University of Guilan with collaboration of Iranian Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 8, No. 2, 2022, pages: 55-70
DOI: 10.22124/janb.2023.23679.1181

Comparison of continuous and pulse administration of probiotic bacteria potency of *Lactobacillus* sp., *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus* in the basal diet on biochemical parameters of *Lates calcarifer*

Takavar Mohammadian[1,3*], Ghazal Oskooie Nejad Monfared[1], Mohammad Razi Jalali[1], Mansour Torfi Mozanzadeh[2]

1- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Khuzestan, Iran
2- South Iran Aquaculture Research Centre, Iranian Fisheries Science Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension organization (AREEO), Ahwaz, Khuzestan, Iran
3- Excellence Center of Warm Water Fish Health, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Khuzestan, Iran

Received 21 April 2022	Revised 20 June 2022	Accepted 24 June 2022

KEYWORDS

Feeding strategy
Lactobacillus
Bacillus Cereus
Bacillus
Thuringiensis
Biochemical
factors

ABSTRACT

This study was conducted with the aim of determining the effect of different probiotics administration on alterations in biochemical parameters of juvenile sea bass *(Lates calcarifer).* Four hundred and twenty sea bass with an average weight of 34 ± 4.5 g were prepared and randomly divided into seven groups with three replications (40 fish in each replication) and fed with experimental diets for 90 days. The experimental treatments included: group 1 (T_1): different *Lactobacillus plantarum* sp.; group 2 (T_2): *L. plantarum* sp., *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* and *L. rhamnosus* in a combined form (combination of lactobacilli); group 3 (T_3): the combination of diets 1 and 2 as well as *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* which was administered to fish every two weeks; group 4 was the control group without probiotics (C_4). In addition, groups 5, 6 and 7 (T_5, T_6 and T_7) were similar to groups 1, 2 and 3 which were continuously fed to fish. The results showed that there was a significant increase in blood serum cholesterol at the end of the experiment in T_7 compared to the control group. The calcium level in T_3 showed the highest amount compared to other treatments. All treatments showed a decreased amount of total protein at the end of the experiment compared to the control (C_4). Moreover, the highest value was related to T_6. T_7 exhibited the highest amount of triglycerides and glucose at the end of the experiment. In case of liver enzymes, the lowest serum ALP level was found in T_1 and the lowest AST in T_6, while serum ALT level did not display any significant difference in any group. In cases of Cpk and HDL, the lowest values belonged to T_1. In general, it can be concluded that the use of a mixture of probiotics in a pulse administration can cause positive effects on the blood biochemical parameters of *L. calcarifer*.

*Corresponding author: t.mohammadian@scu.ac.ir

دانشگاه گیلان با مشارکت انجمن آبزی‌پروری ایران

تغذیه آبزیان

سال هشتم، شماره دوم، تابستان ۱۴۰۱، صفحات ۷۰-۵۵

DOI: 10.22124/janb.2023.23679.1181

"مقاله پژوهشی"

مقایسه تجویز ادامه دار و ناپیوسته باکتری‌های پروبیوتیکی *Lactobacillus* sp.، *Bacillus thuringiensis* و *B. cereus* در جیره غذایی بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی ماهی باس دریایی (*Lates calcarifer*)

تکاور محمدیان*[۱،۳]، غزل اسکویی نژاد منفرد[۱]، محمد راضی جلالی[۱]، منصور طرفی موزان زاده[۲]

۱- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، خوزستان

۲- مرکز تحقیقات آبزی پروری جنوب کشور، موسسه علوم شیلاتی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، خوزستان

۳- قطب بهداشت وبیماری های ماهیان گرمابی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، خوزستان

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۰۱ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۳/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۰۳

چکیده

این مطالعه با هدف تعیین اثر تجویز مختلف پروبیوتیک‌ها بر تغییرات فراسنجه‌های بیوشیمیایی بچه ماهیان باس دریایی (*Lates calcarifer*) انجام شد. تعداد ۴۲۰ بچه ماهی باس دریایی با میانگین وزن ۴/۵ ± ۳۴ گرم تهیه و به طور تصادفی در قالب هفت گروه با سه تکرار (هر تکرار ۲۰ عدد ماهی) تقسیم و به مدت ۹۰ روز با جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند. گروه یک شامل سویه های مختلف لاکتوباسیلوس پلنتاروم؛ گروه دو شامل لاکتوباسیلوس پلنتاروم، لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس رامنوسوس به‌صورت ترکیبی (ترکیب لاکتوباسیلوس ها)؛ گروه سه شامل ترکیب جیره‌های یک و دو و باسیلوس سرئوس و باسیلوس ترنجیئنسوس (دارای خواص کوئروم کوئنچینگ) که به‌صورت دو هفته درمیان به ماهی ها تجویز شد. گروه ۴ (شاهد) بدون پروبیوتیک بود. گروه‌های پنج، شش و هفت مشابه گروه‌های یک، دو و سه بودند که به صورت ادامه‌دار به ماهی‌ها تجویز شدند. نتایج نشان داد مقدار کلسترول سرم خون در انتهای آزمایش در تیمار هفت نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت. کلسیم در تیمار سه بیشترین مقدار را نسبت به دیگر تیمارها نشان داد. مقدار پروتئین تام در انتهای آزمایش در تمام تیمارها نسبت به گروه شاهد کاهش نشان داد. در مورد مقدار آلبومین سرم نیز بیشترین مقدار مربوط به گروه شش بود. گروه هفت بیشترین مقدار تری‌گلیسرید و گلوکز را در انتهای آزمایش نشان داد. کمترین مقدار ALP مربوط به گروه یک و کمترین مقدار AST مربوط به گروه شش بودند، در حالی که مقدار ALT تفاوت معنی‌دار نشان نداد. در سنجش مقدار Cpk و HDL کمترین مقدارها متعلق به گروه یک بودند. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از مخلوط پروبیوتیک ها به صورت ناپیوسته می‌تواند اثرات مثبتی بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون اعمال کند.

کلمات کلیدی

استراتژی تغذیه ای

لاکتوباسیلوس‌ها

باسیلوس سرئوس

باسیلوس

ترنجیئنسوس

فراسنجه های

بیوشیمیایی

ماهی باس دریایی

آسیایی

نویسنده مسئول: t.mohammadian@scu.ac.ir

مقدمه

در حدود یک دهه است که ماهی باس دریایی آسیایی به صنعت آبزی‌پروری کشور معرفی شده و مورد استقبال قرار گرفته است. با وجود این، ماهیان پرورشی در استخرهای خاکی و به‌خصوص در قفس‌های دریایی به دلایل مختلف از قبیل سوء مدیریت در تغذیه، مدیریت بهداشتی دچار بیماری‌های مختلف به‌خصوص بیماری‌های باکتریایی از قبیل ویبریوزیس و استرپتوکوکوزیس می‌شوند (اژدهاکش پور و همکاران، ۱۳۹۷). بر اساس مطالعه Azhdari و همکاران (۲۰۱۷) با وجود خصوصیات مطلوب ماهی باس دریایی آسیایی برای پرورش، این گونه حساسیت بسیار زیادی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا، به‌خصوص از جنس ویبریو دارد. به‌کارگیری آنتی‌بیوتیک‌ها به منظور افزایش رشد و بهبود ضریب تبدیل غذایی و همچنین، به عنوان یک اقدام پیش‌گیرانه یا درمان بیماری‌های ماهی بحث‌برانگیز بوده است، زیرا گزارش‌های متعددی از بروز مقاومت ضدمیکروبی و خطر انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی به انسان وجود دارد. ممانعت از بروز بیماری و کنترل آن معمولاً از طریق به‌کارگیری داروهای صناعی و از طریق خوراکی، حمام و یا تزریق انجام می‌شود (Rico et al. 2013). با وجود این، این رویکرد نه تنها برای محیط زیست خطرناک است، بلکه برای آبزی نیز ممکن است مخاطره‌آمیز باشد (Carlson et al. 2017). از سوی دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها موجب مهار و از بین بردن فلور میکروبی طبیعی و مفید و همچنین، اثرات طولانی‌مدت و غیر قابل پیش‌بینی بر سلامت عموم می‌شوند (Fuente et al. 2015; Gasser et al. 2019).

