

The effect of *Weissella cibaria* and *Lactococcus lactis* bacteria in the diet of Caspian Kutum, *Rutilus kutum* fingerlings propagated naturally and artificially on growth, hematological indices, serum biochemical and immunological parameters

Siavash Pirasteh¹, Hosein Oraji^{1*}, Khosrow Janikhalili¹

1-Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Animal Science, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran

Received: 24 April 2025

Accepted: 2 June 2025

Extended Abstract:

Introduction: Among the fish exist in the southern Caspian Sea, the Caspian Kutum (*Rutilus kutum*) has a special place due to its nutritional preference. This fish species has been endangered because of unsuitable ecological conditions, reduced water flow, and the destruction of their natural habitats. Therefore, by increasing the production of Caspian white fish through aquaculture, it will be possible to increase its supply in the country and increase the per capita consumption of this aquatic animal. Fish obtained from different breeding methods, whether natural or artificial, may exhibit potential differences in growth performance and hematological and immune indices, which can be practical and useful in fisheries planning, and there are lack of researches that have addressed these differences in Caspian Kutum. Lactobacilli are the most commonly used microorganisms as probiotics (Roman *et al.*, 2012). Studies have shown that the use of these probiotics leads to improved immune responses and increased resistance to pathogens (Mohammadian *et al.*, 2018; Qin *et al.*, 2018). *Weissella cibaria* and *Lactococcus lactis* are among the lactic acid bacteria identified as part of the natural flora in various species, including aquatic animals (Bakhshzad Mahmoudi *et al.*, 2023). Few studies have compared the differences in fish bred through natural and artificial methods. Given the importance of probiotics in aquaculture and the lack of sufficient studies on the use of these probiotics in the Caspian Kutum, the current study evaluated the effects of diets containing probiotic bacteria *W. cibaria* and *L. lactis* on blood indices, serum biochemical parameters, and immunity in juvenile Kutum bred naturally and/or artificially.

Material and methods: For this research, 2400 fingerlings with an average initial weight of 10.01±13.01 g were selected, of which 1200 were obtained from natural breeding and 1200 from artificial breeding. The experimental diets included 4 levels (0, 150, 300, and 450 mg/kg with an equal ratios of *W. cibaria* and *L. lactis* bacteria) added to the diets of fish from 2 breeding type (natural and artificial) (4×2 factorial). One hundred fingerlings were assigned to each of the 24 experimental units. The distribution of the fish was completely random. In this experiment, water quality parameters and variable conditions were considered constant. The desired amounts of bacteria strains were weighed in sterile plastic containers, gelatin was added for coating and was evenly sprayed to the experimental diets. After 8 weeks of trial, all fish weighed to measure growth and nutritional factors. In addition, biochemical factors including total protein, albumin, cholesterol, triglycerides, and liver enzymes (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and alkaline phosphatase) were assessed using an autoanalyzer. Immune indices such as lysozyme activity, ACH50, and IgM were also evaluated. For data comparison, one-way analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple range test were used at a 95% confidence level. Furthermore, factorial analysis (2×4) was employed to examine the interactions between probiotic levels (4 levels) and breeding types (2 types).

Results and Discussion: Results indicated that the inclusion of probiotic levels led to improve growth performance and feed conversion ratio, with 300 mg/kg being the optimum dosage. Probiotic bacteria had positive effects on digestive tract by modulating intestinal microbial balance. Meanwhile, complex carbohydrates are broken down and short-chain fatty acids (SCFAs) provide energy sources for fish and promote growth development (Ringø *et al.*, 2022). In addition, the production of bioactive compounds by probiotic bacteria, such as vitamins, organic acids, and enzymes, can have beneficial effects on growth and health, improving nutrient absorption (Liu *et al.*, 2010). On the other hand, red and white blood cells, hemoglobin, and hematocrit improved by the addition of probiotics. Changes in white blood cells are one of the important indicators showing how the fish responded to pathogens, and an increase in these factors can indicate stimulation of the immune system (Bakhshzad Mahmoudi *et al.*, 2023). Moreover, since in anemia red blood cells are hemolyzed or their production is reduced (Hedayati *et al.*, 2013), so, the increase in these indices in fish fed mixture of *W. cibaria* and *L. lactis* could indicate a positive effect on hematopoiesis. This may be due to modulation of the gut microbiota and increased bioavailability and absorption of elements and/or synthesis of vitamins by beneficial bacteria. Some lactic acid bacteria may, by producing lactic acid and other organic acids, increase intestinal iron permeability and enhance erythropoiesis (red blood cell production) (Padalino *et al.*, 2012). Biochemical serum parameters such as cholesterol, triglycerides, AST, ALT, and ALP were not affected by the type of breeding or the probiotic levels. Since, liver enzymes increase in hepatic injury (Kumar *et al.*, 2011), the current results may indicate that the probiotic mixture (*W. cibaria* and *L. lactis*) has no adverse effects on the liver. Based on the current result, complement activity (ACH50), lysozyme, and immunoglobulin enhanced up to the 300 mg probiotic level, but relatively decreased at the 450 mg level. This could be attributed to microbial imbalance, increased populations of undesirable bacteria, and antagonistic effects on immunity, however, these parameters were higher than the control. Probiotic bacteria may stimulate the expression of antimicrobial peptides in fish, leading to increased lysozyme production (Kim *et al.*, 2013). Short-chain fatty acids can lead to activation in both innate and adaptive immune pathways through the expression of genes related to cytokines and other signaling molecules (El-Kady *et al.*, 2022).

Conclusion: The present study clearly showed that the bacteria *W. cibaria* and *L. lactis* acted effectively as hematological and immunological stimulants in fingerlings produced by both artificial and natural spawning and can be used to increase productivity. Since, growth performance, hematological and immune parameters of the fingerlings were not affected by the breeding type (natural or artificial), providing an appropriate probiotic dosage of these probiotic mixtures can have positive effects in both groups of fish. However, additional studies are needed at older ages and higher weights and also using genetic techniques to clarify the more precise mechanisms. Based on the optimal level found in the current study, 300 mg of this probiotic blend is recommended in the diet of the Caspian kutum.

Conflict of Interest: The authors claim no conflict of interest throughout providing this paper.

Acknowledgment: We hereby express our gratitude and appreciation for the assistance of all colleagues in conducting this research.

Keywords: Probiotic, immune stimulator, lactic acid, Caspian whitefish fingerlings, breeding method

* Corresponding Author: hoseinoraji@yahoo.com

"مقاله پژوهشی"

تأثیر باکتری‌های *Weissella cibaria* و *Lactococcus lactis* در جیره بچه ماهیان سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*) حاصل از تکثیر طبیعی و مصنوعی بر رشد، فراسنجه‌های خونی، بیوشیمیایی سرم و شاخص‌های ایمنی

سیاوش پیراسته^۱، حسین اورجی^{۱*}، خسرو جانی خلیلی^۱

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۳/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۲/۴

چکیده

در مطالعه کنونی، تأثیر جیره‌های غذایی حاوی باکتری‌های پروبیوتیکی *Weissella cibaria* و *Lactococcus lactis* بر رشد، شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی سرم و ایمنی در بچه ماهیان سفید (*Rutilus kutum*) حاصل از تکثیر طبیعی و مصنوعی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای اجرای این تحقیق ۲۴۰۰ عدد بچه‌ماهی سفید با میانگین وزن اولیه 10.0 ± 13.0 گرم انتخاب شد که از این میان ۱۲۰۰ عدد حاصل از تکثیر طبیعی و ۱۲۰۰ عدد حاصل از تکثیر مصنوعی بودند. جیره‌های آزمایشی شامل ۴ سطح (صفر، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با نسبت مساوی باکتری‌های *W. cibaria* و *L. lactis* به جیره بچه‌ماهیان سفید حاصل از ۲ نوع تکثیر (طبیعی و مصنوعی) اضافه گردیدند (۴×۲ فاکتوریل). ۱۰۰ عدد بچه‌ماهی سفید به هر کدام از ۲۴ واحد آزمایشی اختصاص داده شد. طبق نتایج، افزودن ترکیب پروبیوتیکی سبب بهبود درصد افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی گردید ($p < 0.05$). تعداد گلبول‌های قرمز و سفید، هموگلوبین و هماتوکریت در ماهیان تغذیه‌شده با ۳۰۰ میلی‌گرم ترکیب پروبیوتیکی افزایش معنی‌داری را در مقایسه با سایر سطوح نشان دادند و کمترین مقادیر مذکور در گروه شاهد مشاهده گردید ($p < 0.05$). بالاترین مقادیر پروتئین تام و آلبومین در جیره حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم ترکیب پروبیوتیکی مشاهده گردید ($p < 0.05$), مقادیر ACH50، لیزوزیم و ایمونوگلوبولین با افزودن ترکیب پروبیوتیکی تا سطح ۳۰۰ میلی‌گرم روند صعودی داشتند ولی در سطح ۴۵۰ میلی‌گرم نسبتاً کاهش یافتند ($p < 0.05$), اگرچه کمترین مقادیر در شاهد یافت گردید ($p < 0.05$). اثر نوع تکثیر و اثر متقابل تکثیر×سطح در هیچ کدام از شاخص‌های مورد مطالعه معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). مطالعه حاضر به خوبی نشان داد باکتری‌های *W. Cibaria* و *L. Lactis* به عنوان محرک خون‌سازی و ایمنی در هر دو روش تکثیر مصنوعی و طبیعی بچه‌ماهیان سفید مؤثر عمل کرده و می‌تواند به منظور افزایش بهره‌وری مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به سطح بهینه در پژوهش کنونی مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم از این ترکیب پروبیوتیکی به جیره بچه‌ماهیان سفید پیشنهاد می‌گردد.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، محرک ایمنی، لاکتیک اسید، بچه‌ماهی سفید، روش تکثیر

