تاثیر کیتوزان جیره بر شاخص‌های رشد و پارامترهای خون‌شناسی در بچه‌ماهیان سفید (*Rutilus frisii kutum*, Kamenskii 1901)

- **معصومه کمالی‌نجف‌آباد*:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیطزیست، دانشگاه علوم کشاورزي و منابع طبيعي گرگان ، صندوق‌پستی: 49175-487
- **محمدرضا ایمانپور:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیطزیست، دانشگاه علوم کشاورزي و منابع طبيعي گرگان ، صندوق‌پستی:487-49175
- **وحید تقی‌زاده:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیطزیست، دانشگاه علوم کشاورزي و منابع طبيعي گرگان، صندوق‌پستی: 487-49175
- **علیرضا عالیشاهی:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیطزیست، دانشگاه علوم کشاورزي و منابع طبيعي گرگان ، صندوق‌پستی: 487-49175

تاریخ دریافت: اسفند 1392 تاریخ پذیرش: خرداد 1393

چکیده

مطالعه حاضر به‌منظور ارزیابي اثرکیتوزان به‌عنوان یک محرک ایمنی بر شاخص‌های رشد و پارامترهای خون‌شناسی در بچه‌ماهیان سفید (*Rutilus frisii kutum*) انجام شد. این تحقیق با استفاده از طرح کاملاً تصادفی شامل سطوح صفر، 0/25، 0/5، 1 و 2 گرم کیتوزان به ازای هر کیلوگرم جیره تجاری ماهی سفید با سه تکرار طراحی شد. بچه‌ماهیان سفید با میانگین وزنی 0/15 ± 1/76 گرم در آکواریوم به‌مدت 8 هفته با جیره‌های آزمایشی تا حد سیری تغذیه شدند. پارامترهای اندازه‌گیری شده شامل معیارهای رشد (وزن نهایی، نرخ رشد ویژه، فاکتور وضعیت و افزایش وزن بدن)، شاخص تغذیه‌ای (ضریب تبدیل غذا) بود. در پایان دوره آزمایش پارامترهای هماتولوژیک خون بچه‌ماهیان مورد بررسی قرارگرفت و خون‌گیری از ساقه دمی ماهیان به‌عمل آمد. نتایج به‌دست آمده از نظر شاخص‌های رشد تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها نشان نداد (P>0/05) اما نتایج از نظر شاخص تغذیه‌ای (ضریب تبدیل غذایی) و فاکتور خون‌شناسی تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها نشان داد (P< 0/05). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد کیتوزان در سطح 2 گرم می‌تواند بر ارتقاء گلبول سفید خون و در سطح 1 گرم بر بهبود ضریب تبدیل غذایی در بچه‌ماهیان سفید تاثیرگذار باشد.

کلمات کلیدی: کیتوزان، رشد، پارامترهای خون‌شناسی، بچه ماهیان سفید (*Rutilus frisii kutum*)

مقدمه

ماهی سفید با نام علمی (*Rutilus frisii kutum*) از خانواده کپور ماهیان، یکی از مهم‌ترین و با ارزش‌ترین ماهیان استخوانی تجاري و اقتصادي درياي خزر است (Holchik، 1995). این ماهی تنها در درياي خزر وجود دارد و زیستگاه اصلی آن مربوط به بخش جنوبی درياي خزر به‌خصوص سواحل ایران می‌باشد (Razavi Sayad، 1995). آمار صید ماهی سفید در سواحل ایرانی دریای خزر نشان می‌دهد که این ماهی رقم عمده صید صیادان منطقه را تشکیل می‌دهد. این میزان صید سالانه حاصل رهاکرد میلیون‌ها بچه‌ماهی توسط کارگاه‌های تکثیر و پرورش شیلات ایران است. لذا جهت بازسازی ذخایر این ماهی پس از تکثیر و پرورش لارو این ماهی با کیفیت خوب، نرخ بقا و رشد بالاتر می‌تواند موفقیت زندگی بچه‌ماهیان را پس از رهاسازی و ورود به دریا تضمین نموده و درصد بازماندگی را افزایش دهد (Ahmadifar و همکاران، 2009).

آلودگی‌های زیست‌محیطی، صید بیش از حد ذخایر، کاهش ضریب بازگشت بچه‌ماهیان رهاسازی شده و همچنین کاهش میانگین وزن متوسط مولدین در ده ساله اخیر از عوامل متعددی است که میزان ذخایر ماهی سفید را به‌شدت تحت تاثیر قرار داده است (فلاحي و همکاران، 1383). بدین جهت پرورش این گونه از طریق فرموله کردن غذای مناسب اهمیت پیدا کرده است (نویریان همکاران، 1383).

تغذیه یکی از اساسی‌ترین محدودیت‌ها و عامل پر-هزینه در پرورش گونه‌ها و یا رهاسازی در محیطهای

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: masume.kamali91@yahoo.com

طبیعی می‌باشد؛ لذا با آگاهی از نیازمندی‌های تغذیه‌ای بچه-ماهی سفید و استفاده از انواع مواد مغذی و مکمل‌های غذایی مرغوب که در بالا بردن راندمان سیستم ایمنی نقش دارند شاید بتوان تا حد زیادی میزان بقا، میل تغذیه و رشد آن را به خصوص در دوران قبل از رهاسازی افزایش داد (اکرمي و همکاران، 1387).

استفاده از محرک‌های ایمنی در ماهی می‌تواند مقاومت ماهی را در برابر شرایط نامساعد محیطی و عوامل بیماری‌زا در مقایسه با روش‌های دیگر درمانی بهبود ببخشد (Sakai، 1999). کیتوزان تجاری توسط دی-استیله شدن کیتین که عنصر ساختاری در اسکلت خارجی سخت‌پوستان همچون خرچنگ و میگو و دیواره سلول‌های قارچ است، تولید می‌شود. به‌طور متوسط، وزن مولکولی کیتوزان تجاری تولیدی 3800 تا 20000 دالتون است. گروه آمینه در کیتوزان منجر به تولید محلول اسیدی خنثی با چگالی وابسته به pH می‌شود، که باعث می‌شود کیتوزان قابل حل در آب و ماده چسبناک زیستی که به آسانی به سطوح باردار منفی مانند موکوس متصل شوند (Zhuangdong، 2007). Romeran و همکاران (2002) و Kim و همکاران (2005) در بررسی‌های خود نشان دادند که کیتوزان خواص رشد و تحریک کننده سیستم ایمنی در حیوانات آبزی با حلالیت کیتین در آب و دیگر حلال‌های مشابه دارد. Meshkini و همکاران (2012) در مطالعات خود به این نکته اشاره کردند که کیتوزان دارای خواص تحریک کننده سیستم ایمنی در گونه‌های مختلف ماهیان است.

