



University of Guilan with collaboration of Iranian
Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 11, No. 1, 2025, pages: 37-52
DOI: 10.22124/janb.2025.29612.1272



RESEARCH PAPER

OPEN ACCESS

Synbiotic effects of probiotic *Bacillus subtilis* and prebiotic inulin on growth performance, digestive enzymes, blood biochemical parameters and resistance to *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Golbahar Zeitounli, Hadi Raisi, Hossein Adineh*, Mohammad Harsij, Mohammad Farhangi

Department of Fisheries, Faculty of Agriculture Sciences and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Golestan, Iran

Received 18 January 2025

Revised 11 March 2025

Accepted 13 March 2025

Published online 28 May 2025

KEYWORDS ABSTRACT

Nile tilapia
Synbiotics
Digestive enzymes
Blood indices
Aeromonas hydrophila

Introduction: Synbiotics are combination of prebiotics and probiotics that are used in the aquaculture industry, but the mechanism of action of synbiotics can be different as growth and immunity stimulants in aquatic animals. In general, synbiotics optimize nutrient metabolism and create favorable biological conditions by maintaining the dominance of probiotic bacteria in the intestinal microbiota through the consumption of non-digestible prebiotics, thereby improving growth and immune performance. This study aimed to determine the effects of synbiotic supplementation (mixture of probiotic *Bacillus subtilis* and prebiotic inulin) on growth performance, digestive enzymes, biochemical factors, and resistance to *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).

Materials and methods: Two hundred and forty fish with initial body weight of 5.18 ± 0.83 g were randomly distributed in 12 tanks with 60 L of water. Fish were randomly fed with 4 experimental treatments (each with 3 replicates) with different levels of synbiotic supplement diets for 56 days, as follows: BI₀: control without supplement addition, BI₁: (2.5×10^{11} CFU/g probiotic *B. subtilis* + 2.5 g inulin), BI₂: (2.5×10^{11} CFU/g probiotic *B. subtilis* + 5 g inulin), BI₃: (2.5×10^{11} CFU/g probiotic *B. subtilis* + 10 g inulin).

Results: The results of this experiment showed that the highest weight and lowest feed conversion ratio were obtained in BI₂ and BI₃ compared to BI₁ and the control. Digestive enzyme assays showed that there was no significant difference in the lipase and amylase activity between the synbiotic and control treatments, while protease enzyme increased significantly in the synbiotic

feeding treatments. There was no significant difference in the concentration of protein, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase between the synbiotic feeding treatments and the control. The antibacterial activity of blood plasma of tilapia fed BI₃ was significant compared to the BI₀ (control).

Discussion and Conclusion: Synbiotics can improve the general health of aquatic animals, but it is very important to determine the effective compounds and doses on growth performance, digestive enzyme secretions, and blood biochemical components. Therefore, in the present study, a synbiotic combination (probiotic subtilis with different amounts of prebiotic inulin) in nutritional treatments with a dose of 2.5×10^{11} CFU/g probiotic *B. subtilis* + 5 and 10 g inulin of diet is recommended for Nile tilapia. Overall, growth performance, digestive secretions, immunity, and resistance to *Aeromonas hydrophila* in tilapia fed with different levels of synbiotic (probiotic *B. subtilis* + prebiotic inulin) improved in the experimental treatments, especially BI₂ and BI₃.

*Corresponding author: adineh.h@gmail.com; adineh.h@gonbad.ac.ir





"مقاله پژوهشی"

اثرات سین بیوتیکی پروبیوتیک باسیلوس سوبتیلیس و پری بیوتیک اینولین بر عملکرد رشد، آنزیم های گوارشی، پارامترهای بیوشیمیایی خون و مقاومت به باکتری *Aeromonas hydrophila* در ماهی تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus*)

گلپهار زیتونلی، هادی رئیسی، حسین آدینه*، محمد هرسیج، محمد فرهنگی
گروه شیلات، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، گلستان

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۲۹ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۱۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۳ تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۳/۰۷

کلمات کلیدی

چکیده

سین بیوتیک ها، ترکیبی بین پری بیوتیک ها و پروبیوتیک ها هستند که در صنعت آبی پروری استفاده می شوند، اما ساز و کار عملکرد سین بیوتیک ها به عنوان محرک های رشد و ایمنی در آبزیان متفاوت است. این مطالعه با هدف تعیین تأثیر جیره های مکمل سین بیوتیک (مخلوط پروبیوتیک باسیلوس سابتیلیس و پری بیوتیک اینولین) بر رشد، آنزیم های گوارشی، فاکتورهای بیوشیمیایی و مقاومت به باکتری آئروموناس هیدروفیلا در ماهی تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus*) انجام شد. تعداد ۲۴۰ عدد ماهی ($5/18 \pm 0/83$ گرم) در ۱۲ مخزن توزیع شدند. ماهیان به طور تصادفی در ۴ تیمار آزمایشی (هر یک با ۳ تکرار) به مدت ۵۶ روز با سطوح مختلف مکمل سین بیوتیک به شرح زیر تغذیه شدند: تیمار BI₀: شاهد بدون افزودن مکمل، تیمار BI₁: $2/5 \times 10^{11}$ CFU/g پروبیوتیک باسیلوس سابتیلیس + $2/5$ گرم اینولین، تیمار BI₂: 10^{11} CFU/g × $2/5$ پروبیوتیک باسیلوس سابتیلیس + 5 گرم اینولین، تیمار BI₃: $2/5 \times 10^{11}$ CFU/g پروبیوتیک باسیلوس سابتیلیس + 10 گرم اینولین. نتایج نشان داد بیشترین وزن و کمترین ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای BI₂ و BI₃ در مقایسه با تیمار BI₁ و شاهد به دست آمد. سنجش آنزیم های گوارشی نشان داد فعالیت آنزیم های لیپاز و آمیلاز بین تیمارهای سین بیوتیک و شاهد اختلاف معنی دار نداشت، ولی آنزیم پروتئاز در تیمارهای تغذیه با سین بیوتیک افزایش معنی دار داشت. غلظت پروتئین، آنزیم های ALT و AST بین تیمارهای تغذیه با سین بیوتیک و تیمار شاهد اختلاف معنی دار نداشت. فعالیت ضد باکتریایی پلاسمای خون ماهی تغذیه شده در تیمار BI₃ نسبت به شاهد BI₀ معنی دار بود. به طور کلی، عملکرد رشد، ترشحات گوارشی، ایمنی و مقاومت به باکتری آئروموناس هیدروفیلا در ماهی تیلاپای تغذیه شده با سطوح مختلف سین بیوتیک (پروبیوتیک باسیلوس سابتیلیس + پری بیوتیک اینولین) در تیمارهای آزمایشی به خصوص BI₂ و BI₃ بهبود یافت.

