

(OPEN ACCESS)

The Effect of microencapsulated probiotic *Lactobacillus* sp. AM14 on growth performance, digestibility and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with diets containing 20 and 40% levels of soybean meal

Mahin Ranjdoust¹, Sakineh Yeganeh^{*2}, Hosein Ouraji³, Fatemeh Moradian⁴, Parastoo Pourashouri⁵

1. Dept. of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran. E-mail: mahin.rnj@gmail.com
2. Corresponding Author, Dept. of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran. E-mail: s.yeganeh@sanru.ac.ir
3. Dept. of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran. E-mail: hoseinoraji@yahoo.com
4. Dept. of Basic Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran. E-mail: f.moradian@sanru.ac.ir
5. Associate Prof., Dept. of Seafood Processing, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: pourashouri.p@gmail.com

Article Info	ABSTRACT
Article type: Full Length Research Paper	Background and Objectives: Alternative sources of fish meal, such as soybean plant protein, have anti-nutritive components such as phytate, which can be reduced by using probiotic bacteria with phytase enzyme. Probiotic <i>Lactobacillus</i> sp. AM14 obtained from dairy products, it has phytase activity and was coated with sodium alginate polymers and chitosan. The present study was conducted to evaluate the effect of microencapsulated probiotic <i>Lactobacillus</i> sp. AM14 with phytase activity with sodium alginate and chitosan polymers, on growth, digestibility and body composition of rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) fed with diets containing different levels of soybean meal.
Article history: Received: 01.11.2024 Revised: 01.23.2024 Accepted: 02.04.2024	
Keywords: Chitosan, Microencapsulation, Phytase activity, Probiotic, Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>), Sodium alginate	
	Materials and Methods: Probiotic <i>Lactobacillus</i> sp. AM14 isolated based on phytase activity and was coated with sodium alginate polymers and chitosan. To conduct the experiment, 360 rainbow trout fingerling with an average weight of 12.43 ± 0.22 g were randomly distributed in 18 tanks (20 fish in each tank). Fish fed for eight weeks to the extent of satiety with experimental diets in 6 treatments including: 40% soy + 3.8×10^8 CFU/g probiotic microcapsulated with sodium alginate and chitosan (T1), 40% soy + 3.8×10^8 CFU/g free probiotic (T2), 40% soy + capsules made with sodium alginate and chitosan without probiotics (T3), 40% soy + 3.8×10^8 CFU/g microcapsulated probiotic with sodium alginate (T4), 40% soy without (C2), 20% of soybeans without micro-covering and probiotics (C1) were fed. At the end of the feeding experiment, growth performance, body composition of rainbow trout and digestibility were evaluated.
	Results: The results showed that the use of probiotic <i>Lactobacillus</i> sp. AM14 with phytase activity microencapsulated with sodium alginate and

chitosan in a diet containing 40% soy significantly improved all growth indicators, body composition and digestibility compared to the control group, containing 20 and 40% soy without additives ($P<0.05$). Specific growth rate, final weight, body composition and digestibility showed a significant difference between probiotic-containing and micro-encapsulated probiotics ($P<0.05$). In the control treatment of 40% soy without additives, the growth indices, body composition and digestibility showed a significant decrease compared to the control of 20% soy without additives ($P<0.05$).

Conclusion: In general, according to the results obtained regarding the addition of *Lactobacillus* sp. AM14 probiotic bacteria with phytase activity in a microencapsulated form to the diet of rainbow trout, due to the significant improvement of growth indicators, body composition and digestibility in the treatment fed with a diet containing 40% soy and additives *Lactobacillus* sp. AM14 probiotic with phytase activity in a microencapsulated form can be suggested as an efficient microencapsulated probiotic strain for use in aquatic diets in order to increase the percentage of replacing fish meal with vegetable protein sources.

Cite this article: Ranjdoust, Mahin, Yeganeh, Sakineh, Ouraji, Hosein, Moradian, Fatemeh, Pourashouri, Parastoo. 2025. The Effect of microencapsulated probiotic *Lactobacillus* sp. AM14 on growth performance, digestibility and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with diets containing 20 and 40% levels of soybean meal. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 14 (1), 69-90.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/japu.2024.22072.1845

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

تأثیر پروبیوتیک ریزپوشانی شده *Lactobacillus sp.* AM14 بر عملکرد رشد، هضم‌پذیری و ترکیب بدن ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه‌شده با جیره حاوی سطوح ۲۰ و ۴۰ درصد آرد سویا

مهین رنج‌دوست^۱، سکینه یگانه^{۲*}، حسین اورجی^۳، فاطمه مرادیان^۴، پرستو پورعاشوری^۵

۱. گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
رایانامه: mahin.rnj@gmail.com
۲. نویسنده مسئول، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
رایانامه: s.yeganeh@sanru.ac.ir
۳. گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
رایانامه: hoseinoraji@yahoo.com
۴. گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: f.moradian@sanru.ac.ir
۵. دانشیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
رایانامه: pourashouri.p@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله:	سابقه و هدف: منابع جایگزین پودر ماهی مانند پروتئین گیاهی سویا دارای اجزای ضد تغذیه‌ای مانند فیتات است که می‌توان این مواد را با استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک دارای آنزیم فیتاز کاهش داد. شرایط نامطلوب دستگاه گوارش، مانع از عملکرد درست پروبیوتیک‌ها در زمان استفاده است که برای حل این مشکل از کپسوله‌سازی پروبیوتیک استفاده می‌شود. مطالعه حاضر به‌منظور ارزیابی اثر پروبیوتیک ریزپوشانی شده <i>Lactobacillus sp.</i> AM14 دارای فعالیت فیتازی با پلیمرهای آلزینات سدیم و کیتوزان، بر رشد، هضم‌پذیری و ترکیب بدن ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) تغذیه‌شده با جیره حاوی سطوح مختلف آرد سویا صورت گرفت.
واژه‌های کلیدی:	
آلزینات سدیم، پروبیوتیک، ریزپوشانی، فعالیت فیتازی، کیتوزان، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان	مواد و روش‌ها: پروبیوتیک <i>Lactobacillus sp.</i> AM14 به‌دست آمده از محصولات لبنی، دارای فعالیت فیتازی بوسله پلیمرهای آلزینات سدیم و کیتوزان ریزپوشانی گردید. ۳۶۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین 0.22 ± 0.12 گرم به مدت ۸ هفته با جیره‌های آزمایشی در ۶ تیمار شامل ۴۰ درصد سویا + $3/8 \times 10^8$ CFU/g پروبیوتیک ریزپوشانی‌شده با آلزینات سدیم و کیتوزان (T1)، ۴۰ درصد سویا + $3/8 \times 10^8$ CFU/g پروبیوتیک آزاد (T2)،

۴۰ درصد سویا + کپسول‌های ساخته شده با آلژینات سدیم و کیتوزان فاقد پروبیوتیک (T3)،
۴۰ درصد سویا + $3/8 \times 10^8$ CFU/g پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم (T4)،
درصد سویا فاقد ریزپوشانی و پروبیوتیک (C2)، ۲۰ درصد سویا فاقد ریزپوشانی و پروبیوتیک
(C1) تغذیه شدند. در پایان آزمایش تغذیه، عملکرد رشد، ترکیب بدن ماهی قزل‌آلای
رنگین کمان و قابلیت هضم‌پذیری مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که استفاده از پروبیوتیک *Lactobacillus* sp. AM14 دارای فعالیت
فیتازی ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم و کیتوزان در جیره حاوی ۴۰ درصد سویا بهبود
معنی‌داری در تمام شاخص‌های رشد، ترکیبات بدن و قابلیت هضم‌پذیری نسبت به گروه شاهد
حاوی ۲۰ و ۴۰ درصد سویا بدون افزودنی داشت ($P < 0/05$). در میزان رشد ویژه، وزن نهایی،
ترکیبات بدن و هضم‌پذیری اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای حاوی پروبیوتیک و پروبیوتیک
ریزپوشانی شده مشاهده گردید ($P < 0/05$). در تیمار شاهد ۴۰ درصد سویا بدون افزودنی
شاخص‌های رشد، ترکیبات بدن و قابلیت هضم‌پذیری نسبت به شاهد ۲۰ درصد سویا بدون
افزودنی کاهش معنی‌داری نشان داد ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به‌دست آمده در خصوص افزودن باکتری پروبیوتیک
Lactobacillus sp. AM14 دارای فعالیت فیتازی به‌صورت ریزپوشانی شده به جیره غذایی
ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌طورکلی با توجه به بهبود معنی‌دار شاخص‌های رشد، ترکیب بدن
و هضم‌پذیری در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۴۰ درصد سویا و افزودنی، می‌توان
پروبیوتیک *Lactobacillus* sp. AM14 دارای فعالیت فیتازی به شکل ریزپوشانی شده را
به‌عنوان یک سویه پروبیوتیک ریزپوشانی شده کارآمد برای استفاده در جیره آبزیان به‌منظور
افزایش درصد جایگزینی پودر ماهی با منابع پروتئین گیاهی، پیشنهاد نمود.

استناد: رنج‌دوست، مهین، یگانه، سکینه، اورجی، حسین، مرادیان، فاطمه، پورعاشوری، پرستو (۱۴۰۴). تأثیر پروبیوتیک ریزپوشانی شده
Lactobacillus sp. AM14 بر عملکرد رشد، هضم‌پذیری و ترکیب بدن ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)
تغذیه شده با جیره حاوی سطوح ۲۰ و ۴۰ درصد آرد سویا. نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱۴ (۱)، ۶۹-۹۰.