Teitelbaum و Walker (2002)؛ Gibson و Roberfroid (1995) اشاره کردند که شواهد و مدارکی از اثرات سودمند پروبیوتیک‌ها پیدایشی از مفهوم پربیوتیک‌ها را نشان می‌دهدکه به‌عنوان مجموعه‌ای از الیگوساکاریدها با وزن مولکولی کم طبقه‌بندی شده و به‌طورکلی نمی‌توانند توسط ماهی هضم شوند اما با ارتقاء باکتری‌های سالم در دستگاه گوارش میزبان متابولیزه می‌شوند. به‌همین نسبت در مطالعات Ringo و همکاران (2010)؛ Luo و همکاران (2009) اثرات مفید برخی از الیگوساکاریدها در ماهی نشان داده شده است. Li و همکاران (2007) اظهار داشتند که کیتوزان‌الیگوساکارید (cos) یک نوع الیگوساکاریدی است که از هیدرولیز آنزیمی و شیمیایی کیتوزان به‌دست آمده است. cos فعالیت بالاتر و عملکردهای فیزیولوژیکی بالاتر از کیتوزان دارد که به‌علت وزن مولکولی پایین‌تر و یا قابلیت انحلال سریع آن در آب است. در واقع، برخی مطالعات در رابطه با cos بر روی خوک‌ها توسط Han و همکاران (2007)، جوجه‌های گوشتی توسط Li و همکاران (2007) و یا ماهی توسط Hoffman و همکاران (1997)؛ Luo و همکاران (2009) مورد بررسی قرار گرفته و اثرات مفیدی بر روی عملکرد رشد، ایمنی و پروفیل خون گزارش شده است.

کیتوزان برنامه‌های کاربردی بسیاری در پزشکی، کشاورزی و آبزی‌پروری دارد. در آبزی‌پروری، کیتوزان به‌عنوان ایمنی برای محافظت از آزادماهیان در برابر بیماری‌های باکتریایی در بررسی‌های Anderson و Siwicki (1994)؛ Siwicki و همکاران (1994)، افزایش انفجار تنفسی و فعالیت فاگوسیتوز در ماهی سیم سر طلایی gilthead sea Bream (*Sparus Auratus*) در مطالعات Esteban و همکاران (2000)؛ Ortuno و همکاران (2000)؛ و Esteban و همکاران (2001)؛ Cuesta و همکاران (2003)، غوطه‌وری و رژیم غذایی مکمل در گزارش‌های Kono و همکاران (1987)؛ Kawakami و همکاران (1998) مورد استفاده قرار گرفته است، با این حال Shiau و Yu (1999) رشد افسرده تیلاپیا را پس از تغذیه کیتین و کیتوزان گزارش دادند.

لذا با توجه به موارد فوق، تحقیق حاضر با هدف بررسی اثرات سطوح متفاوت کیتوزان در جیره غذایی بچه‌ماهیان سفید بر عملکرد رشد جهت تسریع و افزایش رشد و در نتیجه کاهش مدت زمان نگهداری بچه‌ماهیان برای رسیدن به وزن رهاسازی یا رهاسازی بچه‌ماهیان با اوزان بالاتر به‌منظور افزایش بازگشت شیلاتی آن‌ها و کاهش هزینه تولید و همچنین تاثیر کیتوزان بر فاکتورهای خون‌شناسی و در انتها تولید بچه‌ماهیان مقاوم در برابر استرس و شرایط محیطی در طول دوره پرورش انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

محل اجرا و روش آزمایش: این آزمایش در تابستان 1392 به‌مدت 8 هفته اجرا شد. برای این منظور بچه‌ماهیان سفید از مرکز تکثیر و پرورش ماهی کلمه سیجوال (بندر ترکمن) تهیه و به مرکز آبزی‌پروری شهید ناصر فضلی-برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند. پس از سازگاری اولیه بچه‌ماهیان به‌مدت 3 هفته با غذای کنسانتره تجاری (جدول1)، تعداد 525 قطعه بچه‌ماهی با وزن متوسط 1/76±0/15 گرم در 15 آکواریوم 70 لیتری که با حدود 40 لیتر آب پر شده بودند، با تراکم 35 عدد در هر آکواریوم کشت شدند. جهت تامین هوادهی و نیاز اکسیژنی ماهیان، به هر یک از آکواریوم‌ها یک سنگ هوا که به منبع هواده متصل بود، نصب گردید.

طرح آزمایش: این تحقیق با استفاده از طرح کاملاً تصادفی شامل چهار سطح 0/25، 0/5، 1 و 2 گرم کیتوزان به ازای هر کیلوگرم جیره تجاری ماهی سفید در پنج تیمار با سه تکرار برطبق روش Meshkini و همکاران (2012) طراحی شد.

کیتوزان مصرفی: کیتوزان پلیمر دی – گلوکزآمین با نام علمی (poly(β-D(1-4)-2-amino-2-deoxy-α-glucan) پس از دی‌استیله شدن از کیتین با نام شیمیایی (poly(β-D(1-4)-N-acetly-glucosamine) به‌دست می‌آید (Goorge و Roberts Roberts، 1992). کیتین ماده‌ای سخت با ساختار کریستالی و سفیدرنگ است که به‌مقدار زیاد در پوسته سطحی سخت‌پوستان و حشرات و دیواره سلولی قارچ‌ها وجود دارد. منبع اصلی تولید صنعتی کیتین در دنیا، ضایعات پوسته حاصل از صنایع فرآوری میگو و خرچنگ است (Steckel و Nogly، 2003؛

Shahidi و Synwieki، 1991). غالباً کیتوزان را به‌عنوان ماده کیتینی با درصد استیلاسیون بالای50 درصد می‌شناسند. کیتوزان‌های تجاری معمولاً درصد دی‌استیلاسیون بیش از 70 درصد و وزن مولکولی بین 10 هزار تا 1/2 میلیون دالتون دارند (No و همکاران، 2002؛ Benjakul و همکاران، 2000).

