فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال چهاردهم، شماره اول، بهار ۱۴۰۵

مقاله پژوهشی

اثرات تغذیه با ناپلی آرتمیای غنی شده با پری‌بیوتیک بر عملکرد رشد، برخی شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی و بقای لارو ماهی گورخری (*Danio rerio*)

محمد امینی ویشکائی[۱]، نوید ابراهیم‌زاده کوچصفهانی[۱]، بهرام فلاحتکار[۲]*

DOI: 10.22124/japb.2026.32319.1580
تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۴ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۴۰۴

چکیده

این مطالعه به بررسی تاثیر تغذیه لارو ماهیان گورخری (*Danio rerio*) با ناپلی آرتمیای غنی شده با سطوح مختلف پری‌بیوتیک، حاوی مانان‌الیگوساکارید و بتاگلوکان بر شاخص‌های رشد و ایمنی غیراختصاصی پرداخته است. پژوهش در دو مرحله شامل غنی‌سازی ناپلی آرتمیا و تغذیه لاروها به مدت ۱۴ روز انجام گرفت. ناپلی‌ها در چهار سطح پری‌بیوتیک صفر (P_0)، ۵۰ (P_{50})، ۱۰۰ (P_{100}) و ۲۰۰ (P_{200}) میلی‌گرم در لیتر غنی شدند و لاروها با میانگین وزن ۰/۵۸±۴۶/۰۸ میلی‌گرم در شرایط کنترل شده با ناپلی آرتمیا تغذیه شدند. در پایان دوره، شاخص‌های رشد و شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تغذیه لاروها با ناپلی آرتمیای غنی شده با پری‌بیوتیک تاثیر معنی‌داری بر وزن نهایی و نرخ بقا نداشت ($P>0/05$)، اما وزن کسب شده، میانگین رشد روزانه و کارایی غذا در تیمار P_{200} نسبت به P_{50} به طور معنی‌داری بالاتر بود ($P<0/05$). نرخ رشد ویژه و درصد افزایش وزن بدن به طور معنی‌داری در تیمارهای P_0 و P_{200} بالاتر از P_{50} بود ($P<0/05$)، در حالی که شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی بین تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان ندادند ($P>0/05$). این نتایج حاکی از آن است که پری‌بیوتیک‌ها حتی در کوتاه مدت نیز می‌توانند عملکرد رشد لاروها را تا حدی بهبود بخشند، در حالی که اثر آنها بر شاخص‌های ایمنی لارو ماهی محدود است. تثبیت بخشی از پری‌بیوتیک در بدن آرتمیا، مقدار و مدت غنی‌سازی نقش مهمی در اثرگذاری نهایی دارند. پاسخ رشد غیرخطی احتمالا نشان‌دهنده تعامل پیچیده مکانیسم‌های متابولیک و میکروبی است که نیاز به پژوهش‌های بیشتر در این زمینه دارد.

واژگان کلیدی: *بتاگلوکان، غذای زنده، مانان الیگوساکارید*، Artemia franciscana، Danio rerio.

۱- کارشناس ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران.
۲- استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران.
* نویسنده مسئول: falahatkar@guilan.ac.ir

مقدمه

آبزی‌پروری به عنوان یکی از مهم‌ترین منابع تولید پروتئین جانوری در جهان، طی دهه‌های اخیر رشد چشمگیری داشته است و نقش کلیدی در تامین امنیت غذایی ایفا می‌کند (Reda and Selim, 2013). افزایش تقاضا برای محصولات شیلاتی و محدودیت منابع طبیعی، ضرورت توسعه روش‌های نوین برای ارتقای سلامت و کارایی تولید را آشکار ساخته است (Miandare et al., 2016). در این میان، مرحله لاروی آبزیان به دلیل حساسیت بالا و ضعف سیستم ایمنی ذاتی، بیشترین تلفات را تجربه می‌کند و مدیریت تغذیه و سلامت در این مرحله اهمیت ویژه‌ای دارد (Hamsah et al., 2019).

یکی از راهکارهای موثر برای بهبود وضعیت لاروها، استفاده از غذای زنده با کیفیت بالا است. آرتمیا به دلیل ارزش غذایی بالا، اندازه مناسب و قابلیت غنی‌سازی، به عنوان غذای زنده استاندارد در پرورش لارو ماهیان و سخت‌پوستان، جایگاه ویژه‌ای را در پژوهش‌ها و کاربردهای عملی پیدا کرده است (Samie Amlashi et al., 2014). ویژگی منحصربه‌فرد آرتمیا در قابلیت جذب و انتقال مواد مختلف از محیط به بدن خود، امکان استفاده از آن را به عنوان حامل طبیعی ترکیبات زیست‌فعال مانند پری‌بیوتیک‌ها و پروبیوتیک‌ها فراهم کرده است (Jheng et al., 2015).

توسعه پایدار آبزی‌پروری نیازمند جایگزین‌های ایمن و زیست‌سازگار بجای آنتی‌بیوتیک‌ها است، زیرا استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها در سال‌های گذشته منجر به ظهور باکتری‌های مقاوم، تهدید سلامت عمومی و آسیب به محیط زیست شده است (Miandare et al., 2016). پری‌بیوتیک‌ها به عنوان ترکیبات طبیعی می‌توانند بدون ایجاد مقاومت میکروبی، ایمنی ذاتی آبزیان را تقویت کنند و مقاومت آنها را در برابر بیماری‌ها افزایش دهند (Momeni-Moghaddam et al., 2015). پری‌بیوتیک‌ها ترکیبات غیرقابل هضمی هستند که رشد و فعالیت باکتری‌های مفید روده را تحریک می‌کنند و در سال‌های اخیر توجه زیادی را در آبزی‌پروری به خود جلب کرده‌اند (Momeni-Moghaddam et al., 2015). مانان‌الیگوساکارید (MOS) و گالاکتوالیگوساکارید (GOS) از جمله شناخته‌شده‌ترین پری‌بیوتیک‌ها هستند که اثرات مثبت آنها بر عملکرد رشد، شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی و مقاومت به استرس در

گونه‌های مختلف آبزیان گزارش شده است (Zhang et al., 2012; Miandare et al., 2016). افزودن MOS به جیره غذایی می‌تواند موجب افزایش طول ریزپرزهای روده، بهبود جذب مواد مغذی، ارتقای فعالیت آنزیم‌های ایمنی مانند لیزوزیم و کمپلمان و افزایش مقاومت در شرایط استرس‌زا شود (Zhang et al., 2012). بتاگلوکان‌ها نیز به عنوان نسل جدیدی از پری‌بیوتیک‌ها مطرح هستند که با تحریک سلول‌های ایمنی، موجب بهبود و تقویت واکنش‌های ایمنی در بدن می‌شوند (Kibenge et al., 2020).

