University of Guilan with collaboration of Iranian Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 8, No. 3, 2022, pages: 1-15
DOI: 10.22124/janb.2023.24077.1190

Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Candida utilis* on mucus immunity indices, liver enzymes, and growth of common carp, *Cyprinius carpio*

Tayeb Weisi[1], Nasrollah Ahmadifard[*1,4], Behrooz Atashbar[2], Amir Tukmechi[3]

1- Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, West Azerbaijan, Iran

2- Department of Ecology and Resource Assessment, Artemia, Artemia & Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, West Azerbaijan, Iran

3- Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, West Azerbaijan, Iran

4- Artemia & Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, West Azerbaijan, Iran

Received 2 June 2022 Revised 17 September 2022 Accepted 19 September 2022

KEYWORDS

Probiotics

Mucus

Immunity

Liver enzymes

Growth

Common carp

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Candida utilis* probiotics on mucus immunity, growth indices and liver enzymes of common carp (*Cyprinus carpio*). This study was in the form of a completely randomized design with 4 treatments and 3 repetitions including: 1- basic diet, 2- basic diet + bacteria (1.23 g), 3- basic diet + yeast (0.67 g) and 4- basic ration + bacteria (0.625 g) and yeast (0.333 g) per kg of diet in 60 days. A number of 300 fish with an average weight of 12 ± 0.33 g were randomly distributed in 12 tanks (300 L) with a density of 25 fish in each tank. Based on the results, no significant difference was observed in terms of growth indices between the treatments except for the protein efficiency ratio ($p>0.05$). However, significant differences were found between the treatments ($p<0.05$) in terms of mucus immune parameters, lysozyme activity, total immunoglobulin and total protein. It was also true for AST and ALP which exhibited significant differences between the treatments ($p<0.05$). Based on the general results of this study, using *Lactobacillus acidophilus* and *Candida utilis* as probiotics displayed the highest enhancement on the fish immune system.

*Corresponding author: n.ahmadifard@urmia.ac.ir

دانشگاه گیلان با مشارکت انجمن آبزی‌پروری ایران

تغذیه آبزیان

سال هشتم، شماره سوم، پاییز ۱۴۰۱، صفحات ۱۵-۱

DOI: 10.22124/janb.2023.24077.1190

"مقاله پژوهشی"

تأثیر پروبیوتیک‌های *Lactobacillus acidophilus* و *Candida utilis* بر شاخص‌های ایمنی موکوس، آنزیم‌های کبدی و رشد ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

طیب ویسی[۱]، نصراله احمدی فرد [۱و۴*]، بهروز آتشبار کنگرلویی[۲]، امیر توکمه چی[۳]

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، آذربایجان غربی

۲- گروه اکولوژی و بیوتکنولوزی آبزیان، پژوهشکده آرتمیا و آبزی پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، آذربایجان غربی

۳- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، آذربایجان غربی

۴- پژوهشکده آرتمیا و آبزی پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، آذربایجان غربی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۲ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۶/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۸

چکیده

هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی اثرات پروبیوتیک‌های *Lactobacillus acidophilus* و *Candida utilis* بر ایمنی موکوس، شاخص‌های رشد و آنزیم‌های کبدی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بود. این پژوهش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۳ تکرار شامل: ۱- جیره تجاری (control)، ۲- جیره تجاری + باکتری (۱/۲۳ گرم در کیلوگرم غذا (bacteria + control)، ۳- جیره پایه + مخمر (۰/۶۷ گرم در کیلوگرم غذا) (yeast + control) و ۴- جیره پایه + باکتری (۰/۶۲۵ گرم) و مخمر (۰/۳۳۳ گرم) در کیلوگرم غذا (yeast + + bacteria control) در مدت زمان ۶۰ روز انجام شد. تعداد ۳۰۰ ماهی با میانگین وزن ۰/۳۳ ± ۱۲ گرم به‌طور تصادفی در ۱۲ مخزن ۳۰۰ لیتری با تراکم ۲۵ عدد ماهی در هر مخزن توزیع شدند. بر اساس نتایج، به لحاظ شاخص‌های رشد بین تیمارها بجز نسبت کارایی پروتئین تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵). به لحاظ شاخص‌های ایمنی موکوس، فعالیت لیزوزیم، ایمونوگلوبولین کل و پروتئین کل بین تیمارها تفاوت معنی‌دار وجود داشت (p<۰/۰۵). آنزیم‌های کبدی شامل AST و ALP بین تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان دادند (p<۰/۰۵). بر اساس نتایج کلی مطالعه حاضر، استفاده از پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و کاندیدا اوتیلیس بیشترین اثر را بر دستگاه ایمنی ماهی داشته و سبب تقویت و بهبود دستگاه ایمنی ماهی مورد نظر می‌شود.

کلمات کلیدی

پروبیوتیک

ایمنی موکوسی

آنزیم‌های کبدی

رشد

کپور معمولی

نویسنده مسئول: n.ahmadifard@urmia.ac.ir

مقدمه

دستیابی به تولید اقتصادی کپور معمولی مستلزم استفاده از جیره غذایی مناسب و کافی به شکلی است که بتواند علاوه بر تامین نیازهای اولیه، موجب بهبود شرایط رشد، بهبود و تقویت سطح ایمنی، مقاومت در برابر شرایط نامناسب محیطی، کاهش تلفات، ماهیانی با وزن بالاتر و در نهایت دستیابی به تولیدی بالاتر در شرایط پرورشی گردد. در شرایط پرورش کپور ماهیان، تهدید عمده، شیوع بیماری به دلیل وجود اشکال مختلف ریزموجودات بیماری‌زا در کشورهای مختلف است.

ریزموجودات بیماری‌زا شامل ویروس‌ها، باکتری‌ها، ریکتسیاها، مایکوپلاسما، جلبک‌ها، قارچ‌ها و انگل‌های تک-یاخته‌ای هستند. یکی از شایع‌ترین بیماری‌های باکتریایی در شرایط پرورشی توسط گونه‌های ویبریو و آئروموناس ایجاد می‌شود که از گونه‌های ویبریو می‌توان به مواردی از قبیل *Vibriosis harveyi*، *V. splendidus* و *V. parahaemolyticus* و از جنس آئروموناس گونه *Aeromonas hydrophila* اشاره کرد (Tavakoli and Akhlagi, 2015). عفونت‌های باکتریایی باعث تلفات سنگین در مزارع پرورش ماهی شده و خسارات اقتصادی شدیدی را به صنعت آبزی پروری وارد می‌کند. باکتری‌های آئروموناس هیدروفیلا به عنوان عامل سپتی-سمی یا مسمومیت خون گزارش شده اند. در بین عوامل باکتریایی آبزیان، خصوصا در ماهیان آب شیرین، آئروموناس هیدروفیلا بسیار مورد توجه بوده است (Pirarat et al. 2007; Cao et al. 2011). *A. hydrophila* یک باکتری فرصت‌طلب است اما تحت شرایط استرس‌زا، تبدیل به یک عامل بیماری‌زا شده و ایجاد بیماری می‌کند (Lee et al. 2000, Yogananth et al. 2009).

