

## تاثیر ویتامین ریوفلاوین (B2) بر رشد و شاخص های ایمنی بچه ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*)

علیرضا عاشوری<sup>۱</sup>، میرحامدسیدحسینی<sup>۲</sup>، اسماعیل حسین نیا<sup>۱</sup>

۱- کارشناس ارشد شیلات، ایستگاه تحقیقات تاسماهیان دریای خزر چابکسر، گیلان، ایران. Alireza.ashouri52@gmail.com

۲- کارشناس ارشد شیلات، موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، بخش آبی پروری، گیلان، برشت، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۴ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۵

### چکیده

مقدمه و هدف: در این مطالعه تاثیر سطوح مختلف ویتامین ریوفلاوین بر شاخص های رشد، هماتولوژی و ایمنی بچه ماهی شیپ مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: تعداد ۱۲۰ عدد بچه ماهی شیپ با وزن ابتدایی  $30/6 \pm 1/28$  (گرم) با ۴ جیره غذایی (پروتئین: ۴۹ درصد، چربی: ۱۴ درصد و انرژی: ۲۱/۱ مگاژول در هر کیلوگرم) با الحاق ریوفلاوین در سطوح ۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی گرم/کیلوگرم (RB<sub>0</sub>، RB<sub>15</sub>، RB<sub>20</sub> و RB<sub>25</sub>) به مدت ۸ هفته تا حد سیری مورد تغذیه قرار گرفتند. بیومتری در فواصل ۱۵ روز انجام گرفت. در پایان دوره تغذیه از ماهیان نمونه خون گرفته و جهت سنجش شاخص های ایمنی به آزمایشگاه ارسال شد.

یافته ها: الحاق ریوفلاوین به جیره موجب افزایش معنی دار وزن نهایی در مقایسه با تیمار شاهد گردید (p < ۰/۰۵). درصد افزایش وزن و ضریب رشد ویژه در ماهیان تغذیه شده با جیره ۲۰ میلی گرم ریوفلاوین در کیلوگرم (RB<sub>20</sub>) به طور معنی داری بیش از ماهیان تیمار شاهد و ماهیان این گروه آزمایشی بیشترین نسبت بازده پروتئین و کمترین ضریب تبدیل غذا را دارا بودند (p < ۰/۰۵). هم چنین نتایج بیان گر این نکته می باشند که ریوفلاوین اضافه شده به جیره بر سیستم ایمنی ماهیان تاثیر گذار است، به نحوی که تعداد گلبول سفید و فعالیت کامپلیمنت CH<sub>50</sub> در ماهیان تغذیه شده از جیره الحاقی ریوفلاوین به میزان ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم (RB<sub>20</sub>) به طور معنی داری بر ماهیان تیمار شاهد برتری دارد (p < ۰/۰۵).

نتیجه گیری: نتایج این آزمایش نشان می دهد که افزودن ریوفلاوین به جیره فرموله شده تاسماهی شیپ اثرات سودمندی بر شاخص های رشد و سیستم ایمنی این گونه دارد.

واژه های کلیدی: تاسماهی شیپ، ریوفلاوین، شاخص های رشد، ضریب تبدیل غذا، سیستم ایمنی.

### مقدمه

گونه عمده پرورشی در این مزارع عمدتاً فیلماهی، تاسماهی سبیری و در کنار آن ها تاسماهی شیپ است (۱). یکی از اهداف تولیدکنندگان ماهیان پرورشی جهت رسیدن به صرفه اقتصادی، کاهش مرگ و میر و تلفات بچه ماهیان، بالا بردن سرعت رشد و تولید بیشتر در واحد سطح است (۲۵)، که رشد بهینه ارتباط نزدیکی به نوع غذا و کیفیت مواد غذایی مورد استفاده آن دارد (۱۸). متأسفانه در پرورش ماهیان سردابی و ماهیان خاویاری، بیشترین توجه بر مواد کلان غذایی (ماکرونوترینت ها) متمرکز و توجهی به عناصر خرد

صنعت پرورش ماهیان خاویاری در کشور ما صنعتی جوان، اما به سرعت در حال توسعه است، تا قبل از سال ۱۳۸۸ پرورش تاسماهیان در مقیاس تجاری صورت نمی گرفت. در این سال تنها ۲۰ تن گوشت تولید گردید، اما با افزایش صدور پروانه های بهره برداری و استقبال عمومی، میزان تولید گوشت و خاویار به ترتیب از سال ۹۱ به ۹۲ از ۴۵۶ به ۶۰۰ تن و از ۴۰۰ به ۱۲۰۰ کیلوگرم افزایش یافت، در حال حاضر تعداد ۴۵ مزرعه پرورش ماهیان خاویاری در کشور مشغول به کار بوده و قادر به تولید ۳۴۷۸ تن گوشت و بیش از ۱۵ تن خاویار می باشند.

های مختلف ماهیان می توان به بیماری های چشمی، رنگ غیرعادی پوست، کمخونی، کوتاه شدن سرپوش آبششی و خوردگی باله (۱۶)، تجمع چربی و دژنره شدن لوزالمعده با رسوب ملاتین در سیم دریایی (*Sparus Aurata*) (۳۶) اشاره نمود، در صورتی که در ماهی کپور معمولی این عوارض شامل خون ریزی در لوزالمعده می باشد (۵). هم چنین گزارشات در دست است که به دلیل خاصیت انرژی زایی ریبولوین، الحاق این ویتامین به جیره غذایی کپور معمولی (۵) (۴۱)، گربه ماهی کانال (۴۵) و ماهی باس طلایی (۱۰) موجب بهبود شاخص های رشد، کارایی غذا و نسبت بازده پروتئین در این ماهیان شده است. علاوه بر نقش کوآنزیمی ویتامین ریبولوین، مطالعات انجام شده در آزاد ماهی اقیانوسی (*Salmo salar L*) بر این نکته دلالت داشت که با کاهش غلظت ویتامین های گروه B کارکرد سیستم ایمنی در این گونه به شدت به خطر می افتد (۲۴، ۴۹). بنابراین از آن جایی که درصد تلفات ماهی شیپ تغذیه شده با جیره تجاری متداول در مقایسه با سایر گونه های پرورش داخل کشور (تاسماهی سبیری و فیلماهی) بالاتر بوده و پرورش دهندگان از این گونه جهت پرورش کمتر استقبال می کنند، این آزمایش به منظور بررسی تاثیر افزودن مکمل ریبولوین (۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ میلی گرم/کیلوگرم) بر شاخص های رشد و سیستم ایمنی این گونه در یک دوره ۸ هفته ای به مرحله اجرا درآمد.

