مجله علمی شیلات ایران ۳۱(۵) ۱-۱۲ (DOI): 10.22092/ISFJ.2023.128303

CC BY

مقاله علمی - پژوهشی:

اثرات مخلوط‌های پروبیوتیک در جیره غذایی بر عملکرد رشد، شاخص‌های خونی، ایمنی و ظرفیت آنتی اکسیدانی ماهی باس دریایی آسیایی جوان (*Lates calcarifer*)

منصور طرفی موزان‌زاده*[۱]، تکاور محمدیان[۲]، مینا آهنگر زاده[۱]، حسین هوشمند[۱]، ابوالفضل سپهداری[۳]، مجتبی ذبایح نجف آبادی[۱]، عبدالرحیم اصولی[۱]، حمید سقاوی[۱]، جواد منعم[۱]، شاپور مهرجویان[۱]، محمود حافظیه[۳]، مریم میربخش[۳]، الهام اسروش[۲]، مصیب سیدی[۲]

*Mansour.torfi@gmail.com

۱- پژوهشکده آبزی پروری آبهای جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران

۲-گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳-مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: مهر ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۱

چکیده

در مطالعه حاضر اثرات مخلوط پروبیوتیک‌های مختلف بر عملکرد رشد، خون‌شناسی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ماهیان بأس دریایی آسیایی (*Lates calcarifer*) (۳۰ گرم) انجام شد. در این تحقیق از سه مخلوط باکتریایی جداسازی شده از گونه‌های آبزیان بومی خوزستان و جنوب کشور استفاده شد که شامل: گروه اول شامل سویه‌های مختلف لاکتوباسیلوس پلانتاروم، گروه دوم شامل *L. plantarum* با مخلوط *L. bulgaricus*. *L. acidophilus* و *L. rahamnosus* و گروه سوم شامل مخلوط باکتری‌های گروه اول و دوم به همراه مخلوط *B. cereus* و *B. thuringiensis* می‌باشند که از طریق کواروم سنسینگ[۱] در برابر باکتری *Vibrio harvei* شناسایی و از ماهی باس آسیایی جدا شدند. چهار تیمار با اسپری مخلوط باکتریایی مختلف شامل جیره پایه (جیره ۱؛ گروه شاهد) که فقط روی آن سرم فیزیولوژی استریل اسپری شده بود، جیره (۲) که روی آن مخلوط باکتری‌های گروه اول اسپری شد، جیره (۳) که مخلوط باکتری‌های گروه دوم روی آن اسپری شد و جیره (۴) که مخلوط همه باکتری‌ها روی آن اسپری شد، ساخته شدند. ماهی‌ها با جیره‌های آزمایشی چهار بار در روز تا سیر شدن در دمای ۳۰/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰۰ روز تغذیه شدند. در این مطالعه، ماهی‌هایی که با جیره‌های ۲، ۳ و ۴ تغذیه شدند، عملکرد رشد بیشتری نسبت به شاهد داشتند که با بهبود ضریب تبدیل غذایی همراه بود (p <۰/۰۵). شاخص‌های خونی و آنتی اکسیدانی در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی مخلوط پروبیوتیک‌ها بهبود یافت. تیمار ۴ پروتئین تام پلاسما و آلبومین بیشتری نسبت به سایر تیمارها داشت. در مجموع، استفاده از مخلوطی از پروبیوتیک‌های مختلف باعث افزایش رشد در ماهی بأس دریایی آسیایی شد که با بهبود شاخص‌های سلامتی در این گونه همراه بود.

لغات کلیدی: پروبیوتیک، ماهیان دریایی، ضریب تبدیل غذایی، هموگلوبین، سوپر اکسید دیسموتاز

*نویسنده مسئول

[1] Quorum sensing

مقدمه

ماهی بأس دریایی آسیایی (*Lates calcarifer*) یک گونه دریایی با رشد سریع و مقاوم به شوری با توانایی سازگار شدن به پرورش در استخرهای خاکی و قفس‌های دریایی تحت شرایط محیط‌های دریایی، لب شور و آب شیرین است (Mozanzadeh *et al.*, 2021). با این وجود، ماهیان پرورشی در استخرهای خاکی به‌خصوص در قفس‌های دریایی به دلایل مختلف از قبیل سوء مدیریت در تغذیه، مدیریت بهداشتی دچار بیماری‌های مختلف به‌خصوص بیماری‌های باکتریایی از قبیل ویبریوزیس و استرپتوکوکوزیس می‌گردند (اژدهاکش پور و همکاران، ۱۳۹۷، اژدری و همکاران، ۱۳۹۷). به‌کارگیری آنتی‌بیوتیک‌ها به منظور افزایش رشد و بهبود ضریب تبدیل غذایی و همچنین به عنوان یک اقدام پیش‌گیرانه یا درمان بیماری‌های ماهی بحث‌برانگیز بوده است. زیرا گزارش‌های متعددی از بروز مقاومت ضد میکروبی و خطر انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیک به انسان وجود دارد. آنتی‌بیوتیک‌ها موجب مهار و از بین بردن فلور میکروبی طبیعی و مفید و اثرات طولانی‌مدت و غیر قابل پیش‌بینی بر سلامت عموم می‌شوند (Gasser *et al.*, 2019). یکی از مهم‌ترین روش‌های ارتقاء سلامت، افزایش رشد و کنترل بیماری و عوامل بیماری‌زا در صنعت آبزی‌پروری استفاده از پروبیوتیک‌هاست. پروبیوتیک‌ها می‌توانند برخلاف آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان ابزاری جایگزین در آبزی‌پروری پایدار به‌کار برده شوند. پروبیوتیک‌ها علاوه بر ایمنی‌زایی سبب بهبود رشد و کارایی تغذیه نیز می‌شوند (Hoseinifar *et al.*, 2017). مکانیسم‌های متعددی در توضیح اثرات مفید پروبیوتیک‌ها وجود دارد که از جمله آنها اثرات آنتاگونیستی در مقابل عوامل بیماری‌زا که شامل رقابت برای جایگاه‌های اتصالی، رقابت غذایی، ترشح آنزیم‌های مختلف کمک به هضم مواد غذایی، تولید ترکیبات ضد میکروبی (باکتریوسین و سیدروفور) و تحریک پاسخ‌های ایمنی میزبان می‌باشد (Simon *et al.*, 2021). اخیراً مطالعات پیشنهاد نموده‌اند که پروبیوتیک‌های مستخرج از لوله‌ی گوارش میزبان، مقاومت بیشتری نسبت به تغییرات اسیدیته در لوله گوارش در مقایسه با پروبیوتیک‌های تجاری دارند (Hoseinifar *et al.*, 2018, Van Doan *et al.*, 2018). علاوه‌براین، گونه‌های پروبیوتیک مهارکننده کروم سنسینگ[1] دارای توان پروبیوتیک می‌توانند به عنوان سویه‌های جدید کنترل زیستی در آبزی‌پروری محسوب شوند. سیستم کواروم سنسینگ مکانیسمی است که به باکتری‌ها اجازه می‌دهد که به عنوان موجودات چندسلولی عمل کنند. فنوتیپ‌های باکتریایی مسبب بیماری‌زایی باکتری از جمله حدت، ساخت باکتریوسین‌ها و متابولیت‌های ثانویه، آسیل‌هموسرین‌لاکتون‌ها، تشکیل بیوفیلم، انتقال پلاسمید، بیولومینسانس و حرکت تحت کنترل سیستم حد نصاب است (Zhou *et al.*, 2016). برخی از باکتری‌ها دارای توانایی استفاده از مولکول‌های آسیل‌هموسرین‌لاکتون‌ها به عنوان منبع کربن و نیتروژن هستند و می‌توانند به عنوان مهارکننده عملکردهای تنظیمی سیستم درک حد نصاب در باکتری‌های بیماری‌زا به‌کار روند (Tinh *et al.*, 2008). با توجه به اهمیت استفاده از پروبیوتیک‌ها در جیره آبزیان، در این تحقیق، اثر باکتری‌های پروبیوتیک نظیر لاکتوباسیلوس پلانتاروم و باسیلوس‌های دارای خاصیت ضد درک حد نصاب جیره بر بقاء، عملکرد رشد، شاخص‌های خونی، ایمنی و آنتی‌اکسیدانی در ماهی بأس دریایی آسیایی بررسی شده است.

