نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۵ تابستان ۱۳۹۶
DOI: 10.22034/vj.2017.109242

بررسی تاثیر سین‌بیوتیک (Biomin Imbo) بر وضعیت آنتی اکسیدان و پروفایل لیپیدی بچه ماهیان کفال معمولی (Mugil cephalus)

• **سراج بیتا**
دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، دانشکده علوم دریایی، گروه شیلات
• **پریا اکبری (نویسنده مسئول)**
دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، دانشکده علوم دریایی، گروه شیلات
• **مهین سرحدی پور**
دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، دانشکده علوم دریایی، گروه شیلات

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۹۵ تاریخ پذیرش: مرداد ۹۵
Email: paria.akbary@gmail.com

چکیده

تحقیق حاضر به‌منظوز بررسی تاثیرسین‌بیوتیک (Biomin Imbo) بر وضعیت آنتی‌اکسیدان و پروفایل لیپیدی بچه‌ماهیان کفال خاکستری *(Mugil cephalus)* به مدت ۶۰ روز صورت گرفت. ۱۲۰ قطعه بچه‌ماهی کفال خاکستری با میانگین وزنی ۳/۹۲±۰/۴۳ گرم در یک طرح کاملا تصادفی با ۴ تیمار و ۳ تکرار (با تعداد ۱۰ قطعه در هر تکرار) که شامل تیمار ۱ (گروه شاهد)، تیمار ۲ (۰/۵ گرم سین بیوتیک در هر کیلوگرم غذا)، تیمار ۳ (۱ گرم سین بیوتیک در هر کیلوگرم غذا) و تیمار ۴ (۱/۵ گرم سین بیوتیک در هر کیلوگرم غذا) بود مورد آزمایش قرار گرفتند. در پایان آزمایش، کمترین میزان کلسترول و تری‌گلیسرید کبد در تیمار ۳ مشاهده شد و بین تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵). کمترین میزان لیپوپروتئین با چگالی پایین و بیشترین میزان لیپوپروتئین با چگالی بالا در تیمار ۳ مشاهده شد و بین تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵). بیشترین میزان فعالیت گلوتاتیون احیاء، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در تیمار ۳ مشاهده شد. اما بین تیمار ۳ و ۴ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). همچنین از نظر فعالیت کاتلاز بین تیمارهای حاوی سین‌بیوتیک و شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). در کل، نتایج نشان داد که استفاده از ۱ گرم سین‌بیوتیک در هر کیلوگرم جیره غذایی منجر به بهبود کلسترول، تری‌گلیسرید، لیپوپروتئین با چگالی پایین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی سرم کبد ماهی کفال خاکستری می‌شود.

کلمات کلیدی: ماهی کفال خاکستری، آنتی‌اکسیدانی، تری‌گلیسرید، کلسترول، لیپوپروتئین با چگالی پایین

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 115 pp: 224-233

Effect of Synbiotic Biomin Imbo on anti-oxidant status and lipid profiles of ***Mugil cephalus***

By: Bita, S., Chabahar Maritime University, Marine Science, Fisheries group, Iran. Akbary, P., (Corresponding Author) Chabahar Maritime University, Marine Science, Fisheries group, Iran. and Sarhadipour, M., Chabahar Maritime University, Marine Science, Fisheries group, Iran.

Email: Paria.akbary@gmail.com

Received: 2016-05-16 Accepted: 2016-08-13

This experiment was conducted to evaluate the effect of Synbiotic Biomin Imbo on anti-oxidant status and lipid profiles of *Mugil cephalus* for 60 days. The experiment was conducted in a completely randomized design with 120 gray mullet (with an average weight of 3.92 ± 0.43 g) in 4 treatments and 3 replicates (n=10 in each replicate) and included: treatment 1 (control), treatment 2 (0.5 g Synbiotic per kg diet), treatment 3 (1 g Synbiotic per kg diet) and treatment 4 (1.5 g synbiotic per kg diet). At the end of experiment, the highest and lowest cholesterol and triglyceride of liver fish were recorded in treatment 1 and 4 respectively and there was significant difference between treatments ($P< 0.05$). The lowest low density of lipoprotein (LDL) and the highest high density of lipoprotein (HDL) were recorded in treatment 3 ($P< 0.05$). The highest GSH and TAC were observed in treatment 3 but there was no significant difference between treatment 3 and 4. The anti- oxidant status findings suggest that using 1 g Synbiotic per kg diet is effective in improving anti- oxidant status and lipid profiles in gray mullet.

Key words: *Mugil cephalus*, Cholesterol, Triglyceride, Anti- oxidant status, Low density lipoprotein

مقدمه

توسعه سریع صنعت آبزی‌پروری منجر به القاء استرس‌های فیزیولوژیکی و افزایش خطر بالقوه شیوع بیماری در ماهی‌ها شده است (۲۶). در چنین شرایطی، به طور معمول از آنتی بیوتیک‌ها به عنوان اولین انتخاب برای درمان حیوانات استفاده می‌شود. از آنجا که استفاده از دوزهای پایین آنتی‌بیوتیک در جیره غذایی آبزیان منجر به ایجاد مقاومت دارویی می‌گردد (۱۱). لذا محدودیت‌های اخیر در استفاده از آنتی‌بیوتیک به‌عنوان مواد افزودنی در جیره غذایی، پرورش دهندگان ماهی را وادار به کشف جایگزین ایمن و سالم در جیره غذایی آبزیان نموده است. امروزه، پروبیوتیک، پربیوتیک و سین‌بیوتیک ها افزودنی‌های خوراکی هستند که در صنعت آبزی‌پروری مورد استفاده قرار می‌گیرند. پربیوتیک ترکیبات کربوهیدرات غیر قابل هضمی هستند که به‌طور انتخابی سبب تحریک رشد و یا فعالیت یک یا تعداد محدودی از باکتری‌های روده بزرگ شده و با تغییرات سودمند خود منجر به بهبود سلامت میزبان می‌گردند (۲۸،۱۶). پرو بیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده هستند که منجر به بهبود بقاء ایمنی بدن، عملکرد سیستم دستگاه گوارش و رشد ماهی می‌گردند (۲۴). در طول دهه گذشته، مطالعات متعددی در زمینه استفاده از پروبیوتیک و پروبیوتیک در سلامت ماهیان پرورشی، میگو و دیگر موجودات آبزی صورت گرفته است (۲۹، ۲۶، ۲۴، ۱۳، ۷).

