Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics

Print ISSN: 2345-427X
Online ISSN: 2345-4288

Investigation of some innate immune indicators, liver metabolic enzymes, growth and survival in zebrafish (*Danio rerio*) fed with different levels of autolysed yeast based on *Saccharomyces cerevisiae*

Fereshteh Khalili[1], Ali Shabani[*2], Hamed Paknejad[3], Mohammad Mazandarani[4]

1. Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: fereshtekhalili25@yahoo.com
2. Corresponding Author, Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: shabani@gau.ac.ir
3. Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: hkolangi@gmail.com
4. Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: mazandarani57@gmail.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 10.09.2022
Revised: 10.19.2022
Accepted: 11.11.2022

Keywords:
Autolysed yeast,
Growth,
Innate immunity,
Liver metabolic enzymes,
Zebrafish

ABSTRACT

Yeasts are the most important and widely used microorganisms used in the food industry, including the production of yeast powder and extract. Therefore, the present research was conducted with the aim of determining the effects of diet containing autolysed *Saccharomyces cerevisia*e yeast on innate immune function, liver metabolic enzymes, growth and survival of zebrafish. For this purpose, 480 pieces of zebra fish (10.78±0.08 g) were randomly placed in aquariums with a water volume of 40 liters for 60 days with different levels of autolyzed yeast in the basic diet including 1, 2 and 5% of the diet along with a control group (three replications) to 5% of body weight were fed. At the end of the feeding, to check survival and growth performance (final weight, percentage of body weight gain, food conversion ratio, specific growth rate, obesity ratio), biometry was done on all fish. In order to measure some of the serum's inherent immunity indicators, such as total immunoglobulin, total protein, albumin, and to check liver metabolic enzymes (alkaline phosphatase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase), fish were randomly sampled in order to prepare serum. 5 pieces of each aquarium). Data were analyzed using SPSS software through one-way analysis of variance. The results showed that feeding zebrafish with different levels of yeast isolates had no significant effect on the growth performance, survival percentage and liver enzymes of the treatment groups compared to the control group ($P<0.05$). However, the highest amount of total protein, total immunoglobulin and serum albumin was significantly in the treatment of feeding with autolysed yeast at the rate of 5% of the diet ($P<0.05$). In general, the results showed that the use of synthesized yeast, despite its effect on growth, liver enzymes and survival, could improve the innate immunity indicators in zebrafish. And the best suggested level in this research is 5% of autolysed yeast diet.

Cite this article: Khalili, Fereshteh, Shabani, Ali, Paknejad, Hamed, Mazandarani, Mohammad. 2024. Investigation of some innate immune indicators, liver metabolic enzymes, growth and survival in zebrafish (*Danio rerio*) fed with different levels of autolysed yeast based on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 13 (2), 103-119.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2024.20655.1713
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا چاپی: ۲۳۴۵-۴۲۷X
شاپا آنلاین: ۲۳۴۵-۴۲۸۸

بررسی برخی از شاخص‌های ایمنی ذاتی، آنزیم‌های متابولیکی کبدی، رشد و بازماندگی در ماهی زبرای (*Danio rerio*) تغذیه‌شده با سطوح متفاوت مخمر اتولیزشده بر پایه ساکارومایسس سرویسیه (*Saccharomyces cerevisiae*)

فرشته خلیلی[۱]، علی شعبانی*[۲]، حامد پاک‌نژاد[۳]، محمد مازندرانی[٤]

۱. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: fereshtekhalili25@yahoo.com

۲. نویسنده مسئول، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: shabani@gau.ac.ir

۳. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: hkolangi@gmail.com

٤. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: mazandarani57@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۱/۰۷/۱۷
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۱/۰۷/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۰۸/۲۰

واژه‌های کلیدی:
آنزیم‌های متابولیکی کبد،
ایمنی ذاتی،
رشد،
ماهی زبرا،
مخمر اتولیزشده

چکیده

مخمرها مهم‌ترین و پرکاربردترین میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در صنایع غذایی از جمله تولید پودر و عصاره مخمر به‌شمار می‌روند. از این‌رو، پژوهش حاضر با هدف تعیین اثرات جیره حاوی مخمر اتولیزشده ساکارومایسس سرویسیه بر عملکرد ایمنی ذاتی، آنزیم‌های متابولیکی کبد، رشد و بازماندگی ماهی زبرا انجام شد. بدین‌منظور، تعداد ٤۸۰ قطعه ماهی زبرا (۰/۰۸ ± ۱/۷۸ گرم) به‌صورت تصادفی در آکواریوم‌هایی با حجم آب ٤۰ لیتر به‌مدت ٦۰ روز با سطوح مختلف مخمر اتولیزشده در جیره غذایی پایه شامل ۱، ۲ و ۵ درصد جیره به همراه یک گروه شاهد (سه تکرار) به میزان ۵ درصد وزن بدن مورد تغذیه قرار گرفتند. در پایان دوره، برای بررسی بازماندگی و عملکرد رشد (وزن نهایی، درصد افزایش وزن بدن، ضریب تبدیل غذایی، نرخ رشد ویژه، ضریب چاقی) زیست‌سنجی از تمام ماهیان صورت گرفت. برای سنجش برخی از شاخص‌های ایمنی ذاتی سرم مانند ایمونوگلوبولین کل، پروتئین کل، آلبومین و بررسی آنزیم‌های متابولیکی کبد (آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینوترنسفراز، آسپارتات آمینوترنسفراز) از ماهیان به‌منظور تهیه سرم به‌طور تصادفی نمونه‌برداری صوررت گرفت (۵ قطعه از هر تکرار). داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS از طریق آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. یافته‌های حاصل نشان داد که تغذیه ماهیان زبرا با سطوح متفاوت مخمر اتولیزشده تأثیر معناداری در عملکرد رشد، درصد بازماندگی و آنزیم‌های کبدی

گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه شاهد نداشت (P>۰/۰۵). با این‌حال، بیش‌ترین میزان پروتئین کل، ایمونوگلوبولین کل و آلبومین سرم به‌طور معناداری در تیمار تغذیه‌شده با مخمر اتولیزشده به میزان ۵ درصد جیره بود (P<۰/۰۵). به‌طورکلی، نتایج نشان داد که استفاده از مخمراتولیزشده علی‌رغم عدم اثر روی رشد، آنزیم‌های کبدی و بازماندگی، توانست سبب بهبود شاخص‌های ایمنی ذاتی ماهی زبرا شود و بهترین سطح پیشنهادی در پژوهش حاضر، میزان ۵ درصد جیره مخمر اتولیزشده معرفی گردید.

استناد: خلیلی، فرشته، شعبانی، علی، پاک‌نژاد، حامد، مازندرانی، محمد (۱۴۰۳). بررسی برخی از شاخص‌های ایمنی ذاتی، آنزیم‌های متابولیکی کبدی، رشد و بازماندگی در ماهی زبرای (*Danio rerio*) تغذیه‌شده با سطوح متفاوت مخمر اتولیزشده بر پایه ساکارومایسس سرویسیه (*Saccharomyces cerevisiae*). *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۳ (۲)، ۱۱۹-۱۰۳.
DOI: 10.22069/japu.2024.20655.1713

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

ماهی زبرا با نام علمی *Danio rerio* متعلق به خانواده سیپرینیده می‌باشد که با اسامی مترادفی مانند *D. franker* و *Brachydanio rerio* در آب‌های شیرین مناطق گرمسیری زندگی می‌کند. پرورش ماهی زبرا فرآیندی ساده دارد و این ماهی به‌طور فوق‌العاده‌ای برای مطالعات تکوینی جنین و زنده مناسب است (۱). آبزیان در طول دوره پرورش با عوامل محدودکننده‌ای از جمله بیماری‌ها و شرایط نامطلوب محیطی روبرو هستند و در صورت عدم انجام کنترل‌های بهداشتی و اعمال مدیریتی نامناسب با کاهش رشد، کاهش بازدهی خوراک و بروز شدت‌های مختلفی از انواع بیماری‌ها از مزمن تا حاد روبه‌رو خواهند شد، بنابراین، حفظ حالت پایدار داخلی بدن و به‌کار گرفتن راهکارهایی جهت پیشگیری از وقوع بیماری تضمین‌کننده آبزی‌پروری موفق خواهد بود (۲، ۳).

