

(OPEN ACCESS)

Effect of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* on growth indices and growth-related genes (GH and IGF-I) expression in Koi fingerling (*Cyprinus carpio* L.)

Seyedeh Zahra Sadat^{*1}, Mohammad Reza Imanpour², Roghieh Safari³

1. Corresponding Author, M.Sc. Student of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: sy.zahra.sadat.m@gmail.com
2. Professor, Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: moimanpour.gau.ac.ir
3. Associate Prof., Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: fisheriessafari@yahoo.com

Article Info	ABSTRACT
Article type: Full Length Research Paper	Background and Objectives: This research was conducted to elevate the effects of using the <i>Saccharomyces cerevisiae</i> probiotic on growth indices and the expression of growth-related genes (GH and IGF-1) in koi fish (<i>Cyprinus carpio</i> L.).
Article history: Received: 05.03.2025 Revised: 05.19.2025 Accepted: 06.28.2025	Materials and Methods: To achieve this goal, 132 Koi carp fry, weighing approximately 20 ± 1.6 g, were obtained from a private sector hatchery. After a period of acclimatization to breeding environment conditions and hand-feeding, they were subjected to experimental treatments for 8 weeks, including the <i>Saccharomyces cerevisiae</i> probiotic Vivacell in 4 groups (0, 0.1, 0.5, 1%) with three replicates. At the end of the period, samples were taken from the treatments in a completely randomized manner, and growth indices were examined. To measure gene expression, brain and liver tissue samples were taken, RNA was extracted, and cDNA was synthesized using a synthesis kit. Gene expression was performed using primers for the (GH and IGF-1) genes and the beta-actin gene in Real-Time PCR.
Keywords: GH gene, Growth indicators, IGF-1 gene, Koi fish, Probiotic, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Results: Based on the results obtained, in Koi carp fry, different levels of the probiotic showed a significant effect on final weight and final body length, feed conversion ratio, specific growth rate, feed intake, and weight gain, as well as the number of red and white blood cells, hemoglobin concentration, mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), and mean corpuscular hemoglobin (MCH) ($p < 0.05$). Evaluation of IGF-1 and GH gene expression in the 0.5 and 1% treatments showed a significant increase compared to the control group and the 0.1% treatment ($p < 0.05$).

Conclusion: The results of this study indicated the beneficial effects of the *Saccharomyces cerevisiae* Vivacell probiotic on growth indices and the expression of growth-related genes (GH and IGF-1) in Koi carp fry.

Cite this article: Sadat, Seyedeh Zahra, Imanpour, Mohammad Reza, Safari, Roghieh. 2026. Effect of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* on growth indices and growth-related genes (GH and IGF-I) expression in Koi fingerling (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 15 (2), 93-107.



© The Author(s).

Doi: 10.22069/japu.2026.23617.1949

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

اثر پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*) بر شاخص‌های رشد، بیان ژن‌های مرتبط با رشد (GH and IGF-I) در بچه‌ماهی کوی (*Cyprinus carpio* L.)

سیده زهرا سادات^{۱*}، محمدرضا ایمانپور^۲، رقیه صفری^۳

۱. نویسنده مسئول، دانشجوی کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: sy.zahra.sadat.m@gmail.com
۲. استاد گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: moimanpour.gau.ac.ir
۳. دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: fisheriessafari@yahoo.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله:	سابقه و هدف: این پژوهش به منظور ارزیابی اثرات استفاده پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیه
مقاله کامل علمی- پژوهشی	و یواسل و کریر (1×10^4 CFU/g) (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) بر شاخص‌های رشد و بیان ژن‌های مرتبط با رشد (GH and IGF-I) در بچه‌ماهی کوی (<i>Cyprinus carpio</i> L.) انجام گردید.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۱۳	
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۹	مواد و روش‌ها: برای دستیابی به این هدف، تعداد ۱۳۲ قطعه بچه‌ماهی کوی، با وزن حدود
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۰۷	$20 \pm 1/6$ گرم پس از یک دوره سازگاری با شرایط محیط پرورشی و غذاگیری دستی، به مدت ۸ هفته، تحت تیمارهای آزمایشی شامل پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیه و یواسل در ۴ گروه (۰، ۰/۱، ۰/۵، ۱ درصد) با سه تکرار قرار گرفت. در پایان دوره از تیمارها به صورت کاملاً تصادفی نمونه‌برداری انجام شده و شاخص‌های رشد بررسی گردید و جهت سنجش بیان ژن از بافت مغز و کبد نمونه‌برداری، استخراج RNA و سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز و بیان ژن‌ها، با استفاده از پرایمر ژن‌های (GH and IGF-1) و ژن بتا اکتین در Real Time PCR انجام گرفت.
واژه‌های کلیدی:	پروبیوتیک، ژن GH، ژن IGF-I، ساکارومایسیس سرویزیه و یواسل، شاخص‌های رشد، ماهی کوی
یافته‌ها:	بر اساس نتایج به دست آمده، در بچه‌ماهی کوی، سطوح مختلف پروبیوتیک اثر معناداری بر وزن نهایی و طول نهایی بدن، ضریب تبدیل غذایی، ضریب رشد ویژه، غذای خورده شده و

مقدار وزن‌گیری نشان داده است ($p < 0/05$). ارزیابی بیان ژن IGF-I و GH در تیمار ۰/۵ و تیمار ۱ افزایش معناداری نسبت به گروه شاهد و تیمار ۰/۱ داشت ($p < 0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان‌دهنده اثرات مفید پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیه (Saccharomyces cerevisiae) بر شاخص‌های رشد، بیان ژن‌های مرتبط با رشد (GH and IGF-I) در بچه‌ماهی کوی می‌باشد.

استناد: سادات، سیده زهرا، ایمانپور، محمدرضا، صفری، رقیه (۱۴۰۵). اثر پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*) بر شاخص‌های رشد، بیان ژن‌های مرتبط با رشد (GH and IGF-I) در بچه‌ماهی کوی (*Cyprinus carpio* L.) نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱۵ (۲)، ۹۳-۱۰۷.

