Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics

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

Effects of sodium butyrate dietary supplement on some haematological parameters, immunity and intestinal microbiota and response to stocking density stress of young beluga (*Huso huso*)

Hossein Panahi Sahebi[*1], Hossein Oraji[2], Farid Firouzbakhsh[3], Maryam Ghiasi[4]

1. Corresponding Author, Ph.D. Student of Aquatic Reproduction and Breeding, Faculty of Animals Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resource University, Sari, Iran. E-mail: hpanahie@yahoo.com
2. Professor, Dept. of Fisheries, Faculty of Animals Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resource University, Sari, Iran. E-mail: hoseinoraji@yahoo.com
3. Professor, Dept. of Fisheries, Faculty of Animals Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resource University, Sari, Iran. E-mail: f.firouzbakhsh@yahoo.com
4. Research Assistant Prof., Caspian Sea Ecology Research Center, Sari, Iran. E-mail: ghiasimaryam4@gmail.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 06.01.2022
Revised: 05.30.2022
Accepted: 06.15.2022

Keywords:
Beluga,
Density stress,
Haematological parameters,
Immune response,
Sodium butyrate

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the physiological response of young beluga to different levels of sodium butyrate in the diet. For this purpose, 360 young beluga (average weight of 15±0.56 g) with 6 experimental diets containing 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5% sodium butyrate were fed for 8 weeks. The number of red blood cells (RBC) and MCV, MCH and MCHC indices were significantly higher in the 0.3% treatment than in the other treatments ($P<0.05$). The number of white blood cells (WBC) and the amount of hemoglobin and hematocrit in fish fed with 0.3% sodium butyrate in the feed were higher than other treatments, although there was no significant difference with the treatment of 0.4% and the control group ($P>0.05$). Lysozyme activity and IgM level in 0.3% treatment was significantly higher than other treatments ($P<0.05$). Cortisol and glucose levels in fish fed diets containing 0.3% sodium butyrate increased slightly less than other groups after acute density stress and a significant difference was observed between treatments ($P<0.05$). Overall, this study indicates that including 0.3% sodium butyrate in the diet of young beluga can improve fish health, innate immune response and resistance to density stress.

Cite this article: Panahi Sahebi, Hossein, Oraji, Hossein, Firouzbakhsh, Farid, Ghiasi, Maryam. 2023. Effects of sodium butyrate dietary supplement on some haematological parameters, immunity and intestinal microbiota and response to stocking density stress of young beluga (*Huso huso*). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 11 (4), 95-107.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2022.20268.1670
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا آنلاین: ۲۳٤٥-٤۲۷X
شاپا چاپی: ۲۳٤٥-٤۲۸۸

اثر مکمل غذایی بوتیرات سدیم بر برخی شاخص‌های خونی، ایمنی و پاسخ به تنش تراکم فیل‌ماهی جوان (*Huso huso*)

حسین پناهی صاحبی*[۱]، حسین اورجی[۲]، فرید فیروزبخش[۳]، مریم قیاسی[٤]

۱. نویسنده مسئول، دانشجوی دکتری تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: hpanahie@yahoo.com

۲. استاد گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: hoseinoraji@yahoo.com

۳. استاد گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: f.firouzbakhsh@yahoo.com

٤. استادیار پژوهشی، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران. رایانامه: ghiasimaryam4@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۱/۰۳/۱۱
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۱/۰۳/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۰۳/۲٥

واژه‌های کلیدی:
بوتیرات سدیم،
پاسخ ایمنی،
تنش تراکم،
شاخص‌های خونی،
فیل‌ماهی

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی پاسخ فیزیولوژیکی فیل‌ماهیان جوان به سطوح مختلف بوتیرات سدیم در جیره غذایی انجام پذیرفت. بدین‌منظور تعداد ۳٦۰ قطعه فیل‌ماهی جوان با میانگین وزنی ۰/٥٦ ± ۱٥ گرم با ٦ جیره آزمایشی حاوی ۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/٤ و ۰/٥ درصد بوتیرات سدیم به‌مدت ۸ هفته تغذیه شدند. فیل‌ماهیان مورد مطالعه به‌طور تصادفی به ۱۸ حوضچه آزمایشی به حجم ۳/۲ مترمکعب (۳۲۰۰ لیتر) و حجم آبگیری ۱ مترمکعب (۱۰۰۰ لیتر) انتقال داده شدند (هر حوضچه ۲۰ قطعه ماهی) و روزانه ٦ بار با جیره‌های آزمایشی در حد سیری تغذیه شدند. تعداد گلبول‌های قرمز خون (RBC) و شاخص‌های MCV، MCH و MCHC در تیمار ۰/۳ درصد از سایر تیمارها به‌طور معنی‌داری بیش‌تر بود (P< ۰/۰٥). تعداد گلبول‌های سفید خون (WBC) و مقدار هموگلوبین و هماتوکریت در ماهیان تغذیه شده با ۰/۳ درصد بوتیرات سدیم، بیش‌تر از سایر تیمارها بود، اگرچه تفاوت معنی‌داری با تیمار ۰/٤ و گروه شاهد نداشت (P>۰/۰٥). فعالیت لیزوزیم و میزان IgM در تیمار ۰/۳ درصد به‌طور معنی‌داری از سایر تیمارها بالاتر بود (P<۰/۰٥). میزان کورتیزول و گلوکز در فیل‌ماهیان تغذیه‌شده با جیره حاوی ۰/۳ درصد بوتیرات سدیم پس از تنش تراکم حاد نسبت به گروه‌های دیگر به میزان کم‌تری افزایش یافت و اختلاف معنی‌دار بین تیمارها مشاهده شد (P<۰/۰٥). در مجموع، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که گنجاندن ۰/۳ درصد بوتیرات سدیم در جیره غذایی فیل‌ماهیان جوان، می‌تواند به سلامت ماهیان، بهبود پاسخ ایمنی ذاتی و مقاومت در برابر تنش‌های تراکم کمک کند.