در سال‌های اخیر، با توجه به اثرات جانبی، زیست‌محیطی و مقاومت‌های دارویی در به‌کارگیری ترکیبات شیمیایی به‌خصوص آنتی‌بیوتیک‌ها، محدودیت‌هایی در استفاده از این ترکیبات اعمال شده است (٤، ٥) و توجه به استفاده از مکمل‌های غذایی مانند پروبیوتیک‌ها، پربیوتیک‌ها، مکمل‌های گیاهی و ترکیبات زیست‌فعال در جیره غذایی آبزیان در جهت افزایش عملکرد رشد و کارایی سیستم دفاعی و بهبود سلامت افزایش یافته است (٦، ٧). از جمله ترکیباتی که بسیار مورد توجه قرار گرفته است ترکیبات باکتریایی و مخمرها است. سلول زنده، سلول کامل مرده یا محصولات جانبی زیستی مخمرها با داشتن ارزش غذایی بالا و قابلیت بالقوه به‌عنوان ترکیبات تغذیه‌ای مکمل می‌توانند فواید متعددی برای میزبان به همراه داشته باشند. برای مثال، برخی از محصولات مانند: بتاگلوکان‌ها، کیتین، اسیدهای نوکلئیک، اولیگوساکاریدهای مانان، بتاکاروتن، بکمپلکس، تورولن و تورولا الودین در رژیم‌های غذایی آبزیان استفاده شده که تأثیر مستقیمی بر رشد داشته است. هم‌چنین، توانایی بهبود عملکرد سیستم ایمنی به همراه خواص آنتی‌اکسیدانی موجود در مخمرها به‌عنوان محرک سیستم ایمنی نقش مهمی در افزایش مقاومت به بیماری‌های رایج ویروسی و باکتریایی دارند (۸).

ترکیبات زیست‌فعال مخمر مانند گلوکان‌ها، نوکلئوتیدها، پلی‌ساکاریدها، رنگدانه‌های کاروتنوئید، لیپیدها، پروتئین‌ها و ویتامین‌ها پاسخ ایمنی را مستقیماً فعال می‌کنند و میکروبیوتای روده را بهبود می‌بخشند (۹). در سال‌های اخیر، افزایش تقاضا برای مواد غذایی با کیفیت بالا برای صنعت آبزی‌پروری منجر به افزایش تمرکز روی مواد میکروبی به‌عنوان منابع غذایی شده است. در این راستا Hansen و همکاران (۱۰) گزارش دادند که مخمری که به‌مدت ١٦ ساعت اتولیزشده بود، باعث بالا رفتن قابلیت هضم پروتئین‌های مصرفی شد. هم‌چنین، مخمر اتولیزشده باعث ترشح اینترلوکین-۸ شد، در حالی‌که، سلول مخمر خردشده باعث ترشح فاکتور نکروز توموری آلفا شد. به‌علاوه فرآوری کردن مخمر ساکارومایسس سرویسیه منجر به افزایش حلالیت پروتئین و بتاگلوکان می‌شود که قابلیت هضم پروتئین را در ماهی آزاد آتلانتیک (*Salmo salar*) بیش‌تر کرد و باعث اثرات مختلف تحریک ایمنی در این ماهی شد. در مطالعه انجام شده توسط Rawling و همکاران (۱۱) با هدف ارزیابی پاسخ‌های ایمنی موکوس ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره حاوی *S. cerevisiae* و *Cyberlindnera jardinii* هیچ اثر منفی بر عملکرد رشد با رژیم غذایی مکمل مشاهده نشد. هم‌چنین، در مطالعه Yang و همکاران (۱۲) اثرات مکمل ترکیبی پروتئین گیاهی و مخمر هیدرولیزشده *S. cerevisiae* به همراه رژیم غذایی حاوی مقادیر کم پودر ماهی مورد ارزیابی قرار

گرت. آن‌ها گزارش کردند که این مکمل ترکیبی سبب بهبود مورفولوژی روده، عملکرد ایمنی بدن و مقاومت در برابر باکتری *Vibrio harveyi* در ماهی هامور (*Epinephelus coioides*) شد و سطح بیان TLR22، INF-γ و TNF-α در گروه تغذیه شده با پودر ماهی در ترکیب با پروتئین‌های گیاهی به‌طور قابل‌توجهی بالاتر از سایر تیمارها بود. به‌علاوه، پس از چالش باکتری، میزان بازماندگی در گروه مذکور نسبت به گروه تغذیه شده با پودر ماهی به‌طور قابل‌توجهی پایین‌تر بود، در حالی‌که در گروه‌های تغذیه‌ای با مخمر هیدرولیزشده *S. cerevisiae* بهبود بازماندگی در مقایسه با دو گروه قبل مشاهده شد.

با توجه به اهمیت دیواره سلولی مخمر در تقویت سیستم ایمنی و بهبود عملکرد رشد در ماهیان، و با توجه به این‌که هیچ مطالعه‌ای در ارتباط با اثرات مخمر اتولیزشده ساکارومایسس سرویسیه روی شاخص‌های ایمنی و عملکرد رشد ماهی زبرا به‌عنوان یک مدل حیوانی صورت نگرفته است، بنابراین مطالعه حاضر، با هدف بررسی تأثیر استفاده از مخمر اتولیزشده ساکرومایسس سرویسیه روی عملکرد رشد، بازماندگی، فعالیت آنزیم‌های متابولیکی کبد و برخی از شاخص‌های ایمنی سرم خون ماهی زبرا طرح‌ریزی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی بچه‌ماهی‌ها: تعداد ٤٨٠ قطعه ماهی زبرای سالم با میانگین وزنی ۰/۰۸ ± ۱/۷۸ گرم از فروشنده تجاری در شهرستان گرگان خریداری شد. ماهیان قبل از تیماربندی، در تانک‌های ٤٠ لیتری که از قبل با آب نمک ضدعفونی‌شده بودند، به‌مدت ۲ هفته جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاه نگهداری شدند (۱۳). سپس ماهیان مذکور به‌صورت تصادفی در آکواریوم‌هایی با حجم آب ٤٠ لیتر توزیع شدند، به‌طوری‌که در هر آکواریوم تعداد ٤٠ قطعه بچه‌ماهی زبرا قرار داده شد. نحوه تیماربندی ماهیان در جدول ۱ ذکر شده است. مقدار غذادهی ۵ درصد مجموع وزن بدن ماهیان صورت گرفت که در ۳ وعده غذایی و هر ٦ ساعت (۸ صبح، ١٤ بعد از ظهر و ۸ شب) به‌مدت ٦٠ روز انجام می‌شد (١٤). در این مطالعه، از غذای بیومار ساخت کشور فرانسه با قطر ۰/۵ میلی‌متر استفاده شد. میزان چربی، پروتئین و کربوهیدرات تقریبی جیره در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱- نحوه تیماربندی ماهیان زبرای تغذیه شده با مخمر اتولیزشده به‌مدت ٦٠ روز (۱۵، ١٦).

تیماربندی	کدبندی	مخمراتولیزشده (به‌ازای درصد جیره)
گروه شاهد	C	۰
تیمار ۱	AY_1	۱
تیمار ۲	AY_2	۲
تیمار ۳	AY_3	۵

جدول ۲- آنالیز تقریبی جیره بیومار فرانسه (۱۷).