Doi: 10.22069/japu.2026.23617.1949



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

صنعت آبی‌پروری یکی از منابع اصلی تامین غذای انسان می‌باشد. این صنعت علی‌رغم رشد قابل توجه، همواره با مشکلاتی رو به رو بوده است و در حال حاضر چالش عمده، بهبود جیره‌های غذایی فرموله شده برای بهینه‌سازی رشد و ارتقاء سلامت ماهیان می‌باشد (۱، ۲). طبق گزارش فائو، در سال ۲۰۲۰ میزان کل تولیدات شیلاتی جهان برابر با ۱۷۷/۸ میلیون تن بوده که ۴۹ درصد (۸۷،۵ میلیون تن) آن مربوط به آبی‌پروری بوده، که میزان تولید آن از سال ۲۰۰۰ تا ۲۰۲۰، دو برابر شده است (۳).

هدف نهایی در آبی‌پروری افزایش بازده تولید، جهت به حداکثر رساندن سوددهی می‌باشد. افزایش تراکم تولید یکی از روش‌های افزایش بازده تولید می‌باشد، اما این امر ممکن است سبب ابتلا به بیماری و کاهش کیفیت آب و به وجود آوردن شرایط استرس‌زا گردد، که اغلب تحت‌تأثیر عفونت‌های باکتریایی قرار می‌گیرند و سیستم ایمنی را درگیر می‌کند. یکی از معمول‌ترین روش‌های درمان این عفونت‌ها، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. اما به‌کارگیری آنتی‌بیوتیک‌ها جهت درمان بیماری‌های ماهیان پرورشی به طور گسترده مورد انتقاد قرار گرفته است، که دلایل آن، افزایش توانایی مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، از بین بردن فلور میکروبی دستگاه گوارش، هزینه بالا و عوارض جانبی این داروها می‌باشد. ثابت گردیده است که برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها سیستم ایمنی را سرکوب می‌کنند و موجودات آبی را بیش‌تر مستعد پذیرش بیماری‌های باکتریایی، ویروسی و انگلی می‌نمایند. افزایش نگرانی‌های ناشی از به‌کارگیری آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به کاهش استفاده از آن‌ها در صنعت آبی‌پروری آمریکا و اروپا گردیده است. این تغییر سیاست برای صنعت آبی‌پروری مفید بوده و بدین ترتیب توسعه راهکارهای

مختلف در جهت کنترل بیماری‌ها مفید واقع شده است (۴، ۵).

پروبیوتیک‌ها، سلول‌های میکروبی زنده‌ای هستند، که بر تعادل میکروبی روده تأثیر می‌گذارند. استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبی‌پروری علاوه بر بهبود کیفیت آب و ارتقای وضعیت سلامت آبزیان، از طریق تولید ویتامین‌ها، افزایش قابلیت جذب مواد معدنی و عناصر کمیاب و نیز تولید آنزیم‌های گوارشی موجب بهبود رشد می‌گردد (۶). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که پروبیوتیک‌ها، می‌توانند عملکرد رشد حیوانات آبی را افزایش دهند. این را می‌توان به توانایی آن‌ها در افزایش استفاده از مواد مغذی و هضم، تحریک اشتها، بهبود سلامت روده و تعدیل تنظیم هورمونی ژن‌های مرتبط با رشد مانند هورمون رشد (GH) و فاکتور رشد شبه انسولین (IGF-I) نسبت داد. GH و IGF-I نقش مهمی در تنظیم رشد، نمو و متابولیسم آبزیان دارند. هورمون رشد^۱ که به اختصار با حروف GH نیز نشان داده می‌شود، نوعی هورمون پپتیدی با ۱۹۲ واحد آمینواسید می‌باشد و پلی‌پپتیدی تک زنجیره‌ای است (۷). این هورمون در بخش قدامی غده هیپوفیز تولید، ذخیره و ترشح شده و سبب رشد، تقسیم سلول‌ها و بازسازی آن‌ها می‌شود، که در نتیجه رشد ماهیچه و استخوان و در مجموع رشد را در پی دارد (۷، ۸). سوماتوتروپین هم‌چنین غلظت گلوکز و اسیدهای چرب آزاد را افزایش داده و محرک هورمون IGF-I نیز می‌باشد، هورمون رشد در متابولیسم پروتئین، کربوهیدرات‌ها و لیپیدها دخالت دارد و هدف نهایی آن افزایش بیوسنتز پروتئین‌ها در سلول است تا بدین‌وسیله، سبب رشد ابعادی و تعدادی سلول‌ها شود (۹). ساکاروماایسیس سرویزیه، که معمولاً به عنوان مخمر آبجو یا مخمر نانویی شناخته می‌شود، یک سویه پروبیوتیک شناخته شده و مورد

مطالعه گسترده است. اثرات مفید متعددی در آبی‌پروری از جمله بهبود عملکرد رشد، مقاومت در برابر بیماری و افزایش استفاده از مواد مغذی نشان داده است. استفاده از ساکارومایسیس سرویزیه به‌عنوان یک پروبیوتیک در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است (۱۰).

مخمر جنس ساکارومایسیس جزء مخمرهای تک سلولی از شاخه قارچ‌ها محسوب گشته و مشهورترین عضو این خانواده ساکارومایسیس سرویزیه است که کاربردهای بسیار متنوعی نیز دارد (۱۱).

ساکارومایسیس سرویزیه از متخبین پروبیوتیک‌های گروه مخمر می‌باشد، که به دلیل طیف وسیعی از نقش‌های زیستی مطرح است. وجود نوکلئوتیدها، اسید گلوتامات، ویتامین‌های گروه B، اینوزیتول و گلوکان در ترکیب مخمر، نقش‌های ارزشمندی هم‌چون مکمل غذایی پروتئینی، پروبیوتیکی، جاذب سموم قارچی و فلزات سنگین و محرک اشتها به آن داده است. استفاده از مخمر باعث بهبود عملکرد رشد، افزایش ایمنی، کارایی باروری و مدیریت بهتر استرس در آبزیان پرورشی می‌گردد. مخمر ساکارومایسیس باعث بالابردن حالت‌های تدافعی، ایمنی و رشد می‌گردد (۱۲). مخمر ساکارومایسیس سرویزیه منابع بسیار زیادی از آنزیم‌ها، ویتامین‌های گروه B و آمینواسیدها را دارا می‌باشد، که می‌تواند نیازهای غذایی ماهیان را تامین کند (۱۳).

