اثر تغذیه با سطوح مختلف لاکتوفرین گاوی بر عملکرد رشد و فعالیت لایزوزیم سرم و موکوس تاس‌ماهی سیبری جوان

خلیل اسلاملو[۱]، بهرام فلاحتکار[۲]، سایچیرو یوکویاما[۳] و علیرضا عباس‌علیزاده[۴]

تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۳۰

خلاصه

این مطالعه با هدف بررسی اثرات استفاده از لاکتوفرین به صورت خوراکی روی پارامترهای رشد و ایمنی غیراختصاصی تاس‌ماهی سیبری انجام گردید. به این منظور شش جیره با سطوح مختلف شامل ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین در هر کیلوگرم غذا تهیه شد و ماهیان با وزن متوسط اولیه ۲/۰±۲۶/۳ گرم به مدت ۸ هفته با جیره‌های مذکور تغذیه شدند. برای سنجش شاخص‌های رشد با فاصله ۲ هفته تا انتهای آزمایش، طول کل و وزن در تیمارهای مختلف اندازه‌گیری شد. در انتهای آزمایش، برای سنجش میزان پارامترهای ایمنی غیراختصاصی از ماهیان خونگیری به عمل آمد و از موکوس آنها نمونه‌برداری شد. پارامترهای رشد ماهیان شامل وزن نهایی، فاکتور وضعیت (CF)، وزن کسب شده (WG)، نرخ رشد ویژه (SGR) و ضریب تبدیل غذایی (FCR) در طول مدت آزمایش در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($P>0/05$). همچنین تعداد گلبول‌های سفید و درصد افتراقی گلبول‌های سفید شامل مونوسیت، ائوزینوفیل، نوتروفیل و لنفوسیت در تیمارهای مختلف با تغییر سطح لاکتوفرین جیره اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($P>0/05$). اختلاف معنی‌داری در فعالیت لایزوزیم سرم و موکوس ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف لاکتوفرین نیز مشاهده نشد ($P>0/05$). میزان ترشح موکوس در ماهیانی که از ۴۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین تغذیه کرده بودند به صورت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت ($P<0/05$). با توجه به افزایش معنی‌دار ترشح موکوس در تیمارهای تغذیه کرده از لاکتوفرین این گونه به نظر می‌رسد که پتانسیل لاکتوفرین جهت استفاده به عنوان یک تحریک کننده سیستم ایمنی در تاس‌ماهی سیبری بسیار کم می‌باشد ولی نیاز به مطالعات بیشتر و اندازه‌گیری سایر پارامترهای ایمنی مرتبط دارد.

کلمات کلیدی: تاس‌ماهی سیبری، سیستم ایمنی، لاکتوفرین، سرم، موکوس، لایزوزیم، رشد

مقدمه

به حداقل رساندن تلفات ناشی از بیماری‌ها و کاهش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از پیش نیازهای موفقیت در صنعت آبزی‌پروری می‌باشد. محرک‌های سیستم ایمنی به موادی اطلاق می‌شود که به کارگیری آنها باعث تقویت سیستم ایمنی و مقاومت در برابر بیماری‌ها می‌شود (Sakai, 1999). بیشتر تحقیقات انجام شده روی آبزیان بر استفاده از بتا گلوکان تمرکز داشته در حالی که سایر محرک‌های ایمنی مانند لاکتوفرین پتانسیل بالایی برای استفاده در آبزی‌پروری دارند (Kakuta, 2000). لاکتوفرین یک نوع گلیکوپروتئین باند کننده آهن با وزن مولکولی ۸۰ کیلودالتون می‌باشد و به خانواده ترانسفرین‌ها تعلق دارد (Wakabayashi et al., 2006).

لاکتوفرین دارای کارکردهای زیستی فراوانی است که از جمله آن می‌توان به فعالیت‌های ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد قارچی و ضد انگلی، تحریک و تعدیل سیستم ایمنی و تنظیم متابولیسم آهن اشاره کرد

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان
[۲] دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان
[۳] استادیار گروه تغذیه آبزیان، دانشکده شیلات، دانشگاه کاگوشیما، کاگوشیما، ژاپن
[۴] کارشناس ارشد شیلات، مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی

(نویسنده مسئول) E-mail: falahatkar@guilan.ac.ir

(Gonzalez-Chavez et al., 2009, Jenssen and Hancock, 2009, Tomita et al., 2009). در بسیاری از تحقیقات انجام شده روی پستانداران، اثرات مثبت لاکتوفرین بر پاسخ‌های فیزیولوژیک در اثر استفاده خوراکی آن به اثبات رسیده است (Wakabayashi et al., 2006). اگر چه وجود لاکتوفرین در آبزیان به اثبات نرسیده اما به کارگیری آن به عنوان تحریک کننده سیستم ایمنی می‌تواند مفید باشد (Kumari and Sahoo, 2006). به عنوان مثال، استفاده از لاکتوفرین گاوی در جیره ماهی طلایی (*Carassius auratus*) باعث افزایش رشد و مقاومت آن به انگل لکه سفید (*Ichthyophthirius multifiliis*) شده است (Kakuta 1996). در ماهی قزل‌آلا (*Oncorhynchus mykiss*)، بکارگیری لاکتوفرین باعث افزایش مقاومت در برابر عفونت‌های باکتریایی (Sakai et al., 1993) و افزایش میزان بیگانه خواری گلبول‌های سفید خون شده است (Sakai et al., 1995). همچنین استفاده از لاکتوفرین در جیره باعث افزایش ترشح موکوس و تعداد گرانولوسیت‌ها و لنفوسیت‌های خون شانک قرمز (*Pagrus major*) (Kakuta et al., 1996) و افزایش پارامترهای ایمنی غیراختصاصی در گربه ماهی (*Clarias batrachus*) شده است (Kumari et al., 2003). در برخی از مطالعات به اثبات رسیده است که بکارگیری لاکتوفرین در جیره ماهیان باعث تشدید پاسخ‌های استرسی (Yokoyama et al., 2006) یا سرکوب آنها (Kakuta 1996, 1998) می‌شود که این تاثیرات می‌تواند اثرات مثبت و یا منفی غیر مستقیمی روی سیستم ایمنی داشته باشد (Ortuno et al., 2001). البته در برخی مطالعات با به کاربردن لاکتوفرین خوراکی تغییرات معنی‌داری در رشد و شاخص‌های ایمنی ماهی آزاد (*Salmo salar*) و تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) مشاهده نشد (Lygren et al., 1999, Welker et al., 2007).

