مقاله علمی – پژوهشی:

اثرات به‌کارگیری منفرد و توأم باکتری *Lactobacillus casei* و پروپیونات سدیم بر شاخص‌های رشد و ایمنی ماهی زبرا (*Danio rerio*)

احسان اکبرنژاد[۱]، سکینه یگانه*[۱]، صدیقه محمدزاده[۲]

*skyeganeh@gmail.com, s.yeganeh@sanru.ac.ir

۱-گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران، صندوق پستی: ۵۷۸

۲- دانشکده دامپزشکی دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین، آمل، ایران

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۳ تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۳

چکیده

در مطالعه حاضر اثرات به‌کارگیری منفرد و توأم باکتری *Lactobacillus casei* و پروپیونات سدیم به عنوان افزودنی بر شاخص‌های رشد و ایمنی ماهی زبرا (*Danio rerio*) مورد بررسی قرار گرفته است. بدین منظور، تعداد۱۲۰ قطعه ماهی زبرا با میانگین اولیه وزنی ۰/۲۳±۰/۳۳۵ گرم در ۱۲ تانک با تعداد ۱۰ ماهی در هر تانک توزیع شدند. چهار جیره آزمایشی شامل: تیمار اول یا شاهد، جیره پایه (صفر درصد افزودنی، تیمار ۱)، تیمار دوم با باکتری *L. casei* (10^6 CFU ×۵، تیمار ۲)، تیمار سوم با ۱ درصد پروپیونات سدیم (تیمار ۳) و تیمار چهارم با باکتری *L. casei* به همراه ۱ درصد پروپیونات سدیم (تیمار ۴) به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. نتایج نشان داد که تاثیر جیره‌های آزمایشی بر میزان وزن نهایی، افزایش وزن، نرخ رشد ویژه و میزان بازماندگی معنادار بود به‌طوری‌که ماهیان تغذیه شده با باکتری *L. casei* و پروپیونات سدیم (تیمارهای ۲، ۳ و ۴) وزن نهایی بالاتری نسبت به گروه شاهد داشتند ($p<0/05$). اختلاف معناداری در میزان سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در بین تیمارها وجود داشت و تیمار ۴ دارای بیشترین فعالیت بود ($p<0/05$). اختلاف معناداری بین تیمارها در پروتئین کل سرم، ایمنوگلوبولین، لیزوزیم و کمپلمان ACH50 مشاهده شد به‌طوری‌که بالاترین میزان در تیمارهای تغذیه شده با *L. casei* و پروپیونات سدیم (تیمارهای ۲، ۳ و ۴) مشاهده شد ($p < 0/05$). نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از مکمل‌های پروبیوتیک باکتری *L. casei* و پروپیونات سدیم به صورت همزمان (تیمار چهارم) در جیره غذایی ماهی زبرا می‌تواند بر رشد و سلامت آن تاثیرات مثبتی داشته باشد.

لغات کلیدی: *Lactobacillus casei*، پروپیونات سدیم، ماهی زبرا، ایمنی، آنزیم، شاخص بیوشیمیایی

*نویسنده مسئول

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

مقدمه

هدف آبزی‌پروری صنعتی به عنوان یک صنعت در حال رشد با سرعت بالا، تأمین پروتئین برای جمعیت جهانی در حال افزایش است (Kuuebutornye *et al*., 2020). ماهی و محصولات شیلاتی منابع پروتئین‌ها و ریز مغذی‌های مهمی بوده که برای سلامت انسان ضروری هستند. با این‌حال، ظهور بیماری‌ها یک عقب‌گردی برای صنعت آبزی پروری بوده است. بیماری‌ها اجزاء طبیعی محیط هستند و بسیاری از آنها پیامدهای اقتصادی برای صنعت آبزی‌پروری و شیلات دارند (Plant and LaPatra, 2011; Kuuebutornye *et al*., 2020). رویدادهای مرگ‌ومیر گسترده با یک یا چند عامل بیماری‌زا همراه بوده و تلاش‌های زیادی برای کاهش وقوع بیماری‌های ماهی انجام شده است. این تلاش‌ها در ابتدا شامل استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها بود (Kuuebutornye *et al*., 2020). استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها، ظهور سویه‌های بیماری‌زا مقاوم، منجر به محدودیت یا ممنوعیت استفاده از آنها شد (Safari *et al*., 2016). محدودیت و ممنونیت استفاده از تجویز آنتی‌بیوتیک در آبزی‌پروری، سبب توسعه استفاده از افزودنی‌های دوستدار محیط‌زیست به عنوان محرک‌های ایمنی شده است (Hoseinifar *et al*., 2017).

طیف گسترده‌ای از افزودنی‌ها و توانایی آنها در بهبود هضم و استفاده از خوراک در زمینه تغذیه ماهی در حال بررسی هستند. اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه (SCFAs)/ اسیدهای آلی (C1-C7) یا نمک‌های مربوطه آنها که معمولاً به عنوان اسیدی‌کننده شناخته می‌شوند، جایگزین‌های بالقوه‌ای برای محرک‌های رشد آنتی‌بیوتیک در آبزیان هستند که توجه روزافزونی را به‌خود جلب می‌کنند (Wassef *et al*., 2020). اسیدهای آلی ترکیبات حاوی آلدئید با وزن مولکولی کم با یک یا چند گروه کربوکسیل هستند (Jones, 1998). اسیدی فایرها نوعی مکمل غذایی هستند که با کاهش pH خوراک و مهار رشد میکروبی به عنوان عوامل حفظ‌کننده در روده حیوان عمل می‌کنند (Lückstädt, 2008). این اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه وضعیت فیزیولوژیک میزبان را به سه طریق تعدیل می‌کنند: ۱) تأثیر خوراکی‌هایی که تجویز می‌شوند، ۲) تأثیر در دستگاه گوارش حیوان و ۳) تأثیر مستقیم بر متابولیسم (Freitag *et al*., 2007). در جانوران آبزی، غالب‌ترین اسیدهای چرب با زنجیره مستقیم شامل اسید استیک (C2)، اسید پروپیونیک (C3) و اسید بوتیریک (C4) است (Tran *et al*., 2020). سدیم و پتاسیم پروپیونات نمک‌های اسید پروپیونیک هستند که در سال‌های گذشته به عنوان مکمل غذایی مفید مورد توجه قرار گرفته اند (Hoseinifar *et al*., 2017). اثرات مثبت پروپیونات سدیم بر رشد و ایمنی باس دریایی اروپایی (*Dicentrarchus labrax*)، (Wassef *et al*., 2020)، ایمنی موکوسی و دفاع انتی اکسیدانی زبرافیش (*Danio rerio*)، (Safari *et al*., 2016)، عملکرد و ایمنی غیر اختصاصی ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii*) (Hoseinifar *et al*., 2016) و عملکرد رشد و ایمنی فیل ماهی (*Huso huso*) (Ahmadifar *et al*., 2022)، ثابت شد.