DOI: 10.22069/japu.2024.22072.1845



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

پودر ماهی یکی از منابع پروتئینی جیره آبزیان می باشد که منابع محدود و گران قیمت بودن، استفاده از آن را محدود کرده است (۱). توسعه مداوم آبی پروری نیاز به منابع پایدار و تجدیدپذیر برای جایگزینی با پودر ماهی دارد (۲). برای کاهش پودر ماهی یا روغن ماهی در آبزیان مطالعات زیادی تأثیر جایگزینی پودر ماهی با منابع پروتئین گیاهی، عمدتاً محصولات سویا، در رژیم غذایی ماهی قزل آلا، رنگین کمان را بر عملکرد آن بررسی کرده اند (۳، ۴، ۵). با این وجود آرد سویا دارای معایبی است (۴). پودر ماهی یکی از منابع پروتئینی جیره آبزیان می باشد که منابع محدود و گران قیمت بودن، استفاده از آن را محدود کرده است (۱). توسعه مداوم آبی پروری نیاز به منابع پایدار و تجدیدپذیر برای جایگزینی با پودر ماهی دارد (۲). برای کاهش پودر ماهی یا روغن ماهی در آبزیان مطالعات زیادی تأثیر جایگزینی پودر ماهی با منابع پروتئین گیاهی، عمدتاً محصولات سویا، در رژیم غذایی ماهی قزل آلا، رنگین کمان را بر عملکرد آن بررسی کرده اند (۳، ۴، ۵). با این وجود آرد سویا دارای معایبی است (۴). از جمله می توان به ترکیبات ضد تغذیه ای (آنتی تریپسین، الیگوساکارید، لکترین، ساپونین و اسید فیتیک) اشاره کرد (۶ و ۷). برای استفاده بیش تر از سویا در رژیم غذایی ماهی، می توان مواد ضد تغذیه ای موجود در سویا را به روش های مختلفی کاهش داد که یکی از آن ها استفاده از باکتری های پروبیوتیک دارای فعالیت فیتازی است زیرا ایمن، ارزان و در دسترس هستند (۸). پروبیوتیک ها افزودنی های خوراکی مناسبی هستند که سبب افزایش مقاومت میزبان در برابر بیماری، افزایش رشد، بهبود میکروبیوتای روده و افزایش فعالیت آنزیم ها می گردند (۹). برخی از باکتری های پروبیوتیک آنزیم فیتاز تولید می کنند. آنزیم

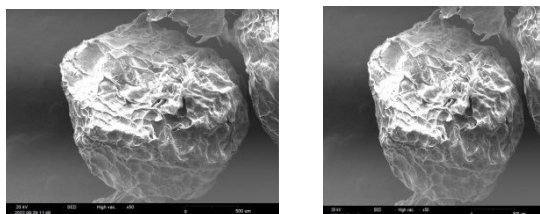
فیتاز در موجودات تک معدده ای به طور قابل توجهی قابلیت هضم فسفر و مواد معدنی توسط دستگاه گوارش را افزایش می دهد (۸). فیتاز میکروبی قادر است گروه های مواد معدنی و فسفر را از فیتات آزاد کند، در نتیجه آن ها را برای جذب و استفاده توسط حیوانات در دسترس قرار دهد (۱۰). سلول های پروبیوتیک باید در طول پردازش مواد غذایی، ذخیره سازی و عبور مواد گوارشی از طریق معده و روده زنده بمانند تا فواید سلامتی خود را منتقل کنند (۱۱، ۱۲). با این حال برای استفاده از پروبیوتیک ها در نوشیدنی ها و غذاها محدودیت هایی وجود دارد. نرخ رشد و پایداری آن ها مستقیماً تحت تأثیر برخی از متغیرها مانند pH، محیط دستگاه گوارش، دمای ذخیره سازی و شرایط پردازش است (۱۲). یکی از مهم ترین عوامل محدود کننده بقای باکتری های پروبیوتیک، pH پایین است (۱۳). به منظور بهبود بقای پروبیوتیک ها در شرایط دستگاه گوارش، از کپسوله سازی پروبیوتیک در دانه های هیدروکلوئیدی استفاده می شود (۱۴). فرآیند ریزپوشانی یک روش مفید برای محافظت از پروبیوتیک ها در برابر شرایط نامساعد محیطی است که پروبیوتیک ها ممکن است در معرض آن قرار بگیرند (۱۵). بیوپلیمرهای مختلفی، مانند آلژینات سدیم برای ریزپوشانی باکتری های پروبیوتیک مورد استفاده قرار گرفته اند (۱۶). هیدروژل های آلژینات سدیم (ALG) به دلیل خاصیت ژل کنندگی ارزان، غیر سمی و عالی با مواد معدنی مغذی مانند Ca^{2+} توجه زیادی را به خود جلب کرده اند (۱۷). با این حال، هیدروژل های آلژینات نیمه تراوا در سطح اسیدی pH مانند pH ۳ و در حضور عوامل سازنده مانند Ca^{2+} شکسته و یا حتی از بین می روند (۱۶). به منظور غلبه بر نفوذپذیری هیدروژل آلژینات، سطح آن با لایه ای از پلیمرهای زیستی دیگر غذایی مانند کیتوزان، پروتئین آب پنیر و نشاسته پوشانده می شود

(۱۸). کیتوزان یک پلی‌ساکارید کاتیونی است که از استیل‌زدایی کیتین به‌دست می‌آید. گروه‌های آمین با بار مثبت ($pKa \sim 6.5$) در کیتوزان امکان برهمکنش الکترواستاتیکی کیتوزان را با دیگر پلیمرهای زیستی آنیونی، مانند آلژینات سدیم، در یک محیط اسیدی فراهم می‌کند (۱۹). با توجه به موارد بیان شده، باکتری *Lactobacillus* sp. AM14 در مطالعات قبلی نویسندگان با توجه به فعالیت فیتازی آن از محصولات لبنی جدا (۸) و پتانسیل پروبیوتیکی آن در مطالعه (۸) اثبات شد، سپس تأثیر مثبت آن بر عملکرد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره حاوی سطوح مختلف آرد سویا بررسی شد (۲۰). هدف از این مطالعه، ریزپوشانی باکتری پروبیوتیک *Lactobacillus* sp. AM14 با فعالیت فیتازی و بررسی تأثیر تغذیه رژیم غذایی مبتنی بر پروتئین گیاهی آرد سویا همراه با میکروکپسول‌های باکتری پروبیوتیک *Lactobacillus* sp. AM14 با فعالیت فیتازی بر رشد، قابلیت هضم مواد مغذی و ترکیب لاشه در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی و ریزپوشانی پروبیوتیک AM14 *Lactobacillus* sp. پروبیوتیک AM14 *Lactobacillus* sp. به‌دست آمده از محصولات لبنی، دارای فعالیت فیتازی (۸) در محیط کشت MRS مایع در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط بی‌هوایی

به‌مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور کشت داده شد. سوسپانسیون کشت سلولی با تعداد زنده نهایی 10^8 کلونی/میلی‌لیتر برای ریزپوشانی استفاده شد. ریزپوشانی باکتری‌ها با آلژینات‌سدیم و کیتوزان در شرایط استریل و به روش اکستروژن انجام شد. ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریایی با ۱۵ میلی‌لیتر محلول آلژینات سدیم ۲ درصد (w/v) استریل با یکدیگر مخلوط شد سپس کپسول‌ها با ریختن ماتریکس آلژینات در محلول کلرید کلسیم ۰/۱ مولار استریل تهیه شدند. کپسول‌ها در این محلول به مدت ۳۰ دقیقه سخت شدند (۱۶). سپس با سرعت ۳۵۰۰ دور به‌مدت ۵ دقیقه دو بار سانتریفیوژ شده و با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد (۲۱). برای تهیه محلول کیتوزان به منظور لایه دوم ریزپوشانی، ابتدا ۰/۴ گرم کیتوزان در ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر اسیدی شده با ۰/۴ میلی‌لیتر اسید استیک حل گردید. pH محلول حاصل با اضافه کردن NaOH ۱ مولار به حدود ۶ تنظیم شد و سپس کپسول‌های ساخته شده با آلژینات سدیم به درون محلول کیتوزان ریخته‌شد و با دور ۱۰۰ rpm به‌مدت ۳۰ دقیقه مخلوط شد و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی در پیتون‌واتر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (۱۶). اندازه میکروکپسول‌های تولیدی توسط دستگاه پارتیکل سایزر 37.47 ± 268.5 میکرومتر تعیین شد. شکل ۱ تصویر پروبیوتیک ریزپوشانی‌شده *Lactobacillus* sp. AM14 به‌وسیله آلژینات و کیتوزان را نشان می‌دهد.



شکل ۱- میکروکپسول پروبیوتیک *Lactobacillus* sp. AM14

Figure 1. Probiotic microcapsule AM14 *Lactobacillus* sp.

و بر روی غذا اسپری گردید در غذای گروه شاهد فقط سرم فیزیولوژی اسپری گردید.

محاسبه عملکرد رشد: در پایان دوره آزمایش، ماهیان سپس به صورت جداگانه وزن شدند و ضریب تبدیل خوراک (FCR)، نرخ رشد ویژه (SGR)، رشد روزانه و کارایی پروتئین (PER) مطابق رابطه‌های زیر محاسبه شد (۲۱).

درصد نرخ رشد ویژه (SGR) = $\ln$ وزن نهایی بدن - $\ln$ وزن اولیه بدن (گرم) / طول دوره پرورش (روز) $\times 100$

ضریب تبدیل غذایی (FCR) = کل غذای خورده شده (گرم) / افزایش وزن (گرم)
رشد روزانه = وزن نهایی بدن - وزن اولیه بدن (گرم) / طول دوره آزمایش
کارایی پروتئین (PER) = افزایش وزن (گرم) / مقدار پروتئین مصرفی (گرم)

تجزیه شیمیایی لاشه و جیره: برای نمونه برداری از لاشه ماهیان ۲۴ ساعت قبل تغذیه ماهیان قطع شد. از هر تکرار ۳ قطعه ماهی برای نمونه برداری به صورت تصادفی انتخاب و برای آنالیز ترکیبات لاشه در عصاره گل میخک (۳۰۰ میلی گرم در لیتر) بیهوش گردید (۲۲). رطوبت، چربی خام، پروتئین خام و محتوای خاکستر در جیره و کل بدن ماهی قزل آلا رنگین کمان اندازه گیری شد (۲۳). ترکیب جیره‌های آزمایشی نیز بر همین اساس تعیین شد.

