(DOI): 10.22092/ISFJ.2025.133854 34(1) 65-77 Iranian Scientific Fisheries Journal

Effect of dietary probiotic *Lactobacillus acidophilus* and polyphenol ferulic acid on non-specific immunity and antioxidant activity in goldfish (*Carassius auratus*)

Bahrekazemi M.[1*]

[*]2721116711@iau.ir

1-Department of Fisheries, QaS.C., Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran-

Received: June 2024 Accepted: April 2025 Published: May 2025

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/).

Introduction

Fish is among the best sources of animal protein but aquaculture industry have faced to many challenges. Global aquaculture productions are vulnerable, and the increasing prevalence of diseases has caused a partial and overall reduction in aquaculture production (Bondad-Reantaso *et al*., 2005). Factors such as overcrowding in ponds, periodic movement and manipulation, sudden temperature changes, water quality deterioration, and poor nutritional conditions, along with physiological changes in fish such as stress, have heightened susceptibility to infections (Quesada-García *et al*., 2013). In aquaculture, the application of natural immuno-stimulants to enhance fish health and boost their resistance to pathogens has shown encouraging results (Habibnia *et al*., 2024).

Methodology

This study examined the impact of incorporating probiotic *Lactobacillus acidophilus* (LA) and polyphenol ferulic acid (FA) into the diet of goldfish (*Carassius auratus*) on growth performance, as well as factors related to immunity and antioxidant activity. A total of 240 fish, initially weighing 3.34 ± 0.35 g, were divided into four experimental groups: a control treatment with no food supplement (T0), fed with 6×10^8 CFU/g LA probiotic (T1), fed with 100 mg/kg FA (T2), and fed with a combination of LA and FA (T3) for eight weeks. At the end of feeding trial, the fish were fasted for 24 hours and all the fish in each tank were sampled and then anesthetized with benzocaine at a concentration of 120 mg per liter and weighed individually. Growth performance was then assessed. Thereafter, nine fish (per replication) were randomly selected. The selected fish were then subjected to anesthesia with Benzocaine at a concentration of 120 mg per liter to minimize handling stress. The fish underwent dissection, with the intestine and liver tissues being meticulously separated. Subsequently, these tissues were promptly subjected to freezing using liquid nitrogen and were subsequently preserved at a temperature of -80 °C. To measure lysozyme activity, the

[Downloaded from isfj.ir on 2025-06-28]

sample was added to a suspension of *Micrococcus lysodeikticus* prepared in 0.1 molar citrate phosphate buffer at a pH of 5.8. Optical density was read at a wavelength of 410 nanometers for 5 minutes, with readings taken every 30 seconds. Total immunoglobulin (Ig) levels were determined based on the method by Siwicki *et al*. (1994). In brief, total protein from the homogenate sample was measured using the microprotein method, followed by precipitation of immunoglobulin molecules with a 12% polyethylene glycol solution. The protein level was then re-measured, and the difference in protein content was considered as the Ig content. The levels of lipid peroxidation products in the fish homogenate were determined based on a previous study (Kei, 1978). Briefly, trichloroacetic acid (20%) (1.25 mL) was mixed with the fish homogenate (0.25 mL) and centrifuged at 2000 g for 10 minutes. Then, 1.25 mL of sulfuric acid (0.05 molar) and 1 mL of thiobarbituric acid (0.2%) were added to the collected precipitate and boiled for 30 minutes. After adding 2 mL of n-butanol, centrifugation (2000 g) was performed for another 10 minutes. The final absorbance was recorded at a wavelength of 532 nanometers. Catalase activity in the fish homogenate was assessed based on a previous study (Goth, 1991). The reaction buffer (1 mL) consisted of hydrogen peroxide (65 mM) and sodium-potassium phosphate buffer (60 mM) mixed with the fish homogenate (0.5 mL) for 1 minute at 37°C. The enzymatic reaction was terminated by adding 1 mL of ammonium molybdate (32.4 mM), and absorbance was recorded at 405 nanometers. Superoxide dismutase activity in the fish homogenate was determined based on a previous study (Nishiimi *et al*., 1997). The reaction buffer included 2.6 mL of phosphate buffer (0.017 mM), 0.1 mL of phenazine methosulfate, and 0.1 mL of nitro blue tetrazolium mixed with the fish homogenate (0.5 mL). After adding 0.1 mL of NADH (2.34 mM), absorbance was recorded at 560 nanometers for 3.5 minutes. Glutathione peroxidase activity in the fish homogenate was assessed according to a previous study (Pagalia & Valentine, 1967). The reaction buffer (0.88 mL) included GSH (1 mM), NADPH (150 mM), and sodium azide (100 mM) mixed with the fish sample (20 µL). Absorbance was recorded at a wavelength of 340 nanometers for 1 minute. The normality of the data and the homogeneity of variances were analyzed using the Kolmogorov-Smirnov test and Levene's test, respectively. A one-way analysis of variance (ANOVA) was conducted to assess significant differences among treatments. Tukey's post-hoc tests were employed to evaluate differences between treatments. These analyses were performed using SPSS 22 software (SPSS, Richmond, VA, USA) with a 95% confidence level.

Results

The results showed that the final weight, weight gain and specific growth rate were significantly influenced by LA and FA, with the T3 treatment resulting in the highest growth observed. Furthermore, levels of total immunoglobulin, IgM, and lysozyme increased in fish fed diets containing FA or LA. Additionally, malondialdehyde (MDA) activity was reduced by the experimental diets, with its lowest value significantly observed in the T3 treatment compared to the control group. Fish fed diets containing LA and/or FA also displayed significant increases in catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx) activity compared to the control group. The findings suggest that these nutritional supplements at optimal doses have potential to enhance growth as well as innate immunity and

[Downloaded from isfj.ir on 2025-06-28]

antioxidant factors in goldfish. Furthermore, both supplements exhibited synergistic effects; therefore, it is recommended to use these compounds simultaneously for sustainable aquaculture practices.

Discussion and conclusion

Our results showed that supplementing with FA and/or LA can significantly activate antioxidant activity, effectively scavenging excess free radicals and regulating ROS balance in the body, thereby enhancing antioxidant potential. In this study, the beneficial effects of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* and the polyphenol ferulic acid were examined in carp fish. These additives in the diet had potential effects on growth, immune factors, and antioxidant capacity in carp, and simultaneous use of these compounds is recommended for sustainable aquaculture.