یکی از مهم‌ترین روش‌های ارتقای سلامت، افزایش رشد و کنترل بیماری و عوامل بیماری‌زا در صنعت آبزی‌پروری استفاده از پروبیوتیک‌هاست. پروبیوتیک‌ها می‌توانند برخلاف آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان ابزاری جایگزین در آبزی‌پروری پایدار به کار برده شوند. پروبیوتیک‌ها علاوه بر ایمنی‌زایی سبب بهبود رشد و کارایی تغذیه نیز می‌شوند (Hoseinifar et al. 2017). باکتری‌های پروبیوتیک موجود در دستگاه گوارش ماهی، سبب افزایش تولید و ترشح آنزیم‌های گوارشی در میزبان می‌شوند که در نهایت، منجر به افزایش قابلیت هضم چربی‌ها و پروتئین‌های موجود در جیره غذایی شده و کارایی تغذیه و متعاقب آن رشد را در ماهی میزبان به طور قابل توجهی افزایش می‌دهند (Ziaenejad et al. 2006).

فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون به عنوان اولین تغییرات قابل اندازه‌گیری اطلاعات زیادی درباره وضعیت سلامت آبزیان، اثر مواد سمی، ارزیابی اثرات مواد مغذی و مکمل-های تغذیه‌ای و دارویی در اختیار محققان قرار می‌دهند. به طور سنتی، تحقیقات آبزی‌پروری بر روی پروبیوتیک‌های (به‌خصوص لاکتوباسیل‌ها و گونه‌های مختلف باسیلوس‌های) مستخرج از منابع غیر آبزی مانند شیر و پنیر انجام شده است، اما اخیراً مطالعات پیشنهاد کرده‌اند که استفاده از باکتری‌های موجود در بدن خود میزبان با خصوصیات پروبیوتیکی عملکرد بهتری دارند. همچنین، مطالعات نشان می‌دهند که پروبیوتیک‌های مستخرج از لوله گوارش میزبان، مقاومت بیشتری نسبت به تغییرات اسیدیته در لوله گوارش در مقایسه با پروبیوتیک‌های تجاری دارند (Van Doan et al. 2018; Hoseinifar, 2019). به دلیل کمبود اطلاعات موجود در خصوص تأثیرات راهبردهای مختلف کاربرد پروبیوتیک‌های جدا شده از آبزیان در تغذیه ماهی و با توجه به اهمیت پرورش ماهی باس دریایی آسیایی در ایران و جهان، این مطالعه به بررسی خصوصیات بیوشیمیایی سرم ماهی باس دریایی آسیایی تحت تأثیر این پروبیوتیک برای بهبود سلامت این ماهیان پرداخته است. هدف از مطالعه حاضر مقایسه وضعیت فراسنجه‌های بیوشیمیایی ماهیان تغذیه شده با مکمل پروبیوتیکی در راهبردهای مختلف تجویز پروبیوتیک به‌صورت ادامه‌دار و ناپیوسته است.

مواد و روش‌ها

تأمین بچه ماهی و معرفی آن‌ها به محیط آزمایشی

کلیه مراحل اجرایی تحقیق حاضر در ایستگاه ماهیان دریایی بندر امام وابسته به پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور به انجام رسید. بچه‌ماهیان باس دریایی از همین مرکز تهیه شد. در ابتدای آزمایش زیست‌سنجی ماهیان انجام شد. تعداد ۴۲۰ قطعه بچه ماهی باس دریایی آسیایی با وزن متوسط ۴/۵ ± ۳۴ گرم برای این آزمایش ها استفاده شد. عملیات بر روی ماهی زنده به مدت سه ماه در این مرکز انجام و آزمایش‌های سرمی و آنزیمی در دانشگاه شهید چمران اهواز انجام شد.

تیماربندی ماهیان

بچه‌ماهی‌ها به‌صورت کاملاً تصادفی به هفت تیمار در سه تکرار تقسیم شدند، به طوری که هر تکرار شامل ۲۰ قطعه بچه ماهی باشد. دوره نوری در زمان انجام تحقیق به صورت ۱۲-۱۰ ساعت روشنایی و ۱۲-۱۰ ساعت تاریکی در نظر گرفته شد و ماهیان در یک سالن سرپوشیده قرار گرفتند. دمای آب ۳۰/۵-۲۸/۳ سانتی‌گراد در نوسان بود و pH هشت در نظر گرفته شد. اکسیژن محلول آب ورودی ۸/۷ میلی‌گرم در لیتر و شوری ۴۵ گرم در لیتر اندازه‌گیری شد.

گروه اول سویه‌های مختلف باکتری لاکتوباسیلوس پلنتاروم؛ گروه دوم شامل باکتری های لاکتوباسیلوس پلنتاروم به همراه مخلوط لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس رامنوسوس؛ و گروه سوم شامل مخلوط باکتری‌های گروه اول و دوم به همراه مخلوط باسیلوس های *Bacillus cereus* و *B. thuringiensis* بود که به روش کوئوروم سنسینگ از ماهی باس دریایی آسیایی پرورش یافته در آب شیرین، لب شور و شور جداسازی شده بودند (Khajepour and Hosseini, 2012). با استفاده از ۳ گروه پروبیوتیکی ۷ تیمار طراحی شد که شامل گروه شاهد که فقط سرم فیزیولوژی سترون بر روی جیره غذایی افشانه شد؛ جیره یک که بر روی آن مخلوط باکتری‌های گروه اول (سویه-های مختلف لاکتوباسیلوس پلنتاروم) افشانه شد؛ جیره دو که بر روی آن مخلوط باکتری‌های گروه دوم افشانه شد؛ جیره سه که بر روی آن مخلوط باکتری‌های گروه سوم افشانه شد و به‌صورت ناپیوسته به‌صورت دو هفته در میان به ماهیان برای تغذیه داده شد؛ جیره شماره چهار گروه کنترل بود و جیره‌های پنج و شش و هفت به ترتیب با جیره‌های یک و دو و سه به صورت ادامه‌دار برای تغذیه به ماهی‌ها داده شد. طول دوره تحقیق بدون احتساب دو هفته سازگاری، ۹۰ روز بود. مقدار وعده‌های غذادهی سه بار در روز و به میزان ۳٪ وزن بدن بود.

برای ارزیابی اثر پروبیوتیک‌های انتخاب شده بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی باس دریایی آسیایی، باکتری-های باسیلوس و لاکتوباسیلوس منتخب به غذای ماهیان افزوده شد. از جیره‌های غذایی مخصوص پرورش سی باس آسیایی تهیه شده از شرکت ۲۱ بیضا (شیراز) دارای ۴۸٪ پروتئین و ۱۵٪ چربی با قطرهای دو تا چهار میلی‌متر استفاده شد. به طور خلاصه، هر یک از باکتری‌های باسیلوس *Bacillus cereus* و *B. thuringiensis*، با تلقیح سویه مورد نظر به محیط مایع لوریا-برتانی به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری، و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ و جداسازی، باکتری‌ها دو بار با PBS سترون شستشو شدند و با استفاده از لوله‌های مک‌فارلند غلظت مناسب آنها تنظیم شد. برای آماده‌سازی سویه‌های مختلف باکتری‌های لاکتوباسیلوسی و افزودن آن‌ها به غذای ماهیان از روش توصیه شده توسط Planas و همکاران (۲۰۰۴) و Vine و همکاران (۲۰۰۶) استفاده شد.