استناد: پناهی صاحبی، حسین، اورجی، حسین، فیروزبخش، فرید، قیاسی، مریم (۱۴۰۱). اثر مکمل غذایی بوتیرات سدیم بر برخی شاخص‌های خونی، ایمنی و پاسخ به تنش تراکم فیل‌ماهی جوان (*Huso huso*). *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۱ (۴)، ۱۰۷-۹٥.
DOI: 10.22069/japu.2022.20268.1670

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها به‌طور گسترده و ارزان در آبزی‌پروری برای کنترل و مدیریت عفونت‌های باکتریایی استفاده می‌شوند. بااین‌حال، کاربرد زیاد آن‌ها با خطراتی مانند سرکوب ایمنی ماهیان، آلودگی زیست‌محیطی و انباشت باقی‌مانده‌های خطرناک در عضلات ماهیان مرتبط است (۱). این موارد می‌تواند بر سلامت مصرف‌کنندگان انسانی اثر بگذارد و به ایجاد سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک از طریق انتقال باکتری‌های مقاوم از محیط آبی منجر شود (۲، ۳، ٤، ٥، ٦). بنابراین، برای افزایش پاسخ‌های ایمنی در جهت مبارزه با پاتوژن‌ها، نیاز فوری به محرک‌های ایمنی سازگار و ایمن برای محیط زیست به‌عنوان جایگزین‌های آنتی‌بیوتیک‌ها در گونه‌های آبزی پرورشی احساس می‌شود (۷، ۸).

اخیراً، استفاده از اسیدهای آلی غذایی در پرورش حیوانات آبزی از نظر پژوهشی و تجاری مورد توجه قرار گرفته است. اسیدهای آلی و یا نمک‌های آن‌ها جزء مواد ایمن طبقه‌بندی می‌شوند. طیف گسترده‌ای از اسیدهای آلی و اسیدهای چرب کوتاه زنجیره (SCFA)، از جمله اسید سیتریک، اسید فورمیک، اسید بوتیریک، اسید لاکتیک و اسید استیک و نمک‌های آن‌ها در رژیم غذایی گونه‌های آبزی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این مواد در آبزیان برای بهبود رشد ماهی، جذب مواد مغذی و مقاومت در برابر بیماری‌ها استفاده می‌شوند (٦، ۹).

بوتیرات سدیم نمک اسید بوتیریک است و پس از شلات‌شدن اسید بوتیریک به‌وسیله سدیم معدنی تشکیل می‌شود. این نمک پایدارتر از اسید بوتیریک است و شدت بوی آن نسبت به اسید بوتیریک کم‌تر است، در نتیجه در رژیم غذایی ماهی و دام بیش‌تر استفاده می‌شود. مطالعات متعددی آثار مفید تقویت‌کننده اسید بوتیریک و بوتیرات سدیم و فرم‌های ریزپوشش داده‌شده آن‌ها را در طیف وسیعی از ماهیان، از جمله در باس دریایی اروپایی (۱۰)، سیم دریایی سرطلایی (۱۱)، گربه‌ماهی آفریقایی (۱۲)، کپور طلایی (۱۳)، باس دریایی آسیایی (١٤)، کپور معمولی (۱۵)، تیلاپیای نیل (١٦، ۱۷) و کپور علفخوار (۱۸) گزارش کرده‌اند. مطالعه حاضر با هدف تعیین آثار سطوح مختلف بوتیرات سدیم در جیره غذایی بر برخی شاخص‌های خونی و ایمنی و پاسخ ماهیان مورد مطالعه به مواجهه با تنش تراکم در پایان دوره آزمایش انجام شده است.

مواد و روش‌ها

تیمار ماهیان و شرایط پرورشی: تعداد ۳٦۰ قطعه فیل‌ماهی جوان با میانگین وزنی ۰/٥٦ ± ۱۵ گرم پس از گذراندن یک هفته دوره سازگاری با شرایط محیطی به‌صورت تصادفی در شش تیمار (هر تیمار با سه تکرار) در ۱۸ حوضچه‌های گرد ۳۲۰۰ لیتری با حجم آبگیری ۱۰۰۰ لیتر و با تراکم ۲۰ قطعه ماهی در هر حوضچه در مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری قره‌برون (واحد حسین‌آباد ساری) ذخیره‌سازی شدند. در این مطالعه بوتیرات سدیم در ٦ سطح ۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/٤ و ۰/٥ درصد به ازای هر کیلوگرم جیره‌های غذایی (خوراک کنسانتره کارخانه خوراک مجتمع قره‌برون) افزوده شد (۱۸، ۱۹، ۲۰). آنالیز ترکیب خوراک توسط شرکت آزمون سلامت البرز و طبق استاندارد AOAC (۲۰۰۵) انجام شد (جدول ۱).

برای تهیه این جیره‌ها پس از محاسبه میزان بوتیرات سدیم مورد نیاز، این مواد پس از انحلال در کلروفرم به روش اسپری‌کردن به جیره غذایی اضافه شد (۲۰). ماهیان روزانه ٦ بار در حد سیری با جیره‌های آماده‌شده به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب شامل دما، اکسیژن و pH روزانه اندازه‌گیری و ثبت شد. در این مطالعه

دمای آب به‌طور میانگین ۱±۱۹ درجه سانتی‌گراد بود. مقدار اکسیژن محلول ثبت‌شده در طول دوره آزمایش ۰/۵±۸/۵ میلی‌گرم در لیتر گزارش شد. مقدار pH آب نیز ۰/٤±۷/۵ ثبت شد. غلظت‌های آمونیاک، نیتریت و نیترات نیز به ترتیب ۰/۰۰۳±۰/۰۱، ۰، ۰/۰۵±۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بود. مدفوع و مواد باقی‌مانده دیگر هر روز صبح از حوضچه‌ها خارج و آب نیز قبل از غذادهی به میزان ۵۰ درصد تعویض شد. این آزمایش در شرایط نوری طبیعی و در سالن سربسته انجام شد.

جدول ۱- آنالیز ترکیب خوراک.

