"مقاله پژوهشی"

بهبود شاخص‌های ایمنی موکوس پوست ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با نانو ذره آهن با استفاده از مکمل غذایی ملاس

پریا هوشمند[1*]، روح ا.. شیخ ویسی[1]، حبیب ا.. سنچولی[2]، وحید زمانی[3]، سپیده غنی[2]، سید علی اکبر هدایتی[1]

۱. گروه تولید و بهره برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۲. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۳. گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۳/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۸/۱۷

چکیده

وجود آلاینده‌های نوظهور نانوذرات در آب باعث پاسخ استرس در ماهی می‌شود که نهایتاً بر وضعیت فیزیولوژیک ماهیان اثرگذار بوده و باعث کاهش عملکرد ایمنی ماهیان می‌شود. از این رو، استفاده از محرک‌های ایمنی نظیر ملاس بسیار ضروری به‌نظر می‌رسد. در این تحقیق، تعداد ۲۵۰ قطعه بچه‌ماهی کپور معمولی به‌مدت ۴۲ روز در چهار دسته: جیره فاقد ملاس (تیمار ۱)، جیره حاوی ۰/۵ درصد ملاس (تیمار ۲)، جیره حاوی ۱ درصد ملاس (تیمار ۳) و جیره حاوی ۲ درصد ملاس (تیمار ۴) تقسیم شدند. سپس به هرکدام از گروه‌ها ۵۰ درصد غلظت کشنده نانو آهن به‌مدت چهارده روز اضافه شد. شاخص‌های مختلف از جمله : پروتئین محلول، فسفاتاز قلیایی، لیزوزیم و ایمونوگلوبولین (IgM) در موکوس اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر شاخص‌های ایمنی موکوس تأثیر معنی‌داری داشت ($P<0/05$). به‌طوری‌که میزان این شاخص‌ها در تیمارهای تغذیه شده با ملاس با افزایش غلظت ملاس افزایش یافت. در تیمار در معرض نانو آهن و در تیمارهای ترکیب نانو آهن و ملاس نیز میزان این شاخص‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. نتیجه کلی این تحقیق نشان داد که ملاس، نانوذره آهن و ترکیب ملاس و آهن باعث افزایش شاخص‌های ایمنی موکوس می‌شود.

کلمات کلیدی : بهبود مقاومت، آبزی، نانو ذرات فلزی، ملاس

* عهده دار مکاتبات: pariahooshmand71@gmail.com

مقدمه

در سال‌های اخیر، نانوتکنولوژی تبدیل به یکی از مهم‌ترین و مهیج‌ترین حوزه‌های رو به پیشرفت در فیزیک، شیمی، علوم مهندسی و زیست‌شناسی شده است. ذرات نانو به خاطر خصوصیت‌های غیر معمول نوری، شیمیایی، فوتوالکتروشیمیایی و الکتریکی، مورد توجه دانشمندان هستند (Gong *et al*., 2007). با توجه به نوظهور بودن فناوری نانو هنوز از خطرات احتمالی این ذرات برای محیط زیست ارزیابی دقیقی صورت نگرفته است. ازآن‌جا که نانوذرات مصنوعی تولید بشر هستند و در فرآیند تکامل وجود نداشته‌اند، در حال حاضر، نگرانی زیادی پیرامون آلودگی موجودات زنده به خصوص آبزیان با آن‌ها وجود دارد. نانو ذرات می‌توانند از جداره رگ‌های خونی و همچنین جفت عبور کنند. در نتیجه، به‌راحتی می‌توانند با ملکول‌های مستقر بر روی سطح یا داخل سلول‌ها تعامل داشته باشند. این مسئله باعث می‌شود سلامتی موجودات زنده تحت تاثیر قرار گیرد. ویژگی‌های نانو ذرات مانند انحلال‌پذیری، تحرک بسیار زیاد در بدن انسان و توانایی نفوذ به غشاء سلولی سبب شده مقیاس نانو بیش از مقیاس‌های دیگر مورد توجه قرار گیرد. با توجه به خصوصیات منحصر به فرد فیزیکی و شیمیایی نانوذرات ممکن است نوع سمیت آن‌ها با موادی که از نظر ساختمان شیمیایی با آن‌ها یکسان اما اندازه متفاوت دارند، فرق داشته باشد. حتی امکان دارد که نانو ذره‌ها سمیت بیشتری در مقایسه با ذرات بزرگتر ایجاد کنند. نانوذرات اکسید فلزی می‌توانند وارد رگ‌ها و بافت‌های مغز شوند و از این طریق می‌توانند قابلیت دسترسی زیستی را افزایش دهند. این مسئله ممکن است منجر به تأثیرات سمی و پاسخ‌های التهابی در مغز و تخریب سیستم عصبی مرکزی شود (Chang *et al*., 2012).

کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) از رده‌ی ماهیان استخوانی و متعلق به خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) است و در تمام حوضه‌های آبریز ایران پراکنش دارد و یکی از مهمترین ماهیان پرورشی و تجاری در دنیا و ایران محسوب می‌گردد.

در سال‌های اخیر، تحقیقات فراوانی روی ترکیبات و مکمل‌های غذایی که در بالا بردن ایمنی موجود و کارایی تغذیه نقش دارند، صورت گرفته است. از جمله ترکیباتی که به عنوان مکمل غذایی مطرح می‌باشند، می‌توان به پروبیوتیک‌ها، نوکلئوتیدها، ملاس و ... اشاره کرد. در طی سال‌های گذشته، استفاده از مکمل‌های غذایی (پروبیوتیک و سایر افزودنی‌ها) که در بالا بردن ایمنی مصرف‌کنندگان نقش اساسی داشته‌اند، افزایش یافته است. به‌طوری که، اثرات مثبت و فراوان این مواد در انواع جانداران ثابت شده است. ملاس چغندر قند (beet molasses) یک شیرین کننده است که به عنوان یک محصول جانبی از فرایند ساخت قند تشکیل می‌شود. ملاس انواع مختلفی دارد که نوع Black strap معمول‌ترین شکل ملاس است و شامل بسیاری از ویتامین‌ها و مواد معدنی می‌باشد. ملاس چغندر قند به عنوان یک منبع غنی از ساکاروز است (Soder *et al*., 2010). ملاس چغندر قند به عنوان یک محصول خوش طعم و سرشار از انرژی برای نشخوارکنندگان است که

در ایران تولید این محصول ۴۸۰ هزار تن در سال است (Moosavi-Nasab *et al*., 2007). همچنین بهبود در عملکرد دستگاه گوارش در قابلیت هضم مواد آلی با جایگزینی ملاس به جای جو در جیره غذایی گاو گزارش داده شده است (Huhtanen, 1998). بتائین یکی از ترکیبات چغندر است که به عنوان یک محصول جانبی در طی تولید قند تولید می‌شود. بتائین در سوخت و ساز چربی از طریق نقش آن در سنتز فسفاتیدیل کولین و در اکسیداسیون اسیدهای چرب کاربرد دارد (Diane *et al*., 2003). وجود موکوس بر پوست و آبشش ماهی جهت حفاظت از ساختار آبشش و برخی وظایف مهم آن حیاتی است (علیزاده رودپشتی و همکاران، ۱۳۹۶). موکوس از طریق اتصال گروه‌های اسیدسیالیک با بار منفی به کاتیون‌های مضر فلزات، قادر به کاهش سمیت فلزات و نانوفلزات می‌باشد. علاوه بر این موکوس در رویارویی با فلزات سریعاً ترشح می‌شود که از چند دقیقه تا چند ساعت متغیر است. باوجود آنکه موکوس به‌طور کارآمدی قادر به باند شدن به فلزات و کاهش سمیت آنها می‌باشد، از سوی دیگر می‌تواند منجر به تجمع فلزات در بخش‌های اصلی بدن ماهی مانند آبشش شود (Speare and Fergosen, 2006). موکوس پوست شامل شاخص‌های ایمنی ذاتی مانند مکمل‌ها، لیزوزیم، ایمونوگلوبولین‌ها، پروتئاز و لکتین‌ها است. کیفیت و کمیت ترکیبات موکوس گونه‌های مختلف ماهی متفاوت بوده و متأثر از فاکتورهای تنش‌زا در قبل یا در زمان نمونه‌برداری موکوس است فعالیت ضد باکتریایی و ایمونولوژیکی موکوس پوست ماهی تحت تأثیر وضعیت فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای ماهی می‌باشد (Esteban, 2012). در تحقیقی بیگی در سال ۱۳۹۷ تاثیر سطوح مختلف ملاس چغندر بر برخی شاخص های ایمنی موکوس، رشد و بقا در ماهی کپور معمولی پرداخت و دریافت که ملاس باعث بهبود شاخص‌های رشد و ایمنی ماهی می‌گردد. ترکیبات اصلی ملاس چغندر شاما چهار دسته: قندها (گلوگز و ساکاروز)، آمینواسیدها (بتائین، پیروگلوتامیک اسید، گلوتامین، آسپاراژین، ایزولوسین، تیروزین، آلانین، لوسین، والین، سرین، لیزین،گلایسین، آرژنین، فنیل‌آلانین، ترئونین)، اسیدهای آلی (اسید لاکتیک، اسید استیک، فرمیک اسید، اسید مالیک، اسید سیتریک) و مواد معدنی (پتاسیم، سدیم، فسفر، کلسیم) است (بیگی، ۱۳۹۷).