مقدمه

استفاده از فناوری‌های نوین و به‌کارگیری هم‌زمان ترکیبات زیست‌فعال همچون پروبیوتیک و پری‌بیوتیک (سین‌بیوتیک) در صنعت آبزی‌پروری به‌منظور افزایش بازدهی تولید و بهبود سلامت ممکن است در توسعه آبزی‌پروری پایدار برای گونه‌های مهم ماهیان تجاری حائز اهمیت باشد (Bajlan et al. 2017). پروبیوتیک‌ها ریزموجودات مفید و یا باکتری‌های سودمند در دستگاه گوارش موجودات زنده هستند که بر حسب فعالیت‌های متابولیک و آنزیم‌های مترشحه خارج یاخته‌ای از طریق بهبود تعادل میکروبی روده باعث افزایش کارایی و بهره‌برداری از غذا و تغذیه می‌شوند (De Marco et al. 2023). این ریزموجودات نه تنها باعث کاهش میکروب‌های بیماری‌زا در محیط و موجود زنده می‌شوند، بلکه با دگرگونی فلور میکروبی روده به سود باکتری‌های سودمند عملکرد روده میزبان را بهبود می‌بخشند (Torres-Maravilla et al. 2024). علاوه بر این، پروبیوتیک‌ها باعث تحریک اشتها و افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی (Irianto et al. 2002)، ایجاد تعادل میکروبی در روده میزبان، ساخت ترکیبات مفید از جمله ویتامین‌ها و برخی آنزیم‌ها، تحریک و افزایش کارایی دستگاه ایمنی و افزایش رشد و توسعه سطوح غذایی می‌شوند (Lara-Flores, 2011; Pandiyan et al. 2013). پری‌بیوتیک‌ها مواد مغذی غیر قابل هضم همچون کربوهیدرات‌های غیر قابل هضم، بعضی از پپتیدها، پروتئین‌ها و نیز برخی از چربی‌ها هستند که از طریق تحریک رشد و فعالیت یک یا تعداد محدودی از باکتری‌های موجود در روده اثرات سودمندی برای میزبان داشته و سلامت میزبان را بهبود می‌بخشد. از مهمترین محصولات حاصل از سوخت و ساز پری‌بیوتیک‌ها می‌توان به اسیدهای چرب زنجیره کوتاه مانند استات، پروپیونات، بوتیرات و اسید لاکتیک اشاره کرد که شرایط مناسب برای رشد باکتری‌های سودمند را فراهم می‌کنند (Wee et al. 2024).

سین‌بیوتیک‌ها ترکیبی از پروبیوتیک و پری‌بیوتیک هستند که از طریق حفظ غالبیت باکتری‌های پروبیوتیکی موجود در میکروبیوتای روده به‌واسطه مصرف پری‌بیوتیک‌های غیر قابل هضم باعث بهینه‌سازی سوخت و ساز مواد غذایی و ایجاد شرایط زیستی مطلوب و در نتیجه، منجر به بهبود عملکرد رشد و ایمنی می‌شوند (Azevedo et al. 2016). در باره اثرات مثبت به کارگیری سین‌بیوتیک در

جیره غذایی آبزیان می‌توان به اثرات سین‌بیوتیک تجاری بایومین ایمبو (Biomim®IMBO) بر عملکرد رشد، برخی شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی موکوس بافت پوست ماهی کاراس معمولی (*Carassius carassius*) (Sheikhzadeh and Heidarieh, 2020)، اثرات توأم بتاپلاس و الیگوساکاریدهای پری‌بیوتیک بر عملکرد رشد، شاخص کبدی، پارامترهای خونی و کیفیت لاشه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*) (Aftabgard et al. 2020)، تأثیر استفاده از سین‌بیوتیک تولید شده از عصاره قارچ دکمه‌ای همراه با دو گونه از باکتری‌های اسیدلاکتیک بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی، ترکیب لاشه، رشد و فلور میکروبی روده در ماهی زبرا (*Danio rerio*) (Zakariaei et al. 2022)، و تأثیر استفاده از سین‌بیوتیک پکتین و لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر عملکرد رشد و بیان ژن‌های مرتبط با رشد بچه فیل‌ماهی (*Huso huso*) (Jabbari et al. 2023) اشاره کرد. همچنین، در مطالعات انجام شده مشخص شد که به‌کارگیری بتا گلوکان به همراه لاکتوباسیلوس پنتوزوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم در جیره غذایی به عنوان یک سین‌بیوتیک بر عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان جوان (Mohammadian et al. 2024)، به‌کارگیری جیره غذایی مکمل‌سازی شده با سلنیوم آلی و سین‌بیوتیک دی‌پروپلاس (+Dipro) به‌صورت جداگانه و تلفیقی روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی، فلور باکتریایی روده و بافت‌شناسی روده در ماهی آزاد دریای خزر (Akbarabadi et al. 2024) تأثیر مثبت معنی‌داری داشت. در خصوص استفاده از ترکیبات سین‌بیوتیک در جیره غذایی ماهی تیلپیا گزارش شده است که به‌کارگیری سین‌بیوتیک باسیلوس سوبتیلیس میکروکپسوله شده و بتا گلوکان (do Carmo Alves et al. 2024)، تغذیه ماهی تیلپای نیل با پروبیوتیک، پری‌بیوتیک و سین‌بیوتیک باعث بهبود عملکرد رشد و پاسخ ایمنی می‌شود (Ghaly et al. 2023; El-Hamid et al. 2024).

ماهی تیلپیا (*Oreochromis niloticus*) یکی از گونه‌های پرورشی تجاری مهم برای تأمین پروتئین در جهان است که تولید آن در مقایسه با دیگر آبزیان هزینه کمتری دارد. از این‌رو، این گونه به‌عمومی‌ترین ماهی برای پرورش در دنیا تبدیل شده و برداشت جهانی این گونه از ۶ میلیون

تن فراتر رفته است و پس از کپور بالاترین تولید را به خود اختصاص داده است (Watanabe et al. 2002; FAO, 2021). در دهه‌های اخیر تولید صنعتی ماهی تیلاپیا به‌خاطر رشد سریع، پرورش آسان، مقاومت به بیماری و نیاز کم به آب توسعه بسیار وسیعی یافته است و در حال حاضر این صنعت در بیش از یکصد کشور دنیا بهره‌برداری می‌شود. هدف از اجرای این تحقیق، بررسی اثرات به کارگیری سین بیوتیک بر عملکرد رشد و تغذیه، ترشحات آنزیم‌های گوارشی روده و مقاومت به بیماری آئروموناس هیدروفیلا در ماهی تیلاپیای نیل بود.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایش

تعداد ۲۴۰ قطعه ماهی تیلاپیای نیل پس از ۱۰ روز دوره سازگاری با شرایط آزمایشگاه (آزمایشگاه مهندسی آبزیان دانشگاه گنبد کاووس) و تغذیه با جیره پایه با تراکم ۲۰ قطعه (میانگین وزن اولیه 0.18 ± 0.05 گرم) در مخازن ۶۰ لیتری ذخیره‌سازی شد. ماهیان به‌طور تصادفی در چهار تیمار آزمایشی و هر یک با سه تکرار به مدت ۵۶ روز با سطوح مختلف مکمل سین‌بیوتیک تغذیه شدند. برای تهیه سین‌بیوتیک از پروبیوتیک *Bacillus subtilis* IS02

تهیه شده از شرکت تک ژن زیست و پری‌بیوتیک اینولین استفاده شد. جیره پایه بر اساس نیازمندی‌های توصیه شده برای ماهی تیلاپیا و با استفاده از نرم‌افزار جیره‌نویسی UFFDA تنظیم شد (جدول ۱). برای تهیه جیره غذایی پایه اقلام غذایی مانند پودر ماهی، پودر گوشت، آرد سویا، آرد گندم، آرد ذرت، روغن ماهی، روغن سویا، ال-لایزین، دی‌ال-متیونین، مکمل ویتامینه و مکمل معدنی تهیه، و پس از مخلوط کردن در میکسر برای خمیری شدن آب استریل اضافه شد. غذا به ۴ قسمت تقسیم شد که شامل تیمار BI₀: شاهد بدون افزودن مکمل، تیمار BI₁: $10^{11} \times 2/5$ پروبیوتیک سابتیلیس + $2/5$ گرم اینولین، تیمار BI₂: $10^{11} \times 2/5$ cfu/g پروبیوتیک سابتیلیس + ۵ گرم اینولین، تیمار BI₃: $10^{11} \times 2/5$ cfu/g پروبیوتیک سابتیلیس + ۱۰ گرم اینولین) بود. چهار خمیر آماده شده از چرخ گوشت عبور داده شد تا رشته‌های غذایی تهیه و سپس در آون در محدوده دمایی ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. غذادهی روزانه به میزان ۴٪ وزن بدن (Yousefi et al. 2025) و تعویض آب روزانه به میزان ۳۰٪ بود. شاخص‌های کیفی آب با میانگین دمای 25.16 ± 0.19 درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول 0.25 ± 0.19 میلی‌گرم در لیتر، pH 7.63 ± 0.18 ، غلظت آمونیاک کل 0.03 ± 0.15 میلی‌گرم در لیتر ثبت شد.