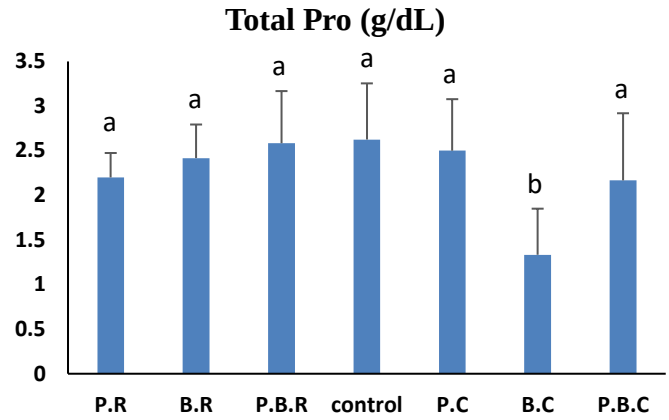
برای ارزیابی اثر تیمارهای مختلف بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرمی، از تعداد ۴ قطعه ماهی از هر تکرار در انتهای دوره پس از تغذیه با پروبیوتیک‌ها، خون‌گیری و جداسازی سرم انجام شد و برای آزمایش‌های مذکور در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. اندازه‌گیری فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم با استفاده از کیت‌های تهیه شده از شرکت پارس آزمون و با دستگاه اتوآنالایزر بیوشیمیایی مدل BT-1500 (ساخت ایتالیا) انجام شد.

قبل از انجام آزمون آنالیز واریانس، نرمال بودن داده‌های به‌دست آمده با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک و یکنواختی واریانس با آزمون لون بررسی شد. برای سنجش واریانس داده‌های نرمال از آزمون واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) استفاده شد. برای مقایسه میانگین تیمارهای مختلف از آزمون توکی استفاده شد. حداقل سطح معنی‌دار بودن آزمون‌ها $p\leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. تمام داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد و ارزیابی‌ها در سه تکرار انجام شد. برای انجام آزمون‌های آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ و برای رسم نمودارها از نرم افزار اکسل استفاده شد.

نتایج

پروتئین تام پلاسما

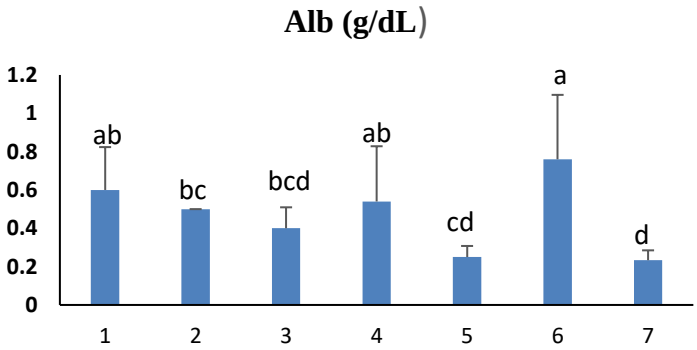
نتایج مربوط به بررسی پروتئین تام پلاسما تنها در گروه تغذیه شده با مخلوط لاکتوباسیلوس‌ها به‌صورت ادامه دار دارای تفاوتی معنی‌دار با باقیمانده گروه‌ها بود ($p<۰/۰۵$). در این میان بیشترین مقدار مربوط به گروه شاهد و کمترین مقدار مربوط به گروه تغذیه شده با مخلوط لاکتوباسیلوس ها به‌صورت ادامه دار بود.



شکل ۱ مقایسه پروتئین کل سرم خون ماهی باس دریایی آسیایی در تیمارهای مختلف.

آلبومین

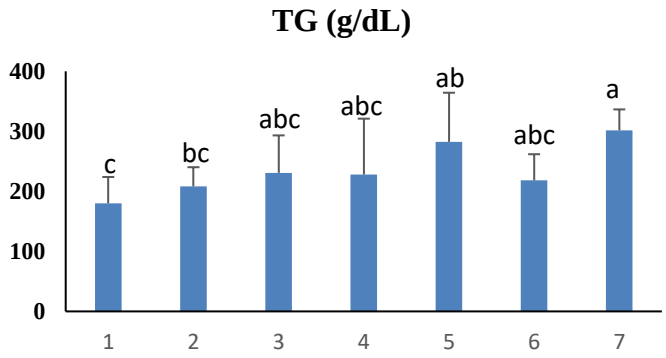
در تیمارها با شیوه‌های مختلف تجویز پروبیوتیک در بین گروه تغذیه شده با پلنتاروم به‌صورت ادامه دار و گروه تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیک ها به‌صورت ادامه دار اختلاف معنی‌دار در سطح آلبومین با گروه شاهد مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). بیشترین مقدار مشاهده شده مربوط به گروه تغذیه شده با مخلوط لاکتوباسیلوس‌ها به صورت ادامه‌دار و کمترین مقدار مربوط به گروه تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیک ها به صورت ادامه‌دار بود.



شکل ۲ مقایسه آلبومین کل سرم خون ماهی باس دریایی آسیایی در تیمارهای مختلف.

تری‌گلیسرید

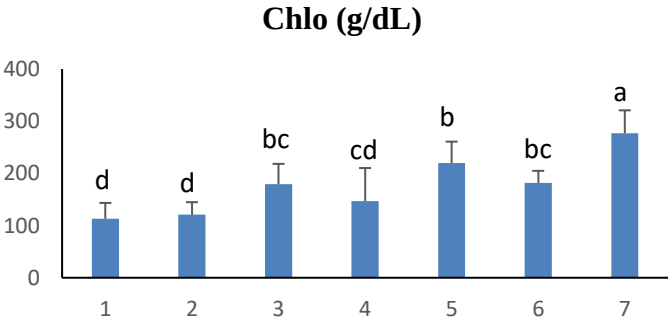
اختلاف معنی‌دار در سطح تری‌گلیسرید در ماهی‌های تغذیه شده با شیوه‌های مختلف تجویز پروبیوتیک در بین گروه‌های مختلف با گروه شاهد مشاهده نشد ($p<۰/۰۵$). در این میان، بیشترین مقدار مربوط به گروه تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیک ها و کمترین مقدار مربوط به گروه تغذیه شده با پلنتاروم به‌صورت ناپیوسته بود.



شکل ۳ مقایسه تری‌گلیسرید سرم خون ماهی باس دریایی آسیایی در تیمارهای مختلف.

کلسترول

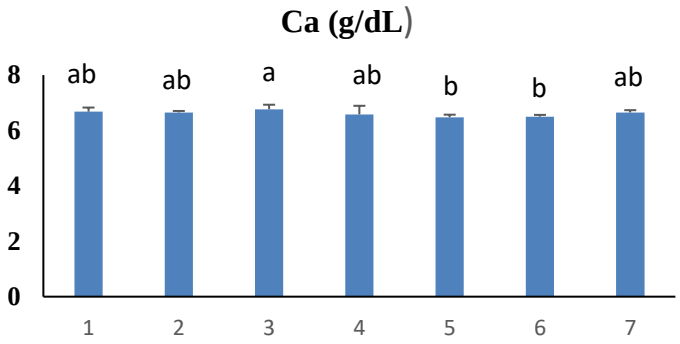
در ماهی‌های تغذیه شده با شیوه‌های مختلف تجویز پروبیوتیک در بین گروه تغذیه شده با پلنتاروم به‌صورت ادامه‌دار و گروه تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیک به‌صورت ادامه‌دار اختلاف معنی‌دار در سطح کلسترول با گروه شاهد مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). بیشترین مقدار مشاهده شده مربوط به گروه تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیک‌ها به‌صورت ادامه‌دار و کمترین مقدار مربوط به گروه تغذیه شده با پلنتاروم به‌صورت ناپیوسته بود.