برای جلوگیری از عوامل بیماری‌زا نیاز به استفاده منظم از آنتی بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی دیگر است. برخی از پرمصرف‌ترین افزودنی‌های تقویت کننده رشد شامل هورمون‌ها، یونوفورها، برخی نمک‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها هستند (Fuller, 1992; El-Haroun et al. 2006). آنتی‌بیوتیک‌ها معمولاً در اوایل دهه ۱۹۵۰ نه تنها به عنوان استراتژی سنتی برای مدیریت بیماری‌های ماهی بلکه برای بهبود رشد و کارایی تبدیل خوراک مورد استفاده قرار می-گرفتند. ماهی‌های پرورش یافته که به دلیل بیماری با مرگ و میر مداوم روبرو هستند، سریعاً با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها درمان می‌شوند اما در برخی از کشورها استفاده از این روش ممنوع است (De Paola et al. 1995; Watson et al. 2008). باکتری‌ها در اثر سوء استفاده یا استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک‌ها مقاوم شده و بقای آن‌ها بالا می‌رود (Watson et al. 2008). از این رو، در رابطه با ممنوعیت استفاده از آنتی‌بیوتیک، به راهبردهای جدید در تغذیه و مدیریت سلامت در آبزی‌پروری بسیار توجه شده است (Balcázar et al. 2006). یکی از جایگزین‌ها استفاده از پروبیوتیک‌هاست که ثابت شده است که گزینه مناسب در ارتقاء سلامت و رشد است (kumar et al. 2006; Wache et al. 2006; Denev, 2008). در حال حاضر پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری به عنوان یک افزودنی ساده و بی خطر دارای مزایای زیادی از جمله تعدیل کلونی میکروبی، تأمین مواد مغذی، بهبود پاسخ‌های ایمنی، افزایش فعالیت‌های آنزیمی هضم، بهبود استفاده از خوراک و قابلیت هضم، کنترل بیماری‌ها، بهبود کیفیت آب و تقویت رشد هستند (Gatesoupe, 1999; Verschuere et al. 2000; Iriant and Austin, 2002; Pérez-Sánchez et al. 2014). از آنجا که صنعت تکثیر و پرورش کپور ماهیان از اهمیت اقتصادی ویژه‌ایی برخوردار است، بنابراین بررسی جنبه‌های مختلف تکثیر و پرورش آن‌ها از جمله بقا و رشد و همچنین راه‌های کاهش هزینه غذا با استفاده از پروبیوتیک‌ها مهم است. از اثرات مفید پروبیوتیک‌ها می‌توان به رشد بیشتر، افزایش راندمان غذا و جلوگیری از اختلالات روده اشاره کرد. علاوه بر این، استفاده از پروبیوتیک‌ها برای تقویت شاخص‌های رشد و بهبود توانایی مقاومت به بیماری در ماهیان به خوبی ثبت شده است (Wang et al. 2006; Watson et al. 2008). استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان یک مکمل غذایی در آبزی پروری به عنوان غذای ماهیانی از قبیل توربوت، *Oncorhynchus mykiss*، ماهی آزاد و ماهی کاد برای تقویت و افزایش هر دو محیط داخلی و بیرونی میکروبی، برای افزایش جمعیت موجودات غذایی و بهبود سطح تغذیه‌ای آن‌ها و ایمنی حیوانات پرورشی در برابر ریزموجودات بیماری زا نتایج امیدوارکننده‌ای نشان داده است، اما مطالعات مربوط به استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان یک مکمل غذایی در ماهی کپور معمولی به‌ندرت انجام شده است (Strom and Ringo, 1993;

Gatesoupe, 1994, 1997; 1999; Gildberg et al. 1995; Austin et al. 1995; Robertson et al. 2000).

از سویه‌های لاکتوباسیل و برخی از گونه‌های مخمر از جمله *Saccharomyces boulardii* و *Sacharomyces cerevisiae* به عنوان پروبیوتیک به طور گسترده مطالعه شده است. گزارش‌ها حاکی از آن است که پروبیوتیک‌های خوراکی سبب بهبود وضعیت ضداکسایشی موجودات، حفظ تعادل فلور روده، تنظیم سطح کلسترول خون و جلوگیری از تومورهای ناشی از مواد شیمیایی می‌شوند. مزیت پروبیوتیک‌ها این است که آن‌ها پس از گذر از معده قادر به زنده ماندن هستند و برای رشد خود تعداد زیادی قند استفاده می‌کنند و طیف وسیعی از آنزیم‌های گوارشی مربوطه، آمیلاز، پروتئاز و لیپاز را تولید می‌کنند. در مطالعه حاضر از دو سویه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و کاندیدا اوتیلیس استفاده شده است که این پروبیوتیک‌ها دارای تحمل بالایی نسبت به غلظت بالای روی معدنی، شرایط pH پایین و غلظت بالای نمک‌های صفراوی هستند (Ren et al. 2011). بیشتر آزمایش ها در مورد حیوانات بر روی دام، مرغ یا موش انجام شده است (Pan al. 2007; Qin et al. 2007; et). با این وجود تا به حال، هیچ گزارشی در مورد ترکیب متشکل از مخمر و لاکتوباسیلوس-ها و اثرات آن بر ماهیان وجود ندارد. هدف از این مطالعه تهیه مکمل پروبیوتیکی است که برای بررسی کارایی آن ماهی کپور معمولی به عنوان یک مدل با جیره‌های غذایی حاوی پروبیوتیک تغذیه شد و آنزیم‌های کبدی، رشد و ایمنی موکوسی در ماهی کپور معمولی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه پروبیوتیک و مواد اولیه

استوک اولیه پروبیوتیک‌های *Lactobacillus acidophilus* و *Candida utilis* از مرکز ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران تهیه و در محیط کشت مربوطه کشت داده شدند. محیط کشت MRS و YEPD (مرک آلمان) به ترتیب برای باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و مخمر کاندیدا اوتیلیس استفاده شد.

تیمار بندی و انجام پژوهش

در تحقیق حاضر از ۴ تیمار غذایی بر اساس جدول ۱ استفاده شد. برای آماده سازی جیره‌های غذایی آزمایش، به کمک ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم، یک کیلوگرم از جیره پایه (جدول ۲) برای هر یک از تیمارها و گروه شاهد توزین شد. مقدار مورد نیاز از پروبیوتیک‌ها پس از حل شدن در میزان یکسانی از آب مقطر بر روی غذاها اسپری و پس از خرد کردن با چرخ گوشت به پلت‌های به اندازه رشته‌های ماکارونی در آمد. غذای تهیه شده در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شد (Pourali et al. 2003). برای حفظ کیفیت غذای مصرفی، غذای مورد نیاز هر یک از تیمارها به صورت هفتگی تهیه و در پوشش‌های مناسب پلاستیکی بسته‌بندی و تا زمان مصرف، در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در تیمار شاهد نیز جیره غذایی با روش فوق با افزودن آب مقطر و بدون افزودن پروبیوتیک تهیه شد.

جدول ۱ مشخصات تیمارهای آزمایشی

تیمار	خصوصیات تیمار
۱	شاهد[۱]
۲	کنترل + باکتری[۲]
۳	کنترل + مخمر[۳]
۴	کنترل + باکتری + مخمر[۴]

۱: جیره تجاری (فاقد روی و فاقد پروبیوتیک)

۲: جیره تجاری+ باکتری *L. acidophilus* به میزان ۱/۲۳ گرم بر کیلوگرم غذا

۳: جیره تجاری+ مخمر *Candida utilis* به میزان ۰/۶۷ گرم بر کیلوگرم غذا

۴: جیره تجاری + مخمر *Candida utilis* و باکتری *L. acidophilus* به ترتیب به میزان ۰/۳۳۳ و ۰/۶۲۵ گرم بر کیلوگرم غذا

جدول ۲ مشخصات فیزیکی و ارزش غذایی خوراک مصرفی

ترکیب	مقدار
پروتئین (٪)	۳۰
چربی (٪)	۹
کربوهیدرات (٪)	۵۰
رطوبت (٪)	۱۰-۱۱
اندازه (mm)	۲/۲
طول ماهی (mm)	۱۵-۴۰
دفعات غذادهی (در روز)	۴

جهت انجام آزمایش تعداد ۳۰۰ قطعه ماهی کپور با میانگین وزنی ۰/۳۳ ± ۱۲ گرم از مرکز سد سنگر رشت خریداری و بعد از طی دوره سازگاری یک هفته ای در ۱۲ عدد تانک پلاستیکی ۳۰۰ لیتری در قالب ۴ تیمار و با ۳ تکرار توزیع شدند. منبع آب مورد استفاده چاه با روش گرمایشی، خصوصیات دما ۱ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد، pH ۷/۵، اکسیژن محلول ۰/۴ ± ۷، دوره روشنایی ۱۰ ساعت تاریکی و ۱۴ ساعت روشنایی و سرعت جریان آب ۱/۳ لیتر در ثانیه را داشت. بچه ماهیان در تمامی تیمارها به مدت یک هفته در دوره سازگاری توسط جیره پایه تجاری تغذیه شد. غذای مورد استفاد از شرکت تجاری تولید جیره غذایی ماهیان گرمابی اتحاد گیلان (شرکت تولید خوراک دام، طیور و آبزیان) خریداری شد. غذادهی ماهیان به میزان ۲ درصد وزن بدن روزانه ۴ بار و برای مدت ۶۰ روز انجام شد. قبل از شروع مطالعه، همه ماهی‌ها تحت معاینه دامپزشکی قرار گرفت. غذادهی در گروه‌های آزمایش طبق تیمارهای آزمایشی انجام شد.