Conflict of Interest

Authors have no conflict of interest.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-06-28]

مجله علمی شیلات ایران

(DOI): 10.22092/ISFJ.2025.133854 ۳٤ (۱) ٦٥-۷۷ مجله علمی شیلات ایران

مقاله علمی – پژوهشی:

اثر خوراک حاوی پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* و پلی‌فنول فرولیک اسید بر ایمنی غیراختصاصی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهی قرمز (*Carassius auratus*)

معصومه بحرکاظمی[1*]

*2721116711@iau.ir

۱-گروه گروه شیلات، واحد قائمشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائمشهر، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱٤۰۳ تاریخ پذیرش: فروردین ۱٤۰٤ تاریخ چاپ: اردیبهشت ۱٤۰٤

چکیده

در مطالعه حاضر، تاثیر جیره‌های حاوی پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* (LA) و پلی‌فنول فرولیک اسید (FA) را بر عملکرد رشد، میزان ایمنی غیر اختصاصی، و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهی قرمز (*Carassius auratus*) مورد بررسی قرار گرفت. ۲۴۰ عدد ماهی با وزن اولیه ۰/۳۵±۳/۳۴ گرم با چهار جیره آزمایشی شامل مقدار صفر از مکمل‌های غذایی (T0)، ۶×۱۰^{۸} واحد تشکیل دهنده کلنی بر گرم پروبیوتیک LA (T1)، ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم FA (T2) و ترکیبی از LA و FA (T3) به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. نتایج نشان داد که وزن نهایی، افزایش وزن و نرخ رشد ویژه به طور قابل‌توجهی تحت تأثیر LA و FA قرار گرفتند و بیشترین رشد در تیمار T3 مشاهده شد (P<0.05). سطوح ایمونوگلوبولین تام، IgM و لیزوزیم با رژیم غذایی FA و LA افزایش یافت (p<۰/۰۵). سطوح ایمونوگلوبولین تام، IgM و لیزوزیم با رژیم غذایی FA و LA افزایش یافت. فعالیت مالون دی آلدئید (MDA) به‌وسیله جیره‌های آزمایشی کاهش یافت و کمترین مقدار آن به طور قابل‌توجهی در تیمار T3 در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد (p<۰/۰۵). ماهی‌هایی که با جیره‌های حاوی LA یا FA تغذیه شده بودند، افزایش قابل‌توجهی در فعالیت کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) نسبت به گروه شاهد نشان دادند (p<۰/۰۵). نتایج نشان داد که این مکمل‌های غذایی به صورت هم‌زمان در غلظت‌های ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فرولیک اسید و ۶×۱۰^{۸} کلنی بر گرم پروبیوتیک LA (T3)، از پتانسیل افزایش رشد، ایمنی ذاتی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهی قرمز برخوردارند. هر دو مکمل خوراکی اثرات هم‌افزایی نشان دادند و توصیه می‌شود از این ترکیبات به طور هم‌زمان برای آبزی‌پروری پایدار استفاده شود.

لغات کلیدی: مکمل غذایی، ماهی قرمز، ایمنی، آنتی‌اکسیدان

*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/).

[Downloaded from isfj.ir on 2025-06-28]

مقدمه

امروزه توسعه آبزی‌پروری در دنیا از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. تجارب کشورهای مختلف نشان می‌دهند که آبزی‌پروری می‌تواند کمک شایانی به تأمین غذای جمعیت رو به رشد کره زمین به‌خصوص کشورهای در حال توسعه نماید. آبزی‌پروری بخش اساسی و در حال رشد از بوم نظام‌های کشاورزی و دامپروری را در سرتاسر دنیا تشکیل می‌دهد. تقاضای ماهی در ابتدا به دلیل رشد سریع جمعیت، درآمد ناشی از این فعالیت، ارجحیت ماهی بر سایر پروتئین‌های حیوانی و دلایل فرهنگی و بهداشتی، افزایش یافته است. با وجود این، تولیدات آبزی‌پروری جهان آسیب‌پذیر بوده و افزایش شیوع بیماری‌ها که ناشی از افزایش تراکم ماهیان در استخرهای پرورشی است، سبب شده است که تولیدات آبزیان به صورت جزئی و کلی کاهش یابد (Bondad-Reantaso *et al*., 2005). عواملی از قبیل ازدحام جمعیت در استخرها، جابه‌جایی و دستکاری‌های دوره‌ای، تغییرات ناگهانی دما، کاهش کیفیت آب و شرایط تغذیه‌ای ضعیف به همراه تغییرات فیزیولوژیک در ماهی(استرس)، باعث افزایش حساسیت به انوع عفونت‌ها شده است. علاوه‌براین، تراکم بالای ماهی و فقدان اقدامات بهداشتی به گسترش عوامل بیماری‌زا کمک کرده و موجب افزایش میزان تلفات شده است (Quesada-García *et al*., 2013).

برای دوری از ضررهای اقتصادی ناشی از ضعف‌های بهداشتی، انواع آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر داروهای دامپزشکی به طور مرتب به غذای ماهیان، اضافه شده یا گاهی اوقات در روش‌های درمانی (حمام و تزریق)، به عنوان پیشگیری یا درمان حیوانات مبتلا شده و گاهی به عنوان محرک رشد، استفاده می‌شوند (Rico *et al*., 2014). همچنین استفاده از داروهای دامپزشکی باعث افزایش مقاومت دارویی می‌شوند و این داروها جنبه تخریبی زیادی بر محیط زیست و سلامتی انسان دارند. برای مثال، استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث افزایش مقاومت سویه‌های باکتری در مقابل آنها شده است (Habibnia *et al*., 2024). همچنین وجود بقایای آنتی‌بیوتیک‌ها در ماهیچه ماهیان خوراکی، اثراتی سوء بر سلامتی انسان دارد (Cabello, 2006; Romero *et al*., 2014). اگرچه واکسیناسیون به عنوان یک روش درمانی بالقوه در پیشگیری از شیوع بیماری‌ها در آبزی‌پروری کاربرد دارد، اما واکسن‌های تجاری مورد استفاده پرورش‌دهندگان بسیار پرهزینه است و این روش زیاد کارآمد نیست، چون واکسن به طور اختصاصی عمل می‌کند و تنها بر یک عامل بیماری‌زا اثر دارد (Harikrishnan *et al*., 2011). یکی از راه‌های افزایش مقاومت آبزیان در برابر عوامل عفونی و بیماری‌زا، بالا بردن سطح ایمنی آبزیان است (Davis, 2010). یکی از معمولی‌ترین روش‌های کاهش اثرات منفی این استرس‌ها بر رشد آبزیان، استفاده از ترکیبات محرک رشد و ایمنی مانند ترکیبات فنولی و پروبیوتیک‌هاست (Burr *et al*., 2006).

باکتری اسید لاکتیک به عنوان برجسته‌ترین باکتری برای تقویت عملکرد رشد و سیستم ایمنی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا مختلف در نظر گرفته می‌شود. *Lactobacillus acidophilus* یکی از گونه‌های باکتریایی عمده مورد استفاده به عنوان پروبیوتیک در آبزی‌پروری است (Gatesoupe, 2008). چندین گزارش نشان داد که مکمل غذایی *L. acidophilus* رشد و پاسخ ایمنی را در ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) (Villamil *et al*., 2017) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (Enferadi *et al*., 2018) بهبود داد.