ترکیب	درصد جیره
پروتئین	۵۲
چربی	۱۲
خاکستر	۱۲
رطوبت	۱۰

تهیه نمونه خون برای تعیین شاخص‌های خونی و ایمنی: در پایان هفته هشتم دوره پرورش پس از ۲٤ ساعت قطع تغذیه با استفاده از سرنگ از ساقه دمی ماهیان (۳ ماهی از هر تکرار) به‌منظور بررسی شاخص‌های خونی (CBC) و تهیه سرم، خون‌گیری انجام شد. پس از خون‌گیری بخشی از خون به داخل تیوب‌های آغشته به ماده ضدانعقاد خون (هپارین) از قبل برچسب‌گذاری‌شده برای مطالعات شاخص‌های خونی انتقال داده شد و بخش دیگر برای آزمایش‌های شاخص‌های ایمنی به ظروف غیرهپارینه از قبل برچسب‌گذاری‌شده ریخته شد و سپس با سانتریفیوژ (۲۵۰۰ دور در دقیقه، ۱۰ دقیقه، ٤ درجهٔ سانتی‌گراد) سرم خون جداسازی و در داخل ظروف مخصوص تا انجام آزمایش‌ها مربوطه در دمای ۸۰- نگهداری شد (۲۱).

شاخص‌های خونی: شمارش گلبول‌های قرمز (RBC) و سفید (WBC) خون به‌وسیله لام هموسیتومتر (نئوبار) انجام و مقدار هماتوکریت (Hct) به روش میکروهماتوکریت و غلظت هموگلوبین (Hb) به روش سیانومت‌هموگلوبین و با اسپکتوفتومتر با طول موج ۵٤۰ نانومتر برحسب گرم در دسی‌لیتر اندازه‌گیری شد. شاخص‌های مهم گلبول‌های قرمز خون عبارتند از حجم متوسط گلبول‌های قرمز (MCV)، غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH) و تغییرات غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) که مطابق رابطه‌های زیر تعیین شد (۲۲، ۲۳):

(RBC×Htc) = MCV×۱۰ (حجم متوسط گلبول‌های قرمز بر حسب فمتولیتر)

(RBC×Hb) = MCH ×۱۰ (غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز برحسب پیکوگرم)

(Hb/Hct) = MCHC ×۱۰ (تغییرات غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز بر حسب درصد)

شاخص‌های ایمنی: برای تعیین میزان فعالیت لیزوزیم سرم از روش ارایه شده توسط (۲٤) استفاده شد. سطح فعالیت لیزوزیم به روش کدورت سنجی و با استفاده از سوسپانسیون باکتری میکروکوکوس لیزودیکتیکوس و آنزیم مورآمیداز صورت گرفت. اندازه‌گیری IgM با استفاده از روش ایمونو توربیدیمتری و کیت تجاری (پارس آزمون، ایران) انجام شد (۲۵).

تنش تراکم: بعد از پایان دوره پرورش، ماهیان تحت تنش حاد تراکم قرار گرفتند. برای این کار ماهیان تغذیه‌شده با تیمارهای مختلف و ماهیان گروه شاهد در یک مخزن با تراکم بالا (چهار ماهی در لیتر یا ۷ کیلوگرم در مترمربع) نگهداری شدند و در زمان‌های صفر، ٦ و ٢٤ ساعت مقدار کورتیزول و گلوکز پلاسما از ماهیان تحت تنش نمونه خون گرفته شد (۲٦). برای تهیه پلاسما، خون ماهیان نمونه با استفاده از سرنگ هپارینه گرفته شد و پلاسمای آن‌ها با استفاده از سانتریفیوژ (۲۵۰۰ دور در دقیقه، ۱۰ دقیقه، ٤ درجهٔ سانتی‌گراد) جداسازی و در داخل میکروتیوب تا انجام آزمایش‌های تعیین مقدار کورتیزول و گلوکز در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. اندازه‌گیری کورتیزول پلاسما با روش ایمنی‌سنجی آنزیمی (الایزا) و با کیت تجاری (مونوبایند، Monobind, Inc) انجام شد (۲۷). مقدار گلوکز موجود در پلاسما پس از آماده‌سازی نمونه‌ها با روش آنزیمی گلوکز اکسیداز و کیت تجاری (پارس آزمون، ایران) اندازه‌گیری شد (۲٦).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. در ابتدا همگنی واریانس و نرمال‌بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف- اسمیرنوف بررسی و داده‌های حاصل با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) با نرم‌افزار SPSS-21 مورد بررسی قرار گرفت. برای مقایسه میانگین شاخص‌های خونی، ایمنی، گلوکز و کورتیزول در تیمارها، از آزمون دانکن با سطح اطمینان ۰/۹۵ درصد استفاده شد.

نتایج

شاخص‌های خون‌شناسی: شاخص‌های خونی (RBC، WBC، MCV، MCH، MCHC، هموگلوبین، هماتوکریت) پس از ۸ هفته تغذیه فیل ماهیان جوان با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف بوتیرات سدیم در جدول ۲ ارائه شده است. براساس نتایج به‌دست آمده، تعداد گلبول‌های قرمز خون (RBC) در تیمار ۰/۳ درصد از سایر تیمارها به‌طور معنی‌داری بیش‌تر بود (P<۰/۰۵). تعداد گلبول‌های سفید خون (WBC) در ماهیانی که با ۰/۳ درصد بوتیرات سدیم در خوراک تغذیه شده بودند، بیش‌تر از سایر تیمارها بود، اگرچه تفاوت معنی‌داری با تیمار ۰/٤ و گروه شاهد نداشت (P>۰/۰۵). ماهیان تغذیه‌شده با خوراک حاوی ۰/۳ درصد بوتیرات سدیم از نظر مقدار هموگلوبین و هماتوکریت نیز وضعیت بهتری داشتند، اگرچه تفاوت معنی‌داری با تیمار ۰/٤ درصد و گروه شاهد نشان ندادند (P>۰/۰۵). نتایج این مطالعه نشان داد که بوتیرات سدیم به میزان ۰/۳ درصد به‌طور معنی‌داری MCV، MCH و MCHC فیل‌ماهیان مورد مطالعه را افزایش داد (P<۰/۰۵).

جدول ۲- شاخص‌های خونی (میانگین ± انحراف معیار) در فیل‌ماهی‌های تغذیه‌شده با جیره حاوی مقادیر مختلف بوتیرات سدیم به‌مدت ۸ هفته.