مواد و روش کار

پرورش ماهی

این مطالعه در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) انجام شد. تأمین بچه ماهی بأس دریایی آسیایی، از یک کارگاه تکثیر در چؤیبده آبادان بود. بدین‌منظور، تعداد ۲۴۰ عدد از بچه ماهیان تکثیر شده در چؤیبده آبادان با وزن اولیه حدود ۳۰ گرم تهیه و به ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) منتقل و در تانک‌های ۵ تنی فایبرگلاس ذخیره‌سازی شدند. پس از دو هفته، مرحله آداپتاسیون و تغذیه با جیره

[1] Quorum quenching

غذایی تجاری، ماهیان به تانک‌های ۳۰۰ لیتری به تعداد ۲۰ قطعه در هر تانک منتقل شدند و بر اساس بیومس و استراتژی تغذیه مد نظر با جیره‌های غذایی طراحی شده مورد تغذیه قرار گرفت. سیستم پرورش دارای آب جاری دریا با شوری ۴۸ گرم بر لیتر، دما ۳۰/۵ درجه سانتی گراد، pH معادل ۸/۲ و اکسیژن محلول ۶-۵ میلی‌گرم بر لیتر بود. تعویض روزانه آب در تانک‌ها معادل ۱۰۰٪ بود.

تهیه باکتری‌های باسیلوس با توان پروبیوتیک

باکتری‌های با توان پروبیوتیک مورد استفاده در این تحقیق، شامل *L. plantarum* (جدایه‌های مختلف)، *L. acidophilus*، *L. rahamnosus*، *L. bulgaricus*(جداشده از ماهی شیربت و تعیین هویت شده به روش مولکولی) و باکتری‌های *باسیلوس* گونه‌های *Bacillus cereus* و *B. thuringiensis* بود که در مطالعات پیشین، محمدیان و همکاران (۱۳۹۳) و Ghanei-Motlagh و همکاران (۲۰۲۰)، از ماهی بأس دریایی آسیایی جداسازی کرده بود. این پروبیوتیک‌ها، دارای خاصیت مهارکنندگی ویژگی ضد درک حد نصاب در برابر باکتری *Vibrio harvei* بودند.

تهیه جیره غذایی حاوی باکتری‌های پروبیوتیک انتخابی

به منظور ارزیابی اثر پروبیوتیک‌های انتخاب شده بر رشد ماهی بأس دریایی آسیایی، باکتری‌های *Bacillus* و *Lactobacillus* منتخب به غذای ماهیان افزوده شدند. از جیره‌های غذایی مخصوص پرورش بأس دریایی آسیایی تهیه شده از شرکت ۲۱ بیضا (شیراز) دارای ۴۸ درصد پروتئین و درصد چربی با قطر های ۴-۲ میلی‌متر استفاده شد. در این مطالعه، از سه مخلوط باکتریایی که از آبزیان بومی منطقه خوزستان و جنوب کشور جداسازی شدند، استفاده شد که شامل: گروه اول سویه‌های مختلف باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، گروه دوم شامل باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به همراه مخلوط *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و گروه سوم شامل مخلوط باکتری‌های گروه اول و دوم به همراه مخلوط *باسیلوس‌های* *Bacillus cereus* و *B. thuringiensis* که از طریق ویژگی ضد درک حد نصاب شناسایی و از ماهی بأس دریایی آسیایی پرورش یافته در آب شیرین، لب شور و شور جداسازی شده بودند. با استفاده از ۳ گروه پروبیوتیک ۴ تیمار طراحی شد که شامل جیره (۱) گروه شاهد که فقط سرم فیزیولوژی استریل روی جیره غذایی اسپری شد، جیره (۲) که روی آن مخلوط باکتری‌های گروه اول (سویه‌های مختلف لاکتوباسیلوس پلانتاروم) اسپری شد، جیره (۳) که روی آن مخلوط باکتری‌های گروه دوم اسپری شد و جیره (۴) که روی آن مخلوط باکتری‌های گروه سوم اسپری و به صورت مداوم به ماهیان برای تغذیه داده شد. ماهیان در چهار وعده در ساعات ۸، ۱۱، ۱۴ و ۱۷ تا حد سیری به مدت ۱۰۰ روز تغذیه شدند. به طور خلاصه هر یک از باکتری‌های باسیلوس *Bacillus cereus* و *B. thuringiensis*، با تلقیح سویه مورد نظر به محیط مایع لوریا-برتانی به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ و جداسازی، باکتری‌ها دو بار با بافر فسفات نمکی استریل شستشو شدند و با استفاده از لوله‌های مک‌فارلند غلظت مناسب آنها تنظیم شد (Mohammadian *et al.*, 2018). جهت آماده‌سازی سویه‌های مختلف باکتری‌های لاکتوباسیلوسی و افزودن آنها به غذای ماهیان، از روش توصیه شده Planas و همکاران (۲۰۰۴) و Vine و همکاران (۲۰۰۴) استفاده گردید. به طور خلاصه، هر باکتری به طور جداگانه در محیط آبگوشت ام آر اس آگار در شرایط بی‌هوازی کشت داده شد. پس از رشد، باکتری‌ها با سانتریفوژ جداسازی و شستشو شدند و به کمک لوله‌های استاندارد مک‌فارلند غلظت‌های مناسب آنها (واحد تشکیل کولونی در میلی‌لیتر) $۳/۳۳\times۱۰^{۷}$ از هر کدام از باکتری‌ها) تنظیم شد. سپس غلظت تعیین شده هر کدام از باکتری‌ها به هر گرم غذای تیمارها اسپری گردید. متفاوت از روش قبلی جهت اطمینان از تعداد باکتری‌های زنده موجود در غذا، نمونه‌برداری و شمارش باکتریایی از

غذای آماده شده جهت استفاده انجام شد (Chu *et al.*, 2010).

