بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد هفتم، شماره اول، بهار ۱۳۹۷
http://japu.gau.ac.ir

اثر مکمل غذایی رافینوز، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ترکیب دو مکمل بر بیان ژن‌های لیزوزیم و TNF-α در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

*سید حسین حسینی‌فر[۱]، مرجان حسینی[۲]، حامد پاک‌نژاد[۳]، رقیه صفری[۱] و علی جافر[۴]
[۱]استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۳]دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۴]دانش‌آموخته دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۲۵

چکیده

هدف از این تحقیق ارزیابی اثرات رافینوز، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ترکیب این دو مکمل به‌عنوان سین‌بیوتیک بر بیان ژن‌های درگیر در ایمنی لیزوزیم (Lysozym) و TNF-α ماهی کپور معمولی بود. تعداد ۱۲ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۲/۵±۱۰ گرم در هر تانک (۵۰۰ لیتری) ذخیره‌سازی شد. ماهی‌ها با ۲ درصد رافینوز، ۶×۱۰^{۸} CFU/g از باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، ترکیب دو مکمل و گروه شاهد نیز با غذای فاقد مکمل به‌مدت ۸ هفته تغذیه شدند. به‌منظور بررسی بیان ژن لیزوزیم از بافت پوست نمونه‌برداری انجام شد. RNA از بافت مورد مطالعه استخراج و cDNA سنتز شد و با آغازگرهای اختصاصی توسط Real Time PCR بیان ژن‌های مذبور بررسی شد. نتایج نشان داد که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس تأثیر قابل ملاحظه‌ای روی بیان ژن لیزوزیم داشت (P< ۰/۰۵) که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت ولی بین تیمارهای پربیوتیک، سین‌بیوتیک و شاهد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. (P>۰/۰۵) همچنین اختلاف معنی‌داری در بیان ژن TNF-α بین تیمارهای پروبیوتیکی، پربیوتیکی و گروه شاهد وجود نداشت (P>۰/۰۵) و کمترین میزان بیان این ژن در گروه‌های تغذیه شده با سین بیوتیک مشاهده شد. در این مطالعه مشخص گردید که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس باعث افزایش ایمنی به‌واسطه افزایش بیان نسبی لیزوزیم در ماهی کپور معمولی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: رافینوز، سین‌بیوتیک، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لیزوزیم، TNF-α

مقدمه

پرورش آبزیان یک فعالیت با گستره جهانی است که در بهبود تغذیه و کمک به توسعه اقتصادی کشورها مؤثر است. کمبود منابع آبی سبب شده است که پرورش انبوه و متراکم جایگزین روش‌های نیمه متراکم یا غیرمتراکم گردد (رحمتی اندانی و همکاران، ۱۳۸۹). در پرورش متراکم، استرس‌هایی مانند اختلالات فیزیکی، شیمیایی و زیستی به‌صورت طبیعی در محیط‌زیست ماهی رخ می‌دهد (کوبولای و آلوکوی، ۲۰۰۲) و آبزیان پرورشی تحت تأثیر عفونت‌های باکتریایی قرار می‌گیرند و سیستم ایمنی