پروبیوتیک‌ها مکمل‌های خوراک میکروبی زنده هستند که به طور مفید تعادل میکروبی روده میزبان را حفظ می‌کنند (Merrifield *et al*., 2010). توانایی پروبیوتیک‌ها در بهبود سلامت آبزی‌پروری به ظرفیت آنها در تحریک پاسخ ایمنی و مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا مربوط می‌شود (Dawood *et al*., 2019; Ahmadifar *et al*., 2020). *L. casei* یکی از پروبیوتیک‌های تجاری بوده که به صورت گسترده در تحقیقات آبزی‌پروری استفاده شده و اثرات مفید ان در رشد و سلامت ابزیان در مطالعات مختلف ثابت شده است (Safari *et al*., 2022; Siddik *et al*., 2022).

مزایای جیره حاوی حاوی اسیدهای آلی یا پروبیوتیک‌ها در گونه‌های مختلف ماهی شناخته شده است. Habibnia و همکاران (۲۰۲۴) به مطالعه بررسی اثر *Pedicuccus pentosaceus* و فرولیک اسید در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پرداختند و استفاده همزمان از این ترکیبات باعث بهبود عملکرد رشد و ایمنی شده است. اثر ترکیبی آنها تقریباً ناشناخته است. برای کشف فعل و انفعالات بین پروبیوتیک‌ها و اسیدفایرها در دستگاه روده ماهی، به دانش بیشتری نیاز خواهد بود. بنابراین، مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثرات منفرد و توأم *L. casei* و پروپیونات سدیم بر رشد، آنزیم‌های گوارشی،

ایمنی و آنتی‌اکسیدان ماهی زبرا به عنوان مدل بیولوژیک انجام شد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی جیره‌ها

پروبیوتیک *L. casei* از شرکت Takjen (ایران) و پروپیونات سدیم از شرکت Sigma (آمریکا) تهیه شدند. برای تهیه تیمارها، ابتدا جیره غذایی پایه بیومار با آب مقطر مخلوط شد و بعد از تبدیل شدن به صورت خمیر، مکمل‌های مد نظر به آن اضافه شدند. سپس با استفاده از چرخ گوشت صنعتی خوراک به صورت رشته تبدیل گردید. با بررسی منابع صورت گرفته سطوح افزودنی‌ها تعیین شد و چهار تیمار با سطوح شاهد با جیره پایه (بدون افزودنی)، تیمار دوم با ۵×۱۰^{۶} CFU باکتری *L. casei* (Mohammadian *et al.*, 2020)، تیمارسوم با یک درصد پروپیونات سدیم (Ding *et al.*, 2024) و تیمار چهارم با با ۵×۱۰^{۶} CFU باکتری *L. casei* به همراه ۱ درصد پروپیونات سدیم آماده شدند. پلت‌های غذایی با ژلاتین دو درصد پوشش داده شده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و سپس بسته بندی،کدگذاری و تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تغذیه و پرورش ماهیان

تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی زبرا دو ماهه با میانگین وزنی وزنی ۰/۳۳۵±۰/۲۳ گرم از مرکز تکثیر ماهیان زینتی خریداری شده و به آزمایشگاه آبزی‌پروری دانشکده علوم دامی و شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری منتقل شدند. سپس در تانک‌های ۱۰۰ لیتری با حجم آبگیری ۴۰ لیتر با تراکم ۱۰ قطعه ماهی در هر تانک ذخیره و به مدت دو هفته به شرایط آزمایش سازگار شدند. خواص فیزیکی و شیمیایی آب شامل دما، اکسیژن محلول و pH تعیین شد. بعد از این مدت، ماهی‌ها به صورت کاملاً تصادفی در چهار تیمار غذایی تقسیم شدند. در مطالعه حاضر، طول دوره پرورش ۵۶ روز بود و ماهی‌ها طی روز سه مرتبه به مقدار ۱۰ درصد وزن بدن غذادهی شدند.. شاخص‌های فیزیکوشیمیایی مانند درجه‌حرارت ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد، pH ۰/۲±۷ و اکسیژن ۰/۸±۸/۳ میلی‌گرم بر لیتر به‌ترتیب با استفاده از دماسنج (دماسنج جیوه‌ای)، pH متر و اکسیژن‌متر با دستگاه مالتی (Multi-parameter Analyzer, WTW, Germany) اندازه‌گیری شد. هوادهی آب از طریق سنگ هوا متصل به کمپرسور مرکزی انجام شد. میزان غذای باقیمانده بعد از خروج و خشک شدن وزن می‌گردید و برای جلوگیری از آلودگی و خارج کردن غذای باقی‌مانده و فضولات، روزانه یک الی دو بار (صبح و عصر) آب مخازن سیفون می‌شد. در صورت مشاهده تلفات، بلافاصله ماهی‌های تلف‌شده خارج شده و تعداد تلفات و شماره مخازن ثبت گردید.

اندازه‌گیری شاخص های رشد

در ابتدا و در پایان دوره، ماهیان با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۱ گرم، و عملکرد رشد با استفاده از رابطه‌های ذیل محاسبه شد (Ahmadifar *et al.*, 2019):

افزایش وزن (گرم)= وزن نهایی (گرم)- وزن اولیه (گرم)

نرخ رشد ویژه= [لگاریتم طبیعی وزن نهایی- لگاریتم طبیعی وزن اولیه /طول دوره (۵۶ روز)] × ۱۰۰

ضریب تبدیل غذایی = غذای دریافتی (گرم)/ وزن به‌دست آمده (گرم)

نمونه‌برداری

در پایان آزمایش غذادهی به مدت ۲۴ ساعت قطع و هشت قطعه از ماهیان در هر تانک با استفاده از روغن میخک دوز ۵۰ میکرولیتر بر لیتر بیهوش شدند و بعد از جدا کردن سر و دم در ازت مایع منجمد شده و با هموژنایزر دستی همگن شده و سپس در بافر Tris-HCl ۲۵ میلی‌مولار (pH ۷/۲) جهت اندازه‌گیری شاخص‌های ایمنی آماده شدند (Ahmadifar *et al.*, 2019).