ماهیان خاویاری از جمله با ارزش‌ترین و اقتصادی‌ترین گونه‌های ماهیان دنیا می‌باشند (Williot et al., 2002). در میان گونه‌های مختلف ماهیان خاویاری، پرورش تاس‌ماهی سیبری به عنوان یکی از گونه‌های مهم پرورشی جهان و اصلی‌ترین گونه پرورشی در اروپا به دلیل سن پایین تولید مثل و مقاومت آن به شرایط متفاوت محیطی در حال افزایش است (Gisbert and Williot, 2002). مطالعات انجام شده در مورد اثر محرک‌های سیستم ایمنی بر ماهیان خاویاری بسیار کم می‌باشد و هیچ مطالعه‌ای نیز در مورد اثرات لاکتوفرین روی ماهیان خاویاری انجام نشده است. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات به کارگیری لاکتوفرین خوراکی بر عملکرد رشد و احتمال تحریک سیستم ایمنی با اندازه‌گیری میزان فعالیت لایزوزیم سرم و موکوس و تعیین درصد افتراقی گلبول‌های سفید در تاس‌ماهی سیبری انجام پذیرفت.

مواد و روش کار

طراحی آزمایش و جیره‌های آزمایشی

جهت انجام این آزمایش از شش جیره آزمایشی با مقادیر متفاوت لاکتوفرین شامل ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین گاوی (شرکت صنایع شیر موریناگا، ژاپن) در هر کیلوگرم غذا استفاده شد (Welker et al., 2007). سطوح متفاوت لاکتوفرین به همراه آلفا سلولز (۱٪) به یک جیره تجاری فرموله شده (مکمل اصفهان، اصفهان، ایران؛ ۴۳٪ پروتئین، ۱۵٪ چربی، ۱۴٪ رطوبت و ۱۱٪ خاکستر) اضافه گردید و پس از مخلوط کردن به وسیله یک چرخ گوشت به صورت پلت در آورده شد. قطر پلت‌های مورد استفاده ۲ تا ۳ میلی‌متر بود که در یک ماه اول پرورش از پلت با قطر ۲ میلی‌متر و سپس تا انتهای دوره از پلت با قطر ۳ میلی‌متر استفاده شد. پس از پلت کردن، جیره‌های آزمایشی به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد خشک شدند و سپس در دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده ذخیره شدند.

پرورش ماهیان و سیستم پرورشی

این مطالعه در مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی (واقع در استان گیلان) انجام شد. جهت انجام این مطالعه از ۴۵۰ قطعه تاس‌ماهی سیبری پنج ماهه با میانگین وزن ۰/۲±۲۶/۳ گرم و ۱۸ تانک فایبرگلاس (قطر ۲ متر، عمق ۳۵ سانتی‌متر و ظرفیت ۱۴۰۰ لیتر آب) استفاده شد. قبل از شروع آزمایش، ماهیان به جهت تطابق با شرایط آزمایش به مدت ۱۵ روز در تانک‌های فایبرگلاس نگهداری شده و روزانه ۵ نوبت با جیره تیمار شاهد تغذیه شدند. برای شروع آزمایش، طول و وزن ماهیان اندازه‌گیری شد و سپس به طور تصادفی در ۱۸ تانک (هر تیمار شامل ۳ تکرار) توزیع شدند (۲۵ ماهی برای هر تانک). سیستم پرورشی ماهیان به صورت باز بود و در هر دقیقه ۰/۴±۱۵ لیتر آب فیلتر شده رودخانه وارد هر تانک می‌شد. ماهیان به مدت ۸ هفته تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با جیره‌های آزمایشی به میزان ۳/۵ درصد وزن بدنشان در ۵ نوبت و در ساعات ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰ و ۲۴ غذادهی شدند (Mohseni et al., 2006). پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب در طول دوره پرورش اندازه‌گیری شد (Tripathi and Govil, 2001)، به طوری که دمای آب ۱/۷± ۱۸/۵ درجه سانتی‌گراد، نیتریت mg/l ۰/۰۲± ۰/۱، آمونیاک mg/l ۰/۰۰۱± ۰/۰۵ ، pH ۰/۴± ۷/۴ و اکسیژن محلول mg/l ۰/۶± ۸/۳ بود.

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد

جهت بررسی اثرات جیره‌های متفاوت بر شاخص‌های رشد، هر ۲ هفته یک بار تا انتهای آزمایش، وزن و طول کل ماهیان در تیمارهای مختلف اندازه‌گیری شد. شاخص‌های اندازه‌گیری شده شامل فاکتور وضعیت (CF)، وزن کسب شده (WG)، نرخ رشد ویژه (SGR) و ضریب تبدیل غذایی (FCR) در هر یک از گروه‌ها با استفاده از فرمول‌های زیر تعیین شد (Wangmi et al., 2009). همچنین در انتهای آزمایش شاخص کبدی[1] برای ۶ ماهی در هر تیمار با جداسازی و توزین کبد اندازه‌گیری شد.

WG (g) = میانگین وزن نهایی – میانگین وزن ابتدایی

FCR = وزن کسب شده / کل غذای مصرفی

SGR (% /day) = [Ln(وزن نهایی)–Ln(وزن اولیه) / دوره پرورش به روز] × ۱۰۰

CF =(وزن نهایی / طول^3) × ۱۰۰

HSI (%) = [(وزن کبد (گرم) / وزن بدن (گرم)] × ۱۰۰

جمع‌آوری نمونه‌ها

جهت بررسی وضعیت فیزیولوژیک ماهیان پس از ۸ هفته تغذیه، ۹ ماهی به صورت تصادفی از هر تیمار گرفته شد و سپس با استفاده از سرنگ غیر هپارینه ۵ میلی‌لیتری، ۳-۲ میلی‌لیتر خون از سیاهرگ دمی گرفته شد. پس از خون‌گیری مقداری از خون به لوله‌های حاوی هپارین جهت جلوگیری از لخته شدن برای اندازه‌گیری تعداد گلبول‌های سفید انتقال یافت و باقیمانده خون به ظروف بدون هپارین برای تهیه سرم انتقال یافت. نمونه‌های خون به مدت ۲ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا لخته شوند و سپس به مدت ۵ دقیقه در ۱۶۰۰×g سانتریفیوژ شدند (Webb et al., 2007). سرم با استفاده از سمپلر جداسازی و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

موکوس ماهیان جهت اندازه‌گیری فعالیت لایزوزیم بر اساس روش Aranishi و Nakane در سال ۱۹۹۷ جمع‌آوری شد. جهت این کار ابتدا سه ماهی از هر تکرار برداشته شد و به مدت یک دقیقه در فسفات بافر نمکی ۱۰ میلی‌مول (PBS, pH 7.5 ، حاوی ۱۱۵mM میکروسدیم) قرار داده شد و سپس موکوس از سطح پوست ماهیان به وسیله یک تکه پنبه استریل جمع‌آوری

1- Hepatosomatic index

شد. موکوس‌های جمع‌آوری شده به میزان ۴ برابر با PBS رقیق شد و پس از به هم زدن، به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰×g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی استخراج و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری نگهداری شدند.