هضم پذیری مواد مغذی: به منظور تعیین قابلیت هضم در هفتمین هفته پرورش، اکسید کروم (به میزان ۱ درصد) (۲۴) به جیره‌ها افزوده شد و ماهیان با جیره جدید به مدت ۱ هفته به منظور سازگاری با این جیره مورد تغذیه قرار گرفتند و در آغاز هفته ۸ نیم ساعت بعد از غذادهی مدفوع ماهیان به مدت ۱ هفته از کف تانک‌ها جمع‌آوری شد مدفوع جمع‌آوری شده در

طرح آزمایش و نحوه تیمار بندی: این آزمایش در سالن ونیرو دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام گرفت. ماهی قزل آلا رنگین کمان (۳۶۰ قطعه با میانگین وزن 0.22 ± 0.43 گرم) از مزرعه خصوصی (ساری، مازندران، ایران) خریداری و به سالن تکثیر و پرورش دانشگاه کشاورزی ساری منتقل شد. ماهیان به منظور عدم آلودگی با آب نمک ضد عفونی شدند. قبل از شروع آزمایش، به مدت ۱۰ روز سازگاری انجام شد و سپس به طور تصادفی به ۱۸ مخزن دایره‌ای فایبرگلاس (۳۰۰ لیتر، ۲۰ ماهی در هر مخزن) توزیع شدند. دمای آب 15.5 ± 1.5 درجه سانتی گراد، اکسیژن محلول و pH به ترتیب 7.6 ± 0.31 میلی گرم در لیتر و 7.6 ± 0.31 بود. ماهیان به مدت ۸ هفته با جیره‌های آزمایشی روزانه به میزان سیری در سه نوبت تغذیه شدند. ترکیب جیره‌های آزمایشی با میزان پروتئین و انرژی یکسان و سطوح مختلف آرد سویا (جدول ۱) با استفاده از نرم افزار UFFDA فرموله شد و ترکیب شیمیایی آن تعیین شد. تغذیه ماهیان در ۶ تیمار (تیمار اول: ۴۰ درصد سویا + $3/8 \times 10^8$ CFU/g پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم و کیتوزان (T1)، تیمار دوم: ۴۰ درصد سویا + $3/8 \times 10^8$ CFU/g پروبیوتیک فاقد کپسول (T2)، تیمار سوم: ۴۰ درصد سویا + کپسول‌های ساخته شده با آلژینات سدیم و کیتوزان فاقد پروبیوتیک (T3)، تیمار چهارم: ۴۰ درصد سویا + $3/8 \times 10^8$ CFU/g پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم (T4)، تیمار پنجم: ۴۰ درصد سویا فاقد کپسول و پروبیوتیک (C2)، تیمار ششم: ۲۰ درصد سویا فاقد کپسول و پروبیوتیک (C1)) انجام شد. کپسول‌های حاوی پروبیوتیک در حین ساخت به غذای پایه افزوده شدند. در تیمار حاوی پروبیوتیک آزاد مقدار $3/8 \times 10^8$ CFU/g باکتری در سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیون شده

آنالیز داده‌ها: این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. شرط نرمال بودن داده‌ها با آزمون Shapiro-Wilk یا آزمون Kalmogorov-Smiranov تست شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد استفاده شد. برای انجام تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه شماره ۱۹ استفاده شد.

پلیت‌های شیشه‌ای قرار داده شده و در آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید و بعد در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای انجام آزمایش‌های بعدی منجمد شد (۲۰ و ۲۵).

ضریب هضم پذیری مواد مغذی = $100 - 100$ درصد
مواد مغذی در مدفوع $\times$ درصد مارکر در غذا / درصد مواد مغذی در غذا $\times$ درصد مارکر در مدفوع.
مقدار محاسبه اسید کرومیک (میلی‌گرم) موجود در نمونه:

اکسید کروم = جذب نمونه / وزن نمونه $\times 10 \times B$

B = شیب منحنی استاندارد

جدول ۱- ترکیب جیره و نتایج آنالیز تقریبی.

Table 1. Diet composition and proximate analysis results.

اجزای جیره (درصد)	جیره ۲۰ درصد سویا	جیره ۴۰ درصد سویا
آرد سویا	20	40
گلوتن ذرت	15	15
آرد گندم	10	5
پودر ماهی	43	26
روغن ماهی	4.5	5.5
روغن سویا	4.5	5.5
مکمل‌های ویتامینی	1.5	1.5
مکمل‌های معدنی	1.5	1.5
ترکیب جیره (درصد)		
پروتئین	42.7	41.1
چربی	19.3	20.06
خاکستر	12	10
رطوبت	2.5	3.43
فسفر	1.07	0.96
کلسیم	0.23	0.21
منیزیم	0.25	0.26

ترکیب مکمل معدنی (میلی‌گرم بر کیلوگرم) شامل: ۲۶۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۶۰۰ میلی‌گرم مس، ۶۰۰۰ میلی‌گرم آهن، ۴۶۰۰ میلی‌گرم منیزیم، ۵۰ میلی‌گرم سلنیوم، ۱۰۰ میلی‌گرم ید

ترکیب مکمل ویتامینی (میلی‌گرم بر کیلوگرم) شامل: ۱۲۰۰۰۰۰ IU (بین‌المللی) ویتامین A، ۴۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D، ۳۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۱۲۰۰ میلی‌گرم K3، ۲۰۰ میلی‌گرم ویتامین B1، ۳۳۶۰ میلی‌گرم ویتامین B2، ۷۲۰۰ میلی‌گرم ویتامین B3، ۲۴۰۰ میلی‌گرم ویتامین B6، ۸ میلی‌گرم ویتامین B12، ۹۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین B5، ۶۰۰ میلی‌گرم ویتامین B9، ۴ میلی‌گرم ویتامین B12، ۵۴۰۰ میلی‌گرم ویتامین C

Mineral supplement composition (mg/kg) includes: 2600 mg manganese, 600 mg copper, 6000 mg iron, 4600 mg magnesium, 50 mg selenium, 100 mg iodine. Vitamin supplement composition (mg/kg) includes: 1,200,000 IU (international units) of vitamin A, 400,000 IU of vitamin D, 3,000 IU of vitamin E, 1,200 mg of K3, 200 mg of vitamin B1, 3,360 mg of vitamin B2, 7,200 mg of vitamin B3, 2,400 mg of vitamin B6, 8 mg of vitamin B12, 9,000 mg of vitamin B5, 600 mg of vitamin B9, 4 mg of vitamin B12, 5,400 mg of vitamin C

نتایج

عملکرد رشد: جدول ۲ نتایج عملکرد رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف آرد سویا همراه با میکروکپسول پروبیوتیک را نشان می‌دهد. در تیمار ۴۰ درصد سویا بدون افزودنی تمام شاخص‌های رشد (به جز ضریب تبدیل غذایی که افزایش معنی‌داری داشت) نسبت به تیمار ۲۰ درصد سویا بدون افزودنی کاهش معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). تمام تیمارهای ۴۰ درصد سویا حاوی افزودنی به جز تیمار حاوی کپسول توانست شاخص‌های رشد را نسبت به تیمار ۲۰ و ۴۰ درصد بدون افزودنی بهبود بخشد ($p < 0.05$)، اما در میان تیمارهای دارای افزودنی، تیمار حاوی پروبیوتیک دارای فعالیت فیتازی ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم-کیتوزان از نظر شاخص وزن نهایی، نرخ رشد

ویژه و میزان رشد روزانه بهترین تیمار و تیمارهای حاوی پروبیوتیک دارای فعالیت فیتازی ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم-کیتوزان و حاوی پروبیوتیک دارای فعالیت فیتازی ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم از نظر ضریب تبدیل غذایی و کارایی پروتئین بهترین نتیجه را نشان دادند ($p < 0.05$) و تیمار حاوی کپسول از نظر شاخص‌های نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و کارایی پروتئین تفاوت معنی‌داری با تیمار ۴۰ درصد سویا بدون افزودنی نشان نداد ($p > 0.05$). اگرچه شاخص‌های وزن نهایی و میزان رشد روزانه در تیمار حاوی کپسول نسبت به تیمار ۴۰ درصد سویا فاقد افزودنی افزایش معنی‌داری نشان داد، اما نسبت به تیمار حاوی ۲۰ درصد سویا فاقد افزودنی کاهش معنی‌دار داشت ($p < 0.05$).

جدول ۲- شاخص‌های رشد در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های حاوی پروبیوتیک.

Table 2. Growth indices in rainbow trout fed diets containing probiotics.

تیمار						پارامترهای رشد
(T ₄)	(T ₃)	(T ₂)	(T ₁)	(C ₂)	(C ₁)	
12.45±0.035	12.39±0.021	12.54±0.056	12.52±0.021	12.36±0.063	12.49±0.240	وزن اولیه (گرم)
71.07±0.756 ^b	57.85±0.353 ^c	63.44±0.374 ^c	72.40±0.035 ^a	56.52±0.254 ^f	60.11±0.141 ^d	وزن نهایی (گرم)
3.10±0.028 ^b	2.74±0.014 ^{de}	2.89±0.028 ^c	3.16±0.000 ^a	2.70±0.014 ^c	2.77±0.014 ^d	نرخ رشد ویژه (SGR) (درصد در روز)
0.90±0.021 ^d	1.07±0.014 ^{ab}	0.95±0.035 ^{cd}	0.90±0.007 ^d	1.08±0.042 ^a	1.01±0.007 ^{bc}	ضریب تبدیل غذایی (FCR)
3.23±0.028 ^a	2.93±0.035 ^b	3.13±0.091 ^a	3.24±0.084 ^a	2.88±0.070 ^b	2.90±0.014 ^b	کارایی پروتئین (PER)
1.04±0.014 ^b	0.80±0.007 ^c	0.90±0.007 ^c	1.07±0.000 ^a	0.78±0.007 ^f	0.84±0.007 ^d	میزان رشد روزانه (گرم در روز)
100	100	100	100	100	100	زنده‌مانی (درصد)

حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست ($P < 0.05$). (C₁) ۲۰ درصد سویا فاقد کپسول و پروبیوتیک (C₂)، ۴۰ درصد سویا فاقد کپسول و پروبیوتیک (T₁)، ۴۰ درصد سویا + 3.8×10^8 CFU/g پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم و کیتوزان (T₂)، ۴۰ درصد سویا + 3.8×10^8 CFU/g پروبیوتیک فاقد کپسول (T₃)، ۴۰ درصد سویا + کپسول‌های ساخته شده با آلژینات سدیم و کیتوزان فاقد پروبیوتیک (T₄) ۴۰ درصد سویا + 3.8×10^8 CFU/g پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم

Different letters in each row indicate significant differences between means ($P < 0.05$). (C₁) 20% soybean without capsule and probiotic (C₂), 40% soybean without capsule and probiotic (T₁), 40% soybean + 3.8×10^8 CFU/g probiotic microencapsulated with sodium alginate and chitosan (T₂), 40% soybean + 3.8×10^8 CFU/g probiotic microencapsulated with sodium alginate and chitosan (T₃), 40% soybean + capsules made with sodium alginate and chitosan without probiotic (T₄) 40% soybean + 3.8×10^8 CFU/g probiotic microencapsulated with sodium alginate