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که غنی‌سازی آرتمیا با پری‌بیوتیک‌ها می‌تواند موجب بهبود رشد، بقا و ایمنی لاروهای آبزیان شود. Daniels و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که غنی‌سازی آرتمیا با MOS در سطوح مختلف و تغذیه از آن توسط لابستر اروپایی (*Homarus gammarus*)، رشد، بقا و شاخص‌های فیزیولوژیک را بهبود می‌دهد و موجب افزایش طول و تراکم ریزپرزهای روده می‌شود. Geraylou و همکاران (۲۰۱۲) نیز نشان دادند که استفاده از آرابینوکسیلانوالیگوساکارید (AXOS) در تغذیه بچه تاس‌ماهی سیبری (*Acipenser baerii*) می‌تواند باعث افزایش فعالیت فاگوسیتی، تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه و تغییر ترکیب میکروبیوتای روده شود. در مطالعه‌ای مشابه، Samie Amlashi و همکاران (۲۰۱۴) و Azimirad و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که آرتمیای غنی شده با پری‌بیوتیک‌ها (از جمله MOS و فروکتوالیگوساکارید) به ترتیب موجب بهبود شاخص‌های رشد، افزایش باکتری‌های مفید روده و مقاومت در برابر استرس در ماهیان اسکار (*Astronotus ocellatus*) و فرشته‌ماهی (*Pterophyllum scalare*) می‌شود. Najdegerami و همکاران (۲۰۱۵) نیز نشان دادند که غنی‌سازی آرتمیا با پلی‌بتاهیدروکسی‌بوتیرات (PHB) ترکیب میکروبی و متابولیسم چربی را در لارو تاس‌ماهی سیبری بهبود می‌بخشد.

با وجود این، نتایج مطالعات در گونه‌های مختلف گاهی متناقض بوده است. برای مثال، در تاس‌ماهی خلیج مکزیک (*Acipenser oxyrinchus*)، استفاده از MOS تاثیر قابل توجهی بر رشد و ساختار ظاهری روده نداشت (Pryor et al., 2003). این تفاوت‌ها نشان می‌دهد که اثرات پری‌بیوتیک‌ها وابسته به گونه، مرحله زندگی، شرایط محیطی و مقدار مصرف است و نمی‌توان نتایج یک گونه را به طور

مستقیم به گونه دیگر تعمیم داد (Momeni-Moghaddam et al., 2015). از این رو، بررسی دقیق اثرات پری‌بیوتیک‌ها در گونه‌های مختلف به‌ویژه در مراحل حساس لاروی ضروری است (Hamsah et al., 2019).

ماهی گورخری (*Danio rerio*) به عنوان یک مدل استاندارد در مطالعات زیست‌پزشکی و ایمنی‌شناسی، فرصت منحصربه‌فردی را برای بررسی مکانیسم‌های اثر مواد زیست فعال فراهم کرده است (Jheng et al., 2015). این گونه به دلیل ویژگی‌هایی مانند اندازه کوچک، رشد سریع، نگهداری آسان و دسترسی به ابزارهای ژنتیکی و مولکولی، به طور گسترده در پژوهش‌ها استفاده می‌شود و نتایج به دست آمده از آن قابلیت تعمیم به گونه‌های دیگر ماهی و حتی مطالعات زیست‌پزشکی انسانی را دارد (Miandare et al., 2016).

مطالعات زیادی در مورد تاثیر پری‌بیوتیک‌ها روی عملکرد رشد و شاخص‌های ایمنی آبزیان، چه از طریق تغذیه مستقیم و چه از روش غنی‌سازی آرتمیا و تغذیه از آن توسط آبزی انجام شده است (Daniels et al., 2010; Geraylou et al., 2012; Samie Amlashi et al., 2014; Najdegerami et al., 2015; Azimirad et al., 2016). با این حال، اطلاعاتی درباره تاثیر تغذیه با آرتمیای غنی شده با پری‌بیوتیک بر رشد، ایمنی و بقا در لاروهای ماهی گورخری وجود ندارد. از این رو، هدف این پژوهش، بررسی تاثیر تغذیه با ناپلی آرتمیای غنی شده با پری‌بیوتیک پرودی ۴۵۰ حاوی مانان الیگوساکارید و بتاگلوکان بر عملکرد رشد و شاخص‌های ایمنی لارو ماهیان گورخری بوده است.

مواد و روش‌ها

تفریخ و غنی‌سازی آرتمیا

سیست‌های آرتمیای به کار رفته در این پژوهش مربوط به گونه *Artemia franciscana* (شرکت کشت و صنعت گوار کویر آریا، ایران) بود. فرایند تفریخ سیست‌ها بر اساس روش‌های مرسوم انجام گرفت. بدین منظور، برای آماده‌سازی محیط تفریخ از آب با شوری ۳۰ گرم در لیتر استفاده شد. سیست‌ها با غلظت ۱ گرم در لیتر در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و با هوادهی مداوم در حجم ۱/۵ لیتر مورد انکوباسیون قرار گرفتند. پس از حدود ۲۴ ساعت، ناپلی‌های تازه تفریخ شده برای انجام مرحله بعدی آزمایش جمع‌آوری شدند (Soltanian et al., 2007).

در این مطالعه از پری‌بیوتیک پرودی ۴۵۰ (Prodi 450؛ کاوشگر سپهر جوان، ایران) استخراج شده از دیواره مخمر که ترکیب مواد مغذی آن شامل پروتئین خام، MOS و بتاگلوکان به ترتیب ۵۰، ۱۰ و ۱۵ درصد و همچنین به ترتیب دارای ۹۰ و ۰/۱۹ میلی‌گرم در کیلوگرم آهن و سلنیوم بود، استفاده شد. ناپلی‌های آرتمیای تازه تفریخ شده در ظروف مخروطی پلاستیکی حاوی یک لیتر آب با شوری ۳۰ گرم در لیتر و دمای ۲۹/۲۴±۰/۲۹ سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت در حضور پری‌بیوتیک در چهار سطح صفر (P0)، ۵۰ (P50)، ۱۰۰ (P100) و ۲۰۰ (P200) میلی‌گرم در لیتر غنی‌سازی شدند. تعداد ناپلی‌ها حدود ۱۵۰ عدد در میلی‌لیتر و هوادهی به صورت ملایم و پیوسته بود. برای رسیدن به تراکم ۱۵۰ ناپلی در هر میلی‌لیتر، ابتدا تراکم ناپلی پس از تفریخ با برداشت حجم مشخص و شمارش زیر لوپ تعیین شد. سپس با رقیق‌سازی، تعداد ناپلی مورد نیاز برای هر میلی‌لیتر تنظیم و وارد ظروف غنی‌سازی شد. در پایان دوره، ناپلی‌ها با صافی با قطر منافذ ۱۸۰ میکرومتری جمع‌آوری و سه بار با آب شور فیلتر شده شستشو داده شدند (Hawkyard et al., 2011).

پرورش لارو ماهیان گورخری

تغذیه و نگهداری لارو ماهیان گورخری تهیه شده از مزرعه تکثیر و پرورش ماهیان زینتی گیلان آکوا (رشت، ایران) در کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان زینتی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان (صومعه سرا، گیلان، ایران) و به مدت ۱۴ روز انجام شد. ابتدا، لارو ماهیان گورخری به تعداد ۲۵ قطعه با میانگین وزن ۴۶/۰۸±۰/۵۸ میلی‌گرم (میانگین ± خطای استاندارد) به ۱۲ مخزن آکواریوم با ابعاد ۴۰ × ۳۵ سانتی‌متر که به اندازه ۳۰ لیتر آب‌گیری شده بودند، منتقل شدند و برای سازگاری با شرایط جدید به مدت ۴ روز با ناپلی آرتمیای غنی نشده به مقدار ۱۰ درصد وزن بدن (Lawrence et al., 2015)، مورد تغذیه قرار گرفتند. برای این آزمایش از آب چاه استفاده شد. عوامل فیزیکوشیمیایی آب شامل دما و pH به ترتیب ۲۶/۵۷±۰/۵۸ درجه سانتی‌گراد و ۸/۰۷±۰/۰۵ بود. برای تنظیم دما از ۱۲ عدد بخاری آکواریوم ترموستات‌دار با توان ۱۰۰ وات (Sobo، چین) و برای هوادهی از کمپرسور هوادهی مرکزی (ACO-300A، Hailea، چین) استفاده شد. دوره نوری نیز ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در نظر گرفته شد. پس از ۴ روز دوره سازگاری، لارو ماهیان

گورخری با ناپلی آرتمیا غنی شده با مقادیر مختلف پری‌بیوتیک شامل تیمارهای یاد شده (P_0، P_{50}، P_{100} و P_{200} هر کدام در سه تکرار) روزانه سه مرتبه در ساعت‌های ۶، ۱۲ و ۲۰ به مقدار ۱۰ درصد وزن بدن (Lawrence et al., 2015)، به مدت دو هفته تغذیه شدند. هر دو روز، ۳۰ درصد از آب هر مخزن تخلیه و با آب تازه هوادهی شده جایگزین می‌شد. شایان ذکر است که در این آزمایش از طراحی کاملا تصادفی استفاده شد.

