

Dietary effect of different levels of chitosan on growth performance, carcass composition, and blood immune-biochemical indices of Beluga (*Huso huso*) fingerlings

Mohseni M.^{1*}; Fadakar Masouleh F.¹; Karami Nasab M.²; Zakeri D.³

*mahmoudmohseni73@gmail.com

1-International Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

2-Behdaneh Shomal, Aquatic Feed Production Company, Babolsar, Iran

3-Department of Animal Sciences and Marine Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: October 2024

Accepted: January 2025

Published: March 2025



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introduction

Aquaculture is increasingly vital for meeting the protein needs of a growing global population. Successful production relies on efficient feed, which accounts for 60% of costs, and the development of high-quality products. Disease management in aquaculture is challenging due to factors like poor nutrition and environmental conditions, making prevention more critical than treatment (Ndashe *et al.*, 2023). Current strategies focus on using immune stimulants and additives, such as organic acids, probiotics, and prebiotics, to enhance fish health and resilience against diseases (Dawood *et al.*, 2018). The use of natural growth stimulants like chitin, chitosan, and lactoferrin has surged due to their economic benefits and minimal environmental impact. These substances not only improve immune responses but also enhance the antibacterial activity of phagocytic cells, contributing to sustainable aquaculture practices. Overall, the shift towards these natural alternatives reflects a growing recognition of their value in promoting fish health and reducing reliance on chemical treatments. Chitosan is a biodegradable and biocompatible polysaccharide derived from glucosamine through the deacetylation of chitin, predominantly found in the exoskeletons of crustaceans, particularly shrimp shells. It offers numerous benefits in aquaculture, notably enhancing fish health and growth. Chitosan stimulates the immune system by increasing levels of immunoglobulin M (IgM) and lysozyme activity, which improves disease resistance. It also boosts antioxidant capacity by enhancing the activity of enzymes like superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), thereby reducing oxidative stress. Additionally, chitosan promotes gut health by increasing intestinal villi length and digestive enzyme activity, facilitating better nutrient absorption (Mukarram *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2024). Moreover, chitosan can chelate heavy metals such as cadmium, mitigating their toxic effects on fish, and its antibacterial properties help maintain gut microbiota balance by preventing pathogenic bacteria

while promoting beneficial ones. Overall, dietary chitosan supplementation has been shown to enhance growth, health, and stress resistance in various fish species, making it a valuable additive in aquaculture. In the context of sturgeon (*Huso huso*) farming in Iran, reducing juvenile fish mortality and increasing growth rates are critical for economic efficiency, highlighting the importance of suitable diets and micronutrient balance to enhance immune function and production efficiency.

Methodology

The extraction of chitosan from shrimp shells was carried out through four stages: demineralization, deproteinization, decolorization, and deacetylation. 1260 fish (2.87 ± 0.07 g) after passing the acclimatization period, were fed in 18 tanks with six experimental diets, including control diet (without chitosan, T1), 0.15% (T2), 0.3% (T3), 0.45% (T4), 0.6% (T5) and 0.75% (T6) of chitosan ($n=3$) for 12 weeks. Then all growth indices such as final weight, growth rate, Protein Efficiency Ratio, and FCR, immunological parameters like lysozyme, ACH50, total immunoglobulin, and IgM were measured. The body composition also was measured after 12 weeks.

Results

The final body weight and body weight gain in treatments containing 0.45%, 0.6%, and 0.75% chitosan were significantly higher compared to the control, 0.15% and 0.3% chitosan treatments. The specific growth rate significantly increased with the higher levels of chitosan, and no significant difference was observed in the group fed with 0.15% chitosan compared to the control group. The hepatosomatic index significantly improved in all chitosan-fed treatments compared to the control group ($P \leq 0.05$). The feed conversion ratio significantly improved with increasing levels of chitosan compared to the control group. The protein efficiency ratio also increased in the treatments fed with 0.45%, 0.6%, and 0.75% chitosan compared to the control group, but no significant differences were found in the treatments fed with concentrations of 0.15% and 0.3% chitosan ($P \geq 0.05$). The lowest carcass protein level was observed in the control treatment, which showed a statistically significant difference compared to the carcass protein levels of other treatments, except for the 0.15% chitosan treatment ($P \leq 0.05$). The carcass protein levels in the 0.45%, 0.6%, and 0.75% chitosan treatments were the highest, but no significant differences were observed among them. The carcass fat level in the 0.45%, 0.6%, and 0.75% chitosan treatments was significantly lower compared to the control group ($P \leq 0.05$). With the increase in chitosan concentration in the diets, the serum lysozyme levels significantly increased except for the group consuming 0.15% chitosan ($P \leq 0.05$). The results obtained from the complement activity (ACH50) measurements showed that with the increase in chitosan levels in the diet, this indicator significantly increased in the serum ($P \leq 0.05$). The total serum immunoglobulin and IgM levels, also increased significantly compared to the control group ($P \leq 0.05$).

Discussion and conclusion

Chitosan, has gained attention in aquaculture for its potential as a growth promoter and immunostimulant. Research indicates that dietary chitosan enhances growth performance, feed efficiency, and immune responses in various fish species, including Nile tilapia, common carp, and golden pompano. Optimal chitosan levels, typically ranging from 0.5% to 2%, have been shown to improve weight gain, feed conversion ratios, and overall health status by promoting gut health and

enhancing digestive enzyme activities. Studies also highlight chitosan's role in modulating serum biochemical parameters, reducing fat accumulation in the liver, and improving intestinal morphology. The balance of chitosan dosage is crucial, as it can enhance beneficial bacteria while inhibiting harmful ones, thereby supporting the fish's immune system. Overall, chitosan represents a promising, eco-friendly alternative to antibiotics in aquaculture, contributing to sustainable fish farming practices while improving the health and productivity of cultured species. Chitosan also enhances nonspecific immunity and reduces mortality in fish, as evidenced by studies on common carp (Maqsood *et al.*, 2010). However, its effects on feed consumption and conversion ratios can vary, with some studies showing no significant impact on these parameters despite improvements in liver health (Stanek *et al.*, 2023). Overall, chitosan's role in aquaculture highlights its potential as a dietary supplement to improve fish health, growth, and resistance to environmental stressors. Serum parameter measurements are crucial for assessing the metabolic and physiological health of fish, particularly in aquaculture where they are susceptible to opportunistic bacterial infections. Lysozyme activity, an indicator of immune health, was found to increase with dietary chitosan levels. Research indicates that chitosan enhances lysozyme activity across various fish species, including loach, cobia, silver carp, vannamei shrimp, and rainbow trout. Additionally, chitosan supplementation in diets for beluga sturgeon and hybrid sturgeon also boosted lysozyme levels. Chitosan's immune-boosting effects are attributed to its ability to scavenge free radicals, enhancing innate immunity. Complement activity, vital for non-specific immune responses, also increased in fish like Nile tilapia and mrigal when fed chitosan. However, responses to chitosan vary by species and concentration, with some studies indicating potential negative effects at higher doses. Furthermore, IgM levels, a key immunoglobulin in fish, significantly increased with chitosan supplementation, reinforcing its role in adaptive immunity. Overall, optimal chitosan levels in fish diets can significantly enhance immune responses and health. The increase in IgM levels with dietary chitosan is not fully understood, necessitating further research to clarify the mechanisms involved (Salam *et al.*, 2024). Studies indicate that chitosan enhances IgM and total protein levels in fish, such as rainbow trout and golden pompano, although excessive chitosan (10 g/kg) can reduce these benefits (Yu *et al.*, 2023). In tilapia, IgM levels increased significantly up to 1.5% chitosan but decreased at 2% (Zhang *et al.*, 2024). Additionally, recombinant chitosan nanoparticles show promise as alternatives to antibiotics in aquaculture, potentially enhancing disease resistance. This research supports using chitosan in beluga fry diets to improve growth and immune performance while reducing antibiotic reliance, particularly at levels of 0.45% to 0.6%, which positively affected growth, body composition, and immune parameters.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgment

The authors wish to convey their heartfelt appreciation to all colleagues who supported and facilitated the experiment's necessary infrastructure.

مقاله علمی - پژوهشی:

اثر خوراکی سطوح مختلف کیتوزان بر عملکرد رشد، ترکیب لاشه و شاخص‌های ایمنی - بیوشیمیایی سرم خون فیل ماهی (*Huso huso*) انگشت‌قد

محمود محسنی^{*}، فاطمه فداکار ماسوله^۱، مصطفی کرمی نسب^۲، دنیا ذاکری^۳

*mahmoudmohseni73@gmail.com

۱-انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش

و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

۲-شرکت تولید خوراک آبزیان بهدانه شمال، بابلسر، ایران

۳-دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، زیست‌شناسی دریا، جانوران دریا، تهران، ایران

تاریخ چاپ: اسفند ۱۴۰۳

تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: مهر ۱۴۰۳

چکیده

تحقیق حاضر به منظور بررسی اثرات سطوح مختلف کیتوزان به عنوان یک مکمل غذایی محرک رشد و ایمنی بر عملکرد رشد، ترکیب لاشه و برخی شاخص‌های خونی و سرم شناسی بچه فیل ماهی پرورشی (*Huso huso*) طراحی و اجرا گردید. تعداد ۱۲۶۰ عدد بچه فیل ماهی ($2/87 \pm 0/07$ گرم) در ۱۸ مخزن فایبر گلاس ۲۰۰۰ لیتری (۷۰ عدد ماهی در هر مخزن) با شش جیره آزمایشی شامل جیره شاهد (فاقد کیتوزان، T1)، کیتوزان با مقادیر ۰/۱۵ درصد (T2)، ۰/۳ درصد (T3)، ۰/۴۵ درصد (T4)، ۰/۶ درصد (T5) و ۰/۷۵ درصد (T6) با ۳ تکرار در هر تیمار به مدت ۱۲ هفته تغذیه شدند. وزن نهایی، شاخص رشد ویژه، نسبت بازده پروتئین و ضریب تبدیل غذایی ماهیان تغذیه شده با سطوح ۰/۴۵ درصد و بالاتر کیتوزان به طور معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد کمتر بود ($p < 0/05$). میزان پروتئین و چربی لاشه با افزایش میزان کیتوزان در جیره غذایی نسبت به گروه شاهد به ترتیب افزایش و کاهش معنی‌داری داشت ($P \leq 0/05$). شاخص‌های ایمنی لیزوزیم، کمپلمان ACH50، ایمونوگلوبولین تام و IgM نیز با افزایش میزان کیتوزان در جیره غذایی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری یافت ($p < 0/05$). در نتیجه، به منظور دستیابی به حداکثر رشد، ترکیب بهینه لاشه و شاخص‌های ایمنی-بیوشیمیایی خون در بچه فیل ماهی پرورشی، پیشنهاد می‌شود از میزان ۰/۴۵-۰/۶ درصد کیتوزان در جیره غذایی این ماهی استفاده گردد.