جدول ۱ اجزای تشکیل‌دهنده جیره پایه

Table 1 Components of the basal diet

Ingredients	Percentage	Proximate composition	Percentage
Fish meal	50	Crude protein	38.41
Meat meal	340	Crude lipid	9.30
Soybean meal	211	Dry matter	89.97
Wheat flour	270	Fiber	3.29
Corn flour	90	Crude Ash	4.60
Sunflower oil	9		
Corn oil	9		
Lysine	3		
Methionine	3		
Vitamin premix	5		
Mineral premix	10		

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد و تغذیه

در پایان دوره آزمایش، شاخص‌های رشد و تغذیه ماهی تیلاپیای نیل سنجش شد. وزن کل با ترازوی دیجیتالی با

دقت ۰/۰۱ گرم و درازای کل با استفاده از تخته زیست‌سنجی با دقت ۰/۱ سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. فرمول‌های به کار رفته در این تحقیق به شرح زیر است:

افزایش وزن (WG, g) = میانگین وزن نهایی (گرم) - میانگین وزن اولیه (گرم)

درصد افزایش وزن (WGR, %) = $\frac{[وزن نهایی (گرم) - وزن اولیه (گرم)]}{وزن اولیه (گرم)} \times 100$

نرخ رشد ویژه (SGR, %/day) = $\frac{[ln(وزن نهایی (گرم)) - ln(وزن اولیه (گرم))]}{مدت زمان پرورش (روز)} \times 100$

ضریب تبدیل غذایی (FCR) = $\frac{[مقدار غذای مصرف شده (گرم)]}{[وزن نهایی (گرم) - وزن اولیه (گرم)]}$

کارایی تبدیل غذا (FCE, %) = $\frac{[وزن به دست آمده]}{[مقدار غذای مصرف شده (گرم)]} \times 100$

سنجش آنزیم‌های دستگاه گوارش

نمونه‌ها با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن شدند و سپس به نسبت وزنی-حجمی (۱ به ۹) با محلول بافر همگن شدند (Cahu et al. 1999). برای تهیه عصاره آنزیمی ابتدا بافر ساخته شد که به این منظور ۱۰۰ میلی-مولار Tris-HCl، ۰/۱ میلی-مولار EDTA و ۰/۱ Triton در پی‌اچ ۷/۸ همگن شدند. نمونه‌ها در دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد که در نهایت مایع رویی به دست آمده به عنوان عصاره آنزیمی برای سنجش جدا شد (-Rungruangsak, 2002). میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی بر مبنای واحد/میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد. آمیلاز و پروتئاز بر اساس روش ورتینگتون انجام شد (Worthington, 1993). سنجش آنزیم لیپاز با استفاده از هیدرولیز p-Nitrophenyl myristate به عنوان سوبسترا در متوکسی اتانول ۰/۲۵ میلی‌مولار، Sodium Cholate ۵ میلی‌مولار و Tris-HCl ۰/۲۵ میلی‌مولار در پی-اچ ۹ انجام شد. فعالیت اختصاصی لیپاز برابر است با آزادسازی یک میکرومول پارا-نیتروفنل در یک دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد که در ۴۰۵ نانومتر خوانده شد (Iijima et al. 1998).

سنجش شاخص‌های خون و قدرت باکتری‌کشی

پایان دوره تغذیه با سین‌بیوتیک، قطع غذایی انجام و به طور تصادفی تعداد ۳ قطعه ماهی از هر تکرار صید، خونگیری و پس از جداسازی پلاسما توسط سانتریفیوژ، همه نمونه‌ها در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه گنبد کاووس نگهداری شد. فعالیت آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارات ترانس‌آمیناز (AST) پلاسما خون با استفاده از کیت‌های تجاری پارس آزمون (کرج، ایران) و با دستگاه آنالیزور بیوشیمیایی خودکار تعیین شدند. میزان پروتئین کل، گلوکز و کلسترول با استفاده از کیت‌های تجاری (پارس

آزمون، کرج، ایران) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده و به روش رنگ‌سنجی تعیین شد.

برای بررسی قدرت باکتری‌کشی پلاسما خون از روش گزارش شده توسط Kajita و همکاران (۱۹۹۰) و همچنین Barnes و همکاران (۲۰۰۳) استفاده شد. به این منظور ابتدا کشت باکتری *Aeromonas hydrophila* در محیط TBS به مدت ۴۸ ساعت انجام شد و سپس یاخته‌های باکتریایی توسط دستگاه سانتریفیوژ در دانه ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جمع‌آوری و با افزودن مقداری بافر فسفات سدیم استریل به آنها جذب نوری سوسپانسیون به دست آمده در طول موج ۵۴۶ نانومتر برابر ۱ تنظیم شد. سپس تعداد باکتری به میزان 10^5 باکتری در میلی‌لیتر در ژلاتین ورنال بافر استریل (حاوی ۰/۵ میلی‌مول در میلی‌لیتر یون کلسیم و ۰/۱۵ میلی‌مول در میلی‌لیتر یون منیزیم با pH ۷/۵) تنظیم شد. سوسپانسیون باکتریایی به دست آمده به نسبت ۱:۱ با پلاسما ترکیب، و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با حرکت ملایم انکوبه شد. سپس ۵ میکرولیتر از مخلوط پلاسما و باکتری در محیط کشت TSA در سه تکرار کشت داده شد. محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس به کمک دستگاه کلونی کانتر (پرگنه‌شمار) تعداد پرگنه‌های باکتریایی رشد یافته بر روی محیط کشت شمارش شد. نتایج به صورت متوسط تعداد باکتری شمارش شده در هر سه تکرار برای هر نمونه گزارش شد.

سنجش آماری

ابتدا داده‌ها وارد محیط Excel و سپس نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون شاپیرو-ویلکس در محیط SPSS بررسی شد. از آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (One-Way ANOVA) برای مقایسه آماری تیمارها و از روش دانکن برای بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها تیمارهای مختلف آزمایشی (تیمارهای تغذیه با

سین‌بیوتیک) استفاده شد. آزمون‌های آماری در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ بررسی شد ($P < 0.05$). رسم نمودارها و آزمون داده‌ها به ترتیب با استفاده از نرم‌افزار Excel و SPSS در محیط ویندوز انجام شد.

نتایج

نتایج به دست آمده از سنجش آماری شاخص‌های رشد و تغذیه ماهی تیلاپای تغذیه شده با سین‌بیوتیک در جدول

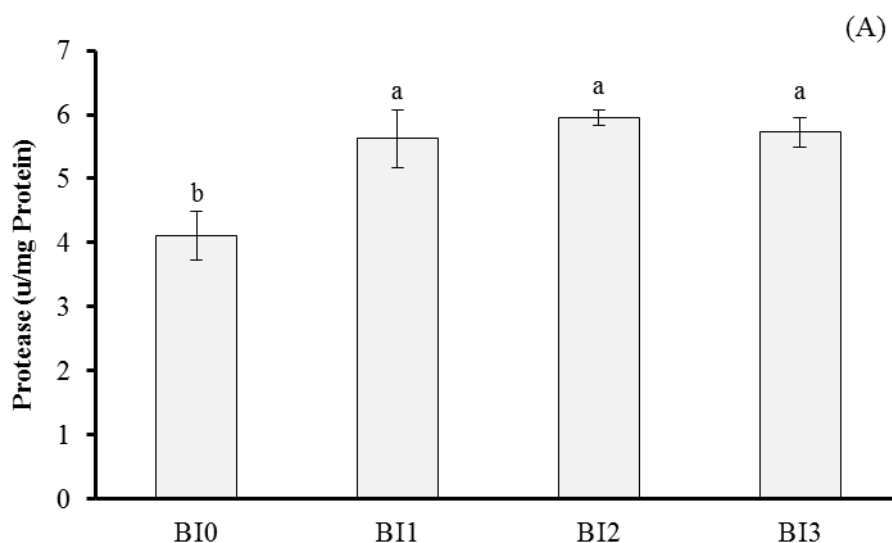
۲ آورده شده است. پس از ۵۶ روز تغذیه با سین‌بیوتیک، وزن نهایی بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری داشت، به طوری که بیشترین و کمترین آن به ترتیب در تیمارهای BI₃ و شاهد BI₀ به دست آمد ($P < 0.05$). نرخ رشد ویژه در تیمارهای تغیه با سین‌بیوتیک تفاوت معنی‌داری نداشتند ($P > 0.05$). ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای تغذیه با سین‌بیوتیک در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌دار داشت ($P < 0.05$).