جمع‌آوری نمونه‌ها

قبل از نمونه‌برداری ماهیان به مدت ۲۴ ساعت غذادهی نشدند. ماهیان براساس شاخص‌های وزن تر (با دقت ۰/۱ گرم) و طول کل (با دقت ۰/۱ سانتی‌متر) زیست‌سنجی شدند و اطلاعات ثبت گردید. در مرحله بعد عملیات خون‌گیری انجام شد و بعد از آسان‌کشی با ۲-فنوکسی اتانول (۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) ماهیان تشریح، وزن امعاء و احشا، و کبد به طور جداگانه وزن گردید.

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد

شاخص‌های رشد تیمارهای آزمایشی در انتهای دوره، بر اساس رابطه‌های ذیل اندازه‌گیری شدند:

افزایش وزن روزانه (گرم): تعداد روزهای دوره / (میانگین وزن اولیه بدن (گرم) – میانگین وزن نهایی بدن (گرم))

^{۳} طول کل بدن/ ۱۰۰ × وزن = ضریب چاقی

افزایش وزن مطلق= وزن اولیه بدن (گرم) /۱۰۰ × (وزن اولیه بدن (گرم) – وزن نهایی بدن (گرم))

نرخ رشد ویژه= (ln وزن نهایی بدن (گرم) - lnوزن اولیه بدن (گرم) × ۱۰۰ /طول دوره پرورش (روز)

ضریب تبدیل غذایی=میزان افزایش وزن بدن (گرم) / (میزان غذای داده شده (گرم))

ضریب کارایی پروتئین = مقدار پروتئین جیره غذایی خورده شده (گرم) / میزان افزایش وزن بدن (گرم)

بررسی خون‌شناسی و ایمنی

جهت سنجش شاخص‌های خون‌شناسی و سنجش ترکیبات بیوشیمیایی خون، نمونه‌های خونی و پلاسما به آزمایشگاه کلینیکال پاتولوژی پژوهشکده آبزی‌پروری آبهای جنوب کشور منتقل گردید. به منظور آنالیز پارامترهای خون‌شناسی در انتهای آزمایش از هر تکرار ۲ قطعه ماهی برداشته شده و با استفاده از سرنگ هپارینه نمونه خونی از سیاهرگ ساقه دمی استحصال شد (Mozanzadeh *et al.*, 2021). لام‌های مربوط به گسترش خونی در محل انجام آزمایش تهیه و پس از تثبیت گسترش‌های خونی با متانول، لام‌ها برای رنگ‌آمیزی با رنگ گیمسا آماده شدند. شاخص‌های خونی نظیر تعداد گلبول‌های قرمز و سفید، میزان هموگلوبین و درصد هماتوکریت بر اساس روش‌های استاندارد انجام شد (Blaxhal and Daisely, 1973). اندیس‌های خونی نیز بر اساس فرمول‌های استاندارد محاسبه شد (Dacie and Lewis, 2001). برای اندازه‌گیری میزان فعالیت لیزوزیم پلاسما از روش کدورت‌سنجی استفاده شد. ابتدا ۱۵ میکرولیتر سرم با ۱۳۵ میکرولیتر از سوسپانسیون ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باکتری *میکروکوکوس لیزودیکتیکوس* (سیگما) در بافر ۰/۰۲ مولار سدیم سیترات (pH= ۵/۸) در گوده‌های میکروپلیت تخت مخلوط شد و جذب نوری آن در دمای اتاق در زمان‌های صفر و ۶ دقیقه بعد از مخلوط‌سازی در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت لیزوزیم سرم با توجه به منحنی استاندارد مربوط به لیزوزیم سفیده تخم مرغ سیگما تعیین گردید (Ellis, 1990). برای بررسی فعالیت کمپلمان ۵۰ میکرولیتر از پلاسما فعال و غیرفعال شده زمان‌های مختلف در میکروتیوب استریل به صورت جداگانه ریخته شده و سپس ۳۵۰ میکرولیتر از ترکیب PBS حاوی $Ca^{+۲}$ و $Mg^{+۲}$ در هر میکروتیوب ریخته شد و در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از گلبول قرمز ٪ ۵ شسته شده خرگوش به هر میکروتیوب اضافه و میکروتیوب‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در ادامه میکروتیوب‌ها سانتریفیوژ و ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی هر میکروتیوب جمع‌آوری و در پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد به‌طوری‌که در یک ستون پلاسما فعال یک زمان خاص و در ستون کناری آن پلاسما غیرفعال همان زمان در گوده‌ها ریخته شود. این عمل برای تمامی سرم‌ها و تمامی زمان‌ها انجام گرفت و در نهایت در طول موج

۴۵۰ نانومتر جذب نوری قرائت شد (Leiro *et al.*, 2004).

پروتئین تام و آلبومین پلاسما با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری و سپس میزان ایمونوگلوبولین تام سرم از تفریق میزان آلبومین از پروتئین تام پلاسما محاسبه شد. برای ارزیابی احیاء NBT مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از خون هپارینه در داخل گوده‌های میکروپلیت تخت قرار داده شد و ۰/۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۲ درصد NBTبه آن اضافه می‌شود. پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه، انکوبه و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از مخلوط حاصل برداشته شده و به یک لوله آزمایش حاوی ۲ میلی‌لیتر دی‌متیل‌فرم‌آمید اضافه شد. پس از سانتریفوژ، جذب نوری مایع رویی در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Secombes, 1990).