آماده‌سازی جیره‌های آزمایشی: فرمولاسیون جیره پایه و تجزیه و تحلیل ترکیب تقریبی آن بر طبق روش AOAC (1990) در (جدول 1) نشان داده شده است. جیره پایه به‌عنوان جیره شاهد استفاده شد. کیتوزان با درجه دی‌استیلاسیون (DD) 90% و وزن مولکولی (Mw) 10 کیلودالتون (وزن مولکولی کم) مطابق با روش Alishahi و همکاران (2011) تهیه شد. چهار جیره آزمایشی به مکمل حاوی 0/25، 0/5، 1 و 2 گرم کیتوزان به ازای هر کیلوگرم جیره اضافه شد. 0/75 گرم ژلاتین به ازای هر کیلوگرم غذا هم به جیره‌های آزمایشی اضافه شد، همچنین ژلاتین به جیره شاهد هم اضافه شد تا شرایط مشابهی با سایر جیره‌ها داشته باشد. بعد از اسپری کردن کیتوزان بر روی جیره تجاری، پلیت‌ها در دمای اتاق به‌مدت 2 ساعت خشک شدند و سپس در دمای 4 درجه سانتی‌گراد در یخچال نگه‌داری شدند. تغذیه بچه‌ماهیان در تیمارهای شاهد و آزمایشی براساس 3% وزن بدن آن‌ها محاسبه شده و روزانه در 3 نوبت به‌مدت 8 هفته به آن‌ها غذا داده شد.

محل اجرا و روش آزمایش: این آزمایش در تابستان 1392 به‌مدت 8 هفته اجرا شد. برای این منظور بچه‌ماهیان سفید از مرکز تکثیر و پرورش ماهی کلمه سیجوال (بندرترکمن) تهیه و به مرکز آبزی‌پروری شهید ناصر فضلی‌برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند. پس از سازگاری اولیه بچه‌ماهیان به‌مدت 3 هفته با غذای کنسانتره تجاری (جدول1)، تعداد 525 قطعه بچه‌ماهی با وزن متوسط 0/15± 1/76گرم در 15 آکواریوم 70 لیتری که با حدود 40 لیتر آب پر شده بودند، با تراکم 35 عدد در هر آکواریوم کشت شدند. جهت تامین هوادهی و نیاز اکسیژنی ماهیان، به‌هر یک از آکواریوم‌ها یک سنگ هوا که به منبع هواده متصل بود، نصب گردید.

طرح آزمایش: این تحقیق با استفاده از طرح کاملاً تصادفی شامل چهار سطح 0/25، 0/5، 1 و 2 گرم کیتوزان به ازای هر کیلوگرم جیره تجاری ماهی سفید در پنج تیمار با سه تکرار برطبق روش Meshkini و همکاران (2012) طراحی شد.

جدول 1: ترکیبات شیمیایی جیره تجاری ماهی سفید

تجزیه تقریبی جیره	درصد ماده خشک
ماده خشک	82/46
پروتئین خام	42/39
چربی خام	17/19
خاکستر	6/56
فیبر	5/1

شاخص‌های رشد: زیست سنجی ماهیان هر دو هفته یک بار صورت گرفت. جهت اندازه‌گیری وزن از ترازوی دیجیتال با دقت 0/01 گرم و جهت اندازه‌گیری طول از خطکش با دقت 1 میلی‌متر استفاده شد و براساس اطلاعات ثبت شده شاخص‌های رشد نظیر وزن نهایی، نرخ رشد ویژه (SGR)، فاکتور وضعیت (CF)، افزایش وزن بدن و پارامترهای‌تغذیه‌ای مثل‌ضریب‌تبدیل غذایی (FCR) محاسبه شد (Hatlen و همکاران، 2005):

میانگین وزن ابتدای دوره به گرم - میانگین وزن انتهای دوره به گرم = افزایش وزن بدن

(زمان/لگاریتم طبیعی میانگین وزن اولیه به گرم - لگاریتم طبیعی میانگین وزن نهایی به گرم) × 100 = ضریب رشد ویژه

[(میانگین طول انتهای دوره به سانتی‌متر^3) / (میانگین وزن انتهای دوره به گرم)] × 100 = شاخص وضعیت

افزایش وزن بدن (گرم) / مقدار غذای خورده شده (گرم) = ضریب تبدیل غذایی

نمونه‌گیری و خون‌گیری: نمونه‌گیری از بچه‌ماهیان سفید با میانگین وزنی 4 گرم جهت تعیین فاکتورهای خون‌شناسی در انتهای دوره پرورش صورت گرفت. 24 ساعت قبل از خون‌گیری تغذیه ماهیان قطع شد و سپس 8 ماهی به ظاهر سالم (به ازای هر تکرار) به‌طور تصادفی انتخاب شدند و از ورید ساقه دمی آن‌ها خون‌گیری به‌عمل آمد و داخل ظروف حاوی ماده ضدانعقاد هپارین جمع‌آوری شد.

روش اندازه‌گیری: آزمایش‌های هماتولوژی روی خون حاوی ماده ضدانعقاد هپارین انجام گرفت. فاکتورهای خون‌شناسی مورد مطالعه به‌روش توصیه شده توسط Feldman و همکاران (2000) شامل تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، تعداد گلبول‌های سفید (WBC)، هماتوکریت (HCT)، هموگلوبین (HGB)، حجم متوسط گلبولی (MCV)، هموگلوبین متوسط گلبولی (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) بود.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (One- Way ANOVA) با استفاده از آزمون دانکن و با کمک نرم‌افزارهای spss (نسخه 16) و Excel انجام پذیرفت و نتایج به‌صورت میانگین±انحراف معیار ارائه شده‌اند و سطح اطمینان 95 درصد به‌عنوان معیار معنی‌دار بودن اختلاف از نظر آماری در نظر گرفته شد.

نتایج

میانگین مقادیر اندازه‌گیری شده اکسیژن محلول، درجه حرارت، pH و شوری در آکواریوم‌های پرورش طی روزهای مختلف در جدول2 نشان داده شده است:

جدول 2: میانگین و انحراف معیار مقادیر اندازه‌گیری شده اکسیژن

محلول، درجه حرارت، pH و شوري در آکواریوم‌هاي پرورش

اکسیژن‌محلول (ميلي‌گرم برليتر)	دمای آب (درجه‌سانتی‌گراد)	pH	شوري (ppt)
5/9±0/06	25/53±0/11	7/71±0/1	0/2±0

اعداد به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.