زیست‌سنجی لارو ماهیان گورخری در ابتدا و انتهای دوره پرورش ۱۴ روزه انجام شد. به منظور اندازه‌گیری وزن از ترازوی دیجیتال با دقت ۱ میلی‌گرم استفاده شد. ارزیابی روند رشد و عملکرد تغذیه‌ای با محاسبه وزن کسب شده (Weight Gain: WG)، افزایش وزن بدن (Body Weight Increase: BWI)، نرخ رشد ویژه (Specific Growth Rate: SGR)، میانگین رشد روزانه (Average Daily Growth: ADG)، کارایی غذا (Food Efficiency: FE) و نرخ بقا (Survival Rate: SR) توسط رابطه‌های ۱ تا ۶ انجام شد (Falahatkar, 2014).

رابطه ۱:

$$WG\ (g) = W_f - W_i$$

W_i: وزن ابتدایی (گرم)؛ W_f: وزن نهایی (گرم).

رابطه ۲:

$$BWI\ (\%) = (WG / W_i) \times 100$$

W_i: وزن ابتدایی (گرم)؛ WG: وزن کسب شده (گرم).

رابطه ۳:

$$SGR\ (\%/day) = [(LnW_f - LnW_i) / t] \times 100$$

W_i: وزن ابتدایی (گرم)؛ W_f: وزن نهایی (گرم)؛ t: کل روزهای آزمایش (روز).

رابطه ۴:

$$ADG\ (g/day) = WG / t$$

WG: وزن کسب شده (گرم)؛ t: کل روزهای آزمایش (روز).

رابطه ۵:

$$FE\ (\%) = (WG / W_F) \times 100$$

WG: وزن کسب شده (گرم)؛ W_F: مقدار غذای داده شده (گرم).

رابطه ۶:

$$SR\ (\%) = (N_f / N_i) \times 100$$

N_i: تعداد ماهی در ابتدای دوره؛ N_f: تعداد ماهی در انتهای دوره.

نمونه‌برداری

برای سنجش پروتئین کل، ایمونوگلوبولین کل و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در پایان دوره آزمایش، از هر تکرار به طور تصادفی ۶ قطعه ماهی انتخاب شد. با توجه به جثه کوچک

لاروها و عدم امکان خونگیری، کل بدن ماهی مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا ماهی‌ها با استفاده از عصاره گل میخک با غلظت ۷۵ میلی‌گرم در لیتر بیهوش شده و در شرایط کاملا استریل داخل یخدان به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس طبق روش Holbech و همکاران (۲۰۰۱)، نمونه‌ها در حضور بافر Tris-HCl (۰/۵ میلی‌مول، pH ۷/۴) و یک درصد مهارکننده پروتئاز (PIC؛ کیازیست، ایران) همگن‌سازی شدند. سوسپانسیون به دست آمده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه و با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (فراتست، ایران) شد. در نهایت، مایع رویی برای اندازه‌گیری شاخص‌های ایمنی مورد استفاده قرار گرفت (Yousefi et al., 2018).

اندازه‌گیری پروتئین محلول

اندازه‌گیری پروتئین محلول بر اساس روش بیوره (Gornall et al., 1949) و با بهره‌گیری از کیت بیوره (بایرکس، ایران) انجام گرفت. برای این منظور، ۲۰ میکرولیتر از نمونه با ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول معرف کیت مخلوط شده و سپس جذب نوری در طول موج ۵۴۶ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Scinteck Instruments LLC، آمریکا) اندازه‌گیری شد. مقدار پروتئین محلول با استفاده از منحنی استاندارد و بر حسب میلی‌گرم در گرم تعیین شد.

اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین کل

برای سنجش مقدار ایمونوگلوبولین کل از روش گزارش شده توسط Siwicki (۱۹۹۳) استفاده شد. بدین منظور، به هر نمونه، پلی‌اتیلن گلیکول (۶۰۰۰) با غلظت ۱۲ درصد افزوده شد. پس از انکوباسیون به مدت دو ساعت در دمای محیط، نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند و سپس غلظت پروتئین محلول در بخش مایع رویی با بهره‌گیری از روش بیوره (Gornall et al., 1949) تعیین شد. برای این کار، ۲۰ میکرولیتر از نمونه با ۱۰۰۰ میکرولیتر از معرف کیت بیوره مخلوط و جذب نوری در طول موج ۵۴۶ نانومتر خوانده شد. پس از محاسبه مقدار پروتئین کل، مقدار ایمونوگلوبولین کل با تفاضل مقدار پروتئین موجود در نمونه اولیه و مقدار پروتئین پس از افزودن پلی‌اتیلن گلیکول به دست آمد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز

فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز با استفاده از روش طیف‌سنجی و به کمک کیت تشخیصی کمی آلکالین فسفاتاز (بایرکس، ایران) اندازه‌گیری شد. سنجش‌ها توسط دستگاه

اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۰۵ نانومتر انجام شد و تغییر جذب نوری در مدت سه دقیقه برای محاسبه فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت (Hoseinifar et al., 2015).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های ثبت شده در هر آزمایش پس از بررسی توزیع نرمال با آزمون Kolmogorov-Smirnov، توسط آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) بررسی و مقایسه میانگین داده‌ها از طریق پس‌آزمون توکی (Tukey) در سطح اطمینان ۹۵ درصد (P<۰/۰۵) ارزیابی شد. برای تجزیه و تحلیل کلیه داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۷ و برای رسم نمودارها از برنامه Microsoft Excel 2019 استفاده شد.

نتایج

نتایج مربوط به شاخص‌های رشد و بقای لارو ماهیان گورخری بعد از ۱۴ روز تغذیه با ناپلی آرتمیای غنی شده با سطوح مختلف پری‌بیوتیک در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: اثرات تغذیه ۱۴ روزه با ناپلی آرتمیای غنی شده با سطوح مختلف پری‌بیوتیک پرودی ۴۵۰ بر عملکرد رشد در لارو ماهی گورخری *Danio rerio* (میانگین ± خطای استاندارد؛ سه تکرار)

