Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics

Online ISSN: 2345-427X
Print ISSN: 2345-4288

The effects of dietary supplemented oyster mushroom powder (*Pleurotus ostreatus*) on growth performance, immunity of skin mucus and blood serum and mucus protein pattern of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings

Hossein Arab[1], Hamed Pakenjad[*2], Seyed Hossein Hoseinifar[3], Mohammad Reza Imanapour[4], Ali Jafarnoudeh[5], Mohsen Tajari[6]

1. Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: hossein.arab03@gmail.com
2. Corresponding Author, Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: hkolangi@gmail.com
3. Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: hossein.hoseinifar@gmail.com
4. Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: imanpoor@gau.ac.ir
5. Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: a.jafar55@gmail.com
6. Dept. of Fisheries, Bandargaz Branch, Islamic Azad University, Bandargaz, Iran. E-mail: m.tajari1356@gmail.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 07.08.2022
Revised: 08.03.2022
Accepted: 12.24.2022

Keywords:
Growth,
Immune index,
Mucus protein pattern,
Nile tilapia,
Oyster mushroom

ABSTRACT

Mushrooms have a large amount of biologically active compounds such as prebiotics. In the present study, we tested the effect of supplementing oyster mushroom powder in the diet on growth performance, survival, serum and mucus immune parameters and mucus protein pattern of Nile tilapia fingerlings. Therefore, 200 pieces of Nile tilapia fingerlings with an average weight of 9.15 ± 0.09 g were prepare and then, they were fed with oyster mushroom powder at four levels including 0, 0.5, 1 and 2 g kg^{-1} diet by 3% of their body weight per day (three replications). At the end of the experiment, biometry was performed to measure the growth performance. Also, some serum and mucus immune parameters such as total immunoglobulin and lysozyme were investigated. The protein pattern of skin mucus was evaluated by sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis method. The results showed that the best growth performance and the highest levels of lysozyme and mucus immunoglobulin were significantly in the group fed with a diet containing 2 g oyster mushroom powder compared to the control group ($P<0.05$). The amount of lysozyme and total serum immunoglobulin was significantly higher in the treatments fed with 0.5 and 1 g of oyster mushroom powder, respectively, compared to the control group ($P<0.05$). The protein bands ranged from 11 to 100 kilo Daltons. The density of bands in the treatment of oyster mushroom powder was higher compared to the control group. In general, the results showed that the diet containing 2 g of oyster mushroom powder had more positive effects on growth performance, protein pattern and some immune parameters of mucus and serum of Nile tilapia fingerlings.

Cite this article: Arab, Hossein, Pakenjad, Hamed, Hoseinifar, Seyed Hossein, Imanapour, Mohammad Reza, Jafarnoudeh, Ali, Tajari, Mohsen. 2023. The effects of dietary supplemented oyster mushroom powder (*Pleurotus ostreatus*) on growth performance, immunity of skin mucus and blood serum and mucus protein pattern of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 12 (2), 13-33.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2022.20406.1685
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا آنلاین: ۲۳۴۵-۴۲۷X
شاپا چاپی: ۲۳۴۵-۴۲۸۸

اثرات مکمل‌سازی پودر قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) در جیره غذایی بچه‌ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) بر عملکرد رشد، ایمنی موکوس پوست و سرم خون و الگوی پروتئینی موکوس

حسین عرب[۱]، حامد پاک‌نژاد*[۲]، سید حسین حسینی‌فر[۳]، محمدرضا ایمانپور[٤]، علی جافرنوده[٥]، محسن تجری[٦]

۱. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: hossein.arab03@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: hkolangi@gmail.com

۳. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: hossein.hoseinifar@gmail.com

٤. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: imanpoor@gau.ac.ir

٥. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: a.jafar55@gmail.com

٦. گروه شیلات، واحد بندرگز، دانشگاه آزاد اسلامی، بندرگز، ایران. رایانامه: m.tajari1356@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۱/۰٤/۱۷
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۱/۰٥/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۱۰/۰۳

واژه‌های کلیدی:
الگوی پروتئینی موکوس،
تیلاپیای نیل،
رشد،
شاخص ایمنی،
قارچ صدفی

چکیده

قارچ‌ها دارای شمار زیادی از ترکیبات فعال بیولوژیکی مانند پری‌بیوتیک‌ها هستند. در پژوهش حاضر، اثر مکمل‌سازی پودر قارچ صدفی در جیره بر عملکرد رشد، بازماندگی، شاخص‌های ایمنی سرم، موکوس و الگوی پروتئینی موکوس بچه‌ماهیان تیلایای نیل بررسی شد. از این‌رو، تعداد ۲۰۰ قطعه بچه‌ماهی تیلاپیای نیل با میانگین وزنی ۰/۰۹ ± ۹/۱۵ گرم تهیه و با پودر قارچ صدفی در چهار سطح ۰ (گروه شاهد)، ۰/۵، ۱ و ۲ گرم به ازای کیلوگرم جیره با میزان ۳ درصد وزن بدن به مدت ٦۰ روز تغذیه شدند. در انتهای آزمایش برای بررسی عملکرد رشد زیست‌سنجی به‌طور تصادفی از تمام گروه‌ها انجام شد. هم‌چنین، برخی از شاخص‌های ایمنی سرم خون و موکوس پوست شامل ایمنوگلوبولین کل و فعالیت لیزوزیم بررسی شدند. الگوی پروتئینی موکوس پوست به روش الکتروفورز ژل سدیم دو دوسیل سولفات پلی آکریل آمید ارزیابی شد. نتایج نشان داد که بهترین عملکرد رشد و بیش‌ترین میزان لیزوزیم و ایمنوگلوبولین موکوس به‌طور معناداری در مقایسه با گروه شاهد مربوط به گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۲ گرم پودر قارچ صدفی می‌شد ($P<0/05$). میزان لیزوزیم و ایمنوگلوبولین کل سرم به ترتیب در تیمارهای تغذیه شده با ۰/۵ و ۱ گرم پودر قارچ صدفی در

مقایسه با گروه شاهد به‌طور معناداری بالاتر بود (P<۰/۰۵). باندهای پروتئینی محدوده‌ای از ۱۱ تا ۱۰۰ کیلودالتون داشتند. تراکم باندها در تیمارهای تغذیه شده با پودر قارچ صدفی در مقایسه با گروه شاهد بیش‌تر بود. به‌طورکلی نتایج نشان داد که جیره مکمل شده با ۲ گرم پودر قارچ صدفی اثرات مثبتی بر شاخص‌های رشد، الگوی پروتئینی و برخی از شاخص‌های ایمنی موکوس و سرم بچه‌ماهی تیلاپیای نیل داشت.

استناد: عرب، حسین، پاک‌نژاد، حامد، حسینی‌فر، سید حسین، ایمانپور، محمدرضا، جافرنوده، علی، تجری، محسن (۱۴۰۲). اثرات مکمل‌سازی پودر قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) در جیره غذایی بچه‌ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) بر عملکرد رشد، ایمنی موکوس پوست و سرم خون و الگوی پروتئینی موکوس. *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۲ (۲)، ۳۳-۱۳.
DOI: 10.22069/japu.2022.20406.1685

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

در طی سالیان گذشته استفاده پیشگیرانه و درمانی از آنتی‌بیوتیک‌ها مرسوم بود. به طوری که استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها پیامدهایی مانند: ظهور باکتری‌های مقاوم، باقی‌ماندن بقایای آنتی‌بیوتیکی در گوشت ماهیان و خطر انتقال آن به انسان از طریق زنجیره غذایی و نیز آلودگی‌های زیست‌محیطی را به‌دنبال داشته است (۱). بنابراین، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در بسیاری از کشورها به واسطه وضع قوانین، محدود و یا ممنوع شده است (۲). از این‌رو، در دهه‌های اخیر از محرک‌های ایمنی به عنوان یک راهکار و جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها به‌منظور تحریک سیستم ایمنی میزبان در برابر عوامل بیماری‌زا استفاده می‌گردد (۳). پروبیوتیک‌ها، پربیوتیک‌ها، سین‌بیوتیک‌ها، گیاهان دارویی، عصاره‌های گیاهی، رنگدانه‌ها و اسیدهای آلی نمونه‌های بارزی از محرک‌های ایمنی و رشد می‌باشند که به خصوص در سال‌های اخیر در آبزی‌پروری مورد استفاده قرار می‌گیرند (٤، ٥، ٦، ٧، ٨، ٩، ١٠، ١١، ١٢، ١٣).

پربیوتیک‌ها، اجزای غذایی غیر قابل هضم بوده که با تحریک رشد فلور میکروبی روده میزبان، سلامت میزبان را تأمین می‌نمایند (١٤). یکی از این اجزای غذایی مهم، الیگوساکاریدهای غیرقابل‌هضم می‌باشند (١٥). اولیگوساکاریدهای غیرقابل‌هضم کربوهیدرات‌هایی با وزن مولکولی کم و حد واسط بین قندهای ساده و پلی‌ساکاریدها می‌باشند (١٦). از جمله مواد غذایی که دارای ترکیبات پربیوتیکی است قارچ خوراکی صدفی با نام علمی *Pleurotus ostreatus* می‌باشد (١٧). در حدود ١٢٠٠٠ گونه قارچ در جهان وجود دارد که تنها کم‌تر از ٢٠٠٠ هزار گونه آن خوراکی است (١٨). قارچ‌ها دارای شمار زیادی از ترکیبات فعال بیولوژیکی مانند: پلی‌ساکاریدها، گلیکوپروتئین‌ها، تری‌ترپن‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها هستند (١٩). در همین راستا، خصوصیت آنتی‌اکسیدانی قارچ صدفی توسط Jayakumar و همکاران (٢٠٠٩) مورد مطالعه قرار گرفته است (٢٠). Kamilya و همکاران، (٢٠٠٦) اثرات بتاگلوکان موجود در یکی از گونه‌های قارچ صدفی (*Pleurotus florida*) را روی سیستم ایمنی ماهی کپورهندی *Catla catla* مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که افزودن این قارچ باعث افزایش میزان بازماندگی و کاهش تلفات گردید (٢١). Din و همکاران (٢٠١٢) پس از استفاده از پودر قارچ صدفی در جیره غذایی بچه‌ماهیان تیلاپیای قرمز (*Oreochromis sp.*) بیان کردند که این مکمل غذایی سبب افزایش معنی‌دار رشد و بازماندگی در گروه تیمار شد (٢٢).

