrition and disease*, 5 September, Ghaemshahr, Iran. 27 p.
- Barros, M.M., Lim, C., Klesius, P.H. 2002. Effect of iron supplementation to Cottonseed meal diets on growth performance of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Applied Aquaculture*. 10: 65-86.
- Bone, Q., Moore, R.H. 2008. *Biology of fishes*. 3rd edition. Taylor and Francis. pp. 278-280.
- Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F., Wassermann, G.F. 2004. Hematologic and serum biochemical values for jundia' (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemical*. 30: 21-25.
- Cabrita, E., Robles, V., Herraes, P. 2009. *Methods in reproductive aquaculture marine and freshwater species*. CRC Press. Taylor & Francis Group. pp. 9-63.
- Carmona, R., Domezain, A., Garcia-Gallego, M., Antonio Hernando, J., Rodriguez, F., Ruiz-Rejon M. 2009. *Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons*. Fish and Fisheries Series Vol 29. Springer Publication, New.
- Cejas, J.R., Almansa, E., Villamandes, J.E., Badia, P., Balanos, A., Lorenzo, A. 2003. Lipid and fatty acid composition of ovaries from wild fish and ovaries and eggs from captive fish of white seabream (*Diplodus sargus*). *Aquaculture*. 216: 299-313.
- Das, S., Mondal, K., Haque, S. 2017. A review on application of probiotic, prebiotic and symbiotic for sustainable development of aquaculture. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 5(2): 422-429.
- Falahatkar, B., Tolouei, Gilani, M.H., Falahatkar, S., Abbasalizadeh, A. 2011. Laparoscopy, a minimally-invasive technique for sex identification in cultured great sturgeon *Huso huso*. *Aquaculture*. 321: 273-279.
- Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jian, N.C. 2000. *Schalm's veterinary hematology*. Lippincott Williams and Wilkins publication, Canada. pp. 1120-1125.
- Gatlin, D.M. 2002. Nutrition and fish health. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (eds.). *Fish Nutrition*. 3rd edition. London: Academic Press. pp. 671-702.
- Ghosh, K., Sen, S.K., Ray, A.K. 2003. Supplementation of an isolated fish gut bacterium, *Bacillus circulans*, in Formulated diets for Rohu, *Labeo rohita*, Fingerlings. *Aquaculture-Bamidigh*. 55(1): 13-21.
- Ghosh, S., Sinha, A., Sahu, C. 2007. Effect of probiotic on reproductive performance in female livebearing ornamental fish. *Aquaculture Research*. 38: 518-526.

- Gioacchini, G., Giorgini, E., Vaccari, L., Carnevali, O. 2014. Can Probiotics Affect Reproductive Processes of Aquatic Animals? In: Merrifield, D., Ringø, E. (eds.). *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, UK.
- Gultepe, N., Hisar, O., Salnur, S., Hossu, B., Tansel Tanrikul, T., Aydm, S. 2012. Preliminary assessment of dietary mannanoligosaccharides on growth performance and health status of gilthead seabream *Sparus auratus*. *Journal of Aquatic Animal Health*. 24: 37-42.
- Hosseinfar, S.H., Zare, P., Merrifield, D.L. 2010. The effects of inulin on growth factors and survival of the Indian white shrimp larvae and postlarvae (*Fenneropenaeus indicus*). *Aquaculture Research*. 41(9): 348-352.
- Hoseinfar, S.H., Mirvaghefi, A., Mojazi Amiri, B., Rostami, H.K., Merrifield, D.L. 2011a. The effects of oligofructose on growth performance, survival and autochthonous intestinal microbiota of beluga (*Huso huso*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*. 17: 498-504.
- Hoseinfar, S.H., Mirvaghefi, A., Merrifield, D.L., Amiri, B.M., Yelghi, S., Bastami, K.D. 2011b. The study of some haematological and serum biochemical parameters of juvenile beluga (*Huso huso*) fed oligofructose. *Fish Physiology and Biochemistry*. 37: 91-96.
- Lombardo, F., Gioacchini, G., Carnevali, O. 2011. Probiotic based nutritional effects on killifish reproduction. *Fish Aquacult J FAJ*-33.
- Martyniuk, C.J., Gallant, N.S., Marlatt, S.C., Woodhouse, A.J., Trudeau, V.L. 2006. Current perspectives on 17 β -estradiol action and nuclear estrogen receptors in teleost fish in *Fish endocrinology*. In: *Fish Endocrinology*. Reinecke, M., Zaccone, G., Kapoor, B.G. (eds.). Enfield. Vol. 2. Science Publishers, New Hampshire. pp: 625-663.
- Mehdinejad, N., Taghizadeh, V., Imanpour, M.R. 2013. Correlation between serum steroid hormones and some biological parameters of gonad of common carp (*Cyprinus carpio*) in Caspian Sea, Iran. *Global Veterinaria*. 10(1): 55-59.
- Nagahama, Y., Yamashita, M. 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Develop. Growth Differ*. 50: S195-S219.