تاثیر کیتوزان برروی برخی از شاخص‌های رشد بچه‌ماهیان سفید در جدول 3 ارائه شده است.

نتایج نشان داد که کیتوزان نتوانسته به‌طور معنی‌داری بر روی برخی از شاخص‌های رشد در بچه‌ماهیان سفید تاثیر بگذارد (P>0/05)، در میانگین وزن نهایی، افزایش وزن انفرادی بدن، نرخ رشد ویژه و فاکتور وضعیت اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد وجود نداشت. اما کیتوزان تاثیر معنی‌داری بر شاخص تغذیه‌ای (ضریب تبدیل غذایی) داشته است (P<0/05) (جدول 3). این نتایج نشان داد بچه‌ماهیان سفید در تیمار چهارم (1 گرم بر کیلوگرم کیتوزان در جیره) از ضریب تبدیل غذایی بهتری برخوردار می‌باشند به‌طوری که در این تیمار کم‌ترین مقدار 2/14 در مقایسه با سایر تیمارها به‌دست آمد (P<0/05).

تاثیر کیتوزان بر روی برخی از پارامترهای خون‌شناسی بچه‌ماهیان سفید در جدول 4 ارائه شده است.

نتایج نشان داد که کیتوزان توانسته به‌طور معنی‌داری بر میزان گلبول سفید خون در بچه‌ماهیان سفید تاثیر بگذارد (جدول 4)، به‌طوری‌که میزان گلبول سفید (WBC) در ماهیان تیمار پنجم با بیش‌ترین سطح کیتوزان 2 گرم به‌ازای هرکیلوگرم جیره

جدول3: مقایسه شاخص‌های رشد (میانگین ± انحراف معیار) بچه‌ماهیان سفید پرورشی در تیمارهای مختلف طی8 هفته پرورش

شاخص / تیمار	شاهد	0/25 (گرم برکیلوگرم)	0/5 (گرم برکیلوگرم)	1 (گرم بر کیلوگرم)	2 (گرم بر کیلوگرم)
وزن اولیه (گرم)	1/88 ± 0/10 a	1/71 ± 0/09 a	1/73 ± 0/10 a	1/74 ± 0/23 a	1/73 ± 0/26 a
وزن نهایی (گرم)	3/58 ± 0/21 a	3/42 ± 0/17 a	3/44 ± 0/29 a	3/62 ± 0/19 a	3/44 ± 0/31 a
افزایش وزن انفرادی بدن (گرم)	1/70 ± 0/13 a	1/71 ± 0/19 a	1/70 ± 0/25 a	1/87 ± 0/11 a	1/70 ± 0/43 a
ضریب تبدیل غذایی	2/35 ± 0/07 a	2/34 ± 0/16 a	2/35 ± 0/08 a	2/14 ± 0/13 b	2/34 ± 0/17 a
نرخ رشد ویژه	1/15 ± 0/06 a	1/23 ± 0/13 a	1/21 ± 0/13 a	1/31 ± 0/16 a	1/23 ± 0/35 a
فاکتور وضعیت	0/85 ± 0/13 a	0/96 ± 0/11 a	0/92 ± 0/13 a	0/84 ± 0/08 a	0/85 ± 0/03 a

حروف مشابه در یک ردیف دارای اختلاف معنی‌داری نمی‌باشند (P>0/05).

جدول4: متغیرهای خون‌شناختی (میانگین ± انحراف معیار) بچه‌ماهیان سفید تغذیه شده با سطوح متفاوت کیتوزان در جیره تجاری

فاکتورهای خونی / تیمار	شاهد	0/25 (گرم‌برکیلوگرم)	0/5 (گرم‌برکیلوگرم)	1 (گرم بر کیلوگرم)	2 (گرم بر کیلوگرم)
گلبول سفید (میکرولیتر/ 10^3)	7/16 ± 2/88 c	7/30 ± 1/73 c	7/56 ± 3/05 c	8/23 ± 1/52 b	8/73 ± 2/08 a
گلبول قرمز (میکرولیتر/10^3)	2/48 ± 0/14 a	2/32 ± 0/13 a	2/52 ± 0/05 a	2/44 ± 0/09 a	2/44 ± 0/16 a
هموگلوبین (دسی‌لیتر/گرم)	10/87 ± 0/89 a	9/75 ± 1/06 a	11/13 ± 0/47 a	10/60 ± 0/50 a	10/60 ± 0/78 a
هماتوکریت (درصد)	37/66 ± 2/46 a	34/70 ± 3/53 a	38/86 ± 1/19 a	37/20 ± 1/86 a	37/23 ± 2/55 a
حجم متوسط گلبولی (فمتولیتر)	1/51 ± 1/10 a	1/49 ± 6/57 a	1/53 ± 1/75 a	1/52 ± 2/22 a	1/52 ± 1/25 a
هموگلوبین متوسط گلبولی (پیکوگرم)	43/73 ± 1/01 a	41/9 ± 2/12 a	44/03 ± 0/98 a	43/40 ± 0/75 a	43/33 ± 0/35 a
غلظت‌متوسط‌هموگلوبین‌گلبول‌های قرمز (دسی‌لیتر/گرم)	28/83 ± 0/49 a	28/36 ± 0/47 a	28/66 ± 0/35 a	28/50 ± 0/20 a	28/46 ± 0/40 a
نوتروفیل (درصد)	8/66 ± 1/15 a	7/33 ± 0/57 a	7/66 ± 0/57 a	8/00 ± 1/00 a	8/66 ± 1/52 a
لنفوسیت (درصد)	90/33 ± 1/15 a	91/33 ± 0/57 a	91/00 ± 1/00 a	91/00 ± 0 a	90/00 ± 1/00 a
ائوزینوفیل (درصد)	1/00 ± 0 a	1/33 ± 0/57 a	1/50 ± 0/70 a	2/00 ± 0 a	1/33 ± 0/57 a

اعدادی که در هر ردیف دارای حروف غیرمشابه هستند اختلاف معنی‌داری دارند (P<0/05).

به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد (P<0/05) و در گروه شاهد و تیمار دوم و سوم بدون هیچ اختلاف معنی‌داری کم‌ترین میزان به‌دست آمد. اما در میزان گلبول‌های قرمز (RBC)، هماتوکریت (HCT)، هموگلوبین (HGB)، حجم متوسط گلبولی (MCV)، هموگلوبین متوسط گلبولی (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها با گروه شاهد مشاهده نشد (P>0/05). همچنین درصد نوتروفیل، لنفوسیت و ائوزینوفیل نیز تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها با گروه شاهد نداشت (P>0/05).

