



Original Research Paper

Investigation of the effects of diet supplemented with chitosan as an immune stimulant on some skin mucus and serum immune factors in juvenile Beluga (*Huso huso*)

Arezoo Mahani ¹, Shayan Ghobadi ^{1*}, Mehdi Hoseini Fard ², Reza Changizi ¹, Saber Vatandoust ¹

¹ Department of Aquaculture, Babol branch, Islamic Azad University, Babol, Iran

² Department of Aquatic Animal Health, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran

Key Words

Huso huso
Chitosan
Immune stimulants
Alkaline phosphatase
Liver enzymes

Abstract

Introduction: The effects of dietary supplemented with chitosan was investigated on some growth indices, mucus immunity and blood serum in juvenile Beluga (*Huso huso*).

Materials & Methods: In this study, 240 fish (with an average weight of 60 ± 0.12 g) after two weeks adaptation to experimental conditions, were divided into 4 groups in 3 replicates and then were fed with different levels of chitosan; 0 (control), 5, 10 and 15 g/kg of diet for 8 weeks. At the end of the experiment, Biometrics were performed to determine the performance of growth indices. Also, sampling was done randomly to measure the desired indicators.

Results: The results showed that the highest final weight and final length, weight gain percentage, specific growth rate and lowest feed conversion ratio were present in the diet fed with diet containing 10 g of chitosan per kg of feed, which was significantly different from the control group and other treatments. ($P < 0.05$). The highest activity of mucosal alkaline phosphatase and total protein was observed in the treatments fed with 15 and 10 g of chitosan, respectively, which were significantly different from the control group ($P < 0.05$). Also, the highest and lowest serum glucose and cortisol levels were related to treatments fed with 15 and 10 g chitosan, respectively, which were significantly different from the control group ($P < 0.05$). The highest levels of albumin and total serum protein were observed in the treatments fed with 10 g of chitosan, which were significantly different from the control group ($P < 0.05$). The lowest levels of alanine transaminase and aspartate transaminase were observed in the treatments fed with 10 g of chitosan, which was significantly different from the control group ($P < 0.05$).

Conclusion: Due to the positive effects of chitosan as an immune stimulant, using this substance in the amount of 10 grams per kilogram diet is recommended to promote the health of beluga.

* Corresponding Author's email: shgh_science@yahoo.com

Received: 13 March 2021; Reviewed: 19 April 2021; Revised: 10 June 2021; Accepted: 21 July 2021

(DOI): [10.22034/AEJ.2021.288277.2542](https://doi.org/10.22034/AEJ.2021.288277.2542)

مقاله پژوهشی

تأثیر استفاده از "کیتوزان" به عنوان مکمل غذایی محرک ایمنی بر برخی از فاکتورهای ایمنی مخاط پوست و سرم خون در فیل ماهیان جوان (*Huso huso*)

آرزو مهانی^۱، شایان قبادی^{۱*}، مهدی حسینی فرد^۲، رضا چنگیزی^۱، صابر وطن دوست^۱

^۱ گروه تکثیر و پرورش آبزیان، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران

^۲ گروه بهداشت حیوانات آبزی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران

چکیده

کلمات کلیدی

مقدمه: تأثیر استفاده از کیتوزان در جیره غذایی بر برخی از شاخص های رشد، ایمنی موکوس و سرم خون در فیل ماهیان جوان (*Huso huso*) بررسی شد.

مواد و روش ها: در این پژوهش تعداد ۲۴۰ عدد بچه فیل ماهی (با میانگین وزنی $60 \pm 10/12$ گرم) پس از دو هفته سازگاری با شرایط محیط آزمایشی، در چهار گروه در سه تکرار به مدت ۸ هفته با سطوح مختلف کیتوزان به میزان ۰ (شاهد)، ۵، ۱۰ و ۱۵ گرم به ازای کیلوگرم جیره خشک تغذیه شدند. در پایان دوره زیست سنجی به منظور تعیین عملکرد شاخص های رشد انجام شد. همچنین، نمونه برداری از موکوس و خون جهت سنجش شاخص های مذکور به صورت تصادفی انجام شد.

نتایج: نتایج نشان داد که بیشترین میزان وزن و طول نهایی، درصد افزایش وزن، نرخ رشد ویژه و کمترین میزان ضریب تبدیل غذایی در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰ گرم کیتوزان به ازای کیلوگرم غذا وجود داشت که در مقایسه با گروه شاهد و سایر تیمارها دارای اختلاف معنی دار بود ($P < 0/05$). بیشترین فعالیت آلکالین فسفاتاز و پروتئین کل موکوس به ترتیب در تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی ۱۵ و ۱۰ گرم کیتوزان مشاهده شد که با گروه شاهد اختلاف معنی دار داشتند ($P < 0/05$). همچنین، بیشترین و کمترین میزان گلوکز و کورتیزول سرم خون به ترتیب مربوط به تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی ۱۵ و ۱۰ گرم کیتوزان می شد که با گروه شاهد دارای تفاوت معنی دار بودند ($P < 0/05$). بیشترین میزان آلبومین و پروتئین کل سرم به ترتیب در تیمارهای تغذیه شده با جیره های حاوی ۵ و ۱۰ گرم کیتوزان مشاهده شد که با گروه شاهد اختلاف معنی دار داشتند ($P < 0/05$). کمترین میزان آنزیم های آلانین ترانس آمیناز و آسپارات ترانس آمیناز در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰ گرم کیتوزان مشاهده شد که با گروه شاهد دارای اختلاف معنی دار بود ($P < 0/05$).

بحث و نتیجه گیری: با توجه به اثرات مثبت کیتوزان به عنوان محرک ایمنی افزودن این ماده به میزان ۱۰ گرم در کیلوگرم غذا در جیره فیل ماهی جهت ارتقای سلامت این گونه اقتصادی توصیه می شود.

مقدمه

دستور کار آبی‌پروری قرار گرفته است (۱۱). تاکنون مطالعات زیادی در ارتباط با تأثیر مکمل‌های غذایی مانند ویتامین‌ها، پریبیوتیک‌ها و محرک‌های سیستم ایمنی در فیل ماهی انجام شده است (۱۲، ۱۳، ۱۴). بیش‌تر مطالعات استفاده از کیتوزان در فیل ماهی در ارتباط با اثرات مثبت این ترکیب بر بسته‌بندی و افزایش ماندگاری فیله انجام شده است (۱۵، ۱۶، ۱۷). با توجه به علاقه روزافزون استفاده از کیتوزان به عنوان یک مکمل خوراکی در رژیم غذایی آبزیان، مطالعات بی‌شماری در ارتباط با اثرات مثبت آن در ماهیان و سخت‌پوستان صورت گرفته است (۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲). اما، اطلاعات محدودی در ارتباط با استفاده از این مکمل غذایی به عنوان یک محرک خوراکی در مورد ایمنی و اثرات محافظتی آن در برابر عوامل ایجاد عفونت در فیل ماهی وجود دارد (۲۳، ۲۴، ۲۵). بنابراین، مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر مکمل خوراکی کیتوزان در جیره بر عملکرد رشد، ایمنی موکوس و برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون در فیل ماهی انجام شد.

مواد و روش‌ها

استخراج کیتوزان از اسکلت خارجی میگو: برای تهیه کیتوزان، از اسکلت خارجی میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) استفاده شد. میگوها از صیدگاهی در استان هرمزگان/ شهرستان بندرعباس تهیه و بلافاصله پس از استقرار در یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. کیتوزان موجود در اسکلت آن‌ها براساس روش Hasan و همکاران با کمی تغییرات استخراج شد (۲۶). بدین منظور، پوسته و کاراپاس میگوها جدا و آسیاب شد (عبور محتویات از یک صافی ۲۵۰ میکرونی). ترکیبات معدنی با استفاده از اسیدکلریدریک ۱۰٪ نرمال، به مدت ۶۰ دقیقه در دمای محیط و با نسبت پودر به اسید (w/v) ۱:۲۰ حذف شدند. ترکیبات پروتئینی محصول به دست آمده که ترکیبات معدنی آن در مرحله قبل حذف شد، با استفاده از هیدروکسید سدیم ۵ درصد با نسبت (w/v) ۱:۱۵ به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو (۱۲۱°C/15 psi) حذف شد. پس از حذف ترکیبات رنگدانه‌ای، با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۳۲ درصد به مدت ۲ دقیقه و با نسبت (w/v) ۱:۱۵، پلیمر کیتین به دست آمد. برای تبدیل کیتین به کیتوزان، پلیمر کیتین به دست آمده با محلول هیدروکسید سدیم ۵۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه با نسبت (w/v) ۱:۱۵ اتوکلاو (۱۲۱°C/15 psi) شد. در این مرحله، حذف گروه‌های استیل از روی کیتین و تبدیل آن به کیتوزان انجام شد (۲۷). جهت تهیه کیتوزان با خلوص بیش‌تر، کیتوزان α و β به دست آمده به مدت ۱۲ ساعت در معرض اسید استیک ۱۰ درصد قرار داده شد. با رساندن pH محلول اسیدی به ۱۰ با استفاده از هیدروکسید سدیم ۴۰ درصد، کیتوزان رسوب داده و سپس با سانتریفیوژ با دور