مقدمه

در میان ماهیان استخوانی سواحل جنوبی دریای خزر، ماهی سفید (*Rutilus kutum*) به دلیل ارجحیت غذایی، برای ساکنین این مناطق از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. نامناسب بودن شرایط اکولوژیکی، کاهش دبی آب، از بین رفتن بسیاری از زیستگاه‌های طبیعی، حیات این ماهی را محدود کرده است. بنابراین، با افزایش تولید ماهی سفید از طریق پرورش، امکان عرضه بیشتر آن در کشور و بالا رفتن مصرف سرانه این آبی‌پروری فراهم خواهد شد. از این رو، حفاظت و بازسازی ذخایر این گونه با ارزش از طریق تکثیر مصنوعی و همچنین تکثیر طبیعی و رهاسازی بچه ماهیان تولیدی طبیعی در دستور کار شیلات می‌باشد (Daryanabard *et al.*, 2020). تولید مثل طبیعی ماهی سفید دریای خزر شامل مهاجرت به محیط‌های آب شیرین برای تخم‌گذاری است. زیستگاه‌های آب شیرین در سواحل دریای خزر در حال تخریب هستند که بر تولید مثل طبیعی تأثیر می‌گذارد. از سوی دیگر، تولید مثل مصنوعی یک فرآیند کنترل‌شده است، اما با چالش‌هایی مانند کوچک شدن اندازه ماهی سفید احتمالاً به دلایل عدم به‌گزینی صحیح مولدین و روابط خویشاوندی نزدیک در تکثیر مصنوعی این گونه مواجه است (Abdolmaleki and Ghaninezhad, 2007). ماهیانی که از تکثیرهای مختلف اعم از طبیعی و مصنوعی استحصال می‌گردند ممکن است تفاوت‌های بالقوه‌ای در عملکرد رشد و فراسنجه‌های خونی و ایمنی نشان دهند که در برنامه‌ریزی‌های شیلات می‌توانند کاربردی و مفید باشند و مطالعه‌ای که به این تفاوت‌ها در ماهی سفید پرداخته باشد وجود ندارد.

از طرفی، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در آبی‌پروری به منظور کنترل بیماری‌ها نگرانی‌های زیادی را به دلیل ایجاد مشکلات محیط زیستی به وجود آورده است (Karimzadeh *et al.*, 2017). در این راستا، اقدامات زیادی جهت کاهش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها صورت گرفته است. به کارگیری مواد محرک سیستم ایمنی در صنعت آبی‌پروری، به منظور بهبود و تحریک فعالیت سیستم ایمنی غیراختصاصی و مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا عمومیت یافته است؛ از جمله این مواد می‌توان به پروبیوتیک‌ها اشاره نمود. پروبیوتیک‌ها از باکتری‌های غیر بیماری‌زا که توانایی ایجاد کلنی در دستگاه گوارش را داشته باشند انتخاب می‌شوند. باکتری‌های اسید لاکتیک دسته مهمی از پروبیوتیک هستند؛ این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند در ناحیه روده با تولید اسیدهای آلی و مواد ضد میکروبی مانع رشد باکتری‌های بیماری‌زا شوند و اسیدهای آلی تولیدی می‌توانند بعنوان یک منبع انرژی مورد استفاده سلول‌های روده قرار گیرند (Román *et al.*, 2012).

بکارگیری پروبیوتیک در آبزیان دارای اثرات مفیدی مانند بهبود سیستم ایمنی، افزایش بقا و ایجاد مقاومت در برابر بیماری است که با بررسی چگونگی اثرگذاری آنها در برابر فراسنجه‌های بیولوژیک حیوان می‌توان فرآیند اثرگذاری باکتری‌های مفید بر ماهی را تا حدودی شناخت. جوامع باکتریایی دستگاه گوارش بر ظرفیت متابولیکی میزبان اثر دارند و تنظیم آن می‌تواند اثرات سودمندی بر رشد، تغذیه و سلامت ماهی بگذارد (Liu *et al.*, 2021). انتخاب پروبیوتیک مناسب بسیار ضروری است زیرا میکروارگانیسم‌های نامناسب اثرات ناخواسته‌ای را در میزبان به جای می‌گذارند. لاکتوباسیلوس‌ها بیشترین

سفید دریای خزر وجود ندارد، از این رو، در مطالعه کنونی تأثیر جیره‌های غذایی حاوی باکتری‌های پروبیوتیکی *W. cibaria* و *L. lactis* بر شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی سرم و ایمنی در بچه ماهیان سفید حاصل از تکثیر طبیعی مصنوعی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

شرایط پرورش و تیمار بندی

برای اجرای این تحقیق ۲۴۰۰ عدد بچه ماهی سفید با میانگین وزن اولیه $13/01 \pm 1/0$ گرم در نظر گرفته شد. از این میان ۱۲۰۰ عدد حاصل از تکثیر طبیعی و ۱۲۰۰ عدد حاصل از تکثیر نیمه‌مصنوعی بودند. بچه ماهیان حاصل از تکثیر نیمه‌مصنوعی از مرکز بازسازی ذخایر شهید رجایی ساری به استخرهای تکثیر طبیعی کنار پره صیادی منتقل شده جدا و ذخیره‌سازی شدند. جهت تیمار بندی ماهیان، در درون استخر با استفاده از تور کف و کناری یک شبکه ۲۴ خانه به حالت قفس با ابعاد ۴۰ در ۴۰ سانتی متر و ارتفاع نیم متر تشکیل گردید. در مطالعه حاضر، ۸ تیمار و ۳ تکرار در نظر گرفته شد. برای هر تکرار ۱۰۰ عدد بچه ماهی سفید قرار داده شد که تعداد کل ماهیان در مجموع ۲۴ واحد آزمایشی ۲۴۰۰ عدد بود. توزیع ماهیان به صورت کاملاً تصادفی صورت گرفت. در این آزمایش، فاکتورهای آب، شرایط متغیرهایی همچون سطح بستر، میزان شدت نور، استرس و جیره پایه یکسان در نظر گرفته شدند. علاوه بر این، فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب شامل pH، درجه حرارت، میزان اکسیژن، نیتريت، آمونیاک و سختی آب به صورت هفتگی اندازه‌گیری و کنترل شدند.

میکروارگانیزم‌هایی هستند که بعنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار می‌گیرند (Román et al., 2012). مطالعات نشان داده استفاده از این پروبیوتیک منجر به بهبود پاسخ‌های ایمنی و افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا می‌گردد (Mohammadian et al., 2018; Qin et al., 2018). باکتری‌های *Weissella cibaria* و *Lactococcus lactis* از جمله باکتری‌های لاکتیک اسید به شمار می‌آیند که به عنوان فلور طبیعی در گونه‌های مختلف از جمله آبزیان شناسایی شده‌اند (Bakhshzad Mahmoudi et al., 2023). تأثیر مثبت استفاده از باکتری‌های *W. cibaria* و *L. lactis* به عنوان پروبیوتیک در برخی گونه‌ها مانند تاس‌ماهی سبیری (*Acipenser baerii*)، تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)، سر ماری (*Channa striata*) و هیبرید سوروین (*Pseudoplatystoma corruscans*) $\text{P. reticulatum} \times \text{P. reticulatum}$ به صورت جداگانه و یا به صورت توأم در کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بررسی شده‌است (Hashemimofrad et al., 2016; Shenavar Masouleh et al., 2016). از طرفی، مطالعات محدودی از قبیل Hoseinifar و همکاران (۲۰۲۴) پروبیوتیک *P. acidilactici*، Imanpoor و Roohi (۲۰۱۵) مکمل پروبیوتیکی پریمالاک و Karimzadeh و همکاران (۲۰۱۷) تأثیر پروبیوتیک گالیپرو را در جیره غذایی ماهی سفید مورد بررسی قرار داده‌اند که لزوم بررسی‌های بیشتر بر روی این گونه ارزشمند را تقویت می‌نماید. علاوه بر این، مطالعات کمی به مقایسه تفاوت‌ها در ماهیان تکثیر شده به روش طبیعی و مصنوعی پرداخته است. نظر به اهمیت پروبیوتیک‌ها در آبی‌پروری و با توجه به اینکه مطالعات کافی در استفاده از این پروبیوتیک‌ها بر ماهی

تیمارهای آزمایشی شامل:

- ۱- ماهیان حاصل از تکثیر طبیعی تغذیه شده با صفر میلی گرم ترکیب پروبیوتیکی (شاهد ۱)
- ۲- ماهیان حاصل از تکثیر طبیعی تغذیه شده با ۱۵۰ میلی گرم ترکیب پروبیوتیکی
- ۳- ماهیان حاصل از تکثیر طبیعی تغذیه شده با ۳۰۰ میلی گرم ترکیب پروبیوتیکی
- ۴- ماهیان حاصل از تکثیر طبیعی تغذیه شده با ۴۵۰ میلی گرم ترکیب پروبیوتیکی
- ۵- ماهیان حاصل از تکثیر نیمه‌مصنوعی تغذیه شده با صفر میلی گرم ترکیب پروبیوتیکی (شاهد ۲)
- ۶- ماهیان حاصل از تکثیر نیمه‌مصنوعی تغذیه شده با ۱۵۰ میلی گرم ترکیب پروبیوتیکی
- ۷- ماهیان حاصل از تکثیر نیمه‌مصنوعی تغذیه شده با ۳۰۰ میلی گرم ترکیب پروبیوتیکی
- ۸- ماهیان حاصل از تکثیر نیمه‌مصنوعی تغذیه شده با ۴۵۰ میلی گرم ترکیب پروبیوتیکی

ساخت جیره و غذادهی

به منظور تغذیه بچه‌ماهیان سفید از غذای پلت استارتر سایز ۲/۵ میلی‌متر (شرکت فرادانه) استفاده شد. برای تهیه جیره‌های آزمایشی باکتری‌های *W. cibaria* و *L. lactis* از شرکت دانش بنیان زیست‌یار وارنا خریداری شده و با نسبت مساوی در سطوح (۷۵+۷۵) ۱۵۰، (۱۵۰+۱۵۰) ۳۰۰ و (۲۲۵+۲۲۵) ۴۵۰ میلی‌گرم با ازای هر کیلوگرم غذا معادل $1/5 \times 10^9$ ، 3×10^9 و $4/5 \times 10^9$ پرگنه باکتری به غذای پایه اضافه شدند. برای اطمینان از مقدار غلظت نهایی شمارش باکتریایی طبق روش Hoseinifar و همکاران (۲۰۲۴) انجام گردید. دلیل انتخاب این مقادیر از پروبیوتیک‌ها، نزدیک بودن این مقادیر به دوزهای مورد استفاده قرار گرفته در تغذیه

ماهیان در تحقیقات انجام شده در خصوص باکتری‌ها و آبرزیان بوده است (Bakhshzad Mahmoudi et al., 2021). مقادیر مورد نظر از پودر محتوی باکتری‌های *L. lactis* و *W. cibaria* در زیر هود لامینار در ظروف پلاستیکی استریل توزین گردید، سپس، ژلاتین به منظور پوشش‌سازی به هر یک از نمونه‌های وزن شده اضافه و به هر کیلو غذا بطور یکسان اسپری شد. در مرحله بعد جهت یکسان شدن وضعیت تیمار شاهد با سایر تیمارها به جیره غذایی تیمار شاهد نیز ۲۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی بدون ماده مؤثر اضافه شد (Shenavar Masuleh et al., 2016). سپس، غذای حاوی باکتری در داخل دستگاه فن در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه خشک گردید. غذادهی بصورت روزانه در سه وعده صبح، ظهر و عصر بر حسب ۵-۳ درصد وزن توده زنده انجام شد. طول دوره غذادهی با جیره‌های آزمایشی به مدت ۸ هفته بود (Shenavar Masuleh et al., 2016).

زیست‌سنجی و محاسبه عملکرد رشد

برای اندازه‌گیری فاکتورهای رشد و تغذیه و همچنین محاسبه میزان غذای مورد نیاز، همه بچه‌ماهیان هر دو هفته یک بار مورد زیست‌سنجی قرار گرفتند. وزن کل با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم اندازه‌گیری شدند. سپس، مقادیر شاخص‌های درصد افزایش وزن بدن (BWI)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، نرخ رشد ویژه (SGR) و بازماندگی (SR) در پایان آزمایش با استفاده از روابط زیر محاسبه گردید (Bakhshzad Mahmoudi et al., 2021).

$$\text{BWI (\%)} = [(وزن اولیه / وزن اولیه - وزن نهایی)] \times 100$$

$$\text{SGR (\%/day)} = [(لگاریتم طبیعی وزن اولیه - لگاریتم طبیعی وزن نهایی)] / [زمان پرورش] \times 100$$

$$\text{FCR} = [(g) افزایش وزن تر بدن / (g) کل غذای خورده شده]$$

$$\text{SR (\%)} = 100 \times (\text{تعداد کل ماهی اولیه} / \text{تعداد کل ماهی سالم زنده باقی مانده})$$

سنجش شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی

پس از پایان ۸ هفته غذادهی با جیره‌های آزمایشی، خونگیری از ماهیان به طور تصادفی انجام گردید. ابتدا، ماهیان با پودر گل میخک (۰/۵ گرم بر لیتر) بیهوش شده، و خونگیری با کمک سرنگ انسولین هپارینه از سرخرگ یا سیاهرگ دمی انجام شد. از هر نمونه ماهی، ۲ میلی‌لیتر خون نمونه‌برداری شده که مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر آن به داخل لوله‌های اپندورف آغشته به ماده ضد انعقاد خون (هپارین) ریخته و شماره‌گذاری گردید تا جهت شمارش گلبول‌های خونی مورد استفاده قرار گیرد و مابقی ۱/۵ میلی‌لیتر آن به داخل لوله‌های اپندورف غیر هپارینه ریخته و جهت تهیه سرم و بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی و ایمنی شماره‌گذاری شد. نمونه‌ها بلافاصله در یک کلمن حاوی یخ خشک و به دور از تکان‌های شدید به آزمایشگاه ارسال گردید (Torfi Moazenzadeh et al., 2015). فاکتورهای بیوشیمیایی مورد بررسی شامل پروتئین تام، آلبومین، کلسترول، تری‌گلیسرید و آنزیم‌های کبدی (آلاتین آمینو ترانسفراز، آسپارات آمینو ترانسفراز و آلکالین فسفاتاز) بود که با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر و کیت‌های مربوطه سنجش شد.

شاخص‌های ایمنی

شاخص‌های ایمنی از جمله میزان فعالیت لیزوزیم، ACH50 و IgM مورد ارزیابی قرار گرفت. اندازه‌گیری

فعالیت آنزیم لیزوزیم طبق روش ارائه‌شده توسط Kumari و همکاران (۲۰۰۶) با استفاده از فعالیت باکتریایی *Micrococcus luteus* و به روش کدورت سنجی صورت گرفت. فعالیت کمپلمان ACH50 طبق روش Yano و همکاران (۱۹۹۲) سنجش گردید. روش مورد استفاده برای اندازه‌گیری ایمنوگلوبولین M کدورت سنجی Immunoturbidimetric بود و طبق آن شدت کدورت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۴۰ نانومتر با بلاتک (آب مقطر) قرائت گردید (Siwicki, 1993).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Version 20) انجام گرفت و نمودارها با استفاده از Excel رسم شد. ابتدا نرمال بودن داده‌ها با آزمون شاپیروویک به دلیل دقت بالاتر و همگنی واریانس با آزمون لون کنترل گردید. جهت مقایسه داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تفکیکی دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. همچنین، برای بررسی روابط متقابل بین سطوح پروبیوتیکی (۴ سطح) و نوع تکثیر (۲ نوع) از آنالیز فاکتوریل (۲×۴) استفاده شد.

نتایج

پروبیوتیکی بالاتر از شاهد بود اما با سایر تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی داری نداشت ($p < 0/05$). همچنین، اثر نوع تکثیر و اثر متقابل تکثیر × سطح در هیچ یک از شاخص‌های مذکور مشاهده نگردید ($p > 0/05$) (جدول ۱).

نتایج بررسی عملکرد رشد طبق نشان داد افزودن ترکیب پروبیوتیکی سبب بهبود درصد افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی گردید. بهترین شاخص‌های مذکور در سطح ۳۰۰ میلی گرم و فارغ از نحوه تکثیر بدست آمد ($p < 0/05$). بازماندگی در ماهیان تغذیه شده با ۳۰۰ میلی گرم ترکیب

جدول ۱: عملکرد رشد بچه ماهیان سفید (*Rutilus kutum*) حاصل از تکثیر طبیعی و مصنوعی تحت تأثیر سطوح مختلف باکتری‌های پروبیوتیکی *Weissella cibaria* و *Lactococcus lactis* پس از ۸ هفته

Table 1: Growth parameters of *Rutilus kutum* fingerlings bred naturally and semi-artificially fed different levels of *Weissella cibaria* and *Lactococcus lactis* probiotic mixture after 8 weeks