پلی‌فنول‌ها یا ترکیبات پلی‌فنولیک از گیاهان، مشتق شده و از واحدهای زیاد فنول به همراه سایر ترکیبات شیمیایی تشکیل می‌شوند (Etxeberria *et al*., 2013). گزارش‌های متعددی در مورد اثرات مثبت مصرف پلی‌فنول بر شاخص‌های رشد، ایمنی و مقاومت در برابر بیماری و استرس‌های محیطی در آبزیان گزارش شده است (Mandel *et al*., 2005; Ahmadifar *et al*., 2019; Habibnia *et al*., 2024). فرولیک اسید یک ترکیب لیگنوسلولزی، روشن کننده پوست، مکمل گیاهی و ترکیب آلی است که با رادیکال های آزاد واکنش می‌دهد. این ترکیب سرشار از ترکیبات فنولیک دیواره سلول گیاهی است. فرولیک اسید در برگ‌ها و دانه‌های گزنه، گندم، برنج، جوی صحرایی، تمشک، ذرت و توت فرنگی وجود دارد (Stapleton *et al*., 2004).

[Downloaded from isfj.ir on 2025-06-28]

در سال‌های اخیر استفاده از محرک‌های ایمنی و رشد در آبزی‌پروری رایج شده است به‌طوری‌که حتی به عنوان یک جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها معرفی شده‌اند. با توجه به اهمیت این بخش برای شیلات کشور، انجام تحقیقات برای بهبود راندمان رشد و ایمنی ماهی امری ضروری به‌نظر می‌رسد. مطالعه حاضر نیز در همین زمینه به بررسی اثرات منفرد و توأم پروبیوتیک LA و FA بر رشد و ایمنی ماهی قرمز که به عنوان یک گونه آزمایشگاهی نماینده خوبی از خانواده کپور ماهیان بوده و می‌توان نتایج آن را به سایر کپور ماهیان نیز تعمیم داد، پرداخته است.

مواد و روش کار

جیره‌های آزمایشی

به منظور بررسی اثر انفرادی و همزمان پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* و پلی‌فنول فرولیک اسید (Sigma-Aldrich, Germany) در ماهی قرمز، چهار تیمار آزمایشی شامل تیمار شاهد با مقدار صفر از مکمل غذایی (T0)، ۶×۱۰^{۸} واحد تشکیل دهنده کلنی بر گرم پروبیوتیک LA (T1)، ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم FA (T2) و ترکیبی از LA و FA (T3) در نظر گرفته شد. غلظت‌های مورد استفاده در مطالعه حاضر برای LA (Hoseinifar *et al*., 2015) و غلظت FA (Dawood *et al*., 2020) براساس مطالعات گذشته انتخاب شد. برای ساخت جیره غذایی، ابتدا LA در محیط کشت MRS (Basingstoke, UK) یک شبانه روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. سپس سلول‌های پروبیوتیک با سرعت ۲۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه سانترفیوژ شدند و پلیت حاصله در بافر PBS حل و غلظت ۶×۱۰^{۸} واحد تشکیل دهنده‌ی کلنی بر گرم از باکتری به‌دست آمد. جیره‌های پایه بر اساس ترکیبات جدول۱ آماده شدند. بدین صورت که تمام اجزاء جیره به طور دقیق وزن شدند و به همراه مقادیر مذکور از LA و FA در مخلوط کن به‌خوبی مخلوط شدند. سپس اجزاء جیره با آب مخلوط شدند و به شکل خمیر درآمدند. خمیر حاصله از چرخ گوشت عبور داده شد تا پلت‌های یکسان حاصل شود. این پلت‌ها در معرض هوا، خشک شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری شدند. جیره‌های پروبیوتیک هر دو هفته یکبار به‌تازگی تهیه می‌شد.

جدول ۱: فرمولاسیون و ترکیب تقریبی جیره غذایی پایه
Table 1: Dietary formulation and proximate composition of the control diet

Ingredients	%
Fish meal	40
Fish oil	6
Wheat flour	21
Soybean meal	13.5
Gluten	5.5
Soybean oil	6
Vitamin premix	2
Mineral premix	3
Binder	2
Antifungal	0.5
Antioxidant	0.5
Chemical composition	
Crude protein (%)	36.81
Dry matter (%)	91.12
Crude lipid (%)	11.33
Ash (%)	3.5
Energy (kJ kg^{-1})	17.90

ماهی و شرایط پرورش

۲۴۰ عدد ماهی با میانگین وزن ۳۴/۳۵±۳/۰ گرم تهیه شده و به مرکز تکثیر ماهیان زینتی شرکت آبزی گستر (ساری، ایران) منتقل شدند. ماهی‌ها در ۱۲ آکواریوم شیشه‌ای (۲۰۰ لیتر) با تراکم ۲۰ ماهی در هر آکواریوم توزیع شده و به مدت ۲ هفته با شرایط آزمایش سازگار شدند. در طول دوره سازگاری، ماهی‌ها دو بار در روز با جیره پایه تغذیه شدند. بعد از دو هفته، اکواریوم‌ها به چهار تیمار آزمایشی با سه تکرار اختصاص داده شدند. در طول دوره آزمایش (۵۶ روز) ماهی‌ها هر ۲ هفته یکبار وزن می‌شدند تا میزان غذادهی بر اساس وزن آنها تعیین شود (Shohreh *et al*., 2024). آکواریوم‌ها مجهز به سنگ هوا بوده و روزانه ۷۰ درصد آب آنها با آب تازه جایگزین می‌شد. در طول دوره تحقیق، شاخص‌های شیمیایی و فیزیکی آب (دما، اکسیژن

[Downloaded from isfj.ir on 2025-06-28]

محلول و pH) به‌ترتیب ۰/۷±۲۵/۳ درجه سانتی‌گراد، ۰/۱۴±۷/۱۳ میلی‌گرم در لیتر و ۰/۸±۷/۵ اندازه‌گیری شد.

عملکرد رشد

در ابتدا و انتهای آزمایش، ماهی‌های هر اکواریوم بعد از ۲۴ ساعت قطع غذادهی با بنزوکائین با غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر بیهوش شده (Shohreh *et al*., 2024) و به صورت جداگانه وزن شدند. افزایش وزن (WG)، نرخ رشد ویژه (SGR) و نرخ بازماندگی براساس فرمول‌های ذیل در انتهای آزمایش محاسبه شدند:

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

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

بازماندگی (درصد)= (تعداد ماهی در انتهای دوره/ تعداد ماهی در ابتدای دوره) × ۱۰۰

نمونه‌برداری بافت

بدین منظور، ۹ عدد ماهی از هر تیمار به صورت تصادفی صید و پس از بیهوشی، روده و کبد آنها به‌ترتیب به منظور سنجش شاخص‌های ایمنی و آنتی‌اکسیدانی خارج شد. نمونه‌های روده و کبد در نیتروژن مایع منجمد شده و به صورت جداگانه با هموژنایزر دستی در بافر ۲۵ میلی مولار Tris-HCl (pH: ۷/۲) همگن شدند و برای سنجش مورد استفاده قرار گرفتند (Ahmadifar *et al*., 2020).