	پروتئین	چربی	خاکستر	رطوبت	فیبر	انرژی (کیلوکالری)
درصد	۵۲/٤۵	۱۸/٤٤	۱۱/۳۵	۱۵/٦٦	½	٤٦۷۱/۳۲

آماده‌سازی جیره: مخمر اتولیزشده با نام تجاری نوتری‌ییست‌آکوا از شرکت دانش‌بنیان بهان کیمیاآنزیم (کیمیازیم)، با هدف حذف رطوبت احتمالی در آون با دمای ۳۷ تا ٤٠ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (۱۸). سپس، مخمر اتولیزشده در سطوح ذکر شده در جدول ۱ به‌صورت جداگانه به جیره افزوده گردید. برای به حداقل رساندن میزان آبشویی ترکیبات از ژلاتین ٤ درصد به‌عنوان پوشش استفاده شد (۱۹). جیره‌های تهیه شده در سایه و در یک محیط خنک و تمیز به‌مدت ٢٤ ساعت خشک شدند و سپس هر جیره درون یک زیپ‌پلاست جداگانه درون یخچال با دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (۱۷). در هر بار آماده‌سازی جیره، وزنی معادل ۱۰ روز مصرف در نظر گرفته می‌شد.

بررسی شاخص‌های رشد و بازماندگی: به‌منظور بررسی شاخص‌های رشد در ابتدا، میانه و پایان دوره پرورش، وزن همه ماهی‌ها در تمام گروه‌ها به‌وسیله ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ میلی‌گرم و طول آن‌ها با استفاده از خط‌کش با دقت ۱ میلی‌متر مورد سنجش قرار گرفت. درصد بازماندگی، وزن نهایی، درصد افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و ضریب چاقی با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه گردید (۲۰، ۲۱، ۲۲):

۱۰۰ × [وزن اولیه بدن (گرم)/ (وزن اولیه بدن (گرم) – وزن نهایی بدن (گرم))] = (درصد) درصد افزایش وزن بدن

طول دوره / (لگاریتم طبیعی وزن اولیه بدن – لگاریتم طبیعی وزن نهایی بدن)] = (روز/درصد وزنی) نرخ رشد ویژه

۱۰۰ × [پرورش بر حسب روز

[(گرم) افزایش وزن / (گرم) مقدار غذای مصرف شده] = ضریب تبدیل غذایی

طول نهایی ^{3}(سانتی‌متر) / ۱۰۰ × وزن نهایی (گرم) = (گرم بر سانتی‌مترمکعب) ضریب چاقی

۱۰۰× (تعداد ماهیان در انتهای دوره آزمایش – تعداد ماهیان در ابتدای دوره آزمایش) = (درصد) بازماندگی

نمونه‌برداری و جمع‌آوری عصاره بدن به‌منظور بررسی شاخص‌های سرمی: در زمان نمونه‌برداری پایانی، غذادهی ماهیان به‌مدت ٢٤ ساعت قطع می‌گردید. جهت اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی عصاره بدن، ماهی‌ها بلافاصله پس از نمونه‌برداری و بیهوشی با پودر گل میخک به میزان ۵۰ میلی‌گرم در یک لیتر آب، منجمد می‌شدند. سپس، نمونه‌ها بعد از هموژنیزه شدن به همراه بافر فسفات استریل با pH ۷/٤ مخلوط و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و دور ٦۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گریدند. در انتها، مایع رویی یا همان سوپرناتات جمع‌آوری و تا زمان انجام آزمایش‌های مربوطه در فریزر و دمای ۸۰– درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۳). در این پژوهش، برخی از شاخص‌های مربوط به ایمنی ذاتی و آنزیم‌های کبدی مورد سنجش قرار گرفتند.

– شاخص‌های ایمنی ذاتی سرم

سنجش پروتئین کل (TP) و ایمونوگلوبولین کل (Total Ig): سنجش پروتئین کل سرم از روش Bradford و همکاران (٢٤) ارزیابی گردید. بدین‌منظور، از آلبومین سرم گاوی (سیگما/آلدریچ) به‌عنوان استاندارد استفاده شد و میزان جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از کیت شرکت کوشان زیست‌آزما (ساخت

ایران) بر طبق دستورالعمل مندرج روی بسته و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Perstige 24i) در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. ایمنوگلوبولین کل از روش Siwicki و Anderson (۲۵) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ابتدا میزان پروتئین کل عصاره بدن به روش Bradford و همکاران (۲٤) تعیین و سپس به نمونه‌های آماده شده پلی‌اتیلن گلایکول ۱۲ درصد (شرکت مبتکران شیمی ساخت کشور ایران) اضافه گردید. نمونه‌ها پس از گذشت ۲ ساعت در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) سانتریفیوژ شدند. بعد از انجام سانتریفیوژ، غلظت پروتئین کل در قسمت بالایی محلول مجدداً اندازه‌گیری شد. میزان ایمونوگلوبولین کل، از تفریق غلظت پروتئین در نمونه اولیه و غلظت پروتئین پس از افزودن پلی‌اتیلن گلایکول به‌دست آمد.

سنجش آلبومین (Albumin): در پژوهش حاضر، آلبومین به روش Doumas (۲٦) با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون و مطابق با دستورالعمل مندرج روی بسته کیت در طول موج ٥٤٦ نانومتر اندازه‌گیری شد (۲٦).

- آنزیم‌های متابولیکی کبدی

سنجش آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP): آلکالین فسفاتاز با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون (کرج، ایران) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Perstige 24i) در طول موج ٤۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (۲۷).

سنجش آنزیم آسپارات آمینوترنسفراز (AST): آنزیم آسپارتات آمینوترنسفراز با استفاده از کیت شرکت پادکو (ساخت کشور ایران) و دستگاه اسپکتروفتومتر (Perstige 24i) با روش آنزیمی مطابق با دستورالعمل مندرج روی بسته کیت در طول موج ۳٤۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت (۲۸).

سنجش آنزیم آلانین آمینوترنسفراز (ALT): سنجش آنزیم آلانین آمینوترنسفراز با روش آنزیمی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Perstige 24i) و کیت تشخیصی شرکت پادکو (ساخت کشور ایران) مطابق با دستورالعمل مندرج روی بسته کیت در طول موج ۳٤۰ نانومتر انجام شد (۲۸).

روش آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها: آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. داده‌های مربوط به شاخص‌های رشد، بازماندگی، آنزیم‌های کبدی و ایمنی ذاتی جهت بررسی نرمالیتی با استفاده از آزمون کولوموگروف اسمیرنوف مورد بررسی قرار گرفتند؛ سپس، داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (Standard error) نمایش داده شد. تمامی شکل‌ها و جدول‌ها با استفاده از نرم‌افزار آفیس ۲۰۱۰ ترسیم شدند (۱٤).

نتایج و بحث

عملکرد رشد و درصد بازماندگی در ماهی زبرا: نتایج به‌دست آمده از بررسی شاخص‌های رشد ماهیان زبرای تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح متفاوت مخمر اتولیزشده در جدول ۳ آورده شده است. نتایج حاصل از این جدول نشان داد که بین وزن و طول اولیه تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد تفاوت معناداری وجود نداشت (P>۰/۰۵). هم‌چنین، در سایر شاخص‌های رشد اندازه‌گیری شده شامل: وزن نهایی، درصد افزایش وزن بدن، ضریب تبدیل غذایی، نرخ رشد ویژه و ضریب چاقی پس از ٦۰ روز تغذیه با جیره‌های آزمایشی و گروه شاهد تفاوت معناداری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). به‌علاوه، در درصد بازماندگی گروه شاهد و سایر تیمارهای آزمایشی نیز اختلاف معناداری وجود نداشت (P>۰/۰۵).

جدول ۳- عملکرد رشد و درصد بازماندگی در ماهیان زبرای تغذیه شده با جیره غذایی حاوی سطوح متفاوت مخمراتولیزشده به‌مدت ٦٠ روز.