### مواد و روش ها

#### تهیه ریبولوین و اجزای اولیه غذایی

ریبولوین از شرکت پدیده کالای باستان تهران (هرکیلوگرم رومیت حاوی ۴۰۰۰ میلی گرم ریبولوین)، پودر ماهی، پودر گوشت و روغن ماهی از شرکت پودر ماهی خزر- کیشهر، پرمیکس ویتامینی و پرمیکس معدنی از شرکت سیانس- قزوین، لستین سویا

غذایی نظیر ویتامین ها نگردیده و تصور بر این است که وجود آن ها در غذا اضافه و به طور طبیعی از مواد خام به کار رفته در غذا تامین می گردد (۷، ۱۹)، اما وجود ویتامین ها به میزان کافی در پرورش متراکم ضروری بوده و در تراکم های بالای پرورش که مواد غذایی طبیعی فقط برای حفظ حیات جمعیت کفایت می کنند و یا به طور کل موجود نمی باشد، افزودن ویتامین به جیره از اهمیت خاصی برخوردار است (۱۵، ۴۳)، اما مدارک مستندی در دست است که سطوح میکرونوترینت ها در مواد خام به کار رفته در جیره غذایی (آرد ماهی، آرد گوشت و کنجاله های گیاهی) متغیر و از اندازه ماهی، سن، روند رشد و سلامتی، فاکتورهای محیطی و فعل و انفعالات غذایی تاثیر می پذیرد (۱۱، ۳۱). از سوی دیگر چند سالی است که به منظور کاهش هزینه غذا، از جیره های پرانرژی (حاوی ۲۵ تا ۲۸ درصد لیپید) در تغذیه ماهیان سردابی (۱۴) و ماهیان خاویاری (۳۴) استفاده می شود، بنابراین، با اعمال تغییرات عمده در جیره غذایی ماهیان خاویاری در سالیان اخیر (معرفی غذاهای پرانرژی) ضرورت تعیین نیازمندی ویتامین ها و تاثیر الحاق آن ها بر روند رشد و شاخص های فیزیولوژیک این ماهیان را پیش از پیش گوش زد می نماید. ریبولوین مولکولی با رنگدانه زرد است که به عنوان بخشی از گروه آنزیمی به نام فلاوپروتئین ها عمل می کند. فلاوین مونو نوکلئوتید (FMN) و فلاوین آدنین دی نوکلئوتید (FAD) دو کوآنزیم مهم از ریبولوین ها هستند که در واکنش های اکسیداسیون - احیای موثر در آزادسازی انرژی از سلول (۳)، تجزیه پیرووات، اسیدهای چرب و آمینواسیدها و در فرآیند انتقال الکترون ها شرکت داشته (۵۲) و به تبع آن نقش مهمی در متابولیسم اسیدهای چرب، کربوهیدرات و پروتئین دارند (۱۰). عارضه های کمبود ریبولوین در ماهیان شامل کم خونی و رشد ضعیف است (۳۱). از دیگر عوارض کمبود ریبولوین در گونه

تعداد ۱۴۰ عدد ماهی شیپ با وزن اولیه  $25 \pm 2$  گرم از موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر به سایت چابکسر انتقال و در وان های فایبرگلاس ذخیره و به منظور سازگاری با شرایط جدید با جیره بیومار فرانسه به مدت ۲ هفته تغذیه شدند. پس از طی این دوره تعداد ۱۲۰ عدد ماهی با متوسط وزن  $17.28 \pm 3.06$  گرم انتخاب و به صورت تصادفی بدون دارا بودن اختلاف معنی دار آماری در شاخص وزن در ۱۲ وان فایبرگلاس دوتنی آبیگری شده با مخلوطی از آب چاه و رودخانه، مجهز به سیستم هوادهی و ریتم فتوپریود ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی رهاسازی ( $P = 0.05$ ) و به مدت ۸ هفته روزانه به میزان ۳ تا ۵ درصد وزن بدن (تا حدسیری) در سه نوبت (ساعات ۸، ۱۶ و ۲۱) با جیره غذایی (ارائه شده در جدول ۱) تغذیه شدند. هم چنین در فواصل ۱۵ روزه با محلول گل میخک بیهوش و با استفاده از یک خط کش چوبی و ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم مورد زیست سنجی قرار گرفتند و بر اساس وزن به دست آمده میزان غذای داده شده برای ۱۵ روز بعد تنظیم گردید. در پایان دوره تغذیه پس از گذشت ۲۴ ساعت، از ۳۰ درصد جمعیت ماهیان با استفاده از سرنگ های ۲ سی سی از باله دمی خون گیری به عمل آمد و نمونه های خون به تیوب های اپندروف آغشته به ماده ضد انعقاد خون (هپارین) ریخته، به آزمایشگاه فیزیولوژی مؤسسه منتقل و به وسیله سانتریفوژ (مدل Heraeus Labofuge 12)  $3000 \times g$  در دور ۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و سرم خون جدا گردید، سپس نمونه های حاصل به آزمایشگاه دکتر فدایی رشت جهت بررسی شاخص های هماتولوژیک و ایمنی منتقل شدند.

#### آنالیز شیمیایی و آماری

آنالیز بیوشیمیایی جیره و مواد غذایی با استفاده از دستورالعمل کتابچه Association of Official Analytical Chemists, AOAC, 1995 تعیین گردید،

از شرکت ارس بازار و نشاسته گندم و ذرت از قنادی های محلی خریداری شد.

#### فرمولاسیون و ساخت غذا

بر اساس انرژی آزاد شده از اجزای اولیه غذایی (پروتئین: ۵/۶۵، چربی: ۹/۵ و کربوهیدرات: ۴/۱ کیلوکالری بر گرم) و با استفاده از برنامه ریزی خطی در محیط Excel، ۴ جیره غذایی با سطوح پروتئین و انرژی یکسان (۴۹ درصد پروتئین و ۱۸/۵ مگاژول انرژی در کیلوگرم) ساخته شد، پودر ماهی، پودر گوشت و پودرخون به عنوان منبع پروتئین، روغن ماهی و روغن ذرت به عنوان منبع چربی و نشاسته ذرت و گندم به عنوان منبع کربوهیدرات به کار رفت (۵۱). پرمیکس ویتامینی دارای مقادیر ناچیزی ریوفلاوین به عنوان منبع تامین کننده ویتامین و پرمیکس معدنی تامین کننده نیازهای معدنی ماهی بود. جهت ساخت غذا ابتدا اجزای درشت (پودر ماهی، پودر گوشت، پودرخون، نشاسته ذرت و گندم) در دستگاه آسیاب (Damicar Co., Tehran, Iran)، آسیاب و سپس با اجزای تر (شامل روغن ماهی و روغن گیاهی) مخلوط و به خوبی میکس شدند (۲۲). سپس اجزای خرد غذا (پرمیکس ویتامینی و معدنی، لستین سویا و سلولز) با یک همزن برقی مخلوط (Pooya Nootash Machinery Co, Mashhad) و به مخلوط قبلی اضافه و آسیاب گردید. سپس ریوفلاوین در مقادیر مورد نظر (۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی گرم در کیلوگرم) بر اساس تحقیقات انجام شده در مورد تعیین حد بهینه ویتامین  $B_{12}$  (۵) در یک لیتر آب مقطر محلول و به مخلوط قبلی اضافه و به خوبی با یک همزن مکانیکی هم زده و سپس با استفاده از دستگاه پلت زن (California Pellet Mill Co Sanfranciso, CA) با توجه به اندازه دهان ماهی به قطر ۲ میلی متر تبدیل شد. یک ساعت پیش از توزیع غذا در وانها جیره های ساخته شده از فریزر خارج و در دمای اتاق نگهداری و به ماهیان داده شد.