شکل ۴ مقایسه کلسترول کل سرم خون ماهی باس دریایی آسیایی در تیمارهای مختلف.

کلسیم

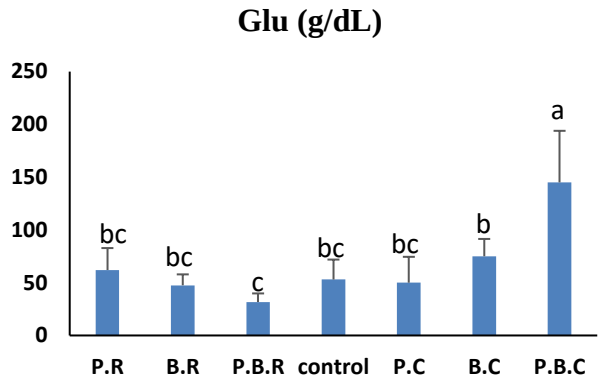
سطح کلسیم پلاسما در ماهیان تغذیه شده به روش‌های مختلف اختلاف معنی‌داری با سطح کلسیم ماهیان گروه شاهد نداشت ($p>۰/۰۵$). اما دربین گروه تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیک‌ها به‌صورت ناپیوسته و گروه‌های تغذیه شده با پلنتاروم به‌صورت ادامه‌دار و گروه تغذیه شده با مخلوط لاکتوباسیلوس به‌صورت ادامه‌دار اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($p<۰/۰۵$).



شکل ۵ مقایسه کلسیم سرم خون ماهی باس دریایی آسیایی در تیمارهای مختلف.

گلوکز

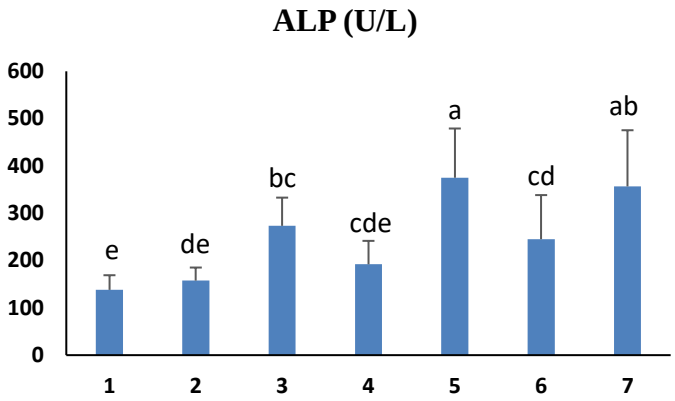
در بررسی سطح گلوکز پلاسما فقط در گروه تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیک‌ها به‌صورت ادامه‌دار اختلاف معنی‌دار با سطح گلوکز پلاسما در گروه شاهد داشت ($p<۰/۰۵$). بیشترین مقدار مربوط به همین گروه و کمترین مقدار مربوط به گروه تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیک‌ها به صورت ناپیوسته بود که دربین آن‌ها اختلاف معنی‌دار هم مشاهده شد ($p<۰/۰۵$).



شکل ۶ مقایسه گلوکز سرم خون ماهی باس دریایی آسیایی در تیمارهای مختلف

آنزیم آلکالین فسفاتاز

در گروه تغذیه شده با پلنتاروم به صورت ادامه‌دار و گروه تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیک‌ها به صورت ادامه دار اختلاف معنی دار سطح فعالیت آنزیم ALP با گروه شاهد مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). در این میان بیشترین مقدار مشاهده شده مربوط به گروه تغذیه شده با پلنتاروم به‌صورت ادامه‌دار و کمترین مقدار مربوط به گروه تغذیه شده با پلنتاروم به صورت ناپیوسته بود که در بین این دو گروه اختلاف معنی‌دار هم مشاهده شد ($p<۰/۰۵$).



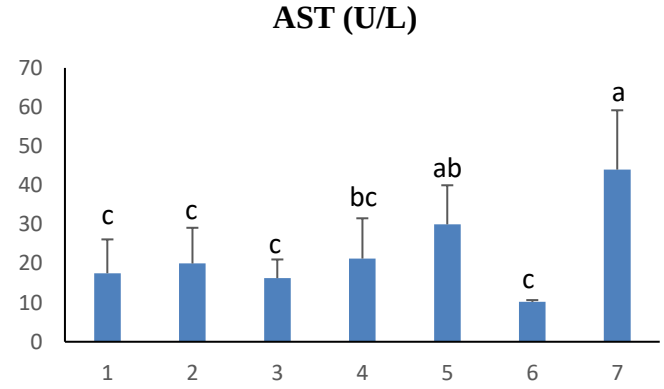
شکل ۷ مقایسه فسفاتاز قلیایی سرم خون ماهی باس دریایی آسیایی در تیمارهای مختلف.

آنزیم آلانین آمینوترانسفراز

بررسی مقدار فعالیت انزیم ALT در سرم هیچ یک از گروه‌ها قابل اندازه گیری نبوده است.

آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز

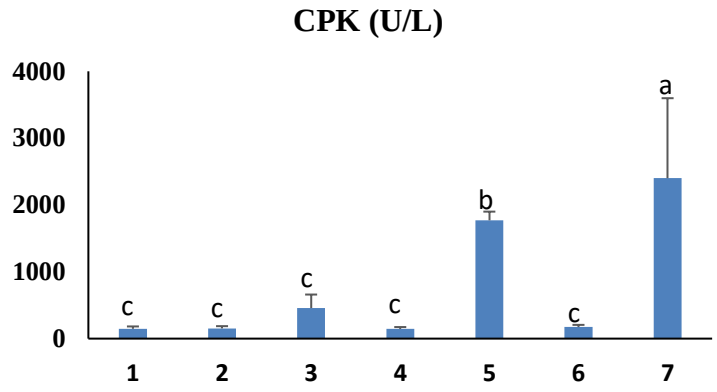
در بررسی سطح فعالیت آنزیم AST اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد در گروه تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیک‌ها به صورت ادامه‌دار مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). بیشترین مقدار مربوط به همین گروه، و کمترین مقدار مربوط به گروه تغذیه شده با مخلوط لاکتوباسیلوس به‌صورت ادامه‌دار بود و اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه نیز مشاهده شد ($p<۰/۰۵$).



شکل ۸ مقایسه آسپارتات آمینو ترانسفراز سرم خون ماهی باس دریایی آسیایی در تیمارهای مختلف.

کراتین فسفوکیناز (CPK)

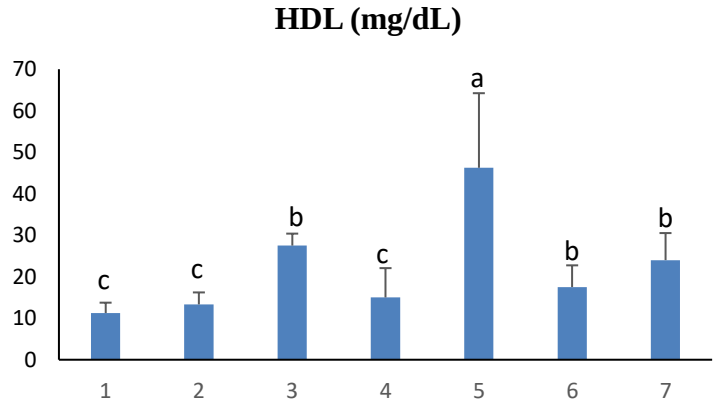
در بین گروه‌های تغذیه شده با پلنتاروم به‌صورت ادامه‌دار و تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیک‌ها به صورت ادامه‌دار اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ($p<۰/۰۵$). اما بین این دو گروه با گروه شاهد و دیگر گروه‌ها اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). بیشترین مقدار مربوط به گروه تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیک‌ها به صورت ادامه‌دار و کمترین مقدار مربوط به گروه تغذیه شده با پلنتاروم به‌صورت ناپیوسته بود.