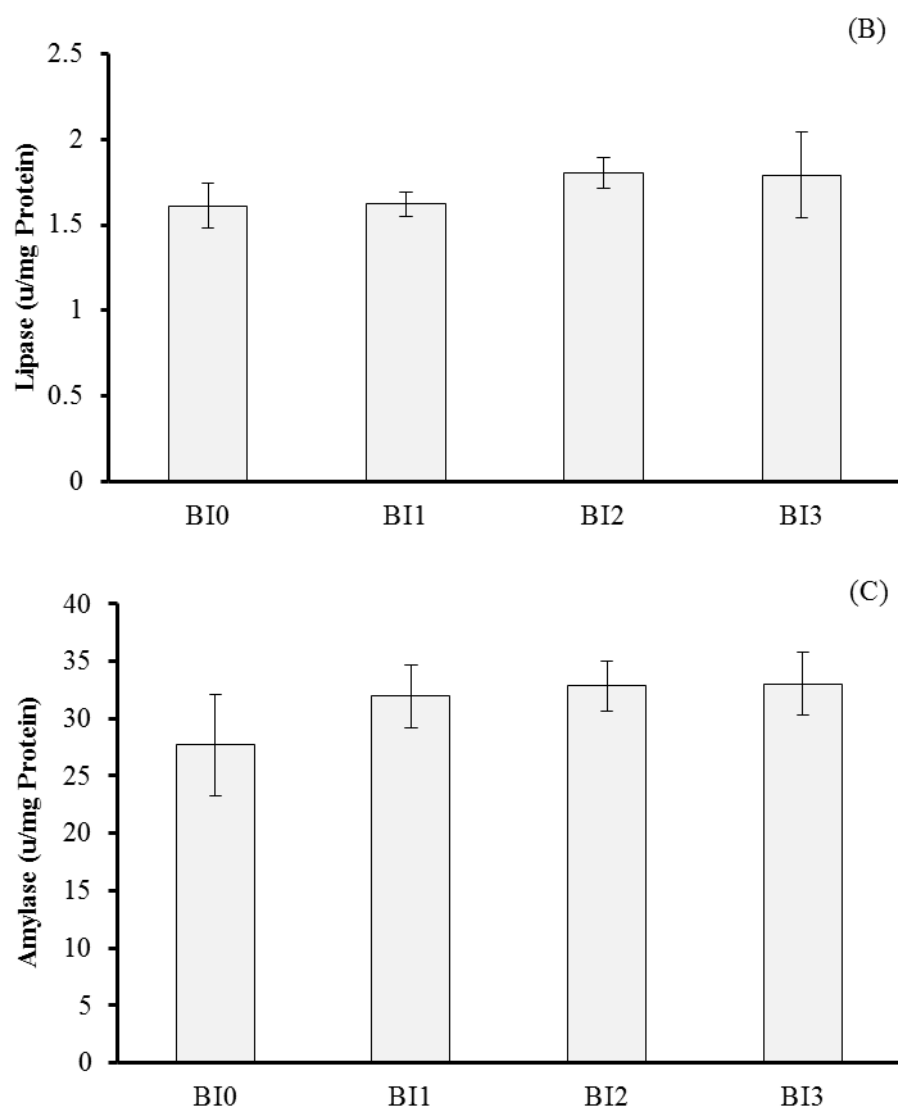
جدول ۲ شاخص‌های رشد و تغذیه ماهی تیلاپای نیل تغذیه شده با سطوح مختلف سین‌بیوتیک به مدت ۵۶ روز

Table 2 Growth and feeding indices of Nile tilapia fed with different levels of synbiotic for 56 days

	BI0 (Control)	BI1 (0.5 g)	BI2 (1 g)	BI3 (2 g)
Initial weight (g)	5.11 ± 0.88	5.00 ± 0.86	5.20 ± 0.91	5.44 ± 0.73
Final weight (g)	17.48 ± 2.24 ^c	19.35 ± 1.43 ^{bc}	21.21 ± 1.90 ^{ab}	21.80 ± 1.62 ^a
Weight gain (g)	12.36 ± 1.85 ^b	14.35 ± 1.57 ^{ab}	16.00 ± 2.24 ^a	16.36 ± 1.72 ^a
Weight gain (%)	247.04 ± 50.95	295.91 ± 71.17	319.04 ± 84.59	307.09 ± 67.09
SGR (%/day)	2.20 ± 0.16	2.43 ± 0.31	2.52 ± 0.37	2.48 ± 0.27
FCR	1.61 ± 0.25 ^a	1.47 ± 0.14 ^{ab}	1.28 ± 0.17 ^b	1.29 ± 0.14 ^b

Non-similar letters in each row indicate a statistically significant difference between experimental treatments (Duncan; $P < 0.05$).





شکل ۱ فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی تیلاپای نیل تغذیه شده با سطوح مختلف مکمل سین بیوتیک. حروف انگلیسی غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری بین تیمارهای آزمایشی است (دانکن؛ $P < 0.05$).

Figure 1 Digestive enzymes activity of Nile tilapia fed with different levels of synbiotic supplementation. Non-similar letters in each column indicate a statistically significant difference between experimental treatments (Duncan; $P < 0.05$).

تیمارهای آزمایشی اختلافی نداشت ($P > 0.05$)، درحالی‌که بیشترین مقدار آن در تیمار BI3 به دست آمد. گلوکز در تیمارهای BI0 و BI1 افزایش معنی‌داری نسبت به دیگر تیمارهای آزمایشی داشت. غلظت کلسترول خون در تیمارهای تغذیه‌ای و شاهد اختلاف داشتند، به طوری که کمترین مقدار آن در تیمار BI3 به دست آمد ($P < 0.05$). آنزیم‌های ضد اکسایشی کبدی آلانین آمینوترانسفراز و آسپاراتات آمینوترانسفراز بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$) و کمترین مقدار آنها در تیمار BI3 به دست آمد.

فعالیت آنزیم‌های گوارشی پروتئاز، لیپاز و آمیلاز در شکل ۱ آورده شده است. فعالیت آنزیم پروتئاز بین تیمارهای تغذیه با سطوح مختلف سین بیوتیک (0.5 ، 1 و 2 گرم در کیلوگرم) و تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). فعالیت آنزیم‌های لیپاز و آمیلاز بین تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری نداشت، اما مقادیر آنها در تیمارهای سین بیوتیک افزایشی بود ($P > 0.05$).