#### تهیه بچه ماهیان و شرایط پرورش

جیره پایه با استفاده از دستگاه HPLC (مدل -CECIL 1100 SERES) به روش اسپکتروفتومتری تعیین شد (۹).

### تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بررسی توزیع نرمال داده ها در گروه ها و تکرارها جهت تشکیل تیمارها از آزمون Kolmogorov-Smirnov استفاده شد. به منظور مقایسه آماری داده های حاصل از شاخص های رشد، و شاخص های سیستم ایمنی، آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (Oneway Anova) و جهت مقایسه گروه ها با یک دیگر از آزمون دانکن استفاده گردید، کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ صورت گرفت. با انجام زیست سنجی های یک ماهه و با توجه به اطلاعات به دست آمده از طول و وزن ماهیان، شاخص های رشد و ضریب تبدیل غذای ماهیان براساس فرمول های زیر محاسبه شد. (Ronyai et al., 1990; Xue et al., 2006; Hung et al., 1989)

$$K = (BWF/TL^3) \times 100$$

K: درصد شاخص وضعیت، BWF: متوسط وزن

نهایی (گرم)، TL: طول کل (سانتی متر)

$$BWI = (Bwf - BWi) / BWi \times 100$$

BWI: درصد افزایش وزن بدن، BWF: متوسط وزن

نهایی (گرم)، BWi: متوسط وزن اولیه (گرم)

$$F.C.R = F / (Wt - W0)$$

F.C.R: ضریب تبدیل غذا، F: مقدار غذای مصرف

شده توسط ماهی، W0: میانگین بیوماس اولیه (گرم)،

Wt: میانگین بیوماس نهایی (گرم)

$$S.G.R = (\ln Wt - \ln W0) / t \times 100$$

T: دوره زمانی (روز)، Wt: میانگین بیوماس نهایی

(گرم)، W0: میانگین بیوماس اولیه (گرم)

$$PER = (Bwf - Bwi) / \text{protein intake}$$

BWi: متوسط وزن اولیه (گرم)، BWF: متوسط وزن

نهایی، Protein intake: کل پروتئین مصرفی هر

ماهی (گرم)

بر این اساس ماده خشک با سوزاندن در دمای ۱۰۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت (AOAC Official Method 930.15, 1995) پروتئین خام با استفاده از روش کج‌دال در سه مرحله هضم، تقطیر، تیتراسیون و ضرب نمودن ازت به دست آمده از هر گرم ماده خشک در عدد ۶/۲۵، (AOAC Official Method 975.05, 1995) خاکستر مواد با سوزاندن در کوره الکتریکی مدل (Muffle Furnaces, RHF 16/3/3216 P1 Model, Made in England AOAC Official Method 942.05, 1995) گراد، چربی خام با استخراج چربی بروش سوکسله با استفاده از حلال اتر با رسیدن به نقطه جوش ۵۰ تا ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴ تا ۶ ساعت (AOAC Official Method 932.02, 1995) در استخراج کننده سوکسله (Gerhart soxthoterm Made in Germany) SOX, Model, اندازه گیری و انرژی کل با استفاده از بمب کالری متر (Bak model, Made in USA) به دست آمد (۴). نمونه های خون به آزمایشگاه فیزیولوژی موسسه منتقل و توسط سانتریفوژ (Heraeus sepatch company) Lebofuge model, Made in Germany با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید تا سرم خون جدا گردد، شمارش گلبول های سفید (WBC) با استفاده از لام هموسیتومتر نئوبار با استفاده از لنز ۴۰ و با لنز ۲۰ نیکون میکروسکوپ نوری نیکون مدل E600 شمارش شد (۲۳). لیزوزیم ها، کمپلامنت، CH<sub>50</sub> و توتال ایمونوگلوبولین پلاسما با استفاده از دستگاه (Technicon Auto Analyzer, Technicon Made in USA) و کیت های پارس آزمون نوع ISC و ILT مورد سنجش قرار گرفت و مقدار ویتامین در

جدول ۱- اجزا و ترکیب شیمیایی جیره های غذایی (n=۳)

شماره جیره ( % )				اجزای غذایی
RB <sub>25</sub>	RB <sub>20</sub>	RB <sub>15</sub>	RB <sub>0</sub>	
۴۹/۸	۴۹/۸	۴۹/۸	۴۹/۸	آرد ماهی <sup>۱</sup>
۸	۸	۸	۸	پودر گوشت <sup>۲</sup>
۳/۵	۳/۵	۳/۵	۳/۵	پودر خون <sup>۳</sup>
۱۱/۵	۱۱/۵	۱۱/۵	۱۱/۵	نشاسته ذرت
۱۱/۵	۱۱/۵	۱۱/۵	۱۱/۵	نشاسته گندم
۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	مخمر
۳/۵	۳/۵	۳/۵	۳/۵	روغن ماهی
۳/۵	۳/۵	۳/۵	۳/۵	روغن ذرت
۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	لستین
۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	بتافین
۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	پرمیکس ویتامینی
۱	۱	۱	۱	پرمیکس معدنی
۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷	سلونز
۲۵	۲۰	۱۵	۰	ریبوفلاوین
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	جمع کل
				ترکیب شیمیایی ( % )
۹۴/۸	۹۴/۵	۹۴/۱	۹۳/۶	ماده خشک
۴۸/۵	۴۹/۰۸	۴۸/۸۵	۴۹/۰۶	پروتئین
۱۲/۲۵	۱۲/۲	۱۲/۶۸	۱۲/۳۵	چربی
۱۰/۶	۱۰/۴	۱۰/۵	۱۰/۶	خاکستر
۳/۵	۳/۰۶	۳/۰۰	۳/۱۵	فیبر
۱۹/۰۱	۱۸/۸۳	۱۸/۵	۱۸/۵	کربوهیدرات
۱۸/۵۸	۱۸/۵۴	۱۸/۴۸	۱۸/۶۳	کل (مگاژول
				انرژی
				بر کیلوگرم)