لذا با توجه به جنبه‌های روز افزون کاربرد نانوذرات و ورود آن به اکوسیستم‌های آبی به عنوان آلاینده نوظهور، در تحقیق حاضر به تعیین اثرات نانو آهن بر ماهی کپور معمولی پرداخته شد و این فرضیه که احتمال کاهش اثرات نانوذرات با مکمل ملاس وجود دارد، نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

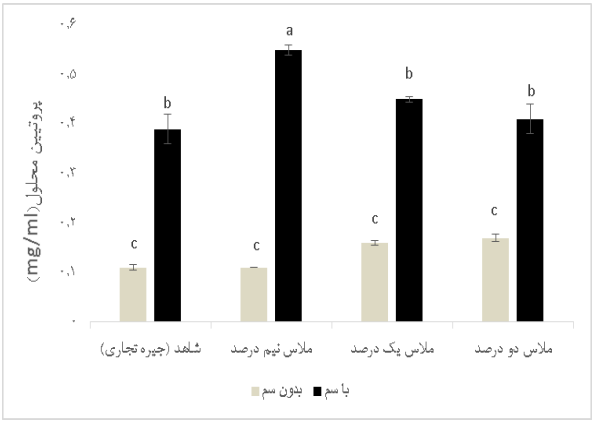
این تحقیق به مدت ۶۳ روز (یک هفته برای سازگاری، ۴۲ روز تغذیه با ملاس،۱۴روز در معرض نانو ذرات آهن) در محل مرکز تحقیقات آبزی‌پروری شهید ناصر فضلی برآبادی گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. ابتدا تعداد ۲۵۰ قطعه بچه ماهی کپور معمولی با محدوده وزنی حدود ۲۰ گرم از مراکز تکثیر و پرورش بخش خصوصی تهیه گردید. بعد از ضدعفونی و آماده‌سازی