	سطوح پری‌بیوتیک پرودی ۴۵۰ (mg/kg)			
شاخص (واحد)	صفر	۵۰	۱۰۰	۲۰۰
وزن ابتدایی (mg)	۴۵/۵۲ ± ۰/۵۹	۴۷/۸۷ ± ۰/۳۵	۴۴/۵۳ ± ۱/۵۴	۴۶/۴۰ ± ۱/۲۹
وزن نهایی (mg)	۵۱/۱۴ ± ۰/۱۷	۵۱/۰۶ ± ۰/۶۶	۴۹/۴۵ ± ۱/۱۴	۵۲/۲۴ ± ۲/۵۶
WG (mg)	۵/۶۲ ± ۰/۴۵ ab	۳/۱۹ ± ۰/۳۴ b	۴/۹۱ ± ۰/۴۴ ab	۵/۸۴ ± ۱/۵۳ a
SGR (%/day)	۰/۸۳ ± ۰/۰۷ a	۰/۴۶ ± ۰/۰۴ b	۰/۷۵ ± ۰/۰۸ ab	۰/۸۵ ± ۰/۲۰ a
ADG (mg/day)	۰/۴۰ ± ۰/۰۳ ab	۰/۲۳ ± ۰/۰۲ b	۰/۳۵ ± ۰/۰۳ ab	۰/۴۲ ± ۰/۱۱ a
BWI (%)	۱۲/۳۴ ± ۱/۱۵ a	۶/۶۷ ± ۰/۶۷ b	۱۱/۰۳ ± ۱/۳۱ ab	۱۲/۵۸ ± ۳/۱۳ a
FE (%)	۶/۲۴ ± ۰/۵۰ ab	۳/۵۵ ± ۰/۳۸ b	۵/۴۶ ± ۰/۴۹ ab	۶/۴۹ ± ۱/۶۹ a
SR (%)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

WG: وزن کسب شده؛ SGR: نرخ رشد ویژه؛ ADG: میانگین رشد روزانه؛ BWI: افزایش وزن بدن؛ FE: کارایی غذا؛ SR: نرخ بقا.

حروف متفاوت در برخی ردیف‌ها نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

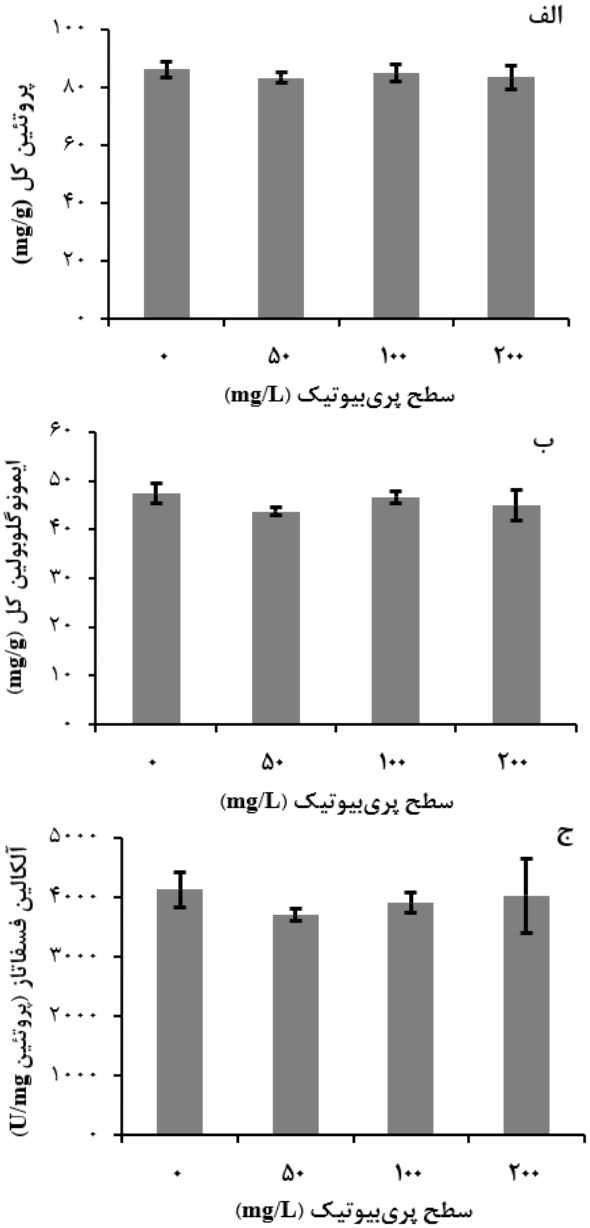
در شاخص‌های وزن پایانی و بقا تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد (P>۰/۰۵). وزن کسب شده، میانگین رشد روزانه و کارایی غذا در تیمار P_{200} به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار P_{50} بود (P<۰/۰۵) اما با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌دار نداشت (P>۰/۰۵). نرخ رشد ویژه و درصد افزایش وزن بدن تیمارهای P_0 و P_{200} به طور معنی‌داری از تیمار P_{50} بیشتر بودند (P<۰/۰۵) اما با یکدیگر و تیمار P_{100} اختلاف معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵).

نتایج مربوط به شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی شامل پروتئین کل، ایمونوگلوبولین کل و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز لارو ماهیان گورخری بعد از ۱۴ روز تغذیه با ناپلی آرتمیای غنی شده با سطوح مختلف پری‌بیوتیک در شکل ۱ آمده است. به طور کلی در هیچ کدام از شاخص‌ها، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

بحث

پژوهش حاضر با هدف ارزیابی اثرات پری‌بیوتیک پرودی ۴۵۰ در غنی‌سازی آرتمیا و تاثیر آن بر رشد و ایمنی لارو ماهی گورخری انجام شد و نتایج نشان داد که اگرچه افزایش مقدار پری‌بیوتیک تا سطح ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر موجب بهبود قابل توجه در شاخص‌های رشد شد، اما شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی تغییر معنی‌داری را نشان ندادند.

پری‌بیوتیک‌ها ترکیبات غیرقابل هضم هستند که به صورت انتخابی رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌های مفید دستگاه گوارش را تحریک می‌کنند و در نتیجه اثرات سودمندی بر سلامت و رشد میزبان دارند (Gibson and Roberfroid, 1995). مکانیسم‌های متعددی وجود دارد که از طریق آنها پری‌بیوتیک‌ها می‌توانند بر رشد ماهی تاثیرگذار باشند. یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌ها، تعدیل ترکیب میکروبی روده و افزایش باکتری‌های مفید است. این باکتری‌ها از پری‌بیوتیک‌ها به عنوان منبع انرژی استفاده کرده و در نتیجه از طریق رقابت برای مواد مغذی و محل اتصال، از رشد باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری می‌کنند (Ringo et al., 2010).



شکل ۱: اثرات تغذیه ۱۴ روزه با ناپلی آرتمیای غنی شده با سطوح مختلف پری‌بیوتیک پرودی ۴۵۰ بر شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی لارو ماهی گورخری *Danio rerio* (میانگین ± خطای استاندارد؛ سه تکرار).

الف) سطوح پروتئین کل؛ ب) ایمونوگلوبولین کل؛ ج) فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز. اختلاف معنی‌داری در بین تیمارها در هیچ یک از شاخص‌ها مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

کاهش تراکم میکروفلور بیماری‌زا موجب بهبود سلامت روده و کاهش انرژی مصرفی در مسیرهای ایمنی و التهابی می‌شود و در نتیجه انرژی بیشتری برای رشد اختصاص می‌یابد (Merrifield et al., 2010). از سوی دیگر، تخمیر پری‌بیوتیک‌ها در روده منجر به تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیره می‌شود. این ترکیبات نقش مهمی در تنظیم pH روده، تقویت رشد باکتری‌های مفید و بهبود جذب مواد معدنی دارند. علاوه بر آن، اسیدهای چرب کوتاه زنجیره می‌توانند به عنوان منبع انرژی برای سلول‌های پوششی روده عمل کنند و موجب تقویت یکپارچگی بافتی و افزایش سطح جذب شوند (Hoseinifar et al., 2015). در نتیجه، افزایش کارایی گوارش و جذب مواد مغذی در نهایت به بهبود رشد و کاهش ضریب تبدیل غذایی منجر می‌شود.

نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد که تغذیه لاروهای ماهی گورخری با ناپلی آرتمیای غنی شده با سطوح مختلف پری‌بیوتیک طی ۱۴ روز تاثیر معنی‌داری بر شاخص‌های وزن نهایی و بقا نداشت. با این حال، شاخص‌های وزن کسب شده، میانگین رشد روزانه و کارایی غذا در تیمار P_{200} به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار P_{50} بود، ولی در مقایسه با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری را نداشت. همچنین، نرخ رشد ویژه و درصد افزایش وزن بدن در تیمارهای P_0 و P_{200} به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار P_{50} بود. در بسیاری از افزودنی‌های زیست‌فعال، اثر مثبت تنها تا مقدار مشخصی ظاهر می‌شود و پس از آن یا به تعادل می‌رسد و یا حتی اثر معکوس نشان می‌دهد. علت آن می‌تواند اشباع گیرنده‌های روده‌ای، افزایش رقابت بین پری‌بیوتیک مورد نظر و الیگوساکاریدهای دیگر یا کاهش کارایی جذب باشد. برخی مطالعات نشان داده‌اند مقادیر بالاتر پری‌بیوتیک ممکن است منجر به کاهش تنوع میکروبی در سطوح مختلف روده شود، یعنی اثر مثبت با افزایش مقدار، لزوما بیشتر نمی‌شود (Bera et al., 2023). بنابراین، شناسایی مقدار بهینه در پژوهش‌های آینده برای هر گونه ضروری است، زیرا پاسخ به پری‌بیوتیک تابع پیچیده‌ای از مرحله رشد، ترکیب جیره و وضعیت میکروبیوم روده است. الگوی غیرخطی مشاهده شده در رشد متوسط روزانه و کارایی غذا را می‌توان نتیجه یک رابطه مقدار- پاسخ غیرخطی دانست

که احتمالا ناشی از برهم‌کنش چند مکانیسم هم‌زمان است. یکی از دلیل‌های محتمل آن است که پری‌بیوتیک در مقادیر پایین و متوسط هنوز به سطح آستانه‌ای لازم برای ایجاد تغییرات موثر در میکروبیوم یا مسیرهای متابولیک لارو نمی‌رسد، در حالی که در سطح ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر از این آستانه عبور شده و اثر مثبت ظاهر می‌شود (Calabrese, 2008). افزون بر این، برخی گیرنده‌های مخاطی و مسیرهای پیام‌رسانی تنها پس از دسترسی به غلظت کافی لیگاندهایی مانند MOS و بتاگلوکان فعال می‌شوند و به همین دلیل مقادیر پایین می‌توانند تحریک ناقص و مقادیر بالاتر تحریک کامل را ایجاد کنند (Herrera et al., 2019). از منظر اکولوژی میکروبی نیز امکان وجود حالت‌های پایدار جایگزین مطرح است، به گونه‌ای که در مقادیر میانی پری‌بیوتیک ممکن است وضعیت میکروبیوم به سمت جامعه‌ای نامطلوب سوق پیدا کند، اما در مقدار بالا به وضعیت سودمندتر تغییر یابد (Amor et al., 2020).

از نظر شاخص‌های رشد، نتایج حاضر تا حدی با مطالعاتی که از آرتمیا به عنوان ناقل پری‌بیوتیک استفاده کرده‌اند، هم‌راستا است. به عنوان مثال، Daniels و همکاران (۲۰۱۰) در لارو لابستر اروپایی که با آرتمیای غنی شده با MOS تغذیه شده بودند، افزایش معنی‌داری در وزن بدن، نرخ رشد ویژه و کارایی غذا گزارش کردند. Azimirad و همکاران (۲۰۱۶) نیز گزارش کردند که تغذیه فرشته‌ماهی با آرتمیای غنی شده با فروکتوالیگوساکارید موجب افزایش معنی‌دار وزن و نرخ رشد ویژه شد. همچنین Samie Amlashi و همکاران (۲۰۱۴) در لارو ماهی اسکار نشان دادند که آرتمیای غنی شده با MOS در سطوح ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر، رشد و کارایی غذا را به طور معنی‌داری افزایش داد. این یافته‌ها مشابه نتایج مطالعه حاضر است، زیرا در هر دو مورد، بالاترین سطح پری‌بیوتیک موجب بهبود شاخص‌های رشد شد. نکته حائز اهمیت این است که MOSها می‌توانند به گلیکوپروتئین‌های سطحی آرتمیا متصل شوند و پایداری پری‌بیوتیک را در طول فرآیند تغذیه افزایش دهند (Daniels et al., 2010). بنابراین، افزایش رشد مشاهده شده در تیمار P_{200} ممکن است تنها ناشی از افزایش پری‌بیوتیک نبوده بلکه نتیجه تعامل ساختاری میان ترکیب پری‌بیوتیک و ماتریکس تغذیه‌ای آرتمیا باشد که منجر به افزایش زیست‌دسترسی اسیدهای چرب ضروری و آمینواسیدها برای لارو ماهی شده است.

کارایی غذا در تیمار P_{200} به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار P_{50} بود، ولی در مقایسه با دیگر تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت. برخی مطالعات نشان داده‌اند که پری‌بیوتیک‌ها می‌توانند مسیرهای متابولیسم نیتروژن را به سمت پروتئین‌سازی سوق دهند (Lv et al., 2007). این امر با مشاهده افزایش کارایی غذا در پژوهش حاضر سازگار است و نشان می‌دهد که پری‌بیوتیک‌ها ممکن است نقشی در تعادل نیتروژن و کاهش دفع آمونیاک نیز داشته باشند. این فرضیه می‌تواند در مطالعات بعدی با اندازه‌گیری متابولیت‌های نیتروژنی بررسی شود. در مقابل، Najdegerami و همکاران (۲۰۱۵) در لارو تاس‌ماهی سیبری گزارش کردند که تغذیه با آرتمیای غنی شده با PHB نه‌تنها منجر به بهبود رشد نشد، بلکه موجب کاهش عملکرد رشد و تغییر نامطلوب در ترکیب اسیدهای چرب بدن شد. همچنین استفاده از پری‌بیوتیک پرودی ۴۵۰ به عنوان غذای لارو شیرونومیده برای انتقال به بچه‌ماهی انگشت قد تاس‌ماهی سیبری، تاثیر معنی‌داری بر عملکرد رشد آن نداشت (Amini Vishekae et al., 2025). این نتایج با یافته‌های حاضر در تضاد است و می‌تواند به نوع پری‌بیوتیک، تفاوت گونه‌ای و ساختار دستگاه گوارش مربوط باشد. علاوه بر این، برخی مطالعات نیز بیان کرده‌اند که در دوره‌های کوتاه یا سطوح پایین پری‌بیوتیک، اثرات معنی‌داری بر رشد و بقا مشاهده نمی‌شود (Pryor et al., 2003; Mansour et al., 2012) که با نتایج عدم تفاوت در وزن نهایی و بقا در پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد.

از نظر ایمنی، پری‌بیوتیک‌ها می‌توانند از طریق تحریک مستقیم گیرنده‌های سطحی ماکروفاژها (مانند دکتین-۱) مسیرهای پیام‌رسانی مانند NF-κB را فعال کنند و موجب افزایش تولید پروتئین‌ها و ایمونوگلوبولین‌های دفاعی شوند (Sheikhzadeh and Soltani, 2022). همچنین پری‌بیوتیک‌ها با تحریک بافت لنفوئیدی مرتبط با روده (GALT)، موجب تکثیر لکوسیت‌ها و افزایش فعالیت‌های فاگوسیتی و آنزیم آلکالین فسفاتاز می‌شوند (Bates et al., 2006; Torrecillas et al., 2014). از سوی دیگر، پری‌بیوتیک‌های مشتق شده از غلات مانند بتاگلوکان، با تحریک بیان ژن‌های ایمنی ذاتی از جمله *tnfa*، *mpo*، *trf* و *lyz* موجب افزایش مقاومت ماهیان گورخری در برابر عفونت باکتری‌های پاتوژن شدند (Oyarbide et al., 2012).

