

**INFLUENCIA DEL INMUNO-ESTIMULADOR
G1M1 EN LA DIETA DE DORADAS
JUVENILES *Sparus aurata***



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
Dpto. Biología Celular, Fisiología e Inmunología
JUNIO/2010



INFLUENCIA DEL INMUNO-ESTIMULADOR G1M1 EN LA DIETA DE DORADAS JUVENILES *Sparus aurata*

RESUMEN

Tradicionalmente, los peces marinos se han alimentado con dietas altas en lípidos con ingredientes de origen marino, que contienen los ácidos grasos esenciales para estas especies. El suministro de los aceites y las harinas de pescado se han visto afectados por el aumento de la ganadería intensiva incluyendo la acuicultura y los fenómenos naturales que afectan a la producción del mar.

En diversos estudios se ha observado que las dietas pueden afectar la salud de los peces cultivados. La cantidad y calidad de los macronutrientes, así como las vitaminas y minerales esenciales, pueden afectar tanto la incidencia como la gravedad de determinadas enfermedades infecciosas de los peces. Algunos cambios en las dietas aunque sean muy sutiles pueden influir gravemente en la capacidad del organismo a resistir a los patógenos oportunistas. Estas enfermedades microbianas causan grandes pérdidas en la acuicultura intensiva y necesitan ser controlados para mejorar el bienestar de los animales y el beneficio económico. Existen diferentes tipos de sustancias conocidas por actuar como inmunoestimulantes, pero sólo unos pocos son aptos para su utilización en la acuicultura. Estos inmunoestimulantes son extractos biológicos y sustancias químicas sintéticas que estimulan la respuesta inmune mediante la promoción de la función de células fagocíticas.

PALABRAS CLAVE: peces, dietas, nutrición, inmunoestimulantes

INFLUÈNCIA DE L'IMMUNO-ESTIMULADOR G1M1 EN LA DIETA D'ORADES JUVENILS *Sparus aurata*

RESUM

Tradicionalment, els peixos marins s'han alimentat amb dietes altes en lípids amb ingredients d'origen marí, que contenen els àcids grassos essencials per a aquestes espècies. El subministrament dels olis i les farines de peix s'han vist afectats per l'augment de la ramaderia intensiva incloent l'aqüicultura i els fenòmens naturals que afecten la producció del mar.

En diversos estudis s'ha observat que les dietes poden afectar la salut dels peixos cultivats. La quantitat i qualitat dels macronutrients, així com les vitamines i minerals essencials, poden afectar tant la incidència com la gravetat de determinades malalties infeccioses dels peixos. Alguns canvis en les dietes, encara que siguin molt subtils, poden influir greument en la capacitat de l'organisme de resistir els patògens oportunistes. Aquestes malalties microbianes causen grans pèrdues a l'aqüicultura intensiva i necessiten ser controlades per millorar el benestar dels animals i el benefici econòmic. Hi ha diferents tipus de substàncies conegudes per actuar com a immunoestimulants, però només unes poques són aptes per a la seva utilització en l'aqüicultura. Aquests immunoestimulants són extractes biològics i substàncies químiques sintètiques que estimulen la resposta immune mitjançant la promoció de la funció de cèl·lules fagocítiques.

PARAULES CLAU: peixos, dietes, nutrició, immunoestimulants

LLUIS TORT BARDOLET

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología

Facultad de Ciencias

INFORMA

Que el trabajo de investigación titulado: **“INFLUENCIA DEL INMUNO-ESTIMULADOR G1M1 EN LA DIETA DE DORADAS JUVENILES *Sparus aurata*”**, ha sido realizado bajo su tutela, dentro del programa de doctorado de Farmacología de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 10 de junio del 2010

LLUIS TORT BARDOLET

**INFLUENCIA DEL INMUNO-ESTIMULADOR
G1M1 EN LA DIETA DE DORADAS
JUVENILES *Sparus aurata***

Lílian M. Barandica C.

10 de Junio/2010

**Departamento de Biología Celular, Fisiología e
Inmunología**

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Barcelona

**INFLUENCIA DEL INMUNO-ESTIMULADOR
G1M1 EN LA DIETA DE DORADAS
JUVENILES *Sparus aurata***

Memoria del trabajo experimental para obtener el título de Máster de la
Universidad Autónoma de Barcelona, en el programa del doctorado en
Farmacología

El presente trabajo se ha realizado en el grupo de Inmunofisiología y
acuicultura del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de
la Universidad Autónoma de Barcelona bajo la dirección del Dr. Lluís Tort

Bellaterra, 10 de junio 2010

Alumna

Director

Lílian Barandica C.

Lluís Tort

ÍNDICE	Pag.
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. LOS INMUNOESTIMULANTES EN ACUICULTURA	2
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVO	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1. Dietas	9
3.2. Animales experimentales	9
3.3. Diseño experimental	10
3.4. Preparación de muestras y recogida de sangre	12
3.4.1. Análisis del suero	12
3.4.1.1. Bacteriólisis	12
3.4.1.2. Lisozima	12
3.4.1.3. Complemento	13
3.5. Análisis estadístico	13
4. RESULTADOS	15
5. DISCUSIÓN	17
6. CONCLUSIÓN	21
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LOS INMUNOESTIMULANTES EN ACUICULTURA

Los sistemas de acuicultura intensiva han creado un medio ambiente potencialmente estresante para los peces, por ejemplo, en la alta densidad poblacional, en las manipulaciones habituales, en el transporte, etc., pudiendo producir estados inmunosupresivos. El desarrollo de nuevos productos para enriquecer y suplementar las dietas acuícolas ha promovido el ensayo con productos que en un principio fueron elaborados para otras especies, como las aves de corral, los cerdos y el ganado vacuno. Demostrándose que mejoran la función intestinal incrementando el tamaño de las microvellosidades intestinales, así como, su uniformidad e integridad. Potenciando con ello el crecimiento y la salud (Dimitroglou, *et al.* 2009). Al mismo tiempo, la incorporación de inmunoestimulantes en la dieta que aumenten la respuesta inmune innata y adaptativa son considerados como un complemento prometedor para la vacunación y la reproducción selectiva. Convirtiéndose en las principales estrategias para la prevención de enfermedades. Recientes estudios indican que el sistema inmune de los peces en estados inmunosupresivos causados por muchas formas de toxinas puede activarse con inmunoestimulantes y revertir los efectos deletéreos mediados por el estrés químico (Sakai, *et al.* 1999; Anderson, *et al.* 1992; Ortuño, *et al.* 2003).