سنجش شاخص‌های ایمنی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

برای سنجش فعالیت آنزیم لیزوزیم نمونه آماده شده به سوسپانسیون *Micrococcus lysodeikticus* تهیه شده در بافر سیترات فسفات۰/۱ مولار با اسیدیته ۵/۸ اضافه شد. جذب نوری به مدت ۵ دقیقه با فاصله زمانی ۳۰ ثانیه در طول موج ۴۱۰ نانومتر خوانده شد (Habibnia *et al*., 2024). تعیین سطح ایمونوگلوبولین تام (Ig) بر اساس روش Siwicki و همکاران (۱۹۹۴) انجام پذیرفت. به طور خلاصه، پروتئین کل از نمونه هموژنات با استفاده از روش میکروپروتئین اندازه‌گیری شد، سپس مولکول‌های ایمونوگلوبولین با محلول پلی‌اتیلن گلیکول ۱۲٪ رسوب کردند و سطح پروتئین مجدداً اندازه‌گیری شد. تفاوت در محتوای پروتئین به عنوان محتوای ایمونوگلوبولین تام در نظر گرفته شد.

محصولات پراکسیداسیون لیپید و سنجش میزان مالون دی آلدهید در هموژنات ماهی بر اساس مطالعه قبلی تعیین شد (Kei, 1978). به طور خلاصه، تری کلرواستیک اسید (۲۰ درصد) (۱/۲۵ میلی‌لیتر) با هموژنات ماهی (۰/۲۵ میلی‌لیتر) مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. سپس ۱/۲۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک (۰/۰۵ مولار) و ۱ میلی‌لیتر اسید تیوباربیتوریک (۰/۲ درصد) به رسوب جمع‌آوری‌شده اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه جوشانیده شد. پس از افزودن n-بوتانول (۲ میلی‌لیتر)، سانتریفیوژ با سرعت ۲۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و جذب نهایی در طول موج ۵۳۲ نانومتر ثبت گردید. فعالیت کاتالاز در هموژنات ماهی 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 هموژنات ماهی (۰/۰۵ میلی‌لیتر) به مدت ۱ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مخلوط شد. پس از خاتمه واکنش آنزیمی با ۱ میلی‌لیتر آمونیوم مولیبدات (۳۲/۴میلی مولار در لیتر)، جذب در ۴۰۵ نانومتر ثبت شد. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در هموژنات ماهی بر اساس مطالعه قبلی تعیین شد (Weydert and Cullen, 2009). بافر واکنش شامل ۲/۶ میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۰۱۷ میلی‌مولار)، ۰/۱ میلی‌لیتر فنازین متوسولفات و ۰/۱ میلی‌لیتر نیترو بلوتترازولیوم بود که با ۰/۰۵ میلی‌لیتر هموژنات ماهی مخلوط شد. پس از افزودن ۰/۱ میلی‌لیتر NADH (۲/۳۴ میلی‌مولار)، جذب در ۵۶۰ نانومتر به مدت ۳/۵ دقیقه ثبت شد. فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز در هموژنات ماهی بر اساس مطالعه قبلی تعیین شد (Pagalia and Valentine,

[Downloaded from isfj.ir on 2025-06-28]

1967). 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 Kolmogorov–Smirnov ارزیابی شد 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 $p<۰/۰۵$ بررسی شد. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام گرفت.

نتایج

عملکرد رشد

نتایج مربوط به عملکرد رشد در جدول ۲ ارائه شده است. تأثیر جیره‌های آزمایشی بر میزان وزن نهایی و افزایش وزن، معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). در ماهیان تغذیه شده با FA و LA وزن بیشتری نسبت به گروه شاهد به‌دست آمد درحالی‌که نرخ رشد ویژه تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت ($p>۰/۰۵$).

جدول ۲: شاخص‌های رشد ماهی قرمز تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی طی ۸ هفته (تعداد=۲۴۰)

Table 2: Growth performance in goldfish fed with experimental diets for 8 weeks (n=240)

Factors/treatments	T0	T1	T2	T3
Initial weight (g)	3.32 ± 0.47	3.07 ± 0.06	3.34 ± 0.39	3.62 ± 0.27
Final weight (g)	8.30 ± 0.35[a]	9.05 ± 0.45[b]	10.03 ± 0.15[c]	10.10 ± 0.22[c]
Weight gain (g)	4.98 ± 0.14[a]	5.98 ± 0.39[b]	6.69 ± 0.54[b]	6.4 ± 0.09[b]
Specific growth rate (%/day)	1.64 ± 0.17[a]	1.92 ± 0.05[a]	1.97 ± 0.23[a]	1.83 ± 0.09[a]
Survival rate (%)	100	100	100	100

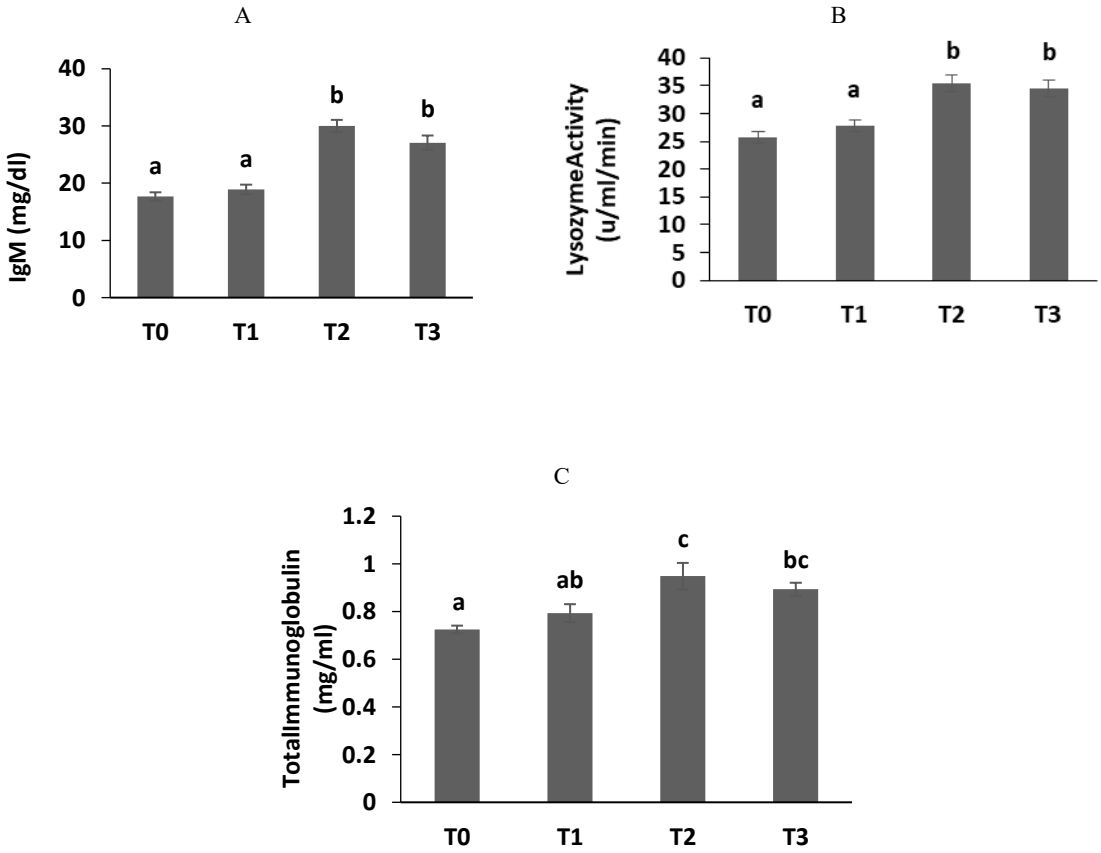
اعدادی که در هر ردیف با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، تفاوت معنی‌دار دارند (میانگین± انحراف معیار، $p<۰/۰۵$). T0: تیمار شاهد (فاقد افزودنی)، T1: تیمار حاوی ۶×۱۰^{۸} واحد تشکیل دهنده‌ی کلنی پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* (LA) در گرم، T2 : تیمار حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم پلی فنول فرولیک اسید (FA) در کیلوگرم، T3: تیمار حاوی LA و FA