شکل ۹ مقایسه کراتین فسفوکیناز سرم خون ماهی باس دریایی آسیایی در تیمارهای مختلف.

HDL

در گروه‌های تغذیه شده با پلنتاروم به صورت ادامه‌دار و ناپیوسته اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). کمترین مقدار مشاهده شده در اندازه‌گیری HDL مربوط به گروه تغذیه شده با پلنتاروم به‌صورت ناپیوسته و بیشترین مقدار مربوط به گروه تغذیه شده با پلنتاروم به‌صورت ادامه‌دار بود. در گروه‌های تغذیه شده با پلنتاروم به‌صورت ناپیوسته و مخلوط لاکتوباسیلوس به‌صورت ناپیوسته اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$).



شکل ۱۰ مقایسه HDL سرم خون ماهی باس دریایی آسیایی در تیمارهای مختلف.

بحث

بر اساس مطالعات محققان، عوامل محیطی (فصل، شوری، درجه حرارت و تراکم) و عوامل فیزیولوژیک گونه ماهی، سن، جنس، وضعیت تغذیه‌ای، زمان نمونه برداری، چگونگی تهیه نمونه، دقت و حساسیت روش‌های اندازه‌گیری می‌توانند بر فعالیت فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون تأثیرگذار باشند و تفاوت در نتایج تحقیقات انجام شده را سبب شوند (Verdegem et al. 1997). علاوه بر این، احتمالاً نوع پروبیوتیک، میزان و روش‌های مختلف اضافه کردن پروبیوتیک به جیره نیز می‌تواند این اختلافات را موجب شود.

اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی خون راهکاری مناسب برای ارزیابی عملکرد فیزیولوژیک در موجودات مختلف است. نتایج مطالعات متفاوت نشان داده است که هنگام استرس، میزان سوخت و ساز افزایش پیدا می‌کند و سبب افزایش جذب اکسیژن شده که ماهی برای مقابله با این نیازها، از تمامی منابع در دسترس خود استفاده می‌کند. در نتیجه چون انرژی بالایی را صرف فعالیت‌هایی همچون تنظیم اسمزی و تنفس می‌کند، کاهش رشد در این ماهیان مشاهده می‌شود (Biswas et al. 2006). Acerete و همکاران (۲۰۰۹) بیان کردند که متابولیزه شدن گلوکز در پاسخ به استرس به‌عنوان یک منبع انرژی، ماهی را برای

غلبه بر استرس ایجاد شده، آماده می‌کند. بنابراین میزان گلوکز در خون، شاخصی مناسب برای ارزیابی پاسخ‌های ثانویه ماهی در مواجهه با استرس است (Yousefi et al. 2012). البته میزان گلوکز در خون تحت تأثیر میزان غذای مصرفی نیز قرار دارد (Xie et al. 2008; Kaleeswaran et al. 2011) و زمانی‌که ماهی نیاز به سوخت انرژی دارد، ابتدا از ذخایری که دارای اشکال ساده‌تر هستند، مثل گلوکز استفاده می‌کند و بعد از آن به سراغ سوختن دیگر ذخایر می‌رود (Lovell, 1998). در مطالعه حاضر در انتهای آزمایش تنها تیمار تغذیه شده با جیره حاوی مخلوط پروبیوتیک‌ها به صورت ادامه‌دار دارای اختلاف معنی‌دار با دیگر تیمارها بود و بالاترین سطح گلوکز را نشان داد، در حالی‌که در انتهای آزمایش تیمارهای تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیک‌ها به صورت ناپیوسته اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد نداشتند. احتمالاً افزایش سطح گلوکز خون در مطالعه حاضر ممکن است به دلیل اختلال در سوخت و ساز کربوهیدرات به واسطه افزایش تجزیه گلیکوژن کبدی باشد (Martinez et al. 2004). افزایش میزان گلوکز خون در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (Mukherjee et al. 2019; Yang et al. 2019). Morshidi و همکاران (۱۳۹۴) گزارش کردند که استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلنتاروم بر روی ماهی سی‌باس آسیایی تأثیری بر سطح گلوکز خون نمی‌گذارد که در تضاد با نتایج مطالعه حاضر بود. Mohammadian و همکاران (۱۴۰۰) با اضافه کردن پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پنتوسوس به جیره غذایی ماهی قزل آلای رنگین کمان گزارش کردند که کاهش معنی‌دار در میزان گلوکز تیمار تغذیه شده با این پروبیوتیک مشاهده شد، درحالی‌که تغذیه ماهیان با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلنتاروم باعث افزایش معنی‌دار گلوکز نسبت به دیگر تیمارها شد که هم‌راستا با نتیجه مطالعه حاضر بود. مطالعات متعدد گزارش کردند که استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌خصوص لاکتوباسیل‌ها و *Bifidobacterium* spp. سبب کاهش سطح گلوکز خون می‌شود (Carnevali et al. 2006; Al-Dohail et al. 2011; Mohapatra et al. 2014). همچنین، گزارش شده است که گلوکز خون ماهیان دارای تفاوت‌های زیادی بین گونه‌های مختلف و حتی بین افراد یک گونه است.

شاخص‌های تری‌گلیسرید و کلسترول برای ارزیابی سوخت و ساز چربی در ماهیان استخوانی استفاده می‌شوند و میزان آن‌ها سوخت و ساز در کبد را نشان می‌دهد. قسمت عمده تولید تری‌گلیسرید در کبد بوده و قسمت کمی از آن در یاخته‌های بافت چربی انجام می‌شود. تری‌گلیسرید در بدن عمدتاً انرژی فرآیندهای مختلف سوخت و سازی را تأمین می‌کند. کلسترول مهم‌ترین استروئید موجود در بافت‌های حیوانی است. کلسترولی که همراه با مواد غذایی وارد بدن شود، به سهولت جذب می‌شود و میزان کلسترول جذب شده از طریق دستگاه گوارش ارتباط مستقیم با میزان کلسترول غذای مصرفی دارد که البته این ارتباط گهگاه مستقیم نیست (دانیال‌زاده و همکاران، ۱۳۸۵). کلسترول یکی از اجزای تشکیل دهنده غشای یاخته ای، لایه بیرونی لیپوپروتئین پلاسما و پیش ماده تولید هورمون‌های استروئیدی است که یا در یاخته‌ها تولید می‌شود و یا از طریق مواد غذایی جذب می‌شود (Hoseinifar et al. 2012). در مطالعه حاضر، کمترین میزان کلسترول در انتهای دوره در تیمار تغذیه شده با پلنتاروم به صورت ناپیوسته مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری با تیمار تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیک ها به صورت ادامه‌دار نشان داد. همچنین، در مورد تری‌گلیسرید، تیمار تغذیه شده با پروبیوتیک پلنتاروم به‌صورت ناپیوسته کمترین سطح را نشان داد. مرشدی و همکاران (۱۳۹۴) هیچ اختلاف معنی‌داری در سطح کلسترول و تری‌گلیسرید مشاهده نکردند که در تضاد با نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر بود. Mohammadian و همکاران (۱۴۰۰) نیز گزارش کردند که افزودن پروبیوتیک به جیره غذایی ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان سبب کاهش معنی‌دار این فراسنجه در تیمارهای مختلف با گروه شاهد می‌شود. Ye و همکاران (۲۰۱۱) با افزودن پروبیوتیک باسیلوس و پری‌بیوتیک مانان الیگوساکارید به جیره کفشک ماهی ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*)، مشاهده کردند که سطوح مختلف پروبیوتیک و پری‌بیوتیک تأثیری بر میزان کلسترول ندارد، اما سبب اختلاف معنی‌دار در میزان تری‌گلیسرید می‌شود.