لغات کلیدی: فیل ماهی، کیتوزان، رشد، ترکیب لاشه، شاخص‌های خونی

*نویسنده مسئول



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

مقدمه

امروزه آبی‌پروری با توجه به روند رو به رشد جمعیت جهان و نیاز انسان‌ها به منابع پروتئینی متنوع و سالم، نقش مهمی در تأمین این ماده ارزشمند ایفاء می‌کند. پرورش و تولید موفق در صنعت آبی‌پروری، نیازمند استفاده از خوراک کامل و کارآمد با ترکیب بهینه و مناسب است (Mohseni *et al.*, 2014). کاهش هزینه‌های تولید به‌خصوص هزینه خوراک ماهی که ۶۰ درصد هزینه تولید را تشکیل می‌دهد (Khan *et al.*, 2021) و تلاش بر تولید محصولات با کیفیت و متنوع با ارزش افزوده بالاتر، دو اقدام ضروری برای توسعه پایدار این صنعت نو پای ماهیان خاویاری در کشور است. بروز بیماری در مزارع پرورشی با توجه به شرایط پرورش از قبیل مدیریت نامناسب تغذیه و پرورش از جمله جیره غذایی نامناسب، افزایش تراکم کشت، تغییرات شدید در شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی آب و ... غیر قابل اجتناب است (Ndashe *et al.*, 2023). تا کنون درمان اختصاصی برای تعدادی از بیماری‌های آبی‌زیان مشخص نشده و نتیجه درمان‌های دارویی در شرایط تجربی، اغلب با شرایط طبیعی و عملی متفاوت است. برخی درمان‌ها در فصل رشد، فصل زمستان یا در واحدهای پرورش به‌خصوص در سیستم‌های آب برگشتی با ظرفیت‌های توده زنده بسیار زیاد قابل اجرا نیستند و هزینه درمان دارویی در این موارد بسیار زیاد است. همچنین ماندگاری مواد شیمیایی و دارویی در بدن ماهی به‌خصوص در خاویار استحصالی، اثرات مضر برای مصرف‌کننده، بازار فروش و محیط زیست خواهد داشت. به این علت پیشگیری از بیماری‌ها اهمیت بسیار بیشتری نسبت به درمان دارد (Wang *et al.*, 2017). به علت مشکلات مذکور امروزه برای پیشگیری از بیماری‌های عفونی و غیرعفونی در صنعت آبی‌پروری به جای دارو درمانی از محرک‌های ایمنی و سایر افزودنی‌ها از جمله اسیدهای آلی، پروبیوتیک و پریوتیک با خاصیت ضد اکسایشی برای به حداقل رساندن یا جلوگیری از آسیب در شرایط تنش و تقویت دستگاه دفاعی و بهبود خصوصیات فیزیولوژیک به آبی‌پروری پایدار کمک می‌کنند (Dawood *et al.*, 2023).

بنابراین، استفاده از محرک‌های رشد و ایمنی در آبی‌زیان در سال‌های اخیر رشد بی‌سابقه‌ای یافته است (Du *et al.*, 2022). امروزه استفاده از محرک‌های رشد با منشاء طبیعی به دلیل عواملی مانند ارزش اقتصادی و کم هزینه بودن تولید آنها، نداشتن اثرات تخریبی بر محیط زیست (داروهای ارگانیک)، کم بودن عوارض جانبی در مقایسه با داروهای شیمیایی و عدم ایجاد مقاومت نسبی عوامل بیماری‌زا به این محرک‌ها منجر شده است تا این منابع ارزشمند دارویی از ارزش و جایگاه خاصی در درمان برخوردار باشند (Mohseni *et al.*, 2023). گزارش شده است که محرک‌هایی مانند کیتین، کیتوزان، لاکتوفرین، گلوکان و لوامیزول باعث تحریک دستگاه ایمنی ماهی و میگو شده‌اند (Pothiraj *et al.*, 2024). کیتوزان سبب تسهیل عمل یاخته‌های بیگانه خوار و افزایش فعالیت ضدباکتریایی آنها شده است (Goy *et al.*, 2009). کیتوزان نوعی پلی ساکارید زیست تخریب‌پذیر و زیست سازگار بوده (Picos-Corrales *et al.*, 2023) که از نظر ساختار شیمیایی پلیمری از گلوکز آمین است که از استیل‌زدایی کیتین به‌دست می‌آید (Nagaoka *et al.*, 2019). کیتوزان در اسکلت خارجی سخت‌پوستان، حشرات، دیواره سلولی برخی قارچ‌ها، مخمر و جلبک، یافت می‌شود که بیش‌ترین مقدار آن در پوسته میگو هست (Hisham *et al.*, 2021). اثرات مفید متعددی در آبی‌پروری به‌ویژه در افزایش سلامت و رشد ماهی دارد. نحوه عملکرد آن شامل تحریک ایمنی است که در آن شاخص‌های ایمنی مانند ایمونوگلوبولین M (IgM) و فعالیت لیزوزیم را تقویت می‌کند و در نتیجه مقاومت به بیماری را بهبود می‌بخشد (Mulyani, 2022; Yu *et al.*, 2023). کیتوزان همچنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد و با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT)، استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد. علاوه‌براین، با افزایش طول پرزهای روده و فعالیت آنزیم‌های گوارشی که جذب بهتر مواد مغذی و عملکرد رشد را تسهیل می‌کند، سلامت روده را بهبود می‌بخشد (Mukarram *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2023).

استفاده از هیدروکسید سدیم ۹٪ با نسبت (w/v) ۱:۲۰ به مدت ۴ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در آون انجام شد. رنگ‌زدایی نیز با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۳۲٪ به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط به نسبت (w/v) ۱:۱۵ انجام شده و پلیمر کیتین حاصل شد. برای حصول کیتوزان از کیتین استیل‌زدایی به‌وسیله هیدروکسید سدیم ۵۵٪ به مدت ۱ ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد با نسبت (w/v) ۱:۲۰ صورت گرفت. برای تعیین درجه استیل‌زدایی عدد جذبی کیتوزان به‌وسیله FTIR^۱ در طول موج $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ ثبت شد. *deacetylation* degree کیتوزان محاسبه شد که ۸۰٪ بود (Fernandez-Kim, 2004).

نحوه تهیه جیره‌های غذایی

به منظور تهیه جیره‌های غذایی، ابتدا ترکیبات غذایی مورد نیاز برای تجزیه و تحلیل به آزمایشگاه (تجزیه و تحلیل غذایی مرکز تحقیقات علوم دامی کشور) منتقل گردید تا بر اساس اطلاعات صحیح از ترکیب مواد اولیه نسبت به تنظیم جیره‌ها اقدام گردد (جدول ۱). هفت جیره آزمایشی ایزو کالریک (۲۰ مگاژول انرژی خام در هر کیلوگرم جیره) و با پروتئین خام یکسان (۴۳ درصد پروتئین) فرموله شدند. شش جیره غذایی با سطوح منابع مختلف کیتوزان شامل سطوح ۰/۱۵، ۰/۳، ۰/۴۵، ۰/۶ و ۰/۷۵ درصد فرموله شد و نتایج با جیره شاهد (عاری از کیتوزان) مقایسه شدند.

مواد خشک قبل از ترکیب با مواد مرطوب با استفاده از آسیاب (شرکت دامیکور، تهران) به قطر ۲۰۰ میکرون تبدیل شدند. برای تهیه سطوح مختلف کیتوزان، مکمل کیتوزان (با خلوص ۸۰ درصد) در مخلوط کننده مکمل معدنی و ویتامینی اضافه گردید، سپس با آرد گندم به مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از دستگاه هم‌زن^۲ (شرکت گرماالکتریک، آمل)، کاملاً با یکدیگر مخلوط شدند. سپس دوباره مخلوط حاصل به سایر ترکیبات اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه دیگر مخلوط شدند. اجزای خشک غذا پس از

et al., 2024). توانایی کیتوزان در کلاته کردن فلزات سنگین (کادمیوم) و کاهش اثرات سمی آنها را بر ماهی تأثیر به‌سزایی دارد (Zhou *et al.*, 2013). علاوه‌براین، خواص ضد باکتریایی آن به حفظ تعادل میکروبیوتای روده کمک کرده و در عین حال از عوامل بیماری‌زا جلوگیری کرده و باکتری‌های مفید را تقویت می‌کند (Dawood *et al.*, 2020; Say *et al.*, 2023). به طور کلی، مکمل غذایی کیتوزان باعث افزایش رشد، سلامت و مقاومت در برابر استرس در گونه‌های مختلف ماهی گزارش شده و آن را به یک افزودنی ارزشمند در آبی‌پروری تبدیل کرده است (Yan *et al.*, 2017; Chen and Chen, 2019; Abdel-Ghany and Salem, 2020; Méndez-Martínez *et al.*, 2023; Zakeri *et al.*, 2024).