آکواریوم‌ها، آبگیری آن‌ها صورت گرفت. سپس ماهیان به آکواریوم‌های آزمایشگاه منتقل شدند. برای سازگارشدن با محیط آزمایش به مدت یک هفته در داخل مخازن پرورشی نگهداری شدند. بعد از گذشت یک هفته از دوره سازگاری، آزمایش در قالب ۴ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار شامل: جیره فاقد ملاس (تیمار ۱)، جیره حاوی ۰/۵ درصد ملاس (تیمار ۲)، جیره حاوی ۱ درصد ملاس (تیمار۳) و جیره حاوی ۲ درصد ملاس (تیمار ۴) انجام شد (بیگی، ۱۳۹۷). ماهی‌ها روزانه به میزان ۳ درصد وزن بدن و دو بار در روز با جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند. بعد از گذشت ۴۲ روز و 96h LC_{50} بر طبق منابع موجود نانو آهن، بچه‌ماهیان در مجاورت ۵۰ درصد غلظت کشنده نانوذرات آهن به مدت ۱۴ روز قرار گرفتند (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۲). در پایان آزمایش و بعد از طی دوره ۶۳ روز، از هر تیمار ۵ نمونه ماهی موکوس گرفته شد. موکوس پوست ماهی‌ها براساس روش Subramanian و همکاران (۲۰۰۷) جمع‌آوری شد. از هر مخزن ۵ قطعه ماهی به صورت تصادفی نمونه‌برداری و پس از بی‌هوشی با ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک، به صورت انفرادی درون کیسه‌های پلی‌اتیلنی (زیپ پلاست) حاوی ۲ میلی‌لیتر سدیم کلرید ۵۰ میلی‌مولار قرار گرفت. ماهیان از ۲۴ ساعت قبل از نمونه‌برداری غذادهی نشدند. پس از ۳ دقیقه ماهیان از کیسه‌ها خارج و موکوس جمع‌آوری شده به لوله‌های سانتریفیوژ استریل ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و با دور g × ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و مایع رویی به میکروتیوپ‌های ۱/۵ سی‌سی منتقل و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس شاخص-های مختلف از جمله : پروتئین محلول، فسفاتاز قلیایی، لیزوزیم و ایمونوگلوبولین در موکوس اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لیزوزیم موکوس پوست به روش کدورت‌سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. برای تعیین سطح فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی از کیت مخصوص سنجش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی (شرکت پارس آزمون) و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۴۰۵ نانومتر و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. برای اندازه‌گیری پروتئین محلول از معرف رنگی فولین فنول سیوکالتیو استفاده گردید (Subramanian *et al.*, 2007). جهت اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین کل از روش Siwicki (۱۹۹۳) استفاده شد (اکبری و همکاران، ۱۴۰۰). تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون چند دامنه دانکن انجام شد. تجزیه‌وتحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان گردید.

نتایج

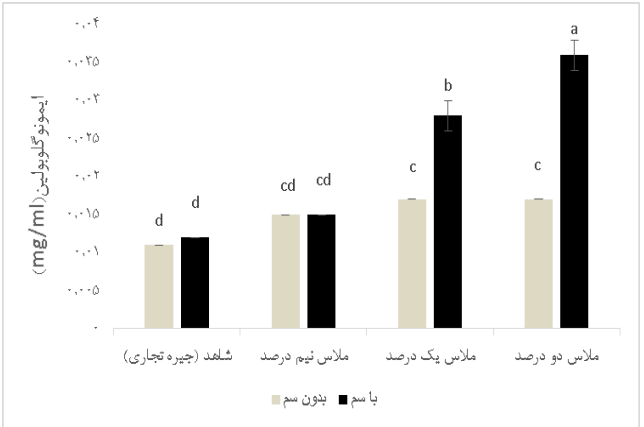
بررسی تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در مجموع تیمارهای آزمایشی بر میزان پروتئین محلول موکوس تاثیر معنی‌داری داشت ($P<0/05$)، به‌طوری-که میزان پروتئین محلول موکوس در اثر تیمارهای تغذیه شده با ملاس با گروه شاهد معنی‌دار نبود ولی

میزان این شاخص در تیمار در معرض نانو آهن و در تیمارهای ترکیب نانو آهن و ملاس به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل۱).



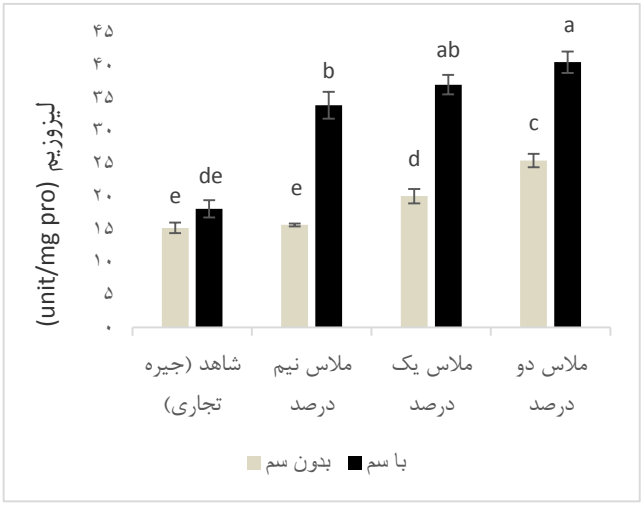
شکل ۱. میزان پروتئین محلول موکوس ماهی کپور معمولی در تیمارهای مختلف آزمایشی.