بررسی شاخص‌های رشد و تغذیه

در پایان دوره پرورش برای ارزیابی وضعیت رشد ماهیان و مقایسه تیمارهای مختلف از شاخص‌های رشد با استفاده از اطلاعات وزنی و طولی بچه ماهیان به صورت انفرادی در هر مخزن مقادیر وزن نهایی، ضریب تبدیل غذایی، ضریب رشد ویژه، نسبت کارایی پروتئین، درصد افزایش وزن بدن، سرعت رشد روزانه، ضریب چاقی و درصد بقا محاسبه شد. فرمول فاکتورهای رشد و تغذیه در زیرنوس جدول ۳ آورده شده است.

بررسی فاکتورهای ایمنی موکوس

جمع آوری موکوس

در پایان دوره آزمایش موکوس ماهیان تغذیه شده با تیمارهای مختلف با استفاده از روش Subramanian و همکاران (۲۰۰۷) جمع‌آوری شد. برای این منظور غذادهی ماهیان به مدت ۲۴ ساعت قبل از نمونه‌برداری قطع شد. از هر تکرار ۳ قطعه ماهی صید و بلافاصله به صورت انفرادی درون کیسه‌های زیپ پلاست حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سدیم کلرید ۵۰ میلی‌مولار قرار گرفت. پس از مدت زمان دو دقیقه ماهیان به آکواریوم با اکسیژن مناسب منتقل و موکوس از کیسه‌ها جمع‌آوری و مایع رویی آن در آزمایشگاه پس از سانتریفیوژ با ۱۵۰۰ × g دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد به دست آمد. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد قرار گرفتند.

سنجش فاکتورهای ایمنی موکوس

برای اندازه‌گیری پروتئین کل موکوس از روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) استفاده شد. اندازه‌گیری با اضافه نمودن معرف رنگی فولین فنول سیوکالتیو به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق شده موکوس و استاندارد و قرائت نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گرفت. با انتقال جذب نوری به دست آمده به منحنی استاندارد، میزان پروتئین محلول بر حسب میلی‌گرم بر دسی لیتر محاسبه شد.

سنجش آنزیم لیزوزیم به روش کدورت سنجی و به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر بر حسب واحد u/mL/min انجام گرفت. برای این کار از باکتری

لیـوفلیزه *Micrococcus lyzodeikticus* حـل شده در بافر فسفات پتاسیم به عنوان سوبسترا استفاده شد. جذب این محلول در مقابـل شـاهد (کـووت حاوی بافر فسفات پتاسیم) در طول موج ۴۵۰ نانومتر و بـه مـدت ۱۰ دقیقـه، اثـر کاهشـی سلول‌های میکروکوکوس لیزودیکتیکوس ثبت شد (Esteban et al. 2001).

برای سنجش میزان ایمونوگلبولین کل ابتدا میزان پروتئین موکوس و سرم خون تعیین شد و سپس به نمونه موکوس و یا سرم خون، پلی اتیلن گلیکول ۱۲ درصد اضافه شد. پس از ۲ ساعت در دمای اتاق نمونه‌ها سانتریفیوژ شد و غلظت پروتئین در قسمت بالایی محلول مجدداً اندازه‌گیری شد. میزان ایمونوگلبولین کل از تفریق غلظت پروتئین در نمونه اولیه و غلظت پروتئین پس از افزودن پلی اتیلن گلیکول بر حسب mg/mL محاسبه شد (Siwicki and Anderson, 1993).

سنجش آنزیم‌های کبدی

سنجش آنزیم‌های کبدی با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر طبق دستورالعمل شرکت سازنده با کیت‌های آزمایشگاهی از نوع Biochemical شرکت پارس آزمون انجام شد. سنجش آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) به روش رنگ سنجی کینتیک و آلکالین فسفاتاز (ALP) به روش آنزیماتیک کینتیک صورت گرفت (Shahsavani et al. 2010).

آنالیز آماری

تمام داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS 23 ارزیابی شدند. اختلاف بین گروه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه بررسی شد و از آزمون دانکن برای بررسی اختلاف بین میانگین‌ها استفاده شد. قبل از انجام آنالیز واریانس از نرمال بودن داده ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف اطمینان حاصل شد. اختلافات آماری از لحاظ معنی دار بودن در سطح ۰/۰۵ در نظر گرفته و داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

فاکتورهای رشد و تغذیه

نتایج فاکتورهای رشد در جدول ۳ نشان داده شده است. بالاترین وزن نهایی ضریب تبدیل غذایی، ضریب رشد ویژه، درصد افزایش وزن بدن در تیمار جیره پایه + باکتری و مخمر و پایین ترین وزن نهایی، ضریب رشد ویژه، سرعت رشد روزانه، درصد افزایش وزن بدن و ضریب چاقی در تیمار جیره تجاری + باکتری مشاهده شد. بر اساس آنالیز آماری بین تیمارها به لحاظ فاکتورهای رشد و تغذیه به جزء نسبت کارایی پروتئین که به ترتیب بالاترین و پایین‌ترین در تیمار جیره تجاری + باکتری و جیره تجاری بدست آمد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵).

جدول۳ فاکتورهای رشد ماهی کپور معمولی تغذیه شده با جیره غذایی مختلف در مدت زمان ۶۰ روز (میانگین ± انحراف معیار). حروف مختلف در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی داری در سطح ۰/۰۵ می باشد(p>۰/۰۵).

شاخص	کنترل	کنترل + باکتری	کنترل + مخمر	کنترل + باکتری + مخمر
TW [1]	۲۳/۸ ± ۰/۴۴	۲۳/۷ ± ۱/۱۱	۲۲/۶۴ ± ۰/۴۲	۲۳/۸۸ ± ۰/۸۱
FCR[2]	۵/۰۹ ± ۱/۶۹	۳/۵۷ ± ۰/۲۵	۳/۸۱ ± ۰/۷۷	۵/۶ ± ۱/۲۶
PER[3]	۳۰/۷۸ ± ۲/۹۲[b]	۳۲/۲۸ ± ۱/۶[b]	۳۶/۹ ± ۱/۷۳[a]	۳۲/۰۵ ± ۲/۵۴[b]
SGR[4]	۱/۱۷ ± ۰/۰۳	۱/۱۶ ± ۰/۰۹	۱/۰۹ ± ۰/۰۲	۱/۱۸ ± ۰/۰۶
DGR[5]	۰/۲ ± ۰/۰[b]	۰/۲ ± ۰/۰۲[ab]	۰/۱۸ ± ۰/۰۱[a]	۰/۲ ± ۰/۰۱[ab]
WG[6]	۹۳/۰۳ ± ۳/۵۷	۹۲/۲۷ ± ۹/۰۴	۸۳/۶۲ ± ۳/۴۴	۹۳/۷۳ ± ۶/۵۷
CF[7]	۱/۹۱ ± ۰/۰۴	۱/۹۳ ± ۰/۰۹	۱/۹ ± ۰/۰۲	۱/۹۲ ± ۰/۰۷
SVR[8]	۸۵/۳۳ ± ۱۰/۰۶	۹۴/۶۶ ± ۲/۳	۹۶/۶۶ ± ۶/۹۲	۹۴/۶۷ ± ۹/۲۳