فیل‌ماهی (*Huso huso*) یکی از مهم‌ترین تاسماهیان بومی ایران با ارزش تجاری بالا جهت پرورش در آب شیرین و لب‌شور است. کاهش تلفات بچه ماهیان، بالابردن سرعت رشد و تولید بیشتر در واحد سطح یکی از اهداف تولید کنندگان برای رسیدن به صرفه اقتصادی است. بنابراین، ارائه یک جیره غذایی مناسب و تعادل ریز مغذی‌های آن در نتیجه تقویت دستگاه ایمنی بدن و افزایش بازدهی تولید، از اصلی‌ترین نیازهای پرورش دهندگان و مهم‌ترین رویکرد محققان است. در این عرصه، مطالعه حاضر با هدف مقایسه اثرات سطوح متفاوت کیتوزان بر شاخص‌های رشد، ترکیب لاشه، برخی شاخص‌های خونی، ایمنی و بیوشیمیایی سرم بچه فیل‌ماهی پرورشی به عنوان یکی از گونه‌های با ارزش اقتصادی، طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش کار

استخراج کیتوزان

استخراج کیتوزان از پوسته میگو (*Penaeus semisulcatus*) طی چهار مرحله مینرال‌زدایی، پروتئین‌زدایی، رنگ‌زدایی و استیل‌زدایی صورت گرفت. مینرال‌زدایی با استفاده از هیدروکلریک اسید ۷٪ به مدت ۴ ساعت در آون با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد با نسبت پودر به اسید (w/v) ۱:۲۰ صورت گرفت. پروتئین‌زدایی با

¹ Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)

² Ribbon mixer

شماره‌گذاری و در محفظه‌های عاری از هوا بسته‌بندی شده و تا زمان مصرف در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. یک ساعت قبل از مصرف و توزیع غذا، جیره‌ها از فریزر خارج شدند و پس از متعادل شدن با دمای اتاق، با استفاده از ترازوی دیجیتال توزین و در اختیار ماهیان قرار گرفتند.

مخلوط کامل با یکدیگر با روغن مخلوط و سپس آب ولرم به آن اضافه گردید تا یک خمیر سفت تشکیل شود. پس از اطمینان از مخلوط شدن تمامی ترکیبات به صورت همگن و یکنواخت، محصول نهایی با استفاده از یک چرخ دستگاه پلت زن (CPM, California Pellet Mill Co., San Francisco, Ca, USA) با توجه به اندازه دهان ماهی به قطر ۲ میلی‌متر پلت شدند. سپس پلت‌ها با استفاده از خشک کن در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت تا رطوبت تقریبی ۱۰ درصد خشک

جدول ۱: اجزای غذایی و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی محتوی درصدهای مختلف کیتوزان

Feed components%	Control	T2 (0.15% chitosan)	T3 (0.3% chitosan)	T4 (0.45% chitosan)	T5 (0.6% chitosan)	T6 (0.75% chitosan)
Fish meal	46	45.85	45.7	45.55	45.4	45.25
Soybean meal	10	10	10	10	10	10
Wheat flour	15	15	15	15	15	15
Wheat gluten	7	7	7	7	7	7
Corn gluten	6	6	6	6	6	6
Poultry meal	3	3	3	3	3	3
Lecithin	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Fish oil	5	5	5	5	5	5
Starch	3	3	3	3	3	3
Sodium bicarbonate	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Chitosan	0	0.15	0.3	0.45	0.6	0.75
Threonine	1	1	1	1	1	1
Vitamin premix*	1	1	1	1	1	1
Mineral premix*	1	1	1	1	1	1
Chemical analysis						
Crude protein	43.3	43.5	43.4	43.5	43.6	43.2
Crude Fat	13.2	13.5	13.2	13.4	13.4	13.5
Ash	8	8	8	8	8	8
Fiber	1	1	1	1	1	1

*Vitamin premix (measured in IU or milligrams per kilogram of feed):

D-alpha-tocopherol acetate 60 IU, D-alpha-cholecalciferol 3000 IU, thiamine 15 mg/kg, riboflavin 30 mg/kg, pyridoxine 15 mg/kg, vitamin B12 0.05 mg/kg, nicotinic acid 175 mg/kg, folic acid 5 mg/kg, ascorbic acid 500 mg/kg, inositol 1000 mg/kg, biotin 2.5 mg/kg, calcium pantothenate 50 mg/kg.

*Mineral premix (milligram or gram per kilogram of feed):

Calcium Carbonate: 15.2 (g/kg), Magnesium Oxide: 1.24 (g/kg), Ferric Citrate: 0.2 (g/kg), Potassium Iodide: 0.4 (mg/kg), Copper Sulfate: 0.3 (g/kg), Manganese Sulfate: 0.3 (g/kg), Dicalcium Phosphate: 5 (g/kg), Cobalt Sulfate: 2 (mg/kg), Sodium Selenite: 3 (mg/kg), Potassium Chloride: 0.9 (g/kg), Sodium Chloride: 0.4 (g/kg)

ابتدای آزمایش تعداد ۲۸۰ عدد بچه فیل ماهی با وزن متوسط $2/87 \pm 0/09$ گرم (سازگار شده با غذای کنسانتره)، به طور تصادفی در ۱۸ مخزن فایبرگلاس (قطر ۱۰۵ سانتی‌متر، ۵۱ سانتی‌متر ارتفاع و حجم آب ۵۰۰

تهیه ماهیان و نحوه پرورش

ماهیان از یکی از واحدهای پرورشی بخش خصوصی تأمین و انتقال یافتند. به مدت ۴ هفته در مخازن فایبرگلاس به شرایط جدید پرورشی با جیره شاهد سازگار گردیدند. در

زیست‌سنجی، غذادهی ماهیان قطع گردید. برای نمونه‌برداری و زیست‌سنجی، ماهیان با محلول پودر گل‌میخک (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بیهوش شدند (Hassan et al., 2021).

تعیین شاخص‌های رشد

با استفاده از اطلاعات وزن ماهیان در هر وان، شاخص‌های محاسباتی شامل متوسط وزن نهایی، وزن کسب شده، شاخص رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی، ضریب چاقی، نسبت بازده پروتئین و شاخص کبدي با استفاده از نتایج Otubusin و همکاران (۲۰۰۹) برای ماهی‌های هر تانک محاسبه شد:

$$\begin{aligned} \text{ضریب رشد ویژه (SGR)} &= [(\text{لگاریتم طبیعی وزن نهایی} - \text{لگاریتم طبیعی وزن اولیه}) \div \text{مدت زمان افزایش وزن}] \times 100 \\ \text{ضریب تبدیل غذایی (FCR)} &= \text{گرم غذای خورده شده} \div \text{گرم افزایش وزن} \\ \text{درصد افزایش بدن (BWI)} &= [(\text{وزن ثانویه} - \text{وزن اولیه}) \div \text{وزن اولیه ماهی}] \times 100 \\ \text{نسبت بازده پروتئین (PER)} &= \text{افزایش وزن} \div \text{پروتئین مصرفی} \end{aligned}$$

با درجه استیل‌زدایی ۸۰ درصد و جرم مولکولی متوسط با مقادیر ۰/۱۵ درصد در جیره (T2)، ۰/۳ درصد (T3)، ۰/۴۵ درصد جیره (T4)، ۰/۶ درصد جیره (T5) و ۰/۷۵ درصد جیره (T6) با ۳ تکرار در هر تیمار به مدت ۱۲ هفته تغذیه شدند.

خون‌گیری و تهیه سرم از بچه‌فیل ماهیان پرورشی

جهت سنجش برخی شاخص‌های خون شناسی و بیوشیمیایی ایمنی سرم، ۳ عدد ماهی از هر تکرار برداشت گردید و به مدت ۱۰ دقیقه ماهی‌ها در محلول پودر گل‌میخک قرار گرفتند و پس از بیهوشی کامل، خونگیری از ساقه دمی توسط سرنگ‌های استریل ۲ میلی‌لیتری انجام شد. جهت تهیه سرم، نمونه‌ها پس از ۶ ساعت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و لخته شدن کامل، با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس نمونه سرم خون هر تکرار بوسیله سمپلر برداشته شد و پس از انتقال به لوله‌های اپندورف،

لیتر) در فضای سر پوشیده مجهز به سیستم هوادهی، تخلیه آب مرکزی و شیرهای تنظیم آب (به صورت فواره‌ای) با دبی آب ۴/۷۵ لیتر در دقیقه (آب چاه) در قالب یک طرح آماری کاملاً تصادفی متعادل ذخیره و با جیره‌های آزمایشی به مدت ۱۲ هفته تغذیه شدند. دوره نوری به صورت ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی تنظیم گردید. میانگین دما، اکسیژن و pH در طول دوره پرورش به ترتیب $21/30 \pm 0/53$ درجه سانتی‌گراد، $7/46 \pm 0/25$ میلی‌گرم در لیتر و $8/52 \pm 0/09$ ، قلیائیت $320/3 \pm 16/5$ میلی‌گرم در لیتر، سختی کل $247/5 \pm 4/9$ میلی‌گرم در لیتر، آمونیم (NH_4) $0/11 \pm 0/00$ میلی‌گرم در لیتر بودند. ماهیان ۴ بار در روز و در ساعات ۸، ۱۴، ۲۰ و ۲ صبح تا حد سیری و به صورت دستی غذادهی شدند. به منظور کاهش استرس، ۱۲ ساعت قبل و بعد از