نتایج نشان داد که تیمارهای آزمایشی بر میزان ایمونوگلوبولین موکوس تاثیر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). میزان ایمونوگلوبولین موکوس در اثر تیمارهای تغذیه شده با ملاس، در تیمار در معرض نانو آهن و در تیمارهای ترکیب نانو آهن و ملاس میزان این شاخص به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل۲).



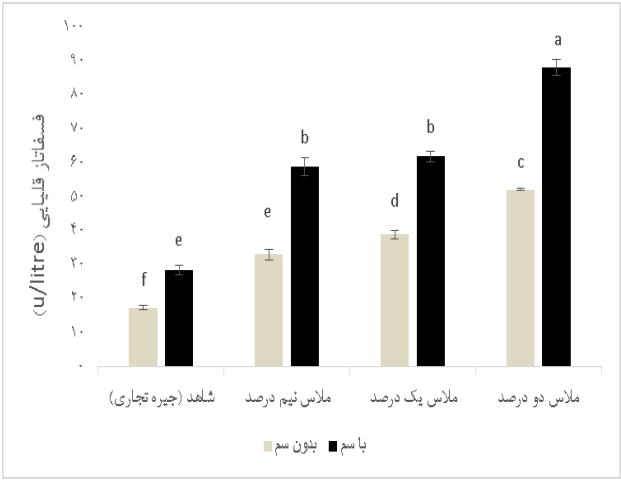
شکل ۲. میزان ایمونوگلوبولین موکوس ماهی کپور معمولی در تیمارهای مختلف آزمایش.

نتایج در این تحقیق نشان داد که تیمارهای آزمایشی بر میزان لیزوزیم موکوس تاثیر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که میزان لیزوزیم موکوس در اثر تیمارهای تغذیه شده با ملاس، در تیمار در معرض نانو آهن و در تیمارهای ترکیب نانو آهن و ملاس نیز میزان این شاخص بطور معنی‌داری افزایش یافت (شکل۳).



شکل ۳. میزان لیزوزیم موکوس ماهی کپور معمولی در تیمارهای مختلف آزمایشی.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها نشان داد که تیمارهای آزمایشی بر میزان فسفاتاز قلیایی(ALP) موکوس تاثیر معنی-داری داشت (P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که میزان فسفاتاز قلیایی(ALP) موکوس در اثر تیمارهای تغذیه شده با ملاس، در تیمار در معرض نانو آهن و در تیمارهای ترکیب نانو آهن و ملاس نیز میزان این شاخص بطور معنی‌داری افزایش یافت (شکل۴).



شکل ۴. میزان فسفاتاز قلیایی (ALP) موکوس ماهی کپور معمولی در تیمارهای مختلف آزمایشی.

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تیمارهای آزمایشی بر میزان لیزوزیم موکوس تاثیر معنی‌داری داشت. به‌طوری‌که، میزان لیزوزیم موکوس در اثر تیمارهای تغذیه شده با ملاس با افزایش غلظت ملاس، میزان این شاخص نیز بطور معنی‌داری افزایش یافت، در تیمار در معرض نانو آهن و در تیمارهای ترکیب نانو آهن و ملاس نیز میزان این شاخص بطور معنی‌داری افزایش یافت. نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر مشابه با نتایج سایر محققان می‌باشد. به‌طور مثال، میزان آنزیم لیزوزیم در ماهی قرمز تغذیه شده با گالاکتوالیگوساکارید افزایش یافته است (Kolangi Miandare *et al*., 2016). همچنین در مطالعه دیگری قارچ خوراکی به‌عنوان محرک ایمنی موجب فعالیت آنزیم لیزوریم شده است (Harikrishnan *et al*., 2012). افزایش سطوح لیزوزیم موکوس مؤید افزایش سطح ایمنی در بچه‌ماهیان تغذیه شده با مکمل‌های غذایی می‌باشد.