*مسئول مکاتبه: Marjanhoseini1370@gmail.com

شان توسط شرایط استرس‌زا به خطر می‌افتد. یکی از معمول‌ترین روش‌های درمان این عفونت‌ها، استفاده از آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد در حالی‌که استفاده بیش از حد از این داروها باعث بروز مقاومت باکتریایی در این حیوانات می‌گردد (سانگ و همکاران، ۲۰۰٦). به‌کارگیری آنتی بیوتیک‌ها جهت درمان بیماری‌های آبزیان پرورشی به‌طور گسترده مورد انتقاد قرار گرفته است. مصرف بی‌رویه داروها و مواد شیمیایی علاوه‌بر ایجاد مقاومت در میکرو ارگانیسم‌ها سبب نفوذ این مواد به خاک و آب گردیده و محیط زیست مجاور مزارع پرورش آبزیان را به‌شدت آلوده نموده است. تثبیت داروها و مواد شیمیایی در بافت‌های ماهی و آب بهداشت انسانی را نیز به‌خاطر ایجاد حساسیت-های مختلف، مقاومت باکتریایی و عوارض کلیوی و کبدی به مخاطره می‌اندازد (آذری تاکامی، ۱۳۷٦). آبزیان در مراحل اولیه تکثیر و پرورش از سطح ایمنی کافی برخوردار نبوده و نیازمند تدابیر لازم در خصوص پیشگیری و درمان می‌باشند و بهره‌گیری از پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها نیز می‌تواند به‌عنوان یکی از ابزارهای مؤثر در پیشگیری از بیماری‌ها و همچنین محرک رشد مدنظر قرار گیرد. (حسینی‌فر و همکاران، ۱۳۸٦). پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که به‌طور سودمندی با بهبود تعادل فلور میکروبی روده به میزبان سود می‌رسانند (فولر، ۱۹۸۹). پروبیوتیک‌ها از طریق تولید موادی نظیر ترکیبات بازدارنده، همچنین رقابت بر سر مواد شیمیایی و مکان‌های اتصال و تحریک و تقویت سیستم ایمنی، باعث بهبود وضعیت سلامتی میزبان و به‌وجود آوردن تعادل میکروبی روده می‌شوند (اندانی و همکاران، ۲۰۱۲). سویه‌های متعلق به بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیلوس عمده‌ترین باکتری‌های پروبیوتیکی مورد استفاده هستند همچنین لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس یکی از مهمترین گونه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیکی محسوب می‌شود (فونتانا و همکاران، ۲۰۱۳) دسته دیگر از مکمل‌های غذایی پربیوتیک‌ها هستند که شامل مواد غذایی غیر قابل هضم برای میزبان هستند که توسط باکتری‌های موجود در میکروبیوتای روده‌ای مصرف شده و سبب افزایش تعداد و غالبیت باکتری‌های بالقوه مفید (مانند باکتری‌های اسید لاکتیک) می‌شوند (حسینی‌فر و همکاران، ۲۰۱٤). الیگوساکاریدهای غیرقابل هضم از جمله مهمترین مواد دارای عملکرد پربیوتیکی هستند (کولیدا و همکاران، ۲۰۰۲؛ ماهیوسو اولیویر، ۲۰۰۵). در میان الیگوساکاریدهای غیرقابل هضم، رافینوز پربیوتیک شناخته شده‌ای است که اثرات آن در آبزی پروری کمتر مورد بررسی بوده است جی‌هنگ‌یان و همکاران (۲۰۱۰) با بکارگیری سطوح مختلف رافینوز در جیره غذایی سی باس ژاپنی (*Lateolabrax japonicus*) نشان دادند که این پربیوتیک به‌طور معنی‌داری سبب افزایش مقاومت و بقای این ماهی در برابر آئروموناس هیدروفیلا شد. سین‌بیوتیک به استفاده توام از پروبیوتیک‌ها و پربیوتیک‌ها اتلاق می‌شود. محققان بسیاری اثرات مثبت مکمل‌های غذایی میکروبی را بر کارایی رشد، ایمنی و مقاومت در برابر بیماری گزارش کرده‌اند (حسینی‌فر و همکاران، ۲۰۱۵). حسینی و همکاران (۲۰۱٦) گزارش کردند افزودن پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به جیره غذایی باعث افزایش بیان ژن‌های TNF-1α و TNF-2α در ماهی قرمز شد همچنین یاراحمدی و همکاران (۲۰۱٤) عنوان کردند که افزودن ایمونوژن به جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث افزایش بیان ژن‌های TNF-α و لیزوزیم شد. هدف از این مطالعه بررسی اثر پربیوتیکی رافینوز، پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ترکیب این دو مکمل به‌عنوان سین‌بیوتیک بر بیان ژن لیزوزیم و TNF-α در کپور معمولی است.