شاخص	جیره‌های آزمایشی					
	شاهد (۰ درصد)	۰/۱ درصد	۰/۲ درصد	۰/۳ درصد	۰/٤ درصد	۰/۵ درصد
تعداد گلبول‌های سفید (سلول در میکرولیتر)	۷۵٦٦/٦٦ ± ۱۸۳۷/۲۷^{ab}	٦۵۰۰ ± ۱۲۹۳/۲۵^{b}	۵٦۰۰ ± ۱٤۳۰/۹۱^{c}	۸۰۳۳/۳۳ ± ۱۷۸۳/۹۲^{a}	۷۳۰۰ ± ۱۱۲۵/۸۳^{ab}	۵٤۰۰ ± ۵۸۸/۸^{c}
تعداد گلبول‌های قرمز (میلیون سلول در میکرولیتر)	۰/۸۱ ± ۰/۰۹^{b}	۰/٦٦ ± ۰/۰۳^{c}	۰/٦٦ ± ۰/۰٤^{c}	۰/۸۱ ± ۰/۰۳^{a}	۰/۷٦ ± ۰/۰٦^{ab}	۰/٦۲ ± ۰/۰٤^{c}
هماتوکریت (درصد)	۱۷ ± ۱/۸۳^{c}	۱٦/٦٦ ± ۰/۵^{b}	۱٦ ± ۰/۸۷^{cd}	۲۱ ± ۰/۸۲^{a}	۱۹ ± ۱/٦۳^{b}	۱٦ ± ۰/۸۷^{d}
هموگلوبین (گرم بر دسی‌لیتر)	۲/٤۲ ± ۰/۱٦^{a}	۲/۰٦ ± ۰/۵^{c}	۲/۳۱ ± ۰/۲٤^{ab}	۲/٦ ± ۰/۱۷^{a}	۲/۵۲ ± ۰/۰۵^{a}	۲/۱۲ ± ۰/۱٤^{c}
MCV (فمتولیتر)	۲۳۹/٤۳ ± ۱/۲۵^{c}	۲۵۲/۷۲ ± ۵/۱۲^{b}	۲٤۱/۳۸ ± ۳/٤۰^{c}	۲۵۹/۲۵ ± ۷/۱٦^{a}	۲٤۹/۷۹ ± ۲/۷۱^{b}	۲٤۲/۱۱ ± ۲/۹۵^{c}
MCH (پیکوگرم در سلول)	۳٤/۰۸ ± ۱/٤۷^{ab}	۳۱/۳٤ ± ۰/۷۹^{ab}	۳۹/۱۹ ± ۰/۲۹^{a}	٤۰/۷٦ ± ۲/۰۱^{a}	۳۲/۰۹ ± ۲/۲۱^{ab}	۲۷/۹۷ ± ۱/۹٤^{c}
MCHC (میلی‌گرم در دسی لیتر)	۱٤/۳۳ ± ۰/۰٦^{ab}	۱۲/٤۰ ± ۰/۰۷^{ab}	۱٦/۲٤ ± ۰/۲۰^{a}	۱٦/۸۳ ± ۰/٦۳^{a}	۱۲/۳۸ ± ۰/۵٤^{ab}	۱۱/۲۰ ± ۰/۸٦^{c}

میانگین‌ها در یک ردیف با حروف انگلیسی متفاوت از نظر آماری تفاوت معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵)

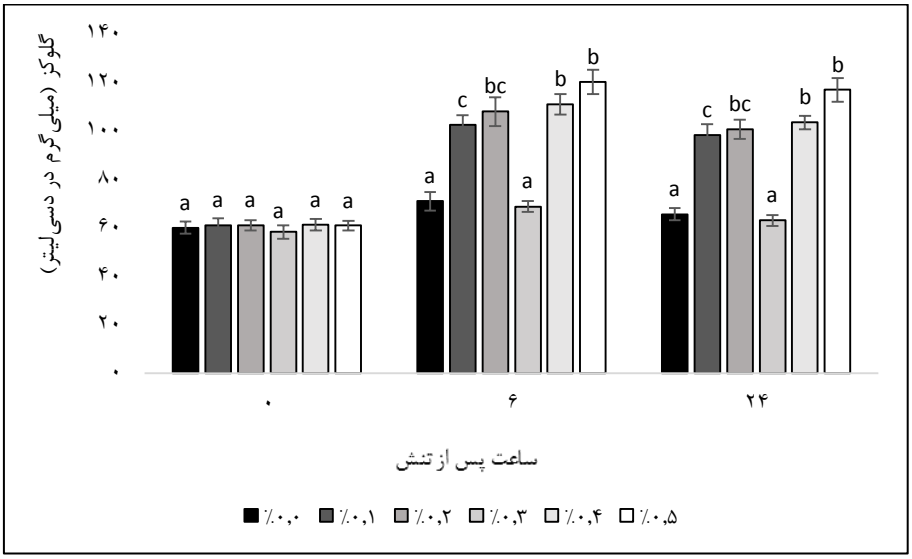
شاخص‌های ایمنی: براساس نتایج به‌دست آمده، افزودن بوتیرات سدیم به جیره غذایی فیل‌ماهیان فعالیت لیزوزیم را افزایش داده است و در تیمار ۰/۳ درصد بالاترین فعالیت لیزوزیم مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری از سایر تیمارها بالاتر بود (P<۰/۰۵). میزان IgM نیز در فیل‌ماهیان تغذیه‌شده با جیره حاوی ۰/۳ و ۰/٤ درصد به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سایر تیمارها بود (P<۰/۰۵) و بالاترین میزان IgM در تیمار ۰/۳ درصد گزارش شد (جدول ۳).

جدول ۳- شاخص‌های ایمنی سرم (لیزوزیم و IgM) (میانگین± انحراف معیار) در فیل‌ماهی‌های تغذیه‌شده با جیره حاوی مقادیر مختلف بوتیرات سدیم به مدت ۸ هفته.