El sistema inmune innato ha evolucionado para responder a unos patrones moleculares únicos que se encuentran en la superficie de los microorganismos. Muchos de estos patrones moleculares asociados a

patógenos (PAMPS) son oligosacáridos complejos que contienen numerosas unidades de manosa o residuos de glucosa. La mayoría de los organismos superiores, incluidos los vegetales, los invertebrados, los mamíferos y los peces teleósteos expresan receptores de lectina asociados a las células del sistema inmune innato que se reconocen y se unen a oligosacáridos ricos en manosa y glucosa (Kudrenko, *et al.* 2009).

Los inmunoestimulantes son extractos biológicos o productos químicos sintéticos que estimulan la respuesta inmune potenciando la función fagocítica en las células e incrementando su actividad bactericida específica o no específica de las células citotóxicas y la producción de anticuerpos (Sakai *et al.* 1999). Se conocen diferentes sustancias que actúan como inmunoestimulantes pero solo algunas son apropiadas para la acuicultura (Robertsen, *et al.* 1990). A pesar de ello, el uso de algunos inmunoestimulantes está siendo una práctica habitual en el sector acuícola, con el objetivo de incrementar la supervivencia y preparar a los peces frente a situaciones críticas como transporte, cambios de temperatura, manipulación periódica, problemas patológicos o cualquier otra situación estresante.

Estos inmunoestimulantes son principalmente derivados de extractos celulares de microorganismos comercialmente disponibles, como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Couso, *et al.* 2003; Kogan, *et al.* 2007; Waldroup, *et al.* 2003), levaduras modificadas o hidrolizadas con altos contenidos en oligosacáridos y nucleótidos. Los oligosacáridos, especialmente los Manano Oligosacáridos (MO) actúan como inhibidores de la unión de patógenos a las células epiteliales del intestino (Montero, *et al.* 2005). Recientemente, la aplicación de estos compuestos en el sector de la cría de animales es prometedora, en la supresión de patógenos entéricos y en la modulación de la respuesta inmune de

pollos y pavos (Waldroup, *et al.* 2003). Los inmunoestimulantes más estudiados en los peces son los β -glucanos que mejoran la respuesta inmune (Chen, *et al.* 1992; Figueras, *et al.* 1998) estimulando la actividad de la lisozima, del complemento (Ortuño, *et al.* 2001; Engstad, *et al.* 1993) y la acción fagocítica de los macrófagos (Robertsen, *et al.* 1990; Jorgensen, *et al.* 1993; Galeotti, *et al.* 1998). Estos compuestos son unidades de glucosa unidas por enlaces glicosídicos del tipo β -1,3 o β -1,6 (glucopiranosil) (Engstad, *et al.* 1994). Constituyendo una de las más importantes estructuras de polisacáridos que componen la pared celular de bacterias, hongos y plantas (Robertsen, *et al.* 1990). El más potente inmunoestimulador conocido es el 1,3- β glucano (Kumari, *et al.* 2006) que mejora la respuesta no-específica (Sahoo, *et al.* 2002), la resistencia contra las infecciones bacterianas y virales utilizándose para prevenir y reducir la mortalidad de los animales (Couso, *et al.* 2003). Para tales efectos se prefiere la administración vía oral que es la más apropiada (Sakai *et al.* 1999; Siwicki, *et al.* 1994). Aunque, la respuesta dependerá del tipo de glucano (Ai, *et al.* 2007), la dosis suministrada, la vía de administración, del régimen de alimentación, y de la asociación con otros inmunoestimulantes (Bagni, *et al.* 2005).

El efecto adyuvante de los β -glucanos de la levadura se ha demostrado en peces como el Salmón Atlántico *Salmo salar* (Sahoo, *et al.* 2001), en el gato de río (Siwicki, *et al.* 1994) y en la trucha arco iris *O. mykiss* (Anderson, *et al.* 1994; Yoshida, *et al.* 1995; Ainsworth, *et al.* 1994). No obstante, en este dos últimos la administración oral prolongada de péptido-glucanos disminuye la respuesta inmune cuando se expone al *Vibrio anguillarum* (Matsuo, *et al.* 1993); sugiriendo un efecto de retroalimentación negativa de los β -glucanos (Robertsen, *et al.* 1990). En combinación con la vitamina C los β -glucanos modulan la respuesta inmune incrementando los anticuerpos secretados en el suero por las células plasmáticas frente a la *Edwardsiella ictaluri* en el gato de río y contra la *Yersinia ruckeri* en la trucha arco iris (Verlhac, *et al.* 1996;

Jeney, *et al.* 1997). En otras investigaciones se ha visto que la administración conjunta en la dieta de lactoferrina, 1-3 β glucano, levamisol y vit.C aumentan la resistencia en especies de peces de agua dulce y marina para enfermedades bacterianas como la *Aeromonas* sp, *Vibrio* sp, *Edwardsiella*, *Yersenia ruckeri* y *Ichthyophthirius multifiliis* (Kumari, *et al.* 2005; Sakai, *et al.* 1999; Mulero, *et al.* 1998b; Sahoo, *et al.* 2002; Sahoo, *et al.* 2001; Kumari, *et al.* 2006). Incrementando la protección en condiciones inmunocomprometidas o de estrés (Kumari, *et al.* 2006). En la lubina *Dicentrarchus labrax* se ha encontrado un aumento en la actividad fagocítica con dietas suplementadas con levamisol y β -glucanos (Jeney, *et al.* 1997). La actividad del complemento y de la lisozima mejora en lubinas alimentadas con dietas suplementadas con β -glucanos de levaduras, Vitamina C y E (Bagni, *et al.* 2000; Peddie, *et al.* 2002; Dalmo, *et al.* 1995; Fujiki, *et al.* 1997).

En el caso de la respuesta específica, los β -glucanos pueden actuar como moduladores incrementando los anticuerpos secretados por las células plasmáticas (Sakai *et al.*, 1999). La estimulación del sistema inmune específico por la administración de glucanos en la dieta del rodaballo *Scophthalmus maximus* (de Baulny, *et al.* 1996) y la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Verlhac, *et al.* 1998) podría estimular indirectamente el proceso de activación de los linfocitos. Sobre todo los β -glucanos podrían mejorar la resistencia al ataque bacteriano en los espáridos (Cook *et al.* 2001).

Otros inmunoestimulantes importantes son los probióticos, que se utilizan como aditivos en el agua o como suplemento alimenticio (Moriarty, *et al.* 1998; Skjermo, *et al.* 2006). Algunas aplicaciones de los probióticos han demostrado ser beneficiosas para el crecimiento, la supervivencia y la salud del hospedador (Moriarty, *et al.* 1998; Skjermo, *et al.* 2006). Estudios previos han demostrado que la *Pseudomona*

synxantha y *Pseudomona aeruginosa* son probióticos eficaces para su uso en el cultivo del langostino occidental juvenil *Penaeus latisulcatus* (Van Hai, *et al.* 2009). Las bacterias vivas de los probióticos y los prebióticos son conocidos como inmunoestimulantes (Galeotti, *et al.* 1998) con capacidad de modular la inmunidad e impulsar sus efectos (Reid, *et al.* 2006). Actuando como tratamientos alternativos a los antibióticos y a los productos químicos que desempeñan el papel de alarma para activar las moléculas del sistema inmunes (López, *et al.* 2003).