Factors	Breeding	Probiotic level				Interaction of breeding × level (Sig.)
		0	150	300	450	
Initial weight (g)	Natural	10.14±0.01 ^a	10.14±0.01 ^a	10.13±0.01 ^a	10.14±0.01 ^a	0.901
	Artificial	10.14±0.01 ^a	10.14±0.01 ^a	10.12±0.01 ^a	10.14±0.01 ^a	
Final weight (g)	Natural	20.18±0.07 ^c	24.40±0.17 ^b	27.03±0.84 ^a	23.20±0.10 ^{cd}	0.778
	Artificial	20.06±0.20 ^c	23.83±0.20 ^{bc}	26.70±0.47 ^a	22.83±0.20 ^d	
Body weight increasing (%)	Natural	99.04±0.88 ^c	140.63±2.12 ^b	166.83±8.65 ^a	128.79±1.06 ^{cd}	0.801
	Artificial	97.76±2.16 ^c	135.04±1.66 ^{bc}	163.74±4.64 ^a	125.17±1.68 ^d	
Specific growth rate (%/day)	Natural	2.84±0.01 ^d	3.12±0.14 ^b	3.24±0.03 ^a	3.06±0.01 ^c	0.772
	Artificial	2.82±0.02 ^d	3.09±0.02 ^b	3.23±0.01 ^a	3.03±0.01 ^c	
Feed conversion ratio	Natural	4.10±0.10 ^a	3.43±0.20 ^b	2.63±0.06 ^c	3.28±0.19 ^b	0.648
	Artificial	4.26±0.05 ^a	3.44±0.05 ^b	2.59±0.12 ^c	3.40±0.26 ^b	
Survival rate (%)	Natural	94.66±2.51 ^b	99.00±1.73 ^a	100.00±0.00 ^a	98.33±2.88 ^{ab}	0.964
	Artificial	95.00±1.00 ^b	98.33±2.88 ^a	100.00±0.00 ^a	97.66±2.51 ^{ab}	

Dissimilar letters in two rows indicate significant differences between different treatments ($p < 0.05$)

وجود نداشت ($p > 0/05$). سطح MCHC با افزودن ۳۰۰ میلی گرم ترکیب پروبیوتیکی در هر دو نوع تکثیر به طور معنی داری بالاتر از سطح صفر و ۱۵۰ میلی گرم پروبیوتیک در ماهیان حاصل از تکثیر طبیعی بود ($p > 0/05$)، اما با سایر تیمارها اختلاف معنی داری نداشت ($p < 0/05$). همچنین، اثر متقابل تکثیر × سطح در هیچ یک از شاخص‌های خونی مشاهده نگردید ($p > 0/05$).

طبق نتایج جدول ۲، گلبول قرمز و سفید، هموگلوبین و هماتوکریت تحت تأثیر نوع تکثیر نبوده و در ماهیان تغذیه شده با ۳۰۰ میلی گرم ترکیب پروبیوتیکی افزایش معنی داری را در مقایسه با سایر سطوح نشان دادند و کمترین مقادیر مذکور در شاهد مشاهده گردید ($p < 0/05$). غلظت MCV در تیمارهای ۳۰۰ میلی گرم ترکیب پروبیوتیکی به طور معنی داری کمتر از شاهد بود ($p < 0/05$). همچنین، تفاوت معنی داری در مقدار MCH تیمارهای مختلف آزمایشی

جدول ۲: فراسنجه‌های خونی بچه ماهیان سفید (*Rutilus kutum*) حاصل از تکثیر طبیعی و مصنوعی تحت تأثیر سطوح مختلف باکتری‌های پروبیوتیکی *Weissella cibaria* و *Lactococcus lactis* پس از ۸ هفته

Table 2: Hematological indices of *Rutilus kutum* fingerlings bred naturally and semi-artificially fed different levels of *Weissella cibaria* and *Lactococcus lactis* probiotic mixture after 8 weeks

Factors	Breeding	Probiotic level				Interaction of breeding × level (Sig.)
		0	150	300	450	
Hemoglobin (gr/l)	Natural	5.66±0.15 ^c	6.18±0.07 ^b	6.86±0.15 ^a	6.06±0.11 ^b	0.988
	Artificial	5.60±0.20 ^c	6.16±0.05 ^b	6.83±0.11 ^a	6.01±0.07 ^b	
Hematocrit (%)	Natural	25.63±0.35 ^d	27.76±0.20 ^b	29.40±0.45 ^a	26.53±0.20 ^c	0.765
	Artificial	25.53±0.30 ^d	27.26±0.41 ^b	29.20±0.10 ^a	26.46±0.07 ^c	
Red blood cell ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Natural	0.76±0.02 ^c	0.85±0.01 ^b	0.93±0.04 ^a	0.81±0.02 ^b	0.998
	Artificial	0.75±0.02 ^c	0.84±0.01 ^b	0.92±0.02 ^a	0.81±0.02 ^b	
White Blood Cell ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Natural	4.19±0.37 ^c	5.51±0.36 ^b	6.80±0.08 ^a	5.52±0.47 ^b	0.904
	Artificial	4.29±0.12 ^c	5.41±0.12 ^b	6.84±0.15 ^a	5.42±0.28 ^b	
MCV (fl)	Natural	337.46±8.41 ^a	326.05±4.77 ^{ab}	315.26±9.01 ^b	325.01±6.18 ^{ab}	0.992
	Artificial	338.32±7.58 ^a	324.53±7.80 ^{ab}	315.22±7.80 ^b	325.47±5.55 ^{ab}	
MCH (pg)	Natural	74.59±2.10 ^a	72.60±1.18 ^a	73.70±4.63 ^a	74.33±3.04 ^a	0.988
	Artificial	74.17±1.60 ^a	73.12±1.18 ^a	73.78±2.85 ^a	73.99±2.03 ^a	
MCHC (%)	Natural	22.10±0.31 ^{bc}	22.26±0.14 ^{bc}	23.36±0.15 ^a	22.86±0.61 ^{ab}	0.836
	Artificial	21.92±0.52 ^a	22.53±0.14 ^{abc}	23.40±0.32 ^a	22.73±0.33 ^{abc}	

Dissimilar letters in two rows indicate significant differences between different treatments ($p < 0.05$)

اثرات معنی‌دار سطوح مختلف پروبیوتیک بر فعالیت کمپلمان (ACH50)، لیزوزیم و ایمنوگلوبولین بود درحالی‌که اثر نوع تکثیر و اثر متقابل تکثیر×سطح معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). افزودن پروبیوتیک سبب بهبود شاخص‌های مذکور شد ($p < 0.05$). مقادیر ACH50، لیزوزیم و ایمنوگلوبولین با افزودن ترکیب پروبیوتیکی تا سطح ۳۰۰ میلی‌گرم روند صعودی داشتند ولی در سطح ۴۵۰ میلی‌گرم نسبتاً کاهش یافتند ($p < 0.05$)؛ اگرچه کمترین مقادیر در شاهد یافت گردید ($p < 0.05$).

طبق نتایج حاصل از بررسی فراسنجه‌های بیوشیمیایی در جدول ۳، فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم از قبیل کلاسترول، تری‌گلیسرید، AST، ALT و ALP اختلاف معنی‌داری بین جیره‌های مختلف آزمایشی نشان ندادند ($p > 0.05$)؛ درحالی‌که پروتئین تام و آلبومین تحت تأثیر جیره‌های مختلف آزمایشی قرار گرفتند ($p < 0.05$). بالاترین مقادیر مذکور در جیره حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم ترکیب پروبیوتیکی مشاهده گردید ($p < 0.05$)، اگرچه این شاخص‌ها تحت تأثیر نوع تکثیر نبودند ($p > 0.05$). علاوه بر این، اثر متقابل تکثیر×سطح در هیچ یک از شاخص‌های بیوشیمیایی مشاهده نگردید ($p > 0.05$). نتایج فراسنجه‌های ایمنی طبق جدول ۴ نشان‌دهنده

جدول ۳: فراسنج‌های بیوشیمیایی بچه ماهیان سفید (*Rutilus kutum*) حاصل از تکثیر طبیعی و مصنوعی تحت تأثیر سطوح مختلف باکتری‌های پروبیوتیکی *Weissella cibaria* و *Lactococcus lactis* پس از ۸ هفته

Table 3: Biochemical indices of *Rutilus kutum* fingerlings bred naturally and semi-artificially fed different levels of *Weissella cibaria* and *Lactococcus lactis* probiotic mixture after 8 weeks

Factors	Breeding	Probiotic level				Interaction of breeding × level (Sig.)
		0	150	300	450	
Total protein (g/dl)	Natural	5.11±0.07 ^c	5.46±0.08 ^b	6.18±0.14 ^a	5.39±0.13 ^b	0.886
	Artificial	5.14±0.01 ^c	5.43±0.05 ^b	6.18±0.12 ^a	5.30±0.07 ^b	
Albumin (g/dl)	Natural	3.95±0.05 ^d	4.41±0.03 ^b	4.65±0.02 ^a	4.17±0.02 ^c	0.221
	Artificial	4.01±0.07 ^d	4.41±0.02 ^b	4.64±0.04 ^a	4.12±0.03 ^c	
Cholesterol (mg/dl)	Natural	190.69±9.83 ^a	186.33±3.51 ^a	188.62±7.26 ^a	191.35±9.43 ^a	0.763
	Artificial	193.04±4.29 ^a	188.62±7.26 ^a	196.26±7.23 ^a	189.15±11.17 ^a	
Triglyceride (mg/dl)	Natural	199.39±6.53 ^a	197.15±4.12 ^a	200.59±3.92 ^a	200.00±3.60 ^a	0.842
	Artificial	202.05±4.22 ^a	196.41±3.91 ^a	198.40±6.37 ^a	199.67±4.32 ^a	
AST (u/l)	Natural	227.00±8.18 ^a	230.66±4.16 ^a	230.00±8.88 ^a	299.66±2.51 ^a	0.952
	Artificial	229.33±7.50 ^a	229.00±5.00 ^a	230.00±3.00 ^a	229.00±7.00 ^a	
ALT (u/l)	Natural	13.33±1.52 ^a	13.66±2.30 ^a	13.66±2.51 ^a	13.00±1.00 ^a	0.995
	Artificial	14.00±1.73 ^a	14.00±2.64 ^a	13.66±2.08 ^a	13.33±3.21 ^a	
ALP (u/l)	Natural	645.00±15.00 ^a	651.66±12.58 ^a	647.66±13.27 ^a	646.33±3.21 ^a	0.992
	Artificial	646.66±7.63 ^a	650.33±1.52 ^a	647.66±7.57 ^a	647.66±5.85 ^a	