آنزیم فسفاتاز قلیایی به دلیل دارا بودن فعالیت هیدرولیتیکی در موکوس به‌عنوان یک عامل ضدباکتریایی عمل می‌کند و مقدار آن در شرایطی مانند مراحل اولیه بهبود زخم‌ها، شرایط تنش‌زا به دلیل نقش حفاظتی در برابر عوامل بیماری‌زا (Palaksha *et al*., 2008) و استفاده از محرک‌های ایمنی در جیره (Roosta *et al*., 2014) افزایش می‌یابد. در این تحقیق نتایج نشان داد که میزان فسفاتاز قلیایی (ALP) موکوس در اثر تیمارهای تغذیه شده با ملاس با افزایش غلظت ملاس، میزان این شاخص نیز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، در تیمار در معرض نانو آهن و در تیمارهای ترکیب نانو آهن و ملاس نیز میزان این شاخص به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی شاخص بالقوه استرس است که در موکوس پوست سالمون آتلانتیک به اثبات رسیده است (Ross *et al*., 2000). موکوس کپور معمولی بیشترین سطوح فسفاتاز قلیایی را دارد که به‌علت زیستگاه این ماهی در آب‌های کم عمق و نزدیک بستر و تحت شرایط گل آلود است و حضور این آنزیم در جهت افزایش مقاومت سیستم ایمنی ذاتی این ماهی می‌باشد (Subramanian *et al*., 2007). افزودن مخمر ساکارومایسس سروزیه به جیره غذایی *Puntigrus tetrazona* و *Oncorhynchus mykiss*، تفاوت معنی‌داری را در فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی نسبت به گروه شاهد نشان داد (Sheikhzadeh *et al*., 2012). Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۵)، اثر باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را روی موکوس پوست در جیره غذایی *Xiphophorus helleri* بررسی و بیان

کردند که سبب افزایش معنی‌دار در میزان فسفاتاز قلیایی می‌شود. نتایج مطالعه حاضر با نتایج این پژوهش‌ها مطابقت دارد. هم‌چنین بیان شده است که افزایش فعالیت این آنزیم می‌تواند به علت پاسخ ایمنی موکوس پوست تحریک شده باشد (Sheikhzadeh *et al*., 2012). مطالعات نشان دادند که استفاده از پروبیوتیک‌ها در رژیم غذایی ماهی تیلاپیای نیل (*Oreocheromis niloticus*) منجر به افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی می‌گردد. در نتیجه می‌توانند باعث تحریک، توسعه و رشد پرزهای روده‌ای شوند. افزایش این پرزها منجر به جذب بیشتر کربوهیدرات‌ها و لیپیدها و درنتیجه، افزایش بیشتر وزن می‌شوند (Lara-Flores, 2011). با این وجود، این مطلب که مکمل‌های غذایی با چه مکانیسمی موجب افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی موکوس پوست می‌شوند مشخص نیست و نیازمند مطالعات بیشتر می‌باشد.

افزایش پروتئین محلول موکوس تحت تأثیر محرک-های ایمنی ازجمله مخمر ساکارومایسس سرویزیه (Sheikhzadeh *et al*., 2012)، محرک ایمنی ارگوسانپروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی (Hernandez *et al*., 2010) به ترتیب در موکوس ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، *Puntigrus tetrazona* و *Periophthalmus gracilis* گزارش شده است. که مطابق نتایج تحقیق حاضر می‌باشد. در این تحقیق میزان پروتئین محلول موکوس در اثر تیمارهای تغذیه شده با ملاس با افزایش غلظت ملاس، میزان این شاخص نیز افزایش یافت، ولی با گروه شاهد معنی‌دار نبود. ولی میزان این شاخص در تیمار در معرض نانو آهن و در تیمارهای ترکیب نانو آهن و ملاس بطور معنی‌داری افزایش یافت.