شاخص‌های رشد	گروه شاهد	AY_1	AY_2	AY_3
وزن اولیه (گرم)	۱/۷۳ ± ۰/۰۹	۱/۸۳ ± ۰/۰۷	۱/۷۳ ± ۰/۰۷	۱/۸۳ ± ۰/۰۹
وزن نهایی (گرم)	٦/۸۱ ± ۰/۰۸	٦/۹۷ ± ۰/۰۲	۷/۰٤ ± ۰/۰۱	۷/۲۱ ± ۰/۰٤
طول اولیه (سانتی‌متر)	۱/٦۰ ± ۰/۵۸	۱/٦۷ ± ۱/۲۰	۱/۷۷ ± ۰/۳۳	۱/۷۷ ± ۰/٦۷
طول نهایی (سانتی‌متر)	۳/۹۳ ± ۰/۵۸$^{=c}$	۳/۹۳ ± ۰/۳۳	٤۰/۰۷ ± ۰/۳۳	٤/۱۰ ± ۰/۰۰
درصد افزایش وزن بدن (درصد)	۳۵۳/۹۳ ± ٦٦/۹۹	۲۸۱/۲٤ ± ۱٤/۷۱	۳۰۷/۲٤ ± ۱٦/۷۱	۲۹۵/۲٤ ± ۲۰/۵٤
نرخ رشد ویژه (درصدوزنی/روز)	۲/٤۹ ± ۰/۲٤	۲/۲۳ ± ۰/۰٦	۲/۳٤ ± ۰/۰۷	۲/۲۹ ± ۰/۰۸
ضریب تبدیل غذایی	۳/٤٦ ± ۰/۰٦	۳/۵۰ ± ۰/۰۰	۳/٤۹ ± ۰/۰۰	۳/٤۸ ± ۰/۰۰
ضریب چاقی (گرم بر میلی‌مترمکعب)	۰/۰۱ ± ۰/۰۰	۰/۰۱ ± ۰/۰۰	۰/۰۱ ± ۰/۰۰	۰/۰۱ ± ۰/۰۰
درصدبازماندگی (درصد)	۱۰۰/۰۰ ± ۰/۰۰	۱۰۰/۰۰ ± ۰/۰۰	۱۰۰/۰۰ ± ۰/۰۰	۱۰۰/۰۰ ± ۰/۰۰

* عدم وجود حروف لاتین نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنادار در هر ردیف می‌باشد ($P<۰/۰۵$)

** AY_1: ۱ درصد جیره مخمر اتولیزشده، AY_2: ۲ درصد جیره مخمر اتولیزشده، AY_3: ۵ درصد جیره مخمر اتولیزشده

شاخص‌های ایمنی ذاتی سرم خون در ماهی زبرا: نتایج به‌دست آمده از بررسی شاخص‌های ایمنی ذاتی سرم ماهیان زبرای تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح متفاوت مخمر اتولیزشده در جدول ٤ آورده شده است. نتایج حاصل از این جدول نشان داد که بیشترین میزان پروتئین کل، ایمونوگلوبولین کل و آلبومین سرم در تیمار AY_3 (تغذیه با مخمر اتولیزشده به‌میزان ۵ درصد جیره) بود که در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنادار داشت ($P<۰/۰۵$).

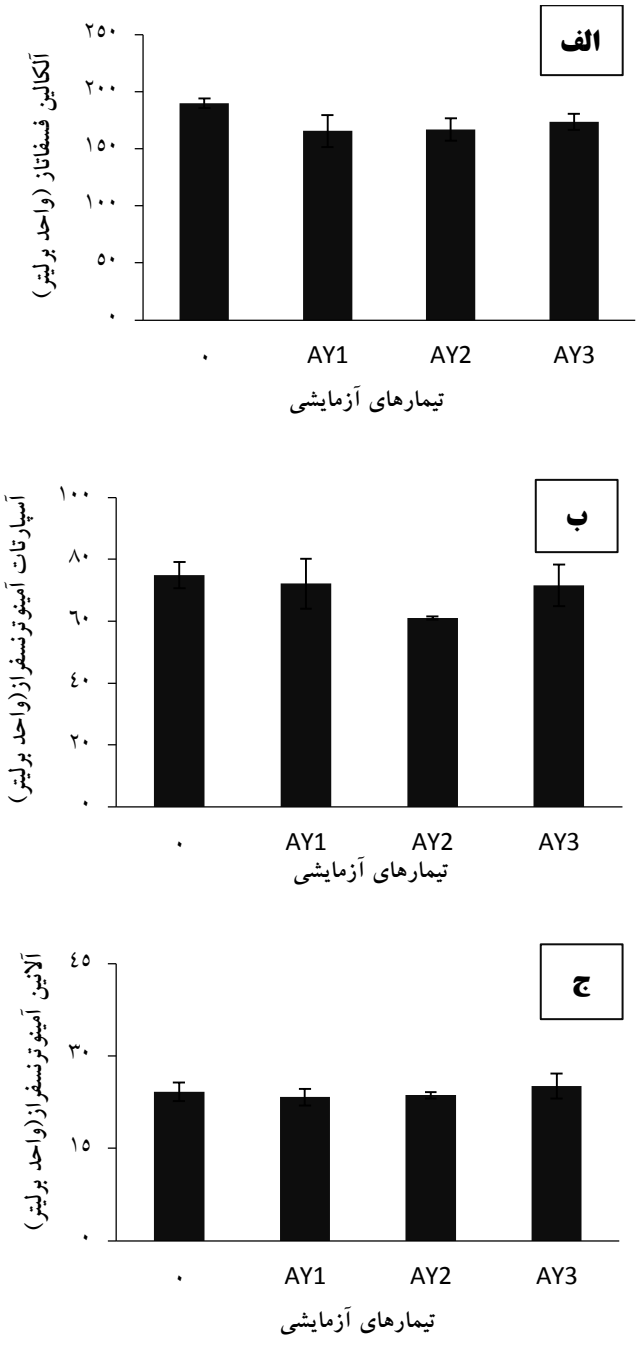
جدول ٤- شاخص‌های ایمنی ذاتی سرم خون در ماهیان زبرای تغذیه شده با جیره غذایی حاوی سطوح متفاوت مخمر اتولیزشده به‌مدت ٦٠ روز.

شاخص‌های ایمنی	گروه شاهد	AY_1	AY_2	AY_3
پروتئین کل (گرم بر دسی‌لیتر)	۲/۳۷ ± ۰/٦۰^{c}	۲/۷۳ ± ۰/۳۳^{bc}	۳/۳۸ ± ۰/۱۲^{ab}	۳/۹٤ ± ۰/۰۵^{a}
ایمونوگلوبولین کل (گرم بر دسی‌لیتر)	۰/۰۷ ± ۰/۰۱^{d}	۰/۰۸ ± ۰/۰۱^{c}	۰/۰۹ ± ۰/۰۱^{b}	۰/۱۰ ± ۰/۰^{a}
آلبومین (گرم بر دسی‌لیتر)	۰/۰۲۸ ± ۰/۰۰٤^{b}	۰/۰۳۷ ± ۰/۰۰۲^{a}	۰/۰۳۸ ± ۰/۰۰۲^{a}	۰/۰٤۱ ± ۰/۰۰۳^{a}

* وجود تفاوت در حروف لاتین نشان‌دهنده وجود تفاوت معنادار در هر ردیف می‌باشد ($P<۰/۰۵$)

** AY_1: ۱ درصد جیره مخمر اتولیزشده، AY_2: ۲ درصد جیره مخمر اتولیزشده، AY_3: ۵ درصد جیره مخمر اتولیزشده

آنزیم‌های متابولیکی کبد در ماهی زبرا: نتایج حاصل از بررسی آنزیم‌های متابولیکی کبدی در شکل ۱ نشان داد که در میزان آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز، آسپارتات آمینوترنسفراز و آلانین آمینوترنسفراز در تمامی تیمارها تفاوتی با گروه شاهد مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$) (شکل ۱).