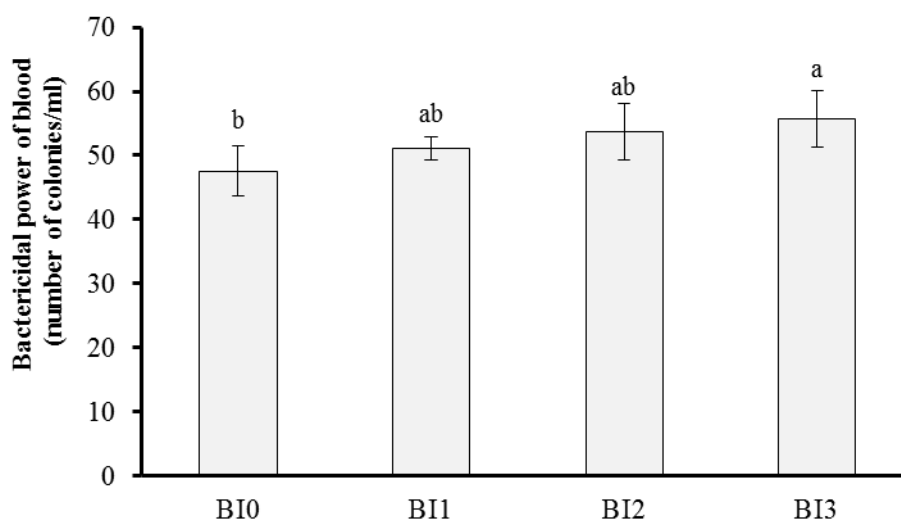
میانگین سنجش فراسنجه‌های بیوشیمیایی پلاسمای خون ماهی تیلاپای تغذیه شده با سطوح مختلف مکمل سین بیوتیک در جدول ۳ آورده شده است. پروتئین کل بین

جدول ۳ فراسنجه‌های بیوشیمیایی ماهی تیلاپای نیل تغذیه شده با سطوح مختلف مکمل سین‌بیوتیک

Table 3 Biochemical parameters of Nile tilapia fed with different levels of synbiotic supplement

	BI0 (Control)	BI1 (0.5 g)	BI2 (1 g)	BI3 (2 g)
Total protein (g/dL)	2.70 ± 0.48	2.80 ± 0.20	2.96 ± 0.16	3.09 ± 0.17
Glucose (mg/dL)	95.07 ± 0.92 ^a	91.91 ± 1.21 ^a	87.00 ± 2.03 ^b	83.99 ± 3.45 ^b
Cholesterol (mg/dL)	122.1 ± 7.98 ^a	119.56 ± 5.6 ^a	108.6 ± 9.25 ^a	94.03 ± 4.53 ^b
ALT (U/L)	30.43 ± 2.30	31.30 ± 1.12	32.50 ± 1.80	29.64 ± 1.51
AST (U/L)	201.69 ± 7.63	197.39 ± 9.38	198.04 ± 6.49	190.68 ± 4.95

Non-similar letters in each row indicate a statistically significant difference between experimental treatments ($P < 0.05$).



شکل ۲ فعالیت باکتری‌کشی خون ماهی تیلاپای نیل تغذیه شده با سطوح مختلف مکمل سین‌بیوتیک به آئروموناس هیدروفیلا. حروف انگلیسی غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری بین تیمارهای آزمایشی است (دانکن؛ $P < 0.05$).

Figure 2 Bactericidal activity of blood plasma of Nile tilapia fish fed with different levels of synbiotic supplementation against *Aeromonas hydrophila*. Non-similar letters in each column indicate a statistically significant difference between experimental treatments (Duncan; $P < 0.05$).

متداول‌ترین مکمل‌های غذایی جدایی‌ناپذیر در صنعت آبی‌پروری بسیار مورد توجه بوده است (Mehrabi et al. 2012)، و زمینه استفاده از آنها در سرتاسر جهان و از جمله ایران نتایج امیدوارکننده‌ای به دنبال داشته است. سین‌بیوتیک‌ها که ترکیبی از پروبیوتیک و پری‌بیوتیک هستند، اثرات سودمندی برای میزبان از طریق القای مکمل‌های غذایی میکروبی زنده در دستگاه گوارش به واسطه تحریک انتخابی رشد و یا از طریق فعال کردن متابولیسم یک یا تعداد معدودی از باکتری‌های تقویت‌کننده سلامتی داشته، بنابراین منجر به بهبود بقا، رشد و در نهایت سلامت میزبان می‌شود (Lee et al. 2024). در تحقیق حاضر، سطوح مختلف پروبیوتیک سابتیلیس و پری‌بیوتیک

قدرت باکتری‌کشی پلاسمای خون در ماهی تیلاپای تغذیه شده با سطوح مختلف سین‌بیوتیک در شکل ۲ نشان داده شده است. قدرت باکتری‌کشی پلاسمای خون ماهی تیلاپای تغذیه شده در تیمار BI3 نسبت به شاهد BI0 معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

بحث

با رشد روزافزون جمعیت یکی از راهکارهای مهم در بهبود توسعه پایدار صنعت آبی‌پروری، استفاده از مکمل‌های غذایی با قابلیت بهبود عملکرد رشد و ایمنی است. در این راستا استفاده از تحقیقات انجام شده در خصوص به کارگیری مکمل‌های پروبیوتیکی و پری‌بیوتیکی به عنوان

بهبود عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی (Zaineldin et al. 2018) دارد. در مطالعه حاضر، سنجش آنزیم‌های گوارشی ماهی تیلاپیای تغذیه شده با مکمل سین‌بیوتیک دارای سطوح مختلف اینولین نشان داد که غلظت آنزیم‌های لیپاز و آمیلاز بین تیمارهای تغذیه با سین‌بیوتیک و شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت، در حالی که غلظت آنزیم پروتئاز در تیمارهای تغذیه با سین‌بیوتیک افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد داشت. بر اساس مطالعات منتشر شده، پروبیوتیک زنده و اسپور باسیلوس سوبتیلیس در رشد و زنده ماندن باکتری‌های مفید تولید کننده اسید لاکتیک در دستگاه گوارش نقش بسزایی را ایفا می‌کند (Nayak, 2010). علاوه بر این، پری‌بیوتیک‌ها سد مخاطی روده را بهبود می‌بخشند، رشد فلور روده را افزایش می‌دهند و در برابر ریزموجودات بیماری‌زا در بافت پوششی روده بزرگ محافظت انجام می‌شود (Akhter et al. 2015). از این رو، پری‌بیوتیک اینولین یک فیبر غیر قابل هضم است که باعث افزایش باکتری‌های اسید لاکتیک در جهت تخمیر مواد مغذی در دستگاه گوارش می‌شود (Yones et al. 2020). به همین ترتیب، تجویز سین‌بیوتیک‌ها می‌تواند از اختلالات گوارشی جلوگیری کند و انرژی و مواد مغذی بیشتری را برای میزبان فراهم کند. مطالعات نشان داده است که سین‌بیوتیک‌ها می‌توانند عملکرد سد بافت پوششی روده، ارتفاع پرز و تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه را افزایش دهند (Sewaka et al. 2019). با توجه به اینکه در بیشتر پژوهش‌های منتشر شده، استفاده از اینولین به تنهایی نتوانسته تأثیر مثبت بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی لیپاز، پروتئاز و آمیلاز داشته باشد (Eshaghzadeh et al. 2015; Ajdari et al. 2022)، اما به کارگیری سین‌بیوتیک (باسیلوس و اینولین) می‌تواند منجر به تحریک فعالیت آنزیم‌های گوارشی شود (Wang et al. 2017) که با پژوهش حاضر مطابقت داشت.