سنجش شاخص‌های ایمنی، آنتی‌اکسیدان و بیوشیمیایی بافت

فعالیت لیزوزیم در هموژن کل بدن بر اساس مطالعه قبلی تعیین شد (Sheikhzadeh *et al*., 2012). سوسپانسیون باکتری *Micrococcus luteus* در بافر فسفات سیترات (۷۵ میکرولیتر) با موکوس یا هموژنات کل بدن (۲۵ میکرولیتر) مخلوط شد و جذب به طور مداوم در ۴۵۰ نانومتر برای ۵ دقیقه ثبت شد. سطح آنتی‌بادی کل در هموژنات کل بدن بر اساس مطالعه قبلی تعیین شد. برای محاسبه سطح آنتی‌بادی در هموژن‌ها، محتوای پروتئین کل در هموژنات کل بدن قبل و بعد از رسوب مولکول‌های آنتی‌بادی با پلی‌اتیلن گلیکول (۱۲ درصد) ارزیابی شد. فعالیت ACH50 در هموژنات ماهی بر اساس مطالعه قبلی تعیین شد. گلبول‌های قرمز خرگوش شسته شده در بافر ژلاتین ورونال به ۲×۱۰۸ سلول در میلی‌لیتر تنظیم شد. سوسپانسیون سلولی خرگوش (۱۰۰ میکرولیتر) با مخاط ماهی (۲۵۰ میکرولیتر) مخلوط شد و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه با تکان دادن مداوم انکوبه شد. پس از افزودن NaCl (۰/۸۵٪) و سانتریفیوژ (۱۶۰۰ گرم) به مدت ۱۰ دقیقه، جذب در ۴۱۴ نانومتر ثبت شد. فعالیت کاتالاز بر اساس مطالعه قبلی تعیین شد (Goth, 1991). بافر واکنش (۱ میلی‌لیتر) متشکل از پراکسید هیدروژن (۶۵ میلی‌مولار در لیتر) و بافر سدیم- پتاسیم فسفات (۶۰ میلی‌مولار در لیتر) با مخاط ماهی (۰/۰۵ میلی‌لیتر) به مدت ۱ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مخلوط شد. پس از خاتمه واکنش آنزیمی با ۱ میلی لیتر آمونیوم مولیبدات (۳۲/۴ میلی مولار در لیتر)، جذب در ۴۰۵ نانومتر ثبت شد.فعالیت سوپراکسید دیسموتاز بر اساس مطالعه قبلی تعیین شد (Nishikimi *et al*., 1992). بافر واکنش شامل ۲/۶ میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۰۱۷ میلی‌مولار)، ۰/۱ میلی‌لیتر فنازین متوسولفات و ۰/۱ میلی‌لیتر نیترو بلو تترازولیوم مخلوط با مخاط ماهی (۰/۰۵ میلی‌لیتر) بود. پس از افزودن ۰/۱ میلی لیتر NADH (۲/۳۴ میلی‌مولار)، جذب در ۵۶۰ نانومتر به مدت ۳/۵ دقیقه ثبت شد. فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز ابتدا بافر واکنش (۰/۸۸ میلی‌لیتر) شامل GSH (۱ میلی‌مولار)، NADPH (۱۵۰ میلی‌مولار)، و آزید سدیم (۱۰۰ میلی‌مولار) در بافر فسفات پتاسیم با مخاط ماهی (۲۰ میکرولیتر) مخلوط شد. جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه ثبت شد.

روش تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

برای بررسی آماری داده‌ها، ابتدا نرمال بودن آنها با آزمون Kolmogrov-Smirnov ارزیابی شده و همگنی واریانس‌ها با آزمون Levene مورد بررسی قرار گرفت. با برقراری شرایط مذکور، برای تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها از آنالیز واریانس یکطرفه (One way ANOVA) استفاده شد و اختلاف میانگین‌ها به‌وسیله آزمون چند دامنه‌ای توکی در سطح معنی‌داری $p<0/05$ بررسی شد. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با نرم افزار SPSS (version 20.0) انجام گرفته و نمودارها در اکسل ۲۰۱۳ رسم گردید. داده‌ها در متن به صورت میانگین±خطای استاندارد گزارش شدند.

نتایج

عملکرد رشد

نتایج مربوط به عملکرد رشد در جدول ۱ ارائه شده است. تاثیر جیره‌های آزمایشی بر میزان وزن نهایی و افزایش وزن معنی‌دار بود به‌طوری‌که ماهیان تغذیه شده با باکتری *L. casei* و پروپیونات سدیم وزن بالاتری نسبت به گروه شاهد داشتند ($p < 0/05$). نرخ رشد ویژه تحت تاثیر جیره‌های آزمایشی قرار گرفت و کمترین نرخ رشد در گروه شاهد مشاهده شد و بالاترین نرخ رشد در تیمارهای تغذیه شده با پروپیونات سدیم و باکتری *L. casei* به‌دست آمد که با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($p<0/05$).

شاخص‌های بیوشیمیایی

نتایج حاصل از بررسی شاخص‌های بیوشیمیایی در جدول ۲ ارائه شده است. اختلاف معناداری بین تیمارها در میزان تری‌گلیسرید،کلسترول و گلوکز بین تیمارها مشاهده نشد ($p>0/05$). نتایج بررسی آلبومین سرم نشان داد که در بین تیمارهای ۱ و ۳ اختلاف معنی‌داری دیده نشد. همچنین بین تیمارهای ۲ و ۴ نیز اختلاف معنی‌دار نبود ($p>0/05$). اما بین تیمارهای ۱ و ۳ با تیمارهای ۲ و ۴ اختلاف معنی‌دار بود

(p<۰/۰۵) و بیشترین میزان در تیمارهای ۲ و ۴ به‌دست آمد. در مورد شاخص گلوبولین گروه شاهد با تیمار ۳ اختلاف معنی‌دار نداشت، اما با دو تیمار دیگر اختلاف معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵).

جدول۱: شاخص‌های رشد ماهی زبرا تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی طی ۸ هفته آزمایش (میانگین ± انحراف معیار)

Table 1: Growth performance in zebrafish fed with experimental diets for 8 weeks (mean ± SD)

Factors/treatments	First treatment	Second treatment	Third treatment	Fourth treatment
Final weight (mg)	387.6 ± 9.4^{c}	432.9 ± 13.4^{b}	450.1 ± 11.2^{b}	458.3 ± 13.1^{a}
Weight gain (mg)	52.4 ± 10.1^{c}	96.9 ± 15.7^{b}	114.6 ± 10.2^{b}	123.9 ± 14.9^{a}
Body weight gain (%)	15.6 ± 3.0^{c}	28.8 ± 4.8^{b}	34.2 ± 2.5^{ab}	37.1 ± 4.7^{a}
Specific growth rate (%/day)	0.1 ± 0.01^{c}	0.18 ± 0.02^{b}	0.21 ± 0.01^{a}	0.22 ± 0.02^{a}
Survival rate (%)	100	100	100	100

تیمار یک (بدون افزودنی)، تیمار دوم با ۰/۱ درصد باکتری *Lactobacillus casei* ($CFU\ 10^{6} \times 5$)، تیمارسوم با ۱ درصد پروپیونات سدیم و تیمار چهارم با ۰/۱ درصد باکتری *Lactobacillus casei* به همراه ۱ درصد پروپیونات سدیم. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌هاست (میانگین ± انحراف استاندارد).