Una posible estrategia sostenible consiste en optimizar la inmunidad natural de un animal por medio de la nutrición (Coop, *et al.* 1995); es decir, la inmunonutrición podría controlar la resistencia a los parásitos en los sistemas de producción convencional y orgánica del ganado (Coop, *et al.* 1999), mejorando así la inmunocompetencia a través de la dieta (Muturi, *et al.* 2005).

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVO

Los recursos pesqueros o acuícolas muestran cada vez mayor relevancia económica en todo el mundo debido al crecimiento de su demanda y a la exigencia de calidad del producto comercial. El conocimiento constante del estado de la población acuícola cultivada es fundamental, ya que frecuentemente cuando se detecta un problema es tarde para salvar la población. Los peces de piscifactorías están sujetos a múltiples situaciones de manejo, transporte y confinamiento que es responsable de la aparición de estrés (Davis, *et al.* 2002). Se han realizado extensos estudios sobre la respuesta de los peces a estresores típicos en prácticas acuícolas (Barton, *et al.* 2005; Tort, *et al.* 1996b). Las condiciones de cultivo deben intentar evitar o minimizar las situaciones de estrés en los procesos de producción.

Dos de los principales factores que deben controlarse en relación a una buena adaptación son las condiciones de estrés y la nutrición. La respuesta inmune no específica ha sido empleada como indicador de estrés. Los parámetros utilizados para identificar los peces estresados a muy corto plazo se denominan indicadores de respuesta primaria, es decir, indicadores de cambios rápidos como la adrenalina y el cortisol. Se emplean también otros indicadores llamados secundarios, como los índices metabólicos, los niveles de glucosa y lactato y los iones en plasma (Rotllant, *et al.* 1997; Rotllant, *et al.* 2000; Sunyer, *et al.* 1995). Se monitoriza su incremento en situaciones de estrés debido a que son mediadores fisiológicos de una mayor demanda energética (Ellis, *et al.* 2001)

Por otro lado, la dieta resulta determinante tanto de manera directa por su influencia sobre el estado energético, como de manera indirecta por su influencia sobre la resistencia al estrés, siendo un factor fundamental el conocimiento del estado fisiológico de los animales. Además, la ración adecuada de alimentación se ha demostrado que afecta el crecimiento, la eficacia de la alimentación, el estado inmunológico y el funcionamiento de la fisiología de peces (Canario, *et al.* 1998).

Nuestra hipótesis inicial fue que las dietas suplementada con inmunoestimulantes deberían tener un efecto beneficioso en las doradas juveniles *Sparus aurata* y con ello en algunos de sus parámetros inmunes.

El objetivo de este estudio es evaluar los efectos de un inmunoestimulador suplementado en la dieta de doradas juveniles *Sparus aurata* y en algunos de sus parámetros inmunes. Este inmunoestimulante es una variedad de β -glucanos o mananos, como se han descrito en la introducción.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Dietas

Los 6 dietas o tratamientos (A-F), fueron extrusionadas adicionadas con el inmunoestimulador G1M1. Las dietas fueron manufacturadas localmente y basadas en dietas comerciales de INVE Technologies (Bélgica). El inmunoestimulante tenía una composición a base de glucanos, mananos o mixta añadidos a la dieta comercial de dorada. Los grupos eran los siguientes:

A: Dieta comercial

B: Dieta comercial + 2,5% Glucano

C: Dieta comercial + 5% Glucano

D: Dieta comercial + 2,5% Manano

E: Dieta comercial + 5% Manano

F: Dieta comercial + 2,5% Glucano + 2,5% Manano

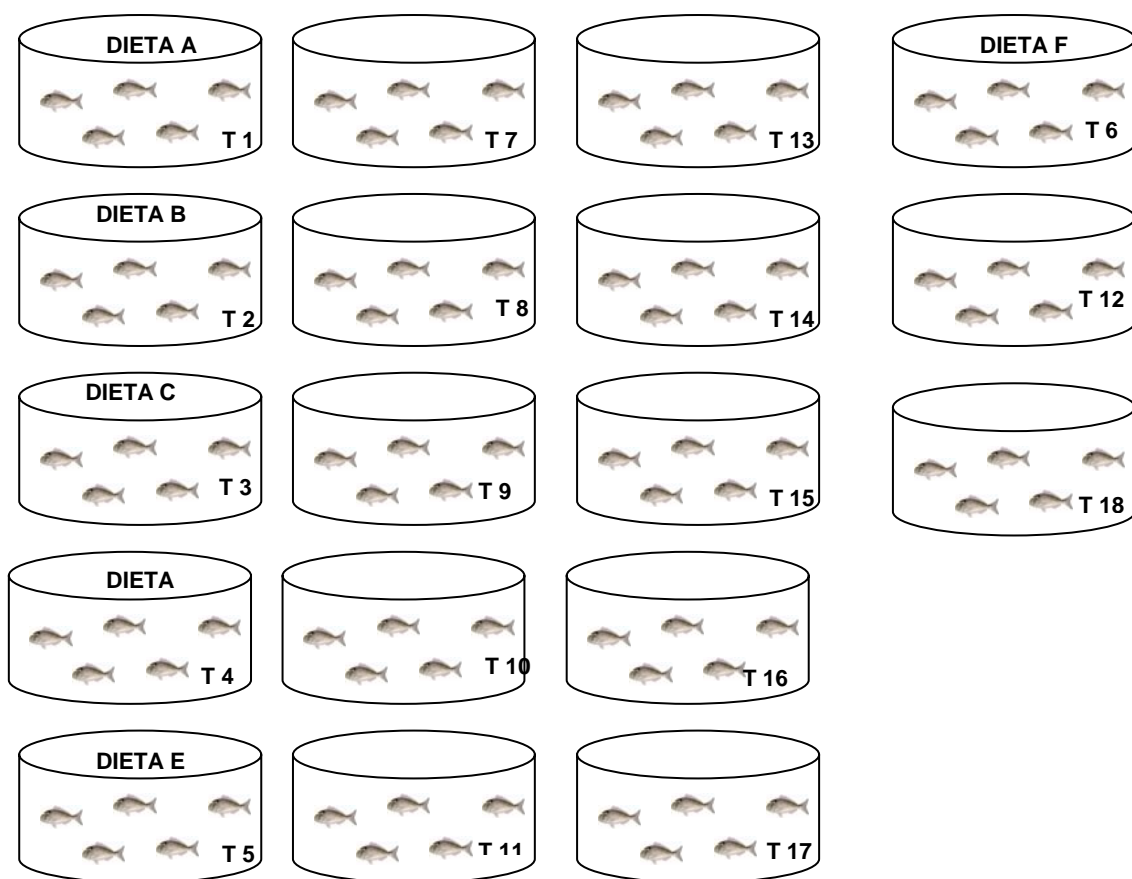
3.2. Animales experimentales

750 doradas juveniles *Sparus aurata* de unos 60 g. de peso de una población aparentemente libre de enfermedades, fueron mantenidas en tanques y alimentadas durante 8 semanas con una dieta extrusionada

comercial, a temperatura de 18.5– 19.5°C, hasta que se adaptaron a las condiciones ambientales (4,5Kg/m³ de densidad media).