۱- آرد ماهی: ۶۱ درصد پروتئین، ۲- پودر گوشت : ۴۸ درصد پروتئین، ۳: پروتئین کنسانتره سویا: ۶۸ درصد پروتئین، ۴- نشاسته ذرت ۱۳٪ پروتئین، ۵- نشاسته گندم: ۱۱٪ پروتئین ۳: ویتامین پرمیکس ( برحسب IU یا میلی گرم در کیلوگرم): د- ال- آلفا توکوفرول استات ۶۰ ای. یو، د- ال - کولکلسیفرول ۳۰۰۰ ای. یو. تیامین ۱۵ میلی گرم در کیلوگرم، ریبوفلاوین ۵ میلی گرم در کیلوگرم، پیرویدوکسین ۱۵ میلی گرم در کیلوگرم، ویتامین B12 ۰/۰۵ میلی گرم در کیلوگرم، نیکوتینیک اسید ۱۷۵ میلی گرم در کیلوگرم، اسید فولیک ۵ میلی گرم در کیلوگرم، اسید اسکوربیک ۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم، اینوزیتول ۱۰۰۰ میلی گرم در کیلوگرم، بیوتین ۲/۵ میلی گرم در کیلوگرم، کلسیم پنتوتات ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم، کولین کلراید ۲۰۰۰ میلی گرم در کیلوگرم.

### نتایج

ریبوفلاوین در جیره، شاخص های وزن نهایی و ضریب چاقی ماهیان در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی داری روند صعودی را نشان داد، به طوری که تاسماهیان شیپ تغذیه شده از جیره ۲۰٪ ۳ میلی گرم در کیلوگرم

الف: تاثیر مکمل های ریبوفلاوین بر شاخص های رشد و ضریب تبدیل غذای تاسماهی شیپ  
نتایج حاصل از تاثیر مکمل های ریبوفلاوین بر شاخص های رشد و ضریب تبدیل غذای ماهیان در جدول ۲ آورده شده است. با افزایش سطوح مکمل

بود (P ۰/۰۵). هم چنین افزودن مکمل ریپوفلاوین به میزان ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم موجب گردید که ضریب تبدیل غذا در ماهیان این تیمار (۰/۱۷±۰/۲۳۶) به طور معنی داری در مقایسه با تیمار شاهد بهبود یابد (P ۰/۰۵). مطلوب ترین نسبت بازده پروتئین به میزان (۰/۰۶±۰/۸۶) در ماهیانی مشاهده شد که از جیره ۳ (۲۰ میلی گرم در کیلوگرم مکمل ریپوفلاوین) تغذیه نموده بود که دارای اختلاف معنی دار آماری با تیمارهای دیگر بود (P ۰/۰۵). نتایج حاصل از تاثیر مکمل های ریپوفلاوین بر شاخص های رشد و ضریب تبدیل غذای ماهیان در جدول ۳ آورده شده است.

مکمل ریپوفلاوین (RB<sub>20</sub>) دارای بیشترین وزن نهایی به میزان (۰/۱۴±۰/۷۲۵) گرم) و بیشترین ضریب چاقی از آن ماهیان تغذیه شده از جیره ۴ (RB<sub>25</sub>) بودند (P ۰/۰۵). شاخص های درصد افزایش وزن بدن و ضریب رشد ویژه ماهیان در تیمارهای (RB<sub>0</sub>، RB<sub>15</sub> و RB<sub>25</sub>) به ترتیب فاقد مکمل، ۱۵ و ۲۵ میلی گرم در کیلوگرم ریپوفلاوین) دارای اختلاف معنی دار آماری نبود، اما درصد افزایش وزن بدن و ضریب رشد ویژه ماهیان تغذیه شده از جیره (RB<sub>20</sub>) (۲۰ میلی گرم در کیلوگرم مکمل ریپوفلاوین) به ترتیب (۰/۰۸±۰/۱۳۵) درصد) و (۰/۱۱±۰/۴۲) درصد در (روز) به طور معنی داری از ماهیان تیمارهای دیگر بیشتر

جدول ۲- تاثیر مکمل های ریپوفلاوین بر شاخص های رشد و ضریب تبدیل غذای تاسماهیان شیپ در یک دوره ۸ هفته ای

شاخص ها	جیره ۱ (RB <sub>0</sub> )	جیره ۲ (RB <sub>15</sub> )	جیره ۳ (RB <sub>20</sub> )	جیره ۴ (RB <sub>25</sub> )
وزن اولیه (W <sub>1</sub> ) (گرم)	۲۹/۳۷±۲/۶۵ <sup>a</sup>	۳۰/۸۵±۰/۲۱ <sup>a</sup>	۳۰/۸۵±۰/۰۷ <sup>a</sup>	۳۱/۳۵±۰/۴۲ <sup>a</sup>
وزن نهایی (W <sub>2</sub> ) (گرم)	۵۱/۲±۰/۲۸ <sup>c</sup>	۶۰/۶۵±۰/۲۱ <sup>b</sup>	۷۲/۵±۰/۱۴ <sup>a</sup>	۶۰/۸۵±۰/۸۷ <sup>b</sup>
(TL <sub>1</sub> ) (سانتی متر)	۲۱/۵±۰/۴۲ <sup>a</sup>	۲۱/۳۲±۰/۴۲ <sup>a</sup>	۲۱/۴۷±۰/۱۷ <sup>a</sup>	۲۱/۳۶±۰/۴۱ <sup>a</sup>
(TL <sub>2</sub> ) (سانتی متر)	۲۴/۳±۰/۰۵ <sup>d</sup>	۲۵/۲±۰/۰۷ <sup>b</sup>	۲۹/۷۵±۰/۱۴ <sup>a</sup>	۲۴/۷±۰/۰۵ <sup>d</sup>
(K)	۰/۳۵±۰/۰۰۵ <sup>d</sup>	۰/۳۷±۰/۰۰۱ <sup>c</sup>	۰/۳۳±۰/۰۰۵ <sup>d</sup>	۰/۴۰±۰/۰۰۵ <sup>b</sup>
(WG)	۷۵/۰۵±۱۶/۸ <sup>b</sup>	۹۶/۵۸±۰/۶۶ <sup>b</sup>	۱۳۵/۰۲±۰/۰۸ <sup>a</sup>	۹۴/۰۹±۰/۱۴ <sup>b</sup>
(SGR)	۰/۹۲±۰/۱۵ <sup>b</sup>	۱/۱±۰/۰۹ <sup>b</sup>	۱/۴۲±۰/۰۱ <sup>a</sup>	۱/۱±۰/۰۱۲ <sup>a</sup>
(FCR)	۳/۷۳±۰/۰۶ <sup>a</sup>	۳/۰۵±۰/۰۳ <sup>ab</sup>	۲/۳۶±۰/۰۱۷ <sup>b</sup>	۳/۱±۰/۰۳۲ <sup>ab</sup>
(PER)	۰/۵۵±۰/۰۰۸ <sup>b</sup>	۰/۶۶±۰/۰۰۱ <sup>b</sup>	۰/۸۶±۰/۰۰۶ <sup>a</sup>	۰/۶۳±۰/۰۰۶ <sup>b</sup>