Different letters in each row indicate significant differences between groups (mean ± SD, $p<0.05$). T0: Control treatment (No additive), T1: Treatment containing 6×10^{8} CFU/g *Lactobacillus acidophilus* (LA), T2: Treatment containing 100 mg/kg polyphenol ferulic acid, T3: Treatment containing LA & FA

پاسخ‌های ایمنی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در بافت

اختلاف معنی‌داری در فعالیت آنزیم لیزوزیم (شکل ۱، B)، ایمنوگلوبولین M (شکل ۱، A) و ایمنوگلوبولین تام (شکل ۱، C) بین تیمارهای مختلف مشاهده شد و بالاترین میزان در تیمار T2 به‌دست آمد ($p<۰/۰۵$). همچنین افزایش معنی‌داری در میزان فعالیت کاتالاز (شکل۲، A)، سوپراکسید دیسموتاز (شکل ۲، B) و گلوتاتیون پراکسیداز (شکل ۲، C) در تیمارهای تغذیه شده با FA و LA مشاهده شد و بالاترین میزان در تیمار T3 به‌دست آمد ($p<۰/۰۵$). میزان مالون‌دی‌آلدهید (شکل ۲، D) در تیمارهای تغذیه شده با FA و LA به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود ($p<۰/۰۵$).

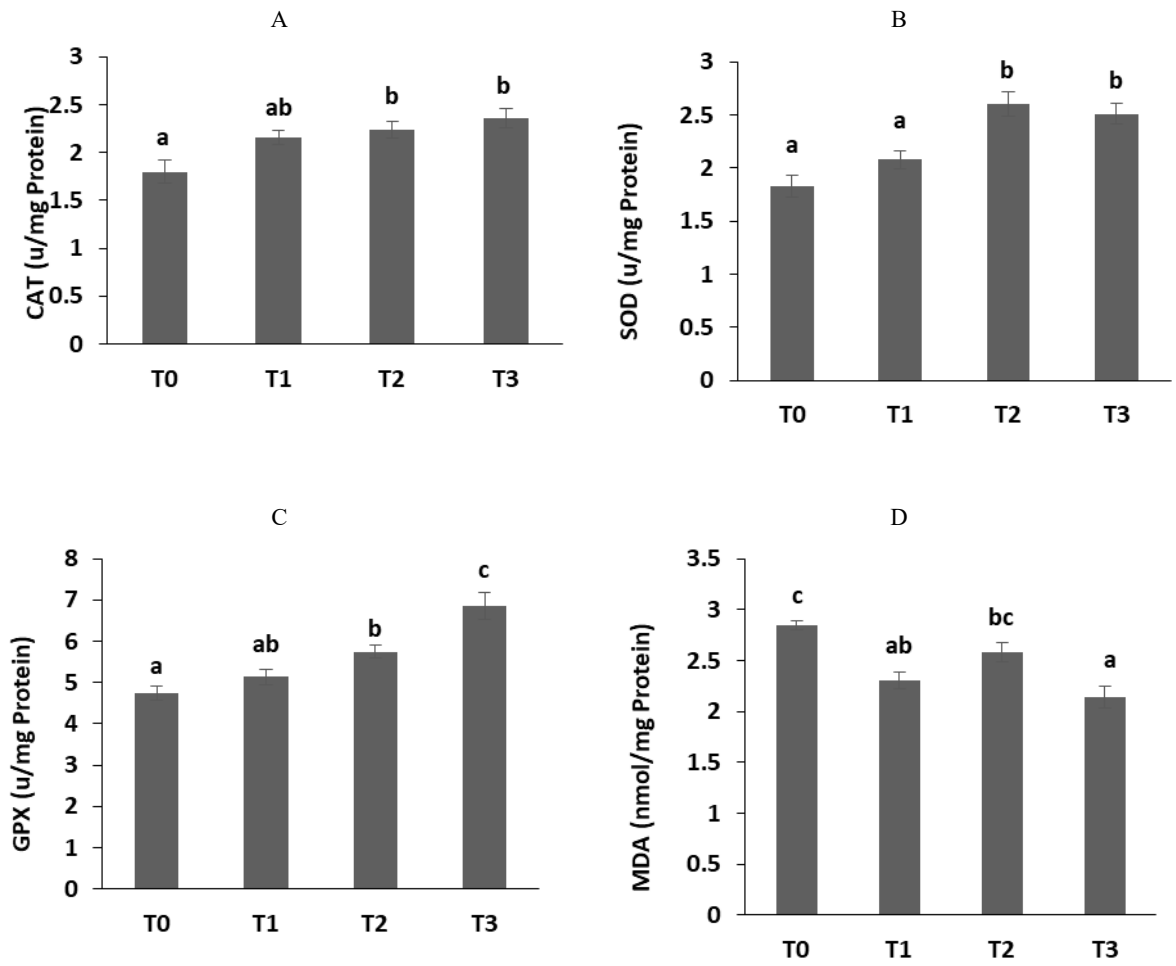
[Downloaded from isfj.ir on 2025-06-28]



شکل ۱: شاخص‌های ایمنی ماهی قرمز تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی به مدت هشت هفته. حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها (میانگین ± انحراف معیار، $p<۰/۰۵$) است. T0: تیمار شاهد (فاقد افزودنی)، T1: تیمار حاوی ۶×۱۰^{۸} واحد تشکیل‌دهنده کلنی پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* (LA) در گرم، T2: تیمار حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم پلی‌فنول فرولیک اسید (FA) در کیلوگرم، T3: تیمار حاوی LA و FA

Figure 1: Immune parameters in goldfish fed with experimental diets for 8 weeks. Different letters indicate significant differences between groups (mean ± SD, $p< 0.05$). T0: Control treatment (No additive), T1: Treatment containing 6×10^{8} CFU/g *Lactobacillus acidophilus* (LA), T2: Treatment containing 100 mg/kg polyphenol ferulic acid, T3: Treatment containing LA & FA.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-06-28]