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی

ابتدا جهت همگن کردن، ۱ گرم از نمونه‌های بافت کبد از هر تکرار به‌وسیله ترازو وزن و در یک فالکن به آن بافر فسفات ۲۰ میلی‌مولار و EDTA ۱ میلی‌مولار (۱ به ۱۰) اضافه گردید. سپس با دستگاه هموژنایزر، عمل همگن‌سازی در مجاورت یخ انجام شد. جهت جداسازی فاز مایع از باقی‌مانده‌ها از سانتریفوژ با دور ۷۴۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. بعد از عمل سانتریفوژ، مایع رویی به‌وسیله سمپلر جدا و تا زمان سنجش در دمای۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای بررسی میزان فعالیت کاتالاز ۱۰ میکرولیتر از محلول حاصل از سانتریفیوژ در کووت دستگاه اسپکتروفوتومتر حاوی ۹۸۰ میکرولیترمحلول ۵۰ میلی مولار بافر فسفات (PH = ۷) ریخته شد. سپس میزان ۱۰ میکرولیتر محلول H_2O_2 آماده شده اضافه گردید. میزان تجزیه (کاهش جذب) پراکسید هیدروژن بلافاصله پس از افزودن و پس از گذشت ۳۰ ثانیه با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت (Aebi, 1974).

فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز براساس روش رنگ‌سنجی پیشنهادی Kono (۱۹۷۸)، مبتنی بر مهار رادیکال‌های سوپراکسید تولیدی طی فرایند اتواکسیداسیون هیدروکسیل آمین هیدروکلراید و احیاء نیتروبلوتترازولیوم (NBT) و نیز تشکیل کمپلکس آبی-بنفش زنگ فورمازان اندازه‌گیری شد. سنجش میزان گلوتاتیون احیاء (گاما گلوتامیل سیستئینیل گلایسین) (GSH) یا گلوتاتیون تام، به عنوان ترکیب آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی به روش Ellman (۱۹۵۹) در طول موج ۴۱۲ نانومتر انجام گرفت.

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های به‌دست آمده در طول آزمایش ابتدا در نرم افزار اکسل وارد شدند. داده‌ها ابتدا از نظر پراکنش نرمال و همگن بودن واریانس‌ها با آزمون‌های شاپیرو- ویلک[1] و لون[2] بررسی شدند. بر این اساس، کلیه داده‌ها از پراکنش نرمال و واریانس همگن برخوردار بودند. سپس مقایسه میانگین بین تیمارها از طریق آزمون تحلیل واریانس یک طرفه انجام شد. برای مقایسه میانگین پارامترهای اندازه‌گیری شده بین تیمارهای مختلف از آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد استفاده شد. معنی‌داری در سطح ۵ درصد بررسی و داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شدند.

نتایج

در پایان ۱۰۰ روز تغذیه با جیره‌های غذایی مختلف، بازماندگی ماهیان بالاتر از ۹۵ درصد بوده و تحت تأثیر تیمارهای غذایی قرار نگرفت (جدول ۱). در این مطالعه ماهیانی که به طور پیوسته با جیره‌های ۲، ۳ و ۴ تغذیه شدند دارای رشد بیشتری نسبت به شاهد بودند (p ۰/۰۵ >) که با بهبود ضریب تبدیل غذایی همراه بود. ماهیان تغذیه شده با جیره شاهد دارای بالاترین میزان ضریب چاقی نسبت به سایر تیمار ها بودند که به دلیل طول کل بدن کمتر در این تیمار نسبت به سایر تیمارها بود.

1 - Shapiro-Wilk
2 - Levene

جدول ۱: شاخص‌های رشد و تغذیه ماهی بأس دریایی آسیایی تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی بعد از ۱۰۰ روز. نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شدند (n=۳ تانک)

Table 1: Growth and feed efficiency parameters in Asian sea bass fed with the experimental diets after100 days. Results are reported as mean ± standard error (n = 3 tanks)

تیمار های غذایی	۱	۲	۳	۴
وزن ابتدایی (گرم)	۳۰/۱ ± ۰/۱	۳۰ ± ۰/۰	۳۰/۱ ± ۰/۲	۳۰/۳ ± ۰/۱
وزن انتهایی (گرم)	۱۹۲/۹ ± ۷/۳^{b}	۲۲۷ ± ۸/۷^{a}	۲۳۶/۷ ± ۱۰/۶^{a}	۲۳۰/۵ ± ۹/۴^{a}
طول انتهایی (سانتی متر)	۲۲/۷ ± ۰/۴^{b}	۲۴/۴ ± ۰/۳^{a}	۲۴/۵ ± ۰/۴^{a}	۲۴/۴ ± ۰/۳^{a}
افزایش وزن (٪)	۵۴۳/۱ ± ۲۴/۲^{b}	۶۵۶/۶ ± ۲۸/۹^{a}	۶۸۸/۹ ± ۳۵/۵^{a}	۶۶۸/۳± ۳۱/۴^{a}
نرخ رشد ویژه (درصد در روز)	۱/۸ ± ۰/۰^{b}	۲ ± ۰/۰^{a}	۲ ± ۰/۰^{a}	۲ ± ۰/۰^{a}
ضریب چاقی (٪)	۱/۷ ± ۰/۰ ^{a}	۱/۵ ± ۰/۰ ^{b}	۱/۶ ± ۰/۰ ^{ab}	۱/۵ ± ۰/۰ ^{b}
ضریب تبدیل غذایی	۱/۵ ± ۰/۱^{b}	۱/۱ ± ۰/۰^{a}	۱/۲ ± ۰/۱^{a}	۱/۲ ± ۰/۰^{a}
بازماندگی (٪)	۹۶/۵ ± ۱/۶	۹۷/۳ ± ۰/۷	۹۶/۸ ± ۰/۹	۱۰۰ ± ۰/۰

نتایج مطالعات خون‌شناسی نشان داد، تعداد گلبول‌های قرمز و سفید در ماهیانی که با جیره شماره ۲ تغذیه می‌شدند، بیشتر از سایر تیمار ها بود. میزان هموگلوبین، هماتوکریت و اندیس‌های خونی در ماهیان تغذیه شده با مخلوط های پروبیوتیک بیشتر از ماهیان شاهد بود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ماهیان تغذیه شده با جیره ۴ حاوی مخلوط تمام پروبیوتیک‌ها سبب کاهش میزان لیزوزیم پلاسما در ماهی بأس دریایی آسیایی شده‌اند (جدول ۲). فعالیت همولیتیک پلاسما، انفجار تنفسی گلبول‌های سفید و گلوبولین پلاسما تحت تأثیر تیمار های مختلف قرار نگرفتند. تیمار ۴ دارای پروتئین کل پلاسما و آلبومین بیشتری نسبت سایر تیمارها بود (جدول ۲).