آسپارتات ترانس آمیناز (AST) و آلانین ترانس آمیناز (ALT) آنزیم‌هایی هستند که برای ماهی‌ها اهمیت حیاتی دارند. تجزیه و تحلیل فعالیت‌های AST وALT می‌تواند به شناسایی آسیب بافتی ناشی از سموم محیطی

یا استرس‌های فیزیولوژیک کمک کند. این بیومارکرها در تشخیص آسیب کبدی استفاده می‌شوند و یکی از شاخص‌های سرمی ضروری سلامت و عملکرد کبد محسوب می‌شوند، زیرا سیتوپلاسمی بوده و پس از آسیب یاخته‌ای در گردش خون آزاد می‌شوند. به طور کلی تأیید شده است که افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در مایع خارج یاخته‌ای، یک شاخص حساس از آسیب‌های یاخته‌ای حتی آسیبی جزئی است. همچنین، این شاخص‌های بیوشیمیایی برای ارزیابی تأثیر مکمل‌های غذایی بر فعالیت سوخت و سازی و سلامت ماهی استفاده می‌شوند. اگرچه بسیاری از باکتری‌های پروبیوتیک برای استفاده به منظور بهبود رشد و وضعیت سلامت و مقاومت در برابر بیماری، ارزیابی شده‌اند، ولی گزارش‌هایی هم در مورد توانایی آنها در بهبود مشکلات مرتبط با کبد و کاهش آسیب بافتی ناشی از استرس‌های محیطی وجود دارد. استفاده از پروبیوتیک‌ها برای کاهش سطوح AST و ALT، توان بالقوه محافظت از کبد را در پژوهش‌های انجام شده نشان می‌دهد. همواره، بررسی سطوح AST و ALT در درمان‌هایی که برای بهبود سلامت ماهی انجام می‌شود، می‌تواند اثرات سمی احتمالی مرتبط با ترکیبات مورد استفاده یا برهمکنش با دیگر ترکیبات در محیط را نشان دهد. در تحقیق حاضر آنزیم‌های کبدی در تیمارهای مختلف (بجز آنزیم ALT) تفاوت معنی داری در مقایسه با یکدیگر و گروه شاهد نشان دادند، درحالی که در برخی تحقیقات تفاوت معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی در بین گروه‌ها با گروه شاهد مشاهده نشد. آن‌ها دریافتند که سطح ALT و AST سرم ماهی تیلاپیا تحت تأثیر رژیم غذایی حاوی پروبیوتیک بیوژن *B. subtilis* قرار نگرفته است. در مقابل، استفاده از پروبیوتیک بیوژن و سورفاکتین، یک لیپوپپتید ضد میکروبی تولید شده توسط چندین سویه *B. subtilis*، نشان داد که سطوح ALT و AST به طور قابل توجهی در ماهی تیلاپیا کاهش یافته است. در تحقیق دیگری، بررسی فعالیت آنزیم‌های کبدی انجام شد و دریافتند که رژیم‌های غذایی همراه با پروبیوتیک باعث افزایش سطح سرمی AST شده است. اختلاف بین نتایج گزارش شده در مطالعات بالا ممکن است به دلیل نوع پروبیوتیک‌های مورد استفاده، غلظت پروبیوتیک‌های مورد استفاده، گونه ماهی مورد مطالعه، زمان تجویز، روش تجویز و یا شرایط محیطی باشد. آلکالین فسفاتاز (ALP) از آنزیم‌های لیزوزومی است که در فعال‌سازی یاخته‌های بیگانه خوار (ماکروفاژها) نقش داشته و به عنوان یک عامل ضد باکتری مهم عمل می‌کند. افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز با افزایش تولید آنزیم توسط ماکروفاژها مرتبط است. فعالیت آلکالین فسفاتاز در سرم و مخاط ماهی کپور بزرگ هندی (*Catla catla*) که از رژیم غذایی حاوی باسیلوس سوبتیلیس تغذیه کرده بود، افزایش یافت. در تحقیقی دیگر فعالیت آلکالین فسفاتاز در سرم و مخاط ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان که از رژیم غذایی مکمل لاکتوباسیلوس رامنوسوس تغذیه کرده بودند، افزایش یافت. در مطالعه حاضر، راهبرد تغذیه‌ای توانسته تأثیر معنی‌دار بر روی آنزیم‌های کبدی مانند ALP و AST بگذارد، به طوری که استفاده‌ی ناپیوسته در مقایسه با استفاده ادامه دار پروبیوتیک‌ها توانسته است کاهش معنی‌دار در سطح فعالیت این آنزیم‌ها نشان دهد، که در واقع نشان می‌دهد که پروبیوتیک و روش تجویز ناپیوسته مسئول حذف عوامل سمی و بهبود عملکرد کبد است. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که استراتژی تغذیه‌ای می‌تواند باعث کاهش و یا افزایش آسیب کبدی و در نهایت، کاهش یا افزایش سطح فعالیت این آنزیم‌ها شود.

CPK اغلب به عنوان بیومارکر پراکسیداسیون پروتئین که به دلیل تعامل ROS با پروتئین‌هاست، شناخته می‌شود. دناتوره شدن پروتئین‌ها و آنزیم‌های عملکردی می‌تواند بسیاری از فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژی یاخته‌ای را مختل کند. لذا استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌تواند از اکسایش لیپیدی به دلیل مواجهه با انواع استرس‌های محیطی و تغذیه‌ای جلوگیری کند.

Jeon و همکاران ۲۰۰۲ گزارش کردند که خواص ضداکسایشی در صورت استفاده به صورت ترکیبی با دیگر مواد مثل ویتامین‌ها کارآمدتر است و می‌تواند به طور مؤثر اکسایش چربی را به عنوان مانعی در برابر نفوذ اکسیژن کاهش دهد. در ماهی کپور معمولی که با رژیم غذایی همراه با کیتوزان و ویتامین C تغذیه شده بود، افزایش اثربخشی دستگاه دفاع ضداکسایشی ماهیانی را که در معرض آب آلوده با کلرید کادمیوم قرار گرفتند، با سنجش میزان آلانین آمینوترانسفراز، ALT، CPK و فعالیت کاتالاز گزارش کردند. در تحقیق حاضر تمامی مقادیر محاسبه شده برای CPK از مقدار محاسبه شده آن برای

گروه شاهد بیشتر بودند، اما فقط در گروه تغذیه شده با پروبیوتیک پلنتاروم به صورت ادامه‌دار و گروه تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیک ها به صورت ادامه‌دار تفاوت معنی‌دار با دیگر گروه‌ها مشاهده شد. بیشترین مقدار مشاهده شده نیز مربوط به گروه تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیک‌ها به صورت ادامه‌دار بوده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از پروبیوتیک‌ها ممکن است باعث افزایش مقدار CPK شوند.

بیشتر پروتئین‌های پلاسما توسط کبد تولید شده و در غالب بیماری‌ها و اختلالات فیزیولوژیک قسمتی از این پروتئین‌های پلاسما از بدن دفع می‌شوند. پروتئین‌های پلاسما براساس عملکردی که در بدن موجود زنده دارند، به گروه‌های مختلف تقسیم می‌شوند. بیشترین ماده حل شده در پلاسما شامل آلبومین‌ها و گلوبولین‌ها (IgM) هستند. استفاده از گلوبولین، آلبومین و پروتئین کل در سرم خون ماهیان می‌تواند به عنوان شاخصی برای ارزیابی پاسخ‌های ایمنی در ماهی استفاده شود. در مطالعه حاضر میزان پروتئین کل در انتهای آزمایش بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد نداشت، ولی در تیمار تغذیه شده با مخلوط لاکتوباسیلوس‌ها به صورت ادامه‌دار اختلاف معنی دار با دیگر تیمارها مشاهده شد. Wiegertjes و همکاران (۱۹۹۶) گزارش کردند که افزودن پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس کازئی و بولگاریکوس سبب افزایش میزان پروتئین کل می‌شود که در تضاد با مطالعه حاضر بود و بیشترین مقدار پروتئین کل اندازه گیری شده مربوط به گروه شاهد بود. می‌توان این‌طور نتیجه‌گیری کرد که نوع پروبیوتیک تجویزی ممکن است در میزان پروتئین‌های سرم تأثیرگذار باشد.