بحث

در سال‌های اخیر آبزی‌پروری از سریع الرشدترین بخش‌های تولید غذا بوده و در کنار این رشد قابل توجه همواره با مشکلاتی روبه‌رو بوده است که از جمله آن می‌توان به تغییرات کیفیت آب، شیوع بیماری‌ها و مشکلات تغذیه‌ای اشاره کرد، به گونه‌ای که شیوع بیماری‌ها به‌عنوان مشکل عمده آبزی‌پروری، گسترش اقتصاد این بخش را در بسیاری از کشورهای جهان تحت تأثیر قرار داده است و

همواره راه حل‌هایی نیز برای برطرف کردن این مشکلات ارائه شده است که موفقیت چندانی نداشته‌اند (Mohamadi Azarm و همکاران، 2004).

نتایج به‌دست آمده در بررسی حاضر مبین این موضوع است که جایگزینی کیتوزان در جیره غذایی بچه-ماهیان سفید تفاوت معنی‌داری روی وزن نهایی، افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه، فاکتور وضعیت نداشته است اما تاثیر معنی‌داری بر ضریب تبدیل غذایی داشته است.

اثرات مکمل کیتوزان در رژیم غذایی بر رشد با چند گونه پرورشی با نتایج متفاوت مورد بررسی قرار گرفته است. برطبق نتایج Gopalakannan و Arul (2006)، مکمل کیتوزان در رژیم غذایی باعث افزایش رشد کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) Common carp شده است. علاوه بر این، کیتوزان پوشش داده شده در رژیم غذایی به‌منظور ارتقاء رشد در کفشک‌ماهی زیتونی (*Paralichthys olivaceus*) olive flounder توسط Cha و همکاران (2008) مورد بررسی قرار گرفته است. درحالی‌که Kono و همکاران (1987) گزارش دادند که کیتوزان در رژیم غذایی رشد قابل توجه‌ای در رشد ماهی دریای سرخ(*Pagellus bgaoraveo*) red sea bream ، مارماهی‌ژاپنی(*Anguilla japonica*) Japanese eel و دم‌زرد (*Seriola lalani*) yellow tail نداشته است. در مقابل Shiau و Yu (1999) رشد افسرده را در تیلاپیا (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) tilapia تغذیه شده با کیتوزان در رژیم غذایی مشاهده کردند. تا به امروز، هیچ توضیح دقیق در مورد عملکرد COS که چگونه میزان رشد مخصوص حیوانات را افزایش می‌دهد وجود ندارد.

مطالعات قبلی با استفاده از کیتوزان در رژیم غذایی به‌عنوان یک محرک ایمنی برای محافظت از آزادماهیان در برابر بیماری‌های باکتریایی توسط Anderson و Siwicki (1994)، افزایش انفجار تنفسی و فعالیت فاگوسیتوز در ماهی سیم سرطلایی توسط Cuesta و همکاران (2003)؛ Esteban و همکاران (2001) انجام شد. Zhang و همکاران (1999) گزارش دادند کیتوزان اولیگوساکاریدها (COS) به‌عنوان مشتقات از کیتوزان، زیست سازگاری و انحلال‌پذیری بهتری دارند. به این دلایل، فعالیت‌های زیستی COS در پژوهش‌های اخیر مورد توجه است. در گزارش Shiau و Yu (1999) رشد افسرده در تیلاپیا به این علت است که فیبر می‌تواند به یک جیره غذایی اضافه شده یا به-عنوان یک مقدار معادل در اجزای جیره غذایی جایگزین شود مثل نشاسته و یا به جیره کل اضافه شود. Southgate (1973) اظهار داشت زمانی که فیبر جایگزین شود انرژی قابل توجه را تامین نمی‌کند و درصدهایی از مواد مغذی، به‌جز انرژی موادغذایی، ثابت باقی می‌ماند، اما نسبت پروتئین/کالری تغییر می‌کند. در مقابل، اضافه کردن (محلول) به فیبر می‌تواند نسبت پروتئین/کالری را ثابت نگه داشته اما نسبت مواد مغذی کاهش می‌یابد. در مطالعه اخیر، رقیق سازی کیتین و کیتوزان اجازه برای ثابت بودن نسبت پروتئین/کالری بوده است. به‌نظر می‌رسد کاهش در مقدار مواد مغذی داده شده به ماهی یک عامل کمک‌کننده به کاهش رشد تیلاپیا بوده است.

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که جایگزینی کیتوزان در جیره غذایی بچه‌ماهیان سفید تفاوت معنی‌داری روی هیچ‌یک از شاخص‌های رشد نداشته اما بر شاخص تغذیه‌ای (ضریب تبدیل غذایی) تفاوت معنی‌دار داشته است. در مجموع اختلاف موجود در نتایج این تحقیق با یافته‌های دیگر محققان را احتمالاً بتوان به نوع گونه پرورشی، اندازه، سن گونه پرورشی، طول دوره پرورش، شرایط محیطی، رفتارهای تغذیه‌ای، خصوصیات فیزیولوژیک، نوع مواد اولیه به‌کار رفته در تهیه جیره و کمیت و کیفیت وابسته باشد.

در مطالعه حاضر، WBC به‌طور قابل توجهی پس از 8 هفته در ماهیان تغذیه شده با 2 گرم کیتوزان در کیلوگرم جیره غذایی افزایش یافته است. در مطالعه حاضر میزان RBC، HCT، HGB، MCV، MCH و MCHC در ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف کیتوزان در رژیم‌های غذایی بعد از 8 هفته آزمایش اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.

Meshkini و همکاران (2012) بیان کردند که مکمل کیتوزان در جیره غذایی به‌میزان (2% و 0/5%) تعداد گلبول‌های سفید خون را در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به-مدت 8 هفته افزایش داد. سطح WBC در ماهی کپورمعمولی تغذیه شده با مکمل کیتین و کیتوزان در رژیم غذایی برعلیه *آئروموناس هیدروفیلا* در بررسی Gopalakannan و Arul (2006) افزایش یافته است. Awad و Austin (2010)؛ Nya و Austin (2011)؛ Sahu و همکاران (2007) در رابطه با مطالعه قبلی مشاهده کردند که در *Labeo rohita* تغذیه شده با رژیم غذایی مکمل سیر تعداد گلبول‌های قرمز، لوکوسیت‌ها و NBT و فعالیت سرم باکتری در برابر *آئروموناس هیدروفیلا* افزایش یافته است.