Total weight (gr) (Shepherd and Bromage, 1992)

FCR=TF/WG= TF((غذای مصرفی (گرم)), WG((افزایش وزن (گرم)) Shepherd and Bromage, 1992)

PER=WG(g)/PC(g)= WG ((افزایش وزن(گرم)), PC(پروتئین مصرفی) Shepherd and Bromage, 1992

$SGR=100\times[(LognW_2-LognW_1)/T=$ $LognW_2$(وزن نهایی), $LognW_1$(وزن اولیه), T: تعداد روزهای پرورش (Shepherd and Bromage, 1992)

$GR = W2 - W1/T2 - T1 =$ W_2(وزن نهایی), W_1(وزن اولیه), T_2-T_1: طول دوره پرورش (Kissil et al. 2001)

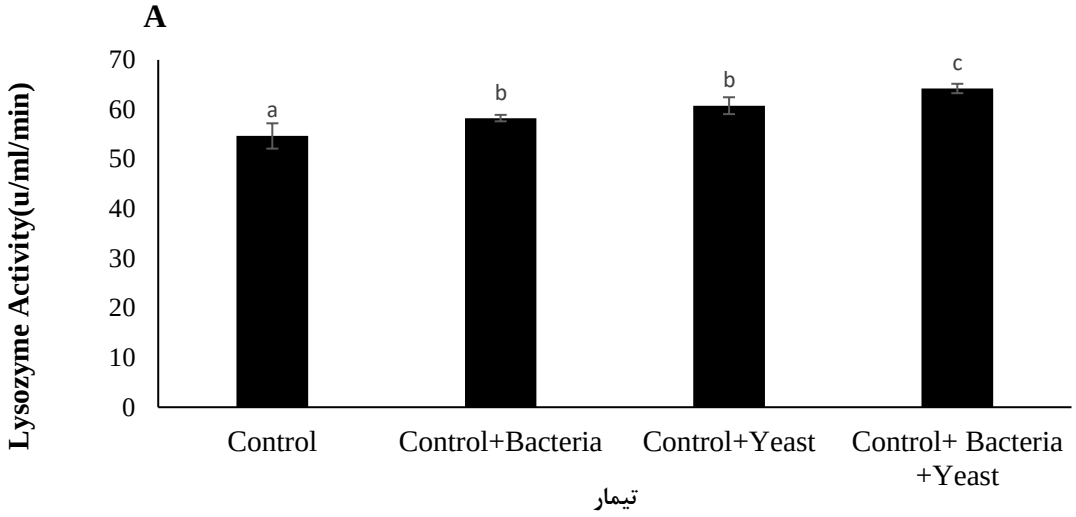
$\% WG = \left[\left(\left(\text{گرم} \right) \text{میانگین وزن نهایی} - \left(\text{گرم} \right) \text{میانگین وزن اولیه} / \left(\text{گرم} \right) \text{میانگین وزن اولیه} \right) \right] \times 100$ (Abdol Tawwab et al. 2008)

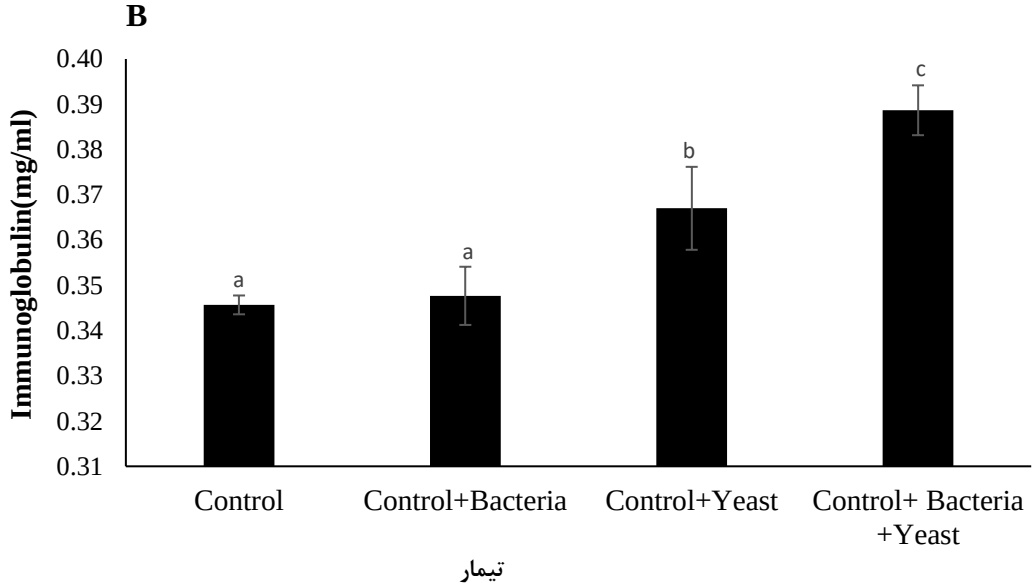
$CF = W/L^3 \times 100 =$ W(وزن) , L(طول) (Ojolick et al. 1995)

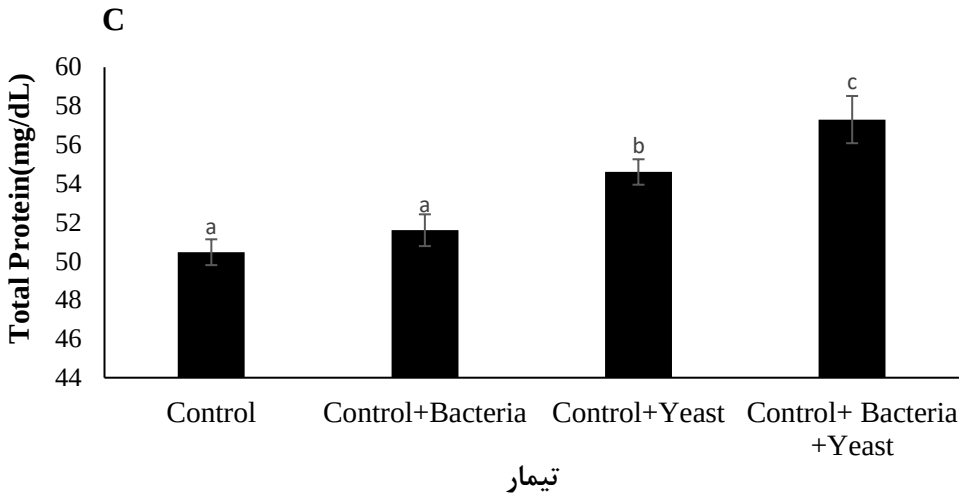
SV= [تعداد ماهیان در پایان آزمایش/تعداد ماهیان در شروع آزمایش]×۱۰۰(Felix and Sudharsan, 2004)

شاخص‌های ایمنی موکوس

نتایج شاخص‌های ایمنی موکوس ماهی کپور معمولی تغذیه شده با رژیم های مختلف غذایی در شکل ۱ نشان داده شده است. به لحاظ شاخص‌های فعالیت لیزوزیم، ایمنوگلوبولین کل و پروتئین کل بین تیمارها تفاوت معنی‌دار مشاهده شد (p<۰/۰۵). شاخص‌های فعالیت لیزوزیم، ایمـونوگلوبولین کل و پـروتئین کل به طور معنی‌دار به ترتیب در تیمار جیره تجاری + باکتری + مخمر و جیره تجاری بالاترین و پایین ترین میزان را نشان داد.