اثرات مثبت استفاده از پروبیوتیک و پربیوتیک در اکثر مطالعات مورد تایید قرار گرفته است. با این حال، تفاوت در دوز پربیوتیک و پروبیوتیک ها، ساختار شیمیایی، ترکیبات پربیوتیک و سویه‌های پروبیوتیک مورد آزمایش، منجر به ایجاد نتایج متفاوت می‌گردد (۶). از آن‌جایی‌که دانش استفاده از پربیوتیک و پروبیوتیک در آبزی‌پروری نوین می‌باشد لذا هنوز اطلاعات کافی در زمینه مکانیسم اثر گذاری آن‌ها وجود ندارد. گیبسون و روبرفروید (۹) ترکیب پروبیوتیک و پربیوتیک را به عنوان سین بیوتیک معرفی نمودندکه اثرات سودمندی برای میزبان از طریق القاء مکمل‌های غذایی میکروبی زنده در دستگاه گوارش به‌واسطه تحریک انتخابی رشد و یا از طریق فعال کردن متابولیسم یک یا تعداد معدود از باکتری‌های تقویت کننده سلامتی داشته بنابراین منجر به بهبود بقاء و رشد و در نهایت رفاه میزبان می‌گردد

کفال ماهیان خاکستری یکی از ذخایر مهم شیلاتی و جزء ماهیان قابل تکثیر در شرایط مصنوعی، نیمه مصنوعی و همچنین قابل پرورش در استخرهای خاکی به‌شمار می‌روند. این ماهی به‌طور گسترده‌ای در آب‌های گرمسیری و نیمه گرمسیری پراکنده‌اند و قدرت سازگاری به محدوده وسیعی از دما، شوری و شرایط تغذیه ای دارند (۲۲).

مطالعات متعددی که در زمینه اثر مکمل سین بیوتیک بر عملکرد رشد و سلامت ماهی سفید (*Rutilus frisi*) (۱۰)، ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) (۵) و قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (۱۹) انجام شده است. همچنینی ی و همکاران (۳۱) نشان دادند که استفاده

از پربیوتیک. پروبیوتیک و استفاده همزمان آن منجر به کاهش معنی‌دار کلسترول، نری‌گلیسرید و لیپوپروتئین با چگالی کم در مقایسه با گروه کنترل در ماهی کفشک ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) گردید. اما تاکنون تحقیقات کمی در ارتباط با اثر سین بیوتیک بر ترکیبات لیپیدی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی ماهی کفال خاکستری صورت گرفته است. لذا هدف از این تحقیق، بررسی اثر مکمل سین بیوتیک بر وضعیت آنتی‌اکسیدان و پروفایل لیپیدی ماهی کفال خاکستری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در اردیبهشت ماه ۱۳۹۴ در کارگاه پرورش ماهی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار انجام شد. ۱۲۰ قطعه بچه ماهیان کفال خاکستری از اسکله رمین واقع در ۵ کیلومتری بندر چابهار صید و به محل آزمایش، انتقال داده شد. پس از طی مرحله سازگاری به مدت دو هفته و اطمینان از سلامتی آن‌ها، بچه ماهیان با میانگین وزنی ۰/۴۳±۳/۹۲ گرم و میانگین طولی۰/۲۵±۶/۱۳ سانتی‌متر شمارش شده و با تراکم ۱۰ قطعه به ۱۲ آکواریوم ۶۰ لیتری منتقل شدند. در طول دوره، پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب اندازه‌گیری شد. به‌طور میانگین در کل دوره شوری ۲۸ گرم بر لیتر درجه حرارت آب ۰/۵±۲۸/۲درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۰/۸۷ ± ۷/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر و pH آب ۰/۴±۷/۸ بود. در طی دوره آزمایش دوره نوری به‌صورت ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی بود. به‌منظور هوادهی و نیاز اکسیژن بچه ماهیان به هر یک از مخزن‌ها یک سنگ هوا که به منبع هواده متصل بود نصب گردید. تیمارهای مورد استفاده در تحقیق حاضر شامل تیمار شاهد که تنها با غذای تجاری (شرکت تعاونی تولیدی ۲۱ بیضاء، شیراز)، ۳ تیمار با سطوح ۰/۵، ۱ و ۱/۵گرم بر کیلوگرم از سین‌بیونیک بودند که با سه تکرار برای هر تیمار در طی یک دوره ۶۰ روزه مورد استفاده قرار گرفتند.

در این تحقیق، از سین بیوتیک بایومین ایمبو (*Biomin imbo*) شامل ۱۰۱۱×۵ واحد تشکیل کلونی بر گرم پروبیوتیک *Entrococcus faecium* IMBO۵۲ (DSM۵۳۰) و پربیوتیک Fructooligosaccharides، دیواره سلولی و ترکیبات فایکوفیتیک که از جلبک‌های دریایی استخراج شده (ساخت شرکت Biomin، کشور اتریش) استفاده شد. به منظور آماده‌سازی جیره‌های غذایی، ابتدا مقدار غذا برای کل دوره آزمایش (۶۰ روز) برای هر تیمار محاسبه شد. سپس غذای کنسانتره (شرکت تعاونی تولیدی ۲۱ بیضاء با قطر (mm)۱/۸-۱/۶ با (درصد) ۵۰ پروتئین خام، (درصد) ۱۳/۵ چربی خام،(درصد) ۱/۷ فیبر خام و ۱۰(درصد) رطوبت) توزین گردید. پس از محاسبه میزان سین بیوتیک مورد نیاز برای هر تیمار، مقدار سین بیوتیک محاسبه شده با غذا مخلوط گردید و با اضافه نمودن درصد مشخصی آب مقطر (۴۰ میلی‌لیتر) به‌حالت خمیر تبدیل شد. سپس خمیر از چرخ گوشت با اندازه چشمه ۰/۸ میلی‌متر عبور داده شد و به شکل پلت در مجاورت هوا خشک گردید و جیره تهیه شده تا زمان استفاده در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. مقدار غذای روزانه با توجه به درصد وزن بدن (توده زنده) محاسبه شد و در دو نوبت صبح (۷) و عصر(۱۶) به میزان ۵(درصد) وزن بدن در اختیار لارو ماهیان قرار گرفت. عمل سیفون کردن بصورت یک روز در میان انجام و باقیمانده غذایی و مدفوع ماهی‌ها از مخازن خارج گردید. جهت تعیین میزان تری‌گلیسرید، لیپوپروتئین با چگالی کم، لیپوپروتئین با چگالی بالا و کلسترول کبد ماهی، در پایان آزمایش (روز ۶۰)، کبد ۳ قطعه ماهی از هر تیمار پس از بیهوشی با پودر گل میخک (۳ گرم در هر لیتر آب) پس از کشتن، خارج گردید. سپس در داخل میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری در مجاورت یخ جمع آوری شده و سریعا به دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد انتقال یافت. سپس کبد و ماهی‌های جمع آوری شده به‌صورت مجزا کاملا با سرم فیزیولوژی ۳ بار شسته شدند. سپس با ۱ حجم سرم فیزیولوژی در میکسر مخلوط گردید و با سرعت ۳۰۰۰ دور در هر دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شده سپس محلول رویی دو بار دیگر با همین سرعت سانتریفوژ گردید. و محلول رویی در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری (با سه تکرار برای هر تیمار) جمع‌آوری و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