تجزیه و تحلیل اجزا، جیره غذایی و ترکیب بدن

تجزیه و تحلیل تقریبی ترکیبات، مواد اولیه و جیره‌های آزمایشی بر اساس روش‌های استاندارد جیره (AOAC, 1995) انجام شد. پس از ۱۲ ساعت قطع غذادهی به منظور اطمینان از تخلیه محتویات شکمی ماهیان، در پایان دوره پرورش از هر تکرار ۲ عدد ماهی به طور تصادفی برداشت شد و پس از خارج کردن امعا و احشا، برای تجزیه و تحلیل لاشه به آزمایشگاه ارسال گردید. برای اندازه‌گیری رطوبت، نمونه‌ها در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت تا رسیدن به یک وزن ثابت، خشک شدند. پروتئین با برآورد نیتروژن کل ($\text{N} \times 6/25$) از روش کجلدال، چربی با روش سوکسله و با استفاده از حلال کلروفورم با نقطه جوش ۵۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ ساعت و خاکستر با سوزاندن در کوره الکتریکی با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۹ ساعت اندازه‌گیری شدند. ماهیان با شش جیره آزمایشی شامل جیره شاهد (فاقد کیتوزان، T1)، کیتوزان

اطمینان ۹۵ درصد انجام شد. کلیه تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار SPSS (version 24, Chicago, IL, USA) صورت گرفت. داده‌ها در متن به صورت (انحراف معیار \pm میانگین) ارائه شده‌اند.

نتایج

شاخص‌های کیفی آب هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری را در طول دوره پرورش نسبت به یکدیگر نشان ندادند ($p > 0/05$). در طول دوره پرورش، هیچ‌گونه تلفاتی مشاهده نشد.

شاخص‌های رشد

تأثیر سطوح مختلف کیتوزان در پایان ۱۲ هفته پرورش بر شاخص‌های رشد ماهی در جدول ۲ ارائه شده است. شاخص‌های وزن نهایی بدن (گرم) و افزایش وزن بدن در تیمارهای حاوی ۰/۴۵، ۰/۶ و ۰/۷۵ درصد کیتوزان به طور معنی‌داری نسبت به تیمارهای شاهد، ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد کیتوزان بیشتر بود. ضریب رشد ویژه با افزایش میزان کیتوزان به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت و تنها در گروه تغذیه شده با کیتوزان ۰/۱۵ درصد هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل مشاهده نشد. شاخص کبدی در تمامی تیمارهای تغذیه شده با کیتوزان نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری بهبود یافت ($p < 0/05$). ضریب تبدیل خوراک با افزایش میزان کیتوزان نسبت به گروه کنترل به صورت معنی‌داری بهبود یافت. نسبت بازدهی پروتئین نیز در تیمارهای تغذیه شده با ۰/۴۵، ۰/۶ و ۰/۷۵ درصد کیتوزان نسبت به گروه کنترل افزایش یافت اما در تیمارهای تغذیه شده با غلظت‌های ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد کیتوزان هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشتند ($p > 0/05$).

ترکیب بدن

کمترین میزان پروتئین لاشه متعلق به تیمار شاهد بود که نسبت به پروتئین لاشه سایر تیمارها، به استثناء تیمار کیتوزان ۰/۱۵ درصد، دارای اختلاف معنی‌دار آماری بود ($p < 0/05$). میزان پروتئین لاشه در تیمارهای ۰/۴۵، ۰/۶ و ۰/۷۵ درصد کیتوزان بیشترین مقدار بوده ولی اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد.

در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تازمان سنجش پارامترهای سرمی نگهداری گردید.

اندازه‌گیری فراسنجه‌های ایمنی سرم

در پایان دوره پرورش، جهت بررسی برخی شاخص‌های ایمنی سرم از ۳ عدد ماهی بطور تصادفی برداشت شده از هر تکرار خونگیری و شاخص‌هایی نظیر ایمونوگلوبولین کل و لیزوزیم اندازه گیری گردید. سنجش مقادیر ایمونوگلوبولین کل سرم بوسیله دستگاه نفلومتری Minineph (Binding site- انگلستان) و با استفاده از کیت آزمایشگاهی Binding site به روش نفلومتری (Siwicki *et al.*, 1994) و لیزوزیم سرم، با استفاده از فعالیت باکتریایی و به روش کدورت سنجی بوسیله فعالیت باکتری *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698) انجام گردید (Subramanian *et al.*, 2007). از نمونه سرم با ۱۵۰ میکرو لیتر سوسپانسیون باکتری *M. lysodeikticus* تهیه شده در بافر ۰/۰۲ مولار سدیم استات و pH ۵/۵ به میزان ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر اضافه شد و جذب نوری اولیه در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در ادامه، جذب نوری نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت پس نگهداری نمونه‌ها در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد، مجدداً اندازه‌گیری شد. در این مطالعه از لیزوزیم سفیده تخم مرغ لیوفیلیزه شده برای ترسیم منحنی استاندارد استفاده شد. سنجش عامل مکمل کمپلمان (ACH50) طبق روش Matsuyama و همکاران (۱۹۸۸) انجام شد.

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۶ تیمار و ۳ تکرار انجام شد. ابتدا نرمال بودن کلیه داده‌های کسب شده با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov و همگنی واریانس‌ها با آزمون Levene کنترل شد. سپس داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه (One-Way ANOVA) مورد سنجش قرار گرفت. زمانی که اختلاف معنی دار بین داده‌های محاسباتی مشاهده شد، برای بررسی اختلاف آماری فاکتورهای محاسبه شده، مقایسه میانگین‌ها به وسیله آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح

جدول ۲: مقایسه شاخص‌های رشد فیل ماهی انگشت قد تغذیه شده با غلظت‌های مختلف کیتوزان به مدت ۱۲ هفته (میانگین \pm انحراف معیار؛ n=۳)

Table 2: Comparison of growth indices of beluga sturgeon fingerlings fed different doses of chitosan in (Mean \pm SD; n=3)

Parameters	Treatment					
	Control	T2 (0.15% chitosan)	T3 (0.3% chitosan)	T4 (0.45% chitosan)	T5 (0.6% chitosan)	T6 (0.75% chitosan)
W 1 (g)	2.88 \pm 0.05 ^a	2.88 \pm 0.09 ^a	2.86 \pm 0.11 ^a	2.86 \pm 0.09 ^a	2.87 \pm 0.07 ^a	2.87 \pm 0.07 ^a
W 2 (g)	100.22 \pm 6.67 ^b	104.30 \pm 3.01 ^b	110.41 \pm 4.58 ^b	122.17 \pm 6.40 ^a	131.00 \pm 5.62 ^a	122.58 \pm 7.29 ^a
BWG%	3378.71 \pm 282.90 ^b	3522.10 \pm 171.67 ^b	3762.74 \pm 166.91 ^b	4180.07 \pm 206.79 ^a	4474.25 \pm 299.48 ^a	4174.02 \pm 159.45 ^a
S.G.R	4.22 \pm 0.10 ^c	4.27 \pm 0.06 ^{bc}	4.35 \pm 0.05 ^b	4.47 \pm 0.06 ^a	4.55 \pm 0.08 ^a	4.47 \pm 0.04 ^a
HSI	3.64 \pm 0.05 ^a	2.99 \pm 0.02 ^b	3.16 \pm 0.26 ^b	3.05 \pm 0.08 ^b	3.16 \pm 0.04 ^b	2.99 \pm 0.04 ^b
FCR	1.28 \pm 0.06 ^a	1.22 \pm 0.03 ^{ab}	1.17 \pm 0.04 ^b	1.06 \pm 0.04 ^c	0.99 \pm 0.07 ^c	1.07 \pm 0.06 ^c
PER	2.18 \pm 0.11 ^b	2.27 \pm 0.05 ^b	2.38 \pm 0.07 ^b	2.62 \pm 0.10 ^a	2.82 \pm 0.19 ^a	2.60 \pm 0.15 ^a

حروف غیر همنام در هر سطر نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد است.

Different lowercase letters in the same row indicate statistically significant differences

جدول ۳: مقایسه ترکیب لاشه فیل ماهی انگشت قد تغذیه شده با غلظت‌های مختلف کیتوزان به مدت ۱۲ هفته (میانگین \pm انحراف معیار؛ n=۳)

Table 3: Comparison of carcass composition of beluga sturgeon fingerlings fed different doses of chitosan in diets during 12 weeks (Mean \pm SD; n=3)

Parameters	Treatment					
	Control	T2 (0.15 chitosan)	T3 (0.3% chitosan)	T4 (0.45% chitosan)	T5 (0.6% chitosan)	T6 (0.75% chitosan)
Protein	15.29 \pm 0.10 ^c	15.39 \pm 0.21 ^{bc}	15.69 \pm 0.25 ^b	16.21 \pm 0.26 ^a	16.46 \pm 0.13 ^a	16.36 \pm 0.08 ^a
Lipid	7.67 \pm 0.03 ^a	7.63 \pm 0.16 ^a	7.48 \pm 0.10 ^{ab}	7.28 \pm 0.11 ^b	6.92 \pm 0.27 ^c	6.79 \pm 0.15 ^c
Ash	2.30 \pm 0.08 ^b	2.83 \pm 0.17 ^a	2.51 \pm 0.31 ^{ab}	2.84 \pm 0.30 ^a	2.86 \pm 0.36 ^a	2.86 \pm 0.17 ^a

حروف غیرهمنام در هر سطر نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد است.