آبی‌پروری یک بخش صنعتی در حال توسعه و گسترش بوده که نیازمند تحقیقات علمی، پیشرفت‌های فنی و نوآوری است. هم‌سو با افزایش رشد در صنعت آبی‌پروری، استرس ناشی از تراکم ماهیان در سیستم‌های پرورشی، سلامت و ایمنی ماهیان را به خطر انداخته و تهدیدی جدی برای آبی‌پروری محسوب می‌گردد. از این‌رو، در سال‌های اخیر استفاده از محرک‌های ایمنی در پرورش ماهیان افزایش یافته به طوری که به عنوان جایگزینی مناسب برای برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها مطرح شده‌اند (۱). کیتوزان به عنوان یک محرک ایمنی مناسب در آبزیان مطرح شده است. در واقع کیتوزان یک پلیمر خطی بوده و دارای گروه‌های فعال آمین و هیدروکسیل می‌باشد و به عنوان فراوان‌ترین پلیمر زیستی بعد از سلولز در جهان مطرح است (۲). این ماده توسط دی‌استیلاسیون قلیایی از کیتین به دست می‌آید (زمانی که درجه استیلاسیون به حدود ۵۰ درصد می‌رسد) و در طبیعت در اسکلت خارجی سخت‌پوستان، حشرات و دیواره سلولی قارچ اسپریلوس وجود دارد. با این حال، بیش‌ترین مقدار نسبی این ماده در پوسته میگو وجود دارد (۳). خواص زیستی کیتوزان شامل: افزایش، تحریک و تعدیل ایمنی (۴، ۵)، تحریک غیراختصاصی سیستم ایمنی علیه آنتی‌ژن‌ها (۶)، ویژگی‌های ضدتوموری (۷)، افزایش رشد و التیام زخم (۸) و آنتی‌اکسیدانی (۹) است. با توجه به مشکلات استفاده از داروهای شیمیایی جهت درمان بیماری‌ها که می‌تواند برای سلامت انسان، حیوانات و محیط زیست پرمخاطره باشد، انجام یک روش پیشگیرانه و سازگار با محیط زیست برای کنترل شیوع بیماری در آبزیان ضروری است. Gopalakannan و Arul، طی یک بررسی در ارتباط با کاربرد کیتین و کیتوزان به عنوان محرک ایمنی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) مشاهده کردند که افزودن این دو محرک ایمنی سبب افزایش رشد و تقویت سیستم ایمنی در کنترل عفونت ناشی از باکتری *Aeromonas hydrophila* شد (۱۰). فیل ماهی (*Huso huso*) از گونه‌های متعلق به خانواده ماهیان خاویاری و بومی دریای خزر است که به عنوان بزرگ‌ترین ماهی آب لب‌شور شناخته شده است. این گونه به دلیل قیمت بالای گوشت و خاویار ارزشمندی که تولید می‌نماید، از گونه‌های مهم تجاری جهان به شمار می‌رود. رشد نسبتاً زیاد، ضریب تبدیل غذایی کم و تحمل شرایط کیفی پایین آب، این ماهی را به عنوان یک گونه پرورشی مهم در صنعت آبی‌پروری مطرح کرده است. ماهی‌گیری بیش از حد، از بین رفتن بسترهای تخم‌ریزی و آلودگی محیط زیست، سبب کاهش فراوانی آن شده و به عنوان گونه در معرض خطر انقراض معرفی شده است. لذا، جهت جلوگیری از انقراض و نابودی نسل این گونه مهم اقتصادی، شیوه پرورش آن در اسارت و تکثیر مصنوعی آن در

سانتی گراد، pH ۷-۸/۵، سختی ۴۲۳ ppm و اکسیژن محلول ۸ میلی گرم در لیتر تا حد امکان در حدود ثابت نگهداری شد.

شاخص های رشد: برای این منظور، تغذیه ماهیان به مدت ۲۴

ساعت متوقف شد. کل بچه ماهیان از هر تکرار نمونه گیری شدند و پس از خشک کردن آن ها از آب اطراف بدن طول کل با استفاده از خط کش (با دقت ۱ میلی متر) و وزن کل با استفاده از ترازو (با دقت ۱ میلی گرم) اندازه گیری گردید. شاخص های رشد تعیین شده عبارتند از: [(گرم/وزن اولیه بدن - (گرم) وزن نهایی بدن)] = (گرم) افزایش وزن بدن (۳۱) = (روز/درصد وزنی) نرخ رشد ویژه (۳۲)

۱۰۰ × [طول دوره پرورش بر حسب روز / (لگاریتم طبیعی وزن اولیه بدن - لگاریتم طبیعی وزن نهایی بدن)]

[(گرم) افزایش وزن / (گرم) مقدار غذای مصرف شده] = ضریب تبدیل غذایی ۱۰۰ × (تعداد اولیه ماهی / تعداد نهایی ماهی) = (٪) میزان بازماندگی (۳۳)

شاخص های ایمنی موکوس و سرم

جمع آوری موکوس: غذادهی ماهیان در انتهای آزمایش و ۲۴

ساعت قبل از نمونه گیری، متوقف شده و جمع آوری موکوس بر اساس روش Ross و همکاران (۳۴) و با اعمال کمی تغییرات انجام شد. از هر تانک به طور تصادفی تعداد ۵ عدد ماهی انتخاب شده و به کیسه های پلاستیکی زیپ دار حاوی ۱۰ میلی لیتر کلرید سدیم ۵۰ میلی مولار منتقل شدند. پس از دو دقیقه، موکوس موجود روی بدن هر ماهی با استفاده از قاشک استریل جمع آوری شد. موکوس های جمع آوری شده به مدت ۱۰ دقیقه در تیوب های استریل و با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. سپس، فاز فوقانی مخلوط جمع آوری شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد تا زمان انجام مراحل بعدی آزمایش نگهداری شد.

خون گیری از ماهیان و جمع آوری سرم: در انتهای آزمایش،

تغذیه ۲۴ ساعت قبل از نمونه گیری متوقف شد؛ سپس تعداد ۵ عدد ماهی از ماهیان باقی مانده در تانک (از ماهیانی که موکوس گرفته شد استفاده نشد) به طور تصادفی از هر تیمار انتخاب شده و بلافاصله با استفاده از پودر گل میخک (۱۵۰ میلی گرم به ازای هر لیتر آب تازه فاقد کلر) بی هوش شدند. خون گیری از ساقه دمی ماهیان انجام شد. نمونه های خونی طی دو ساعت جمع آوری شده و در طی این مدت در تیوب های حاوی ماده ضد انعقاد خون نگهداری شدند. نمونه های خونی در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس فاز فوقانی جدا شده پس از انتقال به تیوب های جدید، تا زمان انجام آزمون های مربوطه در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سنجش تمامی شاخص های مربوط به ایمنی موکوس و سرم در آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل انجام شد.

۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه جدا گردید. در انتهای هر مرحله مواد باقی مانده روی کاغذ فیلتر (واتمن شماره ۳) صاف شد، سپس با آب مقطر برای رسیدن به pH خنثی شست و شو و در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد خشک و سپس توزین شد (۲۸، ۲۹).

نگهداری ماهیان و تیمار بندی: تعداد ۲۴۰ عدد فیل ماهی جوان

سالم با میانگین وزنی ۱۲/۱۰±۰/۶۰ گرم از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری واقع در شهرستان ساری خریداری و به منظور سازگاری با شرایط آزمایشگاهی سالن آبی پروری دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل و دستکاری های بعدی، به مدت ۲ هفته در شرایط نرمال تعیین شده توسط دستورالعمل سالن آبی پروری دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل نگهداری شدند (دما ۲۰±۲ درجه سانتی گراد، pH ۷-۸/۵، سختی ۴۲۳ ppm و اکسیژن محلول ۸ میلی گرم در لیتر). در طی زمان سازگاری، ماهیان با غذای تجاری بیومار تغذیه شدند که ترکیبات تقریبی آن در جدول ۱ آورده شده است. پس از گذشت مدت زمان لازم جهت سازگاری با محیط، ماهیان تحت ۴ تیمار و ۳ تکرار در ۱۲ تانک به طور تصادفی توزیع شدند (۲۰ قطعه در هر تانک). کیتوزان تحت ۳ تیمار به میزان ۵، ۱۰ و ۱۵ گرم به ازای کیلوگرم جیره به جیره بیومار اضافه گردید. جیره غذایی پایه (بدون افزودن کیتوزان) نیز، به عنوان جیره گروه شاهد در نظر گرفته شد.