اعداد با حروف مشابه دارای اختلاف معنی دار آماری نیستند (P ۰/۰۵).

### ب: تاثیر مکمل های ریپوفلاوین بر شاخص های

#### سیستم ایمنی بچه تاسماهی شیپ

مکمل های ریپوفلاوین به طور معنی داری موجب بهبود شاخص های ایمنی در این گونه گردیدند. به طوری که تعداد گلبول سفید در تاسماهیان شیپ تغذیه شده از جیره RB<sub>20</sub> (۲۰ میلی گرم در کیلوگرم ریپوفلاوین) در مقایسه با تعداد گلبول های سفید ماهیان تغذیه شده با جیره فاقد مکمل به طور معنی داری افزایش یافت (P ۰/۰۵). هم چنین غلظت لیزوزیم پلاسما ماهیان تغذیه شده با جیره ۳ (RB<sub>20</sub>) (۲۰ میلی گرم در کیلوگرم ریپوفلاوین) به طور معنی داری بر تیمارهای

دیگر برتری داشت (P ۰/۰۵). فعالیت کامپلایمنت CH<sub>50</sub> پلاسما ماهیان تحت تاثیر مکمل های ریپوفلاوین بود. بیشترین مقدار آن در ماهیان تیمار RB<sub>20</sub> (۲۰ میلی گرم در کیلوگرم ریپوفلاوین) ثبت گردید که دارای برتری معنی دار آماری با تیمارهای دیگر بود (P ۰/۰۵)، هر چند که با افزودن مکمل ریپوفلاوین به جیره مقادیر عددی ایمونوگلوبین کل افزایش یافت، اما اختلاف معنی داری در تیمارهای آزمایشی مشاهده نگردید (P ۰/۰۵) (جدول ۳).

جدول ۳- تاثیر مکمل های ریبوفلاوین بر شاخص های سیستم ایمنی بچه ناسماهی شیب در یک دوره ۸ هفته ای

شاخص ها	(RB <sub>0</sub> )	(RB <sub>15</sub> )	(RB <sub>20</sub> )	(RB <sub>25</sub> )
گلبول سفید (میلی گرم/دسی لیتر)	۷/۲±۲/۳ <sup>a</sup>	۶/۴±۲/۵۵ <sup>a</sup>	۸/۰۶±۲/۵۱ <sup>a</sup>	۶/۲۶±۲/۹۱ <sup>b</sup>
ایمونوگلوبین کل (میلی گرم/دسی لیتر)	۴۲/۰۰±۱۱/۸ <sup>a</sup>	۵۷/۰۰±۲۱/۸ <sup>a</sup>	۴۷/۰۰±۱۴/۴۲ <sup>a</sup>	۶۰/۰۰±۱۶/۲۸ <sup>a</sup>
لیزوزیم (U/ ML/MIN)	۳۲/۱±۴/۰۹ <sup>b</sup>	۱۴/۲۳±۳/۶۶ <sup>c</sup>	۴۹/۳۳±۱۰/۲۹ <sup>a</sup>	۸/۱±۱/۵ <sup>c</sup>
کمپلایمنت (ACH <sub>50</sub> ) (%)	۳۲/۱±۴/۰۹ <sup>b</sup>	۱۴/۲۳±۳/۶۶ <sup>c</sup>	۴۹/۳۳±۱۰/۲۹ <sup>a</sup>	۸/۱±۱/۵ <sup>c</sup>

اعداد با حروف مشابه دارای اختلاف معنی دار آماری نیستند (P < ۰/۰۵).

### بحث و نتیجه گیری

ویتامین A و سایر ویتامین های محلول در آب نظیر ویتامین های گروه B نقشی مهم در متابولیسم سلولی داشته و در این میان ویتامین های گروه B به عنوان کوآنزیم عمل نموده و نقش مهمی در متابولیسم کربوهیدرات، پروتئین و چربی ایفا می نمایند (۲۵). هم چنین ریبوفلاوین در کاهش فعل و انفعال های اکسیداسیون مشارکت داشته که برای همه جانوران ضروری است (۱۰). در این آزمایش با افزایش سطوح مکمل ریبوفلاوین در جیره، شاخص های وزن نهایی و ضریب چاقی ماهیان در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی داری روند صعودی را نشان داد، هم چنین افزودن مکمل ریبوفلاوین به میزان ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم موجب گردید که ضریب تبدیل غذا در ماهیان این تیمار به طور معنی داری در مقایسه با تیمار شاهد بهبود یابد (P < ۰/۰۵). با افزایش ریبوفلاوین به میزان ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم، شاخص های افزایش وزن (WG) و ضریب رشد ویژه (SGR) به طور معنی داری بهبود یافتند که هماهنگ با نتایج به دست آمده در مورد تاثیر ریبوفلاوین بر بهبود این شاخص ها در کپور معمولی (۴۱)، (۵)، گربه ماهی کانال (۴۵) و ماهی باس طلائی (۱۰) می باشد، نتایج مشابهی نیز از Li و همکاران (۲۰۱۰) (۲۷) گزارش شده است که شاخص های رشد وارسته ای از کپور معمولی با نام Jian carp (*Cyprinus Carpio* Var. Jian) از جیره های ریبوفلاوین تاثیر پذیرفته و ارتباط نزدیکی میان میزان جذب غذا و درصد افزایش وزن و ضریب رشد ویژه داشته، به طوری که با افزایش