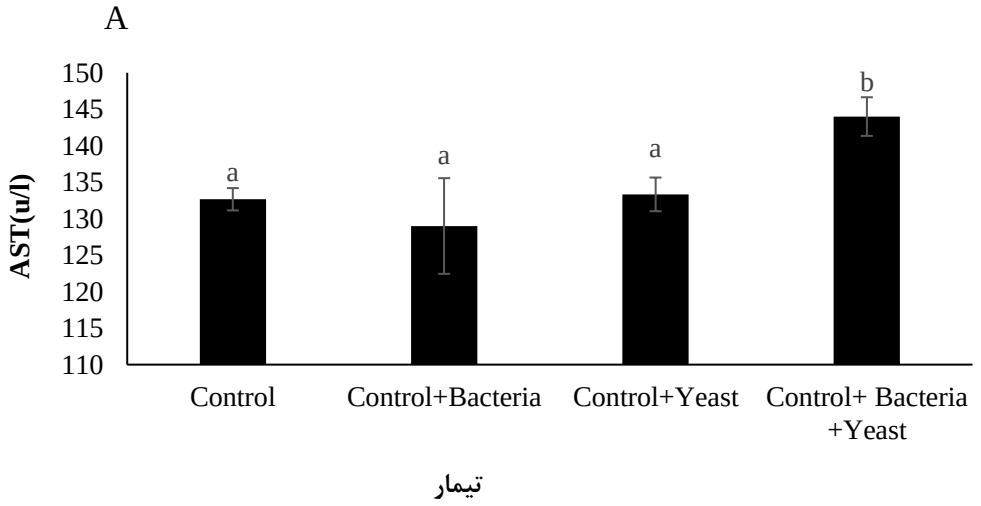


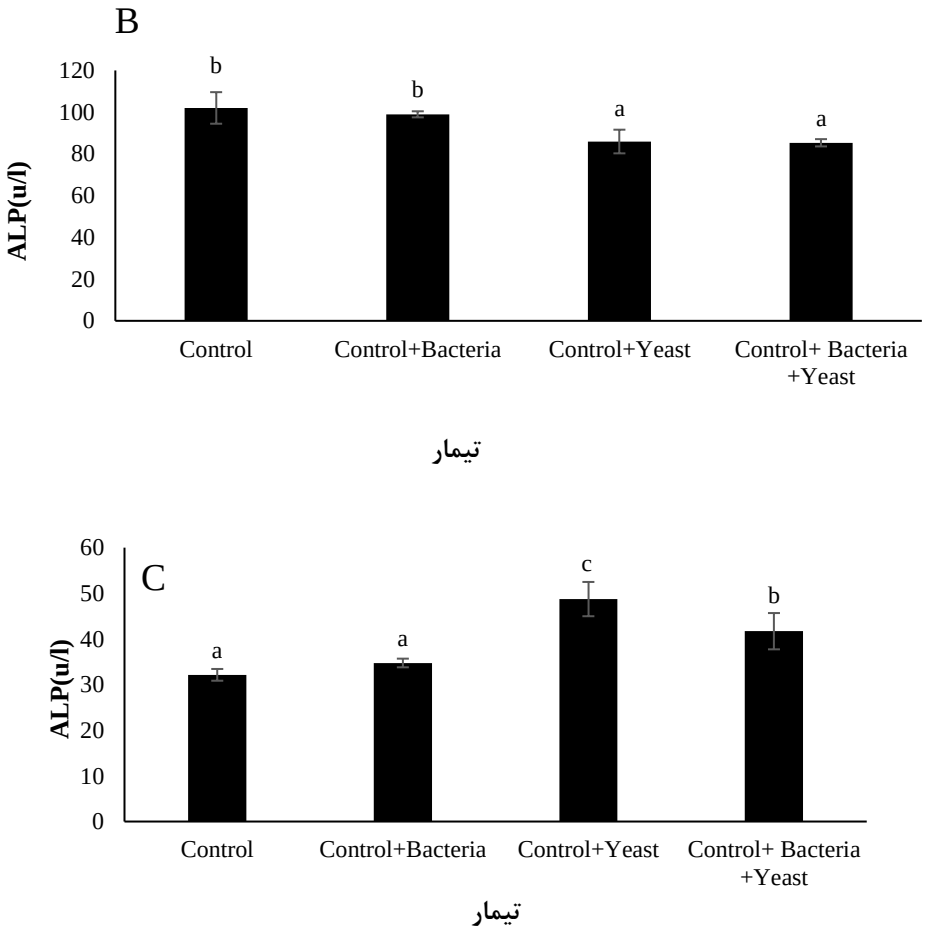


شکل ۱ فعالیت لیزوزیم (A)، ایمنوگلوبولین کل (B) و پروتئین کل (C) در موکوس ماهی کپور تغذیه شده با جیره های مختلف در ۶۰ روز (میانگین ± انحراف معیار) حروف مختلف نشان دهنده تفاوت معنی داری در سطح ۰/۰۵ است.

شاخص‌های آنزیم‌های کبدی

نتایج شاخص‌های آنزیم‌های کبدی کپور معمولی تغذیه شده با رژیم‌های مختلف غذایی در شکل ۲ نشان داده شده است. به لحاظ فراسنجه‌های AST، آلکالین فسفاتاز ترشح شده از سرم و موکوس بین تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (p<۰/۰۵). فراسنجه AST به طور معنی‌داری در تیمار جیره تجاری + باکتری + مخمر بالاترین و در تیمار جیره تجاری پایین‌ترین میزان را نشان داد. به لحاظ فراسنجه آلکالین فسفاتاز سرم به طور معنی‌دار بیشترین میزان در تیمار جیره تجاری و کمترین آن در جیره تجاری + باکتری + مخمر مشاهده شد. بالاترین میزان آلکالین فسفاتاز ترشح شده از موکوس نیز به‌طور معنی دار در جیره تجاری + مخمر و پایین ترین آن در جیره تجاری مشاهده شد.





شکل ۲ آسپارتیک اسید (AST) (A)، آلکالین فسفاتاز سرم (B) و آلکالین فسفاتاز موکوس (C) در ماهی کپور تغذیه شده با جیره های مختلف در ۶۰ روز (میانگین ± انحراف معیار). حروف مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

بحث

در تحقیق حاضر اثرات پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و کاندیدا اوتیلیس بر شاخص‌های رشد، فعالیت آنزیم‌های کبدی و ایمنی موکوسی ماهی کپور معمولی بررسی شد. با بررسی منابع مختلف، مطالعه‌ای درباره عملکرد باکتری و مخمر پروبیوتیکی در جیره غذایی ماهی یافت نشد و پژوهش حاضر به‌نوبه خود اولین مطالعه درباره استفاده از این دوسویه پروبیوتیک در جیره غذایی ماهی کپور معمولی است. اگرچه به‌طور جداگانه و ناقص عملکرد پروبیوتیک‌ها بر حیوانات مختلف گزارش شده است (Cho et al. 2018; Li et al. 2018; Malyar et al. 2019). در پرورش ماهی و به‌خصوص ماهیان گرمابی، وجود شرایط نامناسب محیطی سبب بروز انواع بیماری‌ها شده و این به‌نوبه خود ضرر و زیان اقتصادی را به دنبال دارد. برای جلوگیری از بروز این رخدادها و کاهش خسارات احتمالی، اطمینان از وضعیت سلامتی ماهی ضروری به نظر رسیده و باید مراقبت‌ها و فعالیت‌های پیش‌گیرانه انجام شود. در این مطالعه، پس از پایان دوره تغذیه، تفاوت معنی‌دار در بیشتر شاخص‌های رشد ماهی در بین تیمارها مشاهده نشد، اگرچه در برخی از شاخص‌ها از جمله نسبت کارایی پروتئین در تیمار جیره تجاری + باکتری تغییرات محسوسی ایجاد شده بود. برعکس، نتایج پژوهش حاضر، استفاده از سطوح مختلف پروبیوتیک و به خصوص، 10^8 CFU/kg سبب بهبود رشد ماهی زینتی گرین ترور (*Andinocara rivulatus*) شد (Hosseini Madani et al. 2014). همسو با پژوهش حاضر، استفاده از پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* نتوانست شاخص‌های رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را بهبود بدهد (Atai et al. 2017). برعکس نتایج پژوهش حاضر، Mohammadi و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که