اندازه‌گیری میزان تری گلیسرید، ۱۰ میلی‌لیتر نمونه به همراه ۱ میلی لیتر معرف آنزیمی (آنزیم لیپاز، گلیسرول کیناز و پراکسیداز) به عنوان لوله تست و لوله استاندارد محتوی ۱۰ میلی‌لیتر محلول استاندارد (۲۰۰ میلی‌گرم تری اولئین را در ۱ میلی‌لیتر ایزوپروپانول خالص) و لوله بلانک حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱ میلی لیتر معرف آنزیمی آماده شد سپس لوله‌ها به‌مدت ۳ دقیقه در بن ماری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و جذب نوری لوله‌های تست و استاندارد را در طول موج ۵۴۶ نانومتر در مقابل بلانک قرائت گردید (۲۷). برای سنجش کلسترول، لوله نمونه محتوی ۱۰ میلی‌لیتر به‌همراه ۱ میلی‌لیتر معرف آنزیمی،(توسط آنزیم کلسترول استراز، کلسترول اکسیداز و پراکسیداز)، لوله استاندارد حاوی ۱۰ میلی‌لیتر استاندارد (۲۰۰ میلی‌گرم کلسترول خالص در ایزوپروپانول)و لوله بلانک محتوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر و۱ میلی-لیتر معرف آنزیمی آماده شد و به مدت ۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارگرفته و در ادامه جذب نوری لوله‌های تست و استاندارد را در طول موج ۵۲۰ نانومتر در مقابل بلانک قرائت گردید (۳). اندازه‌گیری لیپوپروتئین با چگالی کم و لیپوپروتئین با چگالی بالا به روش هموژن (homogeneous method) در طول موج ۵۰۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر صورت گرفت (۴). ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر سرم را با ۷۰۰ میکرولیتر Precipitant Reagent وارد میکروتیوب کرده سپس ۲۰۰ میکرولیتر کالیبره را با ۷۰۰ میکرولیتر Precipitant Reagent در میکروتیوب دیگر با سرم مخلوط نموده و هر دو میکروتیوب را به مدت ۲دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفوژ کرده محلول رویی هر دو میکروتیوب را برداشته و به میکروتیوپ دیگر انتقال داده ۱۰۰۰میکرولیتر Reagent میکروتیوپ دوم را با سمپلر برداشته و با ۱۰۰میکرولیتر سرم روی رسوب (میکروتیوب ۱) به کیت اضافه نموده۱۰۰۰میکرولیتر Reagent دوم را با ۱۰۰میکرولیتر کالیبره و به کیت اضافه نموده به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری قرار داده و بعد با طول موج ۵۰۰ نانومتر در اسپکتروفتومتر گذاشته تا میزان جذب اندازه گیری گردد.

برای سنجش وضعیت آنتی اکسیدانی، از ۹ قطعه ماهی از هر تیمار کبد جداسازی شد و سپس در نیتروژن مایع فریز و تا زمان آنالیز شیمیایی در ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس نمونه های کبد به همراه فسفات بافر خنک (۱:۱۰ اسیدیته ۶/۴ و ۰/۰۶۴ مولار فسفات بافر) توسط میکسر هموژنیزه گردید و در دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد و مایع رویی آن در میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری جمع‌آوری شد (۲۵). به منظور سنجش کاتالاز، ایتدا در یک

کووت ۲ میلی‌لیتر نمونه رقیق شـــده و ا میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن اضافه شـــد. ســـپس در کووت دیگر (بلانک) مقدار ۲ میلی لیتر نمونه رقیق و ۱ میلی لیتر بافر فســـفات تهیه شـــد و جذب نوری هر دو کووت در دستگاه اســـپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتـــر قرائت گردید (۸). ظرفیت تام آنتی‌اکســـیدانی با اســـتفاده از روش FRAP (ferric reducing ability of plasma) انجام شـــد. این روش بر اســـاس توانایی نمونه در احیای یون‌های فریک به فرو در حضور ماده‌ای به‌نام (Tripuridyl- s- triazine) استوار است و میزان احیاء کنندگی نمونه از طریق افزایش غلظت کمپلکس فوق توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۳ نانومتر اندازه گیری گردید. برای ســـنجش مالون دی‌آلدئید، محلول صاف شده رویی با اسید تیوباربیتوریک در حرارت ۹۵ درجه ســـانتی‌گراد و به مدت ۵۰ دقیقه واکنش داده شـــد و در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت گردید (۱)، گلوتاتیون توســـط کالریمتری با کیت ســـنجش (ZellBio، آلمان) (۱۷) در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه در طول موج ۴۱۲ نانومتر قرائت گردید.

آنالیز آماری

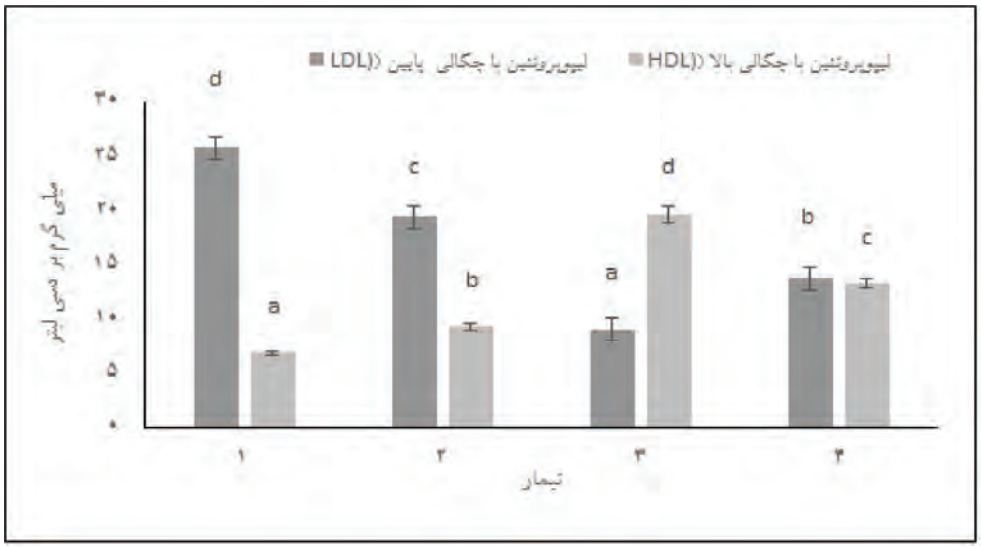
با استفاده از تست کالموگراف اســـمیرنوف نرمال بودن داده‌ها بررسی شـــد. هم‌چنین به‌منظور بررســـی برابری واریانس‌ها از تست لون استفاده شـــد. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از ترکیبات لیپیدی و وضعیت آنتی اکسیدانی ماهی با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و جهت مقایسه میانگین‌ها (میانگین± خطای معیار) از آزمون مقایسه چند دامنه‌ای دانکن با ســـطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد (p=۰/۰۵). برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS ۱۶ در محیط ویندوز XP استفاده گردید. و کلیه داده‌هایی که بر حسب درصد بودند در ابتدا از آن‌ها لگاریتم طبیعی گرفته شد (Ln). رسم نمودار در محیط Excel (۲۰۱۳) انجام شد.