جدول ۲: شاخص های خونی و ایمنی مایعی در بأس دریایی آسیایی تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی بعد از ۱۰۰ روز. نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شدند (n = ۳ تانک)

Table 2: Blood and immune parameters in Asian sea bass fed with the experimental diets after100 days. Results are reported as mean ± standard error (n = 3 tanks)

تیمار های غذایی	۱	۲	۳	۴
گلبول قرمز ($\times 10^{6}$)	۱/۶ ± ۰/۱^{b}	۲/۱ ± ۰/۱^{a}	۱/۶ ± ۰/۰ ^{b}	۱/۵ ± ۰/۱ ^{b}
گلبول سفید ($\times 10^{3}$)	۱/۵ ± ۰/۵^{b}	۳/۸ ± ۰/۴^{a}	۱/۲ ± ۰/۴^{b}	۰/۷ ± ۰/۲^{c}
هموگلوبین (گرم بر دسی لیتر)	۵/۱ ± ۰/۱^{b}	۱۳/۸ ± ۰/۲^{a}	۱۵/۲ ± ۱/۴^{a}	۱۳/۲ ± ۱/۳^{a}
هماتوکریت (٪)	۱۹/۰ ± ۳/۵^{b}	۲۸/۳ ± ۳/۳^{a}	۲۹/۳ ± ۲/۳^{a}	۳۰/۰ ± ۲/۶^{a}
حجم گلبول قرمز (نانومتر)	۱۲۰/۴ ± ۲۵/۷^{c}	۱۳۹/۱ ± ۱۹/۷^{b}	۱۷۸/۵ ± ۱۱۸/۸^{ab}	۲۰۰/۰ ± ۲۱/۳^{a}
هموگلوبین در سلول (پیکوگرم بر سلول)	۳۱/۸ ± ۳/۳^{c}	۶۷/۳ ± ۲/۱^{b}	۹۲/۴ ± ۷/۰^{a}	۸۷/۹ ± ۸/۶^{a}
میانگین غلظت هموگلوبین در سلول (گرم در دسی لیتر)	۰/۳ ± ۰/۱^{c}	۰/۵ ± ۰/۱^{a}	۰/۵ ± ۰/۰^{a}	۰/۴ ± ۰/۰^{b}
لیزوزیم (واحد بر میلی لیتر)	۵۹۷/۲ ± ۱۴۵/۴^{a}	۵۲۱/۷ ± ۲۹/۴^{a}	۴۵۵/۱ ± ۴۰/۰^{b}	۴۷۷/۳ ± ۲۲/۲^{b}
کمپلمان (واحد بر میلی لیتر)	۰/۷ ± ۰/۰	۰/۸ ± ۰/۱	۰/۹ ± ۰/۱	۰/۶ ± ۰/۱
انفجار تنفسی ماکروفاژها (۵۴۰ نانومتر)	۰/۴۸ ± ۰/۰	۰/۵۶ ± ۰/۰	۰/۵۱ ± ۰/۰	۰/۵۵ ± ۰/۰
پروتئین (گرم بر دسی لیتر)	۳/۴ ± ۰/۱^{b}	۳/۶ ± ۰/۲^{b}	۳/۴ ± ۰/۱^{b}	۳/۷ ± ۰/۱^{a}
آلبومین (گرم بر دسی لیتر)	۰/۷ ± ۰/۱^{b}	۰/۷ ± ۰/۰^{b}	۰/۷ ± ۰/۰^{b}	۰/۹ ± ۰/۱^{a}
گلوبولین (گرم بر دسی لیتر)	۲/۷ ± ۰/۱	۲/۹ ± ۰/۲	۲/۷ ± ۰/۲	۲/۸ ± ۰/۱

فعالیت آنزیم کاتالاز در کبد ماهیان تیمار ۳ بیشتر از سایر تیمارها بود و کمترین فعالیت مربوط به ماهیان تیمار شاهد بود. بیشترین فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در کبد مربوط به ماهیان تیمارهای ۲ و ۳ بود و کمترین فعالیت این آنزیم مربوط به تیمار شماره ۴ بود. ماهیان تیمار ۳ دارای بیشترین مقدار گلوتاتیون در کبد نسبت به سایر تیمارها بودند. میزان فعالیت کاتالاز سرم در تیمار ۳ کمتر از سایر تیمارها بود. کمترین فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز سرم مربوط به ماهیان تیمار ۴ بود. میزان گلوتاتیون سرم در تیمار ۳ بیش از تیمار ۴ بود و سایر تیمار ها مقادیر حد واسط را نشان دادند (جدول ۳).

جدول ۳: فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی (واحد در میلی گرم پروتئین) و مقدار گلوتاتیون (میلی مول بر میلی لیتر) در کبد ماهی بأس دریایی آسیایی تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی بعد از ۱۰۰ روز. نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شدند (n = ۳ تانک)

Table 3 Antioxidant enzymes activity (U / mg protein) and glutathione level (mmol/mL) in liver of Asian sea bass fed with the experimental diets after100 days. Results are reported as mean ± standard error (n = 3 tanks)

شاخص های آنتی اکسیدانی			
کبد			
جیره های غذایی	**کاتالاز**	**سوپراکسید دیسموتاز**	**گلوتاتیون**
۱	۲۱/۳ ± ۲/۵^{c}	۸۷/۳ ± ۱/۶^{b}	۰/۰۶۲ ± ۰/۰۱^{ab}
۲	۱۶/۱ ± ۷/۱^{cd}	۹۵/۶ ± ۳/۰^{a}	۰/۰۶۷ ± ۰/۰۱^{ab}
۳	۴۱/۹ ± ۱۲/۲^{a}	۹۲/۶ ± ۱/۵^{a}	۰/۰۹۱ ± ۰/۰۲^{a}
۴	۲۹/۳ ± ۲/۶^{b}	۷۷/۸ ± ۱/۸^{c}	۰/۰۳۲ ± ۰/۰۱^{b}
سرم			
۱	۲/۷ ± ۰/۰^{a}	۱۵۳/۹ ± ۳/۶^{a}	۴/۴ ± ۰/۸^{ab}
۲	۲/۷ ± ۰/۱ ^{a}	۱۵۷/۲ ± ۲/۸^{a}	۴/۹ ± ۱/۰^{ab}
۳	۱/۸ ± ۰/۲^{b}	۱۳۲/۲ ± ۵/۵^{b}	۷/۱ ± ۰/۹^{a}
۴	۲/۴ ± ۰/۲^{a}	۱۱۳/۹ ± ۳/۰^{c}	۲/۰ ± ۰/۲^{b}