3.3. Diseño experimental

Las doradas juveniles fueron distribuidas aleatoriamente en 18 tanques cilindricos cónicos de fibra de vidrio (6 tratamientos por triplicado, 9 peces por tratamiento) con 1000l de capacidad, para una densidad media de 4,5 Kg/m³ (40 peces por tanque). El peso inicial promedio fue de 60g ± SD. Los tanques fueron filtrados con agua marina (1.39 l/min) a temperatura de 18.5 – 19,5°C y fotoperiodo (12h luz día/12h luz noche). El Oxígeno disuelto fue mantenido a 8.0 ± 0.2 ppm. Los peces fueron alimentados con comederos automáticos *ad libitum* con 6 dietas experimentales por 9 semanas (3 veces al día, 6 días a la semana). Cada dieta fue ensayada por triplicado.



La primera dieta tratamiento A: le corresponden los tanques 1, 7, 13
(Dietas comerciales control)

El tratamiento B: Tanques 2,8,14 : Dieta comercial + 2,5% Glucano

El tratamiento C: Tanques 3,9,15 : Dieta comercial + 5% Glucano

El tratamiento D: Tanques 4,10,16 : Dieta comercial + 2,5% Manano

El tratamiento E: Tanques 5,11,17 : Dieta comercial + 5% Manano

El tratamiento F: Tanques 6,12,18 : Dieta comercial + 2,5% Glucano +
2,5% Manano

720 peces comenzaron el ensayo y 9 peces por tanque el día 67 fueron muestreados, después de 24h rápidamente, para la composición del cuerpo proximal. Fueron tomadas muestras de sangre de 15 peces para

recoger el plasma y el suero del día 67 para determinar la actividad lisozímica y del complemento ACP.

3.4. Preparación de muestras y recogida de sangre

La sangre se obtuvo de la punción de la vena caudal con jeringa plástica de 1 ml; no se utilizó anestésico para evitar posibles efectos en los parámetros sanguíneos y el tiempo de manipulación es menor a 1 minuto para minimizar los efectos del estrés. Se dividieron las alícuotas en dos porciones transfiriendo a los tubos eppendorf permitiendo coagular a las 2 horas. El suero se separó por centrifugación y se guardó a -80°C para las pruebas del complemento de la vía alternativa (ACP) y determinar la actividad de la lisozima.

3.4.1. Análisis del suero

3.4.1.1. Bacteriólisis

Se inoculó una colonia de *E. Coli* en medio LB, y se dejó crecer toda la noche. Al día siguiente, se colocó una muestra de la bacteria en el suero en dilución (1:2) y se midió la absorbancia por espectrofotometría, indicando la capacidad hemolítica bactericida del suero, inhibiendo su crecimiento.

3.4.1.2. Lisozima

La lisozima es una sustancia antimicrobiana presente en las secreciones de las superficies de las mucosas, inductora de la lisis bacteriana (Murray, et al. 2000). En peces es utilizada como un indicador inmunológico en situaciones de estrés. La actividad de la lisozima se determina por el método turbidimétrico, que utiliza la lisis del *Micrococcus luteus* para la determinación de la actividad enzimática (Rotllant, et al. 1997) utilizando la lisozima de clara de huevo como estándar.

3.4.1.3. Complemento

La importancia de este indicador se debe, a que en los peces, la actividad del sistema de complemento es 10 veces más potente que en mamíferos. La determinación de la actividad del complemento se realiza siguiendo la técnica descrita por Sunyer y Tort (1995). Para lo cual, se mezcla el suero del pez con sangre fresca de conejo; produciéndose el 50% de la lisis de las células sanguíneas del conejo ocasionado por el suero; lo que se denominada como ACH50.

3.5. Análisis estadístico

Los experimentos se hicieron por triplicado. Un análisis de varianza (ANOVA) fue realizado para evaluar la evolución de las dietas y la manera en se vieron afectados los parámetros inmunes. Se efectuó una ANOVA con factor anidado; la dieta fue un factor anidado dentro del tanque. Se consideró estadísticamente significativa cuando $p < 0,05$ indicándose en las figuras con un asterisco (*). Los valores $n=3$ (3 peces por cada uno de los 3 tanques) fueron representados como la media \pm el error estándar de la media (*Mean* \pm *S.E.M.*); cuando la ANOVA resultó

significativa un análisis adicional fue hecho, para conocer los grupos en que aparecían significaciones con un *Post-hoc* prueba de Scheffé.

4. RESULTADOS

Durante los tratamientos experimentales no se registró mortalidad. Los parámetros inmunes se vieron afectados por los tratamientos; se observó una actividad de la lisozima, similar a la dieta control en los tratamiento B y F, mientras que dicha actividad fue más baja en el resto. Sin embargo, se mostraron tendencias a cambios, que no fueran estadísticamente significativos.

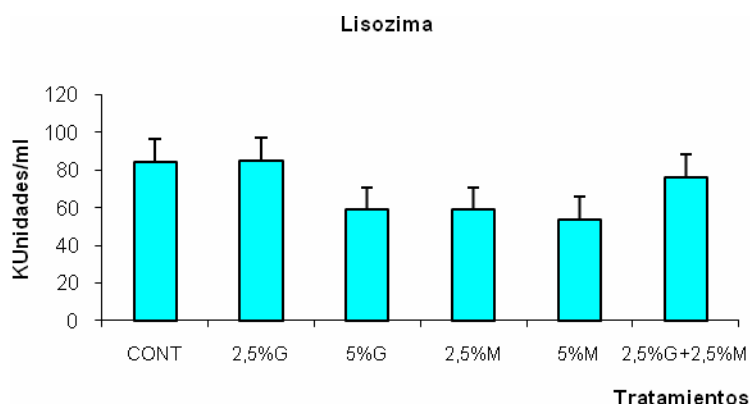


Figura 1. La actividad de la lisozima (en K unidades/ml) según las dietas control (A) suplementadas con los tratamientos (GLU, MOS, GLU/MOS) en diferentes concentraciones. El ANOVA muestra diferencias significativas (*) $p < 0,05$. Media y error estándar $n=3$. Sin embargo el *post-hoc* Scheffé no mostró cambios que fueran estadísticamente significativos.