نتایج تحقیق Naimi و همکاران (۲۰۱۸) نشان داد که استفاده از پری‌بیوتیک سلماناکس در جیره غذایی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث افزایش میزان آلبومین شد. همچنین در تحقیق عادل و همکاران (۱۳۹۴) نیز نشان داده شد که استفاده از پری‌بیوتیک گربیوتیک در تغذیه فیل‌ماهی‌های جوان نیز باعث افزایش میزان آلبومین خون شد، در حالی که در تحقیق حاضر فقط در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک پلنتاروم به‌صورت ناپیوسته و مخلوط لاکتوباسیلوس ها به‌صورت ادامه‌دار افزایش مقدار آلبومین نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از پری‌بیوتیک‌ها و پروبیوتیک‌ها به نوعی متفاوت می‌توانند بر روی میزان آلبومین تأثیرگذار باشند. همچنین، نتایج مطالعه Mohammadianو همکاران (۱۴۰۰) بر پروبیوتیک‌های درون‌زاد جدا شده از ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که متعاقب مصرف جیره‌های آزمایشی حاوی پروبیوتیک-های درون‌زاد، کاهش معنی‌دار در سطح پروتئین تام و آلبومین سرم در تیمارهای آزمایشی در روز ۶۰ نمونه-برداری نسبت به گروه شاهد دیده شد که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد.

ریزمغذی‌هایی مانند کلسیم و گلوکز به عنوان کوفاکتور در ساختار برخی آنزیم‌ها و همچنین در ساختار واحدهای ماکرومولکول‌ها و ترکیبات موجود در مایعات بدن استفاده می‌شوند. بر اساس مطالعه انجام شده توسط Ahire و همکاران در سال ۲۰۱۸ بر روی جذب ریزمغذی‌ها در ماهی کاراس طلایی، استفاده از پروبیوتیک‌ها باعث افزایش جذب آنها در روده می‌شود. همچنین، پروبیوتیک‌ها باعث افزایش عمق کریپت‌ها در روده و همچنین، مستحکم‌تر شدن بافت پوششی روده، و در نتیجه باعث افزایش جذب کلسیم می‌شوند. از سوی دیگر، پروبیوتیک‌ها باعث افزایش تولید ویتامین‌های B_{12}، B_6 و K_2 می‌شوند و به جذب املاح معدنی مانند آهن و کلسیم کمک می‌کنند. در مطالعه حاضر در تیمار تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیک‌ها به صورت ناپیوسته بیشترین مقدار کلسیم مشاهده شده که می‌تواند نشان‌گر تأثیر پروبیوتیک و نحوه تجویز آن بر مقدار کلسیم باشد. در مطالعه Mohammadian و همکاران (۱۴۰۰) تأثیر مثبت تغذیه ماهی قزل آلای رنگین کمان با پروبیوتیک‌های درون‌زاد بر میزان کلسیم مشاهده شده است که در تضاد با نتایج مطالعه حاضر بود.

نتیجه گیری نهایی

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که تغذیه با مخلوط پروبیوتیک‌ها نسبت به تغذیه با پروبیوتیک-ها به صورت مجزا تأثیر بهتری برروی عمده فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون دارد و می‌توان با تجویز ناپیوسته این پروبیوتیک‌ها نسبت به روش ادامه‌دار نتیجه بهتری را نیز کسب کرد.

تشکر و قدردانی

این کار با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز (شماره قرارداد پژوهانه: SCU.VC98.299) و قطب علمی ماهیان گرمابی، دانشگاه شهید چمران اهواز تأمین شد. نویسندگان این تحقیق از دستورالعمل‌های دانشگاهی تبعیت کردند و آزمایش‌ها را بر اساس دستورالعمل اخلاقی حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

منابع

Acerete, L., Reig, L., Alvarez, D., Flos, R., Tort, L. 2009. Comparison of two stunning/slaughtering methods on stress response and quality indicators of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture 287: 139-144.

Adel, M., Safari, R., Yeganeh, S., Ahmadvand, Sh., Ahmadvand, Sh. 2014. The effect of prebiotic grobiotic on some growth, hematological, biochemical and immune indicators of young beluga fish (*Huso huso*). Fisheries Science and Technology 4: 89-99.

Ahire, J.J., Mokashe, N.U., Chaudhari, B.L. 2018. Effect of dietary probiotic *Lactobacillus helveticus* on growth performance, antioxidant levels, and absorption of essential trace elements in goldfish (*Carassius auratus*). Probiotics and Antimicrobial Proteins. 11: 556-568.

Al-Dohail, M.A., Hashim, R., Aliyu-Paiko, M. 2011. Evaluating the use of Lactobacillus acidophilus as a biocontrol agent against common pathogenic bacteria and the effects on the haematology parameters and histopathology in African catfish *Clarias gariepinus* juveniles. Aquaculture Research 42: 196-209.

Aniyalzadeh, A., Zareian, K. 1374. Principles of biochemistry. Tehran, Academic Publishing Center. 381p.

Azhdahakoshpour, A., Paighan, R., Ahangarzadeh, M., Mohseninejad, L. 2017. Investigating the role of *Vibrio harvey* bacteria in the occurrence of vibriosis in Asian sea bass (*Lates calcarifer*). Marine Journal 3: 27-33.

Azhdari, A., Payghan, R., Gurbanpour, M., Ahangarzadeh, M., Mirbakhsh, M. 2017. Evaluation of virulence of Vibrio Harvey isolates isolated from cultured Asian sea bass (*Lates calcarifer*) and investigation of the protective effect of bacteria prepared from the acute isolate. Doctoral thesis (PhD) in aquatic health. Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University.

Biswas, A.K., Seoka, M., Takii, K., Maita, M., Kumai, H. 2006. Stress response of red sea bream *Pagrus major* to acute handling and chronic photoperiod manipulation. Aquaculture 252: 566-572.

Carlson, J.M., Leonard, A.B., Hyde, E.R., Petrosino, J.F., Primm, T.P. 2017. Microbiome disruption and recovery in the fish *Gambusia affinis* following exposure to broad-spectrum antibiotic, Infect. Drug Resistance 10: 143-154.

Carnevali, O., de Vivo, L., Sulpizio, R., Gioacchini, G., Olivotto, I., Silvi, S., Cresci, A., 2006. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. Aquaculture 258: 430-438.

Falcinelli, S., Rodiles, A., Hatef, A., Picchietti, S., Cossignani, L., Merrifield, D.L., Unniappan, S., Carnevali, O. 2018. Influence of probiotics administration on gut microbiota core: a review on the effects on appetite control, glucose, and lipid metabolism. Journal of Clinical Gastroenterology 52: S50-S56.

FAO. 2012. http://www.fao.org/docrep/006/J2084e/j2084e06.htm

Fuente, M.D.L., Miranda, C.D., Jopia, P., Gonzalez-Rocha, G., Guiliani, N., Sossa, K., Urrutia, H. 2015. Growth inhibition of bacterial fish pathogens and quorum-sensing blocking by bacteria recovered

from Chilean salmonid farms. Journal of Aquatic Animal Health 27: 112-122.