بحث

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که پروبیوتیک‌ها با کاهش عدد ضریب تبدیل غذایی یا از طریق افزایش درصد بازماندگی می‌توانند منجر به افزایش میزان رشد و تولید در آبزی‌پروری شوند (Kesselring *et al.*, 2019; Tachibana *et al.*, 2020). در مطالعه حاضر، ماهیانی تغذیه شده با جیره‌های حاوی مخلوط پروبیوتیک‌ها، دارای رشد بیشتری نسبت به گروه شاهد بودند که این افزایش رشد با بهبود ضریب تبدیل غذایی همراه بود. به نظر می‌رسد، پروبیوتیک‌ها از طریق افزایش هضم مواد غذایی و بهبود جذب مواد مغذی منجر به بهبود رشد می‌شوند. مطالعات نشان داده‌اند، پروبیوتیک‌هایی نظیر لاکتوباسیلوس‌ها با تولید باکتریوسین‌ها و آنزیم‌ها منجر به تسهیل هضم مواد غذایی در روده می‌شوند و با کاهش pH روده، جذب مواد معدنی را نیز افزایش می‌دهند (Hoseinifar *et al.*, 2017, 2018; Van Doan *et al.*, 2018). از سوی دیگر، پروبیوتیک‌ها با بهبود شرایط سلامت بافت روده از طریق ممانعت از غالب شدن باکتری‌های بیماری زا از طریق رقابت برای مواد مغذی یا ترشح مواد ممانعت‌کننده از تکثیر آنها یا مکانیسم ضد درک حد نصاب سبب افزایش هضم و جذب مواد مغذی در روده می‌شوند (Ghanei-Motlagh *et al.*, 2019; 2020). از مهم‌ترین اثرات مثبت پروبیوتیک‌ها بر بهبود ضریب تبدیل غذایی می‌توان به تبدیل مواد غذایی با قابلیت هضم کم به اشکالی که راحت‌تر هضم شوند، اشاره نمود که این فرآیند از طریق آنزیم‌های هضمی میکروبی

نظیر سلولازها، فیتازها، لیپازها، پروتئازها، آمیلازها و تریپسین امکان‌پذیر است (Wuertz *et al.*, 2021). از سوی دیگر، پروبیوتیک‌ها سبب تحریک ترشح آنزیم‌های گوارشی در میزبان نیز می‌شوند که این فرآیند به افزایش هضم و جذب مواد مغذی کمک خواهد کرد (Kong *et al.*, 2021). همچنین افزودن پروبیوتیک‌ها در جیره، ارزش غذایی آن را از طریق متابولیت‌های میکروبی نظیر کوفاکتورها، ویتامین‌ها و اسیدهای چرب ضروری افزایش خواهد داد.

در مطالعه حاضر، شاخص‌های خونی ماهیان تغذیه شده با انواع مخلوط پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد به طور چشمگیری بهبود یافت به‌طوری‌که این پروبیوتیک‌ها تعداد گلبول‌های قرمز و سفید و میزان هموگلوبین و هماوکریت را در تیمارهای ۲ الی ۴ افزایش دادند. این مسئله می‌تواند به نقش مؤثر پروبیوتیک‌ها در هضم و جذب مواد مغذی به‌خصوص ویتامین‌ها و مواد معدنی که به عنوان کوانزیم و کوفاکتور در پروسه خون‌سازی ارتباط داشته باشد. همچنین استفاده از مخلوط پروبیوتیک *L. acidophilus* و *Saccharomyces boulardi* سبب افزایش میزان هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول‌های قرمز در ماهی خاویاری سیبری (*Acipenser baerii*) می‌شود (Mocanu *et al.*, 2022). در مطالعه دیگری، استفاده از مخلوط پروبیوتیک *B. licheniformis* و *B. subtilis* در جیره غذایی ماهی بأس دریایی آسیایی منجر به افزایش میزان هموگلوبین، گلبول‌های سفید و قرمز شد (Adorian *et al.*, 2019).

مطالعات نشان داده‌اند که پروبیوتیک‌ها با سنتز متابولیت هایی نظیر اسیدهای چرب کوتاه زنجیره همانند بوتیریک، پروپیونیک و فرمیک اسید می‌توانند سیستم ایمنی ماهی را از طریق اتصال به گیرنده‌های سطح سلول‌های ایمنی نظیر مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها مثل گیرنده پروتئینی G تحریک کنند و منجر به پاسخ‌های ایمنی نظیر آپوپتوز، سنتز موسین‌ها و تقسیم سلولی در سلول‌های روده شوند (Liu *et al.*, 2014; Montalban-Arques *et al.*, 2015). در مطالعه حاضر، تن‌ها شاخص پروتئین کل پلاسما در تیمارهای مختلف تغذیه شده با پروبیوتیک‌ها نسبت به کنترل افزایش یافت و سایر شاخص‌ها افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نداشتند. افزایش میزان پروتئین پلاسما نشان‌دهنده تحریک سیستم ایمنی ماهیان در این مطالعه می‌باشد که با نتایج تحقیقات Mohapatra و همکاران (۲۰۱۴) در ماهی روهو (*Labeo rohita*) تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیک *Bacillus subtilis, Lactococcus lactis* و *Saccharomyces cerevisiae*مشابه است. همچنین استفاده از مخلوط پروبیوتیک باکتری‌های کشته شده *L. delbrüeckii lctis* و*B. subtilis* سبب افزایش پاسخ‌های ایمنی نظیر کمپلمان، پراکسیداز، ایمونوگلوبولین M و فعالیت بیگانه خواری در ماهی سیم سر طلایی (*Sparus aurata*) نسبت به ماهیان تغذیه شده با هر کدام از باکتری‌ها به صورت انفرادی شد (Salinas *et al.*, 2008).

ظرفیت دفاع آنتی اکسیدانی بدن رابطه مستقیمی با سلامت آن دارد. مطالعات نشان داده‌اند، استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌تواند سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در ماهیان شوند. برای مثال، Dawood و همکاران (۲۰۲۰) گزارش نمودند، افزودن پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در جیره غذایی ماهی تیلاپیای نیل منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز شده است. همچنین Wang و همکاران (۲۰۲۱) گزارش نمودند، استفاده از پروبیوتیک *Lactobacillus casei K17* در جیره غذایی باس دهان بزرگ (*Micropterus salmoides*) سبب افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در سرم و کبد و کاهش میزان پراکسیداسیون چربی در کبد شده است. در تحقیق حاضر، استفاده از مخلوط پروبیوتیک شامل باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به همراه مخلوط *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (تیمار ۳) منجر به افزایش فعالیت آنزیمی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در سرم و نیز افزایش میزان گلوتاتیون در کبد و سرم گردید که این

نتایج می‌تواند یکی از عوامل رشد بهتر ماهیان در این تیمار نسبت به کنترل باشد.