نتایج بررسی شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی شامل پروتئین کل،

ایمونوگلوبولین کل و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز بیانگر اختلاف معنی‌داری بین تیمارها نبود و با یافته‌های Pryor و همکاران (۲۰۰۳) که بر روی تاس‌ماهی خلیج مکزیک مطالعه کردند همسو است. در آن مطالعه نیز افزودن ۳ گرم MOS در هر کیلوگرم جیره تاثیر معنی‌داری بر رشد و ساختار روده نداشت (Pryor et al., 2003). همچنین Reda و Selim (۲۰۱۳) در تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) به نتایج مشابهی دست یافتند. Ramezani و همکاران (۲۰۱۸) نیز در تاس‌ماهی سیبری، پس از افزودن پری‌بیوتیک ایمنوژن به جیره، تغییری در سطح پروتئین کل مشاهده نکردند. نتایج Akrami و همکاران (۲۰۱۸) در فیل‌ماهی (*Huso huso*) نیز از عدم تفاوت معنی‌دار در سطح پروتئین کل و ایمونوگلوبولین حمایت می‌کند. از دیدگاه مولکولی، پری‌بیوتیک‌ها از طریق فعال‌سازی گیرنده‌های سطحی مانند TLR2 و Dectin-1 در سلول‌های پوششی روده می‌توانند مسیرهای MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase) و NF-κB (Nuclear Factor Kappa B) را تعدیل کنند (Machuca Valverde et al., 2022). با این وجود، این مسیرها در مرحله لاروی ممکن است به طور کامل فعال نباشند. از این‌رو، نبود تغییر معنی‌دار در شاخص‌های ایمنی در پژوهش حاضر را می‌توان نه الزاما به فقدان اثر پری‌بیوتیک، بلکه به نارسایی توسعه گیرنده‌های شناسایی الگوی مولکولی در این سن نسبت داد. همچنین یکی از چالش‌های مهم در تفسیر داده‌های ایمنی این است که شاخص‌های رایج پروتئین کل، ایمونوگلوبولین کل و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز الزاما شاخص‌های اولیه پاسخ به تغذیه از پری‌بیوتیک نیستند. مسیر اثر پری‌بیوتیک‌ها عمدتا از طریق آماده‌سازی سیستم ایمنی (Immune Priming) و نه تحریک فوری است. بدین معنا که پری‌بیوتیک‌ها با تغییر اپی‌ژنتیک و تنظیم رونویسی ژن‌های ایمنی مانند (*il1β*، *tnfa* و *lyz*) زمینه پاسخ سریع‌تر به چالش‌های آینده را فراهم می‌کنند (Gao et al., 2024). بنابراین، نبود تفاوت معنی‌دار در شاخص‌های ایمنی در این مطالعه ممکن است به علت فقدان اثر فیزیولوژیک نبوده بلکه ناشی از نوع شاخص‌های انتخاب‌شده باشد و می‌توان در پژوهش‌های آینده با بررسی بیان این ژن‌ها نتایج بهتر و قطعی‌تری را انتظار داشت.

در مقابل، مطالعات متعددی اثرات مثبت پری‌بیوتیک را بر شاخص‌های رشد و ایمنی گزارش کرده‌اند. به عنوان مثال، Salem و

همکاران (۲۰۱۶) با مطالعه بر روی باس اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) دریافتند که افزودن ۱ گرم MOS در هر کیلوگرم جیره موجب افزایش معنی‌دار در وزن و نرخ رشد ویژه شد. Yousefi و همکاران (۲۰۲۰) در تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) افزایش معنی‌دار ایمونوگلوبولین کل را در اثر افزودن ۱۰ گرم ایمنووال گزارش کردند. این نتایج با بخش ایمنی مطالعه حاضر تا حدودی متفاوت است، که می‌تواند ناشی از گونه متفاوت، مرحله رشد (لارو در مقابل بچه‌ماهی یا بالغ)، مدت تغذیه یا غلظت پایین‌تر پری‌بیوتیک (Azimirad et al., 2016) در پژوهش حاضر باشد. تفاوت در نتایج مطالعات مختلف می‌تواند به عوامل متعددی از جمله گونه آبزی، مرحله رشد، نوع و مقدار پری‌بیوتیک، چگونگی استفاده، مدت تغذیه، منبع پری‌بیوتیک، و شرایط محیطی مربوط باشد (Hoseinifar et al., 2015; Miandare et al., 2016).

این احتمال وجود دارد که تنها بخشی از پری‌بیوتیک مورد استفاده مانند MOS در بدن آرتمیا تثبیت شده و نه تنها به سطح آن چسبیده باشد بلکه داخل بافت آن نیز قرار بگیرد. برای مثال، یک مطالعه نشان داد که آرتمیا پس از چهار ساعت غنی‌سازی با ۱۲ میلی‌گرم در لیتر MOS، دارای بار باکتریایی بالا بود و افزایش جمعیت باکتری در بدن آرتمیا ثبت شد که نشان‌دهنده توانایی آرتمیا برای نگهداری ترکیبات زیست‌فعال است (Hamsah et al., 2019). همچنین مطالعه‌ای بر روی آرتمیای غنی شده با سین‌بیوتیک‌هایی که شامل فروکتوالیگوساکارید به عنوان پری‌بیوتیک بود، نشان داد پس از ۴ تا ۶ ساعت، تعداد قابل توجهی باکتری در داخل و روی آرتمیا وجود داشت که مستلزم این است که بخشی از ترکیب به داخل آن نفوذ کند و نگه داشته شود (Azimirad and Meshkini, 2017). بنابراین، با توجه به غلظت پری‌بیوتیک، مدت زمان غنی‌سازی و پتانسیل تثبیت آن در آرتمیا، امکان دارد که مقدار کافی از ماده در بدن آرتمیا باقی بماند اما هنگام مصرف توسط ماهی، آزادسازی آن محدود باشد و بنابراین انتقال کامل آن به میزبان (ماهی) رخ ندهد.

در مجموع، نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که تغذیه لاروهای ماهی گورخری با آرتمیای غنی شده با پری‌بیوتیک پرودی ۴۵۰ تا سطح ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر موجب بهبود شاخص‌های رشد مانند وزن کسب شده، میانگین رشد روزانه و کارایی غذا شد، در حالی که شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی تفاوت

معنی‌داری را نشان ندادند. این یافته‌ها نشان می‌دهند که پری‌بیوتیک‌ها می‌توانند احتمالا از طریق تعدیل میکروبیوم روده، افزایش تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیره و بهبود جذب مواد مغذی، رشد لاروها را ارتقا دهند، اما اثر آنها بر شاخص‌های ایمنی در مراحل لاروی محدود است که احتمالا به دلیل عدم تکامل مسیرهای ایمنی و گیرنده‌های شناسایی الگوی مولکولی در این سن است. همچنین، تثبیت بخشی از پری‌بیوتیک در بدن آرتمیا ممکن است موجب انتقال ناقص آن به ماهی شود، بنابراین مقدار و مدت غنی‌سازی نقش تعیین‌کننده‌ای در اثرگذاری نهایی دارند. الگوی غیرخطی پاسخ رشد و کارایی غذا نیز نشان‌دهنده تعامل پیچیده‌ای از مکانیسم‌های متابولیک، میکروبی و فعال‌سازی حد آستانه‌ای گیرنده‌ها است. به طور کلی، این مطالعه تاکید می‌کند که اثرات پری‌بیوتیک‌ها بر رشد و ایمنی لاروها باید در چارچوب مرحله رشدی، وضعیت میکروبیوم و ظرفیت زیست‌فراهمی ماده مورد بررسی در آرتمیا تبیین شود و مطالعات آینده با استفاده از ابزارهای مولکولی و میکروبیومی می‌تواند درک دقیق‌تری از محور روده-ایمنی و مکانیسم‌های عملکردی پری‌بیوتیک‌ها در آبزیان فراهم آورد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از آقایان مهندس محمد محمدی و مهندس سید مهدی صدرممتاز به علت کمک در امر پژوهش و از آقای مهندس ملکی بابت کمک در انجام آزمایش‌ها کمال تشکر را داشته و از دیگر عزیزانی که در این پژوهش ما را یاری نمودند، سپاسگزاریم.