Hawk و همکاران (1954) گزارش دادند تغییرات در گلبول‌های قرمز و هموگلوبین منسوب به گروه شاهد در شرایط کم‌خونی ناشی می‌شود. در ماهی درمان نشده، سطح پایین RBC، HCT و غلظت هموگلوبین نشان داد که گلبول‌های قرمز هستند که توسط لکوسیتوز بعد از آن اریتروبلاستوسیت تخریب شدند درحالی Holeton و Randall (1967) اظهار داشتند که افزایش سطح HCT به-عنوان یک نتیجه از کمبود اکسیژن ناشی شده است. افزایش MCV ممکن است به تورم گلبول‌های قرمز و در نتیجه کم-خونی ماکروسیتیک و یا اختلال در تعادل آب (استرس اسمزی) یا کم‌خونی ماکروسیتیک در ماهی در معرض استرس نسبت داد (Tort و همکاران، 1988)؛ این می‌تواند میل به اکسیژن را در خون افزایش دهد (Soivio و Nikinmaa، 1981). تعداد لنفوسیت، نوتروفیل و ائوزینوفیل اختلاف معنی‌داری در رژیم غذایی مکمل کیتوزان پس از 8 هفته در مقایسه با گروه شاهد نداشته است. مشابه آن Meshkini و همکاران (2012) مشاهده کردند که تعداد مونوسیت و ائوزینوفیل در هر گروه از ماهیان تغذیه شده با کیتوزان افزایش نیافت. درصد

نوتروفیل در ماهیان تغذیه شده با 0/25% کیتوزان کاهش پیدا کرد.

درحالي‌که بیش‌تر بررسی‌ها در مورد اثرات تحریك-کنندگي کیتوزان متمرکز شده‌اند. از سوي دیگر هیچ‌گونه بررسي علمي در زمینه کاربرد کیتوزان در جیره غذایي بچه‌ماهیان سفید و تعیین اثرات آن بر شاخص‌هاي رشد و تغییرات مربوط به شاخص‌هاي خون در این گونه در ایران به‌عمل نیامده است.

براي افزایش میزان مقاومت در برابر ابتلا به بیماری-ها و کاهش میزان مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، امروزه افزودن محرك‌هاي ایمنی به غذاها رایج شده است که این افزودنی‌ها موجب فعال شدن گلبول سفید و افزایش سلامت روده گردیده و به‌وفور در پرورش طیور و سایر دام‌هاي پرورشی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Romeranو همکاران، 2002). تعداد گلبول‌هاي سفید و ترکیب آن ازجمله لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها از شاخص‌هاي مهم سلامتی ماهی و یکی از بخش‌هاي اصلی سیستم ایمنی غیراختصاصی سلولی هستند (Ahmadifar و همکاران، 2009) که نشان‌دهنده وجود یا عدم وجود عفونت و نوع واکنش بدن به عفونت و دیگر عوامل فیزیولوژیک و پاتولوژیک می‌باشد (Serajian و همکاران، 2007) بنابراین، از مله ارزیابی‌هایی که باید پس از کاربرد محرک‌هاي ایمنی انجام داد، شمارش تعداد کل لوکوسیت‌ها و اریتروسیت‌ها و میزان تکثیر لنفوسیت‌ها در موجودات مورد آزمایش می‌باشد (Ahmadifar و همکاران، 2009). در این مطالعه بیش‌ترین میزان گلبول سفید که به-عنوان سد دفاعی بدن مطرح می‌باشد، در تیمار پنجم (2 گرم) کیتوزان به ازای هر کیلوگرم جیره به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر تیمارها بود. هماتوکریت به‌عنوان یک شاخص مهم و مفید و در عین حال ساده و سریع در ارزیابی کم‌خونی (Khadjeh و همکاران، 2008) همچنین در تعیین سلامت و بیماري ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد.

براساس یافته‌هاي موجود در این بررسی و یافته‌هاي دیگر پژوهشگران مشاهده می‌شود که فاکتورهایی مانند عوامل محیطی (فصول سال، شوري، دوره نوري، درجه حرارت وتراکم)، عوامل فیزیولوژیکی (گونه آبزي، سیکل تولیدمثلی و وضعیت بلوغ، سن، جنس) و شرایط تغذیه‌اي (زمان نمونه‌گیري، چگونگی تهیه نمونه، دقت و حساسیت روش‌هاي اندازه‌گیري) می‌توانند بر فعالیت پارامترهاي بیوشیمی خون تأثیر بگذارند و باعث اختلاف در تفسیر نتایج شوند (Williams و همکاران، 1976). همچنین فرمولاسیون جیره‌هاي غذایی، نوع پربیوتیک مصرفی، درجه خلوص پربیوتیک مصرفی(کیتوزان) و میزان مورد استفاده آن در جیره، روش‌هاي مختلف اضافه کردن کیتوزان به جیره و احتمالاً فلور میکروبی ویژه‌اي که قادر به استفاده از کیتوزان به عنوان سوبسترا هستند، به‌طور قابل ملاحظه-اي بر خصوصیات ریخت‌شناسی خون اثر می‌گذارند.

باتوجه به نتایج این تحقیق کیتوزان به‌عنوان یک محرک ایمنی در بچه‌ماهیان سفید تغذیه شده در سطح 2 گرم به ازای هر کیلوگرم جیره بر ارتقاء گلبول‌های سفید خون و در سطح 1 گرم بر بهبود ضریب تبدیل غذایی به‌طور معنی‌داری تاثیرگذار بوده، اما بر شاخص‌های رشد تفاوت معني‌داری را نشان نداد.