شکل ۱- آنزیم‌های متابولیکی کبد: الف) آلکالین فسفاتاز، ب) آسپارتات آمینوترنسفراز، ج) آلانین آمینوترنسفراز در ماهیان زبرای تغذیه‌شده با جیره غذایی حاوی سطوح متفاوت مخمر اتولیزشده به‌مدت ۶۰ روز.

عدم وجود حروف لاتین نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنادار در هر ستون می‌باشد ($P>0/05$).

AY_1: ۱ درصد جیره مخمر اتولیزشده، AY_2: ۲ درصد جیره مخمر اتولیزشده، AY_3: ۵ درصد جیره مخمر اتولیزشده.

در میان محرک‌های ایمنی، پربیوتیک‌ها با تأثیرگذاری بسیار بالا بر شاخص‌های رشد و ایمنی ماهیان به‌طور چشمگیری مورد توجه پرورش‌دهندگان در صنعت آبزی‌پروری می‌باشند (۲۹). مخمرها میکروارگانیسم‌هایی هستند که به هر دو صورت زنده و فرآوری‌شده در صنایع غذایی مورد استفاده قرار

می‌گیرند (۳۰، ۳۱، ۳۲). ارزش غذایی مخمرها بسیار بالا بوده و قابلیت تولید انبوه در آن‌ها، آن‌ها را به‌عنوان یک گزینه مناسب برای صنعت آبزی‌پروری معرفی کرده است (۳۱، ۳۲، ۳۳).

در تعاریف انجمن بین‌المللی شیمی محض و کاربردی، الیگوساکاریدها را ساکاریدهایی معرفی کردند که قند آن‌ها بین ۳ تا ۱۰ بخش است و همین بخش است که ساختار اصلی مکمل‌های پربیوتیکی را تشکیل می‌دهد (۳٤). تاکنون پژوهش‌ها نشان داد که برخی از انواع پربیوتیک‌ها مانند مانان الیگوساکارید، گلوکان و فروکتوالیگوساکارید توانسته‌اند اثرات مثبتی روی شاخص‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی سرم خون، ایمنی ذاتی، عملکرد رشد و بهبود فلور میکروبی برخی از گونه‌ها داشته باشند (۳۵، ۳٦). با این وجود، اثرات مکمل پربیوتیکی مخمراتولیزشده که به‌طور عمده دربردارنده دو ترکیب مانان الیگوساکارید و بتاگلوکان مشتق‌شده از دیواره سلولی مخمر ساکارومایسس سرویسیه می‌باشد، بر عملکرد رشد و شاخص‌های ایمنی سرم خون ماهی زبرا (البته به‌عنوان مدل حیوانی) کم‌تر مورد مطالعه واقع شده است. نتایج مطالعه حاضر در ارتباط با بررسی مصرف سطوح مختلف مکمل پربیوتیک مخمراتولیزشده بر عملکرد رشد ماهی زبرا نشان داد که این مکمل پربیوتیکی نتوانست اثر معناداری برعملکرد رشد و تغذیه‌ای این گونه داشته باشد. در همین راستا، Taati و همکاران (۳۷) گزارش کردند که استفاده از سطوح مختلف پربیوتیک ایمنوال که مانان الیگوساکارید و بتاگلوکان آن در مخمر اتولیزشده نیز وجود دارد، تأثیری روی شاخص‌های رشد فیل‌ماهیان جوان نداشت. هم‌چنین، Gatlin و Li (۳۸) پس از مصرف مکمل پربیوتیکی با بخش‌های مشترک با مکمل پژوهش حاضر، هیچ افزایش معناداری بر عملکرد رشد و افزایش وزن باس مخطط × هیبرید باس سفید (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) مشاهده نکردند که با نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر مطابقت داشت. با این‌حال، در تضاد با نتایج مطالعه حاضر، Aramli و همکاران (۳۹) گزارش کردند که عملکرد رشد تاس‌ماهیان ایرانی پس از تغذیه با سطوح مختلف مکمل بتاگلوکان به‌طور معناداری بهبود یافت. این اختلافات ممکن است به‌دلیل اختصاصات بیولوژیکی بین گونه‌های متفاوت و مدت زمان مصرف مکمل‌ها در جیره آن‌ها باشد (٤۰). هم‌چنین، Adel و همکاران (٤۱) در پژوهشی عملکرد رشد فیل‌ماهیان جوان تغذیه‌شده با سطوح مختلف مکمل تجاری حاوی دیواره سلولی مخمر گروبیوتیک (Grobiotic®-A) را مورد مطالعه قرار دادند و گزارش کردند که مقادیر وزن کسب شده ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی این مکمل در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت. علاوه‌براین، ضریب تبدیل و نرخ رشد به‌طور معناداری بهبود یافت. با این وجود، چگونگی اثر مشتقات پربیوتیکی از جمله مخمر اتولیزشده بر عملکرد رشد ماهی زبرا به‌عنوان یک مدل حیوانی به درستی مورد مطالعه قرار نگرفته است اما، برخی از پژوهش‌گران بر این باور هستند که، تفاوت در نتایج مطالعات متعدد می‌تواند به تفاوت در جیره پایه مصرفی، مدت زمان انجام آزمایش، انواع و ساختار پربیوتیک‌ها، سن ماهی، گونه، دمای محیط، میزان مصرف مکمل پربیوتیکی در جیره، میزان جذابیت غذایی برای گونه مورد مطالعه، میزان توانایی تخمیر گونه‌های غالب در فلور میکروبی روده و تفاوت‌های مورفولوژیکی روده و جمعیت‌های باکتریایی روده میزبان بستگی داشته باشد (٤۲، ٤۳، ٤٤). از سویی دیگر، عملکرد رشد در ماهیان که ممکن است به‌واسطه تغذیه و استفاده از جیره‌های حاوی مکمل‌های پربیوتیکی ایجاد شود، با محدودکردن رشد یا حذف عوامل بیماری‌زا از جمله عوامل باکتریایی

پاتوژن و در نهایت با بهبود هضم و جذب مواد مغذی رخ می‌دهد (٤٥) و از آن‌جایی‌که در شرایط پژوهش حاضر ماهیان در یک شرایط ایده‌آل پرورشی و مساعد محیطی قرار داشتند، ممکن است عدم ایجاد اثرات معنادار رشد روی این گونه را بتوان توجیه کرد. با این‌حال، مطالعات گسترده‌تری مورد نیاز است تا نقش اصلی فاکتورهای مسئول ارتقای رشد مشخص شود (٤٠).