Dissimilar letters in two rows indicate significant differences between different treatments ($p < 0.05$)

جدول ۴: فراسنج‌های ایمنی بچه ماهیان سفید (*Rutilus kutum*) حاصل از تکثیر طبیعی و مصنوعی تحت تأثیر سطوح مختلف باکتری‌های پروبیوتیکی *Weissella cibaria* و *Lactococcus lactis* پس از ۸ هفته

Table 4: Immune parameters of *Rutilus kutum* fingerlings bred naturally and semi-artificially fed different levels of *Weissella cibaria* and *Lactococcus lactis* probiotic mixture after 8 weeks

Factors	Breeding	Probiotic level				Interaction of breeding × level (Sig.)
		0	150	300	450	
Immunoglobulin (U/ml)	Natural	22.33±2.08 ^c	26.66±1.15 ^b	34.66±1.52 ^a	26.33±0.57 ^b	0.801
	Artificial	21.33±1.15 ^c	26.66±0.57 ^b	33.33±1.52 ^a	26.00±1.00 ^b	
ACH50 (U/ml)	Natural	105.66±3.05 ^c	112.66±2.08 ^b	127.00±4.35 ^a	111.66±0.57 ^b	0.726
	Artificial	103.00±1.00 ^c	112.33±1.52 ^b	124.66±2.51 ^a	111.33±0.57 ^b	
Lysozyme (U/ml/min)	Natural	15.66±1.52 ^c	21.33±1.52 ^c	28.66±0.57 ^a	20.66±1.15 ^b	0.976
	Artificial	15.33±1.15 ^c	20.66±1.15 ^b	27.66±0.57 ^a	20.00±1.00 ^b	

Dissimilar letters in two rows indicate significant differences between different treatments ($p < 0.05$)

غذایی گردید و ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به عنوان بهترین سطح مورد استفاده بود. باکتری‌های پروبیوتیکی اثرات مثبتی را در دستگاه گوارش گذاشته و تعادل میکروبی روده را بهبود می‌بخشند. از طرفی، کربوهیدرات‌های پیچیده تجزیه شده و در نتیجه فرآیند تخمیر، اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه (SCFA) مانند

بحث

در مطالعه حاضر، تأثیر چهار سطح پروبیوتیکی ترکیبی از باکتری‌های *Weissella cibaria* و *Lactococcus lactis* در دو نوع تکثیر مصنوعی و طبیعی مورد مطالعه قرار گرفت. افزودن سطوح پروبیوتیکی منجر به بهبود عملکرد رشد و ضریب تبدیل

آنزیم‌های داخلی عمر فعالیت بیشتری دارند و تأثیر بالاتری در هضم و جذب و در نهایت عملکرد رشد خواهند داشت (Najafi Enferadi et al., 2018). در تحقیقات مشابه استفاده از ترکیب پروبیوتیک‌ها، Bakhshzad Mahmoudi و همکاران (۲۰۲۱) سطوح مختلف ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم پروبیوتیک‌های *W. cibaria* و *L. lactis* (هر کدام به میزان 10^7 CFU/g) را به دو صورت جدا و دوز تلفیقی بر کپور معمولی بررسی کرده و بیان کردند افزودن پروبیوتیک‌ها به هر دو شکل سبب بهبود عملکرد رشد و ضریب تبدیل غذایی در مقایسه با شاهد شد. سطح بهینه مورد استفاده در تحقیق کنونی با پژوهش مذکور مشابهت داشت که می‌تواند به دلیل نزدیک بودن گونه و نیاز غذایی باشد. Bakhshzad Mahmoudi و همکاران (۲۰۲۳) *L. lactis* و *W. cibaria* را به طور مجزا و ترکیبی در سطوح $10^7 \times 1/5$ ، 3×10^7 و $4/5 \times 10^7$ CFU/g در کپور معمولی مورد استفاده قرار دادند و بهترین رشد را در سطوح 3×10^7 و $4/5 \times 10^7$ CFU/g ترکیبی و سطح 3×10^7 پروبیوتیک *W. cibaria* گزارش کردند. سطح بهینه پروبیوتیک با توجه به سویه و ترکیب باکتریایی، گونه و ترکیبات جیره غذایی می‌تواند متغیر باشد. عملکرد رشد بچه‌ماهیان تحت تأثیر تکثیر طبیعی و مصنوعی قرارنگرفتند و نشان می‌دهد در صورتیکه سطح مناسب پروبیوتیکی انتخاب گردد استفاده از پروبیوتیک می‌تواند در هر دو گروه از ماهیان تأثیر مثبت بگذارد.

خون به عنوان یک بافت سیال در بدن و نشان‌دهنده شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیکی است و در تشخیص بیماری‌های آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Hosseini et al., 2014). ترکیبات جیره و

استات و بوتیرات ایجاد می‌شود که به عنوان منبع انرژی برای ماهی و توسعه رشد عمل می‌کنند (Ringø et al., 2022). ترکیبات و مواد مغذی ترشح‌شده توسط باکتری‌ها از قبیل اسیدهای آلی و اسیدهای چرب به تحریک اشتها و تقویت راندمان غذایی کمک می‌نماید، به این معنی که ماهی می‌تواند خوراک را به طور مؤثرتری به توده بدن تبدیل کند. علاوه بر این، تولید ترکیبات زیست فعال توسط باکتری‌های پروبیوتیکی مانند ویتامین‌ها، اسیدهای آلی و آنزیم‌ها می‌تواند اثرات مفیدی بر رشد و سلامت، بهبود جذب مواد مغذی و سلامت روده داشته باشند (Liu et al., 2010). بازماندگی ماهیان تغذیه‌شده با پروبیوتیک به خصوص سطح ۳۰۰ میلی‌گرم ارتقا یافت که احتمالاً تحت تأثیر وجود این ترکیبات زیست‌فعال، افزایش ایمنی و رقابت با باکتری‌های بیماری‌زا است. مصرف سطح بهینه پروبیوتیک به حصول بهترین نتیجه در پرورش می‌انجامد و با تعامل بر سایر باکتری‌های مفید به بالانس آنها در دستگاه گوارش کمک می‌نماید درحالی‌که مازاد آن می‌تواند این تعادل را برهم بزند. همچنین، افزایش قابلیت هضم و جذب مواد غذایی از مسیر سنتز و تحریک آنزیم‌های گوارشی و افزایش پرز روده‌ای بهبود یافته، و به دنبال آن رشد سریع می‌یابد (Won et al., 2020). استقرار باکتری‌های مفید در روده ترشح آنزیم‌های خارج سلولی مانند آمیلاز، لیپاز و پروتئاز را در پی داشته و سبب می‌گردد انرژی کمتری صرف تجزیه پروتئین، کربوهیدرات و چربی شود و به بهترین شکل از مواد مغذی استفاده گردد (Dutta et al., 2018). این آنزیم‌های خارج سلولی ترشح‌شده توسط باکتری‌های پروبیوتیکی به دلیل داشتن فعالیت در محدوده وسیعی از pH نسبت به

افزایش نفوذپذیری و جذب آهن در روده و اریتروپوییز مؤثرتر (تولید گلبول‌های قرمز) شوند (Padalino et al., 2012). مطالعات مربوط به تأثیر ترکیب پروبیوتیکی *cibaria* و *L. lactis* بسیار اندک است. به طور مشابه، Aly و همکاران (۲۰۰۸) بالاترین هموگلوبین را در تیلایای نیل تغذیه‌شده با سطح ۰/۳ گرم پروبیوتیک (*Bacillus subtilis* و *Lactobacillus acidophilus*) مشاهده کردند ولی مقدار MCV با افزودن ۰/۴ گرم پروبیوتیک افزایش یافت. تعداد گلبول‌های سفید در بچه‌ماهیان سفید دریای خزر تغذیه شده با مخلوط ۰/۲۵ درصد پروبیوتیک گالیپرو و ۰/۰۵ درصد پری‌بیوتیک تکنو موس افزایش یافت (Karimzadeh et al., 2017). در کپور معمولی مصرف *lactis* و *W. cibaria* به طور مجزا و ترکیبی در سطوح $10^7 \times 1/5$ ، $10^7 \times 3$ و $4/5 \times 10^7$ CFU/g منجر به بهبود تعداد گلبول‌های سفید گردید (Bakhshzad Mahmoudi et al., 2023). در مطالعه Hoseinifar و همکاران (۲۰۲۴) سطوح صفر ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴ گرم در کیلوگرم باکتری پروبیوتیکی *Pediococcus acidilactici* در ماهی سفید منجر به افزایش مقادیر MCV، MCH در تیمار ۰/۴ گرم پروبیوتیک در مقایسه با شاهد شده ولی میزان گلبول قرمز در بالاترین سطح پروبیوتیک تقلیل یافت. تعداد گلبول سفید خون با افزایش میزان پروبیوتیک تا ۰/۲ گرم بهبود یافت که نشان‌دهنده اهمیت انتخاب سطح مناسب پروبیوتیک برای اثرگذاری پروبیوتیک مورد نظر است. باکتری‌های غالب دستگاه گوارش ممکن است تحت تأثیر مکمل‌های پروبیوتیکی دستخوش تغییر قرار گرفته و ویژگی‌هایی را بر این اساس نشان دهند. بنابراین، گرفتن نتیجه مطلوب به نوع پروبیوتیک و