تشکر و قدرداني

از مسئولین محترم مرکز تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی سیجوال (بندرترکمن) و همچنین مسئولین آزمایشگاه آبزی پروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به جهت در اختیار قرار دادن امکانات و راهنمایی‌های لازم در این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. **اکرمی، ر.؛ حاجی‌مرادلو، ع.م.؛ متین‌فر، ع.؛ عابدیان کناری، ع.م. و علیمحمدی، ا.، 1387.** اثرات سطوح متفاوت پربیوتیک اینولین جیره غذایی بر شاخص‌های رشد، تغذیه، نرخ بازماندگی و ترکیب بدن فیل ماهیان جوان پرورشی. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، جلد 5، صفحات 55 تا 67.
2. **عمادی، ح.، 1365.** ماهی سفید، وضعیت گذشته و کنونی آن در آب‌های شمال ایران. سازمان تحقیقات شیلات ایران. صفحات 9 تا 16.
3. **فلاحی، م.؛ دقیق‌روحی، ج.؛ نهرور. م.ر.؛ مرادی‌چافی، م. و سرپناه. ع.، 1383.** بررسی رشد و بقاء لارو ماهی سفید با تغذیه روتیفر مقایسه آن با غذای کنسانتره. مجله پژوهش و سازندگی. شماره 63، صفحات 66 تا 71.
4. **نویریان، ح.؛ مصطفی‌زاده، س. و طلوعی، م.، 1383.** بررسی اثرات سطوح مختلف پروتئین بر روی معیارهای شاخص رشد بچه‌ماهی سفید جنوب دریای خزر. نشریه علمی پژوهشی دام و آبزیان وزارت تحقیقات جهاد کشاورزی. شماره 68، صفحات 38 تا 49.
5. **Ahmadifar, E.; Jalali, M.A.; Sudagar, M.; Azari takami, G.H. and Mohammadi Zaraj Abad, A., 2009.** Effects of AquaVac Ergosan on growth performance, survival and haematological factors in beluga (*Huso huso*) juvenile. Gorgan. J. Agri. Sci. Natur. Resources. Vol. 16, No. 1, pp: 72-80.
6. **Alishahi, A.; Mirvaghefi, A.; Tehrani, M. R.; Farahmand, H.; Koshio, S.; Dorkoosh, F.A. and Elsabee, M.Z., 2011.** Chitosan nanoparticle to carry vitamin C through the gastrointestinal tract and induce the non-specific immunity system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Carbohydrat Polymers. Vol. 86, pp: 142– 146.
7. **Anderson, D.P. and Siwicki, A.K., 1994.** Duration of protection against Aeromonas salmonicida in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion. Progressive Fish-Culturist. Vol. 56, pp: 258–261.
8. **AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990.** Official method of analysis AOAC, Washington DC, USA. 1263 P.

9. **Awad, E. and Austin, B., 2010.** Use of lupin, Lupinus perennis, mango, Mangifera indica, and stinging nettle, Urtica dioica, as feed additives to prevent Aeromonas hydrophila infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases. Vol. 33, pp: 413–420.
10. **Benjakul, S.; Viessanguan, W.; Tanaka, M.; Ishizaki, S.; Suthdham, R. and Sugpech, O., 2000.** Effect of chitin and chitosan on gelling properties of surimi from barred gar fish (*Hemiraphus far*.). J. Sci. Food Agric. Vol. 81, No. 1, pp: 102-108.
11. **Cha, S.H.; Lee, J.S.; Song, C.B.; Lee, K.J. and Jeon, Y.J., 2008.** Effects of chitosan coated diet on improving water quality and innate immunity in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture. Vol. 278, pp: 110–118.
12. **Cuesta, A.; Esteban, M.A. and Meseguer, J., 2003.** In vitro effect of chitin particles on the innate cellular immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata L*.). Fish Shell Immunology. Vol. 15, pp: 1–11.
13. **Esteban, M.A.; Mulero, V.; Cuesta, A.; Ortuno, J. and Meseguer, J., 2000.** Effects of injecting chitin particles on the innate immune responses of gilthead seabream (*Sparus aurata L.*). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 10, pp: 543–554.
14. **Esteban, M.A.; Cuesta, A.; Ortuno, J. and Meseguer, J., 2001.** Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin in gilhead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. Fish Shell Immunol. Vol. 11, pp: 303–315.
15. **Feldman, B.F.; Zinkl, J.G. and Jian, N.C., 2000.** Schalm's veterinary hematology. Lippincott Williams & Wilkins publication, Philadelphia. USA. 178 p.
16. **Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B., 1995.** Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition. Vol. 125, pp: 1401–1412.
17. **Goorge, A. and Roberts, F., 1992.** Chitin chemistry. In senior lecture in Dyeing Nottingham Polytechnic. The Macmilan press LTD. London, UK. 349 p.
18. **Gopalakannan, A. and Arul, V., 2006.** Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of Aeromonas hydrophila infection in ponds. Aquaculture. Vol. 255, pp: 179–187.
19. **Han, K.N.; Kwon, I.K.; Lohakare, J.D.; Heo, S. and Chae, B.J., 2007.** Chitooligosaccharides as an alternative to antimicrobials in improving performance, digestibility and microbial ecology of the gut in weanling pigs. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. Vol. 20, pp: 556–562.
20. **Hatlen, B.; Grisdale-Helland, B. and Helland, S.J., 2005.** Growth, feed utilization and body composition in two size groups of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed diets differing in protein and carbohydrate content. Aquacult. Vol. 249, pp: 401– 408.
21. **Hawk, P.B.; Oser, B.L. and Summerson, W.H., 1954.** Practical Physiological Chemistry. The Blakiston Company, Philadelphia. 237 p.
22. **Hoffman, J.; Johansen, A.; Steiro, K.; Gildberg, A.; Stenberg, E. and Bøgwald, J., 1997.** Chitooligosaccharides stimulate Atlantic salmon, *Salmo salar* L., head kidney leukocytes to enhanced superoxide anion production in vitro. Comparative Biochemistry and Physiology. Vol. 1, No. 118B, pp: 105–115.
23. **Holchik, J., 1995.** New fata on the ecology of kutum, *Rutilus frissi kutum* (Nordman, 1840) From the Caspian Sea. Ecology of Fresh Water Fish. Vol. 4, pp: 175-179.
24. **Holeton, G.F. and Randall, D.J., 1967.** Changes in blood pressure in the rainbow trout during hypoxia. Journal of Experimental Biology. Vol. 46, pp: 297–305.
25. **Kawakami, H.; Shinohara, N. and Sakai, M., 1998.** The non-specific immunostimulation and adjuvant effects of Vibrio anguillarum bacterin, M-glucan, chitin and Freund's complete adjuvant against Pasteurella piscicida infection in yellowtail. Fish Pathology. Vol. 33, pp: 287–292.
26. **Khadjeh, G.H.; Pyghan, R.; Mesbah, M. and Rasekh, R., 2008.** A comparative study on haematological parameters of culturing Benni (*Barbus sharpeyi*) and Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Ahvaz Irainian Vet. J. Vol. 4, No. 1, pp: 24-36.
27. **Kim, S.K. and Rajapakse, N., 2005.** Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. Carbohydr Polym. Vol. 62, No. 4, pp: 357-368.
28. **Kono, M.; Matsui, T. and Shimizu, C., 1987.** Effects of chitin, chitosan and cellulose as diet supplements on the growth of cultured fish. Nippon Suisan Gakkaishi. Vol. 53, pp: 125–129.