ماهی تیلاپیا از راسته سوف ماهی‌شکلان و متعلق به خانواده Cichlidae می‌باشد. این ماهی به‌طور معمول در آب‌های داخلی شیرین و لب شور پرورش داده می‌شود. ولی، به‌علت تحمل محدوده گسترده‌ای از شوری، در محیط آب شور دریا نیز و در شرایط قفس قابل پرورش است (١٧). این ماهی به علت سازگاری بالا و رشد خوب در مزارع پرورش آبزیان تولید می‌گردد. بر اساس پژوهش‌ها مشخص گردید که آبزی‌پروری پایدار به معیارهای مختلفی بستگی دارد که از جمله این معیارها تغذیه آبزیان و جیره غذایی مناسب می‌باشد (١٨ و ١٩). از سویی دیگر، با توجه به پتانسیل‌های بالقوه در خصوص پرورش ماهی تیلاپیا در نواحی مرکزی کشور و نیز شرایط اقتصادی و اجتماعی به‌خصوص ارزآوری و اشتغال‌زایی صنعت تکثیر و پرورش، لازم است که پژوهش‌گران صنعت شیلات در کشور، با به‌کارگیری تکنیک‌ها و فناوری‌های مناسب، پیشنهادات مؤثری را در جهت بالا رفتن میزان تولید ارائه نمایند که بتواند منجر به تأمین بخشی از مواد پروتئینی داخل، صدور این محصول و هم‌چنین

ارزآوری برای کشور شود (۲۳ و ۲٤). برآورد بازده اقتصادی نقش بسیار مهمی در تصمیم مزرعه‌داران بر انتخاب فن‌آوری‌های نوین دارد و در نتیجه بر مدیریت منابع آن‌ها تأثیر می‌گذارد. (۲۵). از آن‌جایی‌که هزینه خوراک در آبزی‌پروری بیش‌ترین بخش هزینه‌ها را شامل می‌شود و با توجه به شرایط اقتصادی هر کشوری بر میزان تولید تأثیر می‌گذارد، هزینه‌های نیروی انسانی، خوراک و مواد شیمیایی مورد استفاده در آبزی‌پروری در حال افزایش است و به‌کارگیری تکنولوژی‌های نوین در جهت کاهش هزینه‌ها ضروری می‌باشد (۲٦). بنابراین در مدیریت مزرعه علاوه بر توجه به فرآیندهای بیولوژیکی نیاز است به عوامل اقتصادی و تجزیه و تحلیل هزینه‌ها و سودآوری پرداخت که برای موفقیت در فعالیت آبزی‌پروری ضروری است (۲۷). قارچ‌ها نیز به‌دلیل دلشتن خاصیت پربیوتیکی می‌توانند کارایی جیره را افزایش دهند. اگرچه قیمت قارچ‌ها در چند سال اخیر افزایش یافت، اما، مقدار افزوده شده به جیره غذایی ماهیان در مقایسه با بازدهی خوراک قابل اغماض است. چرا که پژوهش‌ها نشان داده است که این ماده غذایی قادر است کارایی جیره را به طور چشمگیری افزایش دهد. از طرف دیگر، تعداد قارچ‌ها در هر بار رویش بسیار زیاد است. در هنگام بسته‌بندی قارچ‌ها پایه‌های آن‌ها قطع شده و به عنوان ضایعات بخش اعظمی از این ماده غذایی با ارزش دور ریخته می‌شود. بنابراین، با توجه به ارزش غذایی و قیمت قارچ‌ها می‌توان از این بخش در صنعت دام، طیو و آبزیان استفاده کرد. با این‌حال، طبق بررسی‌های انجام شده، تاکنون مطالعه‌ای در زمینه اثر استفاده از پودر قارچ صدفی بر عملکرد رشد، بازماندگی و شاخص‌های ایمنی سرم خون و موکوس پوست و الگوی پروتئینی موکوس بچه‌ماهیان تیلایای نیل صورت نگرفته است، بنابراین مطالعه حاضر با هدف ارزیابی شاخص‌های مذکور انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه مخازن پرورش و ذخیره‌سازی بچه‌ماهی‌ها: برای انجام این آزمایش تعداد ۲۰۰ قطعه بچه‌ماهی تیلاپیای نیل با میانگین وزنی ۰/۰۹ ± ۹/۱۵ گرم از یک کارگاه بخش خصوصی واقع در استان کرمان تهیه و به سالن آبزی‌پروری شهید ناصر فضلی در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انتقال داده شد. بچه‌ماهی‌ها پس از گذشت مدت زمان ۲ هفته جهت سازگاری با شرایط آزمایش، در ۱۲ مخزن فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری به ارتفاع ۵۰ سانتی‌متر و حجم آبگیری حدود ٦۰ لیتر با تراکم ۱٦ قطعه در هر تانک (سه تیمار و یک گروه شاهد هر کدام با سه تکرار) تقسیم شدند.

تهیه پودر قارچ صدفی: قارچ صدفی از یک گلخانه بخش خصوصی واقع در استان مازندران تهیه و پس از شست و شو به صورت ورقه‌ای درآورده شد، سپس، ورقه‌های نازک قارچ در آون با دمای ٤۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤۸ ساعت قرار داده شد تا به‌صورت کامل خشک گردد. محتویات خشک شده به‌وسیله آسیاب برقی به صورت پودر درآورده شد (۲۸).

تهیه جیره و تیماربندی: در این آزمایش جیره ماهی تیلاپیای نیل با استفاده از اقلام ارائه شده در جدول ۱ ساخته؛ سپس پودر قارچ صدفی در سه سطح ۰/۵، ۱ و ۲ گرم به ازای کیلوگرم جیره به مواد اضافه (۲۹) و ترکیب نهایی به‌طور جداگانه به‌صورت کامل مخلوط گردیدند تا سه جیره همگن به‌دست آید. جیره فاقد پودر قارچ صدفی به عنوان جیره پایه در نظر گرفته شد. پس از تهیه جیره‌های حاوی سطوح متفاوت پودر قارچ صدفی، از چرخ‌گوشت با سوراخ‌هایی به قطر ۲ میلی‌متر برای پلت‌زنی استفاده گردید. پلت‌های ایجادشده در فضایی تاریک و در دمای اتاق روی سینی به مدت ٤۸ ساعت قرار داده شدند تا رطوبت

اضافی آن‌ها از بین برود و رطوبت به زیر ۱۰ درصد درصد کاهش یابد. پلت‌های خشک شده جمع‌آوری و در کیسه‌های پلاستیکی زیپ‌دار برای جلوگیری از فساد جیره در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در داخل یخچال قرار گرفتند. غذادهی به بچه ماهی‌ها به‌صورت دستی به میزان ۳ درصد وزن بدن و ۳ وعده در روز صورت پذیرفت (۳۰). آنایز تقریبی جیره بر اساس روش آزمایشگاهی AOAC (۱۹۹۰) انجام شد (۳۱).

جدول ۱- فرمولاسیون و ترکیب تقریبی جیره پایه.

ترکیبات	مقدار (گرم بر کیلوگرم)
پودر ماهی[۱]	٤۰/۰
آرد گندم	۲۱/۰
آرد سویا[۲]	۱۳/۵
گلوتن	۵/۵
روغن سویا	٦/۰
روغن ماهی	٦/۰
مواد معدنی[۳]	۳/۰
ویتامین[٤۱]	۲/۰
بایندر[۵]	۲/۰
ضد قارچ[٦]	۰/۵
آنتی‌اکسیدان[۷]	۰/۵
آنالیز جیره (بر اساس درصد مواد خشک)	
پروتئین خام	۲۹/۷۰
لیپید خام	۱۱/۱۳
خاکستر	۹/٤۸

[۱] پودر کیلکا: کارخانه نگین پودر (پروتئین ۱±٦۹ درصد، چربی۰/۵±۱۰ درصد، خاکستر ۲±۱٤ درصد، TVN: <۱۲ میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم).

[۲] آرد سویا: کارخانه سویا (پروتئین ٤۵ درصد، چربی ۱/۵ درصد، خاکستر ۵ درصد).

[۳] مکمل معدنی شامل: روی (۳۳۸۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، منگنز (۳۹٦۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، مس (٤۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، آهن (۲۰۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، سلنیوم (۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، ید (۳۹۷ میلی‌گرم در کیلوگرم)، کولین کلرید (۱۰۰۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، کلسیم پنتونیات (۳۹۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم).

[٤] مکمل ویتامینی شامل: A (۳٦۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی در کیلوگرم)، ویتامین D3 (۸۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی در کیلوگرم)، E (۱٤٤۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، K3 (۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، B1 (۷۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، B2 (۲٦٤۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، B3 (۱۱۸۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، B6 (۱۱۷٦ میلی‌گرم در کیلوگرم)، B9 (٤۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، B12 (٦ میلی‌گرم در کیلوگرم)، بیوتین (٤۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، خلوص ویتامین ث ۵۰ درصد بود (۰/۰۸ تا ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم).

[۵] بایندر: بنتونیت (برند هاتف)

[٦] ضدقارچ: برند بایومین

[۷] آنتی‌اکسیدان: برند میاویت

بررسی شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب: در طی دوره پرورش، فاکتورهای فیزیکوشیمیایی محیط آب پرورش مانند: درجه حرارت (با استفاده از دماسنج جیوه‌ای)، pH و اکسیژن (با استفاده از پی‌اچ متر و اکسی‌متر) محلول اندازه‌گیری شد. در طول مدت آزمایش دما بین ۲۶–۲۲ درجه سانتی‌گراد (دماسنج، RX-C008)، pH بین ۸/۲–۸ (پی‌اچ متر، PCE-PH20)، اکسیژن بین ۷–۶ میلی‌گرم بر لیتر (اکسی‌متر، DO600)، سختی آب بین ۲۶۰–۲۶۲ میلی‌گرم بر لیتر کربنات کلسیم (سختی‌سنج TDS) و شرایط نوری در طول دوره آزمایش به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی (لامپ متصل به تایمر) حفظ گردد. هوادهی آب از طریق سنگ هوای متصل به کمپرسور مرکزی (Hailea-ACO-208) انجام شد. برای جلوگیری از آلودگی و خارج کردن غذای باقی‌مانده و فضولات، آب ونیروها هر ۵ روز سیفون می‌شد. در صورت مشاهده تلفات در حوضچه‌ها بلافاصله ماهی‌های تلف‌شده خارج شد و تعداد تلفات و شماره ونیروها ثبت می‌گردید. لازم به ذکر است آب مورد استفاده برای انجام این پژوهش آب شهری بود که جهت کلرزدایی به‌مدت ۲٤ ساعت درون حوضچه‌های ذخیره هوادهی می‌شد.