نتایج

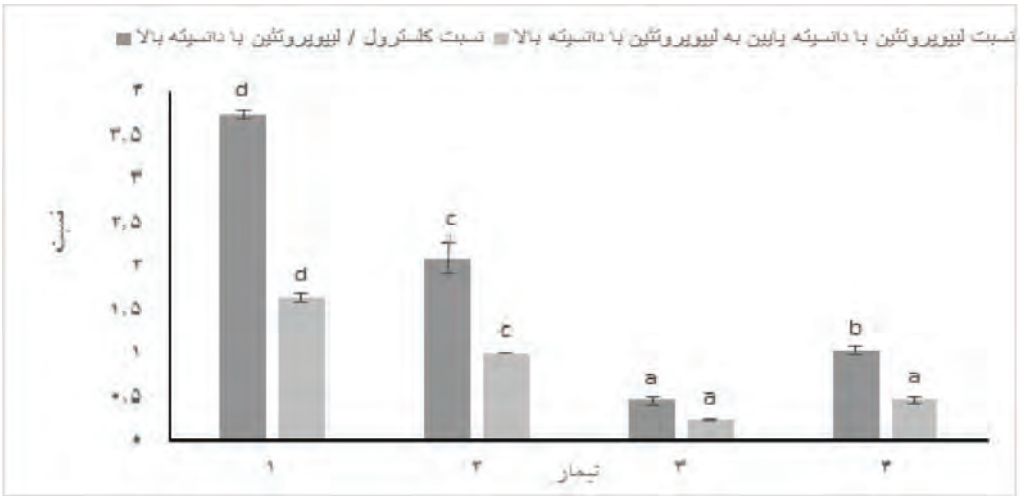
شکل۱ تغییرات میانگین لیپوپروتئین با چگالی پایین و لیپوپروتئین با چگالی بالا کبد ماهی کفال خاکســـتری در انتهای دوره آزمایش (روز ۶۰) نشـــان داده اســـت. بیشـــترین مقدار لیپو پروتئین با چگالی پایین (LDL) درتیمـــار شـــاهد (۰/۸۸ ±۲۵/۶۶ میلی‌گرم بر دســـی‌لیتر) (فاقد ســـین بیوتیک) و کمترین مقدار آن در تیمار ۳ (۰/۵۷± ۹ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) مشـــاهده شد و اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد (P<۰/۰۵). درحالی‌که کمترین مقدار لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL) در تیمار شاهد (۰/۱۶±۶/۸۳ میلی‌گرم بر دســـی‌لیتر) و بیشـــترین میزان آن در تیمار ۳ (۰/۷۹ ±۱۹/۵۶ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) مشاهده شد.

نتایج مربـــوط به تغییرات میانگین تری‌گلیســـرید و کلســـترول کبد ماهـــی کفال خاکســـتری در تیمارهـــای مختلف در پایـــان دوره آزمایش (روز ۶۰) در شـــکل۲ نشـــان داده شـــده اســـت. بر طبق نمودار، کمترین میزان تری‌گلیســـرید(۰/۷۶ ±۵۳/۳۳ میلی‌گرم بر دســـی‌لیتر) و کلسترول (۰/۳±۴/۶ میلی‌گـــرم بر دســـی‌لیتر) در تیمار ۳ و بیشـــترین میزان آن‌ها به‌ترتیـــب ۲/۰۸±۱۱۳ و ۰/۳۹ ±۱۱/۲۳ میلی‌گرم بر دســـی‌لیتر در تیمار شـــاهد مشاهده شـــد. هم‌چنین میزان تری‌گلیســـرید و کلسترول در بین تیمار-های مورد آزمایش با تیمار شـــاهد اختلاف معنی‌دار ی را نشان داد (P <۰/۰۵).

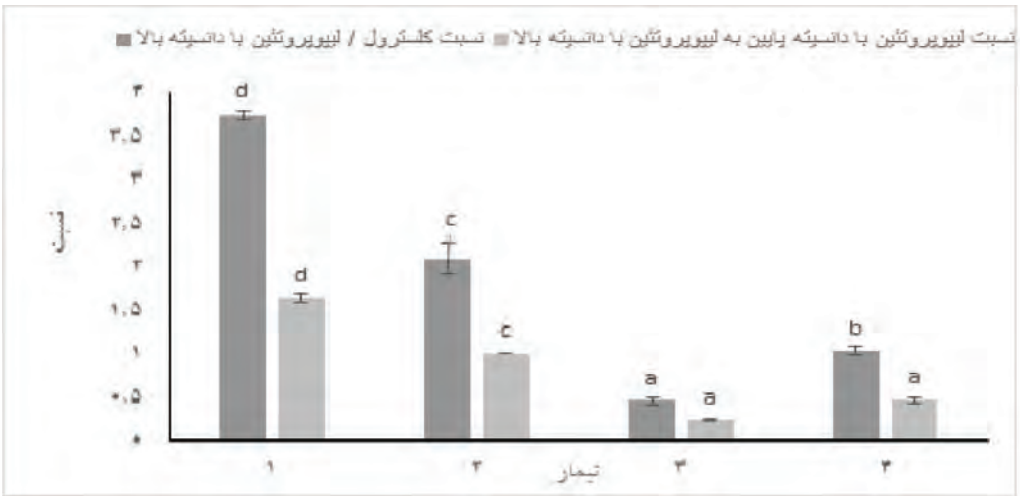
در شکل۳ تغییرات نسبت لیپوپروتئین با چگالی کم بر لیپو پروتئین با



شکل۱- میانگین (± خطای معیار) لیپوپروتئین با چگالی پایین و لیپوپروتئین با چگالی بالا کبد ماهی کفال خاکستری در انتهای دوره آزمایش (روز ۶۰) حروف نامشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها می باشد (P<۰/۰۵) تیمار ۱ تا ۴ به ترتیب حاوی ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم سین بیوتیک بر کیلوگرم غذا می‌باشد.



شکل۲- میانگین (± خطای معیار) کلسترول و تری‌گلیسرید کبد ماهی کفال خاکستری در انتهای دوره آزمایش (روز ۶۰) حروف نامشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد (P<۰/۰۵). تیمار ۱ تا ۴ به‌ترتیب حاوی ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم سین‌بیوتیک بر کیلوگرم غذامی باشد.



شکل۳-. میانگین (± خطای معیار) نسبت کلسترول به لیپوپروتئین با دانسیته بالا و نسبت لیپوپروتئین با دانسیته پایین به لیپوپروتئین با دانسیته بالا کبد ماهی کفال خاکستری در انتهای دوره آزمایش (روز ۶۰) حروف نامشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها می‌باشد (p<۰/۰۵). تیمار ۱ تا ۴به‌ترتیب حاوی ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم سین بیوتیک بر کیلوگرم غذا می‌باشد.