ایمونوگلوبولین‌های ترشحی عمدتاً توسط پلاسماسل تولید می‌شود (Esteban, 2012). در این تحقیق میزان ایمونوگلوبولین موکوس در اثر تیمارهای تغذیه شده با ملاس با افزایش غلظت ملاس، میزان این شاخص نیز بطور معنی‌داری افزایش یافت، در تیمار در معرض نانو آهن و در تیمارهای ترکیب نانو آهن و ملاس نیز میزان این شاخص بطور معنی‌داری افزایش یافت. این افزایش ایمونوگلوبولین توسط محققین دیگر که در جیره ماهی از محرک‌های ایمنی مانند قارچ و باکتری‌ها استفاده کرده‌اند، مطابقت دارد که عبارتند از استفاده عصاره قارچ *Lentinula edodes* در جیره قزل‌آلا (Baba *et al*., 2015) و بتاگلوکان مستخرج از مخمر ساکارومایسس سرویزیه در جیره ماهی *Sparus aurata* (Gazman *et al*., 2014) که موجب افزایش این پارامتر شدند. براساس مطالعات محققین عوامل محیطی (فصل، شوری، درجه حرارت، تراکم)، عوامل فیزیولوژیکی (گونه ماهی، سن، جنس، وضعیت تغذیه-ای)، زمان نمونه‌برداری، چگونگی تهیه نمونه، دقت و حساسیت روش‌های اندازه‌گیری می‌توانند بر فعالیت پارامترهای موکوس تأثیرگذار باشند و تفاوت در نتایج تحقیقات صورت گرفته را سبب شود (Verdegerm, 1997). نتیجه‌گیری کلی این تحقیق نشان داد که ملاس، نانوذره آهن و ترکیب ملاس و آهن باعث افزایش شاخص‌های ایمنی موکوس شده است.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان صورت گرفت. از همه‌ی بزرگوارانی که به نحوی در این پژوهش مساعدت نمودند، سپاس گزاری می‌نماییم.

منابع

۱. اکبری، ح.، حسینی شکرایی، س.پ.، سلطانی، م.، شمسایی مهرجان، م.، ۱۴۰۰. تاثیر مقادیر مختلف پروبیوتیک *Enterococcus faecium* بر برخی شاخص‌های ایمنی سرم خون و موکوس پوست بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). نشریه توسعه آبزی‌پروری، ۱۵(۲)، ۱۵-۲۶.

۲. بیگی، م.، ۱۳۹۷. تأثیر سطوح مختلف ملاس چغندر (Beet molasses) بر برخی شاخص‌های ایمنی موکوس، رشد و بقاء در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، پایان‌نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۶۰ صفحه.

۳. علیزاده رودپشتی، م.، شناور ماسوله، ع.، خلیل پور، ح.، معصوم زاده، م.، بازاری مقدم، ل.، یگانه، ه.، عزیززاده، ل.، ۱۳۹۶. اثر انتروکوکوس فکالیس به عنوان پروبیوتیک بر شاخص های خونی و سرمی بچه تاس ماهی ایرانی *Acipencer persicus* نشریه توسعه آبزی پروری، ۱۱ (۱)، ۸۳-۱۰۳.

۴. هدایتی، ع.، جهانبخشی، ع. و قادری رمازی، ف.، ۱۳۹۲. سم‌شناسی آبزیان، انتشارات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. جلد اول، چاپ اول، ۲۱۰ صفحه.

5. Esteban, A.M., 2012. An overview of the immunological defenses in fish skin. ISRN Immunology, 2012.

6. Baba, E., Ulukoy, G. and Ontaş, 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.

7. Chang, Ya., Xia, L., Zhang, M., Zhang, J. and Xing, G., 2012. The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. Materials. 5(12), 2850-2871.

8. Diane W.C., Ignacio, F.F., Erkki, V., Norman, C. S. and Thomas, J. C., 2003. Betaine improves growth, but does not induce whole body or hepatic palmitate oxidation in swine (*Susscrofa domestica*). Comparative Biochemistry and Physiology A. 137, 131–140.

9. Gong, P., Li, H., He, X., Wang, K., Hu, J., Tan, W. and Yang, X., 2007. Preparation and antibacterial activity of Fe3O4@ Ag nanoparticles. Nanotechnology, 18(28), 285604.

10. Guzman-Villanueva, L.T., Tovar-Ramirez, D., Gisbert, E., Cordero, H., Guardiola, F.A., Cuesta, A., Meseguer, J., Ascencio-Valle, F. and Esteban, M.A., 2014. Dietary administration of β-1, 3/1, 6-glucan and probiotic strain *Shewanella putrefaciens*, single or combined, on gilthead seabream growth, immune responses and gene expression. Fish and Shellfish Immunology, 39(1), 34-41.