شاخص	جیره‌های آزمایشی					
	شاهد (٪۰)	۰/۱ درصد	۰/۲ درصد	۰/۳ درصد	۰/٤ درصد	۰/۵ درصد
لیزوزیم (میکروگرم در میلی‌لیتر)	۱/۷٦ ± ۰/٤۵^{c}	۲/۳۳ ± ۱/۲۹^{c}	۳/٦٤ ± ۰/۸٦^{b}	۵/۵۲ ± ۰/۹۳^{a}	٤/۱۷ ± ۱/۷۳^{b}	۳/٦۲ ± ۰/۷٤^{b}
IgM (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۷۸/۱۳ ± ۹/۳۷^{c}	٦۹/۲۰ ± ۱٤/۳۵^{c}	۷۷ ± ۱٦/۳۹^{c}	۱۳۱/۵۳ ± ۲۱/۵۳^{a}	۹۳/۱۷ ± ۱٤/۵۷^{b}	۸۳/۰۷ ± ۹/۲۸^{bc}

میانگین‌ها در یک ردیف با حروف انگلیسی متفاوت از نظر آماری تفاوت معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵)

تنش تراکم: پس از تنش تراکم فیل‌ماهیان تغذیه‌شده با جیره حاوی سطوح مختلف بوتیرات سدیم، مقدار گلوکز پلاسما در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان داد (شکل ۱). بیش‌ترین افزایش میزان گلوکز در تمام تیمارها در ٦ ساعت پس از تنش مشاهده شد. بالاترین مقدار گلوکز ٦ ساعت پس از تنش و در ماهیان تیمار ۰/۵ درصد ثبت شد. کم‌ترین مقدار افزایش گلوکز هم مربوط به ماهیان تیمار ۰/۳ درصد بود که با سایر تیمارها، به جزء گروه شاهد، تفاوت معنی‌داری داشت (P>۰/۰۵). در تمام تیمارها ۲٤ ساعت پس از تنش مقدار گلوکز کاهش پیدا کرد و در ماهیان گروه شاهد و تیمار ۰/۳ درصد تقریباً به سطح قبل از تنش رسید.



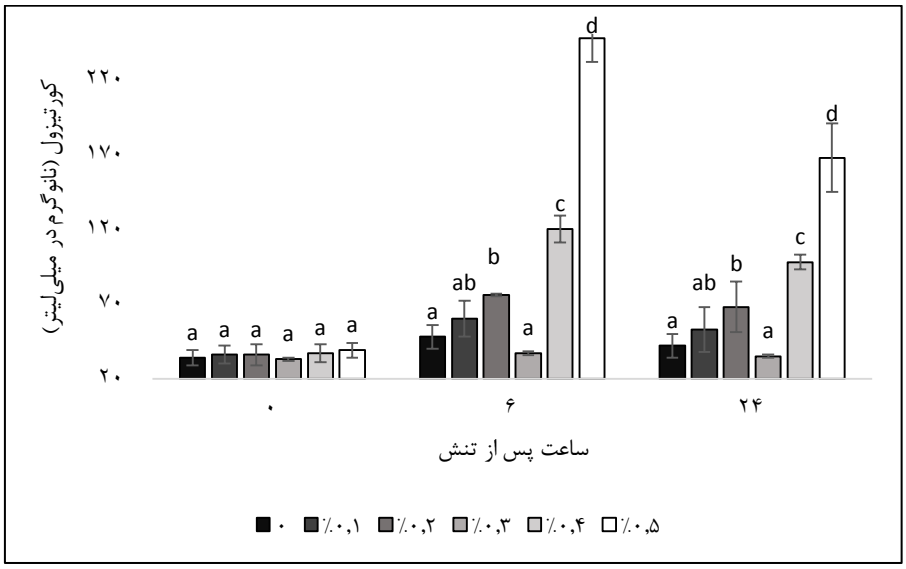
شکل ۱- روند تغییرات گلوکز در فیل‌ماهیان پس از تنش تراکم.

حروف انگلیسی بیانگر اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌های تیمارهای مختلف در طول آزمایش می‌باشد (P<۰/۰۵).

حروف مشترک بیانگر معنی‌دار نبودن اختلاف بین تیمارهای مختلف در ساعت پس از تنش می‌باشد (P>۰/۰۵).

داده‌ها به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شده‌اند.

نتایج این مطالعه نشان داد که بالاترین میزان کورتیزول در تمام تیمارها در ٦ ساعت پس از تنش وجود داشت. در ساعت‌های نمونه‌گیری پس از تنش تراکم، بین تیمارها اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. در این آزمایش، ٦ ساعت پس از تنش تراکم، میزان کورتیزول در تمام تیمارها افزایش پیدا کرد و بالاترین افزایش میزان کورتیزول در تیمار ۰/۵ و پایین‌ترین افزایش میزان کورتیزول در تیمار ۰/۳ درصد مشاهده شد، به‌طوری‌که میزان کورتیزول ماهیان تیمار ۰/۳ درصد از گروه شاهد کم‌تر بود، اگرچه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). میزان کورتیزول در ماهیان گروه شاهد و تیمار ۰/۳ درصد در ٦ و ٢٤ ساعت پس از تنش، نسبت به زمان صفر تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵). این در حالی است که در تیمارهای دیگر این اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). در ماهیان تیمار ۰/۳ درصد مقدار کورتیزول در ٢٤ ساعت پس از تنش، تقریباً به سطح قبل از تنش بازگشت (شکل ۲).



شکل ۲- روند تغییرات کورتیزول در فیل‌ماهیان پس از تنش تراکم.

حروف انگلیسی بیانگر اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌های تیمارهای مختلف در طول آزمایش می‌باشد (P<۰/۰۵).

حروف مشترک بیانگر معنی‌دار نبودن اختلاف بین تیمارهای مختلف در ساعت پس از تنش می‌باشد (P>۰/۰۵).

داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شده‌اند.

بحث

اسیدهای آلی و نمک‌های آن‌ها به‌عنوان افزودنی‌های خوراکی برای بهبود عملکرد رشد و بهبود وضعیت سلامت ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرند. نمک بوتیرات، یک اسید چرب کوتاه زنجیره موجود در دستگاه گوارش حیوانات، به‌عنوان محصول نهایی تخمیر باکتریایی فیبرها و کربوهیدرات‌ها مطرح می‌باشد (۱۸).