چگالی بالا و نسبت کلسترول بر لیپوپروتئین با چگالی بالا کبد ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مورد آزمایش در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰) را نشان داده است. بیشترین نسبت میزان لیپوپروتئین با چگالی کم بر لیپو پروتئین با چگالی بالا (۰/۰۵±۱/۶۴) و نسبت کلسترول بر لیپوپروتئین با چگالی بالا (۰/۰۵±۳/۷۵) در تیمار شاهد و کمترین میزان آن‌ها به‌ترتیب ۰/۰۱±۰/۲۳ و۰/۰۴±۰/۴۶ در تیمار ۳ مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد (P<۰/۰۵).

تغییرات میانگین آنتی‌اکسیدان کل کبد ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰) در شکل۴ نشان داده شده است. بیشترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل در تیمار ۳ (۰/۷۱± ۷/۷۵ میکرومول بر گرم بافت) مشاهده شد و اختلاف معنی داری را با تیمار ۱ و ۲ نشان داد (P<۰/۰۵) در حالی‌که بین تیمار ۴ (۰/۶۸ ± ۵/۹۳ میکرومول بر گرم بافت) با تیمار ۳ این اختلاف معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

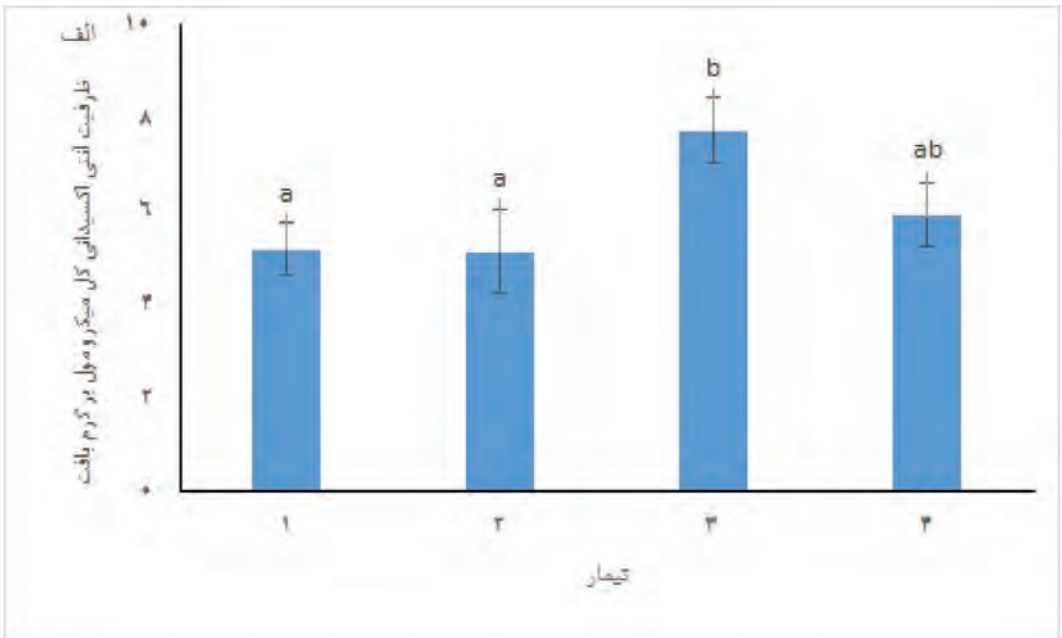
شکل۵ تغییرات میزان مالون دی الدئید کبد ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰) را نشان می‌دهد. کمترین میزان مالون دی آلدئید در تیمار ۳ (۳/۲۲±۵۰/۷۸ نانومول بر گرم بافت) مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد. هم‌چنین بین تیمار ۲ و ۱ این اختلاف معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).. درحالی‌که این اختلاف بین تیمار ۴ (۲/۴± ۶۷/۳۹ نانومول بر گرم بافت) با تیمار ۲ (۳/۶۱± ۸۰/۶ نانومول بر گرم بافت) و ۱ (۳/۸۳± ۸۰/۴۲ نانومول بر گرم بافت) معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

تغییرات میانگین کاتالاز کبد ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مورد آزمایش در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰) در شکل۶ نشان داده شده است. میزان کاتالاز بین تیمارهای مورد آزمایش با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵).

شکل۷ تغییرات میزان گلوتاتیون احیاء کبد ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مورد آزمایش در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰) را می‌دهد. بیشترین میزان گلوتاتیون احیاء در تیمار ۳ (۰/۵۱± ۱۲/۸۷ میکرومول بر گرم بافت) مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری را با تیمار ۱ (۰/۲۳ ± ۹/۴ میکرومول بر گرم بافت) و ۲ (۰/۳۶±۹/۴۳ میکرومول بر گرم بافت) نشان داد (P<۰/۰۵) در حالی‌که بین تیمار ۴ با تیمار ۳ این اختلاف معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

بحث

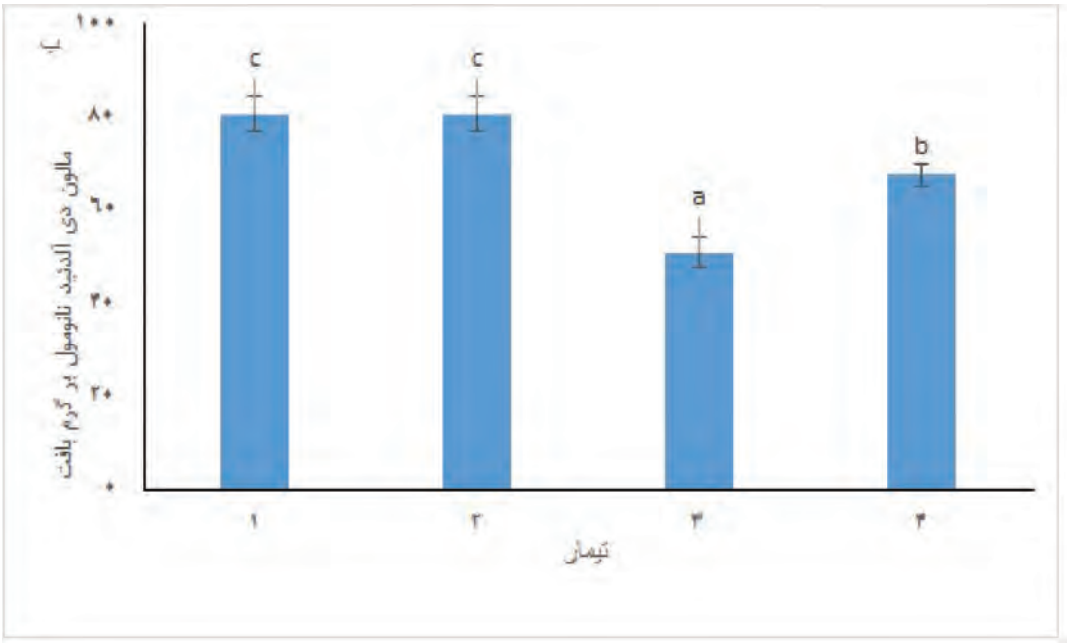
در تحقیق حاضر بیشترین مقدار لیپوپروتئین با چگالی پایین (LDL)) درتیمار شاهد (۰/۸۸ ± ۲۵/۶۶ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) و بیشترین میزان لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL) در تیمار ۳ (۰/۷۹ ± ۱۹/۵۶ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) مشاهده شد. به نظر می‌رسد سین‌بیوتیک به میزان ۱ گرم در کیلوگرم منجر به کاهش میزان لیپوپروتئین با چگالی پایین (LDL)) و