اندازه‌گیری میزان ترشح موکوس

به منظور اندازه‌گیری میزان ترشح موکوس، موکوس از روی یک قسمت به مساحت مشخص (۲۰۰ میلی‌متر مربع از قسمت پشتی بدن) از روی بدن ۹ ماهی از هر تیمار جمع‌آوری شد و بلافاصله درون ۱ میلی‌لیتر از محلول بافر فسفات نمکی (PBS, pH 7.2) غوطه‌ور شد. نمونه‌ها با دور ۵۰۰۰ ×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس میزان پروتئین کل در نمونه‌ها اندازه‌گیری گردید (Bradford, 1976). میزان پروتئین کل در نمونه‌ها نشان دهنده میزان ترشح و یا میزان موکوس موجود بود (Kakuta et al., 1996, Yokoyama et al., 2006).

فاکتورهای خونی

برای شمارش تعداد گلبول‌های سفید (WBC) از پیپت ملانژور سفید استفاده گردید. نمونه‌های خونی با محلول ریس (با نسبت ۱ به ۵۰) رقیق گردید و به خوبی مخلوط شد. سپس در پیپت ملانژور سفید ریخته شد (Barros et al., 2002).

برای شمارش افتراقی گلبول‌های سفید، ابتدا یک قطره خون روی یک لام ریخته شد و گسترش خونی به حالت شعله‌ای تهیه شد. پس از خشک شدن لام‌ها از متانول خالص برای تثبیت آنها استفاده شد و در پایان از رنگ گیمسا جهت رنگ‌آمیزی لام‌ها استفاده شد. پس از ۲۰ دقیقه لام‌ها شسته و در دمای اتاق خشک و نهایتاً با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی X ۱۰۰ و با روغن ایمرسیون مشاهده انجام گردید. از قسمت‌های نازک لام جهت شمارش گلبول‌های سفید بر اساس الگوهای شکلی استفاده گردید. تعداد ۲۰۰ گلبول سفید شمرده شد و نتیجه نهایی به صورت درصد هر نوع از گلبول‌های سفید ارائه شد (Blaxhall and Daisley 1973).

فعالیت لایزوزیم سرم و موکوس بر اساس روش Cha و همکاران در سال ۲۰۰۸ و بر مبنای لیز باکتری گرم مثبت حساس به آنزیم لایزوزیم (*Micrococcus lysodiekticus*) اندازه‌گیری شد (Cha et al., 2008). به این منظور ابتدا یک سوسپانسیون با محلول کردن ۰/۲ میلی‌گرم از سلول‌های لیوفریزه *M. lysodiekticus* (سیگما، آمریکا) در یک میلی‌لیتر بافر سیترات سدیم ۰/۲ مولار (pH 5.5) تهیه شد. ۱۵µl از سرم یا موکوس رقیق شده، درون حفره‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد و سپس ۱۵۰µl از سوسپانسیون تهیه شده باکتری در بافر به آن افزوده و مخلوط گردید. جذب نوری نمونه‌ها هر ۵ دقیقه یک بار تا ۶۰ دقیقه به کمک الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد. از لایزوزیم استخراج شده از سفیده تخم مرغ (سیگما، آمریکا)، جهت تهیه منحنی استاندارد استفاده شد و هر واحد از فعالیت لایزوزیم بر اساس کاهش جذب (۰/۰۰۱ در دقیقه) تعیین شد.

تجزیه و تحلیل آماری

طرح این آزمایش به طور کاملاً تصادفی انجام گردید. ابتدا وضعیت داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنف (One – Sample Kolmogorov – Smirnov test) برای نرمال بودن داده‌ها بررسی شد. سپس از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) جهت مقایسه تیمارها استفاده شد. همچنین از آزمون رگرسیون برای بررسی ارتباط میان پارامترهای ایمنی استفاده شد. آزمون‌ها در محیط نرم‌افزار SPSS (version 15) و در سطح خطای ۰/۰۵ انجام شد. نتایج به صورت میانگین± خطای معیار (SE) ثبت گردید.

نتایج

شاخص‌های رشد تاس‌ماهی سیبری پس از ۵۶ روز پرورش با جیره‌های متفاوت لاکتوفرین در جدول ۱ نشان داده شده است. شاخص‌های مختلف رشد ماهیان از جمله وزن نهایی، WG، SGR و CF با تیمارهای مختلف لاکتوفرین تغییر معنی‌داری را نداشت (P>۰/۰۵). همچنین اختلاف معنی‌داری در FCR و HSI ماهیان در تیمارهای مختلف مشاهده نشد (P>۰/۰۵). روند رشد ماهیان نیز در طول مدت آزمایش در تیمارهای متفاوت یکسان بود و اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (نمودار ۱، P>۰/۰۵).

تعداد گلبول‌های سفید ماهیان در تیمارهای مختلف تغییر معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). با این حال تعداد گلبول‌های سفید در تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم بیشتر از سایر تیمارها بود (جدول ۲). درصد افتراقی گلبول‌های سفید شامل مونوسیت، ائوزینوفیل، نوتروفیل و لنفوسیت در تیمارهای مختلف با تغییر سطح لاکتوفرین جیره اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵).

تغییرات فعالیت لایزوزیم سرم و موکوس ماهیان در تیمارهای مختلف به ترتیب در نمودارهای ۲ و ۳ نشان داده شده است. هیچ اختلاف معنی‌داری در خصوص فعالیت لایزوزیم سرم و موکوس ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف لاکتوفرین مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

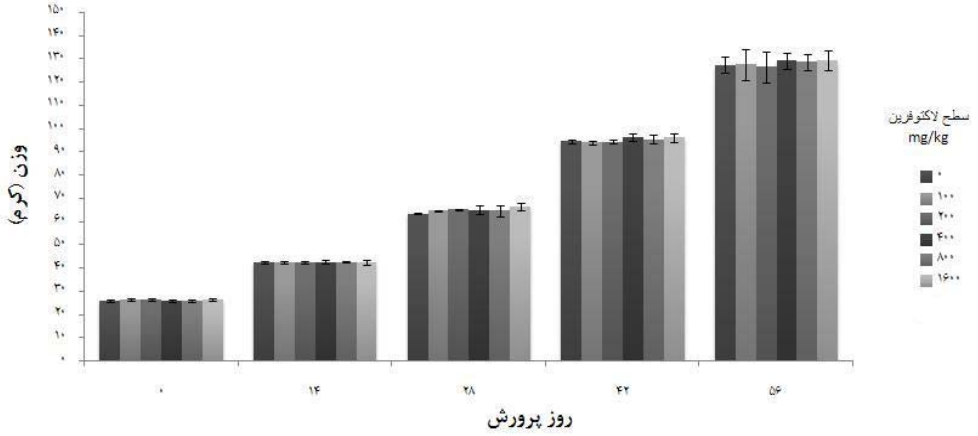
نتایج نشان داد که همبستگی میان تعداد گلبول‌های سفید با لایزوزیم سرم (R^2= 0.021) و همچنین تعداد گلبول‌های سفید با لایزوزیم موکوس بسیار ضعیف بود (R^2= 0.001).