شناسایی سویه‌های ویژه مخمر ساکارومایسیس سرویزیه با نقش‌های خاص، یکی از راهکارهای صنعت تولید غذا جهت بهبود شاخص‌های زیستی گونه‌های آبی می‌باشد (۱۴).

در زمینه آبزیان، تحقیقات نشان می‌دهد که ساکارومایسیس سرویزیه می‌تواند چندین مزیت بالقوه داشته باشد (۱۵). ساکارومایسیس سرویزیه می‌تواند، هضم و جذب مواد مغذی را در دستگاه گوارش

افزایش دهد. این پروبیوتیک، آنزیم‌هایی مانند آمیلاز و پروتئاز تولید می‌کند که به تجزیه کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌های پیچیده در رژیم غذایی آبزیان کمک می‌کند. این فعالیت آنزیمی به بهبود هضم و جذب مواد مغذی کمک کرده و باعث می‌شود آبزیان به‌راحتی از آن‌ها استفاده کنند. مشخص شده است که ساکارومایسیس سرویزیه دارای اثرات تعدیل‌کننده ایمنی است، به این معنی که می‌تواند پاسخ ایمنی را تعدیل کند. این می‌تواند به بهبود مقاومت آن‌ها در برابر عوامل بیماری‌زا و کاهش خطر عفونت کمک کند (۱۴).

با توجه به موارد ذکر شده، بررسی اثر پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیه بر شاخص‌های رشد و بیان ژن‌های مرتبط با رشد (GH و IGF-I)، در بچه‌ماهی کوی از اهمیت و ضرورت بالایی برخوردار است. پروبیوتیک‌ها، مانند ساکارومایسیس سرویزیه، باکتری‌های مفیدی هستند، که می‌توانند سلامت و عملکرد موجودات آبی را بهبود بخشند. بنابراین پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*) بر شاخص‌های رشد، بیان ژن‌های مرتبط با رشد (GH and IGF-I) در بچه‌ماهی کوی (*Cyprinus carpio* L.) انجام شده است.

مواد و روش‌ها

شرایط آزمایش: در این پژوهش، ۱۳۲ قطعه بچه‌ماهی کوی با وزن $1/6 \pm 20$ گرم از مرکز تکثیر و پرورش بخش خصوص تامین و به سالن تکثیر و پرورش آب‌آبی در تهران منتقل گردید. ماهیان در بدو ورود، با نمک ۱ درصد ضدعفونی شده و یک دوره سازگاری (به مدت یک هفته) با شرایط محیط پرورشی، را پشت سر گذاشتند. سپس بچه‌ماهیان به‌طور کاملاً تصادفی در ۱۲ آکواریوم ۵۰ لیتری توزیع گردیدند. آزمایش در

۴ تیمار (۱۱ ماهی در هر آکواریوم)، به مدت دو ماه انجام گردید و روزانه به ۳-۵ درصد وزن بدن، با جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند. تیمارهای آزمایشی، شامل پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیه و یواسل در ۴ گروه (۰ و ۰/۱ و ۰/۵ و ۱ درصد) با سه تکرار قرار گرفتند.

تیمارهای آزمایش شامل:

تیمار ۱ (شاهد): جیره غذایی حاوی صفر درصد پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیه و یواسل
تیمار ۲: جیره غذایی حاوی ۰/۱ درصد پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیه و یواسل
تیمار ۳: جیره غذایی حاوی ۰/۵ درصد پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیه و یواسل
تیمار ۴: جیره غذایی حاوی ۱ درصد پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیه و یواسل

در پایان دوره از تیمارها به صورت کاملاً تصادفی، نمونه‌برداری انجام شده و شاخص‌های رشد، بررسی گردید. همچنین جهت سنجش بیان ژن، از بافت کبد و مغز نمونه برداری، استخراج RNA و سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز انجام و cDNA حاصله با استفاده از پرایمر ژن‌ها، بررسی گردید.

آماده‌سازی جیره غذایی: در این مطالعه، غذای تجاری تهیه شده از شرکت فرادانه به عنوان جیره پایه و پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیه و یواسل از شرکت ویوان استفاده گردید. برای تهیه جیره‌های غذایی تیمارهای مختلف، پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیه و یواسل و کریر (1×10^9 CFU/g) از شرکت ویوان و با درصدهای ۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد به ازای هر کیلوگرم غذا برای گروه‌های تیمار تهیه شده و همراه با ۲ درصد ژلاتین مایع به غذای پلت اضافه و سپس در دمای محیط (به صورت هوا خشک) پلت‌ها خشک شده و در کیسه‌های پلاستیکی و در دمای 4°C تا زمان استفاده ذخیره‌سازی گردید.

زیست‌سنجی: در ابتدای دوره پرورش برای کاهش اختلاف میانگین وزنی ماهیان و در طول دوره پرورش (۱۵ روز یکبار) برای سنجش مقدار جیره غذایی، زیست‌سنجی انجام گردید. برای زیست‌سنجی ابتدا به وسیله، محلول بیهوش‌کننده (اسانس گل میخک) به غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر، ماهیان بیهوش و با خط‌کش و ترازوی دیجیتال ماهیان را وزن نموده و طول کل آن‌ها ثبت گردید.

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد: در پایان دوره آزمایش، ماهیان به وسیله ترازوی دیجیتال وزن شده و میزان افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی با استفاده از فرمول‌های زیر به عنوان شاخص‌های عملکرد رشد محاسبه گردید (۱۶).

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

$100 \times [\text{طول دوره آزمایش} / \text{لگاریتم طبیعی وزن اولیه} - \text{لگاریتم طبیعی وزن نهایی}] = \text{SGR}$ (نرخ رشد ویژه)

$100 \times [\text{میزان افزایش وزن (گرم)} / \text{میزان غذای مصرف شده (گرم)}] = \text{FCR}$ (ضریب تبدیل غذایی)

نمونه‌برداری جهت مطالعات ژنتیکی: جهت مطالعات ژنتیکی از هر آکواریوم، سه ماهی به صورت تصادفی انتخاب شده و با استفاده از گل میخک بیهوش گردید. از بافت مغز و کبد نمونه‌برداری انجام و بلافاصله در ازت مایع قرار گرفته و سپس تا شروع آزمایش به فریزر -80°C منتقل گردید.