ترکیب بدن: در بین تیمارهای حاوی افزودنی و شاهد با سطوح مختلف سویا تفاوت معنی‌داری در میزان رطوبت مشاهده نشد (جدول ۳؛ $P>0.05$). در تیمار ۴۰ درصد سویا بدون افزودنی میزان خاکستر، پروتئین و چربی نسبت به تیمار ۲۰ درصد سویا بدون افزودنی کاهش معنی‌داری داشت ($P<0.05$). در میزان خاکستر، چربی و پروتئین بدن، فقط تیمارهای ۴۰ درصد حاوی پروبیوتیک دارای فعالیت فیتازی ریزپوشانی شده با آلزینات سدیم-کیتوزان و پروبیوتیک دارای فعالیت فیتازی ریزپوشانی شده با آلزینات سدیم توانست بهبود معنی‌داری نسبت به تیمار ۲۰ و ۴۰ درصد سویا بدون افزودنی ایجاد کند

($P<0.05$)، البته در میزان پروتئین بدن تیمار پروبیوتیک دارای فعالیت فیتازی ریزپوشانی شده با آلزینات سدیم با تیمار حاوی ۲۰ درصد سویا بدون افزودنی تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>0.05$). تیمار ۴۰ درصد حاوی پروبیوتیک آزاد نیز میزان پروتئین بدن را نسبت به تیمار حاوی ۴۰ درصد بدون افزودنی افزایش داد و به مقدار پروتئین بدن در تیمار حاوی ۲۰ درصد سویا بدون افزودنی رساند ($P<0.05$)، اما تیمار حاوی کپسول اگرچه میزان پروتئین را نسبت به تیمار ۴۰ درصد فاقد افزودنی افزایش داد، اما همچنان از تیمار ۲۰ درصد سویا بدون افزودنی کم‌تر بود ($P<0.05$).

جدول ۳- ترکیب لاشه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های حاوی پروبیوتیک.

Table 3. Composition of rainbow trout carcasses fed probiotic-containing diets.

شاخص (درصد)	تیمار					
	(T ₄)	(T ₃)	(T ₂)	(T ₁)	(C ₂)	(C ₁)
رطوبت	69.71±1.26 ^a	68.99±0.43 ^a	69.36±0.27 ^a	70.93±1.52 ^a	69.45±0.23 ^a	70.18±0.19 ^a
خاکستر	8.69±0.73 ^a	6.89±0.31 ^b	6.94±0.38 ^b	8.94±0.28 ^a	5.74±0.12 ^b	8.78±0.65 ^a
چربی	39.71±1.23 ^a	34.54±1.25 ^{bc}	36.09±0.60 ^b	39.85±0.45 ^a	32.66±0.26 ^c	35.99±0.82 ^b
پروتئین	48.46±0.20 ^{ab}	45.53±1.47 ^c	47.51±0.43 ^b	49.54±0.23 ^a	42.38±0.32 ^d	47.54±0.12 ^b

حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست ($P<0.05$). (C₁) ۲۰ درصد سویا فاقد کپسول و پروبیوتیک (C₂)، ۴۰ درصد سویا فاقد کپسول و پروبیوتیک (T₁)، ۴۰ درصد سویا + 3.8×10^8 CFU/g پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلزینات سدیم و کیتوزان (T₂)، ۴۰ درصد سویا + 3.8×10^8 CFU/g پروبیوتیک فاقد کپسول (T₃)، ۴۰ درصد سویا + کپسول‌های ساخته شده با آلزینات سدیم و کیتوزان فاقد پروبیوتیک (T₄) ۴۰ درصد سویا + 3.8×10^8 CFU/g پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلزینات سدیم

Different letters in each row indicate significant differences between means ($P<0.05$). (C₁) 20% soybean without capsule and probiotic (C₂), 40% soybean without capsule and probiotic (T₁), 40% soybean + 3.8×10^8 CFU/g probiotic microencapsulated with sodium alginate and chitosan (T₂), 40% soybean + capsules made with sodium alginate and chitosan without probiotic (T₃), 40% soybean + capsules made with sodium alginate and chitosan without probiotic (T₄) 40% soybean + 3.8×10^8 CFU/g probiotic microencapsulated with sodium alginate

هضم‌پذیری مواد مغذی: در تیمار ۴۰ درصد سویا بدون افزودنی میزان هضم‌پذیری خاکستر، پروتئین و چربی نسبت به تیمار ۲۰ درصد سویا بدون افزودنی کاهش معنی‌داری داشت ($P<0.05$). در تیمارهای حاوی افزودنی به جز تیمار ۴۰ درصد سویا حاوی کپسول، هضم‌پذیری خاکستر و چربی نسبت به تیمارهای ۲۰ و ۴۰ درصد سویا فاقد افزودنی افزایش معنی‌داری نشان داد ($P<0.05$). در مورد هضم‌پذیری خاکستر بین تیمارهای ۴۰ درصد سویا حاوی پروبیوتیک آزاد و ریزپوشانی شده تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P>0.05$)، اما در هضم‌پذیری چربی و پروتئین تیمارهای حاوی پروبیوتیک ریزپوشانی شده،

گردید ($P < 0.05$). تیمار حاوی کپسول و پروبیوتیک آزاد اگرچه نسبت به تیمار ۴۰ درصد سویا فاقد افزودنی بهبود داشتند، اما همچنان نسبت به تیمار ۲۰ درصد سویا فاقد افزودنی کاهش نشان دادند ($P < 0.05$).

افزایش معنی داری نسبت به سایر تیمارها نشان دادند به طوری که بیشترین هضم پذیری چربی در تیمار پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم- کیتوزان و بیشترین هضم پذیری پروتئین در تیمار پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم- کیتوزان و پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم مشاهده

جدول ۴- هضم پذیری مواد مغذی در ماهی قزل آلائی رنگین کمان تغذیه شده با جیره های حاوی پروبیوتیک.

Table 4. Nutrient digestibility in rainbow trout fed diets containing probiotics.

شاخص (درصد)	تیمار				
	(T ₄)	(T ₃)	(T ₂)	(T ₁)	(C ₂)
خاکستر	87.74±0.55 ^a	84.73±0.04 ^{bc}	87.84±0.51 ^a	88.27±1.52 ^a	82.17±0.35 ^c
چربی	97.23±0.09 ^b	93.17±0.10 ^{de}	95.56±0.26 ^c	98.39±0.15 ^a	92.79±0.19 ^e
پروتئین	90.94±0.79 ^a	84.68±0.04 ^d	89.42±0.01 ^b	91.55±0.32 ^a	82.32±0.17 ^e

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین هاست ($P < 0.05$). (C₁) ۲۰ درصد سویا فاقد کپسول و پروبیوتیک (C₂), ۴۰ درصد سویا فاقد کپسول و پروبیوتیک (T₁), ۴۰ درصد سویا + 3.8×10^8 CFU/g + پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم و کیتوزان (T₂), ۴۰ درصد سویا + 3.8×10^8 CFU/g + پروبیوتیک فاقد کپسول (T₃), ۴۰ درصد سویا + کپسول های ساخته شده با آلژینات سدیم و کیتوزان فاقد پروبیوتیک (T₄) ۴۰ درصد سویا + 3.8×10^8 CFU/g + پروبیوتیک ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم

Different letters in each row indicate significant differences between means ($P < 0.05$). (C₁) 20% soybean without capsule and probiotic (C₂), 40% soybean without capsule and probiotic (T₁), 40% soybean + 3.8×10^8 CFU/g probiotic microencapsulated with sodium alginate and chitosan (T₂), 40% soybean + 3.8×10^8 CFU/g probiotic microencapsulated with sodium alginate and chitosan (T₃), 40% soybean + capsules made with sodium alginate and chitosan without probiotic (T₄) 40% soybean + 3.8×10^8 CFU/g probiotic microencapsulated with sodium alginate

بحث

سودمندی بر روی گونه های ماهیان دارند (۳۰) و عملکرد رشد را با کاهش استرس، حفظ میکروفلور طبیعی و افزایش قابلیت هضم افزایش می دهند (۲۸ و ۲۹). برخی پروبیوتیک ها قادر به تولید آنزیم فیتاز هستند و می توانند اثرات نامطلوب مواد ضد مغذی موجود در پروتئین های گیاهی جیره ماهی را از بین ببرند (۲۰). پژوهش های متعدد نشان داد که افزودن پروبیوتیک به جیره غذایی آبزیان، افزایش رشد آنها را در پی دارد (۴، ۲۰، ۳۱، ۳۲). افزودن مکمل های پروبیوتیک *Lactobacillus spp.* به طور معنی داری عملکرد رشد را در *Rutilus frisii kutum* (۳۳)، *O. mykiss* (۴، ۲۰، ۳۴)، *Pagrus major*

استفاده از یک رژیم غذایی حاوی مواد غذایی گیاهی منجر به کاهش محتوای فسفر و اسید آمینه موجود نسبت به رژیم غذایی مبتنی بر پودر ماهی می شود که اثر نامطلوبی بر رشد و ایمنی ماهیان دارد (۲۶ و ۲۷) که به منظور غلبه بر این مشکلات استفاده از مکمل ها مانند پروبیوتیک ها برای بهبود رشد و ایمنی مورد توجه قرار گرفته است (۲۸ و ۲۹). به نظر می رسد در میان پروبیوتیک ها، پروبیوتیک دارای فعالیت فیتازی می تواند مشکل فیتیک اسید در جذب فسفر را مرتفع کند (۲۰). پروبیوتیک ها مکمل های غذایی میکروبی زنده هستند که اثرات