میزان ترشح موکوس ماهیانی که از لاکتوفرین تغذیه کرده بودند در انتهای آزمایش بیشتر از گروه شاهد بود به طوری که این میزان در ماهیان تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین نسبت به ماهیان گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بود (P<۰/۰۵) ولی با وجود میزان بالاتر ترشح موکوس در سایر تیمارهایی که از لاکتوفرین تغذیه کرده بودند نسبت به شاهد، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین اختلاف معنی‌داری میان گروه ۴۰۰ میلی‌گرم با سایر تیمارهای لاکتوفرین مشاهده نشد (نمودار ۴).

جدول ۱: اثر سطوح مختلف لاکتوفرین جیره بر شاخص‌های رشد (میانگین± SE) بچه تاس‌ماهیان سیبری بعد از ۵۶ روز پرورش

میزان لاکتوفرین (mg/kg)	وزن اولیه (گرم)	وزن نهایی (گرم)	WG (گرم)	FCR	SGR (درصد/day)	CF	HSI (درصد)
۰	۲۶/۲۲±۰/۵۱	۱۲۷/۶۷±۳/۴۱	۱۰۱/۴۴±۳/۵۴	۰/۹۳±۰/۰۳	۲/۸۲±۰/۰۵	۰/۲۹±۰/۰۲	۵/۱۷±۰/۳۸
۱۰۰	۲۶/۴±۰/۶	۱۲۷/۷۵±۳/۶۴	۱۰۱/۳۶±۱/۶	۰/۹۳±۰/۰۱	۲/۸۱±۰/۰۲	۰/۳۱±۰/۰۰	۵/۰۷±۰/۳۵
۲۰۰	۲۶/۷±۰/۵۸	۱۲۶/۷±۶/۷	۹۹/۹۹±۲/۵۳	۰/۹۵±۰/۰۳	۲/۸۷±۰/۰۵	۰/۳±۰/۰۱	۴/۹۵±۰/۵۳
۴۰۰	۲۶/۲۳±۰/۵۵	۱۲۹/۳۳±۳/۶۳	۱۰۳/۱±۲/۰۸	۰/۹۳±۰/۰۳	۲/۸۵±۰/۰۶	۰/۳۱±۰/۰۱	۵/۰۴±۰/۴۷
۸۰۰	۲۶/۱±۰/۵۳	۱۲۸/۷۷±۳/۳۴	۱۰۲/۶۹±۴/۲۳	۰/۹۳±۰/۰۲	۲/۸۵±۰/۰۵	۰/۳±۰/۰۰	۵/۳۶±۰/۲۸
۱۶۰۰	۲۶/۳۷±۰/۵۳	۱۲۹/۶۸±۴/۳۹	۱۰۳/۳۱±۲/۷۷	۰/۹۳±۰/۰۱	۲/۸۴±۲/۰۲	۰/۳۱±۰/۰۱	۵/۰۸±۰/۵۳

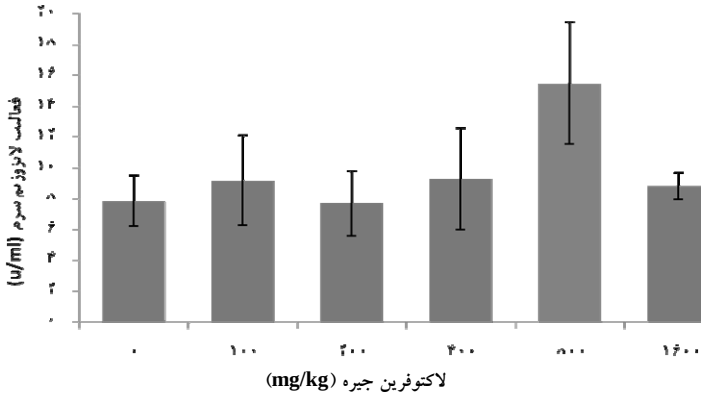
WG (وزن کسب شده)، FCR (ضریب تبدیل غذایی)، SGR (نرخ رشد ویژه)، CF (فاکتور وضعیت)، HSI (شاخص کبدی)



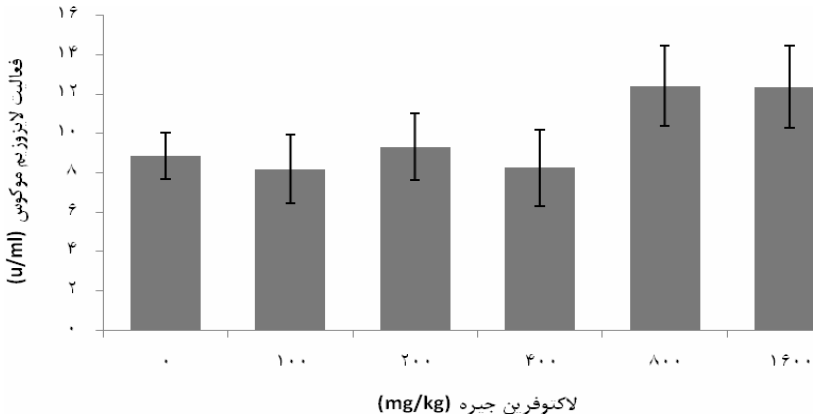
نمودار ۱: روند رشد بچه تاس‌ماهیان سیبری تغذیه شده با سطوح مختلف لاکتوفرین طی ۵۶ روز پرورش

جدول ۲: اثر سطوح مختلف لاکتوفرین جیره بر تعداد و درصد افتراقی گلبول‌های سفید (میانگین ± SE) بچه تاس‌ماهیان سیبری بعد از ۵۶ روز پرورش