مواد و روش

تهیه ماهی و سازگاری به شرایط آزمایشگاهی: بچه ماهی‌ها از کارگاه تکثیری در رشت تهیه شد و با پلاستیک‌های محتوی یک‌سوم آب و دوسوم هوا به سالن پرورش ماهی شهید فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند. ابتدا ماهیان جهت انگل‌زدایی و بهبود استرس ناشی از حمل‌ونقل در آب‌نمک (NaCl) با غلظت ۲ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه حمام داده شدند. و به‌مدت ٤٨ ساعت جهت کاهش تلفات احتمالی و استرس غذادهی نشدند. سازگاری اولیه با تراکم ٤٠ عدد ماهی در هر مخزن ٥٠٠ لیتری متصل به پمپ هوا به‌مدت یک هفته طول کشید. طی این مدت روزانه ٥٠ درصد آب مخازن با آب شهری کلرزدایی شده تعویض شد.

طرح آزمایش و مدیریت مخازن: این آزمایش به‌صورت طرح کاملا تصادفی و در ٤ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار انجام شد. تیمارها شامل گروه تغذیه شده با ۰ و ۲ درصد رافینوز، 6×10^{8} CFU/g مکمل غذایی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ترکیب رافینوز و باکتری بودند که سطح ۰ همان گروه شاهد است. به‌طور تصادفی تعداد ۱۲ عدد ماهی با میانگین وزنی۲/٥ ± ۱۰ گرم در تانک‌های فایبرگلاس ٥٠٠ لیتری ذخیره‌سازی شدند که نصف ظرفیت آن (۲٥٠ لیتر) آبگیری شده بود. هوادهی آکواریوم‌ها با استفاده از سنگ هوای متصل به پمپ هواده صورت گرفت.

تهیه غذا، مکمل غذا و غذادهی: پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از شرکت تک ژن و رافینوز از شرکت Longlive Bio-Tehcnology کشور چین تهیه شد. مکمل پروبیوتیکی به کمک محلول ژلاتین ٥ درصد با غذا مخلوط شد و پس از خشک شدن تا زمان مصرف به یخچال با دمای ٤ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. لازم به ذکر است ماهیان در ابتدا و انتهای دوره و همچنین در طول دوره آزمایش در فواصل زمانی ١٤ روز زیست‌سنجی می‌شدند. غذادهی بر اساس ۳ درصد وزن بیومس زنده موجود در تانک به‌صورت دستی انجام می‌شد. میزان غذای موردنیاز هرروز طی ۳ وعده از ساعت ۹ صبح تا ١٤ در اختیار ماهی‌ها قرار می‌گرفت.

نمونه‌برداری: نمونه‌برداری در شرایط استریل و پس از هشت هفته تغذیه با مکمل‌های غذایی از بافت پوست انجام شد. ماهیان قبل از نمونه‌برداری توسط پودر گل میخک با دوز ۲۰۰ppm بی‌هوش شدند و پس‌ازآن سطح بدن با پنبه آغشته به الکل استریل شد و به‌سرعت بافت پوست جمع‌آوری و به داخل تیوپ‌های از قبل استریل شده انتقال داده شد و بلافاصله تیوپ‌ها به تانک ازت منتقل شدند. در پایان نمونه‌برداری نمونه‌ها در یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده‌شدند و تا زمان استفاده جهت استخراج RNA در آن‌جا نگهداری شدند.

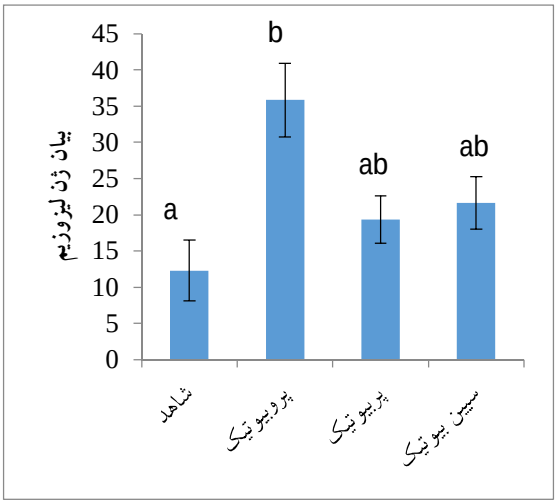
استخراج RNA و سنتز cDNA: در این آزمایش استخراج RNA بر اساس پروتوکل استخراج RNA توسط ماده هضم‌کننده RNX-Plus انجام شد. همچنین سنتز cDNA با استفاده از مسترمیکس سنتز cDNA شرکت جینت بایو محصول کشور کره و طبق دستورالعمل آن انجام شد.