- Patriche, T., Patriche, N., Bocioc, E., Coada, T. 2011. Normal serum biochemical parameters of juvenile stages the beluga sturgeon (*Huso Huso*). University Dunărea de Jos" of GalaŃi, Faculty of Medicine and Pharmacy. tanti_patriche@yahoo.com.
- Qin, C., Xu, L., Yang, Y., He, S., Dai, Y., Zhao, H., Zhou, Z. 2014. Comparison of fecundity and offspring immunity in zebrafish fed *Lactobacillus rhamnosus* CICC 6141 and *Lactobacillus casei* BL23. *Reprod*. 147: 53-64.
- Razeghi Mansour, M., Akrami, R., Ghobadi, S.H., Amani Denji, K., Ezatrahimi, N., Gharaei, A. 2012. Effect of dietary mannan oligosaccharide (MOS) on growth performance, survival, body composition, and some hematological parameters in giant sturgeon juvenile (*Huso huso* Linnaeus, 1754). *Fish Physiology and Biochemistry*. 38: 829-835.
- Rehulka, J. 2003. Haematological analyses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* affected by viral *haemorrhagic septicaemia* (VHS). *Diseases of Aquatic Organisms*. 56: 185-193.
- Rosental, A. 2012. Status and Prospects of Sturgeon Farming in Europe. Institute fur Meereskunde Kiel Dusternbrooker Weg 20-2300 keil. Federal Republic of Germany. pp. 144-157.
- Sado, R.J., Bicudo, A.J.D.A., Cyrno, J.P.E. 2008. Feeding dietary mannan oligosaccharid to juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), has no effect on hematological parameters and showed decreased feed consumption. *Journal of World Aquaculture Society*. 39: 821-826.
- Sattari, M. 2002. Ichthyology (1), Anatomy and Physiology. Guilan University Pressin association with role of seal. 659 p. (in Persian).
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*. 172: 63-92.
- Staykov, Y., Spring, P., Denev, S., Sweetman, J. 2007. Effect of mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International*. 15: 153-161.
- Thomas, P., Tubbs, C., Berg, H., Dressin, G. 2007. Sex steroid hormone receptors in fish ovaries. In: Babin, P.J., Cerda, J., Lubzens, E. (eds.). *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*. Springer, Netherlands. pp. 203-233.

- Environmental Protection Agency (USEPA). 2002. Draft Detailed Review Paper on a Fish Two-Generation Toxicity Test. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC (EPA/68/W-01/023).
- Tukmechi, A., Rahmati Andani, H.R., Manaffar, R., Sheikhzadeh, N. 2011. Dietary administration of beta-mercapto-ethanol treated *Saccharomyces cerevisiae* enhanced the growth, innate immune response and disease resistance of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish and Shellfish Immunology*. 30: 923-928.
- Ustaoglu, S., Okumu, E. 2004. The sturgeons: fragile species need conservation. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 4: 49-57.
- Valcarce, D.G., Pardo, M.A., Riesco, M.F., Cruz, Z., Robles, V. 2015. Effect of diet supplementation with a commercial probiotic containing *Pediococcus acidilactici* (Lindner, 1887) on the expression of five quality markers in zebrafish (*Danio rerio*) (Hamilton, 1822) testis. *Journal of Applied Ichthyology*. 31: 18-21.
- Vílchez, M.C., Santangeli, S., Maradonna, F., Gioacchini, G., Verdenelli, C., Gallego, V., Peñaranda, D.S., Tveiten, H., Pérez, L., Carnevali, O., Asturiano, J.F. 2015. Effect of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* on the expression of genes involved in European eel soermatogenesis. *Theriogenology*. 84: 1321- 1331.
- Welker, T.L., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., Shelby, R., Klesius, P.H. 2007. Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri*, fed diets containing commercial whole cell yeast or yeast subcomponents. *Journal of World Aquaculture Society*. 38 (1): 24-35.
- Whicher, J. 1996. Complement Component C3. In: Richie, R.F., Novolotskaia, O. (eds.). *Serum Proteins in Clinical Medicine*. Scarborough: Foundation for Blood Research, Scarborough. S10.01-1-10.01-7.
- Wiegertjes, G.F., Stet, R.J.M., Parmentier, H.K., Van Muiswinkel, W.B. 1996. Immunogenetics of disease resistance in fish; a comparable approach. *Development Comparative Immunology*. 20: 365-371.
- Worm, B., Branch, T.A. 2013. The future of fish. *Trends in Ecology and Evolution*. 27(11): 594-599.
- Yousefian, M., Hedayatifard, M., Fahimi, Sh., Shikholeslami, M., Irani, M., Amirinia, C., Mousavi, S.E. 2012. Effect of prebioticsupplementation on growth performance and serumbiochemical parameters of Kutum (*Rutilus frisiikutum*) fries. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 7: 684-692.
- Yujisado, R., De Almeida, A.J. 2008. Feeding dietary mannan oligosaccharides to juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, has no effect on hematological parameters and showed decreased feed consumption. *Journal of the World Aquaculture Society*. 39(6): 821-827.