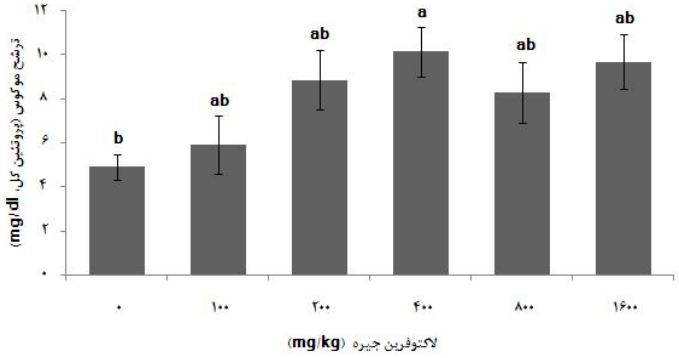
میزان لاکتوفرین (mg/kg)	WBC ($\times 10^3/mm^3$)	لنفوسیت (درصد)	نوتروفیل (درصد)	ائوزینوفیل (درصد)	منوسیت (درصد)
۰	۱۰/۹۳±۰/۷۶	۸۴/۱۱±۴/۲۲	۱۱/۷۷±۳/۰۳	۱/۲۲±۰/۵۲	۲/۸۸±۰/۹۴
۱۰۰	۱۲/۹±۱/۱۵	۷۷/۲۵±۲/۳۸	۱۶/۱۲±۲/۱۲	۱/۷۵±۰/۶۷	۴/۸۷±۱/۳۱
۲۰۰	۱۱/۲۱±۱/۴۱	۸۳/۵±۱/۶۲	۱۰/۶۲±۱/۳۷	۱/۶۲±۰/۲۶	۴/۲۵±۰/۹
۴۰۰	۱۳/۹۶±۱/۲	۸۲±۲/۳۷	۱۲/۲۲±۱/۸۲	۱/۷۷±۰/۶۶	۴±۰/۶۸
۸۰۰	۱۱/۴۳±۱	۸۳±۱/۸۲	۱۰/۵۵±۰/۷۴	۲/۱۱±۰/۹۳	۴/۳۳±۰/۸۳
۱۶۰۰	۱۲/۵۲±۱/۰۲	۸۵/۱۱±۲/۰۶	۹/۸۸±۱/۷۳	۰/۷۷±۰/۴۳	۴/۲۲±۰/۸۶



نمودار ۲: فعالیت لایزوزیم سرم (میانگین±SE) در بچه تاس‌ماهیان سیبری پس از ۵۶ روز تغذیه با سطوح مختلف لاکتوفرین



نمودار ۳: فعالیت لایزوزیم موکوس (میانگین± SE) در بچه تاس‌ماهیان سیبری پس از ۵۶ روز تغذیه با سطوح مختلف لاکتوفرین



نمودار ۴: میزان ترشح موکوس (میانگین± SE) در بچه تاس‌ماهیان سیبری پس از ۵۶ روز تغذیه با سطوح مختلف لاکتوفرین

حروف کوچک a ، ab و b بیانگر تفاوت معنی‌دار در (p<۰/۰۵) می‌باشند.

بحث

در این آزمایش با اینکه وزن ماهیان در حدود ۵ برابر افزایش یافت اما اثر معنی‌داری در رابطه با استفاده از سطوح مختلف لاکتوفرین بر پارامترهای رشد در طول دوره و پس از ۵۶ روز پرورش مشاهده نشد. مطالعات مختلف نشان می‌دهند که لاکتوفرین باعث تحریک رشد برخی از سلول‌ها از جمله لنفوسیت‌ها (Perraudin, 1991)، سلول‌های روده‌ای (Tomita et al., 2009) و سلول‌های استخوانی (Naot et al., 2005) می‌شود. در یک مطالعه مشابه با مطالعه حاضر، پارامترهای رشد و تغذیه‌ای ماهی تیلاپیای نیل بعد از ۵۶ روز تغذیه با سطوح مختلف لاکتوفرین تغییری نکرد (Welker et al., 2007). Yokoyama و همکارانش در تحقیقاتشان در سال‌های ۲۰۰۵ و ۲۰۰۶ اختلاف معنی‌داری در رشد هامور خال نارنجی (*Epinephelus coioides*) و کفشک ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) پس از ۳۰ روز تغذیه با جیره‌های حاوی لاکتوفرین مشاهده نکردند (Yokoyama et al., 2006, Yokoyama et al., 2005). همچنین نتایج مشابهی در ماهی کپور (*Cyprinus carpio*)، سیم دریایی (*Sparus auratus*) و ماهی آزاد در مدت زمان کمتر تغذیه با لاکتوفرین مشاهده نشده است (Esteban et al., 2005, Kakuta, 1998, Lygren et al., 1999). از سویی دیگر، تنها در یک تحقیق به اثبات رسید که میزان رشد و وضعیت تغذیه ماهی طلایی پس از ۲۸ روز تغذیه با لاکتوفرین بهبود یافته است (Kakuta, 1996). از علل

تفاوت در پاسخ رشد در گونه‌های مختلف می‌توان به فیلوژنی، اندازه گونه و ترکیبات جیره و اثرات متقابل آنها، اختصاصات سیستم گوارشی و شرایط پرورشی نظیر سیستم نگهداری و پارامترهای کمی و کیفی آب اشاره نمود. رشد ماهیان وابسته به عوامل زیادی می‌باشد و سایر عوامل تاثیرگذار مانند دما می‌توانند باعث عدم بروز اثرات مثبت لاکتوفرین شوند. همچنین بیان شده که اثر متقابل لاکتوفرین با سایر اجزای جیره یا اختصاصات سیستم گوارشی در گونه‌های مختلف روی اثرات لاکتوفرین در رشد تاثیرگذار باشند (Yokoyama et al., 2006).