زیست‌سنجی و بررسی شاخص‌های رشد: برای آگاهی از عملکرد جیره غذایی، چگونگی رشد بچه‌ماهیان و تعیین میزان غذای موردنیاز، بچه‌ماهیان در فواصل زمانی ۱۵ روزه زیست‌سنجی شدند. بدین‌منظور پس از پایین آوردن سطح آب کلیه ماهیان هر تیمار با استفاده از ساچوک صید می‌شدند. بچه‌ماهیان با ترازویی با دقت ۰/۰۱ گرم و خط‌کش با دقت ۱ میلی‌متر مورد زیست‌سنجی قرار گرفتند. لازم به ذکر است که به دلیل تحت استرس بودن و امکان وقوع تلفات، غذادهی قبل و بعد از زیست‌سنجی صورت نمی‌گرفت. شاخص‌های رشد شامل میزان نرخ رشد ویژه (SGR)، افزایش وزن (BWG)، فاکتور وضعیت (CF)، و ضریب تبدل غذایی (FCR) در ماهی تیلاپیای نیل براساس فرمول‌های گرفته شده از پژوهش Zakariaee و همکاران (۲۰۲۱) محاسبه گردید (۲۸).

وزن اولیه (گرم) – وزن نهایی (گرم) = افزایش وزن بدن (گرم)

۱۰۰ × [وزن اولیه (گرم) / افزایش وزن (گرم)] = درصد افزایش وزن (درصد)

۱۰۰ × [طول دوره پرورش (روز) / (لگاریتم طبیعی وزن اولیه – لگاریتم طبیعی وزن نهایی)] = نرخ رشد ویژه (درصد در روز)

[افزایش وزن (گرم) / مقدار غذای مصرفی (گرم)] = ضریب تبدیل غذایی

وزن نهایی (گرم) = فاکتور وضعیت × طول نهایی ^{3}(سانتی‌متر) / ۱۰۰

جمع‌آوری موکوس: جمع‌آوری موکوس بر اساس روش Ross و همکاران (۲۰۰۰) و Subramanian و همکاران (۲۰۰۷a) انجام شد (۳۲ و ۳۳). تعداد ۳ قطعه ماهی از هر تانک برداشته و پس از بیهوشی با ۵ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک به صورت جداگانه درون کیسه‌های پلی‌اتیلنی (زیپ پلاست) حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سدیم کلرید ۵۰ میلی‌مولار قرار گرفتند و پس از ۲ دقیقه ماهی‌ها از کیسه‌ها خارج شدند. موکوس جمع‌آوری شده در فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و در ۱۵۰۰ g

سانتریفیوژ (digital 5810, R eppendrofcentrifuge) شد و سوپرناتانت به میکروتیوپ ۱/۵ سی‌سی انتقال داده شده و تا زمان انجام آزمایش‌های مربوطه در فریزر در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۳٤).

جمع‌آوری سرم: تعداد ۳ قطعه ماهی از هر تیمار به‌طور کاملاً تصادفی برداشته و پس از بیهوشی با ۵ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک، با استفاده از سرنگ ۲ سی‌سی از قسمت ساقه دمی خون گرفته شد. خون هر ماهی به‌طور جداگانه در داخل ویال‌های استریل ریخته و سپس ویال‌های حاوی خون در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با دور ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردیدند و مایع رویی به ویال‌های جدید انتقال یافت و تا زمان انجام آزمایش‌های مربوطه در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد (۳۵).

سنجش فعالیت آنزیم لیزوزیم موکوس و سرم: سنجش آنزیم لیزوزیم به روش کدورت‌سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد (۳۳). برای سنجش این آنزیم از باکتری *میکروکوکوس لوتئوس* (ATCC 4698) به عنوان سوبسترا استفاده گردید. برای تهیه این سوسپانسیون، باکتری لیوفیلیزه *میکروکوکوس لوتئوس* در بافر فسفات پتاسیم (پی‌اچ ۷)، ۰/۰٤ مولار حل‌شده و جذب این محلول در مقابل شاهد (کووت حاوی بافر فسفات سدیم)، در طول‌موج ٤۵۰ نانومتر، برابر ۰/۷-۰/٦ تنظیم شد؛ سپس ۲/۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری به کووت اضافه شد، بعد از ۵-٤ دقیقه به دمای تعادل رسید، سپس به کووت شاهد ۰/۵ میلی‌لیتر بافر و به کووت نمونه ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه موکوس و یا سرم اضافه شد. محتویات کووت به‌خوبی مخلوط گردید و کاهش جذب به مدت ۱۰ دقیقه در طول‌موج ٤۵۰ نانومتر ثبت گردید. یک واحد فعالیت آنزیم، به‌صورت مقدار آنزیمی که در طول‌موج ٤۵۰ نانومتر و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کاهشی معادل ۰/۰۰۱ در دقیقه در جذب سلول‌های *میکروکوکوس لوتئوس* ایجاد می‌کند، بیان گردید (۳٦).

اندازه‌گیری ایمنوگلوبولین کل موکوس و سرم: جهت اندازه‌گیری ایمنوگلوبولین کل از روش Siwicki و Anderson (۱۹۹۳) استفاده شد (۳۷). میزان پروتئین سرم و موکوس به صورت جداگانه تعیین‌شده و سپس به نمونه‌ها پلی‌اتیلن گلایکول ۱۲ درصد اضافه شد. پس از ۲ ساعت در دمای اتاق نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند و غلظت پروتئین در قسمت بالایی محلول مجدداً توسط روش Bradford (۱۹۷٦) اندازه‌گیری گردید (۳۸). میزان ایمنوگلوبولین کل از تفریق غلظت پروتئین در نمونه اولیه و غلظت پروتئین پس از افزودن پلی‌اتیلن گلایکول محاسبه شد.

بررسی الگوی پروتئینی موکوس: به‌منظور بررسی الگوی پروتئینی موکوس بچه‌ماهیان تیلاپیای نیل تغذیه شده با سطوح متفاوت پودر قارچ صدفی از روش Laemmli (۱۹۷۰) و ژل الکتروفورز پلی‌آکریل آمید- سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) استفاده شد (۳۹). از این رو، نمونه‌های موکوس به‌دست آمده به مدت ۷۲ ساعت در فریزدرایر کاملاً خشک شدند. سپس مقدار ۱۰ میلی‌گرم از هر یک از نمونه‌ها با ۰/۰۱ مولار بافر تریس-گلیسین (با پی‌اچ ٦/۸)، SDS ۰/۱ درصد، مرکاپتواتانول ۱ درصد و گلیسرول ۲۰ درصد مخلوط شدند. حلال‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند و سپس با دور g ۱۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعد، از مایع رویی یا همان سوپرناتات برای اجرای ژل تحت جریان ثابت (۳۰ میلی‌ولت (۷ درصد) و ۵۰ میلی‌ولت (۱۵ درصد)) استفاده گردید. پس از ران کردن ژل، نمونه‌ها با Coomassie Brilliant Blue رنگ‌آمیزی شدند.

مارکرهای وزنی مورد استفاده شامل مارکرهایی با وزن ۱۱ تا ۱۰۰ کیلو دالتون با پروفایل باندی ایجاد شده با لدر به‌عنوان نشانگر وزن مولکولی مقایسه شدند (۴۰).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. جهت بررسی نرمالیتی داده‌ها از آزمون کولوموگروف اسمیرنوف استفاده شد. سپس، داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد سنجش قرار گرفتند. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ثبت گردید.