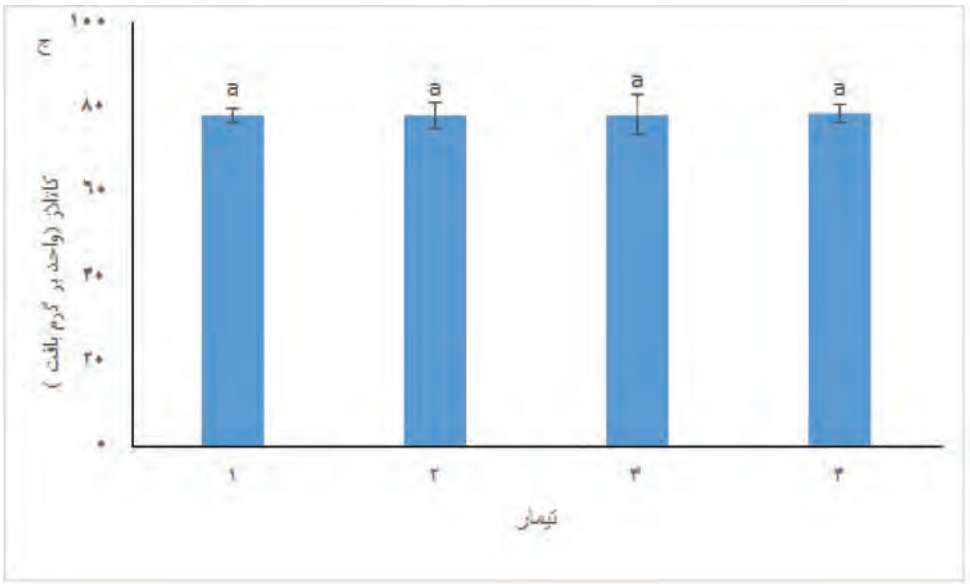
شکل۴- میانگین (± خطای معیار) ظرفیت آنتی اکسیدانی کل کبد ماهی کفال خاکستری در انتهای دوره آزمایش (روز ۶۰) حروف نامشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد (p<۰/۰۵). تیمار ۱ تا ۴به‌ترتیب حاوی ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم سین بیوتیک بر کیلوگرم غذا می‌باشد.

افزایش لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL) می‌شود. پس از اولین استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری، محققان اثرهای مفید این مواد را در پژوهش‌های مختلف اثبات کردند (۱۴). ی و همکاران (۳۱) در پژوهشی اثرات جدا و ترکیبی فروکتوالیگوساکارید، مانان الیگوساکارید و باکتری *Bacillus clausii* را بر روی رشد، ترکیبات لاشه، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و متابولیسم چربی بر ماهی فلاندر ژاپنی گونه *Paralichthys olivaceus* مطالعه کردند. آن‌ها نشان دادند که میزان لیپوپروتئین با چگالی پایین LDL در تیمارهای حاوی فروکتوالیگوساکارید (۵گرم برکیلوگرم)، فروکتوالیگوساکارید و باکتری B. clausii (۵ گرم برکیلوگرم جیره فروکتوالیگوساکارید و ۱۰۷ واحد تشکیل کلونی به ازای هرگرم Bacillus clausii) و ترکیب ۲/۵ گرم فروکتوالیگوساکارید، ۲/۵ گرم مانان الیگوساکارید و ۱۰۷ واحد تشکیل کلونی به ازای هرگرم (*Bacillus clausii* باکتری B. clausii به طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها و تیمار کنترل کاهش یافت که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. سین‌بیوتیک‌ها پروفیل چربی را در حیوانات تحت تاثیر قرار داده و می‌توانند فعالیت لیپولیتیک را افزایش دهند (۲۸). بر اساس مطالعات پیشین پروبیوتیک‌ها با کاهش کلسترول سرم پروفیل چربی را بهبود می‌بخشند (۱۲). پروبیوتیک‌ها از چند طریق متابولیسم کلسترول را کنترل می‌کنند، می‌توانند مانع جذب کلسترول در روده شوند و یا اینکه پروبیوتیک‌ها کلسترول را به دیواره غشای سلولی متصل می‌کنند (۱۶). مکانیسم دیگری که ممکن است نقش داشته باشد در کاهش کلسترول، تولید اسیدهای چرب زنجیر کوتاه به‌وسیله تخمیر پروبیوتیکی است. اسیدهای چرب کوتاه می‌توانند از سنتز کلسترول کبدی جلوگیری کنند. اثر کاهش کلسترول پروبیوتیک‌ها ممکن است به‌وسیله عدم اتصال آنزیمی اسیدهای صفراوی از طریق هیدرولیز نمک‌های صفراوی نیز باشد. علاوه بر این می‌تواند در چرخه نمک‌های صفراوی درون کبدی دخالت کند. زیرا کلسترول پیش ساز سنتز اسیدهای صفراوی جدید است. این تداخل می‌تواند به کاهش غلظت کلسترول سرم منجر شود (۲۰). جذب مستقیم کلسترول توسط پروبیوتیک‌ها نیز سبب کاهش غلظت کلسترول می شود (۲۱). کاهش کلسترول خون ممکن است به‌علت وجود برخی از باکتری‌های پروبیوتیک به‌ویژه باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک باشد که می‌توانند در جذب مستقیم کلسترول در روده از طریق عدم اتصال نمک‌های صفراوی دخالت کنند (۲۰).