اندازه‌گیری پارامترهای خونی برای ارزیابی وضعیت سلامت ماهیان در گونه‌های مختلف به کار می‌رود (Atamanalp and Yanik, 2003). لاکتوفرین می‌تواند تاثیرات مختلفی روی گلبول‌های سفید در موجودات مختلف بگذارد (Wakabayashi et al., 2006). توانایی لاکتوفرین در تنظیم کردن تولید و تکثیر نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها در پستانداران به اثبات رسیده است (Cavestro et al., 2002). در مورد ماهیان مشاهده شده که تغذیه ماهی قزل‌آلا با لاکتوفرین سبب می‌شود میزان فعالیت بیگانه خواری گلبول‌های سفید افزایش یابد (Sakai et al., 1995). همچنین افزایش تعداد گرانولوسیت‌ها و لنفوسیت‌های ماهی شانک قرمز با تغذیه از لاکتوفرین گزارش شده است (Kakuta et al., 1996). در مطالعه حاضر، اختلاف معنی‌داری در تیمارهای مختلف آزمایشی در خصوص تعداد گلبول‌های سفید خون مشاهده نشد. همچنین اختلاف معنی‌داری در مورد درصد افتراقی گلبول‌های سفید مشاهده نگردید اما در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین درصد نوتروفیل افزایش یافت و درصد لنفوسیت‌ها کاهش یافت ولی تغییرات یاد شده معنی‌دار نبودند. نتایج مشابهی نیز در مورد ماهی تیلاپیای نیل دیده شد به گونه‌ای که اختلاف معنی‌داری در پارامترهای خونی این ماهی پس از ۸ هفته تغذیه با سطوح مختلف لاکتوفرین مشاهده نشد (Welker et al., 2007). اینگونه به نظر می‌رسد که قابلیت لاکتوفرین در بهبود بخشی پارامترهای هماتولوژیک بستگی به عواملی همچون شرایط فیزیولوژیک جانور و همچنین میزان آهن موجود در غذا دارد و این قابلیت، بیشتر در شرایط غیر طبیعی مانند کمبود آهن، بیماری و کمخونی بروز می‌یابد.

لایزوزیم یک آنزیم پپتیدی با فعالیت‌های ضد باکتریایی بوده و به عنوان یکی از اجزای مهم سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهیان می‌باشد. این آنزیم به وسیله گلبول‌های سفید تولید می‌شود و به طور مستقیم یا غیرمستقیم باکتری‌های گرم مثبت و منفی را می‌تواند تحت تاثیر قرار دهد (Saurabh and Sahoo, 2008). در مطالعه حاضر میزان فعالیت لایزوزیم در سرم و موکوس ماهیان به صورت معنی‌داری تغییر نکرد. میزان فعالیت لایزوزیم در ماهی تیلاپیای نیل پس از ۵۶ روز تغذیه با لاکتوفرین و در ماهی آزاد پس از ۱۹ روز تغذیه با سطوح متفاوت لاکتوفرین تغییر معنی‌داری نداشت (Lygren et al., 1999, Welker et al., 2007). همچنین در مطالعه‌ای دیگر مشخص شده است که فعالیت لایزوزیم در موکوس شانک قرمز تحت تاثیر تغذیه با لاکتوفرین قرار نمی‌گیرد (Kakuta et al., 1996). Ren و همکاران در سال ۲۰۰۷ اظهار داشته‌اند که فعالیت لایزوزیم در سرم مار ماهی ژاپنی (*Anguilla japonica*) با تغذیه از سطوح مختلف لاکتوفرین افزایش می‌یابد، اما فعالیت لایزوزیم موکوس تحت تاثیر جیره‌های لاکتوفرین قرار نمی‌گیرد. در مطالعه‌ای دیگر مشخص شده است که فعالیت لایزوزیم در گربه ماهی آسیایی بعد از یک هفته تغذیه با جیره‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین به صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد، اما این تغییرات بعد از دو هفته تغذیه معنی‌دار نبود (Kumari et al., 2003). میزان فعالیت لایزوزیم در ماهیان تحت تاثیر عوامل زیادی همچون تغذیه، تغییرات فصلی، جنسیت و بلوغ جنسی، شوری، اسیدیته، دمای آب، استرس و بیماری‌ها قرار می‌گیرد (Saurabh and Sahoo, 2008). همچنین علت این اختلافات در نتایج تحقیقات مختلف می‌تواند ناشی از

شرایط آزمایش و میزان فعالیت پروتئاز در گونه‌های مختلف باشد که بر جذب و اثر بخشی لاکتوفرین اثر می‌گذارد (Henry and Alexis, 2009).

گفته می‌شود که محرک‌های سیستم ایمنی از طریق افزایش تعداد گلبول‌های سفید باعث افزایش میزان فعالیت لایزوزیم خون می‌شوند (Saurabh and Sahoo, 2008). در مطالعه حاضر مشخص شد که رابطه تعداد گلبول‌های سفید ماهیان با میزان فعالیت لایزوزیم سرم و موکوس آنها بسیار ضعیف می‌باشد. با این حال میزان لایزوزیم سرم و موکوس به ترتیب در تیمارهای ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میلی‌گرم نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت اما حداکثر تعداد گلبول‌های سفید مربوط به این تیمارها نبود.

موکوس سطح پوست ماهیان به عنوان اولین سطح دفاعی بدن آنها در برابر عفونت‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها نقش مهمی در سیستم ایمنی غیراختصاصی دارد. تاکنون وجود برخی از ترکیبات مهم ایمنی از قبیل لایزوزیم، ایمونوگلوبین، کمپلمان، آنزیم‌های پروتئولیتیک و پپتیدهای ضد میکروبی در موکوس ماهیان در گونه‌های مختلف به اثبات رسیده است (Palaksha et al., 2008). از این رو افزایش میزان موکوس ترشحی در ماهیان می‌تواند نقش بسیار مهمی در تقویت سیستم ایمنی غیراختصاصی آنها داشته باشد. Kakuta و همکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند که تغذیه ماهی آیو با جیره‌های حاوی لاکتوفرین باعث می‌شود تعداد سلول‌های ترشح کننده موکوس در آنها افزایش یابد (Kakuta et al., 1998). تغذیه ماهی هامور خال نارنجی (Yokoyama et al., 2006) و شانک قرمز (Kakuta et al., 1996) با سطوح مختلف لاکتوفرین میزان ترشح موکوس را به صورت معنی‌داری افزایش داده است. در مطالعه حاضر میزان ترشح موکوس تاس‌ماهی سیبری با افزایش میزان لاکتوفرین در جیره افزایش یافت و در تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم به حداکثر خود رسید که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشت. افزایش ترشح موکوس مشاهده شده می‌تواند باعث افزایش سطوح دفاعی این ماهی در برابر عوامل مختلف شود. افزایش ترشح موکوس در اثر تغذیه با لاکتوفرین در اکثر مطالعات گذشته مشاهده شده است. همچنین در برخی از مطالعات انجام شده مشاهده گردیده که تعداد سلول‌های ترشح کننده موکوس در اثر استفاده از لاکتوفرین افزایش می‌یابد. با این وجود می‌توان نتیجه گرفت که افزایش ترشح موکوس ماهیان در مطالعه حاضر یا سایر مطالعات می‌تواند در اثر افزایش تعداد سلول‌های ترشح کننده موکوس رخ داده باشد.