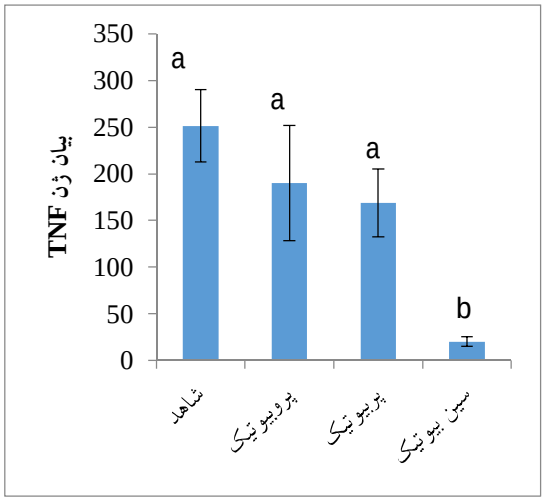
انجام Real time PCR: PCR در تیوپ‌های مخصوص آن و در ٤ تکرار تکنیکی برای هر تیمار صورت گرفت که محتویات هر تیوپ به مقدار ۲۰ میکرو لیتر بود. برای ساخت مستر ۱۰µl بافر سایبر گرین، ۱µl آغازگر پیش‌رونده ژن هدف و رفرنس، µl ۱ آغازگر پس‌رونده ژن هدف و رفرنس، ۸/۲µl آب و ۰/۲µlآنزیم تگ پلیمراز با هم مخلوط شدند و µl ٥cDNA رقیق‌شده هر تیمار نیز اضافه شد و در دستگاه Real time PCR جایگذاری شدند.

کارامدی پرایمر	شماره دستیابی پرایمر	توالی پرایمر	نام ژن
۹۷ درصد	AB027305	Forward: GTGTCTGATGTGGCTGTGCT Reverse: TTCCCCAGGTATCCCATGAT	لیزوزیم
۹۷ درصد	AJ311800.1	Forward: GGTGATGGTGTCGAGGAGGAA Reverse: TGGAAAGACACCTGGCTGTA	TNF-α
۹۷ درصد	M24113.1	Forward: AGACATCAGGGTGTCATGGTTGGT Reverse: CTCAAACATGATCTGTGTCAT	بتااکتین

نتایج

نتایج حاصل از ارزیابی بیان ژن لیزوزیم در نمودار ۱ خلاصه شده‌است. نتایج نشان دادند که بالاترین سطح بیان ژن لیزوزیم در تیمار تغذیه شده با پروبیوتیک بود که اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت. (P<۰/۰۵) کمترین میزان بیان این ژن در گروه شاهد مشاهده شد و بین گروه‌های تغذیه شده با پروبیوتیک‌پربیوتیک و سین‌بیوتیک اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵). همچنین نتایج حاصل از آنالیز ژن TNF-α نشان داد که محرک‌های استفاده شده تأثیری روی بیان این ژن نداشتند و کمترین میزان بیان ژن در گروه‌های تغذیه شده با سین‌بیوتیک مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها و گروه شاهد داشت.





نمودار ۱- سطوح بیان ژن لیزوزیم و TNF-α تحت تأثیر رافینوز، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ترکیب این دو مکمل.

بحث و نتیجه‌گیری

پروبیوتیک‌ها به‌عنوان مکمل‌های غذایی شناخته شده‌اند که از طریق بهبود ارزش غذایی و ارتقای رشد، توزیع آنزیمی جهت هضم مواد غذایی، مهار میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای فرصت طلب، آنتی موتاژنیک و فعالیت ضدسرطانی و افزایش پاسخ ایمنی برای موجود میزبان سودمند هستند (ورسچور و همکاران، ۲۰۰۰؛ هریکریشنان و همکاران، ۲۰۱۰). سویه‌های متعلق به بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیلوس عمده‌ترین باکتری‌های پروبیوتیکی مورد استفاده هستند (فونتانا و همکاران، ۲۰۱۳). حسینی‌فر و همکاران (۲۰۱٤) گزارش کردند که استفاده از