نتایج

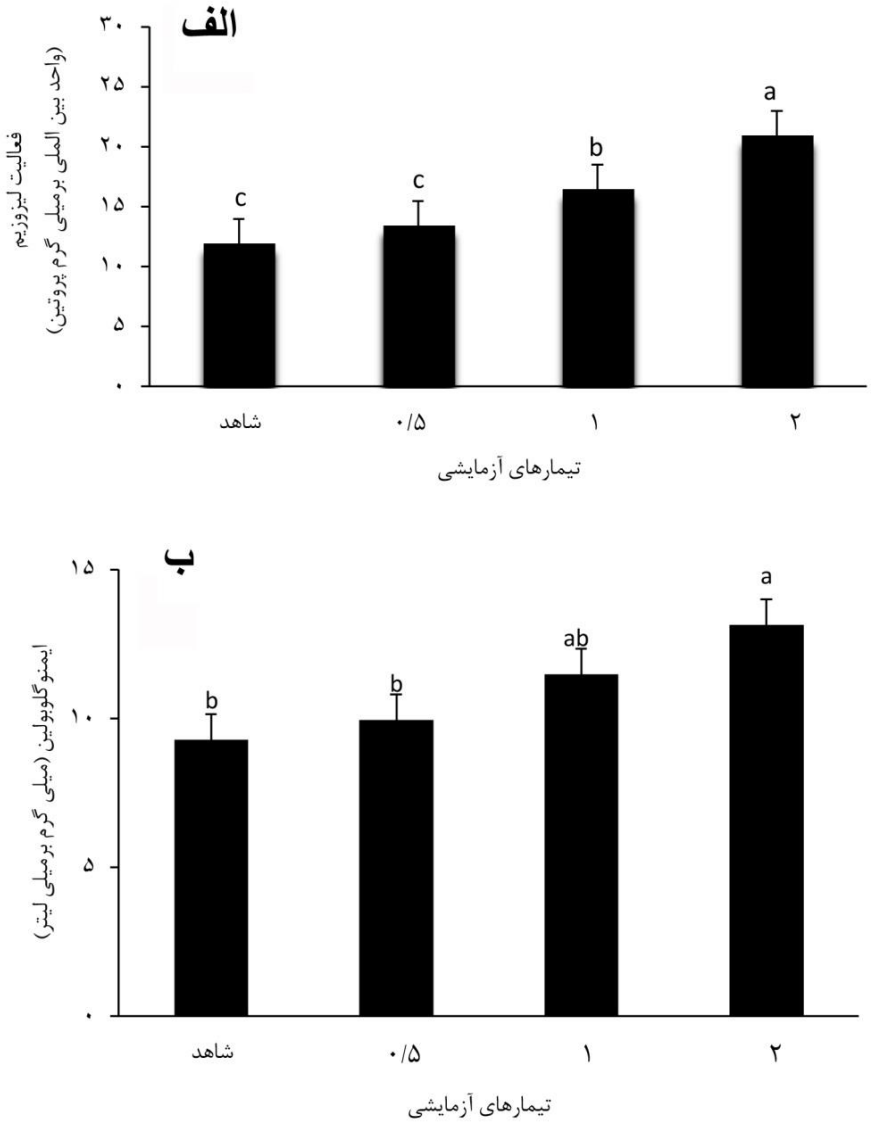
بررسی شاخص‌های رشد و بازماندگی: نتایج به‌دست آمده از بررسی شاخص‌های رشد و بازماندگی بچه تیلاپیای نیل تغذیه شده با سطوح متفاوت پودر قارچ صدفی در جدول ۲ آورده شده است. نتایج نشان داد که میانگین وزن انتهای دوره، بین تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی پودر قارچ صدفی با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بودند (P<۰/۰۵). در بین تیمارهای تغذیه‌شده با پودر قارچ صدفی بیش‌ترین افزایش وزن برای تیمار حاوی ۲ گرم پودر قارچ صدفی و کم‌ترین افزایش وزن مربوط به گروه شاهد بود. هم‌چنین نرخ رشد روزانه بین تیمارهای تغذیه‌شده با پودر قارچ صدفی با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید (P<۰/۰۵)، هم‌چنین، کم‌ترین ضریب تبدیل غذایی در تیمار حاوی ۲ گرم پودر قارچ صدفی و بیش‌ترین آن در گروه شاهد مشاهده گردید که با یکدیگر اختلاف معنادار داشتند (P<۰/۰۵). در تمام تیمارها و گروه شاهد هیچ‌گونه تلفاتی در طول دوره پرورش مشاهده نشد؛ بنابراین، میزان بازماندگی در تمامی گروه‌ها اختلاف معناداری با یکدیگر مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

جدول ۲- مقایسه برخی از شاخص‌های رشد بچه‌ماهی تیلاپیای نیل تغذیه‌شده با سطوح مختلف پودر قارچ صدفی.

	جیره حاوی پودر قارچ (گرم در کیلوگرم جیره)			
	شاهد (بدون مکمل)	۰/۵	۱	۲
میانگین طول اولیه	۸/۷۷ ± ۰/۱[a]	۸/۷۸ ± ۰/۰۶[a]	۸/۸۳ ± ۰/۰۷[a]	۸/۶۸ ± ۰/۰۵[a]
میانگین وزن اولیه	۹/۱۶ ± ۰/۰۸[a]	۹/۱۶ ± ۰/۰۵[a]	۹/۱۶ ± ۰/۰۵[a]	۹/۱۶ ± ۰/۱۱[a]
میانگین طول ثانویه	۹/۸۷ ± ۰/۱۶[a]	۹/۷۸ ± ۰/۳۶[a]	۹/۸ ± ۰/۳۱[a]	۹/۸۷ ± ۰/۱۸[a]
میانگین وزن ثانویه	۱۵/۴۴ ± ۰/۴۴[b]	۱۷/۳ ± ۰/۲۴[a]	۱۶/۹۱ ± ۰/۱۲[a]	۱۷/۶۵ ± ۰/۴۴[a]
افزایش وزن	۶/۲۹ ± ۰/۳۶[b]	۸/۱۲ ± ۰/۲۷[a]	۷/۸ ± ۰/۱۴[a]	۸/۴۹ ± ۰/۳۵[a]
نرخ رشد ویژه (درصد)	۰/۹۳ ± ۰/۰۱[b]	۱/۱۳ ± ۰/۰۶[a]	۱/۱۰ ± ۰/۱۲[a]	۱/۱۷ ± ۰/۰۳[a]
ضریب تبدیل غذایی	۲/۶ ± ۰/۱۱[a]	۲/۰۰ ± ۰/۴۵[b]	۲/۱ ± ۰/۲۶[b]	۱/۹۳ ± ۰/۰۴[b]
درصد افزایش وزن	۸۱/۵۷ ± ۱/۱۴[b]	۸۱/۵۹ ± ۲/۳۹[b]	۷۷/۸۱ ± ۱/۶۳[b]	۸۶/۲۱ ± ۳/۲۱[a]
بازماندگی	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰

حروف لاتین غیرهمنام در هر ردیف تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵)

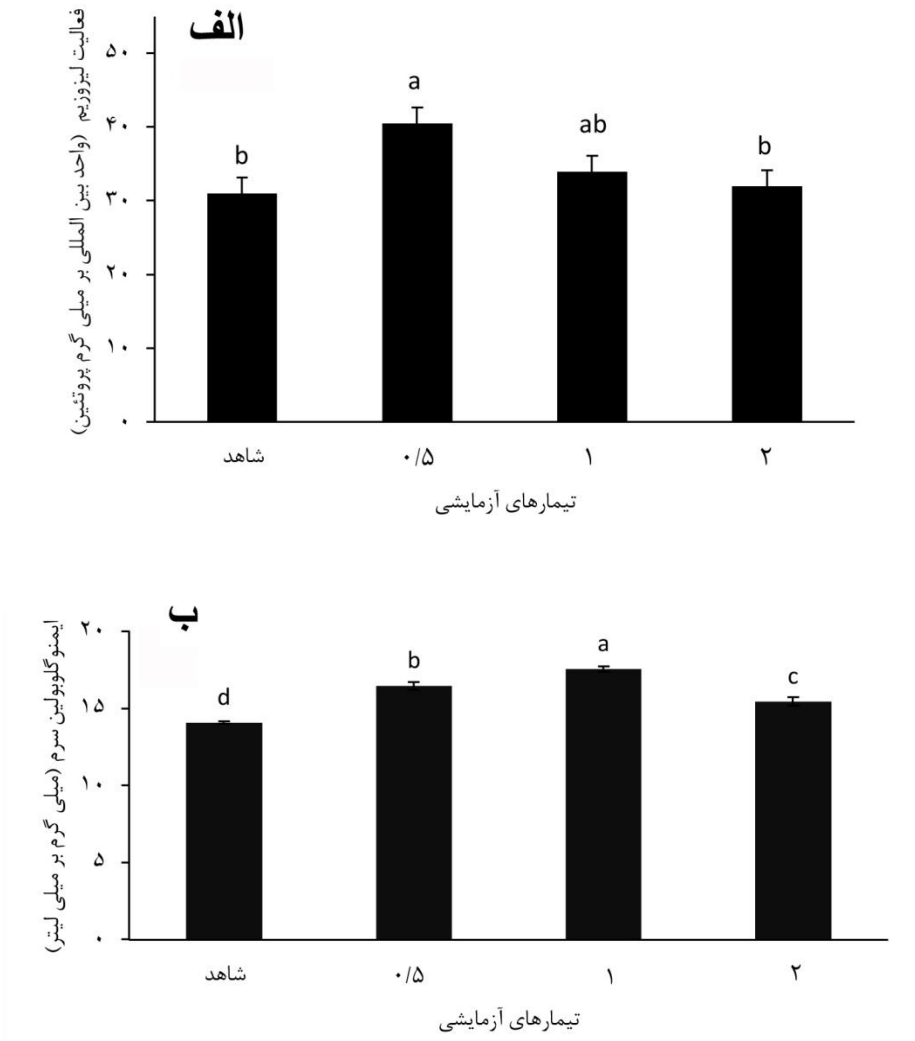
بررسی شاخص‌های ایمنی موکوس پوست: بررسی شاخص‌های ایمنی موکوس در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که فعالیت لیزوزیم موکوس در انتهای دوره بین تیمارها با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). در تیمار حاوی ۲ گرم پودر قارچ صدفی بیش‌ترین فعالیت لیزوزیم و در گروه شاهد کم‌ترین میزان فعالیت مشاهده گردید (P<۰/۰۵) (شکل ۱، الف). بر اساس نتایج، بیش‌ترین مقدار ایمنوگلوبولین در تیمار حاوی ۲ گرم پودر قارچ صدفی و کم‌ترین مقدار آن در گروه شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵) (شکل ۱، ب).



شکل ۱- شاخص‌های ایمنی موکوس بچه تیلاپیای نیل تغذیه شده با سطوح متفوت پودر قارچ صدفی: الف) فعالیت لیزوزیم و ب) ایمنوگلبولین موکوس.

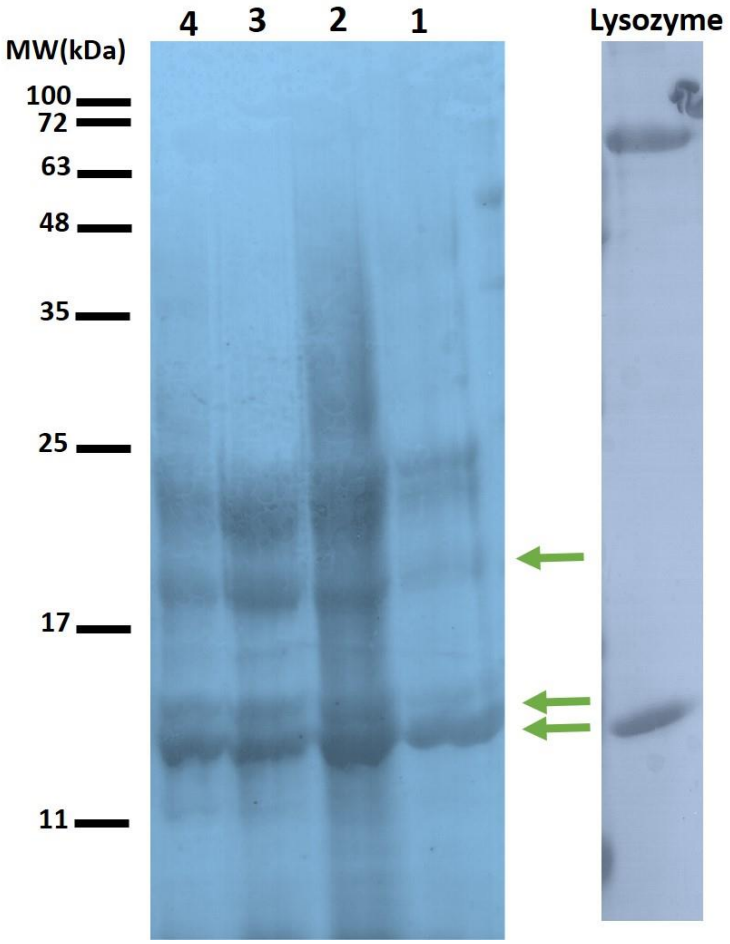
حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد (میانگین ± انحرف استاندارد).