Gasser, M., Zingg, W., Cassini, A., Kronenberg, A. 2019. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in Switzerland. The Lancet 19: 17-18.

Ghanei-Motlagh, R., Mohammadian, T., Gharibi, D., Menanteau-Ledouble, S., Mahmoudi, E., Khosravi, M., Zarea, M., El-Matbouli, M. 2019. Quorum quenching properties and probiotic potentials of intestinal associated bacteria in Asian sea bass *Lates calcarifer*. Marine Drugs 18: 23-27.

Hoseinifar, S.H., Dadar, M., Ringø, E. 2017. Modulation of nutrient digestibility and digestive enzyme activities in aquatic animals: the functional feed additives scenario. Aquaculture Research 48: 3987-4000.

Hoseinifar, S.H., Hossein, M., Paknejad, H., Safari, R., Jafar, A., Yousefi, M. 2019. Enhanced mucosal immune responses, immune related genes and growth performance in common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles fed dietary *Pediococcus acidilactici* MA18/5M and raffinose. Developmental & Comparative Immunology 94: 59-65.

Hoseinifar, S.H., Sun, Y., Wang, A., Zhou, Z. 2018. Probiotics as means of diseases control in aquaculture: A review of current knowledge and future perspectives. Frontiers in Microbiology 9: 24-29.

Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A., Merrifield, D.L. 2011. The effects of dietary inactive brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiaevar*. Ellipsoideus on the growth, physiological responses and gut microbiota of juvenile beluga (*Huso huso*). Aquaculture 318: 90-94

Hoseinifar, S.H., Yousefi, S., Doan, H.V., Ashouri, G., Gioacchini, G., Maradonna, F., Carnevali, O. 2020. Oxidative stress and antioxidant defense in fish: The implications of probiotic, prebiotic, and synbiotics. Reviews in Fisheries Science and Aquaculture 29: 198-217.

Hosseini, A., Chahar Lang, F., Sotoudeh, A., Alishahi, M., Madrasi, M. 2015. The effect of Lactobacillus isolated from the intestine of *Barbus grypus* on the growth performance, survival and microbial flora of common carp (*Cyprinus carpio*). Iranian Scientific Fisheries Journal 25:167-179.

Kaleeswaran, B., Ilavenilb, S., Ravikumara. S. 2011. Dietary supplementation with *Cynodon dactylon* (L.) enhances innate immunity and disease resistance of Indian major carp, *Catla catla* (Ham.). Fish and Shellfish Immunology 31: 953-962.

Lovell, R.T. 1998. Nutrition and feeding of fish. 2nd edition. Kluwer Academic Publishing. Boston, London, 267-332.

Martinez, C., Nagae, M., Zaia, C., Zaia, D. 2004. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Brazilian Journal of Biology 64: 797-807.

Mohammadian, T. 2013. Evaluation of probiotic power and immune stimulation of some lactobacilli isolated from the intestine of *Barbus grypus*. Doctoral thesis of Shahid Chamran University of Ahvaz in field of health and aquatic diseases, 177 p.

Mohammadian, T., Alishahi, M., Tabandeh, M.R., Ghorbanpoor, M., Gharibi, D., Tollabi, M., Rohanizade, S. 2016. Probiotic effects of *Lactobacillus plantarum* and *L. delbrueckii* ssp. *bulguricus* on some immune-related parameters in *Barbus grypus*. Aquaculture International 24: 225-242.

Mohammadian, T., Gurbanpour, M., Alishahi, M., Tabandeh, M., Gharibi, D. 2013. Isolation and biochemical identification of lactobacilli with probiotic potential from the intestine of Shirbet fish. Iranian Veterinary Medicine 1097-1088.

Mohammadian, T., Jangaran Nejad, A.H., Badiei, A., Momeni, H., Tabandeh, M.R.,

Mousavi Khorasani, S.P. 1400. Effect of endogenous probiotics isolated from fish on factors biochemistry and liver enzymes of rainbow trout. Journal of Veterinary Research 76: 22-30.

Mohapatra, S., Chakraborty, T., Kumar, V., DeBoeck, G., Mohanta, K.N. 2013. Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 97: 405-430.

Morshidi, V., Nafisi Bahabadi, M., Azdi, M., Madrasi, M., Chiraghi, S. 2014. The effects of dietary probiotic (*Lactobacillus plantarum*) on carcass composition, some biochemical indices of blood serum and liver enzymes. Asian seabass (*Lates calcalifer*, Bloch 1790). Journal of Marine Science and Technology 14: 1-14.

Mukherjee, A., Chandra, G., Ghosh, K. 2019. Single or conjoint application of Pre-proof *autochthonous Bacillus* strains as potential probiotics: Effects on growth, feed utilization, immunity and disease resistance in Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton). Aquaculture 512: 734302.

Naimi, A., Alizadeh Doghiklai, A., Jafarian, A., Ahmadifar, A. 2018. The effect of Selmanax probiotic on the growth, hematological and biochemical factors of *Oncorhynchus mykiss* rainbow trout fry. Journal of Veterinary Research 74: 175-185.

Planas, M., Vazquez, J.A., Marques, J., Peres-Lomba, R., Gonzalez, M.P., Murado, M. 2005. Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. Aquaculture 240: 313-329.

Rico, A., Phu, T.M., Satapornvanit, K., Min, J., Shahabuddin, A., Henriksso P.J. 2013. Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four maj internationally traded aquaculture species farmed in Asia. Aquaculture 412: 231-243.

Van Doan, H., Hoseinifar, S.H., Khanongnuch, C., Kanpiengjai, A., Unban, K., Srichaiyo, S. 2018. Host-associated probiotics boosted mucosal and serum immunity, disease resistance and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 491: 94-100.

Verdegem, M.C.J., Hilbrands, A.D., Boon, J.H. 1997. Influence of salinity and dietary composition on blood parameter values of hybrid red tilapia (*Oreochromis niloticus* & *Oreochromis mossambicus*). Aquaculture Research 28: 453-459.

Verschuere, L., Rombaut, G., Huys, G., Dhont, J., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 1999. Microbial control of the culture of Artemia juveniles through preemptive colonization by selected bacterial strains. Applied and Environmental Microbiology 65: 2527-2533.

Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H. 2006. Probiotics in marine larviculture. FEMS Microbiology Reviews 30: 404-427.

Wiegertjes, G.F., Stet, R.J.M., Parmentier, H.K., Van Muiswinkel, W. 1996. Immunogenetics of disease resistance in fish; a comparable approach. Developmental and Comparative Immunology 20: 365-381.

Xie, j., Liu, B., Zhou, Q., Su, Y., Pan, L., Ge, X., Xu, P. 2008. Effects of anthraquinone extract from ruhbarb Rheum officinale Bail on the crowding stress response and growth of common carp (*Cyprinus carpio*) var. jian. Aquaculture 281: 5-11.

Yang, G., Cao, H., Jiang, W., Hu, B., Jian, S., Wen, C., Kajbaf, K., Kumar, V., Tao, Z., Peng, M. 2019. Dietary supplementation of Bacillus cereus as probiotics in *Pengze crucian* carp (*Carassius auratus* var. Pengze): effects on growth performance, fillet quality, serum biochemical parameters and intestinal histology. Aquaculture Research 50: 2207-2217.

Ye, J.D., Wang, K., Li, F.D., Sun, Y.Z., 2011. Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body

composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture Nutrition 17: 902-911.

Yousefi, M., Abtahi, B., Abedian Kenari, A. 2012. Hematological, serum biochemical parameters, and physiological responses to acute stress of Beluga sturgeon (*Huso huso*, Linnaeus 1785) juveniles fed dietary nucleotide. Comparative Clinical Pathology 21: 1043-1048.

Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A.R., Shakouri, M. 2006. The effect of Bacillus spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian (*Fenneropenaeus indicus*). Aquaculture 252: 516-524.