پروبیوتیک‌ها دارای اثرات سودمندی روی عملکرد رشد و سلامتی آبزیان است. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس اثر قابل ملاحظه‌ای روی بیان ژن لیزوزیم که از جمله ژن‌های درگیر در ایمنی غیراختصاصی است، داشت در حالی‌که به‌کارگیری این محرک‌ها در جیره غذایی ماهی کپور معمولی تأثیری روی بیان ژن TNF-α نداشت و سین‌بیوتیک (ترکیب لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و رافینوز) استفاده شده در این تحقیق باعث کاهش بیان ژن TNF-α شد. تقویت سیستم دفاعی دارای اهمیت بسزایی در حفظ سلامت گونه آبزی و جلوگیری از شیوع بیماری در بین جمعیت ماهیان پرورشی دارد که این مسئله از زیان‌های اقتصادی ناشی از بروز بیماری و تلفات جلوگیری می‌کند. گزارشات متعدی مبنی‌بر اثر مثبت پروبیوتیک‌ها در بیان ژن‌های درگیر در ایمنی غیراختصاصی وجود دارد. مارتا و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردن که استفاده از مخمر *Sterigmatomyces halophilus* در جیره غذایی ماهی سیم دریایی به‌طور قابل ملاحظه‌ای باعث افزایش بیان ژن لیزوزیم شد که همراستا با نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر می‌باشد. همچنین یاراحمدی و همکاران (۲۰۱٦) بیان کردند که استفاده از ویتاسل باعث افزایش بیان ژن‌های لیزوزیم و TNF-α در قزل‌آلا شد. دلیل این امر را می‌توان چنین گزارش کرد که لاکتوباسیلوس‌های موجود در روده بزرگ کربوهیدرات‌های غیر قابل هضم را تخمیر می‌کنند و در نتیجه pH کاهش می‌یابد. کاهش pH در روده بزرگ باعث تکثیر و بقای ارگانیسم‌های هم‌غذایی می‌شود که موقعیت اسیدی را ترجیح می‌دهند و به‌طور کلی باعث مهار رشد و چسبیدن پاتوژن‌های فرصت طلبی می‌شوند که در اپیتلیوم دستگاه گوارش هستند. بسیاری از باکتری‌ها نیز از طریق تولید باکتریوسین باعث کاهش بقای ارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌شوند همچنین تخمیر در دستگاه گوارش باعث تولید یکسری از متابولیت‌ها از جمله اسیدهای چرب کوتاه زنجیر در روده شده که از طریق دیواره روده جذب و توسط خون به کبد انتقال داده می‌شوند که به عنوان یک منبع انرژی اضافی برای بدن به‌شمار می‌روند (بینس، ۲۰۱۳). پربیوتیک‌ها عمدتا در روده بزرگ تخمیر می‌شوند و از طریق تحریک میکروبیوتای روده روی هضم اثر می‌گذارند. بهبود هضم مواد معدنی (از طریق تخمیر تحریک شده و هضم سطحی افزایش یافته) و کاهش سطح التهاب (از طریق بهبود عملکرد سدهای روده‌ای و اثرات ضد التهابی میکروبیوتای روده و متابولیت‌ها از جمله اسدهای چرب کوتاه زنجیر) احتمالا باعث عملکرد سین‌بیوتیک‌ها در کاهش تولید عوامل ضد التهابی می‌شوند (کاترینا و همکاران، ۲۰۱٦). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از پروبیوتیک‌ها، پربیوتیک‌ها و تلفیق این دو به‌عنوان سین‌بیوتیک در جیره آبزیان مفید است و می‌تواند باعث افزایش ایمنی شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از اساتید محترم به‌خصوص جناب آقای دکتر حامد کلنگی، پرسنل آزمایشگاه شهید ناصر فضلی برآبادی و آزمایشگاه ژنتیک به سبب حمایت‌های اجرایی و مالی دارند.