The first treatment (without additives), the second treatment with 0.1% *Lactobacillus casei* bacteria ($CFU\ 5 \times 10^{6}$), Third treatment with 1% sodium propionate and the fourth treatment with 0.1% *Lactobacillus casei* bacteria along with 1% sodium propionate. Different letters indicate significant differences between groups (mean ± SD).

جدول ۲: شاخص‌های بیوشیمیایی ماهی زبرا تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی طی ۸ هفته آزمایش (میانگین ± انحرف از معیار)

Table 2: Biochemistry index in in zebrafish fed with experimental diets for 8 weeks (mean ± SD)

Factors/treatments	First treatment	Second treatment	Third treatment	Fourth treatment
Triglyceride (mg/100g tissue)	78.6 ± 1.1^{a}	83.85 ± 3.65^{a}	88.1 ± 5.4^{a}	79.9 ± 1.6^{a}
Glucose (mg/100 g tissue)	156.8 ± 11.2^{a}	181.5 ± 8.8^{a}	166.5 ± 11.5^{a}	174.5 ± 4.5^{a}
Cholesterol (mg/ 100 g tissue)	23.8 ± 0.3^{a}	24.8 ± 0.4^{a}	25.6 ± 0.7^{a}	24.85 ± 2.35^{a}
Albumin (mg/ 100 g tissue)	13.59 ± 0.65^{b}	17.20 ± 0.3^{a}	14.6 ± 0.1^{b}	17.05 ± 0.25^{a}
Globulin (mg/ 100 g tissue)	58 ± 0.4^{c}	64.35 ± 0.65^{a}	58.55 ± 0.25^{c}	60.9 ± 0.2^{b}

تیمار یک (بدون افزودنی)، تیمار دوم با ۰/۱ درصد باکتری *Lactobacillus casei* ($CFU\ 10^{6} \times 5$)، تیمارسوم با ۱ درصد پروپیونات سدیم و تیمار چهارم با ۰/۱ درصد باکتری *Lactobacillus casei* به همراه ۱ درصد پروپیونات سدیم. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌هاست (میانگین ± انحراف استاندارد).

The first treatment (without additives), the second treatment with 0.1% *Lactobacillus casei* bacteria ($CFU\ 5 \times 10^{6}$), Third treatment with 1% sodium propionate and the fourth treatment with 0.1% *Lactobacillus casei* bacteria along with 1% sodium propionate. Different letters indicate significant differences between groups (mean ± SD).

آنزیم‌های آنتی اکسیدان

نتایج نشان داد که اختلاف معناداری بین تیمارها در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی وجود دارد (جدول ۳) و بالاترین سطح فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در تیمار ۴ به‌دست آمد که اختلاف معناداری با گروه شاهد داشتند (p<۰/۰۵)، اما اختلاف معناداری با تیمار ۳ نشان ندادند (p>۰/۰۵).

شاخص‌های ایمنی

نتایج حاصل از برخی شاخص‌های ایمنی (پروتئین کل، لیزوزیم و ایمنوگلوبولین) در جدول ۴ ارائه شده است. اختلاف معناداری بین تیمارها در پروتئین کل سرم و ایمنوگلوبین مشاهده شد به‌طوری‌که بالاترین میزان در تیمارهای تغذیه شده با *L. casei* و پروپیونات سدیم (تیمارهای ۲، ۳ و ۴) مشاهده شد که اختلاف معناداری با گروه شاهد داشتند (p<۰/۰۵). اختلاف معناداری در

لیزوزیم و کمپلمان بین تیمارها مشاهده شده و بالاترین میزان در تیمارهای ۳ و ۴ مشاهده شد (p<۰/۰۵).

جدول ۳: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ماهی زبرا تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی طی ۸ هفته آزمایش (میانگین ± انحراف از معیار).
Table 3. Antioxidant enzymes in in zebrafish fed with experimental diets for 8 weeks (mean ± SD)

Factors/treatments	First treatment	Second treatment	Third treatment	Fourth treatment
SOD (u/g)	53.5 ± 0.6^{b}	65.6 ± 0.1^{a}	67.0 ± 0.1^{a}	69 ± 7.1^{a}
CAT (u/g)	63.3 ± 0.4^{b}	63.85 ± 0.4^{b}	73.2 ± 3.5^{a}	72.8 ± 0.3^{a}
GPx (u/g)	221.1 ± 2.5^{b}	223.5 ± 1.5^{b}	232 ± 3^{a}	235 ± 0.3^{a}

تیمار یک (بدون افزودنی)، تیمار دوم با ۰/۱ درصد باکتری *Lactobacillus casei* ($CFU\ 10^{6} \times 5$)، تیمارسوم با ۱ درصد پروپیونات سدیم و تیمار چهارم با ۰/۱ درصد باکتری *Lactobacillus casei* به همراه ۱ درصد پروپیونات سدیم. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌هاست (میانگین ± انحراف استاندارد).

The first treatment (without additives), the second treatment with 0.1% *Lactobacillus casei* bacteria ($CFU\ 5 \times 10^{6}$), Third treatment with 1% sodium propionate and the fourth treatment with 0.1% *Lactobacillus casei* bacteria along with 1% sodium propionate. Different letters indicate significant differences between groups (mean ± SD).

جدول ۴: شاخص‌های ایمنی ماهی زبرا تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی طی ۸ هفته آزمایش (میانگین ± انحراف از معیار)
Table 4: immunity index in zebrafish in zebrafish fed with experimental diets for 8 weeks (mean ± SD)

Factors/treatments	First treatment	Second treatment	Third treatment	Fourth treatment
Total protein (mg/100g tissue)	71.95 ± 0.25^{b}	82.55 ± 0.95^{a}	83.15 ± 0.35^{a}	87.95 ± 0.45^{a}
Immunoglobulin (mg/100 g tissue)	1.4 ± 0.01^{b}	1.48 ± 0.01^{a}	1.44 ± 0.15^{a}	1.46 ± 0.15^{a}
Lysozyme (u/g/min)	22.70 ± 1.1^{c}	20.5 ± 3.2^{b}	38.05 ± 1.45^{a}	40.95 ± 0.25^{a}
ACH50 (U%)	86.5 ± 0.5^{b}	84.5 ± 1.5^{b}	89.5 ± 0.5^{b}	105.1 ± 1.5^{a}

تیمار یک (بدون افزودنی)، تیمار دوم با ۰/۱ درصد باکتری *Lactobacillus casei* ($CFU\ 10^{6} \times 5$)، تیمارسوم با ۱ درصد پروپیونات سدیم و تیمار چهارم با ۰/۱ درصد باکتری *Lactobacillus casei* به همراه ۱ درصد پروپیونات سدیم. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌هاست (میانگین ± انحراف استاندارد).

The first treatment (without additives), the second treatment with 0.1% *Lactobacillus casei* bacteria ($CFU\ 5 \times 10^{6}$), Third treatment with 1% sodium propionate and the fourth treatment with 0.1% *Lactobacillus casei* bacteria along with 1% sodium propionate. Different letters indicate significant differences between groups (mean ± SD).