ریبوفلاوین به ۴/۲۲ میلی گرم در کیلوگرم، شاخص های درصد افزایش وزن و ضریب رشد ویژه در این گونه به طور معنی داری بهبود یافت. در آزمایش حاضر نیز با افزایش سطوح ریبوفلاوین تا سطح ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم در جیره، علاوه بر آن که میزان ضریب تبدیل غذا کاهش یافته، شاخص های ضریب رشد ویژه و درصد افزایش وزن به طور معنی داری بهبود یافت که احتمالاً به دلیل تاثیر گذاری ریبوفلاوین الحاقی بر میزان فعالیت آنزیم های گوارشی است که وظیفه هضم و جذب مواد غذایی را بر عهده دارند (۲۹). نتایج Li و همکاران (۲۰۱۰) (۲۷) بر این نکته دلالت داشت که فعالیت تریپسین، لپاز و آلفا آمیلاز در دستگاه گوارش با افزایش مکمل ریبوفلاوین در جیره Jian carp (*Cyprinus carpio* Var. Jian) افزایش یافته و فعالیت تریپسین، لپاز و آلفا آمیلاز در دستگاه گوارش ماهیان منجر به افزایش روند رشد و بهبود شاخص های لوزالمعده ماهیان تغذیه شده با ریبوفلاوین خواهد گردید. اگرچه ماهیان خاویاری دارای سیستم گوارشی پیش رفته ای هستند (۸)، اما لوزالمعده در این ماهیان نقش مهمی در هضم و جذب غذا داشته و هایپرتروفی لوزالمعده و هایپرپلازی ممکن است بر فعالیت آنزیم های پروتاز، لپاز و فعالیت آمیلاز تاثیر و در نتیجه بر هضم پروتئین تاثیر منفی داشته باشد (۵۳). در گونه های دیگر نیز کاهش فعالیت آنزیم های هضم کننده غذا ارتباط مستقیمی با شاخص های رشد دارد و بنابراین می توان توضیح داد که چرا نتایج به دست آمده در مورد ماهی

خونی و بخشی از دستگاه ایمنی بدن به شمار آمده و بدن را از بیماری های عفونی محافظت می کنند (۵۰)، مطالعات انجام شده در مورد لوکوسیت ها یا گلبول های سفید در گونه قزل آلاهی رنگین کمان نشان داده که افزایش گلبول های سفید در خون به عنوان شاخص فعالیت سیستم دفاعی در بدن ماهیان به شمار می آید (۴۲، ۵۰). پاره ای از مطالعات نشان داده که افزودن مکمل ویتامین E موجب افزایش معنی دار تعداد گلبول های سفید در گونه تیلاپای نیل (*Oeochromis niloticus*) گردیده و موجب تقویت و پایداری ماهی در شرایط پرورش متراکم همراه با بار باکتریایی و کیفیت نامناسب آب شده است (۲۱) که هماهنگ با نتایج به دست آمده در این آزمایش است. لیزوزیم یک آنزیم باکتری کش است که به طور گسترده ای در بدن و قسمتی از مکانیسم سیستم دفاعی غیراختصاصی در بسیاری از جانوران از جمله ماهیان وجود دارد. در آزاد ماهیان، لیزوزیم در سرم خون، ترشحات، لایه موکوس و بافت های غنی از لوکوسیت ها عمدتاً در کلیه و دستگاه گوارش یافت می شود (۲۷، ۱۳)، کارکرد باکتریایی این آنزیم در گیر شدن در هیدرولیز پپتیدو گلیکون های دیواره سلولی باکتری ها می باشد، اما اولین کارکرد ایمنی دفاعی در مقابل باکتری های گرم مثبت و گرم منفی می باشد (۴۶)، کاهش لیزوزیم سرم خون ماهیان پرورش در محیط هایی با تراکم بالا موجب افزایش تلفات و مستعد شدن آن ها به بیماری می گردد (۳۲). سیستم کامپلیمنت در ماهیان استخوانی به خوبی مهره داران عمدتاً از طریق چسبیدن به آنتی بادی ها در دیواره سلولی عمل می کند (۱۷). مطالعات زیادی نشان داده است که کامپلیمنت نقشی حیاتی در پاسخ های سیستم ایمنی ذاتی در ماهیان استخوانی داشته (۵۴) و فعالیت کامپلیمنت، مسئول سیستم ایمنی ماهیان استخوانی در گونه های متعددی نظیر کپور معمولی (۳۳)، گربه ماهی (۲۰) و آزاد ماهیان (۲۶)

کپور معمولی (۴۱، ۵)، ماهی باس طلایی (۱۰) و هم چنین آزمایش حاضر نشان دهنده این مطلب است که ماهیان موقعی که مقادیر ناکافی ریبوفلاوین دریافت می کنند دچار کاهش رشد می گردند. در آزمایش انجام شده نسبت بازده پروتئین نیز با افزایش سطوح ریبوفلاوین تا ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم به طور معنی داری افزایش و سپس با افزایش ریبوفلاوین تا سطح ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم کاهش یافت، نتایج مشابه ای از *Cyprinus Jian carp Carpio Var. Jian* (۲۷)، گربه ماهی کانال (*Ictalurus punctatus*) (۴۵) و ماهی باس طلایی sunshine bass (*Morone chrysops, Morone saxatilis*) به دست آمد که آن را به جذب بهینه غذا بدلیل نقش کوآنزیمی ریبوفلاوین در متابولیسم پروتئین، کربوهیدرات و چربی نسبت داده بودند (۷). در این آزمایش مکمل ریبوفلاوین به طور معنی داری موجب بهبود شاخص های ایمنی در تاسماهی شیپ گردید، به طوری که تعداد گلبول سفید در تاسماهیان شیپ تغذیه شده از جیره RB<sub>20</sub> (۲۰ میلی گرم در کیلوگرم ریبوفلاوین) در مقایسه با تعداد گلبول های سفید ماهیان تغذیه شده با جیره فاقد مکمل به طور معنی داری افزایش و بیشترین فعالیت لیزوزیم و کامپلیمنت CH<sub>50</sub> در ماهیان تغذیه شده از تیمار RB<sub>20</sub> (۲۰ میلی گرم در کیلوگرم ریبوفلاوین) ثبت گردید. مطالعات دیگر در سالیان دور نیز بر این نکته اذعان داشت که ماهیان کپور انگشت قد تغذیه شده از جیره حاوی مقادیر ناکافی ریبوفلاوین دچار کم خونی، کمبود رشد، مرگ و میر بالا و خون ریزی پوست می شوند (۳۵) و هم چنین مواردی در قزل آلاهی رنگین کمان (۴۱)، قزل آلاهی جویباری، قهوه ای و دریاچه ای (۳۸)، سالمون چینوک (۱۵)، ماهی آزاد اقیانوسی (۳۹)، گربه ماهی کانالی (۱۲)، کپور معمولی (۳۷)، قزل آلاهی رنگین کمان (۴۱، ۴۰، ۳۲)، مارماهی ژاپنی (۶) و سیم قرمز دریایی (۵۵) گزارش شده است. گلبول های سفید (لوکوسیت ها) جزء یاخته های