بررسی شاخص‌های ایمنی سرم خون: نتایج حاصل از بررسی شاخص‌های ایمنی سرم خون ماهیان تغذیه شده با سطوح متفاوت پودر قارچ صدفی در شکل ۲ آورده شده است. نتایج نشان داد که بین تیمار ۰/۵ گرم پودر قارچ صدفی با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵) ولی، بین تیمارهای ۱ و ۲ گرم پودر قارچ صدفی با تیمار شاهد هیچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید هر چند فعالیت لیزوزیم در تیمارهای ۱ و ۲ گرم پودر قارچ صدفی نسبت به گروه شاهد بیش‌تر بود ولی اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). مقدار ایمنوگلوبولین سرم در تیمارهای حاوی پودر قارچ صدفی نسبت به گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشد (P<۰/۰۵) به‌طوری‌که تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۱ درصد پودر قارچ دارای بیش‌ترین و گروه شاهد دارای کم‌ترین میزان ایمنوگلوبولین بود (P<۰/۰۵).



شکل ۲- شاخص‌های ایمنی سرم بچه تیلاپیای نیل تغذیه شده با سطوح متفوت پودر قارچ صدفی:
الف) فعالیت لیزوزیم و ب) ایمنوگلبولین سرم.
حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد (میانگین ± انحرف استاندارد).

بررسی الگوی پروتئینی موکوس: نتایج حاصل از بررسی مقایسه الگوی پروتئینی موکوس بین تیمارهای مختلف در ماهیان تغذیه شده با سطوح متفاوت پودر قارچ صدفی در شکل ۳ آورده شده است. نتایج نشان داد که تفاوت قابل‌توجهی در تراکم باندها بین الگوی پروتئینی گروه شاهد و تیمارهای مختلف قابل مشاهده است. باندهایی که تراکم آن‌ها در تیمارها با یکدیگر متفاوت است با رنگ سبز مشخص شده‌اند. باندهای پروتئینی محدوده‌ای از ۱۱تا ۱۰۰کیلودالتون داشتند. بر اساس تخمین وزن مولکولی، کاهش تراکم باند در مناطق کم‌تر از ۱۱ و بیش‌تر از ۲۵ کیلو دالتون قابل‌مشاهده بود. تراکم باندها در تیمار ۲ (شماره ۳ تصویر) در محدوده ۱۷ تا ۲۵ کیلودالتون از سایر تیمارها و گروه شاهد بیش‌تر است که افزایش بیان پروتئینی را نشان می‌دهد و کم‌ترین تراکم باندی در گروه شاهد دیده شد. لیزوزیم نیز به صورت سنتتیک روی ژل برده شده است.



شکل ۳- نتایج الگوی پروتئینی موکوس حاصل از الکتروفورز ژل اس دی اس پیج در بچه تیلاپیای نیل تغذیه شده با سطوح متفاوت پودر قارچ صدفی: ۱: گروه شاهد، ۲: ۰/۵ گرم پودر قارچ صدفی به‌ازای کیلوگرم جیره، ۳: ۱ گرم پودر قارچ صدفی به‌ازای کیلوگرم جیره، ٤: گرم پودر قارچ صدفی به‌ازای کیلوگرم جیره.

بحث و نتیجه‌گیری

صنعت آبزی‌پروری در پاسخ به نیاز جوامع بشری به منابع پروتئینی سالم و ارزان‌قیمت، رشد روزافزونی داشته است. در نتیجه توسعه این صنعت هر ساله نسبت تولیدات آبزی‌پروری به تولیدات صیادی در حال افزایش است. شیوع بیماری‌ها، مشکلات تغذیه‌ای و مقاوم شدن باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک در اثر استفاده بیش از حد از آن‌ها، از چالش‌های عمده پیش روی توسعه این صنعت می‌باشد. بهبود جیره‌های فرموله شده از طریق افزودن مکمل‌های خاصی که علاوه بر افزایش رشد سبب بهبود عملکرد دستگاه ایمنی و در نتیجه مقاومت در برابر بیماری‌ها می‌شوند، از جمله راهکارهای ارائه شده برای حل این مشکل می‌باشد. استفاده از پربیوتیک‌ها در جیره غذایی باعث افزایش سلامتی میزبان می‌شود. استفاده از این استراتژی، راه‌حل خوبی برای بهبود کیفیت جیره می‌باشد. پربیوتیک‌ها پلی‌ساکاریدهای غیرقابل‌هضمی هستند که باعث تحریک رشد و بهبود فلور میکروبی روده می‌گردند (٤١). از جمله پربیوتیک‌های طبیعی می‌توان به قارچ صدفی اشاره کرد که به‌عنوان جایگزین خوبی برای مواد دارویی شناخته شده است (٤٢). خواص دارویی قارچ‌ها توسط بسیاری از پژوهش‌گران مورد تأیید قرار گرفته (٤٢، ٤٣، ٤٤ و ٤٥). بتاگلوکان، کتین و هتروپلی‌ساکاریدهای موجود در قارچ‌ها که ١٠ تا ٥٠ درصد از ماده خشک را تشکیل می‌دهند، باعث ایجاد خواص پربیوتیکی آن‌ها می‌گردد. (١٩ و ٤٦).

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که افزودن پودر قارچ صدفی (٠/٥، ١ و ٢ گرم به‌ازای هر کیلوگرم غذای خشک) تأثیر معنی‌داری بر عملکرد رشد گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه شاهد داشت. از آن‌جایی‌که قارچ صدفی به‌عنوان یک پربیوتیک طبیعی شناخته شده است؛ به‌دلیل داشتن پلی‌ساکاریدهای غیرقابل‌هضم، توانست مواد مغذی لازم را برای جمعیت میکروبی روده فراهم آورد و میکرو فلور روده را به سمت باکتری‌های مفید مانند باکتری‌های اسیدلاکتیک سوق دهد که احتمال می‌رود این باکتری‌ها توانستند با اسیدی کردن محیط روده باعث کاهش رشد باکتری‌های مضر در روده شده باشند. هم‌چنین، پژوهش‌ها ثابت کرد با ترشح آنزیم‌های خارج‌سلولی توسط باکتری‌های مفید، فرآیند هضم و جذب مواد غذایی بهبود می‌باید (٤٧، ٤٨ و ٤٩). بنابراین، ممکن است بهبود فرآیند رشد در پژوهش حاضر به دلیل وجود همین آنزیم‌های گوارشی باشد، با این‌حال، چون در پژوهش حاضر، سنجش آنزیم‌های گوارشی صورت نگرفت، اظهارنظر دقیق در ارتباط با آن به پژوهش‌های بیش‌تری نیاز دارد. از سویی دیگر، تاکنون مشخص نشده که کدام یک از مواد موجود در قارچ‌ها بیش‌ترین تأثیر را روی رشد آبزیان می‌گذارند، ولی احتمال می‌رود که این تأثیر مربوط به بیش‌ترین پلی‌ساکارید موجود در قارچ یعنی گلوکان‌ها باشد (٢٨). پژوهش‌ها تأثیرات مثبت گلوکان‌ها را بر رشد و ایمنی آبزیان ثابت کرده‌اند (٥٠، ٥١، ٥٢ و ٥٣). هر چند که نمی‌توان تأثیر دیگر پلی‌ساکاریدها و مواد دیگر قارچ را نادیده گرفت و این احتمال وجود دارد که هنگامی که این مواد در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند، می‌توانند بر یکدیگر اثر گذاشته و باعث افزایش یا کاهش تأثیر هر یک از ترکیبات در رشد شوند. به‌عبارت دیگر، الیگوساکاریدهای غیرقابل‌هضم به‌دلیل ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاص و فقدان آنزیم‌های هیدرولیزکننده اتصالات نوع β بین واحدهای منوساکاریدی توسط بسیاری از موجودات از جمله ماهی‌ها قابل‌جذب نمی‌باشند بنابراین، در برابر فرآیند گوارش مقاومت کرده و تنها توسط برخی باکتری‌های بی‌هوازی موجود در دستگاه گوارش قابلیت تجزیه شدن را دارند. این باکتری‌ها

بیش‌تر شامل: بایفیدوباکترها، لاکتوباسیلوس‌ها و بسیاری از باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌باشند که قادرند از طریق تخمیر الیگوساکاریدها تغذیه نموده و در نهایت اثرات مفیدی در میزبان ایجاد نمایند. بنابراین، تغذیه ماهیان با این نوع کربوهیدرات‌ها می‌تواند سبب افزایش جمعیت باکتری‌های مفید روده، کاهش pH روده و جلوگیری از فعالیت باکتری‌های بیماری‌زا و افزایش جذب مواد معدنی گردد (٥٤ و ٥٥). نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج پژوهش انجام‌شده توسط Harikrishnan و همکاران (۲۰۱۱) مبنی بر افزایش رشد پس از افزودن قارچ *Phellinus linteus* در ماهی هامور (*Epinephelus bruneus*) هم‌خوانی دارد (٥٦). هم‌چنین Din و همکاران (۲۰۱۲) در پژوهشی نشان دادند که افزودن قارچ به جیره غذایی باعث افزایش رشد تیلاپیای قرمز گردید (۲۲). به‌علاوه، اضافه کردن بتاگلوکان به جیره کپور معمولی سبب افزایش معنی‌دار رشد نسبت به گروه شاهد شد (٥٧). هم‌چنین، استفاده از قارچ *Pleurotus eryngii* در جیره گربه‌ماهی *Pangasius bocourti* باعث افزایش نرخ رشد ویژه و کاهش ضریب تبدیل غذایی شد. (٥٨). با این‌حال، در تضاد با نتایج مطالعه حاضر، Muin و همکاران (۲۰۱۵)، انجام شد بیان گردید که جایگزین کردن پودر قارچ صدفی *Pleurotus sajor caju* در جیره ماهی تیلاپیای نیل هیچ‌گونه تأثیری روی رشد نداشت؛ که البته این اختلاف ممکن است به‌خاطر اختلاف در گونه قارچ استفاده شده مربوط گردد (٥٩).