شکل ۲: شاخص‌های آنتی اکسیدان ماهی قرمز تغذیه شده با جیره های آزمایشی به مدت هشت هفته. حروف مختلف نشان دهنده تفاوت معنی دار بین گروه‌ها (میانگین ± انحراف معیار، $p < ۰/۰۵$) است. T0: تیمار شاهد (فاقد افزودنی)، T1: تیمار حاوی ۶×۱۰^{۸} واحد تشکیل دهنده کلنی پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* (LA) در گرم، T2: تیمار حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم پلی‌فنول فرولیک اسید (FA) در کیلوگرم، T3: تیمار حاوی LA و FA

Figure 2: Antioxidant parameters in goldfish fed with experimental diets for 8 weeks. Different letters indicate significant differences between groups (mean ± SD, $p< 0.05$). T0: Control treatment (No additive), T1: Treatment containing 6×10^{8} CFU/g *Lactobacillus acidophilus* (LA), T2: Treatment containing 100 mg/kg polyphenol ferulic acid, T3: Treatment containing LA & FA

بحث

در دهه‌های اخیر گسترش آبزی‌پروری با موانع مختلفی (عوامل استرس‌زا و بیمارهای عفونی) روبرو بوده به‌طوری‌که برای کنترل این شاخص‌ها به‌شدت به آنتی‌بیوتیک و داروهای شیمیایی وابسته بوده است. پروبیوتیک‌ها، عصاره‌های گیاهی و ترکیبات مشتق از گیاهان، به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر داروهای شیمیایی به طور گسترده در صنعت آبزی پروری استفاده می‌شوند (Yousefi *et al*., 2021). مطالعات زیادی اثرات فرولیک اسید و پروبیوتیک را بر رشد و ایمنی گونه‌های مختلف بررسی کرده و اثرات مثبت آنها را ثابت کردند، اما در مطالعه حاضر به طور همزمان اثرات منفرد و ترکیبی آنها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده

[Downloaded from isfj.ir on 2025-06-28]

از فرولیک FA و LA تأثیر معناداری بر شاخص‌های رشد دارد و بالاترین رشد در استفاده همزمان از این مکمل‌ها در جیره غذایی (T3) مشاهده شد. در زمینه نتایج مطالعه حاضر، FA (Yu *et al*., 2020; Dawood *et al*., 2020) و پروبیوتیک *Bacillus licheniformis* (Gobi *et al*., 2018) به صورت جداگانه در تیلاپیای نیل پرورشی (*Oreochromis niloticus*) سبب بهبود نرخ رشد شدند. مشابه تحقیق حاضر، افزودن پروبیوتیک به جیره غذایی ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) (Tenciu *et al*., 2022) و دلقک ماهی (*Siganus rivulatus*) (El-Dakar *et al*., 2007) باعث بهتر شدن شاخص‌های رشد گردید. دلایل متفاوتی در مورد اثر پروبیوتک‌ها یا فرولیک اسید بر رشد، ذکر شده است. بهبود نرخ رشد در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک ممکن است مربوط به قرار گرفتن پروبیوتیک‌ها در روده و افزایش ترشح آنزیم در نتیجه بهبود فرایند هضم و جذب باشد (Gobi *et al*., 2018). در تیمارهای تغذیه شده با FA افزایش وزن معناداری نسبت به گروه کنترل مشاهده شد که این افزایش وزن می‌تواند ناشی از افزایش هورمون رشد و تستوسترون در خون باشد (Yu *et al*., 2020) همچنین خاصیت چربی‌دوستی FA، توانایی عبور آن را از غشاء سلولی افزایش داده است و ممکن است باعث افزایش رشد در ماهی شود. در مطالعه حاضر، استفاده همزمان از FA و پروبیوتیک LA افزایش رشد بیشتری نسبت به استفاده جداگانه آنها داشته است و این افزایش ممکن است مربوط به اثرات FA و LA در بهبود هضم آنزیمی و افزایش مصرف خوراک باشد.

مطالعات مختلف ثابت کرده است که استفاده از مکمل‌های غذایی از جمله سویه‌های مختلف پروبیوتیک‌ها و فرولیک اسید با تحریک عملکردهای ایمنی و هومورال (فاگوسیتوز، فعالیت لیزوزیم و فعالیت مکمل‌ها)، مقاومت به بیماری را در ماهی افزایش می‌دهند (Guardiola *et al*., 2016; Gobi *et al*., 2018; Ahmadifar *et al*., 2019; Dawood *et al*., 2020). تقویت پاسخ‌های ایمنی ماهی در شرایط پرورشی، یک استراتژی مفید برای کنترل شیوع بیماری‌ها و عفونت‌ها و در نتیجه مرگ‌ومیر است (Mehana *et al*., 2015). در مطالعه حاضر، شاخص‌های ایمنی (ایمنوگلوبولین تام، IgM و لیزوزیم) در ماهی‌های تغذیه شده با LA یا FA افزایش یافت. منطبق با نتایج مطالعه حاضر، ایمنوگلوبولین تام و لیزوزیم در کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، تغذیه شده با FA و پروبیوتیک *Lactobacillus fermentum* (Ahmadifar *et al*., 2019)، در تیلاپیای نیل تغذیه شده با پروبیوتیک (Dawood *et al*., 2020) و تیلاپیای نیل تغذیه شده با FA (Yu *et al*., 2020)، در هیبرید گروپر، *Epinephelus fuscoguttatus*♀ × *Epinephelus polyphekadion*♂ تغذیه شده با FA (Fu *et al*., 2022)، بیشتر از ماهی تغذیه شده با جیره شاهد بود. ACH50 در سیم دریایی قرمز (*Pagyus major*)، تغذیه شده با پروبیوتیک‌های *Lactobacillus rhamnnosus* و *L. lactic* بالاتر از گروه کنترل بود (Dawood *et al*., 2016). بهبود شاخص‌های ایمنی ناشی از FA را می‌توان به نقش FA در افزایش نفوذپذیری سد روده‌ای در GIT به مواد مغذی و اسید فولیک توضیح داد که برای سلول‌ها، مقرون به‌صرفه بوده و ممکن است به کاهش استرس اکسیداتیو و افزایش ایمنی کمک کند (Dawood *et al*., 2020). پروبیوتیک‌ها از طریق تعامل با سلول‌های ایمنی مختلف موجب بهبود پاسخ ایمنی می‌گردند (Gobi *et al*., 2018). افزایش شاخص‌های ایمنی در تیمار FA+ LA در مطالعه حاضر نشان داد که استفاده همزمان FA و LA تأثیر قابل ملاحظه‌تری نسبت به استفاده انفرادی این ترکیبات، در تحریک پاسخ‌های ایمنی ذاتی در ماهی قرمز داشت.

ارزیابی نشانگرهای SOD، CAT و GPX به عنوان آنزیم‌های مهم آنتی‌اکسیدانی، نه‌تنها برای نشان‌دادن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی موجودات آبزی بلکه می‌تواند به عنوان نشانگرهای زیستی استرس اکسیداتیو نیز در نظر گرفته شوند (Ahmadifar *et al*., 2019). نتایج مطالعه حاضر نشان داد، افزودن FA و LA به جیره غذایی ماهی قرمز می‌تواند به طور چشمگیری سبب بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و GPX و کاهش غلظت MDA گردد. در مطالعات قبلی افزایش فعالیت SOD، CAT و GPX و کاهش غلظت MDA به‌وسیله پروبیوتیک یا FA نشان داده شده است (Ahmadifar *et al*., 2019; Yang *et al*., 2019).