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از مخلوط پروبیوتیک‌های مختلف از طریق بهبود کارایی جیره غذایی منجر به افزایش رشد بیشتر ماهیان می‌گردد. از سوی دیگر، استفاده از پروبیوتیک‌ها منجر به افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن ماهی و افزایش خون‌سازی شد که این موارد در مجموع نشان‌دهنده نقش مؤثر پروبیوتیک‌ها در ارتقاء سلامت در ماهی باس دریایی آسیایی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله حاضر از زحمات آقایان مقدسی‌زاده و پژند برای زحمات فراوان در طول دوره نگهداری ماهیان تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

اژدری، ا.، پیغان، ر.، قربانپور، م.، آهنگرزاده، م.، میربخش، م ۱۳۹۷. جدا سازی و شناسایی مولکولی ویبریو هاروی از ماهی باس دریایی آسیایی پرورشی در مزارع استانهای جنوبی کشور ایران. مجله علمی شیلات ایران، ۵: ۶۱-۷۰.

اژدهاکش پور، ا.، پیغان، ر.، آهنگر زاده، م.، و محسنی نژاد، ل ۱۳۹۷. بررسی نقش باکتری ویبریو هاروی در بروز بیماری ویبریوزیس ماهی بأس دریایی آسیایی (*Lates calcarifer*). دوفصل نامه ماهیان دریایی، ۳: ۲۷-۳۳.

محمدیان، ت.، قربانپور، م.، علیشاهی، م.، تابنده، م.، و غریبی، د. ۱۳۹۳. جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی لاکتوباسیل‌های با توان پروبیوتیکی از روده ماهی شیربت. دامپزشکی ایران. ۱۰(۲): ۹۷-۸۸.

Adorian, T.J., Jamali, H., Farsani, H.G., Darvishi, P., Hasanpour, S., Bagheri, T. and Roozbehfar, R., 2019. Effects of probiotic Bacteria Bacillus on growth performance, digestive enzyme activity, and hematological parameters of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11: 248–255. DOI: 10.1007/s12602-018-9393-z

Aebi, H., 1974. Catalase. In: Bergmeyer, H.V. (Ed.), Methods in Enzymatic Analysis. Vol. 2. Academic Press Inc, New York, NY, pp. 674–684.

Blaxhall, P.C. and Daisley, K.W., 1973. Routine hematological methods for use fish with blood. *Journal of Fish Biology*, 5, 771–781.

Chu, W., Zhou, S., Zhu, W. and Zhuang, X., 2014. Quorum quenching bacteria Bacillus sp. QSI-1 protect zebrafish (*Danio rerio*) from *Aeromonas hydrophila* infection. *Scientific Reports*, 4: 5446. DOI: 10.1038/srep05446

Dacie, J.V. and Lewis, S.M., 2001. Practical Hematology. 9th ed. Churchill Livingstone, London, pp. 663.

Dawood, M.A.O., Moustafa, E.M., Elbialy, Z.I., Farrag, F., Lolo, E.E.E., Abdel-Daim, H.A., Abdel-Daim, M.M. and Van Doan, H., 2020. *Lactobacillus plantarum* L-137 and/or beta-glucan impacted the histopathological, antioxidant, immune-related genes and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Aeromonas hydrophila*. *Research in Veterinary Science*, 130: 212–221. DOI: 10.1016/j.rvsc.2020.03.019.

Ellis, A.E., 1990. Serum antiproteases in fish and lysozyme assays. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S. and Van Muiswinkel, W.B. (Eds.), Techniques in Fish Immunology. SOS Publications, Fair Haven, NJ, pp. 95–103.

Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82: 70-77. DOI:10.1016/0003-9861(59)90090-6.

Gasser, M. Zingg, W. Cassini, A. and Kronenberg, A., 2019. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in Switzerland. *The Lancet Infectious Diseases*, 19: 17–18. DOI:10.1016/S1473-3099(18)30708-4

Ghanei-Motlagh, R., Mohammadian, T., Gharibi, D., Menanteau-Ledouble, S., Mahmoudi, E., Khosravi, M., Zarea, M. and El-Matbouli, M., 2019. Quorum Quenching Properties and Probiotic Potentials of Intestinal Associated Bacteria in Asian Sea Bass *Lates calcarifer*. *Marine Drugs*, 18: 23. DOI:10.3390/md18010023

Ghanei-Motlagh, R., Mohammadian, T., Gharibi, D., Khosravi, M., Mahmoudi, E., Zarea, M., El-Matbouli, M. and Menanteau-Ledouble, S., 2020. Quorum quenching probiotics modulated digestive enzymes activity, growth performance, gut microflora, haemato-biochemical parameters and resistance against *Vibrio harveyi* in Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Aquaculture*, 531: 735874. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.735874.

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

Hoseinifar SH, Sun Y, Wang A, and Zhou Z., 2018. Probiotics as means of diseases control in aquaculture, A Review of current knowledge and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 9: 2429. DOI: 10.1111/are.13368.

Kesselring, J.C., Gruber, C., Standen, B. and Wein, S., 2019. Continuous and pulse-feeding application of multispecies probiotic bacteria in whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of World Aquaculture Society*, 50: 1123-1132. DOI: 10.1111/jwas.12640.

Kong, Y., Li, M., Chu, G., Liu, H., Shan, X., Wang, G. and Han, G., 2021. The positive effects of single or conjoint administration of lactic acid bacteria on *Channa argus*: Digestive enzyme activity, antioxidant capacity, intestinal microbiota and morphology. *Aquaculture*, 531: 735852. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.735852.

Kono, Y., 1978. Generation of superoxide radical during oxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase. *Archive in Biochemistry and Biophysics*, 186: 189–195.

Leiro, J., Arranz, J.A., Iglesias, R., Ubeira, F.M. and SanMartın, M.L., 2004. Effects of the histiophagous ciliate *Philasterides dicentrarchi* on turbot phagocyte responses.

Fish and Shellfish Immunology, 17: 27-39. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02429.

Liu, W., Yang, Y., Zhang, J., Gatlin, D.M., Ringø, E. and Zhou, Z., 2014. Effects of dietary microencapsulated sodium butyrate on growth, intestinal mucosal morphology, immune response and adhesive bacteria in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) pre-fed with or without oxidised oil. *British Journal of Nutrition*, 112: 15–29. DOI: 10.1017/S0007114514000610.

Mocanu, E.E., Savin, V., Popa, M.D., Dima, F.M. 2022. The effect of probiotics on growth performance, haematological and biochemical profiles in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt, 1869). Fishes 7, 239. DOI:10.3390/fishes7050239.

Mohammadian, T., Alishahi, M., Tabandeh, M.R., Ghorbanpoor, M. and Gharibi, D., 2018. Changes in immunity, expression of some immune-related genes of Shabot fish, *Tor grypus*, following experimental infection with *Aeromonas hydrophila*: Effects of autochthonous probiotics. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10: 616–628. DOI:10.1007/s12602-017-9373-8.