بررسی شاخص‌های ایمنی سرم و موکوس شاخص مناسبی برای بررسی وضعیت سلامتی ماهیان می‌باشد. بررسی این شاخص‌ها هم‌چنین می‌تواند برای بررسی اثرات احتمالی برخی از مواد ضدمغذی دارای اهمیت باشند. در این میان، لیزوزیم اهمیت زیادی در ایمنی ذاتی موکوس پوست و سرم خون دارد. فعالیت این آنزیم تحت‌تأثیر شرایط مختلف محیطی مانند: تغییرات دمایی، نوسانات پی‌اچ و شوری، جنس و گونه ماهی تغییر می‌کند. در واقع، لیزوزیم یک آنزیم ضد باکتریایی قوی در سیستم ایمنی غیراختصاصی می‌باشد که در موکوس پوست و سرم خون وجود دارد. اگرچه این آنزیم بر باکتری‌های گرم مثبت مؤثر می‌باشد اما باکتری‌های گرم منفی نیز می‌توانند توسط این آنزیم لیز شوند (٦٠). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که استفاده از پودر قارچ صدفی در سطح ۱ و ۲ گرم به‌ازای کیلوگرم جیره بچه‌ماهیان تیلاپیای نیل، به‌طور معناداری سبب افزایش فعالیت لیزوزیم موکوس پوست نسبت به گروه شاهد شد. هم‌چنین علی‌رغم وجود اختلاف معنادار در فعالیت لیزوزیم سرم خون تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی ۱ و ۲ گرم پودر قارچ صدفی، تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ گرم پودر قارچ صدفی به‌ازای کیلوگرم جیره به‌طور معناداری دارای فعالیت لیزوزیم بیش‌تری در مقایسه با گروه شاهد بود. پژوهش‌های بسیاری وجود آنزیم لیزوزیم را در گونه‌های متفاوت ماهی‌ها و به دنبال آن اثرات مفید آن در افزایش پاسخ سیستم ایمنی ذاتی ماهی ثابت کرده است (٦١، ٦٢ و ٦٣). در همین راستا، Harikrishnan و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که استفاده از عصاره قارچ *Phellinus linteus* به‌عنوان محرک ایمنی باعث افزایش فعالیت آنزیم لیزوزیم موکوس در ماهی هامور شد (٥٦). هم‌چنین، در مطالعات دیگر که توسط Harikrishnan و همکاران (a,b ۲۰۱۲) انجام گرفت ثابت شد که استفاده از قارچ *Inonotus obliquus* به‌عنوان یک محرک ایمنی سبب افزایش فعالیت آنزیم لیزوزیم سرم در ماهی هامور و کفشک ماهی زیتونی شد (٦٤ و ٦٥). در تطابق با نتایج حاصل از مطالعه حاضر می‌توان به پژوهش‌های انجام‌شده توسط Chang و همکاران (۲۰۱۳) در ارتباط با استفاده از بتاگلوکان

قارچ در افزایش فعالیت آنزیم لیزوزیم و فعالیت کمپلمان در ماهی هامور (٤٤)، Sirimanapong و همکاران (٢٠١٥) در ارتباط با استفاده از بتاگلوکان استخراج شده از دیواره سلولی مخمر در افزایش فعالیت لیزوزیم سرم ماهی پنگوسی (٦٦) و Katya و همکاران (٢٠١٤a) در افزایش سطوح لیزوزیم سرم و موکوس گربه‌ماهی‌های تغذیه شده با پودر قارچ (٦٧) اشاره کرد.

پژوهش‌گران گزارش کردند که ایمنوگلوبولین‌ها جزء آنتی‌بادی‌های طبیعی می‌باشند. این دسته از آنتی‌بادی‌ها به صورت کاملاً تنظیم شده در غیاب محرک آنتی‌ژنیک خارجی تولید می‌گردند و میزبان را در برابر عوامل بیماری‌زا محافظت می‌کنند. ایمنوگلوبولین‌ها به عنوان یکی از بخش‌های حیاتی سیستم ایمنی ذاتی ماهی می‌باشند. در واقع، ایمنوگلوبولین‌ها در ماهیان از سلول‌های B ترشح می‌شوند. تغییر در سطوح ایمنوگلوبولین سرم خون و موکوس پوست در مطالعات بسیاری از پژوهش‌گران در نتیجه استفاده از محرک‌های ایمنی گزارش شده است (١٨، ٦٨ و ٦٩). در پژوهش حاضر، افزودن پودر قارچ صدفی در جیره ماهی تیلاپیای نیل باعث افزایش ایمنوگلوبولین موکوس و سرم گردید. اگرچه افزایش ایمنوگلوبولین موکوس تنها در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ٢ گرم پودر قارچ صدفی در کیلوگرم جیره با گروه شاهد دارای اختلاف معنادار بود. افزایش سطح ایمنوگلوبولین سرم و موکوس ماهیان تغذیه شده با جیره‌های مکمل‌سازی‌شده با قارچ توسط بسیاری از پژوهش‌گران به اثبات رسیده است (٧٠، ٧١، ٧٢ و ٧٣) که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر همخوانی دارند. در پژوهش حاضر، افزایش ایمنی ذاتی و بهبود پاسخ‌های ایمنی ذاتی ممکن است متأثر از بتاگلوکان و دیگر پلی‌ساکاریدهای موجود در قارچ صدفی باشد. هم‌چنین، از آن‌جایی که قارچ صدفی یک پربیوتیک طبیعی است، می‌تواند فلور میکروبی روده را به سمت باکتری‌های مفید همانند: لاکتیک اسید سوق دهد (٢٨). علاوه براین، بتاگلوکان موجود در قارچ می‌تواند باعث تحریک ماکروفاژها شود. پژوهش‌ها نشان داده است که دیگر ترکیبات موجود در قارچ مانند لنتینان (Lentinan) و شیزوفیلان (Schizophyllan) باعث تحریک تکثیر لنفوسیت‌های T و پارامترهای ایمنی همورال می‌شوند (١٩ و ٧٤).

اس دی اس پیج به‌طور گسترده در مطالعات زیادی برای شناسایی تفاوت الگوی پروتئینی بسیاری از گونه‌ها استفاده شده است (٧٥، ٧٦ و ٧٧) در مطالعه حاضر با استفاده از تکنیک الکتروفورز الگوی پروتئینی موکوس پوست بچه‌ماهی تیلاپیای نیل از طریق ژل دو دوسیل سولفات پلی‌اکریل آمید مورد مطالعه قرار گرفت. در این بررسی جداسازی و شناسایی وزن مولکول پپتیدهای مختلف موجود در موکوس پوست بچه‌ماهی تیلاپیای نیل با کمک اس دی اس پیج روی ژل ١٨ درصد نشان داده شد. اس دی اس پیج باندهای پروتئینی (با وزن مولکولی حدود ١١ تا ٢٥ کیلو دالتون) موکوس بچه‌ماهی تیلاپیای نیل را نشان داد. این باندها می‌توانند مربوط به پروتیئن‌های موکوس پوست باشند. افزایش تراکم باند لیزوزیم می‌تواند مربوط به فراوانی مقدار لیزوزیم باشد (٧٨). تفاوت در الگوی پروتئینی یک موجود زنده را می‌توان به شرایط داخلی و خارجی، انواع بافت‌ها و مراحل مختلف تکامل نسبت داد (٧٩). باندهای حدود ٢٥ کیلودالتون می‌توانند مربوط به پروتئین‌های پروتئازوم سوبیت آلفا و پروتئازها باشد (٧٨ و ٨٠). باندهای بالاتر یعنی محدوده ٤٥-٦٧ کیلودالتون می‌توانند مربوط به آلبومین باشند؛ اگرچه

در پژوهش حاضر، در تصویر الگوی پروتئینی موکوس بچه‌ماهیان تیلاپیای نیل مشاهده نشد (۸۱). احتمالاً افزایش تراکم باندها در تیمارهای تغذیه شده با پودر قارچ صدفی در پژوهش حاضر، نشان‌دهنده افزایش بیان پروتئین‌های ایمنی موکوس پوست مانند لیزوزیم است. از آن‌جایی‌که در گروه‌های تیمار میزان پروتئین‌های ایمنی موکوس در مقایسه با گروه شاهد بیش‌تر بود، شاید بتوان افزایش تراکم باندها را در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه شاهد توجیه کرد. بنابراین، این امر نشان‌دهنده آن است که پودر قارچ صدفی باعث افزایش پروتئین‌ها در موکوس پوست می‌شود و توانسته به عنوان محرک ایمنی عمل کند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که مکمل‌سازی جیره بچه‌ماهی تیلاپیای نیل با پودر قارچ صدفی باعث بهبود عملکرد رشد و افزایش ایمنی سرم و موکوس شد. با این نتایج به‌دست آمده ممکن است بتوان نتیجه گرفت که پودر قارچ صدفی تأثیر مثبتی بر سیستم ایمنی و شاخص‌های رشد بچه‌ماهیان تیلاپیای نیل دارد؛ چرا که، قارچ صدفی به‌عنوان یک منبع پربیوتیکی مهم مورد تأیید شناخته شده است. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، افزودن پودر قارچ صدفی به میزان ۲ گرم در کیلوگرم جیره برای بهبود شاخص‌های رشد و ایمنی موکوسی و سرم بچه‌ماهیان تیلاپیای نیل توصیه می‌گردد.