En cuanto al complemento fue mayor su actividad en los tratamientos C y F. Además, cuando comparamos todos los tratamientos sólo se encontraron diferencias significativas (*) en el tratamiento C.

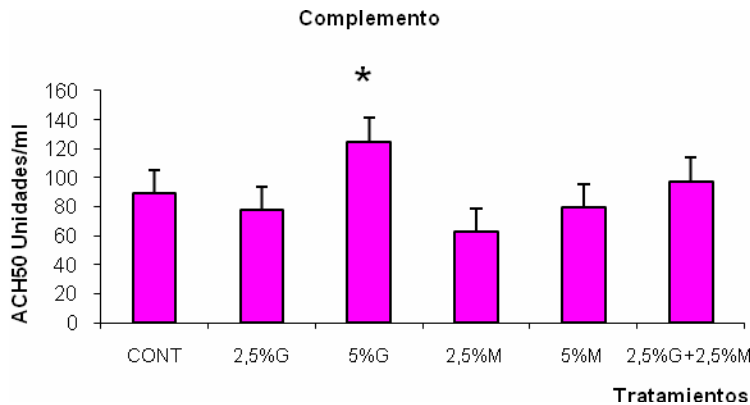


Figura 2. La actividad del complemento en unidades (ACH50/ml) según las dietas control o suplementadas con GLU, MOS y GLU/MOS en diferentes concentraciones. El ANOVA muestra una diferencia significativa (***) $p < 0,001$. Media y error estándar $n=3$. Y también el Post hoc Scheffé muestra una diferencia significativa (*) $p < 0,05$.

En la bacteriolisis se observó una tendencia al incremento de la actividad entre los tratamientos mostrándose mayor sensibilidad en el tratamiento C, seguido del tratamiento B y D, a pesar de no encontrarse en esta actividad diferencias significativas.

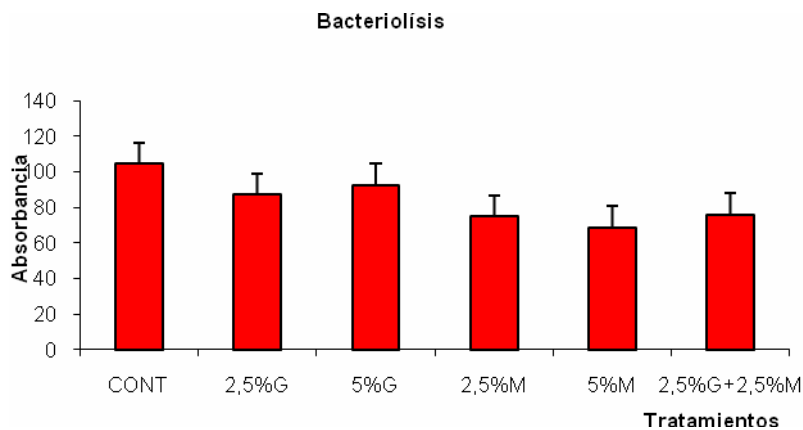


Figura 3. La actividad bacteriolítica según las dietas control o suplementadas con GLU, MOS y GLU/MOS en diferentes concentraciones. El ANOVA no muestra diferencias significativas (*) $p < 0,05$. Media y error estándar $n=3$.

5. DISCUSIÓN

Los inmunoestimulantes ensayados tienen diferentes efectos en las dos especies marinas, los resultados muestran que con las distintas dietas suplementadas las doradas juveniles *Sparus aurata* responden con mayor sensibilidad a los parámetros inmunes (bacteriolisis, lisozima y complemento), con porcentajes más altos de glucanos en comparación a los de Manano oligosacáridos (MOS).

Estudios realizados en lubinas juveniles *D. labrax* alimentadas con la dieta suplementada con MOS presentan un mayor crecimiento en general (Torrecillas, *et al.* 2007). Otros autores han visto en la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*, el gato de río *Ictalurus punctatus* y en la tilapia híbrida *Morone saxatilis* (Staykov, *et al.* 2007; Welker, *et al.* 2007; Genc, *et al.* 2007) efectos similares. Algunos autores interpretan este aumento en el crecimiento con un mayor funcionamiento de los enterocitos (Dimitroglou, *et al.* 2006; Torrecillas, *et al.* 2007). En la trucha arco iris tampoco se observaron efectos perjudiciales en el intestino por la utilización de los MOS en las dietas (Yilmaz, *et al.* 2007). Diversas investigaciones encuentran una correlación positiva entre las dietas suplementadas con Manano oligosacáridos y el incremento en la ingesta alimentaria en diversas especies como lubina (Torrecillas, *et al.* 2007) tilapia roja (Zhou, *et al.* 2004), carpa común (Zhou, *et al.* 2004) y en el pez gato (Welker, *et al.* 2007). Es más, utilizando los Manano oligosacáridos como suplementación en las dietas de trucha arco iris se observa una mayor superficie de absorción promoviendo la prolongación de los plegamientos la mucosa. El autor observó por microscopía

electrónica el aumento de superficie de absorción se confirma que los MOS son capaces de aumentar la densidad de microvellosidades y su longitud (Dimitroglou, *et al.* 2009). Similares resultados fueron reportados también en lubina (Torrecillas, *et al.* 2007). Sin embargo en la tilapia híbrida *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* los resultados obtenidos con inmunoestimulantes como el MOS no muestran un aumento en el crecimiento (Genc, *et al.* 2007b).

Una explicación posible para los diferentes resultados se relaciona con la especie de estudio y con los efectos de la concentración de proteínas corporales, las cuales pueden variar dependiendo de los prebióticos en la dieta (Genc, *et al.* 2007a; Genc, *et al.* 2007b; Torrecillas *et al.* 2007). Además, se sabe que los efectos de los glucanos en el crecimiento pueden variar dependiendo de la especie, de la dosis, de la duración de la alimentación y de la temperatura del ambiente. De esta manera, se explicaría la aparente contradicción entre los diversos resultados publicados (Djordjevic, *et al.* 2009). Otra justificación factible para este incremento en el crecimiento, a ciertas dosis, se relaciona con la mayor eficiencia de la digestión de las proteínas (Waché, *et al.* 2006).