فراسنجه‌های خونی تحت تأثیر عوامل زیست محیطی، غذا و تغذیه، تراکم ذخیره سازی، روش پرورش و غیره قرار می‌گیرد (Fanouraki et al. 2007). بنابراین، سنجش فراسنجه‌های خونی ماهیان یکی از ابزارهای مناسب برای بررسی سلامت و ایمنی است. در پژوهش حاضر، مقادیر غلظت پروتئین، آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز و آسپارات آمینوترانسفراز بین تیمارهای تغذیه با سین-

اینولین به‌عنوان مکمل سین‌بیوتیک در جیره غذایی ماهی تیلاپیای نیل بررسی شد. نتایج بدست آمده از این آزمایش نشان داد که بیشترین وزن و کمترین ضریب تبدیل غذایی به‌ترتیب در تیمارهای BI₂ (۱۰^{۱۱}) یاخته در هر گرم پروبیوتیک سابتیلیس + ۵ گرم اینولین و BI₃ (۱۰^{۱۱}) یاخته در هر گرم پروبیوتیک سابتیلیس + ۱۰ گرم اینولین در مقایسه با تیمار BI₁ و شاهد به دست آمد.

مطالعات در خصوص استفاده از اینولین در جیره غذایی آبزیان نشان از بهبود عملکرد رشد و شاخص‌های خونی دارد که در این ارتباط گزارش شده است. افزودن اینولین در جیره غذایی ماهی تیلاپیا به مقدار ۲/۵ گرم به ازای هر کیلوگرم غذا (Yones et al. 2020) و ۵ گرم به ازای هر کیلوگرم غذا (Tiengtam et al. 2017) باعث بهبود عملکرد رشد و تغذیه می‌شود. اینولین‌ها گروهی از پلی-ساکاریدهای طبیعی هستند که می‌توان در تغذیه ماهی استفاده کرد. همچنین این مکمل حاوی فیبر است که توسط آنزیم‌های گوارشی موجود در دستگاه گوارش قابل هضم نیست، اما اثر بی‌نظیری در روده دارد و فلور روده مانند باکتری‌های اسید لاکتیک را افزایش می‌دهد و فواید زیادی بر روی اثرات تعدیل‌کننده ایمنی نیز دارد (Vogt et al. 2015). برخلاف یافته‌های تحقیق حاضر، دیگر مطالعات هیچ اثری از اینولین بر عملکرد رشد برخی گونه‌ها مانند ماهی تیلاپیای نیل (Ibrahim et al. 2010; Abate et al. 2023)، تیلاپیای هیبرید (He et al. 2003)، ماهی آزاد اقیانوس اطلس (Grisdale-2008)، فیل ماهی (Helland et al. 2008) و ماهی کپور (Eshaghzadeh et al. 2015) نشان ندادند. نتایج متناقضی از تأثیرات به کارگیری مکمل اینولین در جیره غذایی آبزیان گزارش شده است که احتمالاً به دلیل سطوح دوز متفاوت اینولین، تخمیرپذیری آن توسط میکروبیوتای روده و ریخت‌شناسی متفاوت روده است (Hoseinifar et al. 2010).

باکتری باسیلوس سوبتیلیس از جمله پروبیوتیک‌هایی است که به دلیل دارا بودن قابلیت شکستن پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها، تولید برخی ویتامین‌های متعلق به گروه B (بیوتین و کوبالامین) قادر به سوخت و ساز بهتر مواد غذایی است (Savustyanenko, 2016; Nayak, 2021) و در آبی‌پروری نیز تحقیقات بسیاری در زمینه تأثیر این باکتری پروبیوتیک بر آبزیان انجام شده است که نشان از

پلاسمای خون ماهی تیلاپای تغذیه شده با مکمل سین-بیوتیک در برابر بیماری ناشی از باکتری آئروموناس هیدروفیلا در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، قدرت باکتری‌کشی در تیمارهای تغذیه با سین‌بیوتیک (باسیلوس سابتیلیس و اینولین) و به‌خصوص تیمار BI₃ افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد داشت. همسو با تحقیق حاضر، نتایج تحقیقات منتشرشده نشان می‌دهد که استفاده از پروبیوتیک و پری-بیوتیک (سین‌بیوتیک) در جیره غذایی آبزیان و به‌خصوص ماهی تیلاپای نیل منجر به افزایش مقاومت در برابر عفونت باکتریایی آئروموناس هیدروفیلا می‌شود (Cavalcante et al. 2020; Mugwanya et al. 2021; Mohammadi et al. 2022).

نتیجه‌گیری

به طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که ترکیب سین-بیوتیک (پروبیوتیک سابتیلیس با مقادیر مختلف پری-بیوتیک اینولین) در تیمارهای مختلف تغذیه‌ای می‌تواند باعث بهبود عملکرد رشد و ترشح آنزیم پروتئاز و افزایش مقاومت به باکتری آئروموناس هیدروفیلا شود و در این خصوص مقدار $10^{11} \times 2/5$ cfu/g پروبیوتیک سابتیلیس به همراه ۵ تا ۱۰ گرم اینولین بر کیلوگرم جیره غذایی ماهی تیلاپا توصیه می‌شود.

منابع

Abate, T., Getahun, A., Geremew, A., Solomon, D., Recha, J.W., Ambaw, G., Solomon, D. 2023. Effects of single or mixed dietary supplementation of inulin or mannan-oligosaccharide (MOS) on growth, feed utilization, fatty acid profiles, gut morphology, and hematology in Nile tilapia fry. *Ethiopian Journal of Biological Sciences* 22: 89-109.

Aftabgard, M., Salarzadeh, A., Mohseni, M., Rastravan, M.E., Bahri, A.H., Zorriehzadra, S.J. 2020. The synergistic effects of BetaPlus® Ultra and prebiotic oligosaccharides on growth performance, hepatosomatic index, hematological parameters, and carcass

بیوتیک و تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت. در همین راستا، گزارش شده است که استفاده از باسیلوس سابتیلیس در جیره غذایی ماهی تیلاپای نیل بر فعالیت آنزیم‌های کبدی تأثیری نداشت (El-Son et al. 2022)، درحالی که در تحقیقی، به کارگیری اینولین و ترکیب آن با پروبیوتیک (سین‌بیوتیک) در جیره غذایی ماهی کپور معمولی منجر به کاهش معنی‌دار آنزیم‌های کبدی شد (Ajdari et al. 2022). پری‌بیوتیک اینولین با تقویت سطح بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیلوس‌ها در دستگاه گوارش باعث افزایش توان سلامت از طریق بهبود دستگاه ایمنی گونه‌های ماهی می‌شود (Cerezuela et al. 2008; Ghafarifarsani et al. 2021).

بیماری آئروموناس هیدروفیلا یکی از بیماری‌های باکتریایی شایع در پرورش آبزیان گرمابی از جمله ماهی تیلاپاست که باعث کاهش رشد و تضعیف دستگاه ایمنی و در نتیجه، مرگ‌ومیر مزمن می‌شود (Shirajum Monir et al. 2020). بیماری‌زایی این باکتری به دلیل تولید اندوتوکسین‌ها و همولیزین است و باعث سندرم اولسراتیو اپیزوتیک (EUS) می‌شود (Rigney et al. 1978). در بیشتر پژوهش‌های انجام شده تمرکز بر بررسی میزان تلفات و تغییرات شاخص‌های ایمنی ماهی تیلاپای تغذیه شده با پروبیوتیک باسیلوس سوبتیلیس در برابر بیماری ناشی از باکتری آئروموناس هیدروفیلا بوده است (Iwashita et al. 2015; Kuebutornye et al. 2020; Bunkaew et al. 2024)، درحالی که در این مطالعه

quality of Caspian trout (*Salmo caspius*). *Iranian Scientific Fisheries Journal* 29: 99-110. DOI: /20.1001.1.10261354.1399.29.5.6.2

Ajdari, A., Ghafarifarsani, H., Hoseinifar, S. H., Javahery, S., Narimanizad, F., Gatphayak, K., Van Doan, H. 2022. Effects of dietary supplementation of primaLac, inulin, and biomin imbo on growth performance, antioxidant, and innate immune responses of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Nutrition* 8297479. DOI: 10.1155/2022/8297479

Akbarabadi, M., Khara, H., Vahabzadeh, H., Ahmadnezhad, M., Safari, R. 2024. The effect of diet supplemented with