جدول ۱: ترکیب تقریبی جیره غذایی پایه

ترکیب تقریبی جیره	
پروتئین خام (٪)	۵۴
کربوهیدرات (٪)	۱۳/۵
چربی خام (٪)	۱۷
خاکستر (٪)	۱۰/۴
فیبر خام (٪)	۱/۲
فسفر کل (٪)	۱/۴۲
پروتئین قابل هضم (٪)	۲۴/۹
انرژی قابل هضم (کیلوکالری بر کیلوگرم)	۱۹/۳
انرژی خالص (کیلوکالری بر کیلوگرم)	۲۲/۲
کلسیم (٪)	۲/۳۳
سدیم (٪)	۰/۶۶
آنتی اکسیدان (میلی گرم در کیلوگرم)	۵۳

ماهیان روزانه و به مدت ۸ هفته به میزان ۲-۴ درصد وزن بدن به طور مرتب در چهار نوبت در شبانه روز در ساعت های ۸، ۱۳، ۱۹ و ۲۲ با جیره غذایی آزمایشی تغذیه شدند (۳۰). هم چنین، تعویض آب مخازن با آب تازه کلرزدایی شده در هر روز به میزان کامل (۱۰۰ درصد) و به طور مکانیزه با دبی ورودی ۲ لیتر در ثانیه انجام شد. میانگین پارامترهای فیزیوشیمیایی آب شامل: دما ۲۰±۲ درجه

برای این منظور، با توجه به دستورالعمل پیشنهادی هر کیت توسط شرکت سازنده، برای سنجش آنزیم ALT و AST از روش IFCC (فدراسیون بین‌المللی شیمی بالینی و طب آزمایشگاهی) استفاده شد. سپس، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۳۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید (۳۸).

آنالیز آماری: این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی تحت ۴ تیمار و ۳ تکرار انجام شد. برای تجزیه و تحلیل کلیه داده‌ها، از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و برای رسم نمودارها از برنامه اکسل ۲۰۱۳ استفاده شد. جهت حصول اطمینان از نرمال بودن داده‌ها از آزمون Kolmogorov-Smirnov استفاده شد و در صورت نرمال بودن توزیع، داده‌ها با استفاده از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) در سطح اطمینان ۹۵ درصد، ابتدا اختلاف کلی بین میانگین‌ها مشخص شد و سپس با پس‌آزمون دانکن گروه‌ها از یکدیگر تفکیک گردیدند. سطح معنی‌داری برای تمام محاسبات $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

سنجش شاخص‌های رشد: برخی از شاخص‌های رشد در فیل ماهیان جوان تغذیه شده با سطوح مختلف کیتوزان به‌عنوان محرک ایمنی در جدول ۲ نشان داده شده است. براساس نتایج به‌دست آمده مشخص گردید که بیش‌ترین میزان وزن و طول نهایی، درصد افزایش وزن، نرخ رشد ویژه و کم‌ترین میزان ضریب تبدیل غذایی در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰ گرم کیتوزان به‌ازای کیلوگرم غذا وجود داشت که در مقایسه با گروه شاهد و سایر تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

سنجش میزان آلکالین فسفاتاز (ALP) موکوس: فعالیت

آلکالین فسفاتاز موکوس طبق دستورالعمل موجود روی بسته کیت شرکت پارس آزمون (ساخت تهران - ایران) ارزیابی شد. نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

سنجش میزان پروتئین کل (TP) موکوس و سرم: پروتئین

کل موکوس و سرم با استفاده از روش Lowry و همکاران ارزیابی شد (۳۵)؛ بدین‌منظور از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان استاندارد استفاده شد و میزان جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد.

سنجش میزان آلبومین سرم: جهت تعیین غلظت آلبومین سرم

با استفاده از کیت تجاری زیست شیمی ساخت ایران و بر اساس دستورالعمل پیشنهاد شده توسط شرکت سازنده (براساس واحد گرم بر دسی‌لیتر) تعیین گردید. مقدار آلبومین با روش Bromocresol green binding اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه این روش شامل واکنش آلبومین با برموکروزول گرین در شرایط اسیدی و تشکیل کمپلکس سبز مایل به آبی است که شدت رنگ آن متناسب با غلظت آلبومین موجود در نمونه است که در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۳۶).

سنجش میزان کورتیزول و گلوکز سرم: سنجش کورتیزول

استفاده از کیت Monobind Inc (ساخت آمریکا/نیویورک) و براساس دستورالعمل پیشنهاد شده توسط شرکت سازنده با استفاده از دستگاه الیزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر و برحسب نانوگرم بر میلی‌لیتر و گلوکز با روش آنزیمی گلوکز-هگزوکیناز (ساخت شرکت Sigma Aldrich آلمان/دارمشتات) برحسب میلی‌گرم در دسی‌لیتر انجام شد (۳۷).

سنجش میزان آسپاراتات ترانس آمیناز و آلانین ترانس

آمیناز (ALT/AST) سرم: جهت سنجش آنزیم‌های کبدی سرم، از کیت‌های آنزیمی شرکت پارس آزمون ساخت ایران استفاده گردید.

جدول ۲: برخی از شاخص‌های رشد در فیل ماهیان جوان تغذیه شده با سطوح مختلف کیتوزان به‌عنوان محرک ایمنی در جیره غذایی به مدت ۸ هفته.

سطوح متفاوت کیتوزان (گرم بر کیلوگرم غذا)				شاخص‌های رشد
۱۵	۱۰	۵	۰ (شاهد)	
۵۶/۶۷±۰/۶۷ ^a	۵۴/۰۰±۰/۵۸ ^a	۵۴/۳۳±۰/۳۳ ^a	۵۵/۶۷±۰/۳۳ ^a	وزن اولیه (گرم)
۱۹۰/۳۳±۱/۴۵ ^c	۲۱۹/۳۳±۰/۶۷ ^a	۱۴۴/۶۷±۰/۳۳ ^d	۱۹۸/۳۳±۱/۶۷ ^{cb}	وزن نهایی (گرم)
۲۳/۶۷±۰/۳۳ ^a	۲۴/۶۷±۰/۳۳ ^a	۲۴/۰۰±۰/۰۰ ^a	۲۴/۰۰±۰/۰۰ ^a	طول اولیه (سانتی‌متر)
۳۲/۶۷±۰/۳۳ ^c	۴۱/۰۰±۰/۰۰ ^a	۳۳/۰۰±۰/۵۸ ^c	۳۸/۰۰±۰/۵۸ ^b	طول نهایی (سانتی‌متر)
۲۲۴/۵۲±۴/۶۴ ^b	۲۴۲/۷۸±۴/۰۲ ^a	۱۶۶/۲۷±۱/۴۲ ^c	۲۳۲/۴۴±۴/۰۷ ^{ab}	درصد افزایش وزن بدن (درصد)
۰/۹۸±۰/۰۱ ^b	۱/۱۳±۰/۰۱ ^a	۰/۸۵±۰/۰۰ ^c	۱/۰۰±۰/۰۱ ^{ab}	نرخ رشد ویژه (درصد وزنی/روز)
۱/۲۵±۰/۰۳ ^b	۱/۱۵±۰/۰۳ ^c	۱/۶۸±۰/۰۱ ^a	۱/۲۱±۰/۰۳ ^{bc}	ضریب تبدیل غذایی
۱۰۰/۰±۰/۰ ^a	۱۰۰/۰±۰/۰ ^a	۱۰۰/۰±۰/۰ ^a	۱۰۰/۰±۰/۰ ^a	درصد بازماندگی (%)

* حروف مشابه در هر ردیف، نشان‌دهنده عدم وجود معنی‌داری بین تیمارهای مختلف در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

شاخص‌های ایمنی موکوس: براساس نتایج حاصله (جدول ۳)

مشخص شد که بیش‌ترین میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز موکوس در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۱۵ گرم کیتوزان در کیلوگرم جیره مشاهده شد که با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). اما، بین تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی ۵ و ۱۰ گرم کیتوزان

به‌ازای کیلوگرم جیره و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$)؛ هم‌چنین، کم‌ترین و بیش‌ترین میزان پروتئین کل به ترتیب در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۵ و ۱۰ گرم کیتوزان مشاهده شد که با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند ($P < 0.05$).