منابع

1. Tangestani, R., Doughikollaee, E., Ebrahimi, E., & Zare, P. (2011). Effects of garlic essential oil as an immunostimulant on hematological indices of juvenile beluga (*Huso huso*). *Journal of Veterinary Research*. 66 (209-216), 279.
2. Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*. 8, 1137-1144.
3. Pohlenz, C., & Gatlin III, D. M. (2014). Interrelationships between fish nutrition and health. *Aquaculture*, 431, 111-117.
4. Kuebutornye, F. K., Abarike, E. D., Lu, Y., Hlordzi, V., Sakyi, M. E., Afriyie, G., Wang, Z., Li, Y., & Xie, C. X. (2020). Mechanisms and the role of probiotic Bacillus in mitigating fish pathogens in aquaculture. *Fish physiology and biochemistry*, 46 (3), 819-841.
5. Cámara-Ruiz, M., Balebona, M. C., Moriñigo, M. Á., & Esteban, M. Á. (2020). Probiotic *Shewanella putrefaciens* (SpPdp11) as a fish health modulator: a review. *Microorganisms*, 8 (12), 1990.
6. Mohammadian, T., Ghanei-Motlagh, R., Molayemraftar, T., Mesbah, M., Zarea, M., Mohtashamipour, H., & Nejad, A. J. (2021). Modulation of growth performance, gut microflora, non-specific immunity and gene expression of proinflammatory cytokines in shabout (*Tor grypus*) upon dietary prebiotic supplementation. Fish & Shellfish Immunology, 112, 38-45.
7. Ghafarifarsani, H., Rashidian, G., Bagheri, T., Hoseinifar, S. H., & Van Doan, H. (2021). Study on growth enhancement and the protective effects of dietary prebiotic inulin on immunity responses of rainbow trout fry infected with. *Annals of Animal Science*, 21 (2), 543-559.
8. Gewaily, M. S., Abdo, S. E., Moustafa, E. M., AbdEl-Kader, M. F., Abd El-Razek, I. M., El-Sharnouby, M., Alkafafy, M., Raza, S. H. A., El Basuini, M. F., Van Doan, H., & Dawood, M. A. (2021). Dietary synbiotics can help relieve the impacts of deltamethrin toxicity of Nile tilapia reared at low temperatures. *Animals*, 11 (6), 1790.
9. Yilmaz, S., Yilmaz, E., Dawood, M. A., Ringø, E., Ahmadifar, E., & Abdel-Latif, H. M. (2022). Probiotics, prebiotics, and synbiotics used to control vibriosis in fish: A review. *Aquaculture*, 547, 737514.

10.Rey, M. S., García-Soto, B., Fuertes-Gamundi, J. R., Aubourg, S., & Barros-Velázquez, J. (2012). Effect of a natural organic acid-icing system on the microbiological quality of commercially relevant chilled fish species. *LWT-Food Science and Technology*, 46 (1), 217-223.
11.Xia, Y. T., Hu, W. H., Wu, Q. Y., Dong, T. T. X., Duan, R., Xiao, J., Li, S. P., Qin, Q. W., Wang, W. X., & Tsim, K. W. K. (2020). The herbal extract deriving from aerial parts of *Scutellaria baicalensis* shows anti-inflammation and anti-hypoxia responses in cultured fin cells from rabbit fish. *Fish & shellfish immunology*, 106, 71-78.
12.Dada, A. (2019). Effects of herbal growth promoter feed additive in fish meal on the performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* (L.)). *Egypt. Acad. J. Biolog. Sci.* 4 (1), 111-117.
13.Choubert, G., Mendes-Pinto, M. M., & Morais, R. (2006). Pigmenting efficacy of astaxanthin fed to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: Effect of dietary astaxanthin and lipid sources. *Aquaculture*, 257 (1-4), 429-436.
14.Sepehrfar, D., Hoseinifar, S.H., & Jafarnodeh, A. (2018). The effects of singular or combined administration of *Pediococcus acidlactii* and Rafinose as prebiotic on mucosal immune parameters and intestinal histomorphology of Common Carp (*Carassius auratus*). *Journal of Physiology and Animal Development*. 12 (1), 25-34. [In Persian]
15.Qobadi, S., Rezaghi Mansour, M., Akrami, R., Amani Danji, K., & Ismaili Mola, A. (2018). The effect of different levels of prebiotic mannan oligosaccharide on growth indicators, survival, carcass composition and intestinal lactobacillus density in juvenile beluga. *Marine Science and Technology*, 10 (4), 67-77. [In Persian]
16.Pouramini, M., & Hosseinifar, S.H. (2016). Application of probiotics and prebiotics in aquaculture. Moj Sabz Publications. P. 29-31, 120p. [In Persian]
17.Iri, A., Hedayati, S. A., Pakenjad, H., Bagheri, T., & Khaleghi, R. (2018). The effect of different levels of prebiotic congeners of oyster mushroom on the mucus immunity parameters of Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) exposed to chlorpyrifos poison in laboratory conditions. *Aquatic Nutrition*, 5 (2), 61-70.
18.Chang, S. T. (1999). Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: non-green revolution. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 1e7.
19.Wasser, S.P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied microbiology and biotechnology*, 60 (3), 258-274.
20.Jayakumar, T., Thomas, P. A., & Geraldine, P. (2009). In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 228e234.
21.Kamilya, D., Ghosh, D., Bandyopadhyay, S., Mal, B. C., & Maiti, T. K. (2006). In vitro effects of bovine lactoferrin, mushroom glucan and *Abrus agglutinin* on Indian major carp, catla (*Catla catla*) head kidney leukocytes. *Aquaculture*, 253, 130-139.
22.Din, A. R. J. M., Razak, S. A., & Sabaratnam, V. (2012). Effect of mushroom supplementation as a prebiotic compound in super worm based diet on growth performance of red tilapia fingerlings. *Sains Malaysiana*. 41, 1197-1203.
23.Zakariaee, H., Sodagar, M., Hosseini, S., Paknejad, H., & Baroah, K. (2019). The effect of using a synbiotic produced from button mushroom extract in combination with two species of lactic acid bacteria on the activity of digestive enzymes, carcass composition, growth and intestinal microbial flora in zebra fish (*Danio rerio*). Marine science and technology. In press, **10.22113/ jmst.2020.233183.237.** [In Persian]
24.Sodagar, M., Khalsa, M., Mazandarani, M., Hosseini, A., & Zakariaee, H. (2016). The effect of *Spirulina sp* on the growth, survival and pigmentation of

Pseudotropheus demasoni. Journal of Fisheries, *Journal of Natural Resources of Iran*, 69 (1), 21-27. [In Persian]

25. Nyekanyeka, T. (2011). Analysis of profitability and efficiency of improved and local smallholder dairy production: A case of Lilongwe milk shed area. M.Sc. Thesis. University of Malawi, Bunda College.
26. Liping, L., Zongfeng, Z., Wenbo, Z., Murray, F., & Little, D. (2012). Tilapia aquaculture in China: Low market prices, other issues challenge as sector seeks sustainability. *Global Seafood Alliance*. 2, 1-7.
27. Khanjani, M.H., & Alizadeh, M. (2021). Biological and economic performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in two conventional and limited water exchange systems. *J. Aqu. Eco*. 11 (3), 12-21. [In Persian]
28. Zakariaee, H., Sudagar, M., Hosseini, S. S., Paknejad, H., & Baruah, K. (2021). In vitro Selection of Synbiotics and in vivo Investigation of Growth Indices, Reproduction Performance, Survival, and Ovarian Cyp19α Gene Expression in Zebrafish *Danio rerio*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 758758.
29. Amiri, O., Miandare, H. K., Hoseinifar, S. H., Shabni, A., & Safari, R. (2018). Skin mucus protein profile, immune parameters, immune-related gene expression, and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed white button mushroom (*Agaricus bisporus*) powder. *International journal of medicinal mushrooms*, 20 (4).
30. Jafarnoude, A. (2015). Investigating the synergistic properties of some organic acids with *Lactobacillus casei* bacteria in rearing rainbow trout fingerlings (*Oncorhynchus mykiss*). Doctoral dissertation, Urmia University, 100p. [In Persian]
31. AOAC (Association of official Analytical chemists), (1990). Official Methods of Analysis AOAC. Washington, DC. 1263p.
32. Ross, N. W., Firth, K. J., Wang, A., Burka, J. F., & Johnson, S. C. (2000). Changes in hydrolytic enzyme activities of naive Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. *Diseases of aquatic organisms*. 41, 43.
33. Subramanian, S., MacKinnon, S. L., & Ross, N. W. (2007a). A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: *Biochemistry and Molecular Biology*. 148, 256-263.
34. Mehri, A., Jafar, A., & Abarghuei, S. (2022). Study on liver lesions and mucosal indices of common carp (*Cyprinus carpio*) in exposure to different concentrations of nanoplastic. *Utilization and Cultivation of Aquatics*, 10 (4), 15-26. [In Persian]
35. Cho, J. H., Park, I. Y., Kim, M. S., & Kim, S. C. (2002). Matrix metalloproteinase 2 is involved in the regulation of the antimicrobial peptide parasin I production in catfish skin mucosa. *FEBS letters*, 531 (3), 459-463.
36. Subramanian, S., Mackinnon, S. L., & Ross, N. W. (2007b). A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. 148, 256-263.
37. Siwicki, A., & Anderson, D. (1993). Nonspecific defence mechanisms assay in fish II; Potential killing activity of neutrophils and manocytes, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (Ig) level in serum.
38. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem*. 72, 248-254.
39. Laemmli, U.K. (1970). SDS-page Laemmli method. *Nature*, 227, 680-685.
40. Hoseinifar, S. H., Zou, H. K., Paknejad, H., Hajimoradloo, A., & Van Doan, H. (2019). Effects of dietary white-button mushroom powder on mucosal immunity, antioxidant defence, and growth of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 501, 448-454.
41. Ringø, E., Dimitroglou, A., & Hossein, S. (2014). 14 Prebiotics in Finfish: An

Update. Aquaculture nutrition: gut health, *probiotics and prebiotics*. 360.