استخراج RNA، سنتز و بررسی cDNA سنتز شده: RNA از ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه بافت مغز و کبد هموژن شده با ازت مایع با استفاده از کیت استخراج و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. کیفیت RNA با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد و

مشاهده باندهای ۱۸S و ۲۸S مربوط به RNA ریبوزومی و کمیت RNA با استفاده از نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر به دست آمده، از دستگاه نانومتر (IMPLEN-P100) انجام گردید. غلظت نمونه‌های RNA با استفاده از سنجش میزان جذب آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانومتر انجام شده و سپس به غلظت ۵۰۰ نانوگرم در میکرولیتر با استفاده از آب دیس رقیق گردید.

ساخت رشته اول cDNA با استفاده از کیت Superscript Rast براساس روش پیشنهادی شرکت با استفاده از ۵ میکرولیتر از RNA (غلظت ۵۰۰ نانوگرم)، ۱ میکرولیتر آغازگر الیگو dt (۲۰-۱۸ الیگونوکلوئوتید) و ۵ میکرولیتر آب دیس انجام گردید. بدین‌منظور تیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند و سپس به سرعت روی یخ قرار گرفتند. ۴ میکرولیتر بافر ۵X آنزیم نسخه‌بردار معکوس، ۲ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار و ۲۰

واحد آنزیم RNase inhibitor و ۱/۵ میکرولیتر آب دیس به مخلوط بالا اضافه گردید. تیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت. بلافاصله ۲۰۰ واحد آنزیم نسخه‌بردار معکوس به هر تیوپ اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، سپس تیوپ‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید تا واکنش غیرفعال شود. به هر تیوپ ۳۸۰ میکرولیتر آب دیس اضافه گردید و سپس cDNAهای سنتز شده تا شروع آزمایش‌ها در فریز -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آغازگرهای مورد استفاده: آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش، از مطالعات قبلی (۱۷) گرفته شده و با آزمایش کردن در دستگاه PCR بهترین دما برای تکثیر به دست آمد. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در بررسی بیان ژن رشد در ماهی کوی.

Table 1. Characteristics of the primers used in investigating growth gene expression in koi fish.

کارایی پرایمر Primer Efficiency	دمای اتصال (°C) Annealing temp (°C)	کد دسترسی در بانک ژن GenBank Accession No	توالی (۵'→۳') Sequence (3'→5')	نام پرایمر Primer symbol
99%	58	M27000.1	TCTTCGCATCTCTTTTCACC	GHqPCRf
			AGTCGGCCAGCTTCTCA	GHpCRR
99%	58	KP661168.1	GGCATTGGTGTGATGTCTTT	IGF1qPCRf
			CATATCCTGTCGGTTTGCTG	IGF1qPCRR
99%	58	M24113.1	AGACATCAGGGTGTGCATGGTTGGT	β- actin qPCRf
			CTCAAACATGATCTGTGTCAT	β- actin qPCRR

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های به دست آمده جهت تعیین شاخص‌های رشد، بیان ژن‌های مرتبط با رشد مورد آنالیز قرار گرفتند. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS ۱۶ و رسم نمودارها از نرم‌افزار EXCEL استفاده گردید. جهت مقایسه میانگین‌ها از طرح کاملاً تصادفی آنالیز واریانس یک‌طرفه آزمون چنددامنه‌ای دانکن استفاده و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نمایش داده شد.

نتایج

اثرات پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیه و یواسل بر شاخص‌های رشد: نتایج این بررسی حاکی از آن است که سطوح مختلف پروبیوتیک اثر معناداری ($p < 0.05$) بر وزن نهایی و طول نهایی بدن بچه‌ماهی کوی دارد ($p < 0.05$). بر اساس نتایج به دست آمده بیش‌ترین میزان وزن نهایی مربوط به تیمار ۰/۵ ($337/61 \pm 0/66$) و تیمار ۱ ($340/16 \pm 0/25$) و بیش‌ترین میزان طول نهایی مربوط به تیمار ۰/۵ ($13/83 \pm 0/76$) و تیمار ۱ ($14/43 \pm 0/4$) بوده است.

ضریب تبدیل غذایی (FCR)، در تیمارهای ۰/۵ ($2/68 \pm 0/06$) و تیمار ۱ ($2/67 \pm 0/04$) نسبت به گروه شاهد ($2/86 \pm 0/03$) و تیمار ۰/۱ ($2/91 \pm 0/02$) کاهش معناداری نشان داد ($p < 0.05$).

ضریب رشد ویژه (SGR)، در تیمارهای ۰/۵ ($0/72 \pm 0/02$) و تیمار ۱ ($0/73 \pm 0/015$) نسبت به گروه شاهد ($0/66 \pm 0/011$) و تیمار ۰/۱ ($0/67 \pm 0/011$) افزایش معناداری داشت ($p < 0.05$). غذای خورده شده در تیمار ۱ و مقدار وزن‌گیری در تیمارهای ۰/۵ و ۱ نسبت به گروه شاهد افزایش معناداری نشان داد ($p < 0.05$).

اثر پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیه و یواسل بر شاخص‌های رشد در بچه‌ماهی کوی پس از پایان دوره پرورش، در جدول ۲، ارائه گردید.

انجام PCR برای آزمون cDNA و آغازگرها: cDNAهای ساخته شده از نمونه‌ها با آغازگرهای ژن رفرنس و هدف طراحی شده برای Real Time PCR، با استفاده از PCR استاندارد تکثیر گردید. واکنش در حجم ۱۰ میکرولیتر با استفاده از ۲/۵ میکرولیتر رشته اول cDNA (۲ نانوگرم در میکرولیتر)، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر اختصاصی پیشرو و پسرو با غلظت ۱۰ پیکومول، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱X)، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (۵U)، ۲/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت (۵۰mm) و ۰/۲ میکرولیتر dNTP با غلظت (۱۰mm) تحت شرایط دمایی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، به منظور دناتوره شدن، اتصال آغازگر و بسط انجام گردید. جهت اثبات تکثیر cDNA، محصول واکنش روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید.