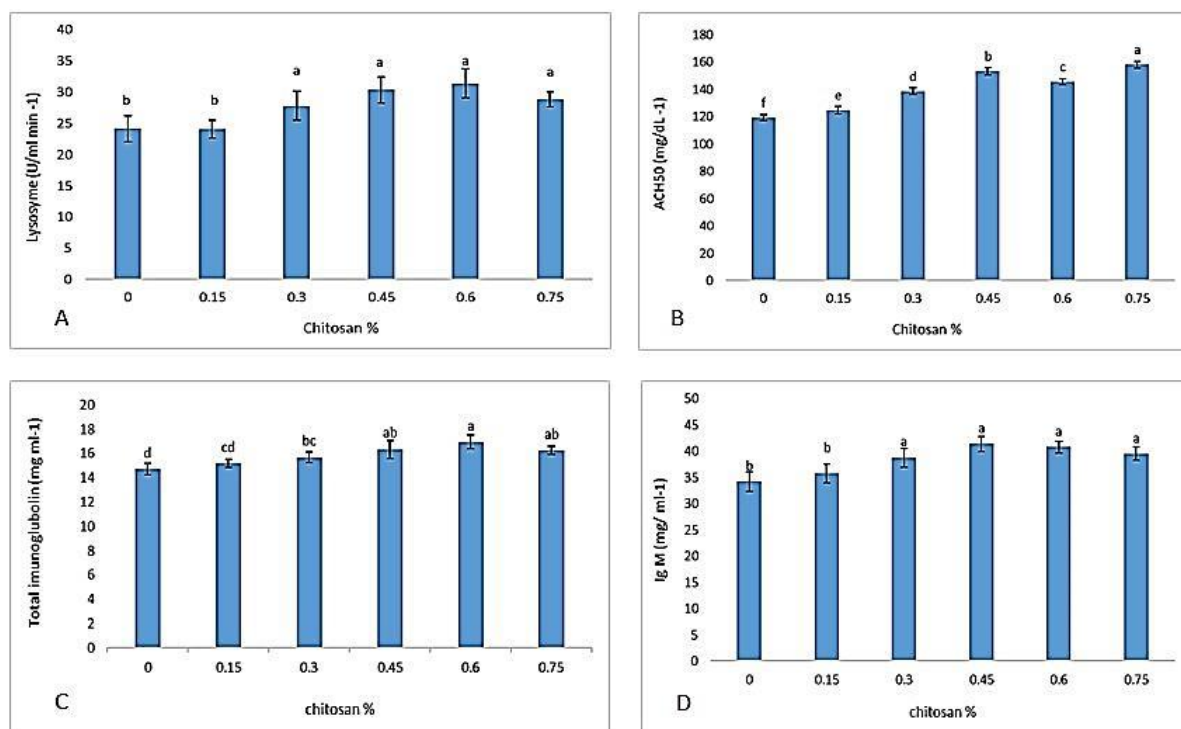
Different lowercase letters in the same row indicate statistically significant differences

نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری میزان فعالیت کمپلمان ACH50 در سرم خون نشان داد که با افزایش میزان کیتوزان در جیره غذایی این شاخص در سرم خون به صورت معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$). و در تیمار تغذیه شده با حداکثر کیتوزان ۰/۷۵ درصد، بیشترین میزان کمپلمان اندازه‌گیری شد. مقادیر ایمونوگلوبولین کل سرم و IgM در ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف کیتوزان نیز با افزایش میزان کیتوزان در سرم خون در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$).

میزان چربی لاشه نیز در تیمارهای ۰/۴۵، ۰/۶ و ۰/۷۵ درصد کیتوزان با اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کمترین میزان مشاهده شد ($p < 0.05$) (جدول ۳).

شاخص‌های ایمنی

نتایج حاصل از تأثیر جیره غذایی حاوی سطوح مختلف کیتوزان بر برخی از شاخص‌های ایمنی سرم در شکل ۱ ارائه شده است. با افزایش غلظت کیتوزان در جیره غذایی فیل ماهیان انگشت قد میزان لیزوزیم سرم خون در تمامی تیمارها بجز گروه مصرف کننده کیتوزان با غلظت ۰/۱۵ درصد، به صورت معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$).



شکل ۱- میزان فعالیت لیوزیم (A)، ACH50 (B)، ایمونوگلوبولین کل (C) و ایمونوگلوبولین M (D) در فیل ماهی انگشت قد تحت تأثیر جیره‌های حاوی غلظت‌های مختلف کیتوزان به مدت ۱۲ هفته (میانگین \pm انحراف معیار؛ n=3)

Figure 1: Activity levels of lysozyme (A), ACH50 (B), Total immunoglobulin (C) and Ig M (D) factors of beluga sturgeon fingerlings fed different doses of chitosan in diets during 12 weeks (Mean \pm SD; n=3)

غذایی بچه فیل ماهیان پرورشی بهبود یافت و این روند در ماهیان تغذیه شده با تیمارهای محتوی سطوح ۰/۴۵ و ۰/۶ درصد کیتوزان در جیره مشهودتر بود که حاکی از پتانسیل ارتقاءدهنده کیتوزان جیره بر نرخ جذب جیره غذایی در روده و عملکرد رشد بچه فیل ماهی پرورشی دارد. نتایج مشابهی در بهبود عملکرد رشد با افزودن کیتوزان به جیره غذایی ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) (Abd El-Naby *et al.*, 2020; El-Naggar *et al.*, 2022) و رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (Khani *et al.*, 2020) و هیبرید خاویاری (*A. baerii* \times *A. schrenckii*) (Li *et al.*, 2023) گزارش شده است. در مطالعات، اثبات شده است که کیتوزان نقش مهمی در افزایش هضم و جذب مواد مغذی دارد و این بهبود عملکرد رشد احتمالاً به دلیل نقش

بحث

در آبی‌پروری، تولید جیره غذایی و فراهم کردن شرایط محیطی مناسب، تقویت عملکردهای بیولوژیک و فیزیولوژیک، به منظور دستیابی به رشد بهینه و محافظت در برابر استرس و بیماری‌ها لازم و ضروری است. بنابراین استفاده از مواد ارزشمند تجدیدپذیر، پایدار و زیست‌فعال، مانند محرک‌های رشد (کیتوزان)، مورد توجه محققین حوزه آبی‌پروری قرار گرفته است (Wang *et al.*, 2017). همچنین در تغذیه ماهیان، کاربرد مکمل‌هایی که ماهیت پربیوتیک دارند، به عوامل زیادی از جمله، گونه جانوری، مرحله رشد، نوع پربیوتیک، دوز و برهمکنش‌های هم‌افزایی با سایر مواد غذایی بستگی دارد و با توجه به رشد حیوان می‌تواند متفاوت باشد (Ringø *et al.*, 2010). در پژوهش حاضر، مقادیر وزن نهایی و ضریب تبدیل غذایی با افزودن سطوح مختلف کیتوزان به جیره

چربی کل بدن مشاهده شد. کاهش مشابهی در چربی کل بدن در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های غنی شده با کیتوزان، صرف نظر از غلظت کیتوزان مشاهده شده است (Wu, 2020). این کاهش چربی را می‌توان به فعالیت کاهندگی چربی (هیپو لیپیدمیک) کیتوزان، در نتیجه کاهش تولید چربی، مهار جذب چربی از روده و افزایش دفع چربی (Wang *et al.*, 2017) و تأثیر بر ارتقاء فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی بدن و به دنبال آن کاهش پراکسیداسیون چربی نسبت داد (Zhang *et al.*, 2024). مکانیزم‌های تأثیر کیتوزان بر روند رشد ماهی کاملاً شناخته شده نیست به طوری که افزودن کیتوزان ۲ درصد در جیره غذایی در ماهی ۴۵ گرمی کپور معمولی موجب افزایش ایمنی غیر اختصاصی، کاهش مرگ‌ومیر و افزایش رشد شده است (Maqsood *et al.*, 2010) در حالی که تأثیر کیتوزان ۱ و ۲ درصد در جیره ماهی ۶۳ گرمی کپور معمولی تأثیر معنی‌داری بر مصرف خوراک، ضریب تبدیل خوراک و نسبت بازده پروتئین در ماهی کپور معمولی نداشته، اما به طور قابل توجهی تعداد واکنش‌ها و قطرات چربی را در کبد کپور معمولی کاهش داده است (Stanek *et al.*, 2023). این تفاوت راندمان آبی‌پروری را می‌توان به سلامت ماهی، مقاومت ماهی در برابر شرایط محیطی و کیفیت محصولات نهایی مرتبط دانست (Stanek *et al.*, 2023). همچنین اثرات کیتوزان بر کاهش متابولیسم چربی کبد در موش‌های دریافت‌کننده غذای پر چرب نیز به اثبات رسیده است (Chiu *et al.*, 2017).