افزودنی‌هایی از قبیل پروبیوتیک می‌توانند بر خصوصیات خونی تأثیر بگذارند. در مطالعه کنونی، گلبول قرمز و سفید، هموگلوبین و هماتوکریت تحت تأثیر نوع تکثیر نبودند اما با افزودن پروبیوتیک بهبود یافتند. تغییر در گلبول‌های سفید به عنوان یکی از شاخص‌های مهمی است که نشان می‌دهد ماهی به پاتوژن‌ها چگونه پاسخ داده و افزایش این فاکتورها می‌تواند نشان‌دهنده تحریک سیستم ایمنی باشد (Bakhshzad Mahmoudi et al., 2023). همچنین، از آنجاییکه در کم‌خونی، سلول‌های خونی همولیز شده و یا تولید آنها کاهش می‌یابد و در نهایت به کاهش گلبول‌های قرمز خون، هماتوکریت و هموگلوبین منجر می‌شود (Hedayati et al., 2013)، افزایش این شاخص‌ها تحت تأثیر ترکیب باکتری‌های *W. cibaria* و *L. lactis* نشان‌دهنده تأثیر مثبت این ترکیب بر خون‌سازی می‌باشد. دلیل این امر می‌تواند تنظیم میکروبیوتای دستگاه گوارش و افزایش قابلیت استفاده و جذب عناصر و یا تولید برخی ویتامین‌ها توسط باکتری‌های مفید باشد که به تقویت خون‌سازی کمک می‌نماید. از این رو، نوع و ترکیب پروبیوتیک و اثر نهایی آن بر جمعیت میکروبی روده دارای اهمیت است. به عنوان مثال، کلسیم لاکتات و کلسیم پروپیونات دو محصول نهایی حاصل از تخمیر باکتری روده‌ای، سبب بهبود فاکتورهای خونی ماهی می‌گردند (Hasan et al., 2014). میکروبیوم سالم روده می‌تواند منجر به جذب بهتر مواد مغذی ضروری مانند فولات، آهن، اسید فولیک و ویتامین ب ۱۲ شود که برای تولید گلبول‌های قرمز بسیار مهم است (Abd El-Rhman et al., 2009). برخی از باکتری‌های لاکتیک اسید، ممکن است با تولید اسید لاکتیک و سایر اسیدهای آلی سبب

ترکیب پروبیوتیکی مناسب، شکل و سطح استفاده، حامل پروبیوتیک، دوره مصرف و اندازه و مرحله زندگی ماهی وابستگی دارد (Yazici et al., 2015). علاوه بر این، فراسنجه‌های خونی تفاوتی در ماهیان حاصل از انواع مختلف تکثیر نشان ندادند.

فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم از قبیل کلسترول، تری‌گلیسرید، AST، ALT و ALP تحت تأثیر نوع تکثیر و پروبیوتیک قرار نگرفتند. آنزیم‌های کبدی مذکور در زمانهای آسیب کبدی افزایش می‌یابند (Kumar et al., 2011)؛ از این‌رو، نتایج کنونی می‌تواند نشان‌دهنده نداشتن اثرات منفی ترکیب پروبیوتیکی *W. cibaria* و *L. lactis* بر کبد باشد. به طور مشابه، Ghiasi و همکاران (۲۰۱۸) تأثیری در میزان ALT و AST در فیل ماهی تغذیه‌شده با دوزهای 10^7 ، 10^8 و 10^9 CFU/g پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* به استثنای بالاترین سطح نشان ندادند و عنوان کردند به دلیل افزایش آنزیم کبدی در بالاترین سطح بایستی با دقت مصرف گردد. Bakhshzad و Mahmoudi و همکاران (۲۰۲۳) بیان کردند افزایش قابلیت هضم و جذب مواد مغذی و ویتامین‌ها تحت تأثیر پروبیوتیک سبب تقویت عملکرد کبدی و جلوگیری از استرس کبدی شده و به کاهش آنزیم‌های کبدی منجر می‌گردد. این محققین کمترین غلظت آنزیم‌های کبدی AST و ALT را در سطوح 3×10^7 و 3×10^7 CFU/g ترکیبی و سطح $4/5 \times 10^7$ CFU/g پروبیوتیک *W. cibaria* مشاهده کردند. به نظر می‌رسد پروبیوتیک استفاده‌شده در مطالعه حاضر تأثیری بر متابولیسم چربی نشان نداده درحالی‌که پروتئین تام و آلبومین با افزودن پروبیوتیک بهبود یافتند. بالاترین مقادیر مذکور در جیره حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم ترکیب پروبیوتیکی مشاهده گردید. همچنین، این مقادیر ارتباطی با نوع تکثیر نداشتند. سطح پروتئین کل سرم منعکس‌کننده سلامت کلی ماهی است و گردش مؤثر سلول‌های ایمنی را در سراسر بدن تضمین می‌کند. پروتئین کل شامل ایمونوگلوبولین‌ها (آنتی‌بادی‌ها) است که اجزای مهم پاسخ ایمنی هستند. سطح پروتئین بالاتر اغلب می‌تواند حاکی از پاسخ ایمنی فعال باشد، زیرا بدن آنتی‌بادی‌ها را برای مبارزه با عفونت‌ها تولید می‌کند. آلبومین به عنوان حامل بسیاری از مواد از جمله اسیدهای چرب، هورمون‌ها، داروها و سایر مولکول‌ها عمل می‌کند و با تسهیل حمل و نقل مواد مغذی و عوامل ایمنی، به حفظ پاسخ ایمنی قوی کمک می‌نماید. همچنین، می‌تواند با کاهش استرس اکسیداتیو، سبب محافظت از بافت‌ها و حفظ عملکرد ایمنی شود (Belinskaia et al., 2021). پروبیوتیک با افزایش جذب پروتئین از طریق تحریک ترشح آنزیم‌های پروتئولیتیک و پپتیدولیتیک ماکرومولکول‌ها را به پپتیدها و اسیدهای آمینه تبدیل کرده و سبب افزایش پروتئین سرمی می‌گردد (Abd El-Rhman et al., 2009). همچنین، پروبیوتیک‌ها سبب تنظیم میکروبیوتا و تولید برخی پپتیدهای بیواکتیو، اسیدهای آلی و ویتامین‌ها توسط باکتری‌های مفید شده و منجر به تحریک سیستم ایمنی می‌گردد (Liu et al., 2010). افزودن پروبیوتیک‌های *Lactobacillus acidophilus* و *Candida utilis* در جیره کیور معمولی سبب بهبود پروتئین کل گردید (Weisi et al., 2022). Zhou و همکاران (۲۰۱۰) دریافتند افزودن باکتری *L. lactis* به آب پس از ۴۰ روز سبب افزایش پروتئین کل و گلوبولین در ماهی تیلاپای نیل گردید. مطالعه حاضر با این نتایج همسو بود.

ترکیب پروبیوتیکی مناسب، شکل و سطح استفاده، حامل پروبیوتیک، دوره مصرف و اندازه و مرحله زندگی ماهی وابستگی دارد (Yazici et al., 2015). علاوه بر این، فراسنجه‌های خونی تفاوتی در ماهیان حاصل از انواع مختلف تکثیر نشان ندادند.

فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم از قبیل کلسترول، تری‌گلیسرید، AST، ALT و ALP تحت تأثیر نوع تکثیر و پروبیوتیک قرار نگرفتند. آنزیم‌های کبدی مذکور در زمانهای آسیب کبدی افزایش می‌یابند (Kumar et al., 2011)؛ از این‌رو، نتایج کنونی می‌تواند نشان‌دهنده نداشتن اثرات منفی ترکیب پروبیوتیکی *W. cibaria* و *L. lactis* بر کبد باشد. به طور مشابه، Ghiasi و همکاران (۲۰۱۸) تأثیری در میزان ALT و AST در فیل ماهی تغذیه‌شده با دوزهای 10^7 ، 10^8 و 10^9 CFU/g پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* به استثنای بالاترین سطح نشان ندادند و عنوان کردند به دلیل افزایش آنزیم کبدی در بالاترین سطح بایستی با دقت مصرف گردد. Bakhshzad و Mahmoudi و همکاران (۲۰۲۳) بیان کردند افزایش قابلیت هضم و جذب مواد مغذی و ویتامین‌ها تحت تأثیر پروبیوتیک سبب تقویت عملکرد کبدی و جلوگیری از استرس کبدی شده و به کاهش آنزیم‌های کبدی منجر می‌گردد. این محققین کمترین غلظت آنزیم‌های کبدی AST و ALT را در سطوح 3×10^7 و 3×10^7 CFU/g ترکیبی و سطح $4/5 \times 10^7$ CFU/g پروبیوتیک *W. cibaria* مشاهده کردند. به نظر می‌رسد پروبیوتیک استفاده‌شده در مطالعه حاضر تأثیری بر متابولیسم چربی نشان نداده درحالی‌که پروتئین تام و آلبومین با افزودن پروبیوتیک بهبود یافتند. بالاترین مقادیر مذکور در جیره حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم ترکیب