مشاهده شده که غلظت بالای لاکتوفرین در جیره باعث کاهش ترشح موکوس در شانک قرمز می‌شود (Kakuta et al., 1996). Sakai در سال ۱۹۹۹ اظهار داشت استفاده از تحریک کننده‌های سیستم ایمنی برای مدت زمان طولانی و یا با غلظت بسیار زیاد می‌تواند باعث تضعیف سیستم ایمنی غیر اختصاصی و یا بازگشت آن به حالت اول گردد. کاهش میزان ترشح موکوس در تیمارهای ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میلی‌گرم نسبت به ۴۰۰ میلی‌گرم و همچنین کاهش نسبی فعالیت لایزوزیم سرم در تیمار ۱۶۰۰ میلی‌گرم نسبت به تیمار ۸۰۰ میلی‌گرم و یا عدم اختلاف معنی‌دار در تیمارهای مختلف در مطالعه اخیر می‌تواند به این دلیل باشد. همچنین اثر لاکتوفرین بر حسب نوع فاکتور ایمنی در یک گونه می‌تواند متفاوت باشد (Kumari et al., 2003). مشاهده شده که بر اثر تغذیه با لاکتوفرین، میزان ایمنی اختصاصی در ماهی تیلاپیای نیل تغییری نمی‌کند اما مقاومت آن نسبت به باکتری *Streptococcus iniae* افزایش می‌یابد (Welker et al., 2007). در اکثر تحقیقات صورت گرفته، صرفاً اثرات مثبت لاکتوفرین بر برخی از پارامترهای ایمنی مشاهده شده است. این امکان وجود دارد که لاکتوفرین بر سایر پارامترهای ایمنی و یا مقاومت در برابر بیماری و یا استرس در تاس‌ماهی سیبری اثر گذار باشد (یافته‌های منتشر نشده). بیان شده که میزان جذب لاکتوفرین در ماهیان می‌تواند به شدت تحت تاثیر آنزیم‌های پروتئولیتیک معده در حین گوارش قرار گیرد و محدود گردد (Cecchini and Caputo, 2009). تغییرات

لاکتوفریسین در ماهیان بعد از استفاده خوراکی هنوز مورد بررسی قرار نگرفته است و احتمال این فرضیه بسیار قوی است که مانند سایر مهره‌داران (Kuwata et al., 1998)، اثرات مثبت مشاهده شده در مورد لاکتوفرین خوراکی روی سیستم ایمنی ماهیان ناشی از عملکرد لاکتوفریسین باشد که بعد از عبور لاکتوفرین از معده و برخورد آن با آنزیم‌های اسیدی معده تولید می‌شود. علت این اختلافات در نتایج ثبت شده در این مطالعه با سایر مطالعات می‌تواند ناشی از شرایط آزمایش و میزان فعالیت پروتئاز در گونه‌های مختلف باشد که بر جذب و اثر بخشی لاکتوفرین اثر می‌گذارد (Henry and Alexis, 2009).

لاکتوفرین دارای پتانسیل قابل مقایسه‌ای با سایر محرک‌های ایمنی از قبیل بتاگلوکان برای استفاده در آبزی‌پروری است (Sakai, 1999). امروزه تولید لاکتوفرین در دنیا رو به افزایش می‌باشد و امکان به کارگیری آن در مقیاس تجاری وجود دارد (Tomita et al., 2009). همچنین لاکتوفرین دارای مقاومت بالایی به افزایش درجه حرارت و نوسانات اسیدیته است و می‌تواند در پروسه تولید غذا پایدار مانده و به مدت طولانی حفظ شود (Abe, 1991). مطالعات گذشته ثابت نموده که لاکتوفرین می‌تواند اثرات مثبتی بر سیستم ایمنی برخی از گونه‌های ماهیان داشته باشد. با این وجود اختلاف معنی‌داری در این مطالعه در پارامترهای رشد و ایمنی غیراختصاصی تاس‌ماهی سیبری مشاهده نشد، اما میزان ترشح موکوس در این ماهی با تغذیه از سطوح لاکتوفرین به طور چشمگیری افزایش یافت. در مطالعه حاضر، به جز ترشح موکوس، سایر پارامترها تحت تاثیر جیره‌های حاوی لاکتوفرین قرار نگرفت. در مطالعات پیشین نیز اثرات مثبت لاکتوفرین بر همه پارامترهای ایمنی قابل مشاهده نبود. به نظر می‌رسد که تاثیر لاکتوفرین در این گونه ماهی بسیار ضعیف‌تر از سایر ماهیان از جمله ماهیان استخوانی باشد. همچنین باید مطالعات همه جانبه‌ای در خصوص پارامترهای ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی در رابطه با تاس‌ماهیان صورت پذیرد تا درک کاملی از اثر لاکتوفرین بر این ماهیان ارزشمند و افزایش احتمالی تحریک سیستم ایمنی و مقاومت در برابر بیماری حاصل آید.

تشکر و قدردانی

نگارندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از پرسنل مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی، شرکت صنایع شیر موریناگا در ژاپن، آقایان عشوری، مرشدی، رعنای اخوان، نجفی‌پور مقدم و خانم‌ها هوشیار، پورسعید و باقرزاده که در انجام این تحقیق نهایت همکاری و مساعدت را داشتند تقدیر و تشکر به عمل آورند.

منابع

Barros M.M., Lim C. and Klesius P.H. (2002). Effect of iron supplementation to cottonseed meal diets on growth performance of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Journal of Applied Aquaculture, 10: 65-86.

Blaxhall P.C. and Daisley K.W. (1973). Routine hematological methods for Use Fish with Blood. Journal of Fish Biology, 5: 771-781.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein. Analytical Biochemistry, 72: 248.

Abe H. (1991). Heat stability of bovine lactoferrin at acidic pH. Journal of Dairy Science, 74: 65-71.

Aranishi F. and Nakane M. (1997). Epidermal protease of the Japanese eel. Fish Physiology and Biochemistry, 16: 471-478.

Atamanalp M. and Yanik T. (2003). Alterations in hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to mancozeb. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 27: 1213-1217.

Cavestro G.M., Ingegnoli A.V., Aragona G., Iori V., Mantovani N. and Altavilla N. (2002). Lactoferrin: mechanism of action, clinical significance and therapeutic relevance. Acta Biomed Ateneo Parmense, 73: 71-73.

Cecchini S. and Caputo A.R. (2009). Serum disposition of bovine lactoferrin after oral and anal administration and its proteolytic cleavage by gastric transit in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.). Fish and Shellfish Immunology, 26: 65-71.

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, 278: 110-118.

Esteban M.A., Rodriguez A., Cuesta A. and Meseguer J. (2005). Effects of lactoferrin on non-specific immune responses of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Fish and Shellfish Immunology, 18: 109-124.