شاخص‌های خونی به تغییرات رژیم غذایی حساس بوده و ابزاری مهم برای سنجش سلامت و وضعیت فیزیولوژیکی ماهی می‌باشند (۲۸). مقادیر هموگلوبین و هماتوکریت به‌عنوان شاخص‌هایی برای سلامت عمومی ماهیان مطرح بوده و ممکن است در پاسخ به کمبودهای مواد مغذی ضروری تغییر کنند (۲۹). لیزوزیم سرم به‌عنوان یک آنتی‌بیوتیک درون‌زای

طبیعی در مایعات بدن حیوانات وجود دارد و فعالیت تجزیه‌ای مستقیم بر دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و فعالیت غیرمستقیم دربرابر باکتری‌های گرم منفی از طریق تحریک سیستم کمپلمان و فاگوسیت‌ها دارد (۳۰). هم‌چنین، مکمل اسیدهای آلی یا نمک‌های آن‌ها به‌عنوان افزودنی‌های خوراکی در رژیم غذایی ماهیان با مهار رشد باکتری‌های گرم منفی و یا تکثیر انتخابی باکتری‌های مفید در روده، می‌تواند به پاسخ‌های ایمنی ذاتی کمک کند (۳۱). نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که بوتیرات سدیم در جیره غذایی بر شاخص‌های خونی فیل‌ماهیان جوان تأثیر گذاشته است به‌طوری‌که در سطح ۰/۳ درصد بوتیرات سدیم در جیره غذایی بهترین نتایج حاصل شد. این امر نشان می‌دهد که بوتیرات سدیم در این سطح به ارتقای وضعیت سلامت ماهیان مورد بررسی کمک کرده است. علاوه‌بر این، شاخص‌های ایمنی ذاتی (IgM و فعالیت لیزوزیم) و فعالیت باکتری‌کشی سرم فیل‌ماهیانی که بوتیرات سدیم را دریافت کردند، نسبت به گروه شاهد تغییراتی را نشان دادند و بهترین وضعیت در ماهیانی دیده شد که جیره غذایی حاوی ۰/۳ و ۰/٤ درصد را دریافت کردند. نتایج این پژوهش با نتایج برخی مطالعات دیگر در این زمینه مطابقت دارد. درصد هموگلوبین، مقدار هماتوکریت، تعداد گلبول‌های قرمز، شاخص MCHC، تعداد گلبول‌های سفید خون و منوسیت‌های باس دریایی اروپایی در گروه‌های تغذیه‌شده با خوراک حاوی بوتیرات سدیم ریزپوشش‌دار به‌طور معنی‌دار افزایش پیدا کرد (۱۰). علاوه‌بر این، مطالعه این نویسندگان افزایش معنی‌داری ایمنوگلوبولین کل، فعالیت انفجار تنفسی، فعالیت فاگوسیتی، شاخص فاگوسیتی، میلوپراکسیداز، لیزوزیم و فعالیت‌های باکتری‌کشی در گروه‌های ماهیان تغذیه‌شده با خوراک حاوی ۰/۲ و ۰/۳ درصد بوتیرات سدیم ریزپوشش‌دار را تأیید کرد. مکمل غذایی اسید بوتیریک کپسوله‌شده در رژیم غذایی گربه‌ماهی دورگه (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*) به‌طور معنی‌دار تعداد گلبول‌های سفید و قرمز خون، هماتوکریت و مقدار هموگلوبین و پروتئین کل سرم را افزایش داد (۳۲). در کپور علفخوار، مکمل غذایی بوتیرات سدیم باعث کاهش غلظت استات و پروپیونات، افزایش فعالیت لیزوزیم و اسید فسفاتاز و افزایش کمپلمان (C3 و C4) و ایمنوگلوبولین (IgM) شد (۳۳). هم‌چنین، بهبود معنی‌دار فعالیت لیزوزیم، فعالیت انفجار تنفسی، فعالیت باکتری‌کشی و آگلوتیناسیون را در سرم تیلاپیای نیل که از رژیم غذایی حاوی مکمل بوتیرات سدیم پوشش‌دار تغذیه شد، گزارش شده است (۳٤). افزایش تعداد گلبول قرمز و منوسیت‌ها در تیلاپیای نیل تغذیه‌شده با خوراک حاوی ۰/۵ درصد بوتیرات سدیم محافظت‌شده با بافر و ۰/۲۵ درصد بوتیرات سدیم محافظت‌شده با روغن پالم گزارش شده است (۳۵). استفاده از بوتیرات سدیم به میزان ۱/۵–۵ گرم در کیلوگرم، پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی مانند فعال‌شدن لیزوزیم و کمپلمان‌ها و فعالیت باکتری‌کشی در روده قزل‌آلای رنگین‌کمان را در پی داشت (۳٦). با وجود این، برخلاف نتایج مطالعه حاضر، تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، درصد هموگلوبین و تعداد گلبول‌های سفید خون تیلاپیای نیل انگشت‌قد تحت‌تأثیر بوتیرات سدیم قرار نگرفت (۱۹). با این حال، تعداد لنفوسیت‌ها با افزایش بوتیرات سدیم تا ۲ درصد افزایش و پس از آن کاهش یافت.

تنش در ماهیان باعث تحریک سیستم غدد درون‌ریز شده و افزایش سطوح کاتکول‌آمین‌ها و کورتیکوستروئیدها را در پی دارد. این کاتکول‌آمین‌ها بر کبد تأثیر گذاشته و با القای گلیکوژنز، باعث