بحث

در صنعت آبزی‌پروری، استفاده از مکمل‌های غذایی به عنوان محرک‌های ایمنی و محرک رشد، پتانسیل افزایش عملکرد رشد و مکانیسم‌های دفاعی ذاتی ماهی را در مبارزه با عوامل بیماری‌زا در زمان استرس دارد (Sharif Rohani, 2013). در مطالعه حاضر، شاخص‌های وزن نهایی، افزایش وزن، درصد افزایش وزن و نرخ رشد ویژه در بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان داد به‌طوری‌که ماهیان تغذیه شده با باکتری *L. casei* و پروپیونات سدیم وزن بالاتری نسبت به گروه شاهد داشتند. به طور مشابه، اسیدها یا نمک‌های آلی کارایی رشد را در ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*)، (Reda *et al*., 2016; Hassan *et al*., 2018, 2020) و قزل‌آلای‌رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، بهبود می‌بخشند (De Wet, 2005). همچنین افزایش رشد در ماهی‌های تغذیه شده با جیره‌های مکمل شده با پروبیوتیک در کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (Mohammadian *et al*., 2020) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (Mohammadi and Tukmechi, 2015) گزارش شد. بهبود رشد از طریق اسیدهای عالی و پروبیوتیک‌ها به چند طریق امکان‌پذیر است که می‌توان به کاهش pH معده که باعث افزایش فعال شدن پپسین، کاهش pH روده که منجر به افزایش انحلال مواد معدنی و متعاقب آن به‌وسیله اسیدهای آلی موجب افزایش جذب (De Wet, 2005; Hassan *et al*., 2018) و بهبود فعالیت

آنزیم‌های گوارشی و کلونیزه کردن روده به‌وسیله پروبیوتیک‌ها می‌شود، اشاره کرد (Dawood *et al*., 2016). شاخص‌های خون تحت تأثیر ترکیب جیره غذایی قرار می‌گیرند و این شاخص‌ها نشان‌دهنده سلامت کلی ماهی هستند. در مطالعه حاضر، میزان آلبومین در ماهیان تغذیه شده با مکمل غذایی پروپیونات سدیم و باکتری *L. casei* بالاتر از گروه شاهد بود. در مطالعه مرشدی و همکاران (؟؟) نتایج حاصل از تجزیه‌وتحلیل شاخص‌های بیوشیمیایی سرم نشان داد که سطوح مختلف پروبیوتیک جیره بر برخی از شاخص‌های اندازه‌گیری شده مثل گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسرید بی‌تاثیر بوده و تنها میزان آلبومین سرم در ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف محرک‌های ایمنی از جمله پروبیوتیک در مقایسه با گروه شاهد بالاتر بود. با این‌حال، با توجه به کمبود اطلاعات و تحقیقات کافی در زمینه اثرات نمک اسیدهای آلی و پروبیوتیک‌ها بر شاخص‌های بیوشیمیایی خون مانند گلوکز، آلبومین، تری‌گلیسرید و ... تحقیقات بیشتری را در آینده می‌طلبد.

پدیده‌ای که به عنوان استرس اکسیداتیو شناخته می‌شود منجر به آزاد شدن گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود و تجمع بیش از حد گونه های فعال اکسیژن در کبد می‌تواند باعث آسیب به اسیدهای نوکلئیک، اکسیداسیون پروتئین و پراکسیداسیون لیپیدی شود (Martínez-Alvarez *et al*., 2005). نتایج نشان داد اختلاف معناداری بین تیمارها در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی وجود دارد و بالاترین سطح فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در تیمار ۴ به‌دست آمد که اختلاف معناداری با گروه شاهد داشتند. همسو با مطالعه حاضر، افزایش قابل‌توجهی در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در سی‌بریم (*Acanthopagrus schlegelii*)، (Sagada *et al*., 2021)، کپور معمولی (Giri *et al*., 2021) و کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idellus*)، (Xu *et al*., 2021) گزارش شد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسیدهای آلی به گروه هیدروکسیل وابسته است که می‌تواند به‌راحتی یک رادیکال فنوکسی تثبیت شده با رزونانس ایجاد کند (Yu *et al*., 2017). علاوه‌براین، اسیدهای آلی می‌توانند از غشاهای بیولوژیک در برابر پراکسیداسیون لیپیدی محافظت کنند و با رادیکال‌های پراکسیل و آلکوکسیل مقابله کنند. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که مکمل پروپیونات سدیم و *L. casei* می‌تواند به طور موثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در ماهی زبرا تحریک کند که منجر به از بین بردن مؤثر رادیکال‌های آزاد اضافی و تنظیم تعادل ROS در بدن می‌شود. در نتیجه، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد. در مطالعه Son و همکاران (۲۰۰۹) و Giannenes و همکاران (۲۰۱۵) نشان داده شده است که مصرف پروبیوتیک‌ها در رژیم غذایی دارای پتانسیل افزایش قابلیت فاگوسیتیزی ماکروفاژهاست، در نتیجه آنها را قادر می‌سازد تا به طور موثر تشکیل بیش از حد ROS را با تنظیم مثبت ژن‌ها و آنزیم‌های مرتبط با آنتی‌اکسیدان مدیریت کنند (Panigrahi *et al*., 2007).

نتایج مطالعه حاضر در شاخص‌های ایمنی نشان داد که ماهیان تغذیه شده با *L. casei* و پروپیونات سدیم وضعیت بهتری نسبت به گروه شاهد داشتن و بالاترین میزان در شاخص‌های ایمنی از جمله لیزوزیم، کمپلمان ACH50، پروتئین کل و ایمنوگلوبولین در تیمار ۴ در ماهیان تغذیه شده با *L. casei* و پروپیونات سدیم مشاهده شد. انواع مختلفی از پروبیوتیک‌ها (Akanmu *et al*., 2016; Hassan *et al*., 2018; Zhang *et al*., 2019; Mohammadian *et al*., 2020) و اسیدهای آلی (Zhang *et al*., 2020;) برای تقویت پاسخ ایمنی ماهی مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده مجزا و توأم *L. casei* و پروپیونات سدیم باعث فعال شدن سلول‌های ایمنی می‌شود و در نتیجه، توانایی ارگانیسم را برای دفاع در برابر عوامل مضر و عوامل استرس زا افزایش می‌دهد. تقویت بالقوه پاسخ ایمنی مرتبط با اسیدی شدن رژیم غذایی یا پروبیوتیک‌ها ممکن است به توانایی آنها در مهار رشد میکروارگانیسم‌های مضر در کل دستگاه گوارش نسبت داده شود. نشان داده شده است که شروع پاسخ ایمنی در روده‌ها، در میان سایر مکان‌ها آغاز می‌شود (Hassan *et al*., 2018). افزایش شاخص‌های ایمنی مشاهده شده در جیره‌های مکمل شده، نشان می‌دهد که استفاده همزمان از این مکمل‌ها باعث افزایش بارزتر پاسخ‌های ایمنی در ماهی

زبرا در مقایسه با تجویز مستقل هر یک از این ترکیبات می‌شود.