Gisbert E. and Williot P. (2002). Advances in the larval rearing of Siberian sturgeon. Journal of Fish Biology, 60: 1971-1092.

Gonzalez-Chavez S.A., Arevalo-Gallegos S. and Rascon-Cruz Q. (2009). Lactoferrin: structure, function and applications. International Journal of Antimicrobial Agents, 33: e301-e308.

Henry M.A. and Alexis M.N. (2009). Effects of in vitro lactoferricin and lactoferrin on the head kidney cells of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). Veterinary Immunology and Immunopathology, 130: 236-242.

Jenssen H. and Hancock B.R. (2009). Antimicrobial properties of lactoferrin. Biochimie, 91: 19-29.

Kakuta I. (1996). Effect of orally administrated bovine lactoferrin on growth and blood properties of goldfish. Suisanzoshoku, 44: 419-426.

Kakuta I. (1998). Reduction of stress response in carp, *Cyprinus carpio* L., held under deteriorating environmental conditions, by oral administration of bovine lactoferrin. Journal of Fish Diseases, 21: 161-168.

Kakuta I. (2000). Lactoferrin improves physiological conditions of fish held under deteriorating states. In: Shimazaki, K., Tsuda, H., Tomita, M., Kuwata, T., Perraudin, J.P. (eds.), Lactoferrin: Structure, Function and Applications. New York: Elsevier Inc.

Kakuta I., Kurokura H., Nakamura H. and Yamauchi K. (1996). Enhancement of the nonspecific defense activity of the skin mucus of red sea bream by oral administration of bovine lactoferrin. Suisanzoshoku, 44: 197-202.

Kakuta I., Ogata T., Igarashi K., Sunada T., Nakamura H. and Shibui T. (1998). Effect of orally administrated bovine lactoferrin on the survival rate of juvenile ayu, *Plecoglossus altivelis*, held under deteriorating environmental conditions. Suisanzoshoku, 46: 93-96.

Kumari J. and Sahoo P.K. (2006). Non-specific immune response of healthy and immunocompromised Asian catfish (*Clarias batrachus*) to several immunostimulants. Aquaculture, 255: 133-141.

Kumari J., Swain T. and Sahoo P.K. (2003). Dietary bovine lactoferrin induces changes in immunity level and disease resistance in Asian catfish *Clarias batrachus*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 94: 1-9.

Kuwata H., Yip T.T., Tomita M. and Hutchens T.W. (1998). Direct evidence of the generation in human stomach of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin. Biochimica et Biophysica Acta, 1429: 129-141.

Lygren B., Sveier H., Hjeltnes B. and Waagbo R. (1999). Examination of the immunomodulatory properties and the effect on disease resistance of dietary bovine lactoferrin and vitamin C fed to Atlantic salmon (*Salmo salar*) for a short-term period. Fish and Shellfish Immunology, 9: 95-107.

Mohseni M., Pourkazemi M., Bahmani M., Falahatkar B., Pourali H.R. and Salehpour M. (2006). Effects of feeding rate and frequency on growth performance of yearling great sturgeon, *Huso huso*. Journal of Applied Ichthyology, 22: 278-283.

Naot D., Grey A., Reid I. and Cornish J. (2005). Lactoferrin - A novel bone growth factor. Journal of Clinical Medicine and Research, 3, 2: 93-101.

Ortuno J., Esteban M.A. and Meseguer J. (2001). Effects of short-term crowding stress on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. Fish and Shellfish Immunology, 11: 187-197.

Palaksha K.J., Shin G.W., Kim Y.R. and Jung T.G. (2008). Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) Fish and Shellfish Immunology, 24: 479-488.

Perraudin J. (1991). Biologically-active proteins. Recently-acquired knowledge and separation technology. Le Lait, 71: 191-212.

Ren T., Koshio S., Ishikawa M., Yokoyama S., Micheal F.R., Uyan Q., et al. (2007). Influence of dietary vitamin C and bovine lactoferrin on blood chemistry and non-specific immune responses of Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquaculture, 267: 31-37.

Sakai M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture, 172: 63-92.

Sakai M., Kobayashi M. and Yoshida T. (1995). Activation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, phagocytic cells by administration of bovine lactoferrin. Comparative Biochemistry and Physiology, 110B: 755-759.

Sakai M., Otubo T., Atsuta S. and Kobayashi M. (1993). Enhancement of resistance to bacterial infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by oral administration of bovine lactoferrin. Journal of Fish Diseases, 16: 239-247.

Saurabh S. and Sahoo P.K. (2008). Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. Aquaculture Research, 39: 223-239.

Tomita M., Wakabayashi H., Shin K., Yamauchi K., Yaeshima T. and Iwatsuki K. (2009). Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. Biochimie, 91: 52-57.

Tripathi B.D. and Govil S.R. (2001). Water Pollution (An Experimental Approach): CBS Publishers & Distributors Pvt. Ltd. 132 pp.

Wakabayashi H., Yamauchi K. and Takase M. (2006). Lactoferrin research, technology and applications. International Dairy Journal, 16: 1241-1251.

Wangmi K.Y., Zheng Z., I Jinag R. and Xie N. (2009). Replacing fish meal with rendered animal protein ingredients in diets for Malabar grouper, *Epinephelus malabaricus*, reared in net pens. Journal of the World Aquaculture Society, 40: 67-75.

Webb M.A.H., Allert J.A., Kappenman K.M., Marcos J., Feist G.W., Schreck C.B., et al. (2007). Identification of plasma glucocorticoids in pallid sturgeon in response to stress. General and Comparative Endocrinology, 154: 98-104.

Welker T.L., Lim C., Yildirim-Aksoy M. and Klesius P.H. (2007). Growth, immune function, and disease and stress resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed graded levels of bovine lactoferrin. Aquaculture, 262: 156-162.

Williot P., Arlati G., Chebanov M., Gulyas T., Kasimov R., Kirschbaum F., et al. (2002). Status and management of Eurasian sturgeon: an overview. Internationale Revue der Gesamte Hydrobiologie, 87: 483-506.

Yokoyama S., Koshio S., Takakura N., Oshida K., Ishikawa M., Gallardo-Cigarroa F.J., et al. (2006). Effect of dietary bovine lactoferrin on growth response, tolerance to air exposure and low salinity stress conditions in orange spotted grouper *Epinephelus coioides*. Aquaculture, 255: 507-513.

Yokoyama S., Koshio S., Takakura N., Oshida K., Ishikawa M., Gallardo-Cigarroa F.J., et al. (2005). Dietary bovine lactoferrin enhances tolerance to high temperature stress in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture, 249: 367-373.