استفاده از پروبیوتیک *Bacillus subtilis* عملکرد رشد و تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را به‌طور معنی‌دار افزایش داد. در مطالعه‌ای Firouzbakhsh و همکاران (۲۰۱۱) اثرات پروبیوتیک پروتکسین، بر عملکرد رشد در ماهی اسکار انگشت‌قد (*Astronotus ocellatus*) را بررسی کردند. بر اساس نتایج، وزن نهایی و افزایش وزن بدن در ماهیان انگشت قد تغذیه شده با سطح ۰/۱۵ جیره نسبت به دیگر تیمارها بیشتر بود که بر این اساس با نتایج پژوهش حاضر هم‌سویی ندارد. برعکس نتایج پژوهش حاضر، استفاده از پروبیوتیک *Lactococcus subsp. lactis* و کیتین در جیره غذایی ماهی کپور معمولی شاخص‌های رشد آن را به طور معنی‌دار بهبود بخشید. در گزارشی Rameshgar و Bergman همکاران (۲۰۲۲) تاثیر لاکتوباسیلوس پلانتاروم و برویس جدا شده از دستگاه گوارش ماهی و تاثیر آن بر شاخص‌های رشد ماهی کپور معمولی در مقایسه با پروبیوتیک پریمالاک را بررسی کردند. در پایان آزمایش، در گروه ماهیانی که لاکتوباسیل و پریمالاک دریافت کرده بودند، شاخص های رشد مانند افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل غذا و درصد بقا سطح بالاتر و مطلوب‌تری را نسبت به گروه ماهیانی که جیره آن‌ها فاقد لاکتوباسیل و پریمالاک بودند، نشان دادند که بر این اساس با نتایج پژوهش حاضر مطابقت ندارد. برعکس پژوهش حاضر، استفاده از پروبیوتیک‌های *Saccharomyces cerevisiae* و *S. elipsoedas* شاخص‌های رشد ماهی قزل آلای رنگین کمان را بهبود بخشید (Adel et al. 2017).

همسو با نتایج پژوهش حاضر Roosta و همکاران (۲۰۱۳) اثرات سطوح مختلف پروبیوتیک *L.acidophilus* بر فعالیت ضدباکتریایی و برخی شاخص‌های ایمنی موکوس ماهی تایگر بارب (*Puntius tetrazona*) را بررسی کردند. قطر هاله عدم رشد، توسط موکوس ماهی با افزایش غلظت پروبیوتیک جیره در مقابل باکتری روند افزایشی نشان داد. در روش رقت‌های متوالی موکوس، نیز نتایجی مشابهی مشاهده شد. همچنین، تغذیه ماهی‌ها با پروبیوتیک سبب افزایش میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز قلیایی و پروتئین محلول شد. نتایج این آزمایش نشان داد که موکوس ماهی تایگر بارب در برابر هر دو پاتوژن فعالیت ضدباکتریایی داشته و استفاده از سطوح مختلف پروبیوتیک سبب افزایش معنی‌دار در فعالیت ضدباکتریایی موکوس، پروتئین محلول و آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی این ماهی نسبت به تیمار شاهد شده است. همسو با نتایج پژوهش حاضر، Vazirzadeh و Masoumi (۲۰۱۸) اثر تکی و ترکیبی برخی پروبیوتیک‌ها بر ایمنی موکوس کپور معمولی را بررسی کردند.

در این پژوهش، اثر باکتری پدیکوکوس اسیدی لاکتیکی (*Pediococcus asidilactici*) و مخمر ساکارومایسیس (*S. cerevisiae*) بر تغییرات میزان ایمونوگلوبولین کل، پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین ماهی کپور معمولی انجام شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که استفاده از مکمل‌های مذکور باعث افزایش فراسنجه-های ایمونوگلوبولین کل، پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین در موکوس ماهی کپور معمولی شد. از نظر شاخص‌های ایمنی موکوس، شاخص‌های فعالیت لیزوزیم، ایمونوگلوبولین کل و پروتئین کل به‌طور معنی دار به‌ترتیب در تیمار جیره تجاری + باکتری + مخمر و جیره تجاری بالاترین و پایین‌ترین میزان را نشان داد. بالاترین میزان آلکالین فسفاتاز در جیره تجاری + مخمر و پایین‌ترین آن به طور معنی‌دار در جیره تجاری مشاهده شد که نشانگر تأثیر مثبت استفاده از پروبیوتیک‌ها در جیره غذایی ماهی کپور معمولی است. بالا بودن این فراسنجه‌ها در موکوس نشان از تقویت دستگاه ایمنی است. به لحاظ شاخص AST به‌طور معنی‌دار در تیمار جیره تجاری + باکتری + مخمر بالاترین و در تیمار جیره تجاری پایین‌ترین میزان را نشان داد. بالا بودن این فراسنجه‌ها در موکوس و پلاسمای خون نشان از تقویت دستگاه ایمنی در مقابل عوامل بیماری‌زا و استرس است. هم‌سو با پژوهش حاضر Akbari و همکاران (۲۰۲۲) تأثیر مقادیر مختلف پروبیوتیک *Enterococcus faecium* بر برخی شاخص‌های ایمنی موکوس پوست بچه‌ماهی کپور معمولی بررسی کردند. نتایج آزمایش حاکی از آن بود که بیشترین میزان لیزوزیم در سرم خون (۲/۷ ± ۴۶/۱ واحد/میلی لیتر) و ایمونوگلوبولین M (۰/۹ ± ۴۰/۰ میلی‌گرم/دسی لیتر) و اجزای دستگاه کمپلمان شامل C3 (۰/۶ ± ۲۵/۱ میلی‌گرم/دسی‌لیتر) و C4 (۰/۴ ± ۱۱/۱ میلی‌گرم/دسی‌لیتر) متعلق به تیمار ۳ بود. در میان تیمارهای مختلف، بیشترین فعالیت لیزوزیم و فعالیت پروتئاز موکوس در ماهیان تیمار ۳ اندازه‌گیری شد. بر اساس نتایج حاصله به نظر می‌رسد که به‌کارگیری مقدار 1×10^{9} CFU/g از باکتری انتروکوکوس فسیوم در جیره