با توجه به نتایج به‌دست آمده از این مطالعه می‌توان بیان کرد که استفاده از جیره حاوی *L. casei* و پروپیونات سدیم در ماهی زبرا اثرات مثبت زیادی را به‌دنبال خواهد داشت. به طور کلی، با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر می‌توان از این مکمل‌ها به صورت مجزا و تلفیقی با سطوح پروپیونات سدیم ۱ درصد و *Lactobacillus casei* ۰/۱ درصد (۵×۱۰^{۶} CFU) در آبزی‌پروری لحاظ نمود.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. از همکاران آزمایشگاه تکثیر و پرورش گروه شیلات برای همکاری و فراهم نمودن تسهیلات صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Ahmadifar, E., Sheikhzadeh, N., Roshanaei, K., Dargahi, N. and Faggio, C., 2019. Can dietary ginger (*Zingiber officinale*) alter biochemical and immunological parameters and gene expression related to growth, immunity and antioxidant system in zebrafish (*Danio rerio*)? *Aquaculture*, 507:41-348. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.049.

Ahmadifar, E., Sadegh, T.H., Dawood, M.A., Dadar, M. and Sheikhzadeh, N., 2020. The effects of dietary *Pediococcus pentosaceus* on growth performance, hemato-immunological parameters and digestive enzyme activities of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 516:734656. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734656.

Ahmadifar, E., Eslami, M., Kalhor, N., Zaretabar, A., Mohammadzadeh, S., Moghadam, M.S., Yousefi, M., Ahmadifar, M., Hoseinifar, S.H., Pusadee, T. and van Doan, H., 2022. Effect of a diet enriched with sodium propionate on growth performance, antioxidant property, innate-adaptive immune response, and growth-related genes expression in critically endangered beluga sturgeon (*Huso huso*). *Fish and Shellfish Immunology*, 125:101-108. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.04.031.

Dawood, M.A., Koshio, S., Ishikawa, M., El-Sabagh, M., Esteban. M.A., and Zaineldin, A.I., 2016. Probiotics as an environment-friendly approach to enhance red sea bream, *Pagrus major* growth, immune response and oxidative status. *Fish and Shellfish Immunology*, 57:170-178. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.08.038.

Dawood, M.A., Koshio, S., Abdel-Daim, M.M. and Van Doan, H., 2019. Probiotic application for sustainable aquaculture. Reviews in Aquaculture, 11(3):907-924. https://doi.org/10.1111/raq.12272.

De Wet, D.L., 2005. Can organic acids effectively replace antibiotics growth promoters in diets for rainbow trout *Oncorynchus mykiss* raised under sub optimal water temperature. *World Aquaculture Society*, 3: 6-35.

Ding, Q., Hao, Q., Jin, Y., Zhang, Q., Xie, Y., Yang, Y., Olsen, R.E., Ringø, E., Ran, C., Zhang, Z. and Zhou, Z., 2024. The effects of sodium propionate on intestinal barrier function of genetically improved farmed tilapia in a high-lipid formulation. *Aquaculture*, 579, 740187 P. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740187.

Freitag, M.E., and Lückstädt, C., 2007. Organic acids and salts promote performance and health in animal husbandry. *Acidifiers in Animal Nutrition*, 31(2):131-139.

Giannenas, I., Karamaligas, I., Margaroni, M., Pappas, I., Mayer, E., Encarnação, P. and Karagouni, E., 2015. Effect of dietary incorporation of a multi-strain probiotic on growth performance and health status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 41:119-128. https://doi.org/10.1007/s10695-014-0010-0.

Giri, S.S., Kim, H.J., Kim, S.G., Kim, S.W., Kwon, J., Lee, S.B., Woo, K.J., Jung, W.J., Kim, M.J., Sukumaran, V., and Park, S.C., 2021. Effects of dietary *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. plantarum L7, alone or in combination with *Limosilactobacillus reuteri* P16, on growth, mucosal immune responses, and disease resistance of *Cyprinus carpio*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(6):1747-1758. https://doi.org/10.1007/s12602-021-09820-5.

Goth, L., 1991. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*, 196(2-3),143-151. https://doi.org/10.1016/0009-8981(91)90067-M.

Habibnia, M., Bahrekazemi, M., Bahram, S., Javadian, S.R., Hedayatifard, M. and Abdel-Tawwab, M., 2024. Growth performance, hematological and immune parameters, and mRNA levels of cytokines and antioxidant-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed on *Pediocuccus pentosaceus* and/or ferulic acid. *Animal Feed Science and Technology*, 308, 115872 P. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115872.

Hassan, M.S., Soltan, M.A., Jarmołowicz, S. and Abdo, H.S., 2018. Combined effects of dietary malic acid and *Bacillus subtilis* on growth, gut microbiota and blood parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition*, 24(1):83-93. https://doi.org/10.1111/anu.12536.

Hassan, M.S., Mohammady, E.Y., Adnan, A.M., Abd Elnabi, H.E., Ayman, M.F., Soltan, M.A. and El-Haroun, E.R., 2020. Effect of dietary protease at different levels of malic acid on growth, digestive enzymes and haemato-immunological responses of Nile tilapia, fed fish meal free diets. *Aquaculture*, 522:735124. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735124.

Hoseinifar, S.H., Zoheiri, F. and Caipang, C.M., 2016. Dietary sodium propionate improved performance, mucosal and

humoral immune responses in Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) fry. *Fish and Shellfish Immunology*, 55: 523-528. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.027.

Hoseinifar, S.H., Sun, Y.Z. and Caipang, C.M., 2017. Short-chain fatty acids as feed supplements for sustainable aquaculture: An updated view. *Aquaculture Research*, 48(4):1380-1391. https://doi.org/10.1111/are.13239.

Jones, D.L., 1998. Organic acids in the rhizosphere–a critical review. *Plant and Soil*, 205:25-44. https://doi.org/10.1023/A:1004356007312.

Kuebutornye, F.K., Abarike, E.D., Lu, Y., Hlordzi, V., Sakyi, M.E., Afriyie, G., Wang, Z., Li, Y. and Xie, C.X., 2020. Mechanisms and the role of probiotic Bacillus in mitigating fish pathogens in aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry*, 46:819-841. https://doi.org/10.1007/s10695-019-00754-y.

Lückstädt, C., 2008. The use of acidifiers in fish nutrition. *CABI Reviews*, 8. https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20083044.

Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E. and Sanz, A., 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15:75-88. https://doi.org/10.1007/s11160-005-7846-

Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S.J., Baker, R.T., Bøgwald, J., Castex, M. and Ringø, E., 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302(1-2):1-18. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.007.