- organic selenium (Selenomethionine) and synbiotic diproplus (Dipro+) separately and combined on the activity of digestive enzymes, intestinal bacterial flora and intestinal histology in Caspian Sea salmon (*Salmo caspius*). Journal of Applied Ichthyological Research 12: 41-50.
- Akhter, N., Wu, B., Memon, A.M., Mohsin, M. 2015. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: a review. Fish & shellfish Immunology 45: 733-741. DOI: 10.1016/j.fsi.2015.05.038
- Akrami, A., Hajimoradloo, A., Matinfar, A., Abedian Kinai, A. 2009. Effect of dietary prebiotic Inulin on growth performance, intestinal microflora, body composition and hematological performance of juvenile Beluga *Huso huso* (Linnaeus, 1758). Journal of the World Aquaculture Society 40: 771-779. DOI: 10.1111/j.1749-7345.2009.00297.x
- Azevedo, R.V., Fosse Filho, J.C., Pereira, S.L., Andrade, D.R., Júnior, V. 2016. Prebiótico, probiótico e simbiótico para larvas de *Trichogaster leeri* (Bleeker, 1852, Perciformes, Osphronemidae). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 68: 795-804. DOI: 10.1590/1678-4162-8580
- Bajlan, B., Zakeri, M., Mousavi, S.M., Yavari, V., Rajabzadeh, A. 2017. Effects of dietary supplementation of synbiotic on growth performance, feed utilization and body biochemical composition of Benni, *Mesopotamichthys sharpeyi*. Journal of Animal Research (Iranian Journal of Biology) 30: 1-14. DOI: 20.1001.1.23832614.1396.30.4.2.7
- Barnes, A.C., Young, F.M., Horne, M.T., Ellis, A.E. 2003. *Streptococcus iniae*: serological differences, presence of capsule and resistance to immune serum killing. Diseases of Aquatic Organisms 53: 241-247. DOI: 10.3354/dao053241
- Bunkaew, K., Yenraksa, A., Pewhom, A., Kiriratnikom, S., Sewaka, M., Lertworapreecha, M., Chanasit, W. 2024. Dietary administration effects of Microbial Exopolysaccharide from *Bacillus subtilis* P1 on biological activities, growth performance and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Microbiology Research 15: 2210-2231. DOI: 10.3390/microbiolres15040148
- Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., Quazuguel, P., Le Gall, M.M. 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. Aquaculture 171: 109-119. DOI: 10.1016/S0044-8486(98)00428-1
- Cavalcante, R.B., Telli, G.S., Tachibana, L., de Carla Dias, D., Oshiro, E., Natori, M.M., Ranzani-Paiva, M.J. 2020. Probiotics, prebiotics and synbiotics for Nile tilapia: Growth performance and protection against *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture Reports 17: 100343. DOI: 10.1016/j.aqrep.2020.100343
- Cerezuela, R., Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.Á. 2008. Effects of inulin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune parameters. Fish & Shellfish Immunology 24: 663-668. DOI: 10.1016/j.fsi.2007.10.002
- De Marco, G., Cappello, T., Maisano, M. 2023. Histomorphological changes in fish gut in response to prebiotics and probiotics treatment to improve their health status: A review. Animals 13: 2860. DOI: 10.3390/ani13182860
- do Carmo Alves, A.P., Orlando, T.M., de Oliveira, I.M., Libeck, L.T., Silva, K.K.S., Rodrigues, R.A.F., Cyrino, J.E.P. 2024. Synbiotic microcapsules of *Bacillus subtilis* and oat β -glucan on the growth, microbiota, and immunity of Nile tilapia. Aquaculture International 32: 3869-3888. DOI: 10.1007/s10499-023-01355-6
- El-Hamid, A., Aya, G., Ahmed, O.M., Said, M.M. 2024. Probiotic, prebiotic, and synbiotic effects on growth performance, water quality, non-

- specific immune response, antioxidant activity, and food safety of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries 28: 149-171. DOI: 10.21608/ejabf.2024.377644
- El-Son, M.A., Elshopakey, G.E., Rezk, S., Eldessouki, E.A., Elbahnaswy, S. 2022. Dietary mixed *Bacillus* strains promoted the growth indices, enzymatic profile, intestinal immunity, and liver and intestinal histomorphology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture Reports 27: 101385. DOI: 10.1016/j.aqrep.2022.101385
- Eshaghzadeh, H., Hoseinifar, S.H., Vahabzadeh, H., Ringo, E. 2015. The effects of dietary inulin on growth performance, survival and digestive enzyme activities of common carp (*Cyprinus carpio*) fry. Aquaculture Nutrition 21: 242-247. DOI: 10.1111/anu.12155
- Fanouraki, E., Divanach, P., Pavlidis, M. 2007. Baseline values for acute and chronic stress indicators in sexually immature red porgy (*Pagrus pagrus*). Aquaculture 265: 294-304. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2007.01.006
- FAO, 2021. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action., Rome.
- Ghafariarsani, H., Rashidian, G., Bagheri, T., Hoseinifar, S.H., Van Doan, H. 2021. Study on growth enhancement and the protective effects of dietary prebiotic inulin on immunity responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry infected with. Annals of Animal Science 21: 543-559. DOI: 10.2478/aoas-2020-0074
- Ghaly, F.M., Hussein, S.H., Awad, S.M., El-Makhzangy, A.A. 2023. Growth promoter, immune response, and histopathological change of prebiotic, probiotic and synbiotic bacteria on Nile tilapia. Saudi Journal of Biological Sciences 30: 103539. DOI: 10.1016/j.sjbs.2022.103539
- Grisdale-Helland, B., Helland, S.J., Gatlin III, D.M. 2008. The effects of dietary supplementation with mannan oligosaccharide, fructooligosaccharide or galacto oligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture 283: 163-167. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2008.07.012
- He, S., Xu, G., Wu, Y., Weng, H., Xie, H. 2003. Effects of IMO and FOS on the growth performance and non-specific immunity in hybrid tilapia. Chinese Feed 23: 14-15.
- Hoseinifar, S.H., Zare, P., Merrifield, D.L. 2010. The effects of inulin on growth factors and survival of the Indian white shrimp larvae and postlarvae (*Fenneropenaeus indicus*). Aquaculture Research 41. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2010.02485.x
- Ibrahim, M.D., Fathi, M., Mesalhy, S., Abd El-Aty, A.M. 2010. Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish & Shellfish Immunology 29: 241-246. DOI: 10.1016/j.fsi.2010.03.004
- Iijima N., Tanaka, S., Ota Y. 1998. Purification and characterization of bile salt activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream (*Pagrus major*). Fish Physiology and Biochemistry 18: 59-69. DOI: 10.1023/A:1007725513389
- Irianto, A., Austin, B. 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Disease 25: 1-10. DOI: 10.1046/j.1365-2761.2002.00375.x
- Iwashita, M.K.P., Nakandakare, I.B., Terhune, J.S., Wood, T., Ranzani-Paiva, M.J.T. 2015. Dietary supplementation with *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* enhance immunity and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae*