جدول ۳: برخی از شاخص‌های ایمنی موکوس در فیل ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی سطوح مختلف کیتوزان به مدت ۸ هفته

سطوح مختلف کیتوزان (گرم بر کیلوگرم جیره)				شاخص‌های ایمنی موکوس
۱۵	۱۰	۵	۰ (گروه شاهد)	
29.70 ± 3.81^a	22.73 ± 2.54^{ab}	22.73 ± 5.43^{ab}	20.53 ± 1.27^b	آلکالین فسفاتاز (واحد در لیتر)
7.33 ± 2.61^b	9.82 ± 3.48^a	4.61 ± 0.97^d	6.43 ± 1.29^c	پروتئین کل (گرم در دسی لیتر)

* حروف مشابه در هر ردیف، نشان‌دهنده عدم وجود معنی‌داری بین تیمارهای مختلف در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون: همان‌طور که در جدول

۴ مشاهده می‌گردد، بیش‌ترین میزان گلوکز خون در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی میزان ۱۵ گرم کیتوزان وجود داشت که با گروه شاهد و سایر تیمارها دارای تفاوت معنی‌دار بود ($P < 0.05$). با این حال، کم‌ترین میزان پروتئین کل در این تیمار مشاهده گردید که دارای تفاوت معنی‌دار با سایر تیمارها و گروه شاهد بود ($P < 0.05$) و بیش‌ترین میزان پروتئین کل به‌ترتیب در تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی ۱۰ و ۵۰ گرم کیتوزان مشاهده شد که با گروه شاهد دارای تفاوت معنی‌دار بودند ($P < 0.05$). هم‌چنین، کم‌ترین و بیش‌ترین میزان کورتیزول به‌ترتیب در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰ و ۱۵ گرم کیتوزان مشاهده که با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار

بودند ($P < 0.05$). به‌علاوه، تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی ۱۰ و ۵ گرم کیتوزان به‌ترتیب دارای بیش‌ترین میزان آلبومین سرم خون بودند که با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند ($P < 0.05$). کم‌ترین میزان آسپارات ترانس آمیناز در تیمار تغذیه شده با جیره ۵ گرم کیتوزان مشاهده شد که با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P < 0.05$). اگرچه، بیش‌ترین میزان این آنزیم در تیمار تغذیه شده با میزان ۱۵ گرم کیتوزان مشاهده شد، اما بین گروه شاهد و این تیمار اختلاف معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). بیش‌ترین میزان آلانین ترانس آمیناز نیز، در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۱۵ گرم کیتوزان مشاهده شد که با گروه شاهد دارای تفاوت معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

جدول ۴: برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون در فیل ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف کیتوزان به‌عنوان محرک ایمنی در جیره غذایی به مدت ۸ هفته

سطوح مختلف کیتوزان (گرم بر کیلوگرم جیره)				شاخص‌های بیوشیمیایی سرم
۱۵	۱۰	۵	۰ (گروه شاهد)	
60.00 ± 11.00^a	30.33 ± 21.08^c	38.67 ± 31.51^b	41.00 ± 21.00^b	گلوکز (میلی گرم در دسی لیتر)
11.02 ± 0.07^c	11.63 ± 0.05^a	11.58 ± 0.05^a	11.32 ± 0.11^b	پروتئین کل (گرم در دسی لیتر)
74.00 ± 3.60^a	46.00 ± 11.15^c	51.00 ± 11.15^{bc}	58.67 ± 21.60^b	کورتیزول (نانوگرم در میلی لیتر)
0.57 ± 0.05^b	0.69 ± 0.04^a	0.70 ± 0.08^a	0.59 ± 0.04^b	آلبومین (گرم در دسی لیتر)
293.33 ± 15.53^a	260.33 ± 15.70^{ab}	231 ± 17.78^b	279.33 ± 28.50^a	آسپارات ترانس آمیناز (واحد در لیتر)
28.00 ± 3.00^a	17.00 ± 11.00^b	17.66 ± 11.53^b	19.00 ± 21.65^b	آلانین ترانس آمیناز (واحد در لیتر)

* حروف مشابه در هر ردیف، نشان‌دهنده عدم وجود معنی‌داری بین تیمارهای مختلف در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

بحث

یکی از محرک‌های ایمنی مهم که تاکنون برای تقویت سیستم ایمنی آبزیان مورد استفاده قرار گرفته است، کیتوزان می‌باشد که

پلیمری خطی از گلوکز آمین است (۳۹). بسیاری از پژوهشگران تأثیر استفاده از این ماده را بر افزایش پاسخ‌های ایمنی گونه‌های مختلفی از آبزیان، مورد بررسی قرار داده‌اند (۴۰، ۴۱، ۴۲، ۴۳). در تحقیق حاضر، استفاده از ۱۰ گرم کیتوزان در کیلوگرم غذا دارای بهترین

عملکرد در شاخص‌های رشد فیل ماهیان جوان بود. بهبود مقاومت ماهیان و همچنین افزایش رشد و بازماندگی آن‌ها از اهمیت به‌سزایی برخوردار است که می‌توان با تجویز خوراکی افزودنی‌ها این مهم را تحقق بخشید، برای این منظور از ترکیبات مناسبی مانند کیتوزان در تغذیه آبیان استفاده می‌گردد (۴۴). به‌عنوان مثال Chen و Chen در تحقیقی در ارتباط با استفاده از کیتوزان به‌صورت خوراکی در جیره غذایی لوچ ماهی (*Misgurnus anguillicadatus*) بیان کردند که استفاده از کیتوزان به‌عنوان یک محرک ایمنی سبب بهبود شاخص‌های رشد، تقویت سیستم ایمنی غیراختصاصی و ارتقای سلامت ماهیان گردید (۴۵). Kamali و همکاران با بررسی تأثیر کیتوزان بر شاخص تغذیه‌ای بچه‌ماهیان سفید (*Rutilus frisii kutum*) نتیجه گرفت که بهترین و کم‌ترین ضریب تبدیل غذایی در ماهیانی که با جیره حاوی ۱ گرم کیتوزان در کیلوگرم غذا تغذیه شده بودند، مشاهده شد (۱۸). با این حال، جیره غذایی حاوی کیتوزان روی رشد بچه‌ماهیان سفید اثری نداشت که این نتایج با نتایج حاصل از این تحقیق هم‌خوانی نداشت. Mohan و همکاران، پس از بررسی عملکرد کیتین در رژیم غذایی قزل‌آلای برفی (*Schizothorax richardsonii*) و کپور طلایی (*Tor putitora*) بیان کردند که ضریب تبدیل غذایی به‌طور قابل توجهی در ماهیان قزل‌آلای برفی تغذیه شده با مکمل کیتین در مقایسه با گروه شاهد بهتر بود (۴۶) که این نتایج مشابه با نتایج حاصل از تحقیق حاضر بود. همچنین درصد بقاء در گروه شاهد ماهیان کپور طلایی با گروه تغذیه شده با مکمل کیتین اختلاف معنی‌داری نداشت که مطابق با نتایج حاصل از تحقیق حاضر است. Geng و همکاران، پس از بررسی اثرات جیره غذایی دارای ترکیبی از *Basilus subtilis* و کیتوزان برای رشد و مقاومت سوکلا ماهیان (*Rachycentro canadum*) در برابر بیماری *Vibrio harveyi* بیان کردند که میزان ۱ گرم باکتری در کیلوگرم غذا و ۶ گرم کیتوزان در کیلوگرم غذا دارای بهترین عملکرد رشد و ایمنی بود که بهبود رشد در این تحقیق در ارتباط با تأثیر کیتوزان به‌عنوان محرک رشد و ایمنی (۴۷) با نتایج حاصل از این تحقیق هم‌خوانی داشت. در آبی‌پروری یکی از مهم‌ترین عوامل نشان دهنده بازده اقتصادی، ضریب تبدیل غذایی می‌باشد (۴۸). زیرا ضریب تبدیل غذایی مناسب، علاوه بر کاهش هزینه‌های مربوط به غذا که بین ۷۰-۶۰ درصد هزینه‌ها را شامل می‌شود، از آلودگی‌های ثانویه آب محیط پرورش و کاهش پارامترهای کیفی آن جلوگیری خواهد کرد. با افزایش وزن ماهیان مقدار تغذیه و متناسب با آن ضریب تبدیل غذایی نیز افزایش می‌یابد. در این مطالعه حداقل مقدار این فاکتور در تیمار ۱۰ گرم کیتوزان بر کیلوگرم جیره مشاهده گردید. محرک ایمنی کیتوزان که می‌تواند به‌عنوان یک پریبیوتیک نیز تلقی شود، احتمالاً از طریق متعادل ساختن فلور طبیعی روده، همچنین با از بین بردن