[Downloaded from isfj.ir on 2025-06-28]

خاصیت آنتی‌اکسیدانی FA به دلیل حضور گروه هیدروکسیل در آنهاست که به‌راحتی می‌تواند یک رادیکال فنوکسی تثبیت شده با رزونانس ایجاد کند و غشاهای بیولوژیک را از پراکسیداسیون لیپیدی، رادیکال‌های پراکسیل و آلکوکسیل خنثی شده، محافظت کند (Yang *et al*., 2019). به طور مشابه، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (SOD، CAT و GPX) در کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idellus*)، تغذیه شده با پروبیوتیک *Bacillus subtilis* (Tang *et al*., 2019) و در کپور معمولی تغذیه شده با کوماریک افزایش یافت (Ahmadifar *et al*., 2021). ثابت شده است که استفاده مناسب از پلی‌فنول‌های فعال مشتق از گیاهان می‌تواند بیان مسیرهای ژنی انتخابی را سرکوب یا فعال کند و در نتیجه، به پیشگیری یا کنترل استرس و برخی بیماری‌ها کمک کند (Cheng *et al*., 2016). مکانیسم‌های اثر آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنول‌ها شامل مهار تشکیل اکسیژن فعال و القاء فعال‌سازی Nrf2 است که به‌نوبه خود بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را تنظیم می‌کند (Kumar and Pandey, 2013). تمام این عملکردها از رشد استرس اکسیداتیو که مسیرهای پیش التهابی را تحریک می‌کند، جلوگیری می‌کنند (Chuang and McIntosh, 2011). همچنین پروبیوتیک‌ها قادر هستند، فعالیت فاگوسیتوز کنندگی ماکروفاژها را برای مقابله با تشکیل بیش از حد ROS از طریق افزایش فعالیت CAT افزایش دهند (Panigrahi *et al*., 2004). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مکمل فرولیک اسید و پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* می‌تواند به طور موثر رادیکال‌های آزاد اضافی را از بین ببرد و تعادل ROS را در بدن تنظیم کند و در نتیجه، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی را در ماهی قرمز بهبود بخشد.

در مطالعه حاضر، اثر مفید پروبیوتیک *L. acidophilus* و پلی‌فنول فرولیک اسید در ماهی قرمز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این مکمل‌های غذایی به صورت همزمان در غلظت‌های ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فرولیک اسید و ۶×۱۰^{۸} کلنی بر گرم پروبیوتیک LA (T3) از پتانسیل افزایش رشد، ایمنی ذاتی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهی قرمز برخوردارند. هر دو مکمل خوراکی اثرات هم‌افزایی نشان دادند و توصیه می‌شود که از این ترکیبات به طور همزمان برای آبزی‌پروری پایدار استفاده شود.

منابع

Ahmadifar, E., Moghadam, M.S., Dawood, M.A. and Hoseinifar, S.H., 2019. *Lactobacillus fermentum* and/or ferulic acid improved the immune responses, antioxidative defence and resistance against *Aeromonas hydrophila* in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. *Fish and Shellfish Immunology*, 94:916-923. DOI:10.1016/j.fsi.2019.10.019.

Ahmadifar, E., Yousefi, M., Karimi, M., Fadaei Raieni, R., Dadar, M., Yilmaz, S., Dawood, M.A. and Abdel-Latif, H.M., 2020. Benefits of dietary polyphenols and polyphenol-rich additives to aquatic animal health: an overview. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture,* 29(4):478-511. DOI:10.1080/23308249.2020.1818689.

Ahmadifar, E., Kalhor, N., Dawood, M.A., Ahmadifar, M., Moghadam, M.S. and Yousefi, M., 2021. The blood and mRNA levels of antioxidant-related factors in common carp (*Cyprinus carpio*) fed p-Coumaric acid. *Fish Physiology and Biochemistry*, 47:59-68. DOI:10.1007/s10695-020-00894-6.

Bondad-Reantaso, M.G., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Tan, Z. and Shariff, M., 2005. Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary Parasitology*, 132(3-4):249-272. DOI:10.1016/j.vetpar.2005.07.005.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-06-28]

Burr, G.S., Li, P., Goff, J.B., Gatlin III, D.M., Grisdale-Helland, B. and Helland, S.J., 2006. Evaluation of growth performance and whole-body composition of juvenile hybrid striped bass *Morone chrysops*× *Morone saxatilis* and red drum *Sciaenops ocellatus* fed high-protein and high lipid diets. *Journal of the World Aquaculture Society,* 37(4):421-430. DOI:10.1111/j.1749-7345.2006.00055.x.

Cabello, F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8(7): 1137-1144. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x.

Cheng, A., Han, C., Fang, X., Sun, J., Chen, X. and Wan, F., 2016. Extractable and non-extractable polyphenols from blueberries modulate LPS-induced expression of iNOS and COX-2 in RAW264. 7 macrophages via the NF-κB signalling pathway. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(10):3393-3400. DOI:10.1002/jsfa.7519.

Chuang, C.C. and McIntosh, M.K., 2011. Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases. *Annual review of nutrition*, 31(1):155-176. DOI:10.1146/annurev-nutr-072610-145149.

Davis, M.W., 2010. Fish stress and mortality can be predicted using reflex impairment. *Fish and Fisheries*, 11(1):1-11. DOI:10.1111/j.1467-2979.2009.00331.x.

Dawood, M.A., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., El Basuini, M.F., Hossain, M.S., Nhu, T.H., Dossou, S. and Moss, A.S., 2016. Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* or/and *Lactococcus lactis* on the growth, gut microbiota and immune responses of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish and Shellfish Immunology*, 49:275-285. DOI:10.1016/j.fsi.2015.12.047.

Dawood, M.A., Metwally, A.E.S., El-Sharawy, M.E., Ghozlan, A.M., Abdel-Latif, H.M., Van Doan, H. and Ali, M.A., 2020. The influences of ferulic acid on the growth performance, haemato-immunological responses, and immune-related genes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to heat stress. *Aquaculture*, 525:735320. DOI:10.1016/j.aquaculture.2020.735320.

El-Dakar, A.Y., Shalaby, S.M. and Saoud, I.P., 2007. Assessing the use of a dietary probiotic/ prebiotic as an enhancer of spinefoot rabbitfish *Siganus rivulatus* survival and growth. *Aquaculture Nutrition*, 13(6):407-412. DOI:10.1111/j.1365-2095.2007.00491.x.

Enferadi, M.H.N., Mohammadizadeh, 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):351-356. DOI:10.4194/1303-2712-v18-2-14.