تحقیقاتی در مورد غلظت IgM در ماهیان خاویاری انجام نشده و باید مطالعات بیشتری این زمینه صورت گیرد. با توجه به اثرات مثبت مکمل ریبوفلاوین بر شاخص های رشد و سیستم ایمنی بدن تاسماهی شیب جوان به نظر می رسد که افزودن ریبوفلاوین در جیره تا حد ۲۰ میلی-گرم / کیلوگرم سودمند و موجب بازماندگی و افزایش بازده تولید این گونه در سیستم های متراکم پرورش می گردد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس گذاری خود را از جناب مهندس هوشنگ یگانه و آقای مهندس محمد پوردهقانی از موسسه تحقیقات بین المللی دریای خزر جهت پرورش ماهیان و تهیه نمونه های خونی و هم چنین آقای هوشنگ ملکی از آزمایشگاه ویرومد رشت که زحمت آنالیز نمونه های خونی را برعهده داشتند ابراز می دارند.

carp-I. Requirement for vitamin B2. Bulletin Japanese Society Science Fish, 33; 355-360.

6. Arai, S., Nose, T., Hashimoto, Y. (1972a). Qualitative requirements of young eels *Anguilla japonica* for water-soluble vitamins and their deficiency symptoms. Bulletin Tokyo Freshwater Fish Research Laboratory, 22; 69-83.

7. Bronstad, I., Bjerka, S., Waagbo, R. (2002). The need for riboflavin supplementation in high and lower energy diets for Atlantic salmon *Salmo salar* L. parr. Aquaculture Nutrition, 8; 209-220.

8. Chebanov, M.S., Galich, E.V. (2011). Sturgeon hatchery manual. Fao Fisheries And Aquaculture Technical Paper. 303 pp.

9. Chimezie, A., Ibukun, A., Teddy, E., Francis, O. (2008). HPLC analysis of nicotinamide, pyridoxine, riboflavin and thiamin in some selected food products in Nigeria. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2; 29-036.

10. Deng, D.F., Wilson, R.P. (2003). Dietary riboflavin requirement of juvenile sunshine bass

است، به طور مثال آنتی بادی های آزاد ماهیان، در حضور پروتئین های کامپلیمنت قادر به خنثی سازی ویروس های هماتوپویتیک نکروز ویروس (IHNV) و ویرال هموراژی سپتی سمی ویروس (VHSV) می باشند (۳۰)، بنابراین می توان اذعان نمود که فعالیت لیزوزیم و کامپلیمنت دلالت بر سلامت عمومی و سیستم همورال در ماهی دارند (۴۷، ۲۸)، در این آزمایش با اضافه کردن مکمل ریبوفلاوین به میزان ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم، فعالیت لیزوزیم و کامپلیمنت در تاسماهی شیب در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی داری افزایش یافت. نتایج این بررسی نشان داد که برعکس افزایش میزان ایمونوگلوبین در تیمارهای ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی گرم / کیلوگرم ریبوفلاوین اختلاف معنی داری با تیمار شاهد مشاهده نشد (۰/۰۵ P). ایمونوگلوبین غالب در اکثر ماهیان IgM می باشد (۲)، البته میزان غلظت IgM در ماهیان استخوانی در سطوح پایین قرار دارد (۴۸) و از درجه حرارت آب (۴۴) و کیفیت آب (۳۲) تاثیر می پذیرد، البته تاکنون

### منابع

۱- یزدانی ساداتی، م.ر.، پورکاظمی، م.، شکوریان، م.، پورعلی، ح.م.، پیکران مانا، ن.، سیدحسینی، م.ح. ۱۳۹۰. ترویج و پرورش فیل ماهی به منظور تولید گوشت و خاویار. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۵۹ صفحه.

2. Acton, RT., Weinheimer, PF., Hall, SJ., Niedermeier, W., Shelton, E., Bennett, JC. (1971). Tetrameric immune macroglobulin in three orders of bony fishes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 68; 107-111.

3. Adelekan, DA., Thurnham, D.I. (1998). Glutathione peroxidase (EC 111.1.9) and superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) activities in riboflavin-deficient rats infected with *Plasmodium berghei*. Malaria British Journal Nutrition, 79; 305-309.