(۳۵) و تیلایا (۳۱) افزایش داد. پروبیوتیک‌ها با ترشح آنزیم‌های گوارشی، سبب افزایش قابلیت هضم مواد غذایی و تجزیه ترکیبات غیرقابل هضم و به دنبال آن افزایش اشتها و نهایتاً افزایش رشد در آبزیان می‌گردند (۳۶). در مطالعه حاضر از پروبیوتیک *Lactobacillus* sp. AM14 دارای فعالیت فیتاز در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به صورت ریزپوشانی که در مطالعات قبلی پتانسیل پروبیوتیکی این لاکتوباسیل برای استفاده در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و اثربخشی مکمل‌سازی آن در عملکرد رشد، قابلیت هضم مواد مغذی، ترکیب بدن، آنزیم‌های گوارشی و فاکتورهای سرمی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار گرفته بود، استفاده گردید (۸، ۲۰). نتایج مطالعه حاضر نشان‌داد در تیمار شاهد ۴۰ درصد سویا بدون افزودنی شاخص‌های رشد از جمله ضریب تبدیل غذایی، کارایی پروتئین، نرخ رشد ویژه و رشد روزانه نسبت به شاهد ۲۰ درصد سویا بدون افزودنی کم‌تر بود. بارنس و همکاران (۲۰۱۲) افزایش میزان ضریب تبدیل غذایی و کاهش معنی‌دار رشد در سطح جایگزینی بیش از ۳۰ درصد پودر ماهی جیره با کنجاله سویای تخمیر شده را گزارش کردند (۳۷). هم‌چنین گزارش شد که گنجاندن پودر سویا ۵۵ درصد در رژیم غذایی *O. mykiss* به‌طور قابل‌توجهی سبب افزایش ضریب تبدیل غذایی و کاهش نرخ رشد ویژه و رشد روزانه گردید (۳۸). مطالعه رحیم‌نژاد و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد جایگزینی ۴۰ درصد پودر ماهی با پودر سویا در جیره تأثیر معنی‌داری بر رشد *Lateolabrax japonicus* نداشت (۳۹) در حالی‌که افزایش سطح جایگزینی به ۸۰ درصد منجر به کاهش نرخ رشد گردید. در مطالعه عابدی و همکاران (۲۰۲۲) تیمار حاوی ۴۰ درصد سویا نسبت به تیمار ۲۰ درصد سویا کاهش معنی‌داری در شاخص‌های

رشد نشان داد (۲۰). کاهش عملکرد رشد در جیره‌های حاوی ۲۰ و ۴۰ درصد سویا بدون افزودنی ممکن است به دلیل وجود عوامل ضد تغذیه‌ای مانند فیتیک اسید، قابلیت هضم کم پروتئین و کمبود اسیدهای آمینه ضروری در جیره غذایی کنجاله سویا باشد (۴۰). اثرات مثبت بر بهبود عملکرد رشد با پروبیوتیک در مطالعات مختلف مشاهده شد. بهبود در ضریب تبدیل غذایی، میزان رشد ویژه و میزان بقا با افزودن پروبیوتیک *L. lactis* subsp. *lactis* strain PTCC 1403 در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) (۳۴) و پروبیوتیک *Bacillus pumillus* SE5 در سی‌باس ژاپنی (*L. japonicus*) (۳۹) مشاهده شد. در مطالعه حاضر نتایج بهتر یا مشابهی در شاخص‌های رشد با استفاده از سطح جایگزینی بالاتر (۴۰ درصد) با افزودن باکتری‌های دارای فعالیت فیتاز به شکل آزاد در مقایسه با ماهیان تغذیه شده از شاهد با سطح جایگزینی ۲۰ درصد به‌دست آمد. با این‌حال تیمارهای حاوی ۴۰ درصد سویا دارای پروبیوتیک ریزپوشانی نتایج بهتری را در شاخص‌های رشد نسبت به پروبیوتیک آزاد در مقایسه با ماهیان تغذیه شده از شاهد با سطح جایگزینی ۲۰ درصد نشان دادند. در مطالعه‌ای دیگر جایگزینی پودر ماهی با سطوح بیش‌تر سویا تا ۴۰ درصد در جیره ماهی سبب کاهش عملکرد رشد گردید که با افزودن باکتری‌های *Lactobacillus* sp. AM14 دارای فعالیت فیتاز می‌توان عملکرد رشد را بهبود بخشید (۲۰). با اضافه کردن مکمل آنزیم فیتاز اثرات مثبتی بر روی میزان مصرف خوراک، شاخص‌های رشد و ترکیب بدن در تیلایای نیل (۴۱) و *Oreochromis niloticus* (۴۲) مشاهده شد. به‌طورکلی مکمل فیتاز می‌تواند مصرف انرژی و مواد مغذی را بهینه کند و می‌تواند به عنوان یک رژیم غذایی سازگار با محیط زیست استفاده شود (۴۳). تأثیر پروبیوتیک‌ها بر عملکرد رشد نیز می‌تواند

پری‌بیوتیک شناخته شده است و می‌تواند به‌طور انتخابی رشد باکتری‌های مفید را در روده تحریک کند و متعاقباً عملکرد رشد را افزایش دهد (۳۱، ۵۱). بسیاری از پژوهش‌گران معتقدند آلزینات دیواره میکروکپسول‌ها می‌تواند به عنوان یک پری‌بیوتیک و محرک ایمنی عمل کند و اثرات مثبتی بر رشد ماهی داشته باشد (۵۲، ۵۳، ۵۴). پری‌بیوتیک‌ها عناصر غذایی غیرقابل هضمی هستند که با فعال‌کردن یا تحریک رشد یک یا تعداد معدودی از گونه‌های باکتریایی که در روده وجود دارند می‌توانند با کمک به رشد باکتری‌های مفید در داخل بدن سبب بهبود و تعادل میکروفلور روده و افزایش مکانیسم دفاعی میزبان و سلامتی و رشد آن گردند (۵۵، ۵۶). یکی دیگر از انواع پری‌بیوتیک‌های محرک رشد و ایمنی مناسب در آبزیان کیتوزان است (۵۷) کیتوزان فراوان‌ترین پلیمر بیولوژیک بعد از سلولز در جهان است که توسط دی‌استیلاسیون قلیایی از کیتین به‌دست می‌آید کیتوزان دارای خواص بیولوژیکی مانند افزایش رشد، تحریک و تعدیل ایمنی می‌باشد (۵۸). در مطالعه‌ای تأثیر کیتوزان جیره بر عملکرد رشد و بقا در بچه‌ماهی کپور معمولی نشان‌داد تغذیه با جیره‌های حاوی کیتوزان در سطوح مختلف نسبت به گروه شاهد در وزن نهایی، افزایش وزن و ضریب تبدیل غذایی عملکرد بهتری داشته است (۵۹). هم‌چنین گنگ و همکاران (۲۰۱۲) با مطالعه بر روی ماهی کوبیا (*Rachycentron canadum*) دریافتند کیتوزان باعث افزایش عملکرد رشد ماهی و بقا گردید (۶۰). در مطالعه حاضر نشان داده شد میزان پروتئین بدن در تیمار ۴۰ درصد سویا بدون افزودنی کم‌تر از تیمار شاهد با ۲۰ درصد سویا بدون افزودنی بود. با افزودن مکمل پروبیوتیک آزاد دارای فعالیت فیتازی به جیره در سطح ۴۰ درصد سویا، افزایش میزان پروتئین نسبت به ۲۰ درصد سویا بدون افزودنی مشاهده

از طریق چند مکانیسم شامل: افزایش در دسترس بودن مواد غذایی برای جذب و هم‌چنین افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی دستگاه گوارش حاصل شود (۴۴). کاهش FCR در ماهی‌های آزمایشی مطالعه حاضر نشان‌دهنده بهبود کارایی خوراک با استفاده از پروبیوتیک‌های باکتریایی دارای فعالیت فیتازی نسبت به تیمارهای ۲۰ و ۴۰ درصد سویا بدون افزودنی بود. به‌عبارت دیگر، به‌نظر می‌رسد که این مکمل با افزایش قابلیت هضم مواد مغذی و فراهمی زیستی مواد مغذی، FCR را بهبود می‌بخشد (۴۵، ۴۶). فیتات در جیره‌های حاوی پروتئین‌های گیاهی سبب مهار فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌گردد (۴۷)، که این اثر فیتات احتمالاً با استفاده از باکتری‌هایی با فعالیت فیتاز کاهش می‌یابد (۲۰) و در نتیجه فعالیت آنزیم‌های گوارشی در ماهی افزوده شده و سبب بهبود عملکرد رشد می‌گردد (۴۲ و ۴۸). در مطالعه حاضر پروبیوتیک *Lactobacillus* sp. AM14 دارای فعالیت فیتازی، ریزپوشانی‌شده با آلزینات و کیتوزان و با آلزینات به تنهایی در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان سبب کاهش FCR و بهبود دیگر شاخص‌های رشد نسبت به ۲۰ و ۴۰ درصد سویا بدون افزودنی گردید. اثرات مثبت ریزپوشانی بر میزان افزایش وزن، نرخ رشد ویژه و FCR *Lactobacillus rhamnosus* GG در ماهی تیلپپای نیل (۳۱) و افزودن پروبیوتیک *Geotrichum candidum* QAUGC01 بر روی ماهی کپور *Labeo rohita* (۳۶) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (۴۹) مشاهده شد. احتمالاً بهبود رشد مشاهده شده در پروبیوتیک‌های ریزپوشانی‌شده به‌علت افزایش زنده ماندن باکتری‌ها در شرایط معده و روده بعد از ریزپوشانی با ذرات آلزینات کیتوزان بوده است (۳۱، ۵۰). علاوه بر این آلزینات یک پلی‌ساکارید از جلبک‌های قهوه‌ای است که به‌عنوان یک

گردید که باتوجه به نتایج به‌دست آمده میزان پروتئین در تیمارهای ۴۰ درصد سویا دارای پروبیوتیک ریزپوشانی نتایج بهتری را در شاخص‌های رشد نسبت به پروبیوتیک آزاد در مقایسه با ماهیان تغذیه شده از شاهد با سطح جایگزینی ۲۰ و ۴۰ درصد سویا نشان داد. در توافق با نتایج این مطالعه با اضافه نمودن پروبیوتیک دارای آنزیم فیتاز به جیره ماهی قزل‌آلا (۲۰) و آنزیم فیتاز در جیره (Acipenser baeri Brandt ♀ × A. schrenckii Brandt ♂) (۶۱) میزان پروتئین بدن به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. این موضوع احتمالاً به‌علت اثر آنزیم فیتاز بوده که با خشی‌نمودن اثر منفی فیتات بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی و تأثیر مثبت بر میزان هضم و جذب پروتئین و مواد مغذی موجود در جیره حیوانات تک‌معدده‌ای، میزان جذب پروتئین لاشه را افزایش داده است (۶۲). کارایی فیتاز برای آزادسازی پروتئین در کمپلکس‌ها و در نتیجه افزایش استفاده از مواد مغذی تأیید شده است (۶۳). مطالعات نشان داد که محتوای پروتئین بدن ماهی با افزایش جایگزینی سویا در جیره کاهش می‌یابد (۳۸، ۶۴). سنتز پروتئین کارآمد نیاز به دسترسی کافی به تمام آمینواسیدهای ضروری دارد (۶۵). غلظت نامتعادل اسیدآمینه در رژیم غذایی حاوی پروتئین گیاهی منجر به افزایش تخریب پروتئین می‌گردد (۶۶). میزان بالاتر پروتئین در لاشه ماهی سفید (*Rutilus Frisii kutim*) تغذیه‌شده با دو پروبیوتیک *Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis* (۳۳) و قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با پروبیوتیک *Bacillus spp.* (۳۵) در تیمار دریافت‌کننده باکتری نسبت به گروه شاهد گزارش شد. افزایش میزان پروتئین در بدن ماهیان مطالعات مختلف می‌تواند به‌خاطر افزایش جذب مواد غذایی باشد چرا که افزایش حضور پروبیوتیک‌ها در روده و بهبود فلور میکروبی آن خود منجر به افزایش جذب آمینواسیدها