سنجش فراسنجه‌های سرم‌شناسی به عنوان ابزاری ارزشمند برای نظارت بر وضعیت متابولیک و فیزیولوژیک ماهی شناخته می‌شوند، زیرا ماهیان در شرایط پرورشی در برابر بسیاری از عوامل باکتریایی فرصت‌طلب آسیب‌پذیر هستند. فعالیت لیزوزیم با وضعیت ایمنی و سلامت در آبزیان ارتباط مستقیم دارد (Wu, 2020). در مطالعه حاضر، فعالیت لیزوزیم به صورت وابسته به سطح کیتوزان جیره غذایی افزایش یافت. نتایج دستاوردهای تحقیقاتی نیز حاکی از تأثیر مثبت کیتوزان بر افزایش فعالیت لیزوزیم در لوچ ماهی (*Misgurnus anguillicaudatus*) (Yan *et al.*, 2017)، ماهی سوکلا (*Rachycentron*)

کیتوزان به عنوان محرک رشد در فعال‌سازی آنزیم‌های گوارشی از طریق تعدیل مناسب فلور میکروبی روده و در نتیجه فعال کردن پروبیوتیک‌هاست (Qin *et al.*, 2014). پروبیوتی‌ها آنزیم‌های گوارشی را برای هضم و جذب مواد مغذی از طریق پرزهای روده ترشح می‌کنند (Dawood *et al.*, 2018). همچنین کیتوزان می‌تواند موجب بهبود ساختار مورفولوژیک روده در نتیجه افزایش سطح پرزهای روده شود و جذب مواد مغذی و در نتیجه عملکرد رشد را بهبود بخشد (Abdel Ghany and Salem, 2020). بر این اساس، بررسی اثر کیتوزان بر میکرو فلور روده و آنزیم‌های گوارشی روده فیل ماهی در تکمیل مطالعات تغذیه آبیان مؤثر است.

مطالعه ترکیب تقریبی بدن ماهی‌ها می‌تواند وضعیت سلامتی آنها و اثرات شرایط محیطی را نشان دهد. کیتوزان موجب تعدیل میکروبیوتای روده شود که در نتیجه موجب افزایش آنزیم‌های گوارشی می‌شود و هضم و جذب مواد غذایی را افزایش می‌دهد که در نهایت می‌تواند بر ترکیب تقریبی بدن تأثیرگذار باشد. مقادیر اجزاء اصلی ترکیب بیوشیمیایی لاشه (پروتئین و چربی)، بر اساس تغییرات سنتز پروتئین و چربی در بدن، میزان ذخیره آنها در بافت‌های بدن و نرخ رشد ماهی متفاوت است (Abdel-Tawwab *et al.*, 2008). بنابراین، با استناد به یافته‌های این مطالعه، ارتقاء شاخص‌های رشد و پروتئین لاشه در کل تیمارهای تغذیه شده با سطوح مختلف کیتوزان به خصوص سطوح بهینه آن در تیمارهای ۴ و ۵ را می‌توان با اثرات احتمالی سطوح مورد آزمایش کیتوزان بر کاهش کاتابولیسم پروتئین و افزایش سنتز گلوکز از کربوهیدرات (Salam *et al.*, 2021) و در نهایت افزایش ذخیره پروتئین^۱ در ماهیچه بچه فیل ماهیان پرورشی مرتبط دانست. کیتوزان نقش مهمی در تعدیل گیرنده‌های بویایی، گیرنده عامل رشد اپیدرمی و گیرنده حسگر کلسیم ایفاء می‌کند (Xu *et al.*, 2017). در این زمینه، برخی مطالعات نیز به نتایج مشابهی در سایر ماهیان دست یافته‌اند (Ismael *et al.*, 2021). با افزایش سطح کیتوزان جیره غذایی، کاهش قابل توجهی در محتوای

¹ Protein-sparing

کمپلمان به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت (Mari et al., 2014). البته باید توجه داشت که واکنش گونه‌های مختلف ماهی نسبت به غلظت‌های مختلف کیتوزان متفاوت بوده و در اصطلاح مختص به گونه است تا جایی که در برخی مطالعات مصرف طولانی مدت غلظت ۲ درصد کیتوزان را در جیره برای سلول‌ها مخرب گزارش داده‌اند (Shiau and Yu., 1999).

IgM، ایمونوگلوبولین اصلی در ماهی است (Watts et al., 2001) و با پیشگیری مؤثر از باکتری‌می و خنثی کردن سموم و سمیت ویروسی، به عنوان یک جزء محوری در ایمنی هومورال تطبیقی ماهیان استخوانی عمل می‌کند (Bag et al., 2009). در بررسی حاضر، مقادیر متوسط IgM در تیمارهای تغذیه شده محتوی ۷/۵-۳ گرم کیتوزان بر کیلوگرم جیره با نمونه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار آماری بود. این نتایج با مطالعه Chen و Chen (۲۰۱۹) همخوانی داشت به طوری که در مطالعه آنان ماهیان تغذیه شده در سطوح ۵ گرم کیتوزان بر کیلوگرم در جیره غذایی لوچ ماهی (*M. anguillicadatus*) و ازون برون پرورشی (Zakeri et al., 2024) موجب افزایش لیروزیم و IgM گردید. در ماهی بارب نقره‌ای (*Barbonymus gonionotus*) تغذیه شده با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ درصد کیتوزان در جیره غذایی به مدت ۶۰ روز، غلظت لیروزیم و IgM نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت، اما حداکثر میزان اندازه گیری شده در تیمار ۰/۱ درصد گزارش شد. دلیل این افزایش هنوز کاملاً شناسایی نشده و مطالعات بیشتری برای کشف مکانیسم اساسی این افزایش و کاهش IgM با تغییر غلظت کیتوزان مورد نیاز است (Salam et al., 2024).

در نتایج حاصل از مطالعه Khani Oushani و همکاران (۲۰۲۰) نیز افزایش سطح IgM و پروتئین کل در قزل آلا رنگین کمان تغذیه شده با جیره‌های حاوی کیتوزان مشاهده شد. Yu و همکاران (۲۰۲۳) نیز تأثیر افزودن کیتوزان (۰، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ گرم بر کیلوگرم) به جیره غذایی ماهی پومفرت طلائی (*Trachinotus ovatus*) را بررسی کردند و نتایج نشان داد که کیتوزان موجب افزایش

(Geng et al., 2011) و تأثیر نانو ذرات کیتوزان بر افزایش فعالیت لیروزیم در گونه کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) (Younus et al., 2020)، میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) و ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Khani Oushani et al., 2020) بوده است که همسو با نتایج به‌دست آمده از این پژوهش هستند. به طور مشابهی افزودن کیتوزان در جیره غذایی سبب افزایش فعالیت لیروزیم در گونه ازون برون (*Acipenser stellatus*) نیز شد (Zakeri et al., 2024). همچنین مطالعات نشان داد که در هیبرید خاویاری (*A. baerii* ♀ × *A. schrenckii* ♂) فعالیت لیروزیم با افزایش کیتوزان غذایی افزایش یافت (Li et al., 2023; Xu et al., 2023). بنابراین، با توجه به مطالب مذکور می‌توان اذعان نمود، افزودن کیتوزان به مقدار بهینه در جیره غذایی فیل ماهی تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر سیستم ایمنی با توجه به توانایی مهار بالای رادیکال‌های آزاد (۸۳/۴ درصد)، به دلیل وجود گروه‌های یون آمونیوم (NH_3^+) موجود در ساختار کیتوزان دارد. مکانیسم احتمالی اثرات کیتوزان بر ایمنی ذاتی را می‌توان این‌گونه بیان نمود، گروه‌های آمین (NH_2) کیتوزان و یون‌های هیدروژن (H^+) در محلول‌های اسیدی واکنش می‌دهد و یون آمونیوم شکل می‌گیرد. رادیکال‌های آزاد که مولکول‌هایی بسیار ناپایدارند، با یون هیدروژن واکنش می‌دهند و سپس به شکل پایدار تغییر می‌یابند (Xu et al., 2023).

فعالیت کمپلمان یکی از مهم‌ترین پاسخ‌های ایمنی هومورال است که با پاسخ‌های فاگوسیتی مرتبط است (Ellis, 1999). این سیستم نقش کلیدی در ایمنی غیر اختصاصی داشته و در فرایندهای کموتاکسی و لیز سلولی نیز دخالت دارد (Tollabian and Kamali, 2022). در ماهی تیلپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) تغذیه شده با کیتوزان ۲ درصد در جیره غذایی، فعالیت ACH50 نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت (Abu-Elala et al., 2015). در ماهی مریگال (*Cirrhina mrigala*) که با کیتوزان ۱ درصد در جیره تغذیه شد نیز طی ۴-۲ هفته پس از آغاز آزمایش، فعالیت