11. Harikrishnan, R., Balasundaram, C. and Heo, M.S., 2012. *Inonotus obliquus* containing diet enhances the innate immune mechanism and disease resistance in olive flounder *Paralichythys olivaceus* against *Uronema marinum*. Fish and Shellfish Immunology, 32(6): 1148-1154.

12. Hernandez, L.H.H., Barrera, T.C., Mejia, J.C., Mejia, G.C., Del Carmen, M., Dosta, M., De Lara Andrade, R. and Sotres, J.A.M., 2010. Effects of the commercial probiotic *Lactobacillus casei* on the growth, protein content of skin mucus and

stress resistance of juveniles of the Porthole livebearer *Poecilopsis gracilis* (Poecilidae). Aquaculture Nutrition, 16(4): 407-411.

13. Hoseinifar, S.H., Roosta, Z., Hajimoradloo, A. and Vakili, F., 2015. The effects of *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). Fish and Shellfish Immunology, 42(2): 533-538.
14. Huhtanen, P., 1988. The effects of barley, unmolested sugar-beet pulp and molasses supplements on organic matter, nitrogen and fiber digestion in the rumen of cattle given a silage diet. Animal Feed Sciences Technology. 20, 259–278.
15. Kolangi Miandare, H., Farvardin, S., Shabani, A., Hoseinifar, S.H. and Ramezanpour, S.S., 2016. The effects of galactooligosaccharide on systemic and mucosal immune response, growth performance and appetite related gene transcript in goldfish (*Carassius auratus gibelio*). Fish and Shellfish Immunology, 55: 479-483.
16. Lara-Flores, M., Olivera-Castillo, L. and Olvera-Novoa, M.A., 2011. Effect of the inclusion of a bacterial mix (*Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*), and the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth, feed utilization and intestinal enzymatic activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). International Journal of Fisheries and Aquaculture, 2(4): 93-101.
17. Moosavi-Nasab, M., Ansari, S. and Montazer, Z., 2007. Fermentative production of lysine by Corynebacterium glutamicum from different carbon sources. Iran Agricultural Research. 26: 99–106.
18. Palaksha, K.J., Shin, G.W., Kim, Y.R. and Jung, T.S., 2008. Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish and Shellfish Immunology, 24(4): 479-488.
19. Roosta, Z., Hajimoradloo, A., Ghorbani, R. and Hoseinifar, S.H., 2014. The effects of dietary vitamin C on mucosal immune responses and growth performance in Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) fry. Fish Physiology and Biochemistry, 40(5), 1601-1607.
20. 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 *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. Diseases of Aquatic Organisms, 41(1), 43-51.
21. Sheikhzadeh, N., Heidarieh, M., Pashaki, A.K., Nofouzi, K., Farshbafi, M.A. and Akbari, M., 2012. Hilyses, fermented *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the growth performance and skin non-specific immune parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology, 32(6), 1083-1087.
22. Sheikhzadeh, N., Pashaki, A.K., Nofouzi, K., Heidarieh, M. and Tayefi-Nasrabadi, H., 2012. Effects of dietary Ergosan on cutaneous mucosal immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology, 32(3), 407-410.
23. Siwicki, A.K., 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish. II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (Ig) level in serum. Fish diseases diagnosis and preventions methods.
24. Soder, K.J., Hoffman, K. and Brito, A.F., 2010. Effect of molasses, corn meal, or a combination of molasses plus corn meal on ruminal fermentation of orchard grass pasture during continuous culture fermentation. Professional Animal Scientist. 26, 167–174.

25. Speare, D.J. and Ferguson, H.W., 2006. Gills and pseudo branchs. Systemic Pathology of Fish, 24-63.
26. Subramanian, S., MacKinnon, S.L. and Ross, N.W., 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 148(3), 256-263.
27. Verdegem, M.C.J., Hilbrands, A.D. and Boon, J.H., 1997. Influence of salinity and dietary composition on blood parameter values of hybrid red tilapia (*Oreochromis niloticus* & *Oreochromis mossambicus*). Aquaculture Research. 28, 453-459.