می‌شود (۶۷). هم‌چنین تغییرات در محتوای پروتئین و چربی لاشه ماهی را می‌توان تحت‌تأثیر ترشح آنزیم‌های مختلف از جمله آنزیم لیپاز و توسط پروبیوتیک‌ها دانست که نقش مهمی در افزایش فعالیت ویژه این آنزیم‌ها در روده ماهیان دارند که موجب افزایش قابلیت هضم‌پذیری پروتئین، چربی و کربوهیدرات‌ها شده و در نتیجه، کارایی تغذیه و رشد بهتری را در آبزیان موجب می‌شوند (۶۸، ۶۹، ۷۰). افزایش حضور پروبیوتیک‌ها به واسطه حفظ باکتری و بارگذاری بهتر در روده ماهی است که در این مطالعه ریزپوشانی با آلزینات/ کیتوزان سبب بهبود عملکرد باکتری شده است. در واقع در پی تعدیل بار میکروبی روده با کمک ریزپوشانی پروبیوتیک، بهترین نتایج در ترکیبات شیمیایی بدن ماهی، در تیمارهای با پروبیوتیک ریزپوشانی‌شده در مقایسه با گروه‌های دارای پروبیوتیک آزاد و شاهد مشاهده شد (۳۶، ۴۹). علاوه بر این خواص پری‌بیوتیکی آلزینات و کیتوزان دیواره کپسول‌ها نیز بر روی فعالیت پروبیوتیک و میکروفلور روده مؤثر است و سبب بهبود ترکیبات بدن می‌گردد (۷۱). پروبیوتیک‌ها موجب افزایش قابلیت هضم ترکیبات پروتئینی و چربی غذای خورده شده در روده جانور آبزی شده و در نتیجه، سبب می‌شوند تا این ترکیبات به خوبی در روده آبزی هضم و جذب شده و درصد پروتئین و چربی خام لاشه افزایش یابد (۷۲). در این مطالعه افزایش مقدار خاکستر بدن در تیمار حاوی پروبیوتیک ریزپوشانی‌شده با آلزینات و کیتوزان و آلزینات به تنهایی مشاهده شد. اثر آنزیم فیتاز بر روی ماهی تیلایپای نیل میزان خاکستر را افزایش داد (۷۳).

در مطالعه حاضر محتوای چربی بدن در ماهی‌هایی که با رژیم غذایی شاهد با سطح جایگزینی ۴۰ درصد سویا تغذیه شده بودند، کم‌تر از تیمار شاهد با سطح جایگزینی ۲۰ درصد سویا بود. در مطالعه

حاضر افزودن باکتری با فعالیت فیتازی به جیره‌های حاوی ۴۰ درصد سویا باعث افزایش قابل توجهی در محتوای چربی بدن در مقایسه با سطوح تیمار شاهد شد. در مطالعه عابدی و همکاران (۲۰۲۲) نیز این نتیجه با افزودن باکتری با فعالیت فیتازی در تیمارهای حاوی ۴۰ درصد سویا مشاهده گردید (۲۰). مطالعه حاضر نشان داد که ریزپوشانی پروبیوتیک‌های باکتریایی با فعالیت فیتاز می‌تواند کیفیت بدن ماهی را بهبود بخشد. محتوی بالای چربی در چند مطالعه حاوی پروبیوتیک مشاهده شد. چربی در لاشه ماهی سفید (*R. frisii*) تغذیه شده با دو پروبیوتیک *B. subtilis* و *B. licheniformis* (۶۷) و قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با پروبیوتیک *Bacillus spp.* (۳۵) در تیمار دریافت‌کننده باکتری نسبت به گروه شاهد گزارش شد. با توجه به نتایج حاضر، افزودن باکتری‌های دارای فعالیت فیتاز در تیمارهای حاوی پروبیوتیک در مقایسه با گروه شاهد ۲۰ و ۴۰ درصد جایگزینی سویا سبب افزایش قابلیت هضم پروتئین و خاکستر و چربی گردید که با نتایج ترکیب بدن نیز تطابق دارد. با این حال مشاهده گردید ریزپوشانی پروبیوتیک عملکرد بهتری را نسبت به پروبیوتیک آزاد در مقایسه با ماهیان تغذیه شده از جیره شاهد با سطح جایگزینی ۲۰ و ۴۰ درصد سویا از خود نشان داده است. تغذیه با جیره‌های حاوی پروبیوتیک به طور معنی‌داری بر ترکیب بدن ماهی *Catla catla* (۷۴) و *sea bream* (۷۲) تأثیر گذاشت. عابدی و همکاران (۲۰۲۲) نیز این نتیجه را در سطوح مختلف جایگزینی سویا و باکتری دارای فیتاز گزارش کردند (۲۰). عملکرد بهتر در جیره‌های دارای باکتری با فعالیت فیتاز، ممکن است به دلیل دسترسی بهتر به آنزیم‌های خارج سلولی تولید شده توسط پروبیوتیک‌ها (۴۴) و همچنین تحریک تولید آنزیم‌های درونی توسط ماهی باشد که هضم مواد مغذی را بهبود می‌بخشد (۷۵). در

مطالعه سطوح مختلف آنزیم فیتاز در جیره ماهی تیلاپیا (۶۹) و در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۲۴، ۷۶)، هضم‌پذیری بالای خاکستر، چربی و پروتئین مشاهده گردید. آنزیم فیتاز مواد مغذی متصل شده به اسید فیتیک را آزاد می‌کند که سبب افزایش انرژی آزاد شده از طریق جیره غذایی می‌گردد (۷۷) که این انرژی آزاد شده مازاد بر نیاز ماهی به صورت چربی ذخیره می‌گردد. در مطالعه‌ای بر روی جوجه‌های گوشتی مشاهده شد قابلیت هضم خاکستر و شاخص‌های رشد با افزودن آنزیم فیتاز افزایش یافته است (۷۸) که می‌تواند به علت افزایش فسفر آلی و یا سایر مواد معدنی آزاد شده در تیمارهای تغذیه شده با فیتاز باشد. افزایش مقدار خاکستر با مصرف مکمل فیتاز نشان‌دهنده رسوب بیش‌تر فسفر در استخوان‌ها است (۷۸). اثرات مثبت هضم‌پذیری ریزپوشانی پروبیوتیک *L. rhamnosus* ATCC 7469 بر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مشاهده شد (۴۹). احتمالاً ریزپوشانی سبب زنده‌مانی بیش‌تر پروبیوتیک گردیده همچنین خاصیت پری‌بیوتیکی دیواره کپسول سبب بهبود فعالیت پروبیوتیک و اثرات مثبت باکتری گردیده است (۱۴، ۳۱، ۳۶، ۵۴). در هضم‌پذیری ترکیب شیمیایی جیره محتوای خاکستر اندازه ماهی جمع‌آوری مدفوع تکنیک تهیه فراوری غذا بستگی دارد (۷۳). اثرات فیتاز بر قابلیت هضم مواد مغذی وابسته به عوامل تغذیه از جمله غلظت و منبع اسید فیتیک یا فیتات در جیره ماهی مقدار و منبع پروتئین جیره میزان هضم‌پذیری پروتئین سطوح مواد معدنی و میزان فیتاز مصرفی بستگی دارد (۲۳، ۷۹).

نتیجه‌گیری

افزودن پروبیوتیک *Lactobacillus sp.* AM14 دارای فعالیت فیتازی به جیره‌هایی با سطوح جایگزینی ۲۰ و ۴۰ درصد سویا باعث افزایش رشد

پروبیوتیک به‌وسیله پلیمرهای آلزینات سدیم و کیتوزان اثرات مثبتی از خود نشان داد و سبب بهبود عملکرد رشد گردید.

همراه با بهبود FCR، اثرات مثبت بر ترکیب بدن و قابلیت هضم گردید. به‌طورکلی، استفاده از باکتری با فعالیت فیتازی، اثرات منفی افزایش سطوح جایگزینی کنجاله سویا را خنثی نمود. همچنین ریزپوشانی