- morphology of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 515:734577. DOI:10.1016/j.aquaculture.2019.734577
- Abdel-Ghany, H.M. and Salem, M.E.S., 2020.** Effects of dietary chitosan supplementation on farmed fish; a review. *Reviews in Aquaculture*, 12(1), 438-452. DOI:10.1111/raq.12326
- Abdel-Tawwab, M., Abdel-Rahman, A.M. and Ismael, N.E., 2008.** Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 280(1-4):185-189. DOI:10.1016/j.aquaculture.2008.03.055
- Abu-Elala, N.M., Mohamed, S.H., Zaki, M.M. and Eissa, A.E., 2015.** Assessment of the immune-modulatory and antimicrobial effects of dietary chitosan on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with special emphasis to its bio-remediating impacts. *Fish & Shellfish Immunology*, 46(2), 678-685. DOI:10.1016/j.fsi.2015.08.004
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists), 1995.** Official methods of analysis. Washington, DC: Association of Official Agricultural Chemists. Vol. 12, pp 13.
- Bag, M.R., Makesh, M., Rajendran, K.V. and Mukherjee, S.C., 2009.** Characterization of IgM of Indian major carps and their cross-reactivity with anti-fish IgM antibodies. *Fish & shellfish*
- IgM و فعالیت لیزوزیم گردید، اما در سطح ۱۰ گرم بر کیلوگرم مقدار IgM و فعالیت لیزوزیم کاهش یافت که نشان می‌دهد سطح بالای کیتوزان برای بهبود پاسخ‌های ایمنی در ماهی ضروری نیست. در ماهی تیلاپیای تغذیه شده با سطوح مختلف کیتوزان نیز سطوح IgM با افزایش غلظت کیتوزان تا ۱/۵ درصد نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری یافت اما در غلظت ۲ درصد کیتوزان این میزان همچنان با حفظ معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نسبت به گروه‌های با کیتوزان کمتر، کاهش یافت (Zhang *et al.*, 2024). در مطالعه González-Chavarría و همکاران (۲۰۲۳) بر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، نشان داده شد که پپتید نوترکیب ریز ذره کیتوزان می‌تواند یک جایگزین پیشگیری‌کننده بالقوه برای آنتی‌بیوتیک‌های معمولی برای درمان بیماری‌های عفونی در آبی‌پروری باشد. همچنین پیشنهاد شد که این پپتید محرک ایمنی ریز کپسوله شده می‌تواند در فرمولاسیون غذا و به عنوان یک کمکی در واکسیناسیون ماهی استفاده شود و یک استراتژی بالقوه برای بهبود مقاومت ماهی در برابر بیماری ارائه دهد.
- در مطالعه حاضر، استفاده از کیتوزان در جیره غذایی بچه فیل ماهیان به عنوان محرک رشد و ایمنی به منظور کاهش هزینه‌های تولید، افزایش توان عملکردی دستگاه ایمنی و بهبود شاخص‌های سلامت مناسب بوده است و یافته‌ها نشان‌دهنده کارایی مناسب مکمل کیتوزان به عنوان جایگزینی برای جلوگیری از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در دوره پرورش به‌ویژه سطوح ۰/۴۵-۰/۶ درصد جیره که در مقایسه با نمونه شاهد دارای عملکرد مؤثر رشد، ترکیب لاشه، شاخص‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی ایمنی در بچه فیل ماهیان پرورشی بوده است.

منابع

- Abd El-Naby, A.S., Al-Sagheer, A.A., Negm, S.S. and Naiel, M.A., 2020.** Dietary combination of chitosan nanoparticle and thymol affects feed utilization, digestive enzymes, antioxidant status, and intestinal

- immunology*, 26(2), 275-278.
DOI:10.1016/j.fsi.2008.11.009
- Chen, J. and Chen, L., 2019.** Effects of chitosan-supplemented diets on the growth performance, nonspecific immunity and health of loach fish (*Misgurnus anguillicadatus*). *Carbohydrate Polymers*, 225, 115227.
DOI:10.1016/j.carbpol.2019.115227.
- Chiu, C.Y., Chang, T.C., Liu, S.H. and Chiang, M.T., 2017.** The regulatory effects of fish oil and chitosan on hepatic lipogenic signals in high-fat diet-induced obese rats. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(4), 919-930. DOI:10.1016/j.jfda.2016.11.015
- Dawood, M.A., Koshio, S. and Esteban, M.Á., 2018.** Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 10(4), 950-974.
DOI:10.1111/raq.12209
- Dawood, M.A., Gewaily, M.S., Soliman, A.A., Shukry, M., Amer, A.A., Younis, E.M., Abdel-Warith, A.W.A., Van Doan, H., Saad, A.H., Aboubakr, M. and Abdel-Latif, H.M., 2020.** Marine-derived chitosan nanoparticles improved the intestinal histo-morphometrical features in association with the health and immune response of grey mullet (*Liza ramada*). *Marine Drugs*, 18(12), 611.
DOI:10.3390/md18120611
- Du, Y., Hu, X., Miao, L. and Chen, J., 2022.** Current status and development prospects of aquatic vaccines. *Frontiers in Immunology*, 13, 1040336.
DOI:10.3389/fimmu.2022.1040336
- Ellis, A.E., 1999.** Immunity to bacteria in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 9(4), 291-308.
- El-Naggar, M., Medhat, F. and Taha, A., 2022.** Applications of chitosan and chitosan nanoparticles in fish aquaculture. *Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries*, 26(1):23-43.
DOI:10.1016/j.aquaculture.2009.02.001
- Fernandez-Kim, S.O., 2004.** Physicochemical and functional properties of crawfish chitosan as affected by different processing protocols. Louisiana State University and Agricultural & Mechanical College. DOI: 10.31390/gradschool_theses.1338.
- Geng, X., Dong, X.H., Tan, B.P., Yang, Q.H., Chi, S.Y., Liu, H.Y. and Liu, X.Q., 2011.** Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 31(3), 400-406.
DOI:10.1016/j.fsi.2011.06.006
- González-Chavarría, I., Roa, F.J., Sandoval, F., Muñoz-Flores, C., Kappes, T., Acosta, J., Bertinat, R., Altamirano, C., Valenzuela, A., Sánchez, O. and Fernández, K., 2023.** Chitosan microparticles enhance the intestinal release and immune response of an immune stimulant peptide in *Oncorhynchus mykiss*. *International Journal of Molecular*

- Sciences*, 24(19), 14685.
DOI:10.3390/ijms241914685
- Goy, R.C., Britto, D.D. and Assis, O.B., 2009.** A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*, 19, 241-247. DOI:10.1590/S0104-14282009000300013
- Hassan, B.R., Abdulrahman, N.M., Ahmad, V.M. and Mohammed, S.J., 2021.** Effect of fish weights and clove powder levels on anesthesia and recovery time in common carp *Cyprinus carpio* L. *Journal for Agricultural Sciences*, 21(2):14-22. DOI:10.25130/tjas.21.2.3
- Hisham, F., Akmal, M.M., Ahmad, F.B. and Ahmad, K., 2021.** Facile extraction of chitin and chitosan from shrimp shell. *Materials Today: Proceedings*, 42, 2369-2373. DOI:10.1016/j.matpr.2020.12.329.
- Khan, M.A., Roll, K.H. and Guttormsen, A., 2021.** Profit efficiency of Pangas (*Pangasius hypophthalmus*) pond fish farming in Bangladesh—The effect of farm size. *Aquaculture*, 539, p.736662. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.736662.
- Khani Oushani, A.K., Soltani, M., Sheikhzadeh, N., Mehrgan, M.S. and Islami, H.R., 2020.** Effects of dietary chitosan and nano-chitosan loaded clinoptilolite on growth and immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 98, 210-217. DOI:10.1016/j.fsi.2020.01.016
- Ismael, N.E., Abd El-hameed, S.A., Salama, A.M., Naiel, M.A. and Abdel-Latif, H.M., 2021.** The effects of dietary clinoptilolite and chitosan nanoparticles on growth, body composition, haemato-biochemical parameters, immune responses, and antioxidative status of Nile tilapia exposed to imidacloprid. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 29535-29550. DOI:10.1007/s11356-021-12693-4.
- Li, R., Wang, X., Yu, D., Liang, Q., Liu, F., Zhang, L., Hu, B., Wei, J., Liu, L., Liu, J. and Xu, H., 2023.** Dietary chitosan alleviates intestinal and liver injury of hybrid sturgeon (*Acipenser baerii*♀× *A. schrenckii*♂) induced by *Aeromonas hydrophila* infection. *Animal Feed Science and Technology*, 299:115624. DOI:10.1016/j.anifeedsci.2023.115624
- Maqsood, S., Singh, P., Samoon, M.H. and Khansaheb Balange, A., 2010.** Effect of dietary chitosan on non-specific immune response and growth of *Cyprinus carpio* challenged with *Aeromonas hydrophila*. *International Aquatic Research*, 2(2):77-85.
- Mari, L.S.S., Jagruthi, C., Anbazahan, S.M., Yogeshwari, G., Thirumurugan, R., Arockiaraj, J., Mariappan, P., Balasundaram, C. and Harikrishnan, R., 2014.** Protective effect of chitin and chitosan enriched diets on immunity and disease resistance in *Cirrhina mrigala* against *Aphanomyces invadans*. *Fish & Shellfish Immunology*, 39(2), 378-385. DOI:10.1016/j.fsi.2014.05.027
- Matsuyama, H., Tanaka, K., Nakao, M. and Yano, T., 1988.** Characterization of the alternative complement pathway of carp. *Developmental and Comparative*