سنجش شاخص‌های سرم‌شناسی به عنوان ابزاری مفید و ارزشمند جهت نظارت بر وضعیت متابولیک و فیزیولوژیک ماهی شناخته می‌شود (٤٦). در پژوهش حاضر مشخص گردید که تیمارهای تغذیه‌شده با مخمر اتولیزشده دارای شاخص ایمنی ذاتی بالاتری در مقایسه با گروه شاهد بود. به‌طوری‌که بالاترین سطح پروتئین و ایمونوگلوبولین کل سرم خون در تیمار تغذیه‌شده با جیره حاوی مخمر اتولیزشده به میزان ٥ درصد جیره مشاهده گردید. افزایش سطح پروتئین‌های سرم به‌عنوان یک شاخص مناسب برای بررسی وضعیت دفاع و پاسخ سیستم ایمنی ماهی مطرح است (٤٧). پروتئین کل پلاسما شامل پروتئین‌های آلبومین و گلوبولین است، پژوهش‌ها نشان داد که افزایش میزان آلبومین، گلوبولین و در واقع پروتئین کل سرم بیش‌تر با تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی میزبان یعنی ایمنی ذاتی مربوط می‌باشد (٤٨، ٤٩). در بین پروتئین‌های سرم، آلبومین نقش مهمی در ثبات و تنظیم فشار اسمزی به‌منظور توزیع مناسب مایعات بدن داشته و در نقش یک حامل پلاسما و لیگاندهای غیراختصاصی (به همراه تعدادی جایگاه‌های اتصال) عمل می‌نماید. هم‌چنین، ایمونوگلوبولین‌ها جزءآنتی‌بادی‌های طبیعی هستند که به‌صورت کاملاً تنظیم شده در غیاب محرک آنتی‌ژنیک خارجی تولید می‌گردند و به این طریق از میزبان در برابر عوامل بیماری‌زا محافظت می‌کنند (٥٠). ایمونوگلوبولین‌ها یکی از بخش‌های حیاتی سیستم ایمنی ذاتی ماهی می‌باشند که از سلول‌های B ترشح می‌شوند (٥١). بر اساس پژوهش‌ها ثابت گردید که تغییر در سطوح ایمونوگلوبولین سرم خون و موکوس پوست ماهیان در نتیجه استفاده از محرک‌های ایمنی اتفاق می‌افتد (٥٢، ٥٣، ٥٤). به‌طورکلی، پروتئین‌های موجود در سرم خون از اساسی‌ترین اجزاء متابولیسم در آبزیان می‌باشند. پژوهش‌ها نشان داد که غلظت کل پروتئین موجود در پلاسمای خون را می‌توان به‌عنوان یک شاخص بالینی در سنجش میزان سلامتی، استرس و وضعیت بدنی موجودات آبزی در نظر گرفت (٥٥). سنجش مقدار پروتئین خون می‌تواند آسیب‌های سلولی را پیش‌بینی کند (٥٦)، به این معنا که اگر میزان پروتئین‌های سرم خون افزایش یابد، ایمنی ذاتی ماهی در واقع افزایش یافته است و ماهی در مواجهه با هر گونه استرس آمادگی دارد (٥٧). در پژوهش حاضر، ممکن است مخمر اتولیزشده توانسته باشد به‌عنوان یک عامل القایی و محرک ایمنی تلقی شده باشد و سبب سرازیر شدن و افزایش پروتئین‌های سرم و در نتیجه افزایش ایمنی ذاتی در ماهیان زبرای تیمارشده با این محرک ایمنی گردد. در تطابق با نتایج حاصل از پژوهش حاضر می‌توان به پژوهش نعیمی و همکاران (٥٨) در ارتباط با اثر مثبت استفاده از پربیوتیک سلمانکس در افزایش و بهبود پروتئین کل، ایمونوگلوبولین و آلبومین سرم بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان اشاره کرد. هم‌چنین، پژوهش‌های Abu-Elala و همکاران (٥٩)، Jami و همکاران (٦٠)، خدادادی و همکاران (٦١)، Ching و همکاران (٦٢) و Khanjani و همکاران (٦٣) در استفاده از دیواره سلولی مخمر، مخمر اتولیزشده و یا ترکیبات آن یعنی مانان الیگوساکارید و بتاگلوکان که دارای خاصیت پربیوتیکی هستند، در تطابق با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد.

آنزیم‌های متابولیکی کبد شامل: آلکالین فسفاتاز (ALP)، آلانین (ALT) و آسپارتات (AST) آمینوترنسفراز از جمله آنزیم‌های مهم در بررسی وضعیت سلامت ماهیان می‌باشند که به وفور در این بافت یافت می‌شوند (٦٤). اگرچه، در مطالعات مربوط به بررسی اثرات پربیوتیک‌ها بر شاخص‌های خونی کم‌تر به سنجش و ارزیابی این آنزیم‌ها پرداخته می‌شود، اما به هر حال، بررسی این آنزیم‌ها می‌تواند به‌عنوان یک فاکتور تکمیلی در کنار سایر شاخص‌ها مطرح باشد (٦٥). در مطالعه حاضر مشخص گردید که در میزان این سه آنزیم کبدی هیچ تفاوتی بین تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد مشاهده نشد. افزایش سطح این آنزیم‌های سرمی نشان‌دهنده آشفتگی سلولی و ورود آنزیم‌ها از سیتوپلاسم سلول‌ها به سرم می‌باشد. به‌طوری‌که در انسان و برخی از حیوانات خونگرم از این آنزیم‌ها به‌عنوان معرف‌های آسیب‌های بافتی خاص استفاده می‌شود (٥٨). امروزه این آنزیم‌ها برای تشخیص تخریب سلول‌های کبدی و عضلانی کاربرد دارند (٦٦). در پژوهش حاضر، عدم وجود اختلاف معنادار بین تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد را می‌توان به عدم وجود آسیب‌های بافتی کبد نسبت داد. یعنی مخمر اتولیزشده هیچ اثر منفی روی سلامت بدن میزبان نداشت و این ترکیب توانست به‌عنوان یک پربیوتیک بدون ضرر در ماهیان زبرا عمل کند. در تطابق با نتایج پژوهش حاضر می‌توان به مطالعات Ahmadifar و همکاران (٦٧)، Denji و همکاران (٦٨) و Hoseinifar و همکاران (٣٦) اشاره کرد که گزارش کردند که استفاده از پربیوتیک‌ها روی میزان آنزیم‌های کبدی گونه‌های مورد مطالعه آن‌ها اثری نداشت.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طورکلی، نتایج نشان داد که استفاده از سطوح متفاوت مخمر اتولیزشده اگرچه اثر مثبتی روی عملکرد رشد و بازماندگی ماهیان زبرا نداشت، ولی، با بررسی آنزیم‌های کبدی به عنوان آزمون تکمیلی و عدم افزایش معنادار این آنزیم‌ها در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه شاهد مشخص گردید که این مکمل غذایی هیچ اثر منفی نیز روی بدن میزبان نداشت. با این وجود، این مکمل توانست سبب بهبود شاخص‌های ایمنی ذاتی در ماهی زبرا شود. هم‌چنین، بهترین سطح پیشنهادی در پژوهش حاضر، میزان ٥ درصد جیره مخمر اتولیزشده معرفی می‌گردد. اگرچه، اظهارنظر دقیق‌تر در ارتباط با چگونگی اثر این مکمل غذایی به مطالعات بیش‌تری در سطح مولکولی نیاز دارد.

منابع

1. Bazarafshan, B., Sadeghi, H., Khalili, M., & Hosseinifar, S. H. (2014). Use of zebrafish (*Danio rerio*) as a research model in human studies. *Journal of Ornamental Aquatics*, 2 (3), 9-13.
2. Van Doan, H., Hoseinifar, S.H., Sringarm, K., Jaturasitha, S., Yuangsoi, B., Dawood, M. A., Esteban, M. Á., Ringø, E., & Faggio, C. (2019). Effects of Assam tea extract on growth, skin mucus, serum immunity and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Streptococcus agalactiae*. *Fish & Shellfish Immunology*, 93, 428-435.
3. Dawood, M. A., Koshio, S., Ishikawa, M., & Yokoyama, S. (2015). Effects of heat killed *Lactobacillus plantarum* (LP20) supplemental diets on growth performance, stress resistance and immune response of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*, 442, 29-36.