Mohapatra, S., Chakraborty, T., Prusty, A.K., PaniPrasad, K., and Mohanta, K.N., 2014. Beneficial effects of dietary probiotics mixture on hemato-immunology and cell apoptosis of *Labeo rohita* fingerlings reared at higher water temperatures, Plos One, DOI: 10.1371/journal.pone.0100929.

Montalban-Arques, A., De Schryver, P., Bossier, P., Gorkiewicz, G., Mulero, V., Gatlin, D.M.I. and Galindo-Villegas, J., 2015. Selective manipulation of the gut microbiota improves immune status in vertebrates. *Frontiers in Immunology*, 6: 512. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00512.

Mozanzadeh, M.T., Safari, O., Oosooli, R., Mehrjooyan, S., Najafabadi, M.Z., Hoseini, S.J., Saghavi, H. and Monem, J., 2021. The effect of salinity on growth performance, digestive and antioxidant enzymes, humoral immunity and stress indices in two euryhaline fish species: yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) and Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Aquaculture*, 534: 736329. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.736329.

Planas, M., Vazquez, J.A., Marques, J., Peres-Lomba, R., Gonzalez, M. P. and Murado M., 2004. Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. *Aquaculture*, 240: 313-329. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2004.07.016.

Salinas, I., Abelli, L., Bertoni, F., Picchietti, S., Roque, A., Furones, D., Cuesta, A., Meseguer, J. and Esteban, M.A., 2008. Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 25: 114–23. DOI: 10.1016/j.fsi.2008.03.011

Secombes, C.J., 1990. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing

activity. *Tech Fish Immunology,* 1: 137–154.

Simon, R., Docando, F., Nuñez-Ortiz, N., Tafalla, C. and D´ıaz-Rosales, P., 2021. Mechanisms Used by Probiotics to Confer Pathogen Resistance to Teleost Fish. *Frontiers in Immunology,* 12: 653025. DOI: 10.3389/fimmu.2021.653025.

Tachibana, L., SilveiraTelli, G., de Carla Dias, D., SampaioGonçalves, G., MassatoshiIshikawa, C., BertoncelloCavalcante, R., Miyoko Natori, M., BenHamed, S. and Ranzani-Paiva, M.J.T., 2020. Effect of feeding strategy of probiotic *Enterococcus faecium* on growth performance, hematologic, biochemical parameters and non-specific immune response of Nile tilapia. *Aquaculture Reports,* 16: 100277. DOI: 10.1016/j.aqrep.2020.100277.

Tinh, N.T.N., Yen, V.H.N., Dierckens, K., Sorgeloos, P. and Bossier, P., 2008. An acyl homoserine lactone-degrading microbial community improves the survival of first-feeding turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.), *Aquaculture,* 285: 56-62. DOI:10.1016/j.aquaculture.2008.08.018.

Van Doan, H., Hoseinifar, S.H., Khanongnuch, C., Kanpiengjai, A., Unban, K. and Srichaiyo 2018. Host-associated probiotics boosted mucosal and serum immunity, disease resistance and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture,* 491: 94-100. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.03.019.

Vine, N. G., Leukes, W.D., Kaiser, H., Daya, S., Baxter, J. and Hecht, T., 2004. Competition for attachment of aquaculrue candidate probiotic and pathogenic bacaetia on fish interstinal mucus. *Journal of Fish Disease* 27: 319-326. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2004.00542.x.

Wang, J., Zhu, Z., Tian, S., Fu, H., Leng, X. and Chen, L., 2021. Dietary Lactobacillus casei K17 Improves Lipid Metabolism, Antioxidant Response, and Fillet Quality of *Micropterus salmoides*. *Animals,* 11: 2564. DOI:10.3390/ani11092564.

Wuertz, S., Schroeder, A. and Wanka, K.M., 2021. Probiotics in Fish Nutrition—Long-Standing Household Remedy or Native Nutraceuticals? *Water,* 13: 1348. DOI:10.3390/w13101348.

Zhou, S., Zhang, A., Yin, H. and Chu, W., 2016. *Bacillus* sp. QSI-1 modulate quorum sensing signals reduce *Aeromonas hydrophila* level and alter gut microbial community structure in fish. *Frontiers in Cell Infection and Microbiology,* 6: 184. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00184.

Effects of probiotic mixtures in the diet on growth performance, hematological indices, immunity and antioxidant capacity of Asian sea bass (*Lates calcarifer*) juveniles

Torfi Mozanzadeh M.[1*]; Mohammadian T.[2]; Ahangarzadeh M.[1]; Hoshmand H.[1]; Sepahdari A.[3]; Zabayeh Najafabadi M.[1]; Oosooli A.[1]; Saghavi H.[1]; Mehrjooyan Sh.[1]; Hafezieh M.[3], Mirbakhsh M.[3]; Osroush E.[2]; Seyedi M.[2]

[*]Mansour.torfi@gmail.com

1-South Iran Aquaculture Research Centre, Iranian Fisheries Science Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ahwaz, Iran.
2-Dpartment of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
3-Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Tehran, Iran.

Abstract

In the present study, the effects of different probiotics mixtures on growth performance, hematology and antioxidant capacity of Asian seabass (*Lates calcarifer*) juveniles (30 g). In this study, three bacterial mixtures were used that were isolated from the native aquatic species of Khuzestan and the South of the country, which include: the first group includes different strains of *Lactobacillus plantarum*, the second group includes *L. plantarum* with a mixture of *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* and *L. rahamnosus* and the third group includes the mixture of bacteria of the first and second groups along with the mixture of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis*, which were identified through their quorum quenching features and isolated from Asian sea bass. Four treatments were designed by spraying various bacterial mixture on a basal diet, which included diet (1, control group) on which only sterile physiological serum was sprayed on the diet, diet (2) on which the bacterial mixture of the first group was sprayed on the diet, diet (3) on which the mixture of bacteria of the second group was sprayed and diet (4) which was the mixture of all bacteria was sprayed on it and fed to the fish. The fish was fed with the experimental diets four times a day up to satiation at 30.5 °C for 100 days. In this study, the fish that was fed with 2, 3 and 4 diets had a higher growth performance than the control ($p < 0.05$), which was associated with an improvement in the food conversion ratio. Blood and antioxidant indices were improved in the fish fed with diets containing probiotics mixture. Treatment 4 had more total plasma protein and albumin than other treatments. In conclusion, the use of a mixture of different probiotics increased growth in Asian seabass that associated with improved health indices in this species.

Keywords: Probiotic, Marine fish, Food conversion ratio, hemoglobin, superoxide dismutase

Corresponding author