یا کاهش تراکم باکتری‌های بیماری‌زای موجود در دستگاه گوارش سبب افزایش جمعیت باکتری‌های مفید روده شده که در نهایت تقویت سیستم ایمنی بدن را سبب گردید و در مجموع توانست وضعیت سلامت ماهیان را بهبود بخشد. به‌علاوه ممکن است با افزایش کارایی هضم و جذب غذا در دستگاه گوارش، منجر به بهبود عملکرد رشد و تغذیه گردد (۴۹). با این حال، این تحقیق با نتایج حاصل از پژوهش Shiau و Yu مبنی بر این که محرک ایمنی کیتوزان و کیتین بدون در نظر گرفتن سطح در جیره غذایی ماهی تیلاپیا باعث کاهش رشد شده است (۵۰)، هم‌خوانی ندارد. در مجموع اختلاف موجود در این تحقیق با نتایج مطالعات دیگر را شاید بتوان به نوع گونه پرورشی، سن، اندازه، طول دوره پرورش، شرایط محیطی، رفتارهای تغذیه‌ای، خصوصیات فیزیولوژیک، نوع و مقدار کیتوزان به کار رفته در جیره وابسته دانست (۴۹). در تحقیق حاضر، بقاء برای تمامی تیمارها ۱۰۰ درصد ثبت شد. با توجه به این که بقاء تحت تأثیر فاکتورهای مانند فاکتورهای محیطی و تغذیه‌ای است، به‌نظر می‌رسد جیره غذایی بالانس شده و شرایط محیطی (شرایط کیفی آب) توانسته نیازهای ماهی مورد آزمایش را تأمین کند. در این پژوهش، برخی از شاخص‌های ایمنی موکوس و سرم خون فیل ماهیان جوان تغذیه شده با سطوح متفاوت کیتوزان در جیره غذایی مورد ارزیابی قرار گرفت. حضور و میزان فعالیت شاخص‌های ایمنی موکوس به شرایط محیطی و گونه ماهی نیز بستگی دارد (۵۱). براساس نتایج حاصل از جدول ۳ مشاهده گردید که تیمار تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۱۵ گرم کیتوزان به‌ازای کیلوگرم جیره دارای بیش‌ترین میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز موکوس در مقایسه با سایر تیمارها بود و بیش‌ترین میزان پروتئین کل موکوس در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰ گرم کیتوزان به‌ازای کیلوگرم جیره مشاهده شد. آلکالین فسفاتاز نقش به‌سزایی در مقابله با عوامل استرس‌زا و بهبود ایمنی به‌عنوان اولین پاسخ ایمنی ایفا می‌نماید. بنابراین، فعالیت آن به‌عنوان یک شاخص بالقوه استرس در موکوس ماهیان تلقی می‌گردد (۵۲). در واقع، ترشح زیاد ALP مخاط در تحقیق حاضر در کنار افزایش سایر شاخص‌های سرم (آنزیم‌های کبدی AST و ALT، کورتیزول و میزان گلوکز سرم) نشان‌دهنده این امر است که میزان بالای کیتوزان نسبت به وزن بدن در این تیمار به‌عنوان یک عامل استرس‌زا عمل کرده است و این افزایش می‌تواند ناشی از مصرف نامتناسب کیتوزان نسبت به وزن ماهی باشد، البته این تحلیل با توجه به افزایش آنزیم‌های کبدی AST و ALT، کورتیزول و میزان گلوکز سرم خون در این تیمار نیز می‌تواند توجیه شود و اگر شاخص‌های سرم نیز، این افزایش را نشان نمی‌دادند، افزایش سطح آلکالین فسفاتاز موکوس نیز می‌توانست یک عامل القای ایمنی ذاتی مخاطی محسوب گردد. افزایش پروتئین کل موکوس در تیمار ۱۰ گرم کیتوزان نشان‌دهنده افزایش پاسخ

ایمنی این تیمار در نتیجه استفاده از محرک ایمنی است. از آن جایی که موکوس اولین خط دفاعی بدن است، افزایش میزان پروتئین کل موکوس ممکن است نوعی ایمنی القایی باشد که بدن را در برابر عوامل بیماری زا مقاوم سازد. Cha و همکاران بیان کردند که استفاده از ۱٪ کیتوزان سبب افزایش میزان پروتئین کل سرم و موکوس در کفشک ماهی زیتونی شد (۵۳) که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. در واقع افزایش پروتئین کل در موکوس نوعی افزایش در ترکیبات پروتئینی مانند لیپوزیم است (۵۴، ۵۵، ۵۶). البته نتیجه این تحقیق در ارتباط با افزایش پروتئین کل موکوس در میزان ۱۵ گرم کیتوزان به ازای کیلوگرم غذا با نتایج حاصل از تحقیقات Akbari و Younesi در ماهی کفال خاکستری (۲۰) هم خوانی ندارد که این تفاوت با توجه به تفاوت به گونه و نوع حساسیت آن ها به محرک ها توجیه می گردد. بررسی شاخص های ایمنی سرم وسیله مناسبی جهت سنجش وضعیت سلامتی ماهیان می باشد. بررسی این شاخص ها نه تنها برای بررسی وضعیت سلامت ماهی، بلکه برای بررسی احتمالی برخی از مواد ضد تغذیه ای حائز اهمیت می باشد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بیشترین میزان آلبومین و پروتئین کل سرم در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰ گرم کیتوزان بوده که علی رغم نداشتن اختلاف معنی دار با تیمار ۵ گرم کیتوزان، با تیمار شاهد و تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۱۵ گرم کیتوزان دارای اختلاف معنی دار بود. نتایج این تحقیق با نتایج حاصل از تحقیقات Akbari و Younesi در ارتباط با استفاده از ۱۰ و ۱۵ گرم کیتوزان در ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) (۲۰)، Cha و همکاران استفاده از ۱٪ کیتوزان در کفشک ماهی زیتونی (*Paralichthys olivaceus*) (۵۳) و Harikrishnan و همکاران، استفاده از ۱ و ۲٪ کیتوزان در هامور ماهی صخره ای (*Epinephelus coioides*) مطابقت داشت (۵). آلبومین نقش مهمی در ثبات تنظیم اسمزی به منظور توزیع مناسب مایعات بدن داشته و به عنوان حامل پلاسما و لیگاندهای غیر اختصاصی (به همراه تعدادی جایگاه های اتصال) عمل می نماید. افزایش آلبومین سرم خون ماهیان تیمار شده با ۱۰ گرم کیتوزان در تحقیق حاضر را می توان نتیجه پاسخ به افزایش انتقال اسیدهای چرب از بافت ها جهت انجام فعالیت اکسیداسیون دانست که سبب ساخت بیش تر پروتئین و صرفه جویی در مصرف آن توسط پتاکسیداسیون اسیدهای چرب شده است (۲۰، ۵۷، ۵۳). افزایش میزان پروتئین کل سرم در تیمارهای تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۱۰ گرم کیتوزان، هم راستا با نتایج حاصل از تحقیقات Harikrishnan و همکاران در ارتباط با تغذیه ماهی *Epinephelus bruneus* با کیتین و کیتوزان با سطح ۱٪ می باشد (۵). آن ها بیان کردند که افزایش سطح پروتئین کل و میلوپروکسیداز سرم می تواند در نتیجه افزایش چشمگیر سطوح فعالیت عوامل ضد پروتئاز در

نتیجه مصرف محرک های ایمنی باشد. در واقع کیتوزان نوعی محرک ایمنی تلقی شده که زمانی که با غلظت مناسب تجویز شد، القای ایمنی را سبب شد (۵۸، ۵۹). به طور کلی، عوامل ضد پروتئاز در تحت تاثیر محرک های ایمنی با ترشح آنزیم های پروتئولیتیک نقش دفاعی در برابر عوامل بیماری زا ایفا می کنند و سبب افزایش میزان پروتئین کل می شوند (۶۰). تحقیقات Rao و Chakrabarti، در ارتباط با استفاده از *Achyranthes aspera* به عنوان محرک ایمنی در افزایش سطح عوامل ضد پروتئاز در ماهی کاتلا (*Catla catla*) (۶۱) موید این نتایج می باشد. به طور کلی، حضور پپتیدهای مختلف نظیر لیپوزیم، آنتی بادی، عوامل کمپلمان و عوامل دیگر لیتیک در سرم خون تحت عنوان پروتئین کل به عنوان خط اولیه دفاعی نقش مهمی در پیش گیری از بیماری های عفونی و تقویت سیستم ایمنی غیر اختصاصی دارد (۶۲). با این حال، مشاهده گردید که در جیره حاوی میزان ۱۵ گرم کیتوزان به ازای کیلوگرم جیره میزان پروتئین کل و آلبومین کاهش یافت. کاهش در پروتئین کل نشان دهنده افزایش تجمع ذخایر پروتئین برای انطباق با شرایط تنش زا است. سوء تغذیه، ایجاد استرس، کاهش بهره وری کبد در سنتز پروتئین و کاهش جذب مواد غذایی به ویژه پروتئین در دستگاه گوارش ممکن است از عوامل مهم در کاهش پروتئین کل پلاسما باشد (۶۳). میزان نامتناسب یک ماده افزودنی ممکن است بتواند با اعمال اثرات منفی روی اسیدهای آمینه و تغییر ماهیت آن ها، روی ساختار پروتئین و یا عملکرد آن ها اثر بگذارد (۶۴) و یا موجب شکسته شدن پروتئین ها گردد (۶۵). در تحقیق حاضر، کاهش سطح آلبومین ممکن است با کاهش پروتئین پلاسما در ارتباط باشد. ممکن است سطح بالای کیتوزان نسبت به وزن ماهی در بیوسنتز آلبومین در کبد و عملکرد آن خللی ایجاد کرده باشد (۶۶، ۶۷). با این وجود مشاهده گردید که تجویز مناسب این محرک ایمنی نسبت به وزن ماهیان (۵ و ۱۰ گرم کیتوزان) تاثیر مثبتی بر شاخص های بیوشیمیایی سرم خون داشت. آنزیم های کبدی آلانین ترانس آمیناز و آسپارات ترانس آمیناز از جمله فاکتورهای شیمیایی مهم می باشند که سنجش آن ها به عنوان یک شاخص آزمایشگاهی استاندارد جهت بررسی اختلالات کبدی در موجودات به کار می رود (۶۸). این دو آنزیم کبدی هنگام ایجاد عارضه از بافت های مختلف مانند عضلات، استخوان و قلب خارج می گردند. به عبارت دیگر، افزایش معنی دار این دو آنزیم ممکن است در نتیجه نشت از بافت های مختلف و اجماع اثر آن ها باشد. آنزیم آلانین ترانس آمیناز در سیتوپلاسم سلول های کبدی زیاد بوده و هنگام آسیب، با عبور از غشای سلولی وارد جریان خون شده و به عنوان شناساگر اختصاصی آسیب های کبدی شناخته می شود (۶۹). با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر، بیشترین میزان این دو آنزیم در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی

۱۵ گرم کیتوزان مشاهده شد که تنها در ارتباط با آنزیم آلانین ترانس آمیناز با تیمار شاهد دارای اختلاف معنی دار بود. ممکن است استفاده از میزان بالای کیتوزان نسبت به وزن بدن در این تیمار به سلول ها و بافت کبد به طور خفیف آسیب رسانده باشد و مانند یک سم خفیف عمل کرده باشد (۷۰، ۷۱). بنابراین، این امر که افزایش میزان این دو آنزیم در سرم خون ماهیان این تیمار آزمایشی به دلیل ایجاد آسیب های کبدی خفیف است می تواند توجیه شود، چرا که همان طور که قبلاً گفته شد افزایش معنی دار ALP موکوس، افزایش میزان کورتیزول و گلوکز در کنار افزایش AST و ALT در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۱۵ گرم کیتوزان به ازای کیلوگرم جیره در مقایسه با گروه شاهد و سایر تیمارها، نشان از ایجاد شرایط استرسی در این تیمار و تلاش برای مقابله با آن را دارد. این تغییرات در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰ و ۵ گرم کیتوزان با گروه شاهد اختلاف زیادی نداشت. تجویز کیتوزان در میزان مناسب (۵ و ۱۰ گرم) در این تحقیق هم سو با نتایج حاصل از تحقیق Fadl و همکاران (۷) می باشد. آن ها بیان کردند که استفاده از کیتوزان به میزان ۳ و ۵ گرم به ازای کیلوگرم جیره سبب ایجاد تفاوت معنی داری در میزان AST و ALT در مقایسه با گروه شاهد نشد. Abd El-Naby و همکاران (۷۳) گزارش کردند که ماهیان تیلاپای نیل تغذیه شده با جیره حاوی کیتوزان در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی داری آنزیم های کبدی AST و ALT کمتری در جریان خون داشتند. کورتیزول یک کورتیکو استروئید و از مهم ترین عوامل هورمونی موثر در ارزیابی پاسخ های فیزیولوژیکی ماهیان در برابر تغییرات شرایط محیطی، عوامل تغذیه ای و استرس ها می باشد (۷۴). تحقیقات ثابت کرده است که افزایش میزان کورتیزول و گلوکز در یک راستا بوده و با یکدیگر رابطه مستقیم دارند (۷۵). در شرایط استرس و یا شرایط نامساعد (داخلی و خارجی) کورتیزول با ورود به جریان خون سبب می شود ماهی با انجام واکنش های بیوشیمیایی گلیکوژنولیز، گلیکوژن بافت را به گلوکز تبدیل کرده و پس از ورود به جریان خون، انرژی مورد نیاز سلول ها طی فرآیند استرس فراهم شود (۷۶). در واقع، کورتیزول و گلوکز با یکدیگر دارای رابطه همبستگی بوده و بدن پس از دریافت میزان بالای کورتیزول در شرایط استرس، با گلوکولیز گلیکوژن گلوکز مورد نیاز سلول ها را که نوعی منبع انرژی است، تامین می نماید. در پژوهش حاضر، کمترین میزان کورتیزول در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰ گرم کیتوزان بود که با تیمار ۵ گرم کیتوزان دارای اختلاف معنی دار نبود و بیشترین میزان آن در تیمار ۱۵ گرم کیتوزان مشاهده شد. ممکن است بدن در حالت مواجهه با مقدار زیاد کیتوزان برای مقابله با استرس ها کورتیزول را داخل شریان خون سرازیر کرده باشد که با توجه به مکانیسم گفته شده نیز،

میزان گلوکز خون افزایش یافته باشد. کاهش میزان کورتیزول به معنی کاهش اعمال اثرات استرس و بهبود فعالیت لنفوسیت ها می باشد (۷۷). Luo و همکاران، بیان کردند که استفاده از کیتوزان الیگوساکارید با میزان ۶۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره ماهی قزل آلا رنگین کمان سبب کاهش میزان کورتیزول و گلوکز در این گونه شد که این کاهش میزان را به کاهش میزان استرس در این گروه نسبت داد (۷۸). این نتایج موید نتایج تحقیق حاضر در ارتباط با گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰ گرم کیتوزان به ازای کیلوگرم جیره می باشد. همان طور که گفته شد، گلوکز یکی از فاکتورهای بیوشیمیایی خون است که به عنوان یکی از شاخص های مهم در تعیین وضعیت فیزیولوژیک ماهی شناخته می شود. با افزایش مصرف گلوکز و متابولیت های دیگر در برخی گونه ها، ذخایر گلیکوژن و چربی ها کاهش یافته و در مرحله بعد پروتئین ها برای تامین انرژی شکسته می شوند (۷۹). وجود تغییر در سطح گلوکز خون ماهیان نشان دهنده تاثیر ترکیبات موجود در جیره و مکمل های غذایی بر مکانیسم های کنترل کننده جذب، ذخیره و متابولیسم گلوکز خون است. در مطالعه حاضر، تیمار تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۱۵ گرم کیتوزان دارای بیشترین مقدار گلوکز بود که با گروه شاهد اختلاف معنی دار داشت. کاهش میزان گلوکز در تیمار ۵ گرم کیتوزان را می توان به ذخیره بیش تر گلوکز در کبد جهت تامین انرژی مورد نیاز نسبت داد (۷۹). مقادیر و مدت استفاده از محرک های ایمنی در عملکرد و تاثیر آن ها بر سیستم ایمنی آبزیان به طور مستقیم دخالت داشته به طوری که براساس گزارش های Tafi و همکاران، تاثیر مقدار ۰/۲۵٪ کیتوزان در مدت ۸ هفته نسبت به مقادیر ۰/۵ و ۱٪ تاثیر بهتری روی پاسخ های ایمنی ماهی قزل آلا رنگین کمان داشت (۱۹). هرچند دلیل کاهش پاسخ های ایمنی در ماهیان هنگام استفاده در مقادیر زیاد از محرک های ایمنی به صورت خوراکی به طور دقیقی مشخص نشده است؛ اما می توان احتمال داد که ممکن است در چنین شرایطی یک سیستم بازخورد منفی در ماهیان در مقابل تحریک ایمنی بدن ایجاد شده و سبب برگشت پاسخ های ایمنی به جایگاه اول آن گردد (۸۰)؛ بنابراین، ایجاد عدم اثرات مثبت در جیره حاوی ۱۵ گرم کیتوزان در فاکتورهای مذکور در این تحقیق ممکن است همین امر باشد. به طور کلی، می توان بیان کرد که با توجه به وجود اثرات مثبت کیتوزان به میزان ۱۰ گرم در کیلوگرم جیره به عنوان یک محرک رشد و ایمنی در ارتقای سیستم ایمنی غیراختصاصی فیل ماهیان جوان پرورشی در تحقیق حاضر، استفاده از آن در مطالعات پالوت جهت ارزیابی میزان سلامت این گونه اقتصادی و با ارزش در کارگاه های تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری توصیه می گردد. اگرچه اظهار نظر دقیق در این باره نیازمند مطالعات بیش تر می باشد.