منابع

Akrami R., Chitsaz H. and Lakzaei F. 2018. Effect of dietary A-Max supplementation as a prebiotic on growth performance and hemato-immunological parameters of great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juveniles. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 17(2): 251–266. doi: 10.22092/ijfs.2018.115454

Amini Vishekae M., Khoshkholgh M., Falahatkar B. and Pazhand Z. 2025. Cultivation of chironomid larvae (DIPTERA) using different levels of prebiotics and its effect on growth performance of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) fingerlings. Journal of Aquatic Ecology, 15(1): 42–56. doi: 10.61882/JAquaEco.15.1.42

Amor D.R., Ratzke C. and Gore J. 2020. Transient invaders can induce shifts between alternative stable states of microbial communities. Science Advances, 6(8): 1–8. doi: 10.1126/sciadv.aay8676

Azimirad M. and Meshkini S. 2017. Determination of the optimal enrichment *Artemia franciscana* with a synbiotic combination of probiotics *Pediococcus acidilactici* and prebiotic fructooligo-saccharide. Veterinary Research Forum, 8(1): 49–54.

Azimirad M., Meshkini S., Ahmadifard N. and Hoseinifar S.H. 2016. The effects of feeding with synbiotic (*Pediococcus acidilactici* and fructooligosaccharide) enriched adult *Artemia* on skin mucus immune responses, stress resistance, intestinal microbiota and performance of angelfish (*Pterophyllum scalare*). Fish and Shellfish Immunology, 54: 516–522. doi: 10.1016/j.fsi.2016.05.001

Bates J.M., Mittge E., Kuhlman J., Baden K.N., Cheesman S.E. and Guillemin K. 2006. Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. Developmental Biology, 297(2): 374–386. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.05.006

Bera A.K., Chowdhury H., Ghatak S., Malick R.C., Chakraborty N., Chakraborty H.J., Swain H.S., Hassan M.A. and Das B.K. 2023. Microbiome analysis reveals potential for modulation of gut microbiota through poly-saccharide-based prebiotic feeding in *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Frontiers in Physiology, 37(3): 293–303. doi: 10.3389/fphys.2023.1168284

Calabrese E.J. 2008. Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologists. Environmental Toxicology Chemistry, 27(7): 1451–1474. doi: 10.1897/07-541

Daniels C.L., Merrifield D.L., Boothroyd D.P., Davies S.J., Factor J.R. and Arnold K.E. 2010. Effect of dietary *Bacillus* sp. and mannan oligosaccharides (MOS) on European lobster (*Homarus gammarus* L.) larvae growth performance, gut morphology and gut microbiota. Aquaculture, 304(1-4): 49–57. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.03.018

Falahatkar B. 2014. Feeding and Feed Formulation in Aquatic Organisms. Jihad Agriculture, Iran. 334P. [In Persian].

Gao N., Zhang J., Shandilya U.K., Lumsden J.S., Barzrgar A.B., Huyben D. and Karrow N.A. 2024. Hepatic gene expression changes of zebrafish fed yeast prebiotic, yeast probiotic, black soldier fly meal, and butyrate. Fishes, 9(12): 1–16 (495). doi: 10.3390/fishes9120495

Geraylou Z., Souffreau C., Rurangwa E., D'Hondt S., Callewaert L., Courtin C.M., Delcour J.A., Buyse J. and Ollevier F. 2012. Effects of arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) on juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) performance, immune responses and gastrointestinal microbial community. Fish and Shellfish Immunology, 33(3): 718–724. doi: 10.1016/j.fsi.2013.06.014

Gibson G.R. and Roberfroid M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. The Journal of Nutrition, 125: 1401–1405. doi: 10.1093/jn/125.6.1401

Gornall A.G., Bardawill C.J. and David M.M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. Journal of Biological Chemistry, 177: 751–766.

Hamsah H., Widanarni W., Alimuddin A., Yuhana M., Junior M.Z. and Hidayatullah D. 2019. Immune response and resistance of Pacific white shrimp larvae administered probiotic, prebiotic, and synbiotic through the bio-encapsulation of *Artemia* sp. Aquaculture International, 27(2): 567–580. doi: 10.1007/S10499-019-00346-W/METRICS

Hawkyard M., Saele O., Nordgreen A., Langdon C. and Hamre K. 2011. Effect of iodine enrichment of *Artemia* sp. on their nutritional value for larval zebrafish (*Danio rerio*). Aquaculture, 316(1-4): 37–43. doi: 10.1016/J.AQUACULTURE.2011.03.013

Herrera M., Mancera J.M. and Costas B. 2019. The use of dietary additives in fish stress mitigation: comparative endocrine and physiological responses. Frontiers in Endocrinology, 10: 1–22. doi: 10.3389/fendo.2019.00447

Holbech H., Andersen L., Petersen G.I., Korsgaard B., Pedersen

K.L. and Bjerregaard P. 2001. Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology (C), 130(1): 119–131. doi: 10.1016/S1532-0456(01)00229-0

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

Jheng Y.H., Lee L.H., Ting C.H., Pan C.Y., Hui C.F. and Chen J.Y. 2015. Zebrafish fed on recombinant *Artemia* expressing epinecidin-1 exhibit increased survival and altered expression of immunomodulatory genes upon *Vibrio vulnificus* infection. Fish and Shellfish Immunology, 42(1): 1–15. doi: 10.1016/J.FSI.2014.10.019

Kibenge F.S.B., Baldisserotto B. and Chong R.S.M. 2020. Aquaculture Pharmacology. Elsevier, Netherlands. 412P.