منابع

1. Dawood, M. A., Magouz, F. I., Mansour, M., Saleh, A. A., Asely, A. M. E., Fadl, S. E., ... & Al-Misned, F. (2020). Evaluation of yeast fermented poultry by-product meal in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) feed: Effects on growth performance, digestive enzymes activity, innate immunity, and antioxidant capacity. *Frontiers in veterinary science*, 6, 516.
2. Ismail, T., Nassef, E. D., Hegazi, E. S., Bakr, A. N., Moustaf, E. M., Abdo, W., & Elbially, Z. (2019). The modulatory effect of dietary betaine on intestinal absorptive capacity, lipogenesis and expression of lipid metabolism-and growth-related genes in Nile tilapia fed on soybean meal-based diet. *Slovenian Veterinary Research*, 56 (22-Suppl).
3. Hosseini Shekarabi, S. P., Shamsaie Mehrgan, M., Banavreh, A., & Foroudi, F. (2021). Partial replacement of fishmeal with corn protein concentrate in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on growth performance, physiometabolic responses, and fillet quality. *Aquaculture Research*, 52 (1), 249-259.
4. Ramos, M. A., Goncalves, J. F., Costas, B., Batista, S., Lochmann, R., Pires, M. A., Rema, P., & Ozorio, R. O. (2017). Commercial Bacillus probiotic supplementation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta*): growth, immune responses and intestinal morphology. *Aquaculture Research*, 48 (5), 2538-2549.
5. Voorhees, J., Barnes, M., & Chipps, S. (2018). Direct substitution of fishmeal with bioprocessed soybean meal in brown trout diets. *J. Fish. Aqua. Dev: JFAD-143*.
6. Kononova, S. V., Zinchenko, D. V., Muranova, T. A., Belova, N. A., & Miroshnikov, A. I. (2019). Intestinal microbiota of salmonids and its changes upon introduction of soy proteins to fish feed. *Aquaculture International*, 27, 475-496.
7. Masoomi Dezfooli, S., Gutierrez-Maddox, N., Alfaro, A., & Seyfoddin, A. (2019). Encapsulation for delivering bioactives in aquaculture. *Reviews in aquaculture*, 11 (3), 631-660.
8. Abedi, S., Yeganeh, S., Moradian, F., & Ouraji, H. (2020). Probiotic potential of *Lactobacillus* sp. strains capable of phytate breakdown isolated from dairy products for using in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) diet. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19 (4), 1690-1707.
9. Yang, G., Peng, M., Tian, X., & Dong, S. (2017). Molecular ecological network analysis reveals the effects of probiotics and florfenicol on intestinal microbiota homeostasis: an example of sea cucumber. *Sci. Rep. UK*, 7, 4778.
10. Kaiza, V. E., Yildiz, M., Eldem, V., Golzaradabi, S., & Ofori-Mensah, S. (2023). The effects of dietary microbial 6-phytase on growth parameters, intestinal morphometric properties and selected intestinal genes expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1876). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 107 (6), 1517-1529.
11. Gandomi, H., Abbaszadeh, S., Misaghi, A., Bokaie, S., & Noori, N. (2016). Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice

- storage and under simulated gastrointestinal conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 391-371.
12. Oberoi, K., Tolun, A., Altintas, Z., & Sharma, S. (2021). Effect of alginate-microencapsulated hydrogels on the survival of *Lactobacillus rhamnosus* under simulated gastrointestinal conditions. *Foods*, 10 (9), 1999.
13. Abbaszadeh, S., Gandomi, H., Misaghi, A., Bokaei, S., & Noori, N. (2014). The effect of alginate and chitosan concentrations on some properties of chitosan-coated alginate beads and survivability of encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* in simulated gastrointestinal conditions and during heat processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94 (11), 2210-2216.
14. Chen, H. Y., Li, X. Y., Liu, B. J., & Meng, X. H. (2017). Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* and survival assays under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 29, 248-25.
15. Liu, H., Gong, J., Chabot, D., Miller, S. S., Cui, S. W., Zhong, F., & Wang, Q. (2018). Improved survival of *Lactobacillus zeae* LB1 in a spray dried alginate-protein matrix. *Food Hydrocolloids*, 78, 100-108.
16. Qi, X., Simsek, S., Ohm, J. B., Chen, B., & Rao, J. (2020). Viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG microencapsulated in alginate/chitosan hydrogel particles during storage and simulated gastrointestinal digestion: role of chitosan molecular weight. *Soft Matter*, 16 (7), 1877-1887.
17. Dong, Q. Y., Chen, M. Y., Xin, Y., Qin, X. Y., Cheng, Z., Shi, L. E., & Tang, Z. X. (2013). Alginate-based and protein-based materials for probiotics encapsulation: a review. *International journal of food science & technology*, 48 (7), 1339-1351.
18. Lee, D. W., Lim, C., Israelachvili, J. N., & Hwang, D. S. (2013). Strong adhesion and cohesion of chitosan in aqueous solutions. *Langmuir*, 29 (46), 14222-14229.
19. Razavi, S., Janfaza, S., Tasnim, N., Gibson, D. L., & Hoorfar, M. (2021). Microencapsulating polymers for probiotics delivery systems: Preparation, characterization, and applications. *Food Hydrocolloids*, 120, 106882.
20. Abedi, S. Z., Yeganeh, S., Moradian, F., & Ouraji, H. (2022). The influence of probiotic (isolated based on phytase activity) on growth performance, body composition, and digestibility of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 53 (5), 1006-1030.
21. Adorian, T. J., Jamali, H., Farsani, H. G., Darvishi, P., Hasanpour, S., Bagheri, T., & Roozbehfar, R. (2019). Effects of probiotic bacteria *Bacillus* on growth performance, digestive enzyme activity, and hematological parameters of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11, 248-255.
22. Abedi, S. Z., Yeganeh, S., Moradian, F., & Ouraji, H. (2019). Effect of commercial phytase (SMIZYME PHYTASE) in diets containing different levels of soybean meal on growth and carcass compositions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *JAIR*; 7 (1), 85-100. [In Persian]
23. Kim, H. S., Jung, W. G., Myung, S. H., Cho, S. H., & Kim, D. S. (2014). Substitution effects of fishmeal with tuna byproduct meal in the diet on growth, body composition, plasma chemistry and amino acid profiles of juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 431, 92-98.
24. Asad, F., Qamer, S., Ashraf, A., Rafique, A., Shaheen, Z., Nisar, A., & Javaid, S. (2019). Apparent nutrient digestibility of carbohydrate (corn) in *Cirrhinus mrigala* under the influence of chromium chloride hexahydrate. *Brazilian Journal of Biology*, 80, 518-522.
25. Khosravi, S., Bui, H. T. D., Rahimnejad, S., Herault, M., Fournier, V., Kim, S. S., ... & Lee, K. J. (2015). Dietary supplementation of marine protein

- hydrolysates in fish-meal based diets for red sea bream (*Pagrus major*) and olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 435, 371-376.
26. Yaghoubi, M., Mozanzadeh, M. T., Marammazi, J. G., Safari, O., & Gisbert, E. (2016). Dietary replacement of fish meal by soy products (soybean meal and isolated soy protein) in silvery-black porgy juveniles (*Sparidentex hasta*). *Aquaculture*, 464, 50-59.
27. Urán, P. A., Gonçalves, A. A., Taverne-Thiele, J. J., Schrama, J. W., Verreth, J. A. J., & Rombout, J. H. W. M. (2008). Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & shellfish immunology*, 25 (6), 751-760.
28. Hoseinifar, S. H., Sun, Y. Z., Wang, A., & Zhou, Z. (2018). Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. *Frontiers in microbiology*, 9, 2429.
29. Adel, M., El-Sayed, A. F. M., Yeganeh, S., Dadar, M., & Giri, S. S. (2017). Effect of potential probiotic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* on growth performance, intestinal microbiota, digestive enzyme activities, and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 9, 150-156.
30. Yang, H. L., Sun, Y. Z., Hu, X., Ye, J. D., Lu, K. L., Hu, L. H., & Zhang, J. J. (2019). *Bacillus pumilus* SE5 originated PG and LTA tuned the intestinal TLRs/MyD88 signaling and microbiota in grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish & Shellfish Immunology*, 88, 266-271.
31. Pirarat, N., Pinpimai, K., Rodkhum, C., Chansue, N., Ooi, E. L., Katagiri, T., & Maita, M. (2015). Viability and morphological evaluation of alginate-encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG under simulated tilapia gastrointestinal conditions and its effect on growth performance, intestinal morphology and protection against *Streptococcus agalactiae*. *Animal feed science and technology*, 207, 93-103.
32. Wang, Y. C., Hu, S. Y., Chiu, C. S., & Liu, C. H. (2019). Multiple-strain probiotics appear to be more effective in improving the growth performance and health status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, than single probiotic strains. *Fish & shellfish immunology*, 84, 1050-1058.
33. Azarin, H., Aramli, M. S., Imanpour, M. R., & Rajabpour, M. (2015). Effect of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* and ferroin solution on growth performance, body composition and haematological parameters in Kutum (*Rutilus frisii kutum*) fry. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 7, 31-37.
34. Yeganeh, S., Adel, M., Nosratimovafagh, A., & Dawood, M. A. (2021). The effect of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PTCC 1403 on the growth performance, digestive enzymes activity, antioxidative status, immune response, and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Probiotics and antimicrobial proteins*, 13(6), 1723-1733.
35. Dawood, M. A., Koshio, S., Ishikawa, M., El-Sabagh, M., Esteban, M. A., & Zaineldin, A. I. (2016). Probiotics as an environment-friendly approach to enhance red sea bream, *Pagrus major* growth, immune response and oxidative status. *Fish & Shellfish Immunology*, 57, 170-178.
36. Amir, I., Zuberi, A., Kamran, M., & Imran, M. (2019). Evaluation of commercial application of dietary encapsulated probiotic (*Geotrichum candidum* QAUGC01): Effect on growth and immunological indices of rohu (*Labeo rohita*, Hamilton 1822) in semi-intensive culture system. *Fish & Shellfish Immunology*, 95, 464-472.
37. Barnes, E., Michael, B. L., Michael, K. A., & Rosentrater, J. R. S. (2012). An initial investigation replacing fish meal with a commercial fermented soybean meal product in the diets of juvenile