منابع

- acids on growth, survival and salinity stress resistance in Beluga (*Huso huso*) larvae. 17(2): 49-58. (In Persian)
14. **Zare Salmasi, A., Nazerian, S., Taheri Mirghaed, A. and Ebrahimzadeh, S.M., 2019.** The Effect of the Active Ingredient of Turmeric Plant (*Curcuma longa* L) on Hematological Parameters of Beluga (*Huso huso*). Journal of Veterinary Research. 74(2): 199-208. (In Persian)
15. **Ahangar, R., 2020.** The effect of different types of chitosan on the chemical characteristics of huso fillet (*Huso huso*) stored in refrigerator. JFST. 9(4): 234-247.
16. **Daneshvar, S.M., Alishahi, A., Ojagh, S.M. and Mirsadeghi, H., 2020.** The effect of chitosan and cooking methods on the rate of heterocyclic aromatic amine compounds formation in Beluga sturgeon (*Huso huso*) fillet. Aquac. Sci. 7(3): 132-140.
17. **Mirsadeghi, H., Alishahi, A., Ojagh, M. and Pourashouri, P., 2019.** The effect of different kinds of chitosans and cooking methods on the formation of heterocyclic aromatic amines in huso (*Huso huso*) fillet. J.Food Process. Preserv. 43(12): e14253.
18. **Kamali Najaf Abad, M., Imanpoor, M.R., Taqizadeh, V. and Alishah, A.R., 2015.** Effect of chitosan diet on growth performance and hematological parameters of kutum (*Rutilus frisii kutum*, Kamenskii, 1901) fingerlings. Journal of Animal Environment. 7(1): 41-50. (In Persian)
19. **Tafi, A.A., Meshkini, S. and Tukmechi, A., 2014.** Effects of Chitosan on some immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and enhance resistance against a pathogenic *Aeromonas hydrophila* following experimental infection. Journal of Animal Research. 26(4): 468-477. (In Persian)
20. **Akbary, P. and Younesi, A., 2017.** Effect of dietary supplementation of Chitosan on growth, hematology and innate immunity of grey Mullet (*Mugil cephalus*). Veterinary Researches and Biological Products. 116: 195-203. (In Persian)
21. **Alishahi, M., Hajipoor, O., Ghorbanpoor, M. and Mesbah, M., 2018.** Adjuvant effects of nanochitosan on immunogenicity of *Aeromonas hydrophila* vaccine in *Cyprinus carpio*. Journal of Veterinary Research. 73(1): 71-81. (In Persian)
22. **Farahnak Roudsari, S., Mousavi, S.A., Rajabi Islami, H. and Shamsaei Mehrgan, M., 2020.** The effect of chitosan nanoparticles coated with folic acid to feed on growth parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. Aquatic Animals Nutrition. 6(2): 49-62. (In Persian)
23. **Gharaei, A., Khajeh, M., Khosravanizadeh, A., Mirdar, J. and Fadai, R., 2020.** Fluctuation of biochemical, immunological, and antioxidant biomarkers in the blood of beluga (*Huso huso*) under effect of dietary
1. **Ispir, U. and Dorueu, M., 2005.** A study on the effects of levamisole on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Turkish J. Vet. Anim. Sci. 29: 1169-1176.
2. **Domard, A. and Rinaudo, M., 1983.** Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. Int. J. Biol. Macromol. 5: 5-49.
3. **Kurita, K., 2006.** Chitin and Chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. Mar. Biotechnol. 8: 203-226.
4. **Harikrishnan, R., Kim, J.S., Balasundaram, C. and Heo, M.S., 2012.** Dietary supplementation with chitin and chitosan on haematology and innate immune response in *Epinephelus bruneus* against *Philasterides dicentrarchi*. Exp. Parasitol. 131: 116-124.
5. **Harikrishnan, R., Kim, J., Balasundaram, C. and Heo, M., 2012.** Immunomodulatory effects of chitin and chitosan enriched diets in *Epinephelus bruneus* against *Vibrio alginolyticus* infection. Aquacu. 326: 46-52.
6. **Seferian, P.G. and Martínez, M.L., 2001.** Immune stimulating activity of two new chitosan containing adjuvant formulations. Vaccine. 19: 661-668.
7. **Qin, C., Du, Y., Xiao, L., Li, Z. and Gao, X., 2002.** Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. Int. J. Biol. Macromol. 31: 111-117.
8. **Ramesh, U. and Maridass, M., 2010.** Wound healing effect of chitosan in fresh water fish *Cyprinus carpio*. Int. J. Biol. Technol. 1: 99-102.
9. **Yen, M.T., Yang, J.H. and Mau, J.L., 2008.** Antioxidant properties of chitosan from crab shells. Carbohydr. Polym. 74: 840-844.
10. **Gopalakannan, A. and Arul, V., 2006.** Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, and chitosan levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. Aquac. 255: 179-187.
11. **Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A. and 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*), Aquac. 318(1-2): 90-94.
12. **Soltani, M., Falahatkar, B., Porkazemi, M., Abtahi, B., Kalbasi, M. and Mohseni, M., 2008.** Effects of dietary l-ascorbyl-2-polyposphate as a source of vitamin c on growth indices in beluga sturgeon (*Huso huso* l.). Iranian Scientific Fisheries Journal. 17(3): 104-120. (In Persian)
13. **Jalali, M., Hosseini, A., Imanpor, M. and Alimohammadi, A., 2008.** The enrichment influences of *Artemia urmiana* with vitamin E and unsaturated fatty

- Lepeophtheirus salmonis and cortisol implantation. Dis. Aquat. Org. 41(1): 43-51.
35. **Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. boil. chem. 193: 265-275.
 36. **Dumas, B.T., Watson, W.A. and Biggs, H.G., 1997.** Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. Clinica Chimica. Acta. 258(1): 21-30.
 37. **Falahatkar, B., Poursaeid, S., Shakoorian, M. and Barton, B.A., 2009.** Responses to handling and confinement stressors in juvenile great sturgeon *Huso huso*. J. Fish. Biol. 75: 784-796.
 38. **Ahmadpour, M., Amani, R. and Heidari, B., 2019.** Changes in metabolic indexes of the *Caspian kutum* fry in acute and subacute exposure to the nanoparticle of copper oxide and silver nanocolloid. Experimental Animal Biology. 8(2): 51-67. (In Persian)
 39. **Tafi, A.A. and Meshkin, S.,** Investigating effects of different values of Chitosan polysaccharide on growth parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Experimental Animal Biology. 4(1): 25-44. (In Persian)
 40. **Meshkini, S., Tafi, A.A., Tukmechi, A. and Farhang Pajuh, F., 2012.** Effects of chitosan on hematological parameters and stress resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In. Vet. Res. For. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. 3(1): 49.
 41. **Salem, M.E., 2015.** Utilization of some feed additives in improving the nutritive value of marine fish diet (PhD dissertation). Alexandria University, Egypt.
 42. **El-Sayed, H.S. and Barakat, K.M., 2016.** Effect of dietary chitosan on challenged *Dicentrarchus labrax* post larvae with *Aeromonas hydrophila*. Russ. J. Mar. Biol. 42: 501-508.
 43. **Gholipour, M., Soltanian, S., Akhlaghi, M., Alishahi, M., Mirbakhsh, M. and Gheysari, H., 2020.** The effect of encapsulation of *Lactobacillus plantarum* with Alginate/Chitosan Nano particles on growth performance and digestive enzyme activities in Asian sea bass (*Lates calalifer*). Journal of Animal Environment. 12(3): 197-206.
 44. **Bricknell, I., and Dalmo, R. A., 2005.** The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. Fish. shellfish. Immune. 19(5): 457-472.
 45. **Chen, J. and Chen, L., 2019.** Effects of chitosan supplemented diets on the growth performance, nonspecific immunity and health of loach fish (*Misgurnus anguillicadatus*). Carbohydr. Polym. 225: 1-5.
 46. **Mohan, M., Bhanja, S.K. and Basade, Y., 2009.** Performance of chitin incorporated diet on the indigenous Kumaon Himalayan fishes: snow trout (*Schizothorax* ZnO and chitosan-ZnO NPs. Fish. physiol. biochem. 46(2): 547-561.
 24. **Hosseini, S.S., Mohammadian, T., Abbaspour, M.R. and Alishahi, M., 2018.** The effect of microencapsulation with alginate/chitosan on survival of probiotic bacteria (*Lactobacillus plantarum*) in the simulated condition of stomach and intestines in *Huso huso*. Iranian Scientific Fisheries Journal. 27(2): 161-172.
 25. **Mohammadiyan, T., Bitar, S. and Naseri Pourtaklo, R., 2019.** Effect of *Lactobacillus plantarum* Encapsulated with Alginate/Chitosan on Biochemical Factors in the Beluga (*Huso huso*). J. Vet. Res. 74(1): 93-103.
 26. **Hasan, M.M., Hasan, M., Parvin, M., Khatun, R., Habib, A., Islam, T., Bushra, A. and Islam, S., 2017.** Determination of Minimum Inhibitory Concentration for chitosan extracted from *Metapeuou monoceros* against gram positive bacteria, gram negative bacteria and fungi, gram negative bacteria and fungi, IOSR J. Pharm. Biol. Sci. 1-4.
 27. **Lee, K.M., Shim, H., Lee, G.S., Park, H., Lee, O.S., Lim, S.C. and Kang, T.J., 2013.** Chitin from the extract of cuttlebone induces acute inflammation and enhances MMP1 expression. Biomol. Technol. 21: 246-250.
 28. **Yen, M.T., Yang, J.H. and Mau, J.L., 2009.** Physiochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. Carbohydr. Polym. 75: 15-21.
 29. **Khakshoor, M.S. and Pazooki, J., 2014.** Extraction of Chitin-Chitosan component in exoskeleton of blue swimming crab (*Portunus segnis* Furskal, 1775), Bandar Abbas beach, Persian Gulf. Journal of Animal Environment. 6(1): 11-18. (In Persian)
 30. **Mohseni, M., Bahmani, M., Porkazemi, M., Porali, H. and Arshad, A., 2003.** Determination of the best feeding ratio in *Huso huso* meat production cultured in fiber glass tanks. Iranian Scientific Fisheries Journal. 4(4): 165-180. (In Persian)
 31. **Tacon, A.G.J., 1990.** Standard methods for the nutrition and feeding of fished fish and shrimp. Argent Laboratories Press. 4: 24.
 32. **Hevrøy, E., Espe, M., Waagbø, R., Sandnes, K., Ruud, M. and 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. Aquac. Nut. 11: 301-313.
 33. **Ai, Q., Mai, K., Tan, B., Xu, W., Duan, Q., Ma, H. and Zhang, L., 2006.** Replacement of fish meal by meat and bone meal in diets for large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. Aquac. 260: 255-263.
 34. **Ross, N.W., Firth, K.J., Wang, A., Burka, J.F. and Johnson, S.C., 2000.** Changes in hydrolytic enzyme activities of naive Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the *salmon louse*