Mohammadian, T., Jangaran-Nejad, A., Mesbah, M., Shirali, T., Malekpouri, P. and Tabandeh, M.R., 2020. Effect of *Lactobacillus casei* on innate immunity responses and *Aeromonas hydrophila* resistance in Shabot, *Tor grypus*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12:224-235. https://doi.org/10.1007/s12602-018-9510-z.

Mohammadi, N. and Tukmechi, A., 2015. The effects of iron nanoparticles in combination with *Lactobacillus casei* on growth parameters and probiotic counts in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. *Journal of Veterinary Research*, 70(1): Pe47-Pe53. https://jvr.ut.ac.ir/article_52968_7158.html

Nishikimi, M., Rao, N.A. and Yagi, K., 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46(2):849-854. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(72)80218-3

Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., Hirono, I., Kobayashi, T., Sugita, H., Puangkaew, J. and Aoki, T., 2007. Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Developmental and Comparative Immunology*, 31(4):372-382. https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.07.004.

Plant, K.P. and LaPatra, S.E., 2011. Advances in fish vaccine delivery. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(12):1256-1262. https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.007

Reda, R.M., Mahmoud, R., Selim, K.M. and El-Araby, I.E., 2016. Effects of dietary acidifiers on growth, hematology, immune response and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish and shellfish Immunology*, 50:255-262. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.01.040.

Safari, R., Hoseinifar, S.H., and Kavandi, M., 2016. Modulation of antioxidant defense and immune response in zebra fish (*Danio rerio*) using dietary sodium propionate. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42:1733-1739. https://doi.org/10.1007/s10695-016-0253-z.

Safari, R., Imanpour, M.R., Hoseinifar, S.H., Faheem, M., Dadar, M. and Van Doan, H., 2022. Effects of dietary *Lactobacillus casei* on the immune, growth, antioxidant, and reproductive performances in male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture Reports*, 25, 101176 P. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101176.

Sagada, G., Gray, N., Wang, L., Xu, B., Zheng, L., Zhong, Z., Ullah, S., Tegomo, A.F. and Shao, Q., 2021. Effect of dietary inactivated Lactobacillus plantarum on growth performance, antioxidative capacity, and intestinal integrity of black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) fingerlings. *Aquaculture*, 535:736370. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736370.

Sharif Rohani, M., Masoumzadeh, M., Haghighi, M., Jalilpoor, J., Pourdehghani, M., Shenavar Masouleh, A., Alizadeh, M. and Bazari Moghaddam, S., 2013. Effects of oral administration of *Zataria multiflora* essential oil on some blood and serum parameters in *Acipenser persicus*. *Iranian Journal of Fisheries Science*, 12(4):908-915. http://hdl.handle.net/1834/11658.

Sheikhzadeh, N., Tayefi-Nasrabadi, H., Khani Oushani, A. and Najafi Enferadi, M.H., 2012. Effects of *Haematococcus pluvialis* supplementation on antioxidant system and metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38: 413-419. https://doi.org/10.1007/s10695-011-9519-7

Siddik, M.A., Foysal, M.J., Fotedar, R., Francis, D.S. and Gupta, S.K., 2022. Probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* coupled with *Lactobacillus casei* modulates physiological performance and promotes gut microbiota in juvenile barramundi, *Lates calcarifer*. *Aquaculture*, 546, 737346 P. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737346.

Son, V.M., Chang, C.C., Wu, M.C., Guu, Y.K., Chiu, C.H. and Cheng, W., 2009. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish*

X.F., 2019. Effect of *Bacillus velezensis* on *Aeromonas veronii*-induced intestinal mucosal barrier function damage and inflammation in crucian carp (*Carassius auratus*). *Frontiers in Microbiology*, 10:2663. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02663.

Zhang, L., Zhang, P., Xia, C., Cheng, Y., Guo, X., and Li, Y., 2020. Effects of malic acid and citric acid on growth performance, antioxidant capacity, haematology and immune response of *Carassius auratus gibelio*. *Aquaculture Research*, 51:2766-2776. https://doi.org/10.1111/are.14616.

Immunology, 26(5):691-698. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.02.018.

Tran, N.T., Li, Z., Wang, S., Zheng, H., Aweya, J.J., Wen, X. and Li, S., 2020. Progress and perspectives of short-chain fatty acids in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 12(1): 283-298. https://doi.org/10.1111/raq.12317.

Wassef, E.A., Saleh, N.E., Abdel-Meguid, N.E., Barakat, K.M., Abdel-Mohsen, H.H. and El-bermawy, N.M., 2020. Sodium propionate as a dietary acidifier for European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fry: immune competence, gut microbiome, and intestinal histology benefits. *Aquaculture International*, 28:95-111. https://doi.org/10.1007/s10499-019-00446-7.

Xu, Z., Yang, H., Poolsawat, L., Rahman, M.M., Xu, X., Jiang, X., Li, X., Tan, H. and Leng, X., 2021. Flavonoid-enriched diets improved the growth and flesh quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) based on metabolomics. *Aquaculture Nutrition*, 27(6):2514-2528. https://doi.org/10.1111/anu.13381.

Yu, L., Wu, F., Liu, W., Tian, J., Lu, X. and Wen, H., 2017. Semisynthetic ferulic acid derivative: an efficient feed additive for Genetically Improved Farmed Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, 48(9):5017-5028. https://doi.org/10.1111/are.13319.

Zhang, D.X., Kang, Y.H., Zhan, S., Zhao, Z.L., Jin, S.N., Chen, C., Zhang, L., Shen, J.Y., Wang, C.F., Wang, G.Q., and Shan,

Individual and combined effects of the dietary *Lactobacillus casei* and sodium propionate supplementation on the growth performance and immunity of zebra fish (*Danio rerio*)

Akbarnezhad, E[1]; Yeganeh, S.[1*]; Mohammadzadeh, S.[2]

*skyeganeh@gmail.com, s.yeganeh@sanru.ac.ir

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

2- Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

Keywords: *Lactobacillus casei*, sodium propionate, zebrafish, immunity, enzyme, biochemical index

Introduction

The emergence of diseases poses significant challenges for the aquaculture sector. While diseases are natural components of aquatic ecosystems, they often lead to economic repercussions for both aquaculture and fisheries. The restrictions on antibiotic use in aquaculture have prompted the development of environmentally friendly alternatives, such as probiotics and organic acids, which serve as immune stimulants. Short-chain fatty acids and organic acids, along with their corresponding salts are emerging as potential alternatives to antibiotic growth promoters in aquaculture, garnering increasing interest. Probiotics, on the other hand, are live microbial feed supplements that help maintain a healthy microbial balance in the host's gut.