- infection in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. Fish & Shellfish Immunology 43: 60-66. DOI: 10.1016/j.fsi.2014.12.008
- Jabbari, E., Jafari, V., Safari, R., Hoseinifar, S.H., Imanpour, M. 2023. The effect of using synbiotic pectin and *Lactobacillus plantarum* on growth performance and expression of genes related to growth in beluga sturgeon (*Huso huso*). Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics 12: 1-12. DOI: 10.22069/japu.2022.19976.1633
- Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S., Kobayash, M. 1990. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish Pathology 25: 93-98. DOI: 10.3147/jsfp.25.93
- Kuebutornye, F.K., Wang, Z., Lu, Y., Abarike, E.D., Sakyi, M.E., Li, Y., Hlordzi, V. 2020. Effects of three host-associated *Bacillus* species on mucosal immunity and gut health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and its resistance against *Aeromonas hydrophila* infection. Fish & Shellfish Immunology 97: 83-95. DOI: 10.1016/j.fsi.2019.12.046
- Lara-Flores, M. 2011. The use of probiotic in aquaculture: an overview. International Research Journal of Microbiology 2: 471-478.
- Lee, S., Choi, S.P., Choi, H.J., Jeong, H., Park, Y.S. 2024. A comprehensive review of synbiotics: an emerging paradigm in health promotion and disease management. World Journal of Microbiology and Biotechnology 40: 280. DOI: 10.1007/s11274-024-04085-w
- Mehrabi, Z., Firouzbakhsh, F., Jafarpour, A. 2012. Effect of dietary supplementation of symbiotic on growth performance, serum biochemical parameters and carcass composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 96: 474-481. DOI: 10.1111/j.1439-0396.2011.01167.x
- Mohammadi, G., Hafezieh, M., Karimi, A.A., Azra, M.N., Van Doan, H., Tapingkae, W., Dawood, M.A. 2022. The synergistic effects of plant polysaccharide and *Pediococcus acidilactici* as a synbiotic additive on growth, antioxidant status, immune response, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Aeromonas hydrophila*. Fish & Shellfish Immunology 120: 304-313. DOI: 10.1016/j.fsi.2021.11.028
- Mohammadian, T., Kazemiasanvand, A., Mesbah, M., Tabande, M. 2024. Synergistic Effects of Dietary β -glucan plus *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* as a synbiotic on growth performance and digestive enzyme activity of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iranian Veterinary Journal 20: 68-79. DOI: 10.22055/IVJ.2023.379766.2543
- Mugwanya, M., Dawood, M. A., Kimera, F., Sewilam, H. 2021. Updating the role of probiotics, prebiotics, and synbiotics for tilapia aquaculture as leading candidates for food sustainability: a review. Probiotics and Antimicrobial Proteins 1-28. DOI: 10.1007/s12602-021-09852-x
- Nayak, S.K. 2021. Multifaceted applications of probiotic *Bacillus* species in aquaculture with special reference to *Bacillus subtilis*. Reviews in Aquaculture 13: 862-906. DOI: 10.1111/raq.12503
- Pandiyan, P., Balaraman, D., Thirunavukkarasu, R., George, E.G.J., Subaramaniyan, K., Manikkam, S., Sadayappan, B. 2013. Probiotics in aquaculture. Drug Invention Today 5: 55-59. DOI: 10.1016/j.dit.2013.03.003
- Rigney, M.M., Zilinsky, J.W., Rouf, M.A. 1978. Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* in red leg disease in frogs. Current Microbiology 1: 175-179. DOI: 10.1007/BF02601673
- Rungruangsak-Torrissen, K., Rustad, A., Sunde, J., Eiane, S.A., Jensen, H.B., Opstvedt, J., Nygard, E., Samuelsen,

- T.A., Mundheim, H., Luzzana, U. 2002. In vitro digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82: 644-654. DOI: 10.1002/jsfa.1089
- Savustyanenko, A.V. 2016. Mechanisms of action of probiotics based on *Bacillus subtilis*. *Actual Infectology* 2: 35-44. DOI: 10.22141/2312-413x.2.11.2016.77529
- Sewaka, M., Trullas, C., Chotiko, A., Rodkhum, C., Chansue, N., Boonanuntanasarn, S., Pirarat, N. 2019. Efficacy of synbiotic *Jerusalem artichoke* and *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented diets on growth performance, serum biochemical parameters, intestinal morphology, immune parameters and protection against *Aeromonas veronii* in juvenile red tilapia (*Oreochromis spp.*). *Fish & Shellfish Immunology* 86: 260-268. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.11.026
- Sheikhzadeh N, Heidarieh M. 2020. Effects of commercial synbiotic Biomin®IMBO on growth performance, some biochemical parameters and skin mucosal immunity in crucian carp (*Carassius carassius*). *Journal of Aquaculture Development* 14: 55-65. DOI: 20.1001.1.23223545.1399.14.2.9.9
- Shirajum Monir, M., Yusoff, S.M., Mohamad, A., Ina-Salwany, M.Y. 2020. Vaccination of tilapia against motile *Aeromonas septicemia*: a review. *Journal of Aquatic Animal Health* 32: 65-76. DOI: 10.1002/aah.10099
- Tiengtam, N., Paengkoum, P., Sirivoharn, S., Phonsiri, K., Boonanuntanasarn, S. 2017. The effects of dietary inulin and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) tuber on the growth performance, haematological, blood chemical and immune parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Aquaculture Research* 48: 5280-5288. DOI: 10.1111/are.13341
- Torres-Maravilla, E., Parra, M., Maisey, K., Vargas, R.A., Cabezas-Cruz, A., Gonzalez, A., Bermúdez-Humarán, L.G. 2024. Importance of probiotics in fish aquaculture: Towards the identification and design of novel probiotics. *Microorganisms* 12: 626. DOI: 10.3390/microorganisms12030626
- Vogt, L., Meyer, D., Pullens, G., Faas, M., Smelt, M., Venema, K., De Vos, P. 2015. Immunological properties of inulin-type fructans. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55: 414-436. DOI: 10.1080/10408398.2012.656772
- Wang, T., Cheng, Y., Chen, X., Liu, Z., Long, X. 2017. Effects of small peptides, probiotics, prebiotics, and synbiotics on growth performance, digestive enzymes, and oxidative stress in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, juveniles reared in artificial seawater. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 35: 89-97. DOI: 10.1007/s00343-016-5130-1
- Watanabe, W.O., Losordo, T.M., Fitzimmons, K., Hanley, F. 2002. Tilapia production systems in the Americas: Technological advances, trends and challenges. *Reviews in Fisheries Science* 10: 465-498. DOI: 10.1080/20026491051758
- Wee, W., Hamid, N.K.A., Mat, K., Khalif, R.I.A.R., Rusli, N.D., Rahman, M.M., Wei, L.S. 2024. The effects of mixed prebiotics in aquaculture: A review. *Aquaculture and Fisheries* 9: 28-34. DOI: 10.1016/j.aaf.2022.02.005
- Worthington C.C. 1993. *Worthington Enzyme Manual*. Enzymes and Related Biochemicals Worthington Chemical. New Jersey, USA, 730 p.
- Yones, A.M.A.S., Mohamed Eissa, I.A.M., Ghobashy, M.A., Marzok, S.S. 2020. Effects of dietary inulin as prebiotic on growth performance, immuno-haematological indices and ectoparasitic infection of fingerlings Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*.

- Egyptian Journal of Histology 43: 88-103. DOI: 10.21608/EJH.2019.15495.1152
- Yousefi, M., Adineh, H., Hoseini, S.M., Hashemianfar, S.A.M., Kulikov, E.V., Petukhov, N.V., Ryzhova, T.A. 2025. Effects of *Laurus nobilis* essential oil nano-particles on growth performance, antioxidant and immune responses to bacterial infection in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture 596: 741821. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2024.741821
- Zaineldin, A.I., Hegazi, S., Koshio, S., Ishikawa, M., Bakr, A., El-Keredy, A. M., Yukun, Z. 2018. *Bacillus subtilis* as probiotic candidate for red sea bream: growth performance, oxidative status, and immune response traits. Fish & Shellfish Immunology 79: 303-312. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.05.035
- Zakariaei, H., Sudagar, M., Hoseini, S.S., Paknejad, H., Baruah, K. 2022. The effect of using synbiotics containing button mushroom (*Agaricus bisporus*) extract in combination with two species of lactic acid bacteria on digestive enzyme activities, body composition, growth and intestinal microbial flora in zebrafish (*Danio rerio*). Journal of Marine Science and Technology 21: 63-75. DOI: 10.22113/jmst.2020.233183.2375