بچه ماهی کپور معمولی بتواند اثرات مثبتی بر برخی پاسخ-های ایمنی سرم خون و شاخص‌های موکوس پوست برجای گذارد. روند تغییرات آنزیم کبدی ALP موکوس و AST سرم خون بر عکس ALP سرم خون در پایان دوره آزمایش و تغذیه افزایشی بود. آنزیم‌های کبدی بر عملکرد فراسنجه-های ایمنی از جمله لیزوزیم و ایمنوگلوبولین کل تأثیر گذار است که این نتیجه بر این نکته تاکید دارد که آنزیم‌های کبدی عاملی تأثیرگذار در بهبود و تقویت دستگاه ایمنی ماهی در مقابل انواع استرس و شرایط نامناسب محیطی هستند. افزایش سطح آنزیم‌های سرمی نشان دهنده آشفتگی سلولی و ورود آنزیم‌ها از سیتوپلاسم یاخته‌ها به سرم است. ALP و AST دو آنزیم انتقال دهنده گروه آمین هستند که شاخص خوبی برای ضایعات کبدی در ماهی هستند. آنزیم‌های کبدی مذکور به عنوان شاخص فعالیت کبدی محسوب می‌شوند و تغییر در میزان فعالیت و ترشح آن‌ها می‌تواند متأثر از فراسنجه‌های فیزیکی و شیمیایی آب، تراکم، شرایط پرورشی، نوع جیره مصرفی، سن، جنس و وضعیت سلامت ماهیان باشد (Racicot et al. 1975). افزایش سطح AST در تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به گروه شاهد ممکن است به دلیل آسیب و آشفتگی در بافت کبد باشد که به نوبه خود بر ترشح ALP اثر گذاشته و سطح آن را در سرم با تغییر نفوذ پذیری غشاء پایین آورده و بر این اساس دستگاه ایمنی ماهی در مقابل استرس، شرایط نامساعد محیطی و بیماری‌های عفونی تقویت می‌شود. یکی از دلایل افزایش سطح سرمی این آنزیم‌ها ممکن است تغییر در نفوذپذیری غشای پلاسمایی یاخته‌های کبدی یا صدمات یاخته‌ای با نانوذرات و مواد معدنی باشد. بنابراین، پایش نشت آنزیم‌های کبدی به داخل خون، ابزار بسیار مفیدی در مطالعات آسیب کبدی است (Park et al. 2010). در واقع، کبد محلی برای واکنش-های چندگانه اکسایشی و تولید بیشینه میزان رادیکال آزاد در بدن محسوب می‌شود. رادیکال‌های آزاد تولید شده در طی فرآیند سوخت و ساز مواد شیمیایی موجب تخریب غشای یاخته‌ها و بروز اختلال در فعالیت کانال‌های تنظیم یونی در سطح آن‌ها می‌شود. بروز اشکال در فرایند تنظیم یونی، به‌خصوص یون کلسیم موجب مهار فسفورالسیون اکسایشی درون یاخته‌ای می‌شود و این پدیده منجر به بر هم خوردن توان تنظیم اسمزی غشاهای زیستی و یاخته-ای، افزایش حجم هسته و هستک‌ها و در نهایت مرگ یاخته‌ای می‌شود و به صورت تغییرات آسیب شناسی بافتی نمود می‌یابد (Isik et al. 2008). در مطالعه حاضر، کاهش سطح آنزیم ALP سرم سبب افزایش سطح فعالیت لیزوزیم و ایمنوگلوبولین کل موکوس شد که این نشانگر افزایش سطح ایمنی است و نتایج مطالعات قبلی را تأیید می‌کند. در ماهی قزل آلا و خاویاری افزایش سطح آنزیم آلکالین فسفاتاز سرم به دنبال برخی استرس‌ها، مثل استرس شوری، سموم محیطی و بیماری‌های عفونی گزارش شده است (Xu et al. 2012). بر این اساس مطالعه Xu و همکاران، صحت نتایج مطالعه حاضر را در مورد تقویت دستگاه ایمنی با جیره‌های غذایی استفاده شده و تغییرات در سطح آنزیم‌های کبدی و ایمنی تأیید می‌کند. آنزیم آلکالین فسفاتاز یکی از مطمئن‌ترین نشانه‌های حیاتی هپاتیک جهت ارزیابی وضعیت تغذیه‌ای و سلامتی در ماهی است (Mozanzadeh et al. 2017). افزایش ایمنی به عنوان یک راهبرد مهم در آبزی پروری مطرح است.

لیزوزیم از مهم‌ترین اجزای ایمنی غیراختصاصی ماهی محسوب می‌شود که موجب تخریب جداره باکتری‌ها، فعال‌سازی دستگاه کمپلمان و افزایش فعالیت بیگانه-خواری در ماهی می‌شود. افزایش میزان فعالیت لیزوزیم و ایمونوگلوبولین کل گویای بهبود و تقویت دستگاه ایمنی ماهی است و افزایش آن به مقاومت بیشتر دستگاه ایمنی ماهی در برابر عوامل عفونی و استرس‌زا کمک می‌کند. افزایش فعالیت لیزوزیم متعاقب استفاده برخی محرک‌های ایمنی، واکسن‌ها و برخی پروبیوتیک‌ها در ماهی مشاهده شده است (Alishahi et al. 2010).

نتیجه گیری

در تحقیق حاضر استفاده از پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلیوس و کاندیدا اوتیلیس نسبت به جیره فاقد پروبیوتیک در شاخص‌های ایمنی موکوس، شاخص‌های آنزیم‌های کبدی تفاوت معنی دار و مثبت ایجاد نمود و نتوانست در شاخص‌های رشد و تغذیه تغییرات محسوس و معنی داری ایجاد نماید. با این حال استفاده از پروبیوتیک-های مورد نظر بیشترین اثر را بر دستگاه ایمنی ماهی گذاشته که در این صورت می تواند سبب تقویت شاخص-های ایمنی در مقابله با شرایط نامناسب محیطی، بروز بیماری و دیگر شرایط ناسازگار با محیط پرورش این گونه با ارزش اقتصادی شود.

تشکر و قدردانی

از کلیه کارشناسان و مسولین محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی و پژوهشکده آرتمیا و آبزی پروری دانشگاه ارومیه به خاطر در اختیار قرار دادن کلیه امکانات کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

Abdol-Tawwab, M., Abdol-Rahman, M., Esmael, E.M. 2008. Evaluation of bakers yeast *Saccharomyces cervisiae* as a growth and immunity promoter for nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). (l.) challenge in situ with *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture 280: 185-189.

Adel, M., Lazado, C.C., Safari, R., Yeganeh, S. and Zorriehzahra, M. 2017. Aqualase®, a yeast-based in-feed probiotic, modulates intestinal microbiota, immunity and growth of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture Research 48: 1815-1826

Akbari, H., Hosseini Shokrabi, P., Soltani, M., Shamsai, M. 2022. The effect of different amounts of *Enterococcus faecium* probiotic on some safety indicators of blood serum and skin mucus of common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Aquaculture Development 15: 15-26.

Alishahi, M., Ranjbar, M.M., Ghorbanpour, M., Peyghan, R., Mesbah, M. and Razi jalali, M. 2010. Effects of dietary Aloe vera on specific and nonspecific immunity of common carp (*Cyprinus carpio*). International Journal of Veterinary Research 4: 189-195.

Atai, Kh., Jalali, S.M., Yadollahi, A., Hematzadeh, A. 2017. Effects of probiotic *Pediococcus acidilactici* on hematology, blood parameters and intestinal histopathology of rainbow salmon. Animal Physiology and Development Quarterly Journal 43: 27-35.

Austin, B., Stuckey, P.A., Robertson, W., Effendi, I., Griffith, D.R. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. Journal of Fish Diseases 18: 93-96.

Balcazar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Muzquiz, J.L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. Veterinary Microbiology 114: 173-186.

Barghman, H., Yeganeh, S., Amir Kalaei, A.K. 2019. The use of probiotic *Lactococcus lactis subsp*. lactis and chitin in the diet of common carp (*Cyprinus carpio*) and its effect on growth performance, carcass composition and diet digestibility. Aquaculture Nutrition 5: 131-145.

Cao, H.P., He, SLu, L., Hou, L. 2010. Characterization and phylogenetic analysis of the bitrichous pathogenic *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh 62: 182-189.

Cho, J.H., Liu, S.D., Yun, W., Kim, K.S., Kim, I.H. 2018. Effect of supplemented microencapsulated zinc oxide and organic acids and pure botanicals on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles, feces microfora, and zinc level of feces in weanling pigs. Canadian Journal of Animal Science 99: 66-73.

Denev, S.A. 2008. Ecological alternatives of antibiotic growth promoters in the animal husbandry and aquaculture. DSc. Thesis, Department of Biochemistry Microbiology, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria, 294 p.

De Paola, A., Peeler, J.T., Rodrick, G. 1995. Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of gram-negative bacteria in catfish ponds. Applied and Environmental Microbiology 61: 2335-2340.

El-Haroun, E.R., Goda, A.M., Kabir

Chowdury, M. A. 2006. Effect of dietary probiotic Biogen supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L). Aquaculture Research 37: 1473-1480.

Esteban, M.A., Cruesta, A., Ortuno, J., Meseguer, J. 2001. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead (*Sparus aurata* L.) innate immune system. Fish and Shellfish Immunology 11: 303-315.

FAO. 2008. Yearbooks of Fishery Statistics. http://www.Fao.org. Cited: August 10, 2010.

Felix, N., Sudharsan, M. 2004. Effect of glycine betaine, a feed attractant affecting growth and feed conversion of juvenile fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture Nutrition 10: 193-197.

Firouzbakhsh, F., Noori, F., Khalesi, K.M., Jani-Khalili, K. 2011. Effects of a probiotic, protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. Fish Physiology and Biochemistry 37: 833-842.