Etxeberria, U., Fernández-Quintela, A., Milagro, F.I., Aguirre, L., Martínez, J.A. and Portillo, M.P., 2013. Impact of

[Downloaded from isfj.ir on 2025-06-28]

Acta, 196(2-3): 143-151. DOI: 10.1016/0009-8981(91)90067-M.

Guardiola, F.A., Porcino, C., Cerezuela, R., Cuesta, A., Faggio, C. and Esteban, M.A., 2016. Impact of date palm fruits extracts and probiotic enriched diet on antioxidant status, innate immune response and immune-related gene expression of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish and Shellfish Immunology*, 52: 298-308. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.03.152.

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. DOI:10.1016/j.anifeedsci.2023.115872.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C. and Heo, M.S., 2011. Fish health aspects in grouper aquaculture. *Aquaculture*, 320(1-2): 1-21. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2011.07.022

Hoseinifar, S.H., Roosta, Z., Hajimoradloo, A. and Vakili, F., 2015. The effects of *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). *Fish and Shellfish Immunology,* 42(2):533-538. DOI:10.1016/j.fsi.2014.12.003.

polyphenols and polyphenol-rich dietary sources on gut microbiota composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(40):9517-9533. DOI:10.1021/jf402506c.

Fu, W., Amenyogbe, E., Luo, J., Yang, E., Huang, J.S., Chen, Y. and Chen, G., 2022. Influences of ferulic acid on intestinal digestive and antioxidant enzymes, immune, antioxidant gene and tight junction protein expression and microbiota in hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀× *Epinephelus polyphekadion*♂). *Aquaculture Reports*, 27:101348. DOI:10.1016/j.aqrep.2022.101348.

Gatesoupe, F.J., 2008. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 14(1-3):107-114. DOI:10.1159/000106089.

Gobi, N., Vaseeharan, B., Chen, J.C., Rekha, R., Vijayakumar, S., Anjugam, M. and Iswarya, A., 2018. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus. Fish and Shellfish Immunology*, 74:501-508. DOI:10.1016/j.fsi.2017.12.066.

Goth, L., 1991. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica*

[Downloaded from isfj.ir on 2025-06-28]

Quesada-García, A., Valdehita, A., Torrent, F., Villarroel, M., Hernando, M.D. and Navas, J.M., 2013. Use of fish farms to assess river contamination: combining biomarker responses, active biomonitoring, and chemical analysis. *Aquatic Toxicology*, 140: 439-448. DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.07.007.

Rico, A., Oliveira, R., McDonough, S., Matser, A., Khatikarn, J., Satapornvanit, K., Nogueira, A.J., Soares, A.M., Domingues, I. and Van den Brink, P.J., 2014. Use, fate and ecological risks of antibiotics applied in tilapia cage farming in Thailand. *Environmental Pollution*, 191:8-16. DOI:10.1016/j.envpol.2014.04.002.

Romero, J., Ringø, E. and Merrifield, D.L., 2014. The gut microbiota of fish. *Aquaculture Nutrition*: *Gut Health, Probiotics and Prebiotics*, 4:75-100. DOI:10.1002/9781118897263.ch.

Shohreh, P., Mohammadzadeh, S., Mahboub, H.H., Ahmadifar, E., Elsheshtawy, H.M., Kalhor, N., Moghadam, M.S. and Abdel-Tawwab, M., 2024. Growth performance, hematological profile, and related genes expression in goldfish (*Carassius auratus*) fed on rosmarinic acid-enriched diets and subjected to ambient ammonia. *Aquaculture*, 587:740861. DOI:10.1016/j.aquaculture.2024.740861.

Siwicki, A.K., Anderson, D.P. and Rumsey, G.L., 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and*

Kei, S., 1978. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clinica Chimica Acta*, 90(1):37-43. DOI:10.1016/0009-8981(78)90081-5.

Kumar, S. and Pandey, A.K., 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013(1):162750. DOI:10.1155/2013/162750.

Mandel, S., Packer, L., Youdim, M.B. and Weinreb, O., 2005. Proceedings from the "Third International Conference on mechanism of Action of Nutraceuticals". *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(9):513-520. DOI:10.1016/j.jnutbio.2005.03.001.

Mehana, E.E., Rahmani, A.H. and Aly, S.M., 2015. Immunostimulants and fish culture: an overview. *Annual Research and Review in Biology*, 5(6): 477-489. DOI: 10.9734/ARRB/2015/9558.

Paglia, D.E. and Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70(1): 158-169. PMID:6066618.

Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S. and Sugita, H., 2004. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102(4): 379-388. DOI:10.1016/j.vetimm.2004.08.006.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-06-28]

Weydert, Ch. J. and Cullen, J., 2009. Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature Protocols*, 5(1):51-66. DOI:10.1038/nprot.2009.197.

Yang, G., Cao, H., Jiang, W., Hu, B., Jian, S., Wen, C., Kajbaf, K., Kumar, V., Tao, Z. and Peng, M., 2019. Dietary supplementation of *Bacillus cereus* as probiotics in Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. Pengze): Effects on growth performance, fillet quality, serum biochemical parameters and intestinal histology. *Aquaculture Research*, 50(8):2207-2217. DOI:10.1111/are.14102.

Yousefi, M., Zahedi, S., Reverter, M., Adineh, H., Hoseini, S.M., Van Doan, H., El-Haroun, E.R. and Hoseinifar, S.H., 2021. Enhanced growth performance, oxidative capacity and immune responses of common carp, *Cyprinus carpio* fed with *Artemisia absinthium* extract-supplemented diet. *Aquaculture*, 545:737167. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.737167.

Yu, L., Wen, H., Jiang, M., Wu, F., Tian, J., Lu, X., Xiao, J. and Liu, W., 2020. Effects of ferulic acid on intestinal enzyme activities, morphology, microbiome composition of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed oxidized fish oil. *Aquaculture*, 528:735543. DOI:10.1016/j.aquaculture.2020.735543.

Immunopathology, 41(1-2):125-139. DOI:10.1016/0165-2427(94)90062-0.

Stapleton, H.M., Letcher, R.J. and Baker, J.E., 2004. Debromination of polybrominated diphenyl ether congeners BDE 99 and BDE 183 in the intestinal tract of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Science and Technology*, 38(4):1054-1061. DOI:10.1021/es0348804.

Tang, Y., Han, L., Chen, X., Xie, M., Kong, W. and Wu, Z., 2019. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus subtilis* affects antioxidant defenses and immune response in grass carp under *Aeromonas hydrophila* challenge. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11:545-558. DOI:10.1007/s12602-018-9409-8.

Tenciu, M., Sîrbu, E., Cristea, V., Patriche, N., Dima, M.F., Nistor, V. and Crețu, M., 2022. The synergistic effect of Technomos® prebiotic and Betaplus® probiotic on the growth and biochemical composition of Nile tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758). *Scientific Papers*. *Series D. Animal Science*, 65(2):415-425.

Villamil, O., Váquiro, H. and Solanilla, J.F., 2017. Fish viscera protein hydrolysates: production, potential applications and functional and bioactive properties. *Food Chemistry*, 224:160-171. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.12.057.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-06-28]