انجام Real Time PCR: Real Time PCR تیوپ‌های مخصوص آن در ۴ تکرار تکنیکی با برنامه زمانی و دمایی بهینه شده برای هر تیمار در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ μ l بافر سایبر گرین، ۱ μ l آغازگر پیش‌رونده ژن هدف و رفرنس (۱۰ پیکومول)، ۱ μ l آغازگر پس‌رونده ژن هدف و رفرنس (۱۰ پیکومول)، ۲/۸ μ l آب، ۰/۲ μ l آنزیم تک پلیمراز (۵U)، ۵ μ l cDNA رقیق شده، انجام گردید.

ارزیابی عملکرد آغازگرهای به کار رفته با استفاده از منحنی استاندارد: به منظور اطمینان از بهینه بودن شرایط Real Time PCR، سری غلظت‌های مختلف (۱/۲۰۰، ۱/۱۰۰، ۱/۵۰، ۱/۲۰، ۱/۱۰) از نمونه‌های cDNA مخلوط از تیمارهای مختلف هر پلت تهیه و با هر دو آغازگر هدف و رفرنس در ۴ تکرار تکثیر گردید و کارایی پرایمرها تخمین زده شد (۱۸).

جدول ۲- مقایسه شاخص‌های رشد بچه‌ماهی کوی تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک.

Table 2. Comparison of the growth indices of Koi fry fed with different levels of probiotics.

تیمار ۱ Treatment 1	تیمار ۰/۵ Treatment 0.5	تیمار ۰/۱ Treatment 0.1	گروه شاهد Control Group	شاخص رشد/ تیمار Growth Index / Treatment
219 ± 1.7^a	219 ± 2.64^a	218.66 ± 2.08^a	219.33 ± 0.57^a	وزن اولیه (گرم) Initial weight (g)
340.16 ± 5.25^a	337.61 ± 0.66^{ab}	328 ± 4.76^{bc}	326.85 ± 2.48^c	وزن نهایی (گرم) Final weight (g)
11.00 ± 1.00^a	11.66 ± 1.04^a	11.66 ± 0.57^a	11.3 ± 1.12^a	طول اولیه بدن (سانتی‌متر) Initial Body Length (cm)
14.43 ± 0.4^a	13.83 ± 0.76^a	13.5 ± 0.5^b	13.16 ± 0.28^b	طول نهایی بدن (سانتی‌متر) Final Body Length (cm)
2.67 ± 0.04^b	2.68 ± 0.06^b	2.91 ± 0.02^a	2.86 ± 0.03^a	ضریب تبدیل غذایی FCR
0.73 ± 0.01^a	0.72 ± 0.02^a	0.67 ± 0.01^b	0.66 ± 0.01^b	ضریب رشد ویژه (درصد) SGR (%)
323.33 ± 7.63^a	318.33 ± 2.88^{ab}	318.33 ± 5.77^{ab}	308.33 ± 2.88^b	غذای خورده شده (گرم) Feed Intake (g)
121.16 ± 3.88^a	118.61 ± 2.50^a	109.33 ± 2.75^b	107.51 ± 2.19^b	مقدار وزن‌گیری (گرم) WG (g)

a-b-c: میانگین هر ردیف با حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشد ($p < 0.05$)

a-b-c: The mean of each row with dissimilar letters has a significant difference ($p < 0.05$)

نتایج ارزیابی بیان ژن‌های (IGF-I و GH): ارزیابی

بیان ژن IGF-I، افزایش بیان این ژن را در گروه‌های تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد نشان داد.

براساس نتایج به دست آمده، بیان ژن IGF-I در تیمار ۰/۵ ($3/35 \pm 0/34$) و تیمار ۱ ($3/25 \pm 0/41$) افزایش معناداری نسبت به گروه شاهد ($1 \pm 0/2$) و تیمار ۰/۱ ($1/09 \pm 0/04$) داشته است ($p < 0/05$). اما تیمار ۰/۱ تفاوت معناداری با گروه شاهد نشان نداد ($p > 0/05$).

ارزیابی بیان ژن GH، افزایش بیان این ژن را در گروه‌های تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد نشان داد.

براساس نتایج به دست آمده، بیان ژن GH در تیمار ۱ ($1/51 \pm 0/18$) افزایش معناداری نسبت به گروه شاهد ($1 \pm 0/02$) و تیمار ۰/۱ ($1/06 \pm 0/11$) داشته است ($p < 0/05$). اما با تیمار ۰/۵ تفاوت معناداری نشان نداد ($p > 0/05$).

نتایج مربوط به اثر سطوح مختلف پروبیوتیک بر بیان ژن‌های IGF-I و GH در بچه‌ماهی کوی پس از پایان دوره پرورشی در جدول ۳ ارائه گردید.

جدول ۳- مقایسه بیان ژن‌های مرتبط با رشد در بچه‌ماهی کوی تغذیه شده با سطوح مختلف پروبیوتیک.

Table 3. Comparison of expression of growth-related genes in koi fry fed with different levels of probiotics.

تیمار ۱	تیمار ۰/۵	تیمار ۰/۱	گروه شاهد	متغیر/ تیمار
Treatment 1	Treatment 0.5	Treatment 0.1	Control Group	Variable / Treatment
1.51 ± 0.18^a	1.28 ± 0.04^{ab}	1.06 ± 0.11^b	1.00 ± 0.02^b	ژن GH GH gene
3.25 ± 0.41^a	3.35 ± 0.34^a	1.09 ± 0.04^b	1.00 ± 0.2^b	ژن IGF-I IGF-I gene

a-b-c: میانگین هر ردیف با حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشد ($p < 0.05$)

a-b-c: The mean of each row with dissimilar letters has a significant difference ($p < 0.05$)

بحث

در سالیان اخیر استفاده از مکمل‌های غذایی، مکمل‌های غذایی میکروبی (پروبیوتیک، پری‌بیوتیک، سین‌بیوتیک)، اسیدهای آلی و نمک‌های آن‌ها، هورمون‌ها، ترکیبات غذایی گوناگون و عصاره‌های گیاهی در جیره غذایی جهت بهبود رشد آبزیان مورد توجه بوده است (۱۹). در این رابطه، مطالعه حاضر به‌منظور بررسی اثر پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*) بر شاخص‌های رشد و بیان ژن‌های مرتبط با رشد (GH و IGF-I) در بچه‌ماهی کوی صورت گرفت.