افزایش گلوکز خون می‌شود (۳۷). تولید گلوکز در پاسخ به تنش، انرژی مورد نیاز برای سازگاری ماهی با عوامل تنش‌زا را تامین می‌کند (۳۸). سطوح گلوکز خون در شرایط بدون تنش و پس از تنش تحت‌تأثیر رژیم غذایی و شرایط تغذیه‌ای ماهیان قرار می‌گیرد (۳۹). در مطالعه حاضر، پاسخ به تنش حاد تراکم (گلوکز و کورتیزول) در فیل‌ماهیان تغذیه‌شده با جیره حاوی سطوح مختلف بوتیرات سدیم اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری کورتیزول و گلوکز در این ماهیان نشان داد که در تمام تیمارها بیشینه کورتیزول در ٦ ساعت پس از تنش بود و ٢٤ ساعت پس از قرارگرفتن ماهیان در معرض تنش، مقدار کورتیزول کاهش یافت. کم‌ترین افزایش کورتیزول و گلوکز پس از تنش در تیمار ۰/۳ درصد و گروه شاهد مشاهده شد و در این گروه از ماهیان ٢٤ ساعت پس از قرار گرفتن در معرض تراکم بالا، مقدار کورتیزول و گلوکز تقریباً به زمان صفر نزدیک شد. نتایج مطالعه حاضر هم‌سو با نتایج مطالعات انجام شده روی ماهیان خاویاری دیگر بود که نشان داد در این ماهیان پس از تنش، کورتیزول و گلوکز روند افزایشی پیدا کرده و پس از سازگاری ماهیان با شرایط، ماهی به حالت عادی نزدیک می‌شود (٢٦، ٤٠). در تاس‌ماهی سیبری (٤١) و پاروپوزه (٤٢) بیشینه گلوکز در ٦ ساعت پس از تنش مشاهده شد که با مطابق با مطالعه حاضر است. با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان گفت بوتیرات سدیم در سطح ۰/۳ درصد علاوه‌بر بهبود وضعیت ایمنی و خونی فیل‌ماهیان به سازگاری ماهیان به تراکم بالا کمک کرده است. با وجود این، در سطوح دیگر مورد آزمایش این وضعیت مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع، در این مطالعه اثربخشی بوتیرات سدیم به‌عنوان یک اسیدی‌فایر غذایی روی برخی عملکرد فیزیولوژیک فیل‌ماهی‌های جوان از جنبه‌های مختلف، بهبود شاخص‌های خونی و ایمنی ذاتی به اثبات رسید. بنابراین، گنجاندن بوتیرات سدیم به‌میزان ۰/۳ درصد برای بهبود دفاع ذاتی فیل‌ماهی‌های جوان و افزایش مقاومت این ماهی نسبت به تنش تراکم توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از جناب آقای حاج اسحاق اسلامی مدیر عامل مجتمع تکثیر و پرورش قره‌برون و آقای مهندس بهزاد اسلامی مدیر مجتمع قره‌برون به دلیل حمایت و مساعدت بی‌دریغ‌شان، تشکر و قدردانی نموده و از آقایان دکتر مزدک پاکزاد و مهندس زرگری جهت همکاری صمیمانه در اجرای پژوهش و از آقایان مهندس بینایی و دکتر صفری از پژوهشکده اکولوژی دریای خزر بابت همکاری در انجام آزمایش‌ها و دکتر ابراهیم‌زاده به‌منظور آنالیز داده‌ها و مشاوره در امر پژوهش کمال تشکر را داشته و از سایر عزیزانی که در این پژوهش ما را یاری نمودند، سپاسگزاریم.

منابع

1. Dawood, MAO., Koshio, S., Abdel-Daim, MM., and Van Doan, H. 2019. Probiotic application for sustainable aquaculture. Review Aquaculture. 11: 3. 907-924.
2. Alderman, D., and Hastings, T. 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance–potential for consumer health risks. International journal of food science & technology. 33: 2. 139-155.
3. Holmström, K., Gräslund, S., Wahlström, A., Poungshompoo, S., Bengtsson, B.E., and Kautsky, N. 2003. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. International journal of food science & technology. 38: 255-266.
4. 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.
5. Romero, J., Feijoó, C.G., and Navarrete, P. 2012. Antibiotics in aquaculture–use, abuse and alternatives. Health and environment in aquaculture. 159p.
6. Hoseinifar, S.H., Sun, Y.Z., and Caipang, C.M. 2017. Short-chain fatty acids as feed supplements for sustainable aquaculture: An updated view. Aquaculture Research. 48: 1380-1391.
7. Wang, W., Sun, J., Liu, C., and Xue, Z. 2017. Application of immunostimulants in aquaculture: current knowledge and future perspectives. Aquaculture Research. 48: 1-23.
8. Dawood, M.A., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., El Basuini, M.F., Hossain, M.S., Nhu, T.H., Dossou, S., and Moss, A.S. 2016. Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* or/and *Lactococcus lactis* on the growth, gut microbiota and immune responses of red sea bream, Pagrus major. Fish & Shellfish Immunology. 49: 275-285.
9. Ng, W.K., and Koh, C.B. 2017. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. Reviews in Aquaculture. 9: 342-368.
10. Abdel-Mohsen, H.H., Wassef, E.A., El-Bermawy, N.M., Abdel-Meguid, N.E., Saleh, N.E., Barakat, K.M., and Shaltout, O.E. 2018. Advantageous effects of dietary butyrate on growth, immunity response, intestinal microbiota and histomorphology of European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) fry. Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries. 22: 4. 93-110.
11. Robles, R., Lozano, A., Sevilla, A., Márquez, L., Nuez-Ortín, W., and Moyano, F. 2013. Effect of partially protected butyrate used as feed additive on growth and intestinal metabolism in sea bream (*Sparus aurata*). Fish Physiology and Biochemistry. 39: 1567-1580.
12. Owen, M., Waines, P., Bradley, G., and Davies, S. 2006. The effect of dietary supplementation of sodium butyrate on the growth and microflora of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). In: (Eds.), Proceeding of proceedings of the XII international symposium fish nutrition and feeding. 250p.
13. Sun, L., Liu, Z., Hao, G., Zhou, L., Lu, S., Zhang, J., and Xiao, T. 2013. Effects of sodium butyrate on growth and intestinal cell proliferation of Carassius auratus. Journal Fish Science China. 20: 893-901.
14. Aalamifar, H., Soltanian, S., Vazirzadeh, A., Akhlaghi, M., Morshedi, V., Gholamhosseini, A., and Torfi Mozanzadeh, M. 2020. Dietary butyric acid improved growth, digestive enzyme activities and humoral immune parameters in Barramundi (*Lates calcarifer*). Aquaculture Nutrition. 26: 1. 156-164.
15. Liu, W., Yang, Y., Zhang, J., Gatlin, D.M., Ringø, E., and Zhou, Z. 2014. Effects of dietary microencapsulated sodium butyrate on growth, intestinal mucosal morphology, immune response and adhesive bacteria in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) pre-fed with or without oxidised oil. British Journal of Nutrition. 112: 15-29.