منابع

1. Andani, H.R.R., Tukmechi, A., Meshkin, S., and Ebrahimi, H. 2010. Rainbow trout increased resistance against Aeromonas hydrophila and Yersinia infections using Lactobacillus isolated common carp. Iran Veterinary journal. 26-35.
2. Andani, H.R.R., Tukmechi, A., Meshkini, S., and Sheikhzadeh, N. 2012. Antagonistic activity of two potential probiotic bacteria from fish intestines and investigation of their effects on growth performance and immune response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Applied Ichthyology. 28: 728-734.
3. Binns, N. 2013. Probiotics, prebiotics and the gut microbiota. International Life Sciences institute. 23-24.
4. Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Munoz-Quezade, S., and Gil, A. 2013. Evaluation of probiotics. Br J Nutr. 2: 35-50.
5. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology. 66: 365-378.
6. Hong.Yun, G., Lan.Mei, W., Yin.Hua, Z.H., Min, X., Wei.Xiang, Z.H., Xiu, F., Liang, H., and Jia, W. 2010. Effects of raffinose on growth performance, immunity, stress/response and survival of japanese seabass (*lateolabrax/japonicus*) challenged with aeromonas hydrophila. CNKI journal.
7. Harikrishnan, R., Balasundaram, C., and Heo, M.S. 2010. *Lactobacillus sakei* BK19 enriched diet enhances the immunity status and disease resistance to *streptococcosis* infection in kelp grouper. Epinephelus bruneus. Fish and Shellfish Immunology. 29: 1037–1043.
8. Hoseinifar, S.H., and Pooramini, M. 2007. The use of probiotic and prebiotic in aquaculture. Moje sabz journal. 110p.
9. Hoseinifar, S.H., Esteban, M.Á., Cuesta, A., and Sun, Y.Z. 2015. Prebiotics and Fish Immune Response: A Review of Current Knowledge and Future Perspectives. Reviews in Fisheries Science and Aquaculture., 23: 315-328.
10. Hoseinifar, S.H., Ringo, E., Shenavar Masouleh, A., and Esteban, M.A. 2014. Probiotic, prebiotic and symbiotic supplement in sturgeon aquaculture: a review. Aquaculture. 6: 11-14.
11. Katharina, E., Scholz, A., Berit, A., Florence, R., Denis, V., Barclayb, B., Michael, V., Yahya, A., and Jürgen, S. 2016. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on mineral metabolism in ovariectomized rats — impact of bacterial mass, intestinal absorptive area and reduction of bone turn-over. NFS Journal. 3: 41-50.
12. Kubulay, A., and Ulukoy, G. 2002. The effects of acute stress on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Turkish Journal of Zoology. 26: 249- 25.
13. Kolida, S., Tuohy, K., and Gibson, G.R. 2002. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. British Journal of Nutrition. 2: 193–197.
14. Mahious, A.S., Ollevier, F. 2005. Probiotics and Prebiotics in Aquaculture: A review. In: Agh N, Sorgeloos P, editors. 1st regional workshop on techniques for enrichment of live food for use in larviculture. Urima, Iran. 17-26.
15. Martha, R-B., Crystal, G., Diana Ceballos-Franciscob., Carlos Angulo, M. Ángeles Esteban. 2017. Dietary yeast *Sterigmatomyces halophilus* enhances mucosal immunity of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Fish and Shellfish Immunology. 46: 165–175.
16. ..Peyman, Yar Ahmadi., Hamid, Farahmand., Hamed, Kolangi Miandare., Alireza, Mirvaghefi., Seyed Hossein, Hoseinifar.2014. The effects of dietary Immunoge on innate immune response, immune related genes expression and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology. 37: 209-214.
17. Peyman, Yar Ahmadi., Hamid, Farahmand., Hamed, Kolangi Miandare., Alireza, Mirvaghefi., Seyed Hossein, Hoseinifar. 2014. Dietary fermentable fiber upregulated immune related genes expression, increased innate immune response and resistance of

rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology. 41: 326-341.
18. Song, Z.F., Wu, T.X., Cai, L.S., Zhang, L.J., Zheng, X.D. 2006. Effects of dietary supplementation with *Clostridim butyricum* on the grow performance and humoral immune response in Miichthys miiuy. J Zhejiang Univ Sci B. 7: 596-602.
19. Verschuere, L., Rombau, G., Sorgeloos, P., and Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiol. Mol. Biol. 64: 655–671.