29. **Li, X.J.; Piao, X.S.; Kim, S.W.; Liu, P.; Wang, L.; Shen, Y.B.; Jung, S.C. and Lee, H.S., 2007.** Effects of chito-oligosaccharide supplementation on performance, nutrient digestibility, and serum composition in broiler chickens. Poultry Science. Vol. 86, pp: 1107-1114.
30. **Luo, L.; Cai, X.F.; He, C.; Xue, M.; Wu, X.F. and Cao, H.N., 2009.** Immune response, stress resistance and bacterial challenge in juvenile rainbow trouts Oncorhynchus mykiss fed diets containing chitosan-oligosaccharides. Current Zoology. Vol. 55, No. 6, pp: 416–422.
31. **Meshkini, S.; Tafy, A.A.; Tukmechi, A. and Farhangpajuh, F., 2012**. Effects of chitosan on hematological parameters and stress resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Veterinary Research Forum. Vol. 3, No. 1, pp: 49-54.
32. **Mohamadi Azarm, H.; Abedin Kenari, A.M. and Abtahi, B., 2004.** Effect of probiotic protexin on the growth and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iranian Journal of Marine Sciences. Vol. 3, pp: 69-75(In Persian).
33. **No, H.K.; Park, N.Y.; Lee, S.H. and Meyers, S.P., 2002.** Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. Int. J. Food Microbilogy. Vol. 74, pp: 65-72.
34. **Nya, E.J. and Austin, B., 2011.** Development of immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss, Walbaum*) to Aeromonas hydrophila after the dietary application of garlic. Fish & Shellfish Immunology. Vol. 30, pp: 845–850.
35. **Razavi Sayad, B., 1995.** *Rutilus frissii Kutum*. Iranian Fisheries Research Institute. 164 p. (In Persian).
36. **Ortuno, J.; Estban, M.A. and Meseguer, J., 2000.** High dietary intake of α- tocopherol acetate enhances the nonspecific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata L.*). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 10, pp: 293–307.
37. **Ringo, E.; Olsen, R.E.; Gifstad, T.O.; Dalmo, R.A.; Amlund, H. and Hemre, G.I., 2010.** Prebiotics in aquaculture: a review. Aquaculture Nutrition. Vol. 16, No. 2, pp: 117–136.
38. **Romeran, K.; Thu, B.J. and Evensen, O., 2002.** Immersion delivery of plasmid DNAII. A study of the potential of a chitosan based delivery system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. J Control Release. Vol. 85, pp: 215-225.
39. **Sado, R.J.; Bicudo, A.J.D.A. and Cyrno, J.E.P., 2008.** Feeding dietary mannan oligosaccharid to juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), has no effect on hematological parameters and showed decreased feed consumption. World. Aqu. Soc. Vol. 39, pp: 821-826.
40. **Sahu, S.; Das, B.K.; Mishra, B.K.; Pradhan, J. And Sarangi, N., 2007.** Effect of Magnifera indica kernel as a feed additive on immunity and resistance to Aeromonas hydrophila in Labeo rohita fingerlings. Fish & Shellfish Immunology. Vol. 23, pp: 109–118.
41. **Sakai, M., 1999.** Current research status of fish immune-stimulants. Aquaculture. Vol. 172, pp: 63-92.
42. **Serajian, S.H.; Zamini, A.A.; Yousefian, M.; Saeedi, A.A. and Jafari, A., 2007.** Comparing of some hematological parameters in Golden grey mullet (*Liza auratus*) Fishes in Caspian Sea. Azadshahr. J. Fisheries. Vol. 1, No. 4, pp: 51-60.
43. **Shahidi, F. and Synwieki, J., 1991.** Isolation and characterization of nutrients and value added products from snow crab *(Chinocete sopilio)* and shrimp *(Pandalus boreqlis)* processing discards. J. Agric. Food Chem. Vol. 39, No. 8, pp: 1532-1572.
44. **Shiau, S.Y. and Yu, Y.P., 1999.** Dietary supplementation of chitin and chitosan depresses growth in Tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. auratus*. Aquaculture. Vol. 179, pp: 439–446.
45. **Siwicki, A.K.; Anderson, D.P.; Rumsey, G.L., 1994.** Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Veterinary Immunology and Immunopathology. Vol. 41, pp: 125–139.
46. **Soivio, A. and Nikinmaa, M., 1981.** Kirjolohen fysiologisesta tilasto kuljetuksen ja sita seuraavan toipumisen aikana. (The physiological condition of rainbow trout during transport and the subsequent recovery period). Suomen Kalatalous. Vol. 49, pp: 49–56.
47. **Southgate, D.A.T., 1973.** Fiber and the other unavailable carbohydrate and their effect on the energy value of the diet. Proc. Nutr. Soc. Vol. 32, pp: 131–136.
48. **Steckel, H. and Nogly, F.M., 2003.** Production of chitosan pellets by extrusion/spherinization. European J. Pharm. Biophar. Vol. 46, pp: 1-6.
49. **Teitelbaum, J.E. and Walker, W.A., 2002.**

Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. Annual Review of Nutrition. Vol. 22, pp: 107–138.

50. **Tort, L.; Torres, P. and Hidalgo, J., 1988.** The effects of sublethal concentrations of cadmium on haematological parameters in the dogfish *Scyliorhinus canicula*. Journal of Fish Biology. Vol. 32, pp: 277–282.
51. **Williams, R.W. and Warner, M.C., 1976.** Some observation on the stained blood cellular elements of *Ictalurus punctatus*. J. Fish. Biol. Vol. 9, pp: 491-497.
52. **Zhang, H.; Du, Y.; Yu, X.; Mitsutomi, M. and Aiba, S., 1999.** Preparation of chitooligosaccharides from chitosan by a complex enzyme. Carbohydrate Research. Vol. 320, No. 3–4, pp: 257–260.
53. **Zhuangdong, Y., 2007.** Study on the synthesis and catalyst oxidation properties of chitosan bound nickel (II) complexes. J Agric Food Chem. Vol. 21, No. 5, pp: 22-24.