پروبیوتیک‌ها یکی از جایگزین‌های شناسایی‌شده‌ای هستند که می‌توانند وابستگی صنعت آبزی‌پروری به آنتی‌بیوتیک‌ها را کاهش دهند. یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های پروبیوتیک‌ها افزایش ارزش غذایی و همچنین بهبود عملکرد رشد است (۲۰).

ساکارومایسیس سرویزیه می‌تواند هضم و جذب مواد مغذی را در دستگاه گوارش ماهی افزایش دهد. ساکارومایسیس سرویزیه آنزیم‌هایی مانند آمیلاز و پروتئاز تولید می‌کند که به تجزیه کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌های پیچیده در رژیم غذایی ماهی کمک می‌کند. این فعالیت آنزیمی به بهبود هضم و جذب مواد مغذی کمک می‌کند و باعث می‌شود ماهیان به‌راحتی از آن‌ها استفاده کنند. مشخص شده است که

ساکارومایسیس سرویزیه دارای اثرات تعدیل‌کننده ایمنی هستند (۱۴).

مشابه نتایج مطالعه حاضر، ستوده (۲۰۲۰) نشان داد که مکمل پروبیوتیک Bio-Aqua (۲ گرم بر کیلوگرم رژیم غذایی) در جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان، باعث افزایش وزن نهایی گردیده است (۲۱). در مطالعه میهای و همکاران (۲۰۲۳) عملکرد رشد در ماهی کپور با افزایش سطوح پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیه BB06 به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافته است. گروه ۵ درصد زیست‌توده مخمر (YBV5%) بهترین عملکرد را از نظر وزن نهایی بدن و میزان افزایش وزن ماهی داشتند. میزان تلفات ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیه BB06 صفر درصد بوده است (۲۱). در مطالعه‌ای دیگر، تفاوت معنی‌داری در فاکتور رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی ماهی کپور سر بزرگ و کپور معمولی هنگام تغذیه با گونه باسیلوس مشاهده گردید (۲۲). موکانو و همکاران (۲۰۲۲) مشاهده کردند، افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل خوراک در ماهیان خاویاری سیبری تغذیه‌شده با لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ساکارومایسیس بولاردی به‌طور جداگانه و ترکیبی نسبت به گروه شاهد بیش‌تر بوده است (۲۳)، که با نتایج مطالعه حاضر تطابق دارد. رمضان‌نژاد و همکاران (۲۰۲۱) گزارش دادند، تیمار

ماهی کپور بزرگ با ۴۵۰ گرم در هکتار پروبیوتیک Bio-Aqua سبب افزایش معنادار وزن بدن، فاکتور رشد ویژه و سرعت رشد روزانه گردید. این محققان معتقدند، دلیل این افزایش را می‌توان به حذف باکتری‌های مضر، توسط باکتری‌های مفید در این پروبیوتیک چندسویه به ویژه لاکتوباسیلوس پلاتناروم، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس رامنوسوس مرتبط دانست (۲۰). وادشتاین (۱۹۹۷) نشان داد که باکتری‌های اسید لاکتیک ترکیباتی مانند باکتریوسین تولید و در نتیجه از رشد میکروارگانیسم‌های مضر در روده جلوگیری می‌کنند (۲۴).

هم‌چنین در آزمایش‌های انجام شده توسط موکانو و همکاران (۲۰۲۲) میزان بقای ماهیان خاویاری سبیری، تغذیه‌شده با پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ساکارومایسیس بولاردی به‌طور جداگانه و ترکیبی بیش‌تر از شاهد بوده است (۲۳). گزارش شده است که اسپورهای باسیلوس لاتروفسپورس و باسیلوس لیچنیفورمیس، اضافه شده به آب پرورش، باعث بهبود عملکرد رشد و بقای ماهی کپور نقره‌ای می‌گردد (۲۵).

تحقیقات نشان داده است، ترکیبات زیستی با تولید ویتامین‌ها (مانند ویتامین‌های گروه B)، آنزیم‌های گوارشی (نظیر پروتئازها) و تولید آنزیم‌هایی مانند، آنزیم‌های پروتئولیتیک و پپتیدولیتیک سبب تجزیه ترکیبات غیرقابل‌هضم و ترکیبات ماکرومولکول و یا هیدرولیز آن‌ها به پپتیدها و آمینواسیدها شده، که نهایتاً منجر به جذب بهتر منابع مختلف موجود در غذا، بهبود شرایط تغذیه‌ای ماهی و افزایش سرعت رشد می‌گردند (۲۶).

استفاده از پروبیوتیک‌ها تولید اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، باکتریوسین‌ها، لیزوزیم، تعدیل پاسخ فیزیولوژیک و پاسخ ایمنی ماهی را نیز در پی