En nuestro estudio, las doradas mostraron menor sensibilidad a la actividad lisozimica. Sin embargo, se ve mayor activación con las dietas ricas en glucano al $2,5\text{g kg}^{-1}$ en comparación a la dieta de 5g kg^{-1} . En investigaciones previas, se ha reportado que el sistema inmune no específico de la trucha arco iris *O.mykiss* fue afectado positivamente cuando la dieta se adicionó con el MOS (Staykov, *et al.* 2007). En el gato de río africano *Clarias gariepinus* las dietas que contienen 10g kg^{-1} MOS, incrementaron el número de neutrófilos activados durante las primeras 2 semanas, disminuyendo luego hasta el nivel del control después de 45 días. La incorporación en la dieta con 4g kg^{-1} de MOS en la lubina *D. labrax* activa el sistema inmune e incrementa su

resistencia a la infección bacteriana por *Vibrio alginolyticus*, inoculada directamente en el intestino por ser uno de los principales sitios de infección en los peces (Torrecillas, *et al.* 2007). En el gato de río africano *Clarias gariepinus* la actividad de la lisozima sérica es mayor en los peces alimentados con la dieta MOS durante 50 días en comparación con los controles; algunos autores cuestionan la administración a largo plazo de inmunoestimulantes (Yoshida, Kruger and Inglis 1995). Por el contrario en salmones, estudios anteriores muestran que la actividad de la lisozima es menor o tiende a ser menor cuando las dietas contienen MOS en comparación con los alimentados con la dieta control (Grisdale-Helland, *et al.* 2008).

Los resultados de este estudio, mostraron en las doradas una gran actividad del complemento que fue significativa para el glucano suministrado a 5g kg⁻¹. Se ha visto también, un aumento de la actividad del complemento en la tilapia híbrida *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*, la lubina *Dicentrarchus labrax*. En la lubina estriada híbrida *Morone chrysops* × *M. saxatilis* los glucanos proporcionados al 0,1% mejoran la resistencia a la infección por *Streptococcus iniae*. Una enfermedad asociada al manejo a escala industrial (Li, *et al.* 2009). En general, la administración de glucanos en la dieta de los peces ha demostrado que aumenta los niveles de lisozima (de Baulny, *et al.* 1996; Li, *et al.* 2009).

Estudios anteriores han señalado que los β-glucanos son excelentes estimuladores de la actividad del estallido respiratorio de los fagocitos de la dorada *in vitro* (Siwicki, *et al.* 1994); lo que sugiere que pueden aumentar la resistencia contra *pasteurellosis* (Couso, *et al.* 2003). Sin embargo, la dosis efectiva y el período de administración deberían ser investigados para cada caso, ya que son difíciles las comparaciones entre los estudios individuales. Por el contrario, *in vitro* se ha reportado

que altas dosis de β -glucanos disminuyen el estallido respiratorio y causan agotamiento celular en el salmón atlántico *Salmo salar* (Engstad, *et al.* 1994). Parece ser que la dosis efectiva de glucanos es muy estrecha en la lubina estriada híbrida *Morone Chrysops x Morone saxatilis*, en comparación con el salmón del Atlántico (Figueras, *et al.* 1998).

Los derivados de la levadura estudiados, mejoran significativamente algunas de las respuestas inmunitarias innatas, mientras que la resistencia en otras especies como la corvina amarilla *Pseudosciaena crocea*, el gato de río asiático *Clarias batrachus* y el Pargo *Pagrus auratus* no presentan estos cambios (Djordjevic, *et al.* 2009). Se ha demostrado también, que los (1-3) β -glucanos estimulan el sistema inmunológico de los invertebrados, activando la cascada de la fenoloxidasa, mientras que en los mamíferos activan la cascada del complemento (Kudrenko, *et al.* 2009). Rice demostró que después de la administración oral, los glucanos solubles en agua se traslocan desde las células epiteliales intestinales al sistema circulatorio. Lo que explicaría una mayor tasa de supervivencia en los monos, frente a las infecciones por *Staphylococcus aureus* o de la *Candida albicans* (Rice, *et al.* 2005). Estos procesos, así como las interacciones con factores de inmunidad humoral y celular afectan a la migración y a la diferenciación de las células inmunes (Djordjevic, *et al.* 2009).

La administración de altas dosis de glucanos puede ser recomendable para mejorar la resistencia de los peces durante períodos cortos. Sin embargo, cuando se administran durante períodos más largos a dosis altas, los glucanos tienen efectos negativos en la resistencia de la dorada *S.aurata* (Couso, *et al.* 2003). Se observa también en la dorada una mayor actividad bacteriolítica que se relaciona con el porcentaje de glucano; por el contrario a la actividad similar en las dietas

suplementadas con los MOS. Se requieren más estudios para entender el papel de los MOS en la inmunomodulación de los peces, teniendo en cuenta que su adición en las dietas mejora las actividades bactericida, lisozímica y del complemento, considerándose una herramienta eficiente en las situaciones inmunosupresivas que son comunes en los peces de cultivo.

6. CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que la incorporación de inmunoestimuladores como suplemento en la dieta, de las doradas juveniles *S. aurata* no mejoran sustancialmente la actividad de dos de los tres parámetros inmunes. Solamente la actividad del complemento se muestra significativamente mayor en las dietas suplementadas con los glucanos al 5%. En la dorada la activación del sistema inmune es mayor cuando se administran los glucanos. Otros experimentos deben llevarse a cabo para aclarar los mecanismos de acción de los inmunoestimuladores Manano oligosacáridos, los glucanos y la mezcla de los Manano oligosacáridos + Glucanos. Así como, el período óptimo de la alimentación y la administración de las dosis.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ai, Q. H., Mai, K. S., Zhang, L., Tan, B., Zhang, W., Xu, W. and Li, H. (2007/4) Effects of dietary β -1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish & Shellfish Immunology* 22, 394-402.
2. Ainsworth, A. J. (1994) A Beta-Glucan Inhibitable Zymosan Receptor on Channel Catfish Neutrophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 41, 141-152.
3. Aksnes, A., Hope, B., Hostmark, O. and Albrektsen, S. (2006) Inclusion of size fractionated fish hydrolysate in high plant protein diets for Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture* 261, 1102-1110.
4. Anderson, D. P. and Siwicki, A. K. (1994) Duration of Protection Against *Aeromonas-Salmonicida* in Brook Trout Immunostimulated with Glucan Or Chitosan by Injection Or Immersion. *Prog. Fish-Cult.* 56, 258-261.
5. Arends, R. J., Mancera, J. M., Muñoz, J. L., Wendelaar Bonga, S. E. and Flik, G. (1999) The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *J. Endocrinol.* 163, 149-157.
6. Bagni, M., Archetti, L., Amadori, M. and Marino, G. (2000) Effect of long-term oral administration of an immunostimulant diet on innate immunity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 47, 745-751.