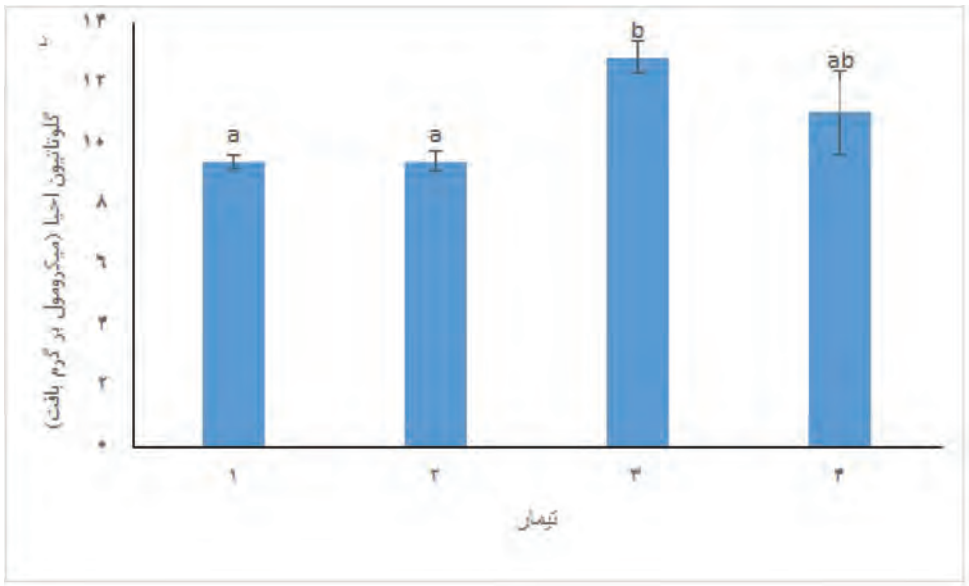
همچنین بررسی میزان تری‌گلیسرید و کلسترول کبد ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰) اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مورد آزمایش با تیمار شاهد نشان داد که کمترین میزان تری‌گلیسرید(۰/۷۶± ۵۳/۳۳ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) و کلسترول (۰/۳±۴/۶ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) در تیمار ۳ و بیشترین میزان آن‌ها به‌ترتیب ۲/۰۸±۱۱۳ و ۰/۳۹ ± ۱۱/۲۳ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر در تیمار شاهد وجود داشت. مهرابی و همکاران (۱۹) تاثیر سطوح مختلف سین‌بیوتیک بایومین ایمبو را در هر سطح ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم بر کیلوگرم جیره غذایی



شکل۵- میانگین (± خطای معیار) مالون دی آلدئید کبد ماهی کفال خاکستری در انتهای دوره آزمایش (روز ۶۰) حروف نامشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می باشد (p<۰/۰۵). تیمار ۱ تا ۴به‌ترتیب حاوی ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم سین بیوتیک بر کیلوگرم غذا می‌باشد.



شکل۶- میانگین (± خطای معیار) کاتالاز کبد ماهی کفال خاکستری در انتهای دوره آزمایش (روز ۶۰) حروف نامشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می باشد (p<۰/۰۵). تیمار ۱ تا ۴به‌ترتیب حاوی ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم سین بیوتیک بر کیلوگرم غذا می‌باشد



شکل۷- میانگین (± خطای معیار) گلوتاتیون احیاء کبد ماهی کفال خاکستری در انتهای دوره آزمایش (روز ۶۰) حروف نامشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می باشد (p<۰/۰۵). تیمار ۱ تا ۴ به‌ترتیب حاوی ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم سین بیوتیک بر کیلوگرم غذا می‌باشد

بر شـــاخص‌های ایمنی و عملکردی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که افزودن بایومین ایمبو در هر سه سطح ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم بر کیلوگرم جیره غذایی سبب افزایش معنی‌دار در میزان پروتئین سرم خون می شود. اما میزان تری‌گلسیرید سرم در بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری نشـــان نداد. ی و همکاران (۳۱) نشان دادند که استفاده از پربیوتیک. پروبیوتیک و استفاده همزمان آن منجر به کاهش معنی‌دار کلســـترول ، نری گلیسرید و لیپوپروتئین با چگالی کم در مقایسه با گروه کنترل در ماهی کفشـــک ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) گردید. نتایج به دست آمده با پژوهش حاضر مطابقت دارد.

در شرایط فیزیولوژیکی طبیعی، سلول‌های حیوانی تولید انواع اکسیژن فعال می‌نمایند که همزمان با آن چندین مکانیسم دفاع آنتی اکسیدانی در بدن صورت می‌گیرد (۳۰، ۱۲). عدم تعادل بین تولید و حذف اکسیژن فعال منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو می شود. آنتی اکسیدان‌های ماهی شامل آنزیم‌های آنتی اکســـیدانی (کاتلاز، سوپر اکسیداز دســـیموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز) و آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی (ویتامین C و ویتامین E و اسید اوریک) به واسطه اکسیژن فعال واکنش‌های مختلف شـــیمیایی را کاتالیز می‌نمایند (۱۸). ســـنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی ابزار مفیدی برای تعیین وضعیت آنتی اکسیدانی و تشخیص استرس اکسیداتیو در مایعات و بافت بدن ماهی می‌باشد (۱۷،۳۰). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اســـتفاده از ۱ گرم بر کیلوگرم سین بیوتیک در جیره غذایی ماهی کفال خاکستری منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنتی اکسیدان کل، کاتلاز، گلوتاتبون احیاء و کاهش معنی‌داری فعالیت مالانون دی آلدئید در کبد شد که با تحقیق صورت گرفته توسط زانگ و همکاران (۳۲) همخوانی داشـــت. آن‌ها گزارش کردند که استفاده از ۳ درصد فروکتوالیگوساکارید و ۱×۱۰۷ واحد تشـــکیل کلونی بر گرم پروبیوتیک *Bacillus licheniformis* در جیره غذایی ماهی سیم (*Megalobrama terminalis*) منجر به افزایش فعالیت آنتی اکســـیدان کل، کاتالاز، سوپراکســـیداز دیسموتاز و گلوتاتیون پراکســـیداز و کاهش فعالیت مالانون دی آلدئید در کبد شد. تحقیق مشابه دیگر بر روی ماهی کپور علف‌خوار (*Ctenopharyngodon idellus*) نشان داد که استفاده از جیره غذایی حاوی باســـیلوس به‌عنوان پروبیوتیک منجر به افزایش فعالیت آنتی اکســـیدان و کاهش میزان مالانون دی آلدئید در کبد شـــد (۳۰). این موضوع نشان می‌دهد که پروبیوتیک به‌عنوان یک آنتی ژن منجر به تحریک سیستم ترشح آنزیم‌های آنتی اکسیدان گردید و با افزایش ترشح آنتی‌اکســـیدان منجر به حذف رادیکال‌های آزاد و اضافی تولید شده توســـط سوخت و ساز بالای بدن و استرس تامطلوب زیست محیطی گردید و با تنظیم تعادل رادیکال‌های آزاد بدن بافت و اندام‌های آســـیب دیده بدن ترمیم شدند (۳۲، ۳۰). ریس بسریل و همکاران (۲۳) و آی و همکاران (۲) به ترتیب استفاده از مخمر (*Debaryomyces hansenii*) و *Bacillus subtilis* در جیره غذایی ماهی را به‌عنوان منبع بالقوه تولید آنزیم‌های آنتی اکسیدان پیشنهاد نمودند. آی و همکاران (۲) گزارش نمودند که استفاده از $۱/۳\times۱۰^{۷}$ واحد تشکیل کلونی بر گرم در جیره غذایی ماهی شوریده (*Larimichthys crocea*) منجر به افزایش فعالیت سوپر اکسیداز دیسموتاز گردید. همچنین آن‌ها گزارش کردند که غلظت مالانون دی آلدئید نشـــان‌دهنده فرآیندهای سمی نشات گرفته از رادیکال‌های آزاد می‌باشد و سطوح مالانون دی آلدئید شاخص مناسبی از میزان پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد (۲).