4.Langdon, A., Crook, N., & Dantas, G. (2016). The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. *Genome medicine*, 8 (1), 1-16.
5.Ramos, M. A. D. S., Da Silva, P. B., Spósito, L., De Toledo, L. G., Bonifácio, B. V., Rodero, C. F., Dos Santos, K. C., Chorilli, M., & Bauab, T. M. (2018). Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 1179.
6.Dossou, S., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Dawood, M. A., El Basuini, M. F., El-Hais, A. M., & Olivier, A. (2018). Effect of partial replacement of fish meal by fermented rapeseed meal on growth, immune response and oxidative condition of red sea bream juvenile, *Pagrus major*. *Aquaculture*, 490, 228-235.
7.Mohapatra, S., Chakraborty, T., Kumar, V., DeBoeck, G., & Mohanta, K. N. (2013). Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97 (3), 405-430.
8.Ernesto Ceseña, C., Vega-Villasante, F., Aguirre-Guzman, G., Luna-Gonzalez, A., & Campa-Cordova, A. (2021). Update on the use of yeast in shrimp aquaculture: a minireview. *International Aquatic Research*, 13 (1), 1-16.
9.Glencross, B. D., Huyben, D., & Schrama, J. W. (2020). The application of single-cell ingredients in aquaculture feeds-a review. Fishes, 5 (3), 22.
10.Hansen, J. Ø., Lagos, L., Lei, P., Reveco-Urzua, F. E., Morales-Lange, B., Hansen, L. D., Schiavone, M., Mydland, L. T., Arntzen, M. Ø., Mercado, L., & Benicio, R. T. (2021). Down-stream processing of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)–Effect on nutrient digestibility and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 530, 735707.
11.Rawling, M., Leclercq, E., Foey, A., Castex, M., & Merrifield, D. (2021). A novel dietary multi-strain yeast fraction modulates intestinal toll-like-receptor signalling and mucosal responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Plos one*, 16 (1), e0245021.
12.Yang, X., He, Y., Chi, S., Tan, B., Lin, S., Dong, X., Yang, Q., Liu, H., & Zhang, S. (2020). Supplementation with *Saccharomyces cerevisiae* hydrolysate in a complex plant protein, low-fishmeal diet improves intestinal morphology, immune function and *Vibrio harveyi* disease resistance in *Epinephelus coioides*. *Aquaculture*, 529, 735655.
13.Yousefi, S., Hoseinifar, S. H., Paknejad, H., & Hajimoradloo, A. (2018). The effects of dietary supplement of galactooligosaccharide on innate immunity, immune related genes expression and growth performance in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish and shellfish immunology*, 73, 192-196.
14.Zakariaee, H., Sudagar, M., Hosseini, S. S., Paknejad, H., & Baruah, K. (2021). In vitro Selection of Synbiotics and in vivo Investigation of Growth Indices, Reproduction Performance, Survival, and Ovarian Cyp19α Gene Expression in Zebrafish *Danio rerio*. Frontiers in Microbiology, 12.
15.Sönmez, A. Y. (2017). Evaluating two different additive levels of fully autolyzed yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth performance, liver histology and fatty acid composition. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 17 (2), 379-385.
16.Adeoye, A. A., Obasa, S. O., Fawole, F. J., Wan, A. H., & Davies, S. J. (2020). Dietary supplementation of autolysed yeast enhances growth, liver functionality and intestinal morphology in African catfish. Aquaculture Nutrition, 26 (3), 772-780.
17.Metinfar, A., Inayat Gholampour, T., Shabani Kakrodi, S., & Fadai Raini, M. (2017). The effect of garlic essential oil (*Allium sativum*) on growth and survival indicators, some blood biochemical indicators and digestive enzymes of zebra fish (*Danio rerio*). *Scientific Journal of Iranian Fisheries*, 27 (6), 143-149.

18. Zargari, A., Mazandarani, M., & Hoseini, S. M. (2018). Effects of safflower (*Carthamus tinctorius*) extract on serum antibacterial activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus iniae* and *Yersinia ruckeri*. *International Journal of Aquatic Biology*, 6 (1), 1-7.
19. El Basuini, M. F., Teiba, I. I., Zaki, M. A., Alabssawy, A. N., El-Hais, A. M., Gabr, A. A., Dawood, M. A., Zaineldin, A. I., Mzengereza, K., Shadrack, R. S., & Dossou, S. (2020) (a). Assessing the effectiveness of CoQ10 dietary supplementation on growth performance, digestive enzymes, blood health, immune response, and oxidative related genes expression of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 98, 420-428.
20. Hevrøy, E., Espe, M., Waagbø, R., Sandnes, K., Ruud, M., & Hemre, G. I. (2005). Nutrient utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed increased levels of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. *Aquaculture Nutrition*, 11, 301-313.
21. Bekcan, S., Dogankaya, L., & Cakirogullari, G. C. (2006). Growth and body composition of European catfish (*Silurus glanis* L.) fed diets containing different percentages of protein. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, 58 (2), 137-142.
22. Tacon, A. G. J. (1990). Standard method for nutritional and feeding of farmed fish and shrimp. Universidad del Mar, México Biblioteca del Campus Puerto Ánge, 1, 117p.
23. Safari, R., Hoseinifar, S. H., Van Doan, H., & Dadar, M. (2017). The effects of dietary Myrtle (*Myrtus communis*) on skin mucus immune parameters and mRNA levels of growth, antioxidant and immune related genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & shellfish immunology*, 66, 264-269.
24. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248 254.
25. Siwicki, A. K., & Anderson, D. P. (1993). Nonspecific defence mechanisms assay in fish II; Potential killing activity of neutrophils and manocytes, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (Ig) level in serum. In A.K. Siwicki, D.P. Anderson, and J. Waluga (ED.), Fish Disease Diagnosis and Preventions Methods (pp. 105-111). Wydawnictwo Instytutu Rybactwa Strodladowego, Olsztyn, Poland. **NII Article ID (NAID):10019209712.**
26. Doumas, B. T., Watson, W. A., & Biggs, H. G. (1971). Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromcresol green. *Clinica chimica acta*, 31 (1), 87-96.
27. Fischbach, F., & Zawta B. (1992). Age-dependent reference limits of several enzymes in plasma at different measurement temperatures. Klin Lab. 38, 555-561.
28. Reitman, S., & Frankel, A. (1957). Colorimetric method for determination of serum glutamate oxaloacetate and glutamic pyruvate transaminase. *American J. Clin. Pathol.* 28, 56-58.
29. Liu, J., Zhang, P., Wang, B., Lu, Y., Li, L., Li, Y., & Liu, S. (2022). Evaluation of the effects of Astragalus polysaccharides as immunostimulants on the immune response of crucian carp and against SVCV in vitro and in vivo. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: *Toxicology & Pharmacology*, 253, 109249.
30. Zhang, P., Yang, F., Hu, J., Han, D., Liu, H., Jin, J., Yang, Y., Yi, J., Zhu, X., & Xie, S. (2020). Optimal form of yeast cell wall promotes growth, immunity and disease resistance in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Aquaculture Reports*, 18, 100465.
31. Agboola, J. O., Øverland, M., Skrede, A., & Hansen, J. Ø. (2021). Yeast as major protein-rich ingredient in aquafeeds: a review of the implications for aquaculture production. *Reviews in Aquaculture*, 13 (2), 949-970.