- rainbow trout. *Open Journal of Animal Sciences*, 2 (4), 234-243.
38. Hariloglu, A. G. (2011). The influence of replacing fish meal partially in diet with soybean meal and full-fat soya on growth and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pakistan Journal of Zoology*, 43 (1), 175-182.
39. Rahimnejad, S., Lu, K., Wang, L., Song, K., Mai, K., Davis, D. A., & Zhang, C. (2019). Replacement of fish meal with *Bacillus pumillus* SE5 and *Pseudozyma aphidis* ZR1 fermented soybean meal in diets for Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). *Fish & shellfish immunology*, 84, 987-997.
40. Zhang, C., Rahimnejad, S., Wang, Y. R., Lu, K., Song, K., Wang, L., & Mai, K. (2018). Substituting fish meal with soybean meal in diets for Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*): Effects on growth, digestive enzymes activity, gut histology, and expression of gut inflammatory and transporter genes. *Aquaculture*, 483, 173-182.
41. Mahmoud, N., Eid, A., Wahdan, A. A., Enany, M. E., El-Nab, A., & Asmaa, S. (2019). Effect of phytase and citric acid on growth performance, feed utilization and its antibacterial activity against fish pathogens of Nile tilapia fingerlings. *Egyptian Journal for Aquaculture*, 9 (4), 35-53.
42. Rachmawati, D., Samidjan, I., & Elfitasari, T. (2018). Effect of The Phytase Enzyme Addition in The Artificial Feed on Digestibility of Feed, Feed Conversion Ratio and Growth of Gift Tilapia Saline Fish (*Oreochromis niloticus*) Nursery Stadia I. Paper presented at the IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*. 116 (1), 012009.
43. Pontes, T. C., Brito, J. M. d., Wernick, B., Urbich, A. V., Panaczewicz, P. A. P., Miranda, J. A. G., Furuya, V. R. B., & Furuya, W. M. (2021). Top-sprayed phytase enhances the digestibility of energy, protein, amino acids and minerals, and reduces phosphorus output in Nile tilapia fed all-vegetable diets. *Aquaculture Research*, 52 (12), 6562-6570.
44. Akbari, H., Shekrabi, S. P. H., Soltani, M., & Mehrgan, M. S. (2021). Effects of potential probiotic *Enterococcus casseliflavus* (EC-001) on growth performance, immunity, and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-10.
45. Kemigabo, C., Abdel-Tawwab, M., Lazaro, J. W., Sikawa, D., Masembe, C., & Kang'Ombe, J. (2018). Combined effect of dietary protein and phytase levels on growth performance, feed utilization, and nutrients digestibility of African catfish, *Clarias gariepinus* (B.), reared in earthen ponds. *Journal of Applied Aquaculture*, 30 (3), 211-226.
46. Zhu, Y., Qiu, X., Ding, Q., Duan, M., & Wang, C. (2014). Combined effects of dietary phytase and organic acid on growth and phosphorus utilization of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture*, 430, 1-8.
47. Dersjant-Li, Y., Awati, A., Schulze, H., & Partridge, G. (2015). Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95 (5), 878-896.
48. Shah, S. Z. H., Afzal, M. U. H. A. M. M. A. D., Hussain, S. M., Fatima, M., Bilal, M., Ahmed, T., & Habib, R. Z. (2015). Supplementation of citric acid and phytase improves the digestive enzymes activities in *Labeo rohita* fingerlings. *Biologia*, 61, 63-68.
49. Hooshyar, Y., Abedian Kenari, A., Paknejad, H., & Gandomi, H. (2020). Effects of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 on different parameters related to health status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the protection against *Yersinia ruckeri*. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 12, 1370-1384.

50. Pinpimai, K., Rodkhum, C., Chansue, N., Katagiri, T., Maita, M., & Pirarat, N. (2015). The study on the candidate probiotic properties of encapsulated yeast, *Saccharomyces cerevisiae* JCM 7255, in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Research in Veterinary Science*, 102, 103-111.
51. Nazarudin, M. F., Yusoff, F., Idrus, E. S., & Aliyu-Paiko, M. (2020). Brown seaweed *Sargassum polycystum* as dietary supplement exhibits prebiotic potentials in Asian sea bass *Lates calcarifer* fingerlings. *Aquaculture Reports*, 18, 100488.
52. Sarfo, F. O. (2017). Macroalga-derived alginate as a feed additive for Atlantic salmon (Master's thesis, Nord universitet).
53. Van Doan, H., Tapingkae, W., Moonmanee, T., & Seepai, A. (2016). Effects of low molecular weight sodium alginate on growth performance, immunity, and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 55, 186-194.
54. Van Doan, H., Hoseinifar, S. H., Tapingkae, W., & Khamtavee, P. (2017). The effects of dietary kefir and low molecular weight sodium alginate on serum immune parameters, resistance against *Streptococcus agalactiae* and growth performance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 62, 139-146.
55. Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker, R. T., Bogwald, J., ... & Ringo, E. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302 (1-2), 1-18.
56. Kipkoech, C., Kinyuru, J. N., Imathiu, S., Meyer-Rochow, V. B., & Roos, N. (2021). In vitro study of cricket chitosan's potential as a prebiotic and a promoter of probiotic microorganisms to control pathogenic bacteria in the human gut. *Foods*, 10 (10), 2310.
57. Cheba, B. A. (2011). Chitin and chitosan: marine biopolymers with unique properties and versatile applications. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 6 (3), 149-153.
58. Maqsood, S., Singh, P., Samoon, M. H., & Balage, A. K. (2010). Effect of dietary chitosan on non-specific immune response and growth of *Cyprinus carpio* challenged with *Aeromonas hydrophila*. *International Aquatic Research*, 2, 77-85.
59. Same, M., Imanpoor, M. R., Jafari, V., & Alishahie, A. (2016). Effects of chitosan prebiotic on the growth performance, hematological parameters, survival and resistance to salinity stress in common carp (*Cyprinus carpio*) fry. *Journal of Animal Environment*, 8 (2), 215-222. [In Persian]
60. Geng, X., Dong, X. H., Tan, B. P., Yang, Q. H., Chi, S. Y., Liu, H. Y., & Liu, X. Q. (2011). Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, (*Rachycentron canadum*). *Fish & shellfish immunology*, 31 (3), 400-406.
61. Xu, G. L., Xing, W., Li, T. L., Ma, Z. H., Jiang, N., Xu, S. D., ... & Luo, L. (2020). The effects of different fishmeal level diets with or without phytase supplementation on growth performance, body composition, digestibility, immunological and biochemical parameters of juvenile hybrid sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt♀ × *A. schrenckii* Brandt♂). *Aquaculture Nutrition*, 26 (2), 261-274.
62. von Danwitz, A., van Bussel, C. G., Klatt, S. F., & Schulz, C. (2016). Dietary phytase supplementation in rapeseed protein based diets influences growth performance, digestibility and nutrient utilisation in turbot (*Psetta maxima* L.). *Aquaculture*, 450, 405-411.
63. Hussain, S. M., Ahmad, N., Javid, A., Shahzad, M. M., Hussain, M., & Arsalan, M. Z. U. H. (2018). Effects of phytase and citric acid supplemented corn gluten (30%) mealbased diets on the mineral digestibility of *Cirrhinus*

- mrigala* fingerlings. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18 (4), 501-507.
64. Koumi, A. R., Koffi, K. M., Atsé, B. C., & Kouame, L. P. (2011). Growth, feed efficiency and carcass mineral composition of *Heterobranchius longifilis*, *Oreochromis niloticus* and *Sarotherodon melanotheron* juveniles fed different dietary levels of soybean meal-based diets. *African Journal of Biotechnology*, 10 (66), 14990-14998.
65. Wolfe, R. R. (2017). Branched-chain amino acids and muscle protein synthesis in humans: myth or reality?. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 14 (1), 30.
66. Mohapatra, S., Chakraborty, T., Prusty, A. K., Das, P., Paniprasad, K., & Mohanta, K. N. (2012). Use of different microbial probiotics in the diet of rohu, *Labeo rohita* fingerlings: effects on growth, nutrient digestibility and retention, digestive enzyme activities and intestinal microflora. *Aquaculture Nutrition*, 18 (1), 1-11.
67. Nayak, S. K. (2010). Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, 29 (1), 2-14.
68. Allameh, S., Yusoff, F., Ringo, E., Daud, H., Saad, C., & Ideris, A. (2016). Effects of dietary mono-and multiprobiotic strains on growth performance, gut bacteria and body composition of Javanese carp (*Puntius gonionotus*, Bleeker 1850). *Aquaculture nutrition*, 22 (2), 367-373.
69. Ebrahimi, G., Ouraji, H., Khalesi, M., Sudagar, M., Barari, A., Zarei Dangesaraki, M., & Jani Khalili, K. (2012). Effects of a prebiotic, Immunogen, on feed utilization, body composition, immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in the common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus) fingerlings. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 96 (4), 591-59.
70. Montazeri Parchikolaie, H., Abedian Kenari, A., & Esmaeili, N. (2021). Soya bean-based diets plus probiotics improve the profile of fatty acids, digestibility, intestinal microflora, growth performance and the innate immunity of beluga (*Huso huso*). *Aquaculture Research*, 52 (1), 152-166.
71. Gatesoupe, F. J., Huelvan, C., Le Bayon, N., Sévère, A., Aasen, I. M., Degnes, K. F., & Kaushik, S. J. (2014). The effects of dietary carbohydrate sources and forms on metabolic response and intestinal microbiota in sea bass juveniles, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 422, 47-53.
72. Zaineldin, A. I., Hegazi, S., Koshio, S., Ishikawa, M., El Basuni, M. F., Dossou, S., & Dawood, M. A. (2021). The influences of *Bacillus subtilis* C-3102 inclusion in the red sea bream diet containing high levels of soybean meal on growth performance, gut morphology, blood health, immune response, digestibility, digestive enzymes, and stress resistance. *Aquaculture Nutrition*, 27 (6), 2612-2628.
73. Maas, R. M., Verdegem, M. C., Dersjant-Li, Y., & Schrama, J. W. (2018). The effect of phytase, xylanase and their combination on growth performance and nutrient utilization in Nile tilapia. *Aquaculture*, 487, 7-14.
74. Shahzad, M. M., Hussain, S. M., Hussain, M., Ahmad, N., Tahir, L., & Akhtar, K. (2023). Effect of eco-friendly probiotics-supplemented rapeseed meal-based diet on the performance of *Catla catla* fingerlings. *Environmental Science and Pollution Research*, 30 (44), 99219-99230.
75. Payam, A., Afshin, J., Amid, M. H., & Amin, K. S. (2011). Effect of dietary probiotic on survival and growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Advances in Environmental Biology*, 5 (6), 1162-1165.
76. Vandenberg, G., Scott, S., & De La Noüe, J. (2012). Factors affecting nutrient digestibility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a plant protein-based diet supplemented with

- microbial phytase. *Aquaculture nutrition*, 18 (4), 369-379.
77. Aydin, A., Pekel, A., Issa, G., Demirel, G., & Patterson, P. (2010). Effects of dietary copper, citric acid, and microbial phytase on digesta pH and ileal and carcass microbiota of broiler chickens fed a low available phosphorus diet. *Journal of Applied Poultry Research*, 19 (4), 422-431.
78. Gautier, A., Walk, C., & Dilger, R. (2018). Effects of a high level of phytase on broiler performance, bone ash, phosphorus utilization, and phytate dephosphorylation to inositol. *Poultry Science*, 97 (1), 211-218.
79. Morales, G. A., Marquez, L., Hernández, A. J., & Moyano, F. J. (2016). Chapter 9 Phytase effects on protein and phosphorus bioavailability in fish diets. In *Phytate destruction-consequences for precision animal nutrition* (pp. 1-8). *Wageningen Academic Publishers*.