4. AOAC. (1995). Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. AOAC, Arlington.

5. Aoe, H., Masuda, I., Saito, T., Komo, A. (1967). Water-soluble vitamin requirement of

- (*Morone chrysops* \$ \times \$ *Morone saxatilis* #). *Aquaculture*, 218; 695-701.
11. Doroshov, V.I. (1985). Biology and culture of sturgeon: *Acipenseriformes*. In: *Advances in Aquaculture*. Muir, J. F. and Roberts, R. J., Eds., Westview Press, Boulder, Co., 251-274.
12. Dupree, H. K. (1966a). Vitamins essential for growth of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *United State Bulletin Sport Fish Technical Paper*, 7; 12 p.
13. Grinde, B., Lie, O., Poppe, T., Salte, R. (1988). Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture. *Aquaculture*, 68; 299-304.
14. Gumus, E., Ikiz, R. (2009). Effect of dietary levels of lipid and carbohydrate on growth performance, chemical contents and digestibility in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, 1792. *Pakistan Vetrinity Journal*, 29; 59-63.
15. Halver, J. E. (1957). Nutrition of salmonoid fishes. III. Water-soluble vitamin requirements of chinook Salmon. *Journal of Nutrition*, 62; 225-243. B.
16. Halver, J.E. (1989). The vitamins. In: *Fish Nutrition* (Halver, J.E. ed.), 2nd edn, pp. 31-109. Academic Press, New York.
17. Holland, M.C., Lambris, J.D. (2002). The complement system of teleosts. *Fish and Shellfish Immunology*, 12; 399-420.
18. Holt, G.J. (2011). *Larval Fish Nutrition*, (Editor: G. Joan Holt). John Wiley & Sons publication, 448 p.
19. Hung S. S. O., Aikins K. F., Lutes P. B., Xu, R. (1989). Ability of Juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) to utilize different Carbohydrate source. *Journal of Nutrition*, 119; 272-733.
20. Jenkins, J.A., Ourth, D.D. (1993). Opsonic effect of the alternative complement pathway on channel catfish peripheral blood phagocytes. *Veterinary Immunology Immunopathology*, 39; 447-459
21. Ispir, U., Yonar, M.E. and OZ, B. (2011). Effect of dietary vitamin supplementation on blood parameters of Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*). *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 21; 566-569.
22. Izquierdo, M.S. (1996). Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition*, 2; 183-191.
23. Klontz, G.W. (1994). *Fish Hematology*. In: *Techniques in Fish Immunology*, Stolen, J.S., T.C.
24. Kitamura, S.T., Suwa, T., Ohara, S., Nakagawa, K. (1967a). Studies on vitamin requirements of rainbow trout-II. The deficiency symptoms of fourteen kinds of vitamin. [In Japanese English Abstract Bulletin of Japanese Society Science Fish], 33; 1120-1125.
25. Lall, S.P. (2000). Nutrition and health of fish. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. 19-22.
26. Lammens, M., Decostere, A., Haesebrouck, F. (2000). Effects of *Flavobacterium psychrophilium* strains and their metabolites on the oxidative activity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* phagocytes. *Disease of Aquaculture Organism*, 41; 173-179.
27. Li, W., Zhou, X.Q., Feng, L., Liu, Y., Jiang, J. (2010). Effect of riboflavin on growth, feed utilization, body composition and intestinal activities of juvenile Jian Carp (*Cyprinus Carpio* Var. Jian). *Aquaculture Nutrition*, 16; 137-143
28. Lie, O., Evensen, O., Sorensen, A., Froyssadal, E. (1989). Study on lysozyme activity in some fish species. *Disease of Aquaculture Organism*, 6; 1-5.
29. Lin, Y., Zhou, X.Q. (2006). Dietary glutamine supplementation improves structure and function of intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var Jian). *Aquaculture*, 256; 389-394.
30. Lorenzen, N., LaPatra, S.E. (1999). Immunity to rabdovirus in rainbow trout: the antibody response. *Fish and Shellfish Immunology*, 9; 345-360.
31. NRC. (1993). *Nutrient requirements of fish* (National Research Council, Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture). pp. 1-115. *National Academy Press*, Washington, DC.
32. Magnadottir, B., Jonsdottir, H., Helgason, S., Bjornsson, B., Jorgensen, T.O., Pilstrom, L. (2001). Immune parameters of immunised cod (*Gadus morhua* L). *Fish and Shellfish Immunology*, 10; 75-8.
33. Matsuyama, H., Yano, T., Yamakawa, T., Nakao, M. (1992). Opsonic effect of the third complement component (C3) of carp (*Cyprinus carpio*) on phagocytosis by neutrophils. *Fish and Shellfish Immunology*, 2; 69-78.
34. Mohseni, M., Hassani, M. H., Pourali, F. H., Pourkazemi, M., Bai, S. C. (2011). The optimum dietary carbohydrate/lipid ratio can spare protein in growing beluga, *Huso huso*. *Journal of Applied Ichthyology*, 27; 737-742.

35. Millikin, M.R. (1982). Qualitative and quantitative nutrient requirement fishes: A review. *Fishery Bulletin*, 80; 4.
36. Morris, P.C., Davies, S.J. and Lowe, D.M. (1995). Qualitative requirement for B vitamins in diets for the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Animal Science*, 61; 419-426.
37. Ogino, C. (1967). B vitamins requirements of carp-II. Requirements for riboflavin and pantothenic acid. [In Japanese ., English. Abstract.] *Bullitune of Japanese Society Science Fish*, 33; 351-354.
38. Phillips, A.M.J.R., Brockway, D.R. (1957). The nutrition of trout. IV. Vitamin requirements. *Progress Fish-Culture*, 19; 119-123.
39. Phillips. A. M., JR. (1959a). Vitamin requirement of Atlantic salmon. State N.Y. Conservative. Department of Fish Research Bulletin, 22; 79-81.
40. Postone, H.A., Rumsey, G.L ., Ketola, H.G. (1977). The effect of supplemental dietary amino acids. minerals and-vitamins on salmonids fed cataractogenic diets. *Cornell Vetrinary*, 67; 472-509.
41. Takeuchi, L., Takeuchi, T., Ogino, C. (1980). Riboflavin requirements in carp and rainbow trout. *Bullutin Jpanase Society Science Fish*, 46; 733-737.
42. Ronyai, A., Peteri, A., Radics, F. (1990). Cross breeding of sterlet and Lena River's sturgeon. *Aquacult Hungrica (Szarwas)*, 6; 13-18.
43. Sahoo, P.K., Mukherjee, S.C. (2003). Immunomodulation by dietary vitamin C in healthy and aflatoxin B<sub>1</sub>-induced immune compromised rohu (*Labeo rohita*). *Comparative Immunology. Microbiology Infection Disease*, 26; 65-76.
44. Sanchez, C., Babin, M., Tomillo, J., Ubeira, F.M., Dominguez. J. (1993). Quantification of low levels of rainbow trout immunoglobulin by enzyme immunoassay using two monoclonal antibodies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 36; 65-74.
45. Serrini, G., Zhang, Z., Wilson, R.P. (1996). Dietary riboflavin requirement of fingerling channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 139; 285-290.
46. Sveinbjornsson, B., Olsen, R., Paulsen, S., (1996). Immuno cytochemical localization of lysozyme in intestinal eosinophilic granule cells (EGCs) of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Disease*, 19; 349-355.
47. Tort, L., Balasch, S. and MacKenzie, S. (2003). Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Imnnoinoiogia*, 08. 9. Available online at: [http://revista .immunologia .org/ Upload /Articles/602.pdf] (Accessed: 11.09.08).
48. Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review *Veterinari Medicina*, 10; 486-503.
49. Waagbo, R. (1997). The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. A review of *Aquaculture Fish Managing*, 25; 175-197.
50. Wahli, T., Verlhac, V., Gabaudan, J., Schüep, W., Meier, W. (1998). Influence of combined vitamins C and E on non-specific immunity and disease resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Disease*, 21; 127-134.
51. Webster, C.D., C.E., Lim. (2002). Nutrient Requirement and Feeding of Finfish for Aquaculture. CAB International CABI publishing, 418.
52. Xue, M., Wu, X., Ren, Z., Gao, P., Yu, N., Pearl, G. (2006). Effects of six alternative lipid sources on growth and tissue fatty acid composition in Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*). *Aquaculture*, 206; 206-214.
53. Xu, Q. Y., Wang, C. A., Zhao, Z. G., Luo, L. (2012). Effects of replacement of fish meal by soy protein isolate on the growth, digestive enzyme activity and serum biochemical parameters for Juvenile Amur Sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 11; 1588-1594.
54. Yano, T., Matsuyama, H., Mangindaan R.E.P. (1991). Polysaccharide induced protection of carp *Cyprinus carpio* against bacterial infection. *Journal of Fish Disease*, 14; 577-582.
55. Yone, Y. (1975). Nutritional studies of red sea bream. *Proceeding of First International Conference of Aquaculture Nutrition*, 39-64.