16. Ahmed, H., and Sadek, K. 2015. Impact of dietary supplementation of sodium butyrate and/or protexin on the growth performance, some blood parameters, and immune response of *Oreochromis niloticus*. International Journal of Agriculture Innovations and Research. 3: 4. 985-991.
17. Dawood, M.A., Eweedah, N.M., Elbialy, Z.I., and Abdelhamid, A.I. 2020. Dietary sodium butyrate ameliorated the blood stress biomarkers, heat shock proteins, and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to heat stress. Journal of Thermal Biology. 88: 102500.
18. Liu, M., Guo, W., Wu, F., Qu, Q., Tan, Q., and Gong, W. 2017. Dietary supplementation of sodium butyrate may benefit growth performance and intestinal function in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Aquaculture Research. 48: 4102-4111.
19. Ali, TE-S., El-Sayed, AM., Eissa, MA. R., and Hanafi, HM. 2018. Effect of dietary supplementation of sodium butyrate on growth performance and feed utilization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fries. Indian Journal of Geo-Marine Sciences. 47: 2071-2076.
20. Najdegerami, E.H., Tran, T.N., Defoirdt, T., Marzorati, M., Sorgeloos, P., Boon, N., and Bossier, P. 2012. Effects of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) on Siberian sturgeon (Acipenser baerii) fingerlings performance and its gastrointestinal tract microbial community. FEMS Microbiology Ecology. 79: 25-33.
21. Adjoumani, J.J.Y., Wang, K., Zhou, M., Liu, W., and Zhang, D. 2017. Effect of dietary betaine on growth performance, antioxidant capacity and lipid metabolism in blunt snout bream fed a high-fat diet. Fish physiology and biochemistry. 43: 6. 1733-1745.
22. Stoskpofe, M.A. 1993. Fish Medicine. Sounders Company. USA. 882p.
23. Klontz, G. 1994. Fish hematology. Techniques in fish immunology. 3: 121-131.
24. Ellis, A. 1990. Lysozyme Assays: In Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., Van Muiswinkel, W.B., editors. Techniques in: Fish Immunology. Fair Haven. NJ: SOS Publications. pp. 101-103.
25. Reyes-Becerril, M., Tovar-Ramírez, D., Ascencio-Valle, F., Civera-Cerecedo, R., Gracia-López, V., and Barbosa-Solomieu, V. 2008. Effects of dietary live yeast Debaryomyces hansenii on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper Mycteroperca rosacea exposed to stress. Aquaculture. 280: 39-44.
26. Falahatkar, B., Poursaeid, S., Shakoorian, M., and Barton, B. 2009. Responses to handling and confinement stressors in juvenile great sturgeon *Huso huso*. Journal of Fish Biology, 75: 4. 784-796.
27. Barry, T.P., Lapp, A.F., Kayes, T.B., and Malison, J.A. 1993. Validation of a microtitre plate ELISA for measuring cortisol in fish and comparison of stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*). Aquaculture. 117: 351-363.
28. Buscaino, G., Filiciotto, F., Buffa, G., Bellante, A., Di Stefano, V., Assenza, A., Fazio, F., Caola, G., and Mazzola, S. 2010. Impact of an acoustic stimulus on the motility and blood parameters of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Marine environmental research. 69: 3. 136-142.
29. Fazio, F., Marafioti, S., Arfuso, F., Piccione, G., and Faggio, C. 2013. Comparative study of the biochemical and haematological parameters of four wild Tyrrhenian fish species. Veterinární medicína, 58: 11. 576-581.
30. Magnadottir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish and Shellfish Immunology. 20: 137-151.
31. Reyshari, A., Mohammadiazarm, H., Mohammadian, T., and Torfi Mozanzadeh, M. 2019. Effects of sodium diformate on growth performance, gut microflora, digestive

enzymes and innate immunological parameters of Asian sea bass (*Lates calcarifer*) juveniles. Aquaculture Nutrition. 25: 1135-1144.
32. Chow, E.P.Y., Liong, K.H., and Schoeters, E. 2017. Dietary encapsulated butyric acid (Butipearl™) and microemulsified carotenoids (Quantum GLO™ Y) on the growth, immune parameters and their synergistic effect on pigmentation of hybrid Catfish (Clarias *macrocephalus*× *Clarias gariepinus*). Fish Aquaculture Journal. 8: 2.
33. Tian, L., Zhou, X.Q., Jiang, W.D., Liu, Y., Wu, P., Jiang, J., Kuang, S.Y., Tang, L., Tang, W.N., and Zhang, Y.A. 2017. Sodium butyrate improved intestinal immune function associated with NF-κB and p38MAPK signalling pathways in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Fish & shellfish immunology. 66: 548-563.
34. Abd El-Naby, A.S., Khattaby, A.E.R.A., Samir, F., Awad, S.M., and Abdel-Tawwab, M. 2019. Stimulatory effect of dietary butyrate on growth, immune response, and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* against Aeromonas hydrophila infection. Animal Feed Science and Technology. 254: 114-212.
35. Jesus, G.F., Pereira, S.A., Owatari, M.S., Syracuse, N., Silva, B.C., Silva, A., Pierri, B.S., Lehmann, N.B., Figueiredo, H.C., and Fracalossi, D.M. 2019. Protected forms of sodium butyrate improve the growth and health of Nile tilapia fingerlings during sexual reversion. Aquaculture. 499: 119-127.
36. Mirghaed, A.T., Yarahmadi, P., Soltani, M., Paknejad, H., and Hoseini, S.M. 2019. Dietary sodium butyrate (Butirex® C4) supplementation modulates intestinal transcriptomic responses and augments disease resistance of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Fish & Shellfish Immunology. 92: 621-628.
37. Rotllant, J., and Tort, L. 1997. Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. Journal of Fish Biology, 51: 1. 21-28.
38. Barton, B.A. 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integrative and comparative biology, 42: 3. 517-525.
39. Barton, B.A., Rahn, A.B., Feist, G., Bollig, H., and Schreck, C.B. 1998. Physiological stress responses of the freshwater chondrostean paddlefish (Polyodon spathula) to acute physical disturbances. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 120: 2. 355-363.
40. Bayunova, L., Barannikova, I., and Semenkova, T. 2002. Sturgeon stress reactions in aquaculture. *Journal* of Applied Ichthyology, 18: 4-6. 397-404.
41. Hamlin, H.J., Edwards, T.M., Moore, B.C., Main, K.L., and Guillette Jr, L.J. 2007. Stress and its relation to endocrine function in captive female Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). Environmental sciences: an international journal of environmental physiology and toxicology, 14: 3. 129-139.
42. Webb, M.A., Allert, J.A., Kappenman, K.M., Marcos, J., Feist, G.W., Schreck, C.B., and Shackleton, C.H. 2007. Identification of plasma glucocorticoids in pallid sturgeon in response to stress. General and Comparative Endocrinology, 154: 1-3. 98-104.