دارد. بهبود شاخص‌های رشد و ایمنی با استفاده از پروبیوتیک‌ها در مطالعات مختلف در رژیم غذایی، افزایش جذب گلوکز، افزایش جذب مواد معدنی (کلسیم، منیزیم و آهن)، افزایش شمار بیفیدوباکترها و لاکتوباسیلوس‌ها (باکتری‌های مفیدی می‌باشند که از پروبیوتیک‌ها به عنوان منبع انرژی استفاده می‌کنند) و کاهش رشد باکتری‌های مضر بهبود عملکرد ایمنی و فیزیولوژی روده را به همراه دارد (۲۷). مشابه با نتایج مطالعه حاضر، در گزارش ایزا (۲۰۱۴) پروبیوتیک تجاری Fishery Prime TM که به عنوان پروبیوتیک محلول در آب عمل می‌کند، سبب افزایش تنظیم رونویسی GH و IGF-I در ماهی دریافت‌کننده پروبیوتیک گردید، که سطوح بالاتری را نسبت به گروه شاهد نشان داد. نتایج این محققان همبستگی مثبت بین عملکرد رشد، بیان mRNA ژن GH و IGF-I را در هر دو گروه تحت درمان با پروبیوتیک و کنترل تأیید کرد (۲۸). کنعانی و همکاران (۱۳۹۹) اثر پروبیوتیک پدیوکوکوس اسیدی لاکتیک‌ها، نمک پروپیونات سدیم و ترکیب پروبیوتیک و نمک پروپیونات سدیم بر رشد و میزان بیان ژن‌های GH و IGF-I در بچه‌ماهی کپور معمولی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که جیره‌های غذایی حاوی پروبیوتیک و سدیم پروپیونات موجب افزایش بیان ژن هر دو هورمون GH و IGF-I می‌گردد. به اعتقاد این محققان، اثرات مفید پروبیوتیک پدیوکوکوس اسیدی لاکتیک‌ها، نمک پروپیونات سدیم و ترکیب پروبیوتیک و نمک پروپیونات سدیم بر میزان بیان ژن‌های GH و IGF-I در بچه‌ماهی کپور کاملاً واضح می‌باشد و به‌نظر می‌رسد، استفاده از ترکیب پروبیوتیک و نمک پروپیونات سدیم در غذای ماهیان کپور معمولی می‌تواند در عملکرد رشد و بیان ژن‌های GH و IGF-I در این گونه تأثیرگذار باشد (۲۹). هم‌چنین، همسو با نتایج مطالعه حاضر، نتایج

نشان نداد. در ارزیابی بیان ژن GH افزایش معناداری در تیمار ۱ نسبت به گروه شاهد و تیمار ۰/۱ مشاهده گردید، اما با تیمار ۰/۵ تفاوت معناداری نشان نداد. به طور کلی، براساس نتایج مطالعه حاضر، می توان نتیجه گیری کرد که استفاده از پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیه و یواسل، می تواند ابزار مؤثری برای کاهش عوامل استرسزا و بهبود وضعیت رشد و سلامت و مورفولوژی روده ماهیان باشد.

با توجه به تأثیرات مثبت، پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیه و یواسل، بر بیان ژن های رشد در ماهی کوی، بنابراین پیشنهاد می گردد:

۱. اثر این پروبیوتیک، بر ژن های مرتبط با اشتها (گرلین) مورد بررسی قرار گیرد.

۲. اثر این پروبیوتیک، بر بیان ژن های مرتبط با ایمنی (IL, ILY) و فعالیت اکسیدانی (GST, SOD, CAT) مورد بررسی قرار گیرد.

۳. اثر این پروبیوتیک، بر بافت شناسی و فلور باکتریایی روده مورد بررسی قرار گیرد.

و با توجه به تأثیرات مثبت پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیه و یواسل، محصول تولیدی شرکت ویوان بر شاخص های رشد و بیان ژن های مرتبط با رشد (GH و IGF-I) این پروبیوتیک می تواند مورد استفاده مراکز آموزشی و تحقیقاتی، شرکت های تولید غذا و خوراک آبزیان، کارگاه های تکثیر و پرورش آبزیان قرار گیرد.

دیغیش و همکاران (۲۰۲۴) نشان داد که همزیستی پروبیوتیک های چندسویه باسیلوس (باسیلوس لیکنیفورمیس، باسیلوس پومیلوس و باسیلوس سوبتیلیس) به طور قابل توجهی باعث افزایش پارامترهای رشد، هورمون رشد (GH)، فاکتور رشد شبه انسولین (IGF-I) و ژن های گیرنده فاکتور رشد شبه انسولین (IGF-I) در ماهی تیلاپیا نیل در معرض عفونت اسپرژیلوس فلاووس گردید. این محققان معتقدند، ظرفیت پروبیوتیک ها در کلنی ها و چسبیدن به دیواره روده ممکن است دلیل این امر باشد، زیرا باعث افزایش ترشح آنزیم های گوارشی، که به نوبه خود باعث افزایش متابولیسم و سرعت رشد می گردد (۳۰).

نتیجه گیری

مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر پروبیوتیک ساکارومایسیس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*) بر شاخص های رشد و بیان ژن های مرتبط با رشد (GH و IGF-I) صورت گرفت. براساس نتایج به دست آمده، در بچه ماهی کوی سطوح مختلف پروبیوتیک و یواسل، اثر معناداری بر وزن نهایی و طول نهایی بدن، ضریب تبدیل غذایی، ضریب رشد ویژه، غذای خورده شده و مقدار وزن گیری داشت.

ارزیابی بیان ژن IGF-I در تیمار ۰/۵ و تیمار ۱ افزایش معناداری نسبت به گروه شاهد و تیمار ۰/۱ داشت. اما تیمار ۰/۱ تفاوت معناداری با گروه شاهد

منابع

1. Niroumand, M., Sajjadi, M. M., Yahyavi, M., & Asadi, M. (2011). The effect of different levels of dietary betaine on growth factors, survival, body chemical composition and resistance of rainbow trout fry to environmental stresses. *Iranian Journal of Fisheries*, 20(1), 135-146.
2. Karimpour, M., Harlioglu, M. M., Khanipour, A. A., Abdolmalaki, S., & Aksu, O. (2020). Present status of fisheries in Iran. *Journal of Fisheries Sciences*, 7(2), 161.
3. FAO. (2020). FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2020.