58. **Hjelmeland, K., 1983.** Proteinase inhibitors in the muscle and serum of cod (*Gadus morhua*). Isolation and characterization. Comp. Biochem. Physiol. Part B. 76: 365-372.
59. **Hjelmeland, K., Christie, M. and Raa, J., 1983.** Skin mucus protease from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and its biological significance. J. Fish. Biol. 23: 13-22.
60. **Ellis, A.E., 1987.** Inhibition of the *Aeromonas salmonicida* extracellular protease by a-2 macroglobulin in the serum of rainbow trout. Microb. Pathog. 3: 167-177.
61. **Rao, Y.V. and Chakrabarti, R., 2005.** Stimulation of immunity in Indian major carp *Catla catla* with herbal feed ingredients. Fish. Shellfish. Immunol. 18: 327-334.
62. **Bai, S.C., 2000.** Requirements of L-ascorbic acid in a viviparous marine teleost, Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). Ascorbic acid in aquatic organisms. 18 p.
63. **Sharifinasab, Z., Banaee, M., Nematdoost Haghi, B. and Noori, A., 2016.** Protective effects of vitamin C and chitosan on blood biochemical parameters in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to paraquat. Iranian Scientific Fisheries Journal. 25(3): 181-199. (In Persian)
64. **Dere, E. and Dağ, S., 2003.** In-vitro interaction of paraquat with some amino acids. Fen. Bilimleri. Dergisi. 24(2): 7-17.
65. **Jaiswal, R., Khan, M.A. and Musarrat, J., 2002.** Photosensitized paraquat-induced structural alterations and free radical mediated fragmentation of serum albumin. J. Photochem. Photobiol. Part B. 67(3): 163-70.
66. **Ahmad, E., Rabbani, G., Zaidi, N., Ahmad, B. and Khan, R.H., 2012.** Pollutantinduced modulation in conformation and β -Lactamase activity of human serum blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Pestic. Biochem. Phys. 99: 1-6.
67. **Banaee, M., 2013.** Physiological dysfunction in fish after insecticides exposure: Insecticides often undesired but still so important, edited by Stanislav Trdan, Published by In Tech. Chapter 4. 103-142.
68. **Parma, M.J., Loteste, A., Campana, M. and Bacchrtta, C., 2007.** Chenges of hematological parameters in *Prochilodus lineatus* (pisces, Prochilodontidae) exposed to sublethal concentration of cypermethrin. J. Environ. Biol. 28(1): 147-149.
69. **Tohidi, M., Harati, H., Hadaegh, F., Mehrabi, Y. and Azizi, F., 2008.** Association of liver enzymes with incident type 2 diabetes: A nested case control study in an Iranian population. BMCEndocrine Disorders. 8: 5-9.
70. **Teodoro, J.S., Gomes, A.P., Varela, A.T., Duarte, F., Rolo, A.P. and Palmeira, C.M., 2016.** Hepatic and skeletal muscle mitochondrial toxicity of chitosan (*richardsoni*) and golden mahseer (*Tor putitora*). Indian J. Fish. 56(2): 135-137.
47. **Geng, X., Dong, X.H., Tan, B.P., Yang, Q.H., Chi, S.Y., Liu, H.Y. and Liu, X.Q., 2011.** Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia (*Rachycentron canadum*). Fish. Shellfish. Immun. 31: 400-406.
48. **Fazaei, Z., Sajjadi, M.M., Sourinejad, I. and Asadi, R., 2015.** Vitamin C supplementation to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diet and analysis of growth indices, survival and carcass composition at two different stocking densities. Journal of Veterinary Research. 70(1): 55-62. (In Persian)
49. **Sameh, M., 2015.** The effect of diet oligosaccharide chitosan on growth indices, survival percentage, hematological parameters and resistance to salinity and heat stress in common carp (*Cyprinus carpio*) fry. Master's thesis, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. 75 p. (In Persian)
50. **Shiau, S.Y. and Yu, Y.P., 1999.** Dietary supplementation of chitin and chitosan depresses growth in Tilapia (*Oreochromis niloticus* $\times$ *O. auratus*). Aquac. 179: 439-446.
51. **Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A., Amoozegar, M.A., Sharifian, M. and Esteban, M.A., 2015.** Modulation of innate immune response, mucosal parameters and disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) upon synbiotic feeding. Fish. Shellfish. immunol. 45(1): 27-32.
52. **Adel, A., Yeganeh, S., Dadar, M., Sakai, M. and Dawood, M.A., 2016.** Effects of dietary *Spirulina platensis* on growth performance, humoral and mucosal immune responses and disease resistance in juvenile great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1754). Fish. Shellfish. Immunol. 56: 436-444.
53. **Cha, S.H., Lee, J.S., Song, C.B. and Lee, K.J., 2008.** Effects of chitosan-coated diet on improving water quality and innate immunity in the Oliver flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquac. 278: 110-118.
54. **Fletcher, T.C., 1986.** Modulation of nonspecific host defences in fish. Vet. Immunol. Immunol. pathol. 12: 59-67.
55. **Grinde, B., Lie, O., Poppe, T. and Salte, R., 1988.** Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture. Aquac. No. 68: 299-304.
56. **Lie, O., Evensen, O., Sorensen, A. and Froyssadal, E., 1989.** Study on lysozyme activity in some fish species. Dis. Aquat. Org. 6: 1-5.
57. **Aathi, K., Ramasubramanian, V., Uthayakumar, V. and Munirasu, S., 2013.** Effect of supplemented diet on survival, growth, hematological, biochemical and immunological responses of indian major carp *labeo rohita*. Int. Res. J. Pharm. 4(5): 141-147.

- oligosaccharides of normal and diabetic rats. Toxicol. Mech. Methods. 26: 650-657.
71. **Liu, S.H., Chen, R.Y. and Chiang, M.T., 2020.** Effects of chitosan oligosaccharide on plasma and hepatic lipid metabolism and liver histomorphology in normal Sprague-Dawley rats. Marine. Drugs. 18(8): 408.
 72. **Fadl, S.E., El-Gammal, G.A., Abdo, W.S., Barakat, M., Sakr, O.A., Nassef, E., Gad, D.M. and El-Sheshtawy, H.S., 2020.** Evaluation of dietary chitosan effects on growth performance, immunity, body composition and histopathology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) as well as the resistance to *Streptococcus agalactiae* infection. Aquac. Res. 51(3): 1120-1132.
 73. **Abd El-Naby, F.S., Naiel, M.A., Al-Sagheer, A.A. and Negm, S.S., 2019.** Dietary chitosan nanoparticles enhance the growth, production performance, and immunity in *Oreochromis niloticus*. Aquac. 501: 82-89.
 74. **Burrells, C.I., William, P.D. and Porno, P.F., 2001.** Dietary nucleotides: A novel supplement in fish feeds, Effects on resistance to diseases in Salmonids. Aquac. 199: 159-169.
 75. **Loukhi, T., Harsij, M., Kolangi Miyandareh, H. and Ghafari Farsani, H., 2015.** Effect of dietary nucleotides on hematological and serum biochemical parameters of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). Aquatic Physiology and Biotechnology. 3(3): 51-62. (In Persian)
 76. **Silvi, S., Nardi, M., Sulpizio, R., Orpianesi, C., Caggiano, M., Carnevali, O. and Cresci, A., 2008.** Effect of the addition of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* on the gut microbiota composition and contribution to the well-being of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). Microb. Ecol. health. dis. 20(1): 53-59.
 77. **Cain, K.D., Grabowski, L., Reilly, J. and Lytwyn, M., 2003.** Immunomodulatory effects of a bacterial-derived β -1, 3 glucan administered to tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in a Spirulina-based diet. Aquac. Res. 34(13): 1241-1244.
 78. **Luo, L., Cai, X., He, C., Xue, M., Wu, X. and Cao, H., 2009.** Immune response, stress resistance and bacterial challenge in juvenile rainbow trouts *Oncorhynchus mykiss* fed diets containing chitosan-oligosaccharides. Curr Zool. 55(6): 416-422.
 79. **Iwama, G.K., Vijayan, M.M., Forsyth, R.B. and Ackerman, P.A., 1999.** Heat shock proteins and physiological stress in fish. Am. Zool. 39(6): 901-909.
 80. **Sakai, M., 1998.** Current research status of fish immunostimulants. Aquac. 172: 63-92.