Lawrence C., James A. and Mobley S. 2015. Successful replacement of *Artemia salina* nauplii with marine rotifers (*Brachionus plicatilis*) in the diet of preadult zebrafish (*Danio rerio*). Zebrafish, 12(5): 366–371. doi: 10.1089/ZEB.2015.1118

Lv H., Zhou Z., Rudeaux F. and Respondek F. 2007. Effects of dietary short chain fructo-oligosaccharides on intestinal microflora, mortality and growth performance of *O. nilotica* ♀ × *O. aurea*. Chinese Journal of Animal Nutrition, 19: 691–697. doi: 10.3969/j.issn.1006-267X.2007.06.008

Machuca Valverde C., Mendez-Martinez Y., Reyes-Becerril M., and Angulo C. 2022. Yeast β-glucans as fish immune-modulators: A review. Animals, 12: 21–54. doi: 10.3390/ani12162154

Mansour M.R., Akrami R., Ghobadi S.H., Amani Denji K., Ezatrahimi N. and Gharaei A. 2012. Effect of dietary mannan oligosaccharide (MOS) on growth performance, survival, body composition and some hemato-logical parameters in giant sturgeon juvenile (*Huso huso* Linnaeus, 1754). Fish Physiology and Biochemistry, 38(3): 829–835. doi: 10.1007/s10695-011-9570-4

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

Miandare H.K., Farvardin S., Shabani A., Hoseinifar S.H. and Ramezanpour S.S. 2016. The effects of galactooligosaccharide on systemic and mucosal immune response, growth performance and appetite related gene transcript in goldfish (*Carassius auratus gibelio*). Fish and Shellfish Immunology, 55: 479–483. doi: 10.1016/j.fsi.2016.06.020

Momeni-Moghaddam P., Keyvanshokooh S., Ziaei-Nejad S., Salati P.A. and Pasha-Zanoosi H. 2015. Effects of mannan oligosaccharide supplementation on growth, some immune responses and gut lactic acid bacteria of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. Veterinary Research Forum, 6(3): 239–244.

Najdegerami E.H., Baruah K., Shiri A., Rekecki A., Van Den Broeck W., Sorgeloos P., Boon N., Bossier P. and De Schryver P. 2015. Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) larvae fed *Artemia nauplii* enriched with poly-β-hydroxy butyrate (PHB): Effect on growth performance, body composition, digestive enzymes, gut microbial community, gut histology and stress tests. Aquaculture Research, 46(4): 801–812. doi: 10.1111/are.12231

Oyarbide U., Rainieri S. and Pardo M.A. 2012. Zebrafish (*Danio rerio*) larvae as a system to test the efficacy of polysaccharides as immunostimulants. Zebrafish, 9(2): 74–84. doi: 10.1089/zeb.2011.0724

Pryor G.S., Royes J.B., Chapman F.A. and Miles R.D. 2003. Mannanoligosaccharides in fish nutrition: Effects of dietary supplementation on growth and gastrointestinal villi structure in Gulf of Mexico sturgeon. North American Journal of Aquaculture, 65(2): 106–111. doi: 10.1577/1548-8454(2003)65<106:mifneo>2.0.co;2

Ramezani S., Eshaghzadeh H., Saeimee H. and Darvishi S. 2018. Subyearling Siberian sturgeon *Acipenser baerii* fed a diet supplemented with immunogen: Effects on growth performance, body composition, and hematological and serum biochemical parameters. Journal of Aquatic Animal Health, 30(2): 155–163. doi: 10.1002/aah.10019

Reda R.M. and Selim K.M. 2013. Enhancement of growth, immunity and disease resistant to *Yersinia ruckeri* in *Oreochromis niloticus* fingerlings by oral administration of prebiotic (Immunowall®). Abbassa International Journal Aquaculture, 6(2): 426–449.

Ringo E., Olsen R.E., Gifstad T.O., Dalmo R.A., Amlund H., Hemre G.I. and Bakke A.M. 2010. Prebiotics in aquaculture: A review. Aquaculture Nutrition, 16(2): 117–136. doi: 10.1111/j.1365-2095.2009.00731.x

Salem M., Gaber M.M., Zaki M.A., and Nour A.A. 2016. Effects of dietary mannan oligosaccharides on growth, body composition and intestine of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Aquaculture Research, 47(11): 1–10. doi: 10.1111/are.12801

Samie Amlashi F.S., Zamini A. and Zarrabi S. 2014. Assessing indices of growth of Oscar fry (*Astronotus ocellatus*) fed up with nauplius of *Artemia* enriched with MOS extracted from yeast cell wall (*Saccharomyces cerevisiae*). Biological Forum an International Journal, 6(2): 24–29.

Sheikhzadeh N. and Soltani M. 2022. Immunostimulants in Aquaculture. University of Tehran Press, Iran. 185P. [in Persian].

Siwicki A.K.I. 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish. II. Potential killing activity of neutrophils and monocytes, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (Ig) level in serum. Fish Diseases Diagnosis and Prevention Methods, FAO-project GCP/INT/ 526/JPN. 105–111.

Soltanian S., Dhont J., Sorgeloos P., and Bossier P. 2007. Influence of different yeast cell-wall mutants on performance and protection against pathogenic bacteria (*Vibrio campbellii*) in gnotobiotically-grown *Artemia*. Fish and Shellfish Immunology, 23(1): 141–153. doi: 10.1016/J.FSI.2006.09.013

Torrecillas S., Montero D. and Izquierdo M. 2014. Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: Potential mode of action. Fish and Shellfish Immunology, 36(2): 525–544. doi: 10.1016/j.fsi.2013.12.029

Yousefi S., Hoseinifar S.H., Paknejad H. and Hajimoradloo A. 2018. The effects of dietary supplement of galactooligo-saccharide on innate immunity, immune related genes expression and growth performance in zebrafish (*Danio rerio*). Fish and Shellfish Immunology, 73: 192–196. doi: 10.1016/j.fsi.2017.12.022

Yousefi S., Monsef Shokri M., Allaf Navirian H. and Hoseinifar S.H. 2020. Effects of yeast cell membrane prebiotic (immunowall®) on growth performance and hematological parameters in juvenile Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). Journal of Animal Environment, 12: 221–228. [In Persian]. doi: 10.22034/aej.2020.115584

Zhang J., Liu Y., Tian L., Yang H., Liang G. and Xu D. 2012. Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, gut morphology and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology, 33(4): 1027–1032. doi: 10.1016/J.FSI.2012. 05.001

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 14, No. 1, Spring 2026

Research Paper

Effects of feeding prebiotic-enriched *Artemia* nauplii on growth performance, selected non-specific immune parameters and survival of zebrafish (*Danio rerio*) larvae

Mohammad Amini Vishekaei[1], Navid Ebrahimzadeh Kouchesfahani[1], Bahram Falahatkar[2]*

Received: November 2025 Accepted: February 2026

Abstract

This study aimed to investigate the effects of feeding zebrafish (*Danio rerio*) larvae with *Artemia* nauplii enriched with different levels of prebiotic, containing mannan-oligosaccharide and β-glucan, on growth performance and non-specific immune parameters. The experiment was conducted in two phases, including *Artemia* nauplii enrichment and zebrafish larvae feeding for 14 days. *Artemia* nauplii were enriched with four levels of prebiotic including zero (P_0), 50 (P_{50}), 100 (P_{100}) and 200 (P_{200}) mg/L. Larvae with an initial mean weight of 46.08±0.58mg were reared under controlled conditions. At the end of trial, growth indices and non-specific immune parameters were evaluated. The results showed that feeding larvae with prebiotic-enriched *Artemia* nauplii had no significant effect on final weight and survival rate ($P>0.05$); however, weight gain, daily growth rate and feed efficiency in the P_{200} group were significantly higher than in P_{50} ($P<0.05$). Specific growth rate and body weight increase were significantly higher in P_0 and P_{200} compared to P_{50} ($P<0.05$), while non-specific immune parameters showed no significant differences among treatments ($P>0.05$). These findings suggest that prebiotics may enhance larval growth performance, even within a short feeding period, whereas their effects on immune indices remain limited at the larval stage. Partial retention of prebiotics within *Artemia* tissues, as well as enrichment dose and duration, may influence final outcome. The nonlinear growth response may reflect complex metabolic and microbial interactions, suggesting the need for further research in this field.

Key words: *Beta-glucan, Live Food, Mannan-oligosaccharide,* Artemia franciscana, Danio rerio.

1- M.Sc. in Aquaculture, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran.
2- Professor in Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran.
*Corresponding Author: falahatkar@guilan.ac.ir