4. Mohammadian, T., Nasirpour, M., Tabandeh, M. R., Heidary, A. A., Ghanei, R., & Hosseini, S. S. (2019). Administration of autochthonous probiotics altered juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* health status, growth performance and resistance to *Lactococcus garvieae*, an experimental infection. *Fish & shellfish immunology*, 86, 279-269.
5. Rezaei Aminloo, V., Ahmadifard, N., Tukmechi, A., & Agh, N. (2018). Investigation of Microbiota of *Artemia franciscana* Fed by Bacterial Probiotic *Bacillus subtilis* and Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* under Laboratory Conditions. *Fisheries Science and Technology*, 7, 185-189.
6. Imanpour, M. R., Roohi, Z., Salaghi, Z., Beekzadeh, A., & Davodipour, A. R. (2015). Effect of prebiotic Primalac on growth indices, blood biochemical parameters, survival and resistance to salinity stress of common sea carp fry. *Fisheries Science and Technology*, 4(3), 17-28.
7. Carnevali, O., Cardinali, M., Maradonna, F., Parisi, M., Olivotto, I., Polzonetti-Magni, A. M., & Funkenstein, B. (2005). Hormonal regulation of hepatic IGF-I and IGF-II gene expression in the marine teleost *Sparus aurata*. *Molecular reproduction and development*. 71(1), 12-18.
8. Morselli, L. L., Manetti, L., Cosci, C., Sardella, C., Bogazzi, F., Faldini, C., & Gasperi, M. (2006). Bone and joint alterations in acromegaly. *Journal of Orthopaedics and Traumatology*. 7(4), 169-175.
9. Biga, P. R., Peterson, B. C., Schelling, G. T., Hardy, R. W., Cain, K. D., Overturf, K., & Ott, T. L. (2005). Bovine growth hormone treatment increased IGF-I in circulation and induced the production of a specific immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 246(1-4), 437-445.
10. Beekzadeh, A., Imanpour, M., & Taghizadeh, V. (2015). The effect of oral cortisol on growth, survival rate, hematocrit and biochemical parameters of blood of sea carp (*Cyprinus carpio*) fingerling. *Quarterly Journal of Animal Ecology*, 7(1), 259-266.
11. Delgado, J. F., Sceni, P., Peltzer, M. A., Salvay, A. G., de la Osa, O., & Wagner, J. R. (2016). Development of innovative biodegradable films based on biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 36, 83-91.
12. Siwicki, A. K., Anderson, D. P., & Rumsey, G. L. (1994). Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 41(1-2), 125-139.
13. Hosseinfara, R., Maleki-Jirsaraeia, N., & Rouhanib, S. (2012). Magnetized *Saccharomyces Cerevisiae* as an Adsorbent for Dyes Removal.
14. Saeedi, N., Olia, P., Amin Marashi, S. M., & Sadari, H. (2017). The effect of probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* on *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Daneshvar Pezkezi*, 25(5), 55-62.
15. Santos, K. O., Costa-Filho, J., Spagnol, K. L., Nornberg, B. F., Lopes, F. M., Tesser, M. B., & Marins, L. F. (2020). The inclusion of a transgenic probiotic expressing recombinant phytase in a diet with a high content of vegetable matter markedly improves growth.
16. Ghosh, S., Sinha, A., & Sahu, C. (2007). Effect of probiotic on performance in female livebearing ornamental fish. *Aquaculture Research*, 38, 518-526.
17. Safari, R., Shabani, A., Hoseinifar, S. H., Ghaffari, H., Shokohian, B., Ullah, M. R., & Siddik, M. A. (2023). The effects of combined or singular administration of formic acid and *Pediococcus acidilactici* on stress resistance, growth performance, immune responses and related genes expression in common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture Reports*, 29, 101474.

18. Bustin, S. A., Bens, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Muller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandes Ompele, J., Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622.
19. Ringo, E. (1991). Effects of dietary lactate and propionate on growth and digesta in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L). *Aquaculture*, 10, 321-333.
20. Ramzannejad, O., Changizi, R., Vatandoust, S., Safari, R., & Manouchehri, H. (2021). The effect of probiotic Bio-Aqua® on growth performance, haematological and biochemical parameters of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 20(5), 1304-1316.
21. Sotoudeh, E. (2020). Growth performance and blood indices of juvenile rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fed diets containing *Sargassum cristaefolium* and *Gracilaria pygmaea* extracts. *Journal of Applied Ichthyological Research*, 8(1), 80-89.
22. Jamali, H. (2015). Effect of probiotic *Bacillus* spp. on growth and feed efficiency of common carp, grass carp and bighead larvae fed with nauplii of different *Artemia* species. *Fisheries Science and Technology*, 4(2), 27-43.
23. Mocanu, E. E., Savin, V., Popa, M. D., & Dima, F. M. (2022). The effect of probiotics on growth performance, haematological and biochemical profiles in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt, 1869). *Fishes*, 7(5), 239.
24. van der Vaart, M., Spaank, H. P., & Meijer, A. H. (2012). Pathogen recognition and activation of the innate immune response in zebrafish. *Advances in hematology*, 2012(1), 159807.
25. Sado, R. Y., Bicudo, Á. J. D. A., & Cyrino, J. E. P. (2008). Feeding dietary mannan oligosaccharides to juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, has no effect on hematological parameters and showed decreased feed consumption. *Journal of the world Aquaculture Society*, 39(6), 821-826.
26. Panahi, S. H., Esmaeili, F. A., Imanpour, M. R., Taheri, M. A., Barari, A., & Kavianpour, M. (2019). Effects of dietary inclusion of prebiotic immunowall and probiotic primalac on growth indices, survival, body composition, and blood biochemical parameters in the Caspian Sea carp, *Cyprinus carpio*, fingerlings.
27. Niki Maleki, Z., Shabani, A., & Safari, R. (2019). Effects of separate and combined use of probiotic (*Lactobacillus casei*) and prebiotic (A-MAX) in the diet on the expression of growth-related genes (GH and IGF-1) in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Quarterly Journal of Animal Ecology*, 11, 4.
28. Eissa, N. (2014). Effect of probiotic on growth performance and growth-regulated genes in yellow perch (*Perca flavescens*). *Global Journal of Fisheries and Aquaculture Researches*, 1(2), 1-15.
29. Kanani, E., Shabani, A., & Safari, R. (2019). Effects of separate and combined use of sodium propionate salt and probiotic *Pediococcus acidilactici* on some growth factors and expression of some growth-related genes in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Quarterly Journal of Animal Ecology*, 12(1), 293-298.
30. Dighiesh, H. S., Alharbi, N. A., Awlya, O. F., Alhassani, W. E., Hassoubah, S. A., Albaqami, N. M., Aljahdali, N., El-Aziz, A., Yasmin, M., & Eissa, E. S. H. (2024). Dietary multi-strains *Bacillus* spp. enhanced growth performance, blood metabolites, digestive tissues histology, gene expression of *Oreochromis niloticus*, and resistance to *Aspergillus flavus* infection. *Aquaculture International*, 1-22.