Methodology

This study was carried out to evaluate individual and combined effects of the dietary *Lactobacillus casei* and sodium propionate supplementation on the growth performance and immunity of zebrafish (*Danio rerio*). A total of 120 zebra fish (335.22 ± 0.23 mg) were placed in 12 tanks with 10 fish per tank and fed with diets containing 0 % *Lactobacillus casei* and sodium propionate (control, T1) 0.1% *Lactobacillus casei* (5 x 10^6 CFU, T2), 1% sodium propionate (T3), and 0.1% *Lactobacillus casei* bacteria and 1% sodium propionate (T4) for 8 weeks. At the end of the experiment, feeding was halted for 24 hours. Eight fish from each tank were anesthetized with clove oil at a dose of 50 µl/l. After removing the head and tail, the fish were frozen in liquid nitrogen and homogenized using a manual homogenizer. The resulting homogenate was then prepared in 25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) for the measurement of immune factors.

Results

The experimental diets significantly affected the final weight and weight gain of the fish. Fish fed with *Lactobacillus casei* and sodium propionate had a higher weight compared to the control group (Table 1, $p<0.05$). The specific growth rate also varied among the diets, with the lowest growth rate observed in the control group and the highest in the groups receiving sodium propionate and *Lactobacillus casei*, which differed significantly from the control group ($p<0.05$). No significant differences were found among the treatments in triglyceride, cholesterol, and glucose levels (Table 2, $p<0.05$). Serum albumin analysis indicated no significant difference between treatments 1 and 3, nor between treatments 2 and 4 (Table 2, $p<0.05$). However, significant differences were noted between treatments 1 and 3 and treatments 2 and 4, with the highest levels found in treatments 2 and 4. Regarding the globulin index, there was no significant

difference between the control group and treatment 3, but significant differences were observed with the other two treatments (Table 2, $p<0.05$). The highest activities of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase were recorded in treatment 4, which significantly differed from the control group ($p<0.05$) but showed no significant difference from treatment 3 (Table 3, $p<0.05$). Significant differences were also observed in total serum protein and immunoglobulin levels, with the highest levels in treatments containing *Lactobacillus casei* and sodium propionate (treatments 2, 3, and 4), which differed significantly from the control group (Table 4, $p<0.05$). Notably, significant variations were found in lysozyme and complement levels among the treatments, with the highest levels in treatments 3 and 4 (Table 4, $p<0.05$).

Table 1: **Growth performance in zebrafish fed with experimental diets for 8 weeks (mean ± SD)**

Factors/treatments	First treatment	Second treatment	Third treatment	Fourth treatment
Final weight (mg)	387.6 ± 9.4^{c}	432.9 ± 13.4^{b}	450.1 ± 11.2^{b}	458.3 ± 13.1^{a}
Weight gain (mg)	52.4 ± 10.1^{c}	96.9 ± 15.7^{b}	114.6 ± 10.2^{b}	123.9 ± 14.9^{a}
Body weight gain (%)	15.6 ± 3.0^{c}	28.8 ± 4.8^{b}	34.2 ± 2.5^{ab}	37.1 ± 4.7^{a}
Specific growth rate (%/day)	0.1 ± 0.01^{c}	0.18 ± 0.02^{b}	0.21 ± 0.01^{a}	0.22 ± 0.02^{a}
Survival rate (%)	100	100	100	100

Different letters indicate significant differences between groups (mean ± SD).

Table 2: Biochemistry index in in zebrafish fed with experimental diets for 8 weeks (mean ± SD)

Factors/treatments	First treatment	Second treatment	Third treatment	Fourth treatment
Triglyceride (mg/100g tissue)	78.6 ± 1.1^{a}	83.85 ± 3.65^{a}	88.1 ± 5.4^{a}	79.9 ± 1.6^{a}
Glucose (mg/100 g tissue)	156.8 ± 11.2^{a}	181.5 ± 8.8^{a}	166.5 ± 11.5^{a}	174.5 ± 4.5^{a}
Cholesterol (mg/ 100 g tissue)	23.8 ± 0.3^{a}	24.8 ± 0.4^{a}	25.6 ± 0.7^{a}	24.85 ± 2.35^{a}
Albumin (mg/ 100 g tissue)	13.59 ± 0.65^{b}	17.20 ± 0.3^{a}	14.6 ± 0.1^{b}	17.05 ± 0.25^{a}
Globulin (mg/ 100 g tissue)	58 ± 0.4^{c}	64.35 ± 0.65^{a}	58.55 ± 0.25^{c}	60.9 ± 0.2^{b}

Different letters indicate significant differences between groups (mean ± SD).

Table 3. Antioxidant enzymes in in zebrafish fed with experimental diets for 8 weeks (mean ± SD)

Factors/treatments	First treatment	Second treatment	Third treatment	Fourth treatment
SOD (u/g)	53.5 ± 0.6^{b}	65.6 ± 0.1^{a}	67.0 ± 0.1^{a}	69 ± 7.1^{a}
CAT (u/g)	63.3 ± 0.4^{b}	63.85 ± 0.4^{b}	73.2 ± 3.5^{a}	72.8 ± 0.3^{a}
GPx (u/g)	221.1 ± 2.5^{b}	223.5 ± 1.5^{b}	232 ± 3^{a}	235 ± 0.3^{a}

Different letters indicate significant differences between groups (mean ± SD).

Table 4: immunity index in zebrafish in zebrafish fed with experimental diets for 8 weeks (mean ± SD)

Factors/treatments	First treatment	Second treatment	Third treatment	Fourth treatment
Total protein (mg/100g tissue)	71.95 ± 0.25^{b}	82.55 ± 0.95^{a}	83.15 ± 0.35^{a}	87.95 ± 0.45^{a}
Immunoglobulin (mg/100 g tissue)	1.4 ± 0.01^{b}	1.48 ± 0.01^{a}	1.44 ± 0.15^{a}	1.46 ± 0.15^{a}
Lysozyme (u/g/min)	22.70 ± 1.1^{c}	20.5 ± 3.2^{b}	38.05 ± 1.45^{a}	40.95 ± 0.25^{a}
ACH50 (U%)	86.5 ± 0.5^{b}	84.5 ± 1.5^{b}	89.5 ± 0.5^{b}	105.1 ± 1.5^{a}

Different letters indicate significant differences between groups (mean ± SD).

Discussion and conclusions

Fish growth and immunity improved in fish fed supplemented diets compare to the control group. Improving fish performance through organic acids and probiotics is possible in several ways, including reducing gastric pH, which increases pepsin activation, reducing intestinal pH, which leads to increased mineral dissolution and subsequent absorption by organic and probiotics. It can be concluded that the use of a diet containing *Lactobacillus casei* and sodium propionate in zebrafish has numerous positive effects. Overall, the findings suggest that these supplements can be effectively utilized both separately and in combination, specifically at levels of 1% sodium propionate and 0.1% *Lactobacillus casei* (5×10^{6} CFU) in aquaculture.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.