Fuller, R. 1992. History and development of probiotics. In: Probiotics: the scientific basis. Volume. 232, Fuller, R. (Ed.). Chapman and Hall, London, UK, 1-18.

Gatesopupe, F.J. 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic Vibrio. Aquatic. Living Research 7: 277-282.

Gatesopupe, F.J. 1997. Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scopthalmus maximus*. Aquatic Living Research 10: 239-246.

Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180:147-165.

Gildberg, A., Johansen, A., Bøgwald, J. 1995. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. Aquaculture 138: 23-34.

Hosseini Madani, N., Morki, S., Anwar, N.S., Manouchehri, A.A., Ghorbani, H., 2013. The effect of the use of probiotic *Pediococcus acidilactici* on the growth indices and blood parameters of green terror ornamental fish (*Andinocara rivulatus*). Journal of Comparative Autobiology 11: 1291-1302.

Irianto, A., Austin, B. 2002. Probiotics in aquaculture. Journal of Fish Diseases 25: 633-642.

Isik, I., Celik, I. 2008. Acute effects of methyl parathion and diazinon as inducers for oxidative stress on certain biomarkers in various tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Pesticide Biochemistry and Physiology 92: 38-42.

Kissil, W.M., Lupatsch, I., Elizur, A., Zohar, Y. 2001. Long photoperiod delayed and increased somatic growth in gilthead sea bream (*sparus aurata*). Aquaculture 200: 363-379.

Kumar, R., Mukherjee, S.C., Prasad, K.P., Pal, A.K. 2006. Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.). Aquaculture Research 37: 1215-1221.

Lee, S., Kim, S., Oh, Y., Lee, Y. 2000. Characterization of *Aeromonas hydrophila* isolated from Rainbow trouts in Korea. The Journal of Microbiology 38:1-7.

Li, H.H., Jiang, X.R., Wang, W.J., Qiao, J.Y. 2018. Effects of *Lactobacillus acidophilus* and zinc oxide on the growth performance, jejunal morphology and immune function of weaned piglet following an Escherichia coli K88 challenge. Italian Journal of Animal Science 17: 114-120.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry 193: 265-275.

Malyar, R.M., Enayatullah, H., L. Hou, H., Farid, R.A., Liu, D. 2019. Zinc-enriched probiotics enhanced growth

performance, antioxidant status, immune function, gene expression, and morphological characteristics of Wistar rats raised under high ambient temperature. Biotech 9: 1-12.

Mohammadi, M., Pourmozaffar, S., Ghazi, M. 2018. Investigating the effect of *Bacillus subtilis* clostat probiotic on some growth, blood and intestinal tissue indicators of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Animal Physiology and Development Quarterly Journal 48: 85-96.

Mozanzadeh, M., Marammazi, J., Yaghoubi, M., Yavari, V., Agh, N. and Gisbert, E. 2017. Somatic and physiological responses to cyclic fasting and re-feeding periods in sobaity sea bream (*Sparidentex hasta*, Valenciennes 1830). Aquaculture Nutrition 23: 181-191.

Ojolick, E.J., Cusack, R., Benfey, T.J., Kerr, S.R. 1995. Survival and growth of female diploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at chronic high temperature. Aquaculture 131: 177-187.

Park, E.J., Bae, E., Yi, J., Kim, Y., Choi, K., Lee, S.H. 2010. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. Environmental Toxicology and Pharmacology 30: 162-168.

Pérez-Sánchez, T., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Balcázar, J.L. 2014. Probiotics in aquaculture: a current assessment. Reviews in Aquaculture 6: 133-146.

Pirarat, N., Maita, M., Endo, M. and Katagiri, T. 2007. Lymphoid apoptosis in *Edwardsiella tarda* septicemia in Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish and Shellfish Immunology 22: 608-616.

Pourali, H.R., Mohseni, M., Aqtoman, V., Tevacoli, M. 2003. Development fishes with different percentages of concentrated food formulated. Iranian Scientific Fisheries Journal, Sturgeon First National Symposium, 37-48.

Qin, S., Gao, J., Huang, K. 2007. Effects of different selenium sources on tissue selenium concentrations, blood GSH-Px activities and plasma interleukin levels in finishing lambs. Biological Trace Element Research 116: 91-102.

Racicot, J.G., Gaudet, M., Leray, C. 1975. Blood and liver enzymes in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) with emphasis on their diagnostic use: study of CCl4 toxicity and a case of *Aeromonas* infection. Journal of Fish Biology 7: 825-835.

Rameshgar, M., Qomi, M., Hashemi, S.M., Hosseinifard, S.M., Tabaripour, S.R. 2022. The effect of *Lactobacillus plantarum* and *Bruis* isolated from the digestive tract of fish and its effect on the growth and safety indicators of common carp (*Cyprinus carpio*) compared to Primalac probiotic, Journal of Animal Physiology and Development 14: 63-76.

Robertson, P.A., Dowd, C.O., Burrells, C.P., Williams, B. 2000. Use of Carnobacterium sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Aquaculture 185: 235-243.

Roosta, Z., Hajimuradlo, A., Hosseinifar, S.H., Vakili, 2013. The effects of different levels of probiotic Lactobacillus acidophilus (*Lactobacillus acidophilus*) on antibacterial activity and some immune indicators of tiger barb (*Puntius tetrazona*) mucus. Journal of Aquatic Ecology 3: 13-20.

Siwicki, A.K., Anderson, D.P. 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish: II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin level in serum. Fish Disease Diagnosis and Prevention Methods Olsztyn, Poland, 10: 5-12.

Shahsavani, D., Mohri, M., Kanani, H.G. 2010. Determination of normal values of some blood serum enzymes in *Acipenser stellatus* Pallas. Fish Physiology and Biochemistry 36: 39-43.

Shepherd, J., Bromage, N. 1992. Intensive

fish farming. Blackwell Scientific Publication, 420 p.

Strom, E., Ringo, E. 1993. Changes in the bacterial composition of early developing cod, *Gadus morhua* (L). larvae following inoculation of *Lactobacillus plantarum* into the water. In: Wather, B., Fyhr, H.J. (Eds.) Physiological and Biochemical Aspects of Fish Larval Development. University of Bergen, Norway, 226-228.

Subramanian, S., MacKinnon, Sh.L., Ross, N.W. 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comparative Biochemistry and Physiology 148: 256-263.

Tavakoli, H., Akhlaghi M. 2015. Evaluation of changes in lysozyme, immunoglobulins cells and blood hematocrit cultivated rainbow trout after experimental infection with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. Biological Journal of Microorganism 4: 93-104.

Vazirzadeh, A., Masoumi Fashani, H. 2018. Individual and combined effects of some probiotics on mucosal immunity of common carp (*Cyprinus carpio*). Animal Research Journal (Iranian Biology Journal) 32: 1-10.

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64: 655-671.

Wache, Y., Auffray, F., Gatesoupe, F.J., Zambonino, J., Gayet, V., Labbe, L., 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, *Oncorhynchus mykiss* fry. Aquaculture 258: 470-478.

Wang, Y.B., Xu, Z.R. 2006. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Animal Feed Science and Technology 127: 283-292.

Xu, Q., Wang, C., Zhao, Z., Luo, L., 2012. Effects of replacement of fish meal by soy protein isolate on the growth, digestive enzyme activity and serum biochemical parameters for juvenile Amur Sturgeon (*Acipenser schrenckii*). Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 25: 1588-1594.

Yogananth, N., Bhakyaraj, R., Chanthuru, A., Anbalagan, T., Mullai Nila, K. 2009. Detection of virulence gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish samples using PCR technique. Global Journal of Biotechnology & Biochemistry 4: 51-53.

Zhou, Z., Shi, P., Yao, B., He, S., Su, Y. 2007. Comparison of the predominant bacterial community structure in the gastrointestinal wall between *Lutjanus sebae* and *Ephippus orbis* based on 16S rDNA PCR-DGGE fingerprint. Acta Hydrobiologica Sinica 31: 78-84.