پیشرفته می‌تواند منجر به شناخت بهتر پاتوژن، افزایش تولید IgM در پاسخ به عوامل بیماری‌زا، و از بین بردن پاتوژن‌ها به هنگام مواجهه‌های بعدی شود. میکروبیوتای روده نقش مهمی در شکل دادن به پاسخ‌های ایمنی سیستمیک ایفا می‌کند. وجود پروبیوتیک منجر به نظارت بر ایمنی و پاسخ‌های حافظه‌ای مؤثرتر می‌شود و تولید IgM در هنگام قرار گرفتن در معرض عوامل بیماری‌زا افزایش می‌یابد (Reyes-Becerril *et al.*, 2011). به طور مشابه، باکتری‌های *L. lactis* و *W. cibaria* به ترتیب در ماهی تیلایای نیل و ماهی هیبرید سوربین سبب بهبود لیزوزیم و ایمونوگلوبولین کل گردید (Zhou *et al.*, 2010). Mahmoudi و همکاران (۲۰۲۳) عنوان کردند افزودن پروبیوتیک‌های *L. lactis* و *W. cibaria* به جیره منجر به بهبود فعالیت IgM، کمپلمان و لیزوزیم در کپور معمولی به خصوص در سطوح 3×10^7 و $4/5 \times 10^7$ CFU/g ترکیبی و سطح 3×10^7 پروبیوتیک *W. cibaria* گردید. مخلوط باکتری پروبیوتیکی *L. lactis* و *W. confuse* در سطوح ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ایمونوگلوبولین و C_3 را افزایش داد. مقادیر کمپلمان ACH50 و C_4 در ماهیان تغذیه‌شده با ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در مقایسه با شاهد و سطح ۴۵۰ میلی‌گرم پروبیوتیک افزایش یافت (Ghorbani *et al.*, 2020). بنابراین، سطح بهینه پروبیوتیک را می‌توان با توجه به هر گونه و نحوه اثرگذاری تعیین نمود. مطالعه حاضر با این تحقیقات مشابهت داشت.

در تحقیق کنونی، فعالیت کمپلمان (ACH50)، لیزوزیم و ایمونوگلوبولین بود با افزودن پروبیوتیک بهبود یافت. این مقادیر تا سطح ۳۰۰ میلی‌گرم پروبیوتیکی روند صعودی داشتند ولی در سطح ۴۵۰ میلی‌گرم نسبتاً کاهش یافتند. این امر می‌تواند به برهم‌خوردن تعادل میکروبی، افزایش جمعیت باکتری‌های نامطلوب و اثرات آنتاگونیستی بر ایمنی نسبت داده شود اگرچه شاخص‌های مذکور از شاهد بالاتر بود. انواع تکثیر تأثیر معنی‌داری بر فراسنجه‌های ایمنی نداشت. باکتری‌های پروبیوتیکی ممکن است بیان پپتیدهای ضد میکروبی در ماهی را تحریک کند و منجر به افزایش تولید لیزوزیم به عنوان بخشی از پاسخ ایمنی ذاتی شود (Kim *et al.*, 2013). اسیدهای چرب زنجیره کوتاه مانند استات، پروپونات و بوتیرات به عنوان محصول نهایی فرآیندهای تخمیر توسط پروبیوتیک‌های لاکتیک اسید تولید می‌شود (Ringø *et al.*, 2022). این ترکیبات از طریق بیان ژن‌های مرتبط با سیتوکین‌ها و سایر مولکول‌های سیگنالینگ مانند القا گیرنده TLR می‌تواند منجر به فعال شدن در هر دو مسیر ایمنی ذاتی و تطبیقی شود (El-Kady *et al.*, 2022). فعال‌سازی این مسیر منجر به بهبود فعالیت کمپلمان می‌شوند (Vinolo *et al.*, 2011). وجود باکتری‌های *W. cibaria* و *L. Lactis* احتمالاً به متعادل‌ساختن میکروبیوم روده کمک کرده که به منظور حفظ سیگنال‌های ایمنی قوی لازم برای فعال کردن سیستم کمپلمان بسیار حیاتی است. پروبیوتیک‌ها ممکن است عملکرد لئوئید مرتبط با روده (GALT) را بهبود بخشند که نقش مهمی در ایمنی مخاطی دارد و آنتی‌ژن را به طور کارآمدتری به لئوسیت‌ها معرفی نمایند (Rodriguez-Estrada *et al.*, 2009). این تعامل

enzymes, and growth of common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquatic Animals Nutrition*, 8(3), pp.1-15. DOI: 10.22124/janb.2023.24077.1190 [In Persian]

3. Najafi Enferadi, M.H., Mohammadzadeh, F., Soltani, M., Bahri, A.H. and Sheikhzadeh, N., 2018. Effects of *Lactobacillus plantarum* on Growth Performance, Proteolytic Enzymes Activity and Intestine Morphology in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(2), pp.351-356. DOI:10.4194/1303-2712-v18_2_14
4. Abdolmaleki, S. and Ghaninezhad, D., 2007. Stock assessment of the Caspian Sea in Kutum (*Rutilus frisii kutum*) Iranian coastal waters of the Caspian Sea, Iranian Scientific Fisheries Journal, 16(1), pp.103-114. DOI: 10.22092/isfj.2007.114976 [In Persian]
5. Imanpoor, M. and Roohi, Z., 2015. Effect of a multi-strain probiotic (Primalac) on growth performance, some blood biochemical parameters, survival and stress resistance on Caspian kutum (*Rutilus kutum*) fry. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 24(2), pp.95-102. DOI: 10.22092/isfj.2015.103133 [In Persian]
6. Daryanabard, G., Fazli, H., Taghavi Motlagh, S.A., Vahab Nejad, A. and Bagherzadeh Afrouzi, F. 2020. Research article: Reproduction and sexual maturity of the white fish (*Rutilus kutum*) in the Iranian waters of the Caspian Sea. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 29(5), pp.111-121. [In Persian]
7. Karimzadeh, S., Keramat Amirkolaei, A. and Parhizkar Miandehi, S. 2017. The effect of probiotic and prebiotic food additives on growth performance, carcass composition, gut microbial population, some blood metabolites, and mortality of juvenile white fish from the Caspian Sea, Third National Conference on Applied Microbiology of Iran, Babolsar, [In Persian]

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد باکتری‌های *W. Cibaria* و *L. Lactis* به عنوان محرک خونی و ایمنی در هر دو روش تکثیر مصنوعی و طبیعی بچه‌ماهیان سفید مؤثر عمل کرده و می‌تواند به منظور افزایش بهره‌وری مورد استفاده قرار گیرد. از آنجاییکه عملکرد رشد، فراسنجه‌های خونی و ایمنی بچه‌ماهیان تحت تأثیر نوع تکثیر (طبیعی و مصنوعی) قرار نگرفتند در صورتیکه سطح مناسب پروبیوتیکی انتخاب گردد استفاده از این پروبیوتیک‌ها می‌تواند در هر دو گروه از ماهیان تأثیر مثبت بگذارد. اگرچه نیاز به مطالعات تکمیلی در سنین و اوزان بالاتر و همچنین، استفاده از تکنیک‌های ژنتیکی به منظور روشن‌شدن مکانیزم‌های دقیقتر وجود دارد. با توجه به سطح بهینه در پژوهش کنونی مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم از این ترکیب پروبیوتیکی به جیره بچه- ماهیان سفید پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از بابت یاری کلیه همکاران در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایم.

منابع

1. Hashemimofrad, M., Sattari, M., Khoshkholgh, M., Shenavar Masuoleh, A. and Abasalizadeh, A., 2016. Effect of *Weissella cibaria* as probiotic on some on growth factors in Siberian sturgeon *Acipenser baerii*. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 25(2), pp.17-27. DOI: 10.22092/isfj.2017.110236 [In Persian]
2. Weisi, T., Ahmadifard, N., Atashbar Kangarloei, B. and Tukmechi, A., 2022. Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Candida utilis* on mucus immunity indices, liver