7. Bagni, M., Romano, N., Finoia, M. G., Abelli, L., Scapigliati, G., Tiscar, P. G., Sarti, M. and Marino, G. (2005) Short- and long-term effects of a dietary yeast beta-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Shellfish Immunol.* 18, 311-325.
8. Barton, B. A., Ribas, L., Acerete, L. and Tort, L. (2005) Effects of chronic confinement on physiological responses of juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., to acute handling. *Aquacult. Res.* 36, 172-179.
9. Calder, P. C. (1995) Fatty-Acids, Dietary Lipids and Lymphocyte Functions. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 302-309.
10. Canario, A. V. M., J, C., M, P., D. and M, I.,P. (1998) The effect of stocking density on growth in the gilthead sea-bream, *Sparus aurata* (L.). *Aquacult. Res.* 29, 177-181.
11. Chen, D. and Ainsworth, A. J. (1992) Glucan Administration Potentiates Immune Defense-Mechanisms of Channel Catfish, *Ictalurus-Punctatus Rafinesque*. *J. Fish Dis.* 15, 295-304.
12. Cook, M. T., Hayball, P. J., Hutchinson, W., Nowak, B. F. and Hayball, J. D. (2001) The efficacy of a commercial beta-glucan preparation, EcoActiva (TM), on stimulating respiratory burst activity of head-kidney macrophages from pink snapper (*Pagrus auratus*), Sparidae. *Fish Shellfish Immunol.* 11, 661-672.
13. Coop, R. L., Huntley, J. F. and Smith, W. D. (1995) Effect of dietary protein supplementation on the development of immunity to *Ostertagia circumcincta* in growing lambs. *Res. Vet. Sci.* 59, 24-29.

14. Coop, R. L. and Kyriazakis, I. (1999) Nutrition–parasite interaction. *Vet. Parasitol.* 84, 187-204.
15. Couso, N., Castro, R., Magarinos, B., Obach, A. and Lamas, J. (2003) Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to *pasteurellosis*. *Aquaculture [Aquaculture]*. Vol. 219 219, 99-4, pp.
16. Dalmo, R. A. and Seljelid, R. (1995) The Immunomodulatory Effect of Lps, Laminaran and Sulfated Laminaran [Beta(1,3)-D-Glucan] on Atlantic Salmon, *Salmo-Salar* L, Macrophages In-Vitro. *J. Fish Dis.* 18, 175-185.
17. Davis, C. R., Okihiro, M. S. and Hinton, D. E. (2002/10/30) Effects of husbandry practices, gender, and normal physiological variation on growth and reproduction of Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquatic Toxicology* 60, 185-201.
18. de Baulny, M. O., Quentel, C., Fournier, V., Lamour, F. and LeGouvello, R. (1996) Effect of long-term oral administration of beta-glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. *Dis. Aquat. Org.* 26, 139-147.
19. Dimitroglou, A., Janssens, T. and Davies, S. (2006) Effect of BIO.MOS on sole (*Solea senegalensis*) gut integrity (histological perspectives). *Nutritional biotechnology in the feed and food industries: Proceedings of Alltech's 22nd annual symposium.*

20. Dimitroglou, A., Merrifield, D. L., Moate, R., Davies, S. J., Spring, P., Sweetman, J. and Bradley, G. (2009) Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Anim. Sci.* 87, 3226-3234.
21. Engstad, R. E. and Robertsen, B. (1994) Specificity of a Beta-Glucan Receptor on Macrophages from Atlantic Salmon (*Salmo-Salar L*). *Dev. Comp. Immunol.* 18, 397-408.
22. Engstad, R. E. and Robertsen, B. (1993) Recognition of Yeast-Cell Wall Glucan by Atlantic Salmon (*Salmo-Salar L*) Macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* 17, 319-330.
23. Figueras, A., Santarem, M. M. and Novoa, B. (1998) Influence of the sequence of administration of beta-glucans and a *Vibrio damsela* vaccine on the immune response of turbot (*Scophthalmus maximus L*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 64, 59-68.
24. Galeotti, M. (1998) Some aspects of the application of immunostimulants and a critical review of methods for their evaluation. *J. Appl. Ichthyol.* 14, 189-199.
25. Genc, M. A., Aktas, M., Genc, E. and Yilmaz, E. (2007a) Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth, body composition and hepatopancreas histology of *Penaeus semisulcatus* (de Haan 1844). *Aquacult. Nutr.* 13, 156-161.
26. Genc, M. A., Yilmaz, E., Genc, E. and Aktas, M. (2007b) Effects of dietary mannan oligosaccharides (MOS) on growth, body composition, and intestine and liver histology of the hybrid Tilapia (*Oreochromis niloticus x O-aureus*). *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 59, 10-16.

27. Grisdale-Helland, B., Helland, S. J. and Gatlin III, D. M. (2008) The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide or galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 283, 163-167.
28. Halver, J. E. (2001) Research in fish nutrition. *Aquacult. Res.* 32, 611-614.
29. Jeney, G., Galeotti, M., Volpatti, D., Jeney, Z. and Anderson, D. P. (1997/7/15) Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture* 154, 1-15.
30. Jorgensen, J. B., Lunde, H. and Robertsen, B. (1993) Peritoneal and Head Kidney-Cell Response to Intraperitoneally Injected Yeast Glucan in Atlantic Salmon, *Salmo-Salar* L. *J. Fish Dis.* 16, 313-325.
31. Kogan, G. and Kocher, A. (2007) Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livestock Science* 109, 161-165.
32. Kudrenko, B., Snape, N. and Barnes, A. C. (2009) Linear and branched beta(1-3) D-glucans activate but do not prime teleost macrophages in vitro and are inactivated by dilute acid: Implications for dietary immunostimulation. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 443-450.
33. Kumari, J. and Sahoo, P. K. (2006) Dietary immunostimulants influence specific immune response and resistance of healthy and immunocompromised Asian catfish *Clarias batrachus* to *Aeromonas hydrophila* infection. *Dis. Aquat. Org.* 70, 63-70.

34. Kumari, J. and Sahoo, P. K. (2005) High dietary vitamin C affects growth, non-specific immune responses and disease resistance in Asian catfish, *Clarias batrachus*. *Mol. Cell. Biochem.* 280, 25-33.
35. Li, P. (2009) Dose-dependent influences of dietary beta-1,3-glucan on innate immunity and disease resistance of hybrid striped bass *Morone chrysops x Morone saxatilis*. *Aquacult. Res.* 40, 1578-1584.
36. López, N., Cuzon, G., Gaxiola, G., Taboada, G., Valenzuela, M., Pascual, C., Sánchez, A. and Rosas, C. (2003) Physiological, nutritional, and immunological role of dietary β 1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 224, 223-243.
37. Magnadóttir, B. (2006/2) Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology* 20, 137-151.
38. Martins, D. A., Valente, L. M. P. and Lall, S. P. (2007/3/6) Effects of dietary lipid level on growth and lipid utilization by juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.). *Aquaculture* 263, 150-158.
39. Matsuo, K. and Miyazono, I. (1993) The Influence of Long-Term Administration of Peptidoglycan on Disease Resistance and Growth of Juvenile Rainbow-Trout. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59, 1377-1379.
40. Montero, D., Fernandez-Vaquero, A., Tort, L., Caballero, M. J. and Izquierdo, M. S. (2005) Efecto de los inmunoestimulantes en la resistencia a estrés en dorada (*Sparus aurata*) y lubina (*Dicentrarchus labrax*). Comunicación oral. X Congreso Nacional de Acuicultura. GANDIA 2005.