42. Mohan, K., Karthick Rajan, D., Muralisankar, T., Ramu Ganesan, A., Marimuthu, K., & Sathishkumar, P. (2022). The potential role of medicinal mushrooms as prebiotics in aquaculture: A review. Reviews in Aquaculture.
43. Van Doan, H., Hoseinifar, S. H., Esteban, M. Á., Dadar, M., & Thu, T. T. N. (2019). Mushrooms, seaweed, and their derivatives as functional feed additives for aquaculture: an updated view. *Studies in natural products chemistry*, 62, 41-90.
44. Chang, C. S., Huang, S. L., Chen, S., & Chen, S. N. (2013). Innate immune responses and efficacy of using mushroom beta-glucan mixture (MBG) on orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, quaculture. *Fish & shellfish immunology*. 35, 115-125.
45. Chong, V., Al-Azad, S., & Shapawi, R. (2016). Comparison of two edible mushroom extract as aquaculture feed additive to enhance immune response of Asian Seabass. *Trans. Sci. Technol.* 3, 427-432.
46. Mizuno, T., Saito, H., Nishitoba, T., & KaWagishi, H. (1995). Antitumor-active substances from mushrooms. *Food Reviews International*. 11, 23-61.
47. Assan, D., Kuebutornye, F.K.A., Hlordzi, V., Chen, H., Mraz, J., Mustapha, U.F., & Abarike, E.D. (2022). Effects of probiotics on digestive enzymes of fish (finfish and shellfish); status and prospects: a mini review. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: *Biochemistry and Molecular Biology*, 257, 110653.
48. Mirghaed, A. T., Yarahmadi, P., Hosseinifar, S. H., Tahmasebi, D., Gheisvandi, N., & Ghaedi, A. (2018). The effects singular or combined administration of fermentable fiber and probiotic on mucosal immune parameters, digestive enzyme activity, gut microbiota and growth performance of Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) fingerlings. *Fish & shellfish immunology*, 77, 194-199.
49. Allameh, S. K., Noaman, V., & Nahavandi, R. (2017). Effects of probiotic bacteria on fish performance. *Advanced Techniques in Clinical Microbiology*, 1(2), 11.
50. Rodrigues, M. V., Zanuzzo, F. S., Koch, J. F. A., de Oliveira, C. A. F., Sima, P., & Vetvicka, V. (2020). Development of fish immunity and the role of β-glucan in immune responses. *Molecules*, 25 (22), 5378.
51. Do Huu, H., Sang, H. M., & Thuy, N. T. T. (2016). Dietary β-glucan improved growth performance, *Vibrio counts*, haematological parameters and stress resistance of pompano fish, *Trachinotus ovatus* Linnaeus, 1758. *Fish & shellfish immunology*, 54, 402-410.
52. Dawood, M. A., Metwally, A. E. S., El-Sharawy, M. E., Atta, A. M., Elbialy, Z. I., Abdel-Latif, H. M., & Paray, B. A. (2020). The role of β-glucan in the growth, intestinal morphometry, and immune-related gene and heat shock protein expressions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under different stocking densities. *Aquaculture*, 523, 735205.
53. Aramli, M.S., Kamangar, B., & Nazari, R.M. (2015). Effects of dietary β-glucan on the growth and innate immune response of juvenile Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. *Fish & shellfish immunology*, 47 (1), 606-610.
54. Ringø, E., Bendiksen, H. R., Gausen, S. J., Sundsfjord, A., & Olsen, R. E. (1998). The effect of dietary fatty acids on lactic acid bacteria associated with the epithelial mucosa and from faecalia of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Journal of Applied Microbiology*, 85(5), 855-864.
55. Vázquez, G.A., & Leitherer, C. (2005). Optimization of Starburst99 for intermediate-age and old stellar populations. *The Astrophysical Journal*, 621 (2), 695.
56. Harikrishnan, R., Balasundaram, C., & Heo, M.S. (2011). Fish & Shell fish Immunology Diet enriched with mushroom *Phellinus linteus* extract enhances the growth, innate immune

response, and disease resistance of kelp grouper, *Epinephelus bruneus* against vibriosis. *Fish and Shellfish Immunology*. 30, 128-134.

57. Kühlwein, H., Merrifield, D., Rawling, M., Foey, A., & Davies, S. (2014). Effects of dietary β-(1, 3)(1, 6)-D-glucan supplementation on growth performance, intestinal morphology and haemato-immunological profile of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of animal physiology and animal nutrition*. 98, 279-289.
58. Van Loo, J., & Gibson, G. (2006). Inulin-type fructans as prebiotics. Prebiotics: *Development & Application*. 57-100.
59. Muin, H., Taufek, N. M., Abiodun, R. A., Yusuf, H. M., & Razak, S. A. (2015). Effect of partial and complete replacement of fishmeal with mushroom stalk meal and soy bean meal on growth performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fingerlings. *Sains Malaysiana*, 44 (4), 511-516.
60. Saurabh, S., & Sahoo, P. K. (2008). Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture research*, 39 (3), 223-239.
61. Song, Q., Xiao, Y., Xiao, Z., Liu, T., Li, J., Li, P., & Han, F. (2021). Lysozymes in Fish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69 (50), 15039-15051.
62. Hikima, J. I., Hirono, I., & Aoki, T. (2003). The lysozyme gene in fish. In Aquatic genomics (pp. 301-309). Springer, Tokyo.
63. Bower, C. K., Avena-Bustillos, R. J., Olsen, C. W., McHugh, T. H., & Bechtel, P. J. (2006). Characterization of fish-skin gelatin gels and films containing the antimicrobial enzyme lysozyme. *Journal of food science*, 71 (5), M141-M145.
64. Harikrishnan, R., Balasundaram, C., & Heo, M.S. (2012a). Effect of Inonotus obliquus enriched diet on hematology, immune response and disease protection in kelp grouper, *Epinephelus bruneus* against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*. 344-349, 48-53.
65. Harikrishnan, R., Balasundaram, C., & Heo, M.S. (2012b). Inonotus obliquus containing diet enhances the innate immune mechanism and disease resistance in olive flounder *Paralichythys olivaceus* against *Uronema marinum*. *Fish & shellfish immunology*, 32(6), 1148-1154.
66. Sirimanapong, W., Adams, A., Ooi, E. L., Green, D. M., Nguyen, D. K., Browdy, C. L., Collet, B., & Thompson, K. D. (2015). The effects of feeding immunostimulant β-glucan on the immune response of *Pangasianodon hypophthalmus*. *Fish & shellfish immunology*. 45, 357-366.
67. Katya, K., Yun, Y. H., Yun, H., Lee, J. Y., & Bai, S. C. (2014a). Effects of dietary fermented by-product of mushroom, *Pleurotus ostreatus*, as an additive on growth, serological characteristics and nonspecific immune responses in juvenile Amur catfish, *Silurus asotus*: 1-9.
68. Baba, E., Uluköy, G., & Öntaş, C. (2015). Effects of feed supplemented with Lentinula edodes mushroom extract on the immune response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and disease resistance against *Lactococcus garvieae*. *Aquaculture*, 448, 476-482.
69. Manayi, A., Vazirian, M., Zade, F. H., & Tehranifard, A. (2016). Immunomodulation effect of aqueous extract of the artist's conk medicinal mushroom, *Ganoderma applanatum* (Agaricomycetes), on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 18 (10).
70. Adams, S., Che, D., Hailong, J., Zhao, B., Rui, H., Danquah, K., & Qin, G., (2019). Effects of pulverized oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on diarrhea incidence, growth performance, immunity, and microbial composition in piglets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99 (7), 3616-3627.
71. Uluköy, G., & Öntaş, C. (2015). Effects of feed supplemented with Lentinula edodes mushroom extract on the immune response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* and disease

resistance *against Lactococcus garvieae. Aquaculture*, 448.

72. Hoseinifar, S. H., Shakouri, M., Van Doan, H., Shafiei, S., Yousefi, M., Raeisi, M., Yousefi, S., Harikrishnan, R., & Reverter, M. (2020). Dietary supplementation of lemon verbena (*Aloysia citrodora*) improved immunity, immune-related genes expression and antioxidant enzymes in rainbow trout (*Oncorrhyncus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 99, 379-385.
73. Safari, O., & Sarkheil, M. (2018). Dietary administration of eryngii mushroom (*Pleurotus eryngii*) powder on haemato-immunological responses, bactericidal activity of skin mucus and growth performance of koi carp fingerlings (*Cyprinus carpio koi). Fish & shellfish immunology*, 80, 505-513.
74. El Enshasy, H.A., & Hatti-Kaul, R. (2013). Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. *Trends in biotechnology*, 31 (12), 668-677.
75. Abu-Almaaty, A. H., Bahgat, I. M., & Al-Tahr, Z. M. (2020a). Using SDS-PAGE and ISSR as biochemical markers for assessment the genetic similarity and protein analysis of some Cyprinid fish species. *Genetika*, 52 (1), 161-175.
76. Abu Almaaty, A., E Abd-Alaty, H., & A Abbas, O. (2020b). Molecular Discrimination among Three Fish Species of Family Sparidae Using ISSR and SDS-PAGE Techniques. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 24 (7-Special issue), 619-628.
77. Al-Ghanim, K. A., Mahboob, S., Vijayaraghavan, P., Al-Misned, F. A., Kim, Y. O., & Kim, H. J. (2020). Sub-lethal effect of synthetic pyrethroid pesticide on metabolic enzymes and protein profile of non-target Zebra fish, *Danio rerio*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27 (1), 441-447.
78. Fagan, M. S., O'Byrne-Ring, N., Ryan, R., Cotter, D., Whelan, K., & Mac Evilly, U. (2003). A biochemical study of mucus lysozyme, proteins and plasma thyroxine of Atlantic salmon (*Salmo salar*) during smoltification. *Aquaculture*, 222 (1-4), 287-300.
79. Shepherd, R., Robertson, A., & Ofman, D. (2000). Dairy glycoconjugate emulsifiers: casein–maltodextrins. *Food Hydrocolloids*, 14 (4), 281-286.
80. Guardiola, F. A., Dioguardi, M., Parisi, M. G., Trapani, M. R., Meseguer, J., Cuesta, A., Cammarata, M., & Esteban, M. A. (2015). Evaluation of waterborne exposure to heavy metals in innate immune defences present on skin mucus of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish & shellfish immunology*, 45 (1), 112-123.
81. Abraham, S. N., Sharon, N., & Ofek, I. (1999). Adhesion of bacteria to mucosal surfaces. *Mucosal immunology*, 3, 35-48.