- in health and disease: esterase, antioxidant, transporting and signaling properties. *International journal of Molecular Sciences*, 22(19), pp.10318. Doi:10.3390/ijms221910318
14. Dutta, D., Banerjee, S., Mukherjee, A. and Ghosh, K., 2018. Potential gut adherent probiotic bacteria isolated from rohu, *Labeo rohita* (Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinidae): Characterisation, exo-enzyme production, pathogen inhibition, cell surface hydrophobicity, and bio-film formation. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 48(3), pp.221-233. DOI: 10.3750/AIEP/02251
 15. El-Kady, A.A., Magouz, F.I., Mahmoud, S.A. and Abdel-Rahim, M.M., 2022. The effects of some commercial probiotics as water additive on water quality, fish performance, blood biochemical parameters, expression of growth and immune-related genes, and histology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 546(4), 737249. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.737249
 16. Ghiasi, M., Binaii, M., Naghavi, A., Rostami, H.K., Nori, H. and Amerizadeh, A., 2018. Inclusion of *Pediococcus acidilactici* as probiotic candidate in diets for beluga (*Huso huso*) modifies biochemical parameters and improves immune functions. *Fish Physiology and Biochemistry*, 44, pp.1099-1107. DOI: 10.1007/s10695-018-0497-x
 17. Ghorbani Vaghei, R., Shenavar Masoule, A.R., Kazemi, R., Jalilpour, J., Hoseinpour, A., Sayed Hassani, M.H. and Alizadeh Rudposhti, M., 2021. Effects of adding two native bacterial strains (*Lactococcus lactis* and *Weissella confusa*) on growth performance, immune indices, and intestinal flora of juvenile great sturgeon (*Huso huso*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 20(4), pp.1206-1217.
 18. Hasan, K.N. and Banerjee, G., 2020.
 8. Bakhshzad Mahmoodi, A., Farokhrooz Lashidani, M., Zamini, A., Shanaf Mazandaran, A. and Tehrani Fard, A., 2021. The effect of probiotics *Lactococcus lactis* and *Weissella cibaria* on growth performance, intestinal bacterial flora, digestive enzymes, and intestinal tissue in common carp fry (*Cyprinus carpio*). *Journal of Aquaculture Development*, 15(3), pp.13-29. DOI: 10.52547/aquadev.15.3.13 [In Persian]
 9. Hosseini, A., Oraji, H., Yegane, S. and Shahabi, H., 2014. The effect of probiotic bacto-cell on growth performance, blood parameters and some serum parameters in Caspian salmon (*Salmo caspius*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 23(2), pp.35-44. DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103691 [In Persian]
 10. Abd El-Rhman, A.M., Khattab, Y.A.E. and Adel Shalaby, M.E., 2009. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotic for promoting the growth performance and health of Nile tilapia. *Fish and Shellfish Immunology* 27(2), pp.175-180. DOI: 10.1016/j.fsi.2009.03.020
 11. Aly, S.M., Abdel-Galil, A.Y., Ghareeb, A. and Mohamed, M.F., 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish Shellfish Immunology*, 25, pp.128-136.
 12. Bakhshzad Mahmoudi, A., Farokhrouz Lashidani, M., Zamini, A., Shenavar Masuleh, A. and Tehranifard, A., 2023. Growth performance and serum immune responses of the common carp (*Cyprinus carpio*) using *Lactococcus lactis* and *Weissella cibaria* as potential dietary probiotics. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 22(3), pp.615-630. DOI: 10.22092/ijfs.2023.129475
 13. Belinskaia, D.A., Voronina, P.A., Shmurak, V.I., Jenkins, R.O. and Goncharov, N.V., 2021. Serum albumin

- survival, development, stress tolerance and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish and Shellfish Immunology*, 28, pp.837-844. DOI: 10.1016/j.fsi.2010.01.012
25. Liu, Y., Li, X., Li, J. and Chen, W., 2021. The gut microbiome composition and degradation enzymes activity of black Amur bream (*Megalobrama terminalis*) in response to breeding migratory behavior. *Ecology Evolution*, 11, pp.5150–5163. DOI: 10.1002/ece3.7407
26. Mohammadian, T., Nasipour, M., Tabandeh, M. R., Heidary, A. A., Ghanei-Motlagh, R. and Hosseini, S. S., 2018. Administrations of autochthonous probiotics altered juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* health status, growth performance and resistance to *Lactococcus garvieae*, an experimental infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 86, pp.269-279. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.11.052
27. Padalino, M., Perez-Conesa, D., López-Nicolás, R., Frontela-Saseta, C. and Ros-Berruezo, G., 2012. Effect of fructooligosaccharides and galactooligosaccharides on the folate production of some folate-producing bacteria in media cultures or milk. *International Dairy Journal*, 27(1-2), pp.27-33. DOI: 10.1016/j.idairyj.2012.06.006
28. Qin, C., Xie, Y., Wang, Y., Li, S., Ran, C., He, S. and Zhou, Z., 2018. Impact of *Lactobacillus casei* BL23 on the host transcriptome, growth and disease resistance in larval zebrafish. *Frontiers in Physiology*, 9, p.1245. DOI: 10.3389/fphys.2018.01245
29. Reyes-Becerril, M. Ascencio-Valle, F. Tovar-Ramirez, D. Meseguer, J. and Esteban, M.A., 2011. Effects of polyamines on cellular innate immune response and the expression of immune-relevant genes in gilthead seabream leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 30, pp.248-254. DOI: 10.1016/j.fsi.2010.10.011
- Recent studies on probiotics as beneficial mediator in aquaculture: a review. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 81(1), pp.1-16. DOI: 10.1186/s41936-020-00190-y
19. Hedayati, A., Jahanbakhshi, A. and Qaderi Rmazy, F., 2013. Aquatic Toxicology. Vol. I. First edition. pp. 70-76.
20. Hoseinifar, S.H., Hoseini, S.M., Taheri Mirghaed, A., Ghelichpour, M., Shirzad-Aski, H., Van Doan, H., El-Haroun, E., Safari, R. and Khanzadeh, M., 2024. Comparison of the effects of host-associated (autochthonous) and commercial probiotics on immune responses, growth parameters and intestinal microbiota of Caspian whitefish (*Rutilus frisii kutum*) fry. *Frontiers in Marine Science*, 11, 1446927.
21. Kim, D., Beck, B.R., Heo, S.B., Kim, J., Kim, H.D., Lee, S.M., Kim, Y., Oh, S.Y., Lee, K., Do, H. and Lee, K., 2013. *Lactococcus lactis* BFE920 activates the innate immune system of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), resulting in protection against *Streptococcus iniae* infection and enhancing feed efficiency and weight gain in large-scale field studies. *Fish and Shellfish Immunology*, 35(5), pp.1585-1590. DOI: 10.1016/j.fsi.2013.09.008
22. Kumar, V., Makkar, H.P.S. and Becker, K., 2011. Nutritional, physiological and haematological responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles fed detoxified *Jatropha* carcass kernel meal. *Aquaculture Nutrition*, 17, pp.451–467. DOI: 10.1111/j.1365-2095.2010.00825.x
23. Kumari, J., 2006. Seasonal variation in the innate immune parameters of the Asian catfish *Clarias batrachus*. *Aquaculture*, 252(2-4), pp.121–127. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.07.025
24. Liu, K., Chiu, C., Shiu, Y., Cheng, W. and Liu, C., 2010. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the

- biochemical parameters in sobaity sea bream juveniles (*Sparidentex hasta*, Valenciennes 1830). *Comparative Clinical Pathology*, 24(6), pp.1501-1507. DOI: 10.1007/s00580-015-2107-y
36. Vinolo, M.A., Rodrigues, H.G., Nachbar, R.T. and Curi, R., 2011. Regulation of Inflammation by Short Chain Fatty Acids. *Nutrients*, 3, pp.858-76. DOI: 10.3390/nu3100858
37. Won. S., Hamidoghli, A., Choi, W., Park, Y., Jang, W.J., Kong, I. and Bai, S., 2020. Effects of *Bacillus subtilis* WB60 and *Lactococcus lactis* on growth, immune responses, histology and gene expression in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Microorganisms*, 8(67), pp.1-15. DOI: 10.3390/microorganisms8010067
38. Yano, T., 1992. Assays of hemolytic complement activity. *Techniques in Fish Immunology*, pp.131-141.
39. Yazici, I. S., Hisar, O., Yilmaz, S. and Yigit, M., 2015. Effects of different probiotic bacteria on growth, body composition, immune response and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under sub lethal water temperature. *Marine Science and Technology Bulletin*, 4(2), pp.21-28.
30. Ringø, E., Harikrishnan, R., Soltani, M., and Ghosh, K., 2022. The effect of gut microbiota and probiotics on metabolism in fish and shrimp. *Animals*, 12(21), 3016. DOI: 10.3390/ani12213016
31. Rodriguez-Estrada, U., Satoh, S., Haga, Y., Fushimi, H. and Sweetman, J., 2009. Effects of single and combined supplementation of *Enterococcus faecalis*, mannan oligosaccharide and polyhydroxybutyrate acid on growth performance and immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Science*, 57(4), pp.609-617. DOI: 0.11233/aquaculturesci.57.609
32. Román, L., Real, F., Sorroza, L., Padilla, D., Acosta, B., Grasso, V., Bravo, J. and Acosta, F., 2012. The in vitro effect of probiotic *Vagococcus fluvialis* on the innate immune parameters of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish & Shellfish Immunology*, 33(5), pp.1071-1075. DOI: 10.1016/j.fsi.2012.06.028
33. Shenavar Masuleh, A., Soltani, M., Ahmadi, M., Pourkazemi, M. and Taherimirghaed, A., 2016. The effect of using *Lactococcus lactis* JF831150 on the status of the intestinal bacterial flora of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and exposure to *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Veterinary Research*, 71(3), pp.303-310. [In persian]
34. Siwicki, A., 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish. II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (Ig) level in serum. Fish diseases diagnosis and preventions methods. In: Siwicki AK, Anderson DP, Waluga J (eds) Fish disease diagnosis and prevention methods. Olsztyn, Poland, pp.105-112.
35. Torfi Moazenzadeh, M., Yaghoubi, M., Yavari, V., Agh, N., Marammazi, J.G. and Popovic, N.T., 2015. Reference intervals for haematological and plasma