- 41.Ortuño, J., Cuesta, A., Angeles Esteban, M. and Meseguer, J. (2001/5/30) Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 79, 167-180.
- 42.Ortuño, J., Esteban, M. A. and Meseguer, J. (2003/2) The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 14, 145-156.
- 43.Peddie, S., Zou, J. and Secombes, C. J. (2002) Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of Ergosan. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 86, 101-113.
- 44.Reid, G. (2006) Safe and efficacious probiotics: what are they? *Trends in Microbiology [Trends Microbiol.]. Vol. 14* 14, 348-352.
- 45.Rice, P. J., Adams, E. L., Ozment-Skelton, T., Gonzalez, A. J., Goldman, M. P., Lockhart, B. E., Barker, L. A., Breuel, K. F., Deponti, W. K., Kalbfleisch, J. H., Ensley, H. E., Brown, G. D., Gordon, S. and Williams, D. L. (2005) Oral delivery and gastrointestinal absorption of soluble glucans stimulate increased resistance to infectious challenge. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 1079-1086.
- 46.Robertsen, B., Rorstad, G., Engstad, R. E. and Raa, J. (1990) Enhancement of Nonspecific Disease Resistance in Atlantic Salmon, *Salmo-Salar* L, by a Glucan from *Saccharomyces-Cerevisiae* Cell-Walls. *J. Fish Dis.* 13, 391-400.
- 47.Rotllant, J., Pavlidis, M., Kentouri, M., Adad, M. E. and Tort, L. (1997) Non-specific immune responses in the red porgy *Pagrus pagrus* after crowding stress. *Aquaculture* 156, 279-290.
- 48.Sahoo, P. K. and Mukherjee, S. C. (2002) The effect of dietary immunomodulation upon *Edwardsiella tarda* vaccination in healthy

- and immunocompromised Indian major carp (*Labeo rohita*). *Fish Shellfish Immunol.* 12, 1-16.
- 49.Sahoo, P. K. and Mukherjee, S. C. (2001) Effect of dietary beta-1,3 glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B-1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita* Hamilton). *Fish Shellfish Immunol.* 11, 683-695.
- 50.Sakai, M. (1999) Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172, 63-92.
- 51.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. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 41, 125-139.
- 52.Skjermo, J., Storseth, T. R., Hansen, K., Handå, A. and Øie, G. (2006/12/1) Evaluation of β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucans and High-M alginate used as immunostimulatory dietary supplement during first feeding and weaning of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture* 261, 1088-1101.
- 53.Staykov, Y., Spring, P. and Denev, S. (2007) Influence of dietary Bio-Mos® on growth, survival and immune status of rainbow trout (*Salmo gairdneri irideus* G.) and common carp (*Cyprinus carpio* L.). 2007,
- 54.Sunyer, J. O. and Tort, L. (1995) Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by alternative complement pathway. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 45, 333-345.

55. Thompson, K. D., Lilley, J. H., Chen, S. C., Adams, A. and Richards, R. H. (1999) The immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Aphanomyces invadans*. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 195-210.
56. Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M. J., Montero, D., Robaina, L., Real, F., Sweetman, J., Tort, L. and Izquierdo, M. S. (2007) Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 969-981.
57. Tort, L., Balasch, J. C. and MacKenzie, S. (2005) Fish health challenge after stress. Indicators of immunocompetence. *Contributions to Science* 2-4, 443-454.
58. Tort, L., Gomez, E., Montero, D. and Sunyer, J. O. (1996a) Serum haemolytic and agglutinating activity as indicators of fish immunocompetence: Their suitability in stress and dietary studies. *Aquacult. Int.* 4, 31-41.
59. Tort, L., Sunyer, J. O., Gomez, E. and Molinero, A. (1996b) Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 51, 179-188.
60. Van Hai, N. and Fotedar, R. (2009) Comparison of the effects of the prebiotics (Bio-Mos super(R) and beta -1,3-D-glucan) and the customised probiotics (*Pseudomonas synxantha* and *P. aeruginosa*) on the culture of juvenile western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). *Aquaculture [Aquaculture]. Vol. 289* 289, 310-4, pp.
61. Van Weerd, J. H. and Komen, J. (1998/5/1) The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 120, 107-112.

62. Verlhac, V., Gabaudan, J., Obach, A., Schuep, W. and Hole, R. (1996) Influence of Van Veldhoven dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 143, 123-133.
63. Verlhac, V., Obach, A., Gabaudan, J., Schuep, W. and Hole, R. (1998) Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 8, 409-424.
64. Virella, G., Kilpatrick, J. M., Rugeles, M. T., Hyman, B. and Russell, R. (1989) Depression of Humoral Responses and Phagocytic Functions In vivo and In vitro by Fish Oil and Eicosapentanoic Acid. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 52, 257-270.
65. Waché, Y., Auffray, F., Auffray, F. J., Zambonino, J., Gayet, V., Labbé, L. and Quentel, C. (2006) Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. *Aquaculture* 258, 470-478.
66. Waldroup, P. W., Oviedo-Rondon, E. O. and Fritts, C. A. (2003) Comparison of Bio-Mos® and antibiotic feeding programs in broiler diets containing copper sulfate. *International Journal of Poultry Science* 2, 28-31.
67. Welker, T. L., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., Shelby, R. and Klesius, P. H. (2007) Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri* challenge in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing commercial whole-cell yeast or yeast subcomponents. *J. World Aquacult. Soc.* 38, 24-35.

- 68.Yilmaz, E., Genc, M. A. and Genc, E. (2007) Effects of dietary mannan oligosaccharides on growth, body composition, and intestine and liver histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 59, 182-188.
- 69.Yoshida, T., Kruger, R. and Inglis, V. (1995) Augmentation of Nonspecific Protection in African Catfish, *Clarias-Gariepinus* (Burchell), by the Long-Term Oral-Administration of Immunostimulants. *J. Fish Dis.* 18, 195-198.
- 70.Zhou, X. Q. and Li, Y. (2004) The effects of BIO-MOS on ontestinal microflora and immune function of juvenile Jian Carp (*Cyprinus carpio* Var. *Jian*). *Nutritional biotechnology in the feed and food industries:Proceedings of Alltech's 20nd annual symposium*