32. Blomqvist, J., Pickova, J., Tilami, S. K., Sampels, S., Mikkelsen, N., Brandenburg, J., Sandgren, M., & Passoth, V. (2018). Oleaginous yeast as a component in fish feed. *Scientific reports*, 8 (1), 1-8.
33. Mahdy, M. A., Jamal, M. T., Al-Harb, M., Al-Mur, B. A., & Haque, M. F. (2022). Use of yeasts in aquaculture nutrition and immunostimulation: A review. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 10 (5), 59-65.
34. Mussatto, S. I., & Mancilha, I. M. (2007). Non-digestible oligosaccharides: A review. Carbohydrate polymers, 68 (3), 587-597.
35. Mohajer, E. M., Vahabzadeh, H., Zamini, A. A., Soudagar, M., & Ghorbani, N. R. (2010). Effect of dietary immunogen prebiotic on growth and survival indices of giant sturgeon (*Huso huso* Linne, 1758) juveniles. *New technologies in aquaculture development*, 4 (3), 61-72.
36. Hoseinifar, S.H ., Mirvaghefi, A., & Merrifield, D. L. (2011). The effects of dietary inactive brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae var*. ellipsoideus on the growth, physiological responses and gut microbiota of juvenile beluga (*Huso huso*). *Aquaculture*, 318 (1-2), 90-94.
37. Taati, R., Soltani, M., Bahmani, M., & Zamini, A. A. (2011). Growth performance, carcass composition, and immunophysiological indices in juvenile great sturgeon (*Huso huso*) fed on commercial prebiotic, Immunoster. [In Press]
38. Li, P., & Gatlin, D. M. (2004). Dietary brewer's yeast and the prebiotic Grobiotic®-Ainfluence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Aquaculture*. 231, 445-456.
39. Aramli, M. S., Kamangar, B., & Nazari, R. M. (2015). Effects of dietary β-glucan on the growth and innate immune response of juvenile Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. *Fish & shellfish immunology*, 47 (1), 606-610.
40. Yousefi, S., Monsef Shokri, M., Alaf Novirian, H., & Hosseini Far, S. H. (2019). The effects of yeast cell wall probiotics (Imnuval) on the growth and hematological parameters of juvenile Persian sturgeon. *Journal of Animal Environmental*, 12 (3), 21-228.
41. Adel, M., Nayak, S., Lazado, C. C., & Yeganeh, S. (2016). Effects of dietary prebiotic grobiotic®-a on growth performance, plasma thyroid hormones and mucosal immunity of great sturgeon, *Huso huso* (linnaeus, 1758). *Journal of Applied Ichthyology*, 32 (5), 825-831.
42. Dalmo, R. A., & Bøgwald, J. (2008). ß-glucans as conductors of immune symphonies. *Fish & shellfish immunology*, 25 (4), 384-396.
43. Hoseinifar, S. H., Esteban, M. Á., Cuesta, A., & Sun, Y. Z. (2015). Prebiotics and fish immune response: a review of current knowledge and future perspectives. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 23 (4), 315-328.
44. Dawood, M. A., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., El Basuini, M. F., Hossain, M. S., Nhu, T. H., Moss, A. S., Dossou, S., & Wei, H. (2017). Dietary supplementation of β-glucan improves growth performance, the innate immune response and stress resistance of red sea bream, *P agrus major*. *Aquaculture Nutrition*, 23 (1), 148-159.
45. Zhang, Y., Zeng, H., Wang, Y., Zeng, S., & Zheng, B. (2014). Structural characteristics and crystalline properties of lotus seed resistant starch and its prebiotic effects. *Food chemistry*, 155, 311-318.
46. Mohseni, M., Aftabgerd, M., Karmi-Nasab, M., Rast-Ravan, M. A., & Gol Alipour, Y. (2022). Investigating the effect of different amounts of soybean powder (*Glycine max*) containing phyzyme enzyme on blood parameters and liver enzyme activity of Caspian sea salmon (*Salmo caspius* Kessler, 1877). *Scientific Journal of Iranian Fisheries*, 30 (2), 117-121.
47. Riche, M. (2007). Analysis of refractometry for determining total

plasma protein in hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) at various salinities. *Aquaculture*, 264 (1-4), 279-284.

48. Jahazi, M. A., Hoseinifar, S. H., Jafari, V., Hajimoradloo, A., Van Doan, H., & Paolucci, M. (2020). Dietary supplementation of polyphenols positively affects the innate immune response, oxidative status, and growth performance of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture*, 517, 734709.
49. Larbi Ayisi, C., Zhao, J., & Wu, J. W. (2018). Replacement of fish oil with palm oil: Effects on growth performance, innate immune response, antioxidant capacity and disease resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *PloS one*, 13 (4), e0196100.
50. Kaveri, S. V. (2012). Intravenous immunoglobulin: exploiting the potential of natural antibodies. *Autoimmunity reviews*, 11 (11), 792-794.
51. Willis, T. G., & Dyer, M. J. (2000). The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. Blood, *The Journal of the American Society of Hematology*, 96 (3), 808-822.
52. Manayi, A., Vazirian, M., Zade, F. H., & Tehranifard, A. (2016). Immunomodulation effect of aqueous extract of the artist's conk medicinal mushroom, *Ganoderma applanatum* (Agaricomycetes), on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 18 (10).
53. Baba, E., Uluköy, G., & Öntaş, C. (2015). Effects of feed supplemented with Lentinula edodes mushroom extract on the immune response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and disease resistance against *Lactococcus garvieae*. *Aquaculture*, 448, 476-482.
54. Amiri, O., Miandare, H. K., Hoseinifar, S. H., Shabni, A., & Safari, R. (2018). Skin mucus protein profile, immune parameters, immune-related gene expression, and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed white button mushroom (*Agaricus bisporus*) powder. *International journal of medicinal mushrooms*, 20 (4).
55. Roy, D., Pal, S., Datta Ray, S., & Homechaudhuri, S. (2019). Evaluating oxidative stress in labeo rohita, infected asypmtomatically with native and invasive aeromonads using biochemical indices. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: *Biological Sciences*, 89 (3), 973-978.
56. Sheikh Vaisi, R., Hedayati, A. A., Bagheri, T., Harnoudeh, A., Hosseini, S. E., & Yavar, M. (2018). The protective effect of Lactobacillus probiotic pretreatment on the gill tissue of common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to iron nanoparticles. Association of Environmental Specialists of Iran, in press.
57. Adineh, H., Naderi, M., Hamidi, M. K., & Harsij, M. (2019). Biofloc technology improves growth, innate immune responses, oxidative status, and resistance to acute stress in common carp (*Cyprinus carpio*) under high stocking density. *Fish & shellfish immunology*, 95, 440-448.
58. Naimi, A., Alizadeh, E., Haafarian, H., & Ahmadi Far, A. (2018). Effect of Selmanax probiotic on growth, hematological and biochemical factors of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Veterinary Research*, 74 (2), 175-185.
59. Abu-Elala, N. M., Younis, N. A., AbuBakr, H. O., Ragaa, N. M., Borges, L. L., & Bonato, M. A. (2018). Efficacy of dietary yeast cell wall supplementation on the nutrition and immune response of Nile tilapia. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44 (4), 333-341.
60. Jami, M. J., Kenari, A. A., Paknejad, H., & Mohseni, M. (2019). Effects of dietary b-glucan, mannan oligosaccharide, *Lactobacillus plantarum* and their combinations on growth performance, immunity and immune related gene expression of Caspian trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877). *Fish & shellfish immunology*, 91, 202-208.
61. Khodadadi, A., Malekinejad, H., & Hosseini, M. S. (2021). Effects of diet supplementation with different level of

Celmanax® (*Saccharomyces cerevisiae* cell wall with Mannan-Oligosaccharides) on health, environmental stress and Yersiniosis in *Oncorhynchus mykiss*. *Iranian Journal of Aquatic Animal Health*, 7 (2), 44-60.

62. Ching, J. J., Shuib, A. S., Abdul Majid, N., & Mohd Taufek, N. (2021). Immunomodulatory activity of β-glucans in fish: Relationship between β-glucan administration parameters and immune response induced. *Aquaculture Research*, 52 (5), 1824-1845.
63. Khanjani, M. H., Ghaedi, G., & Sharifinia, M. (2022). Effects of diets containing β-glucan on survival, growth performance, haematological, immunity and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Aquaculture Research*, 53 (5), 1842-1850.
64. Pickering, A. D., & Pottinger, T. G. (1989). Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish physiology and biochemistry*, 7 (1), 253-258.
65. Bivareh, M. R., & Jafarian, H. (2016). The effect of Imax probiotic on growth performance, feeding efficiency and some biochemical factors of blood serum of common carp fingerlings. *Animal Physiology and Development*, 11 (1), 13-27.
66. Ayoola, S. O., & Uzoamaka, O. O. (2013). Effect of Allium sativum on growth, feed utilization and haematological parameters of *Clarias gariepinus* juvenile. *Afr. J. Livestock Exten*. 12, 1-7.
67. Ahmadifar, E., Akrami, R., Ghelichi, A., & Mohammadi Zarejabad, A. (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 (5), 447-451.
68. Denji, K. A., Mansour, M. R., Akrami, R., Ghobadi, S., Jafarpour, S. A., & Mirbeygi, S. K. (2015). Effect of dietary prebiotic mannan oligosaccharide (MOS) on growth performance, intestinal microflora, body composition, haematological and blood serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 10 (4), 255.