در کل، نتایج حاصل از این تحقیق نشـــان داد که استفاده از غلظت ۱ گرم سین بیوتیک بر کیلوگرم جیره غذایی منجر به کاهش کلسترول، تری گلیسرید، لیپوپروتئین با چگالی کم وافزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل در بچه ماهی کفال خاکستری می‌گردد..

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از آزمایشگاه تخصصی پاتوبیولوژی و آسیب شناسی صدف چابهار و کارشـــناس محترم آزمایشگاه دانشگاه شهید چمران اهواز تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1. Akerboom, T.P. and H. Sies. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathionemixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymology* 77: 373–382.

2. Ai, Q., H. Xu, K. Mai, W. Xu, J. Wang and W. Zhang. 2011. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, Larimichthys crocea. *Aquaculture* 317: 155-161.

3. Burtis, C.A., E.R. Ashwood and D.E. Brund. 1994. Tietz Textbook of Clinical Chemistry (5thed.).W.B. Sunders Company. Philadelphia, USA.

4. Castelli, W.P. 1977. HDL Cholesterol and other lipids in coronary heart disease. Circulation 55:767-772.

5. Chitsaz, H., R. Akrami and M. Arab Arkadeh. 2016. Effect of dietary synbiotics on growth, immune response and body composition of Caspian roach (*Rutilus rutilus*). *Iranian Journal Fisheries Sciences* 15: 170-182.

6. Denev, S., Y. Staykov, R. Moutafchieva and G. Beev. 2009. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. *International of Aquatic Research* 1:1–29.

7. Dimitroglou, A., D.L. Merrifield, P. Spring, J. Sweetman, R. Moate and S.J. Davies. 2010. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilization, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 300:182–188.

8. Draper, H.H., E.J. Squires, H. Mahmoodi, J. Wu, S. Agarwal and M. Hadley. 1993. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials, *Free Radical Biology and Medicine* 15: 353-363.

9. Gibson, G.R. and M.B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics.*Journal of Nutrition* 125: 1401–1412.

10. Haghighi, D.H., M. Fallahi and Y. Abdollahtabar. 2010. The ef-

fect of different levels of Biomin Imbo synbiotic on growth and, survival of *Rutilus frisii kutum* fry. Journal of Fisheries Islamic Azad University, Azadshahr Branch. 4: 1-15.

11. Herna´ndez Serrano, P. 2005. Responsible Use of Antibiotics in Aquaculture, FAO Fisheries Technical Paper. FAO, Rome.

12. Kavitha, K., A. G. Reddy, K. K. Reddy, C. S. Kumar, G. Boobalan and K. Jayakanth. 2016. Hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant effects of pioglitazone, insulin and synbiotic in diabetic rats. *Veterinary World* 9(2): 118-121.

13. Kim, D. and B. Austin. 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish and Shellfish Immunology* 21: 513–524.

14. Lara-flores, M., M. A. Olvera-Novoa, B. E. Guzmán Méndez and W. López- Madrid. 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in *Nile tilapia* (*Oreochromis niloticus). Aquaculture* 216:193-201.

15. Liong, M. T. and N. P. Shah. 2005. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *Journal of dairy science* 88(1): 55-66.

16. Liong, M. T., F. R. Dunshea and N. P. Shah. 2007. Effects of a synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4962 on plasma lipid profiles and morphology of erythrocytes in hypercholesterolaemic pigs on high-and low-fat diets. *British Journal of Nutrition* 98(4): 736-744.

17. Marklund, S. and G. Marklund. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry* 47:469-474.

18. Martı´nez-A lvarez R.M., A.E. Morales, and A. Sanz. 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Review Fish Biology and Fisheries*15:75–88.

19. Mehrabi, Z., F. Firouzbakhsh and A. Jafarpour. 2012. Effects of dietary supplementation of synbiotic on growth performance, serum biochemical parameters and carcass composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96: 474-481.

20. Ooi, L.G. and M.T. Liong. 2010. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *International Journal of Molecular Sciences* 11: 2499–2522.

21. Pereira, D. I. and G. R. Gibson. .2002. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Applied and environmental microbiology* 68(9): 4689-4693.

22. Porfaraj, V., M. Karami, S.A. Nezami, G.R. Rafiee, H. Khara and A. Hamidoghli. 2013. Study of some biological features of Mullets in Iranian coasts of the Caspian sea. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics* 2: 97-110.

23. Reyes-Becerril, M., I. Salinas, A. Cuesta, J. Meseguer, D. Tovar-Ramirez, F. Ascencio-Valle and M.A. Esteban. 2008. Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 25: 731-739.

24. Ringø, E., R.E. Olsen, T.Ø. Gifstad, R.A. Dalmo, H. Amlund, G.I. Hemre and A.M. Bakke. 2010. Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition* 16:117–136.

25. Safari, O., M. Mehraban Sang Atash and M. Paolucci. 2015. Effect of dietary L- carnitine level on growth performance, immune responses and stress resistance of juvenile narrow clawed crayfish, Astacus *Leptodactylus leptodactylus* Eschcholtz, 1823. *Aquaculture* 439: 20-28.

26. Torrecillas, S., A. Makoi, M.J. Cabaliero, D. Montero, L. Robaina and L.Tort. 2007. Immunostimulations and improved infection resistance in European sea bass *(Dicentrarchus labrax)* fed mannan oligosaccharides. *Fish and Shellfish Immunology* 23:969–981.

27. Trinder, P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annuals of Clinical Biochemistry* 6: 24-27.

28. Vitali, B., M. Ndagijimana, S. Maccaferri, E. Biagi, M.E. Guerzoni and P. Brigidi. 2012. An in vitro evaluation of the effect of probiotics and prebiotics on the metabolic profile of human microbiota. *Anaerobe* 18: 386-391.

29. Wang, Y., J. Li and J. Lin. 2008. Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. *Aquaculture* 281:1–4.

30. Weifen, L., Z. Xiaoping, S. Wenhui, D. Bin, L. Quan, F. Luoqin, Z. Jiajia, W. Yue and Y. Dongyou. 2012. Effects of Bacillus preparations on immunity and antioxidant activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Fish Physiology and Biochemistry 38: 1585-1592.

31. Ye, J. D., K. Wang, F.D. Li and Y.Z. Sun. 2011. Single or combined effects of fructo-and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture nutrition* 17(4): 902-911

32. Zhang, C.N., X.F. Li, W.N. Xu, G.Z. Jiang, K.L. Lu, L.N. Wang and W.B. Liu. 2013. Combined effects of dietary fructooligosaccharide and *Bacillus licheniformis* on innate immunity, antioxidant capability and disease resistance of triangular bream (*Megalobrama terminalis*). *Fish and Shellfish Immunology* 35: 1380-1386.