- Immunology*, 12: 403-408. DOI: 10.1016/0145-305X (88)90015-8.
- Méndez-Martínez, Y., Vera-Veliz, A.R., Cortés-Jacinto, E., Cruz-Quintana, Y., Botello-Leon, A., Mendoza-Carranza, P.D. and Calvo, N.S., 2023.** Growth performance, feed utilisation, digestive and metabolic enzyme activity, and liver morphohistology in hybrid tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*) juveniles fed with the inclusion of chitosan in their diet. *Fishes*, 8(11), p.546. DOI: 10.3390/fishes8110546.
- Mohseni, M., Pourali, H.R., Kazemi, R. and Bai, S.C., 2014.** Evaluation of the optimum dietary protein level for the maximum growth of juvenile beluga (*Huso huso* L. 1758). *Aquaculture Research*, 45(11), 1832-1841. DOI:10.1111/are.12134
- Mohseni, M., Ghelichpour, M., Hassani, M.H.S., Pajand, Z.O. and Vaghei, R.G., 2023.** Efficacy of dietary thiamine supplementation on growth performance, digestive enzymes, immunological responses, and antioxidant capacity of juvenile beluga (*Huso huso*). *Aquaculture Reports*, 31, 101664. DOI:10.1016/j.aqrep.2023.101664
- Mohseni, M., Pazhand, Z., Ghiasi, S., Pordehghani, M., Ghorbani Vagheie, R., Yeganeh, H. and Ghasemian, S., 2023.** Effect of egg immersion at different levels of water-soluble thiamine on improving the incubation indices and larvae growth of farmed beluga (*Huso huso*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 32(2):1-12. DOI:10.22092/ISFJ.2023.12911 (In Persian)
- Mukarram, M., Ali, J., Dadkhah-Aghdash, H., Kurjak, D., Kačík, F. and Ďurkovič, J., 2023.** Chitosan-induced biotic stress tolerance and crosstalk with phytohormones, antioxidants, and other signalling molecules. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1217822. DOI:10.3389/fpls.2023.1217822.
- Mulyani, Y., 2022.** A mini-review: the role of chitosan in aquaculture fish health management. *Asian Journal of Fisheries and Aquatic Research*, 17(3), 24-31. DOI:10.9734/ajfar/2022/v17i330405
- Nagaoka, I., Tsuruta, A. and Yoshimura, M., 2019.** Chondroprotective action of glucosamine, a chitosan monomer, on the joint health of athletes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 795-800. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.03.234
- Ndashe, K., Hang'ombe, B.M., Changula, K., Yabe, J., Samutela, M.T., Songe, M.M., Kefi, A.S., Njobvu Chilufya, L. and Sukkel, M., 2023.** An Assessment of the risk factors associated with disease outbreaks across tilapia farms in Central and Southern Zambia. *Fishes*, 8(1), 49. DOI:10.3390/fishes8010049
- Otubusin, S.O., Ogunleye, F.O. and Agbebi, O.T., 2009.** Feeding trials using local protein sources to replace fishmeal in pelleted feeds in catfish (*Clarias gariepinus* Burchell 1822) culture. *European Journal of Scientific Research*, 31(1), 142-147.

- Khani Oushani, A.K., Soltani, M., Sheikhzadeh, N., Mehrgan, M.S. and Islami, H.R., 2020.** Effects of dietary chitosan and nano-chitosan loaded clinoptilolite on growth and immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 98, 210-217. DOI:10.1016/j.fsi.2020.01.016
- Picos-Corrales, L.A., Morales-Burgos, A.M., Ruelas-Leyva, J.P., Crini, G., García-Armenta, E., Jimenez-Lam, S.A., Ayón-Reyna, L.E., Rocha-Alonzo, F., Calderón-Zamora, L., Osuna-Martínez, U. and Calderón-Castro, A., 2023.** Chitosan as an outstanding polysaccharide improving health-commodities of humans and environmental protection. *Polymers*, 15(3), 526. DOI:10.3390/polym15030526
- Pothiraj, C., Jyoti, D., Ramya, S., Jayakumararaj, R., Grover, A., Sinha, R., Ayyappan, P., Faggio, C. and Balaji, P., 2024.** Immunomodulators in aquaculture and fish health. In: Elumalai, P., Soltani, M. Lakshmi, S. (eds) Disease management and prophylaxis by immunostimulants. CRC Press. pp 89-102.
- Qin, C., Zhang, Y., Liu, W., Xu, L., Yang, Y. and Zhou, Z., 2014.** Effects of chito-oligosaccharides supplementation on growth performance, intestinal cytokine expression, autochthonous gut bacteria and disease resistance in hybrid tilapia *Oreochromis niloticus*♀× *Oreochromis aureus*♂. *Fish & Shellfish Immunology*, 40(1), 267-274. DOI:10.1016/j.fsi.2014.07.010
- Ringø, E., Olsen, R.E., Gifstad, T.Ø., Dalmo, R.A., Amlund, H., Hemre, G.I. and Bakke, A.M., 2010.** Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition*, 16(2), 117-136. DOI:10.1111/j.1365-2095.2009.00731.x
- Salam, M.A., Rahman, M.A., Paul, S.I., Islam, F., Barman, A.K., Rahman, Z., Shaha, D.C., Rahman, M.M. and Islam, T., 2021.** Dietary chitosan promotes the growth, biochemical composition, gut microbiota, hematological parameters and internal organ morphology of juvenile *Barbonymus gonionotus*. *PLoS One*, 16(11), e0260192. DOI:10.1371/journal.pone.0260192
- Salam, M.A., Das, T.R., Paul, S.I., Islam, F., Baidya, A., Rahman, M.L., Shaha, D.C. and Mazumder, S.K., 2024.** Dietary chitosan positively influences the immunity and reproductive performances of mature silver barb (*Barbonymus gonionotus*). *Aquaculture Reports*, 36, 102155. DOI:10.1016/j.aqrep.2024.102155
- Say, P., Nimikul, S., Bunnoy, A., Na-Nakorn, U. and Srisapoome, P., 2023.** Long-term application of a synbiotic chitosan and *Acinetobacter* KU011TH mixture on the growth performance, health status, and disease resistance of hybrid catfish (*Clarias gariepinus*× *C. macrocephalus*) during Winter. *Microorganisms*, 11(7), 1807. DOI:10.3390/microorganisms11071807
- Shiau, S.Y., Yu, Y.P., 1999.** Dietary supplementation of chitin and chitosan

- depresses growth in Tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. auratus*. *Aquaculture*, 179, 439–446. DOI:10.1016/S0044-8486(99)00177-5
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P. and Rumsey, G.L., 1994.** Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41(1-2), 125-139. DOI:10.1016/0165-2427(94)90062-0
- Stanek, M., Mazurkiewicz, J., Rawski, M., Bogucka, J., Ziółkowska, E., ankowiakowska, A. and Kierończyk, B., 2023.** Effect of chitosan on common carp (*Cyprinus carpio*) fry growth performance, feed utilization and nutriphysiological status. *Aquaculture Reports*, 30, 101622. DOI:10.1016/j.aqrep.2023.101622
- Subramanian, S., MacKinnon, S.L. and Ross, N.W., 2007.** 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(3), 256-263. DOI: 10.1016/j.cbpb.2007.06.003
- Tollabian, F. and Kamali, M., 2022.** Assessment of hematologic and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to acetaminophen. *Fisheries Science and Technology*, 11(1), 65-77.
- Wang, W., Sun, J., Liu, C. and Xue, Z., 2017.** Application of immunostimulants in aquaculture: current knowledge and future perspectives. *Aquaculture Research*, 48(1), 1-23. DOI:10.1111/are.13161
- Watts, M., Munday, B.L. and Burke, C.M., 2001.** Immune responses of teleost fish. *Australian Veterinary Journal*, 79(8), pp.570-574. DOI:10.1111/j.1751-0813.2001.tb10753.x.
- Wu, S., 2020.** The growth performance, body composition and nonspecific immunity of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) affected by chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 682-685. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.12.235
- Xu, H., Wang, X., Liang, Q., Xu, R., Liu, J. and Yu, D., 2023.** Dietary chitosan moderates the growth rate, antioxidant activity, immunity, intestinal morphology and resistance against *Aeromonas hydrophila* of juvenile hybrid sturgeon (*Acipenser baerii*♀ × *Acipenser schrenckii*♂). *International Journal of Biological Macromolecules*, 224, 1012-1024. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2022.10.185
- Xu, Q., Wang, W., Yang, W., Du, Y. and Song, L., 2017.** Chitosan oligosaccharide inhibits EGF-induced cell growth possibly through blockade of epidermal growth factor receptor/mitogen-activated protein kinase pathway. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 502-505. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2017.02.021
- Yan, J., Guo, C., Dawood, M.A.O. and Gao, J., 2017.** Effects of dietary chitosan on growth, lipid metabolism, immune response and antioxidant-related gene expression in

Misgurnus anguillicaudatus. *Beneficial microbes*, 8(3), 439-449.
DOI:10.3920/BM2016.0177

Younus, N., Zuberi, A., Mahmood, T., Akram, W. and Ahmad, M., 2020. Comparative effects of dietary micro- and nano-scale chitosan on the growth performance, non-specific immunity, and resistance of silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* against *Staphylococcus aureus* infection. *Aquaculture International*, 28, 2363-2378.
DOI:10.1007/s10499-020-00595-0

Yu, W., Yang, Y., Chen, H., Zhou, Q., Zhang, Y., Huang, X., Huang, Z., Li, T., Zhou, C., Ma, Z. and Wu, Q., 2023. Effects of dietary chitosan on the growth, health status and disease resistance of golden pompano (*Trachinotus ovatus*). *Carbohydrate Polymers*, 300, 120237.
DOI:10.1016/j.carbpol.2022.120237

Zakeri, D., Pazooki, J., Mohseni, M. and Jamshidi, S., 2024. Effect of dietary chitosan on the growth performance, intestinal histology and growth-related gene expression in stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) juveniles. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 108(4):1152-1163. DOI:10.1111/jpn.13961

Zhang, Q., Xie, Y., Tang, J., Meng, L., Huang, E., Liu, D., Tong, T., Liu, Y. and Guo, Z., 2024. Effects of dietary chitosan on growth performance, serum biochemical indices, antioxidant capacity, and immune response of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under cadmium stress. *Animal*, 14(15). DOI:10.3390/ani14152259

Zhou, Y., Gao, B., Zimmerman, A.R., Fang, J., Sun, Y. and Cao, X., 2013. Sorption of heavy metals on chitosan-modified biochars and its biological effects. *Chemical Engineering Journal*, 231, 512-518.
DOI:10.1016/j.cej.2013.07.036