Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Comparison of probiotic, paraprobiotic, and postbiotic effects of *Lactobacillus casei* bacteria on immune function in common carp (*Cyprinus carpio*)

Rashid Alijani Ardeshir

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Mazandaran, Iran. E-mail: r.alijani@ausmt.ac.ir

Mina Orang

Department of Medical Laboratory Sciences, Faculty of Medical Sciences, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran. E-mail: orangmina402@gmail.com

Abstract

Objective

The common carp (*Cyprinus carpio*), the most important freshwater fish with a global distribution, is known for its adaptability and potential in aquaculture. However, the risk of disease in this fish is high and protective strategies are essential.

This study aimed to compare the effects of probiotic, paraprobiotic, and postbiotic supplements obtained from *Lactobacillus casei* CC16 to enhance the immune response and antioxidant capacity of common carp and improve their resistance to *Aeromonas hydrophila* infection after 56 days.

Materials and methods

This study used four experimental diets: a basal diet without bacteria as a control, a basal diet with a 24-h culture of *L. casei* (probiotic), a basal diet with a 24-h culture and then killed *L. casei* bacteria (paraprobiotic) and a basal diet with cell-free supernatant (postbiotic) from a 24-h culture of *L. casei*. Fish were fed these diets in aquariums (80 liter) for 56 days. After the feeding experiment, the fish were anesthetized, blood was obtained from the caudal vein, and serum prepared. After dissection, intestinal tissue was sampled. After sampling, antioxidant activity, lipid peroxidation, complement system in serum (ACH50), total immunoglobulin concentration (IgM), serum lysozyme activity, myeloperoxidase activity (MPO), immune gene expression (pro-inflammatory cytokines including IL-1β, TNFα, and IL-6) and bacterial challenge test were measured.

Results

The results showed that paraprobiotic treatment significantly increased antioxidant defense and immune responses compared to other groups. Moreover, it was associated with increased levels of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase), total antioxidant capacity, and decreased lipid peroxidation ($P<0.05$). Additionally, increased immunoglobulin M, lysozyme, and myeloperoxidase activities, and increased expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1β, TNFα, and IL-6) were observed ($P<0.05$) in the paraprobiotic and postbiotic groups compared to other groups. The paraprobiotic and postbiotic groups showed higher survival rates in the bacterial challenge test.

Conclusions

Generally, this study showed that paraprobiotics and postbiotics are effective in enhancing the immune system of common carp and, due to their defined chemical structure, specific immune-enhancing properties, and longer shelf life, have advantages over live probiotics, and provide a promising avenue for disease prevention in carp farming.

Keywords: dietary supplement, immune enhancement, paraprobiotic, postbiotic, probiotic

Paper Type: Research Paper.

Citation: Alijani Ardeshir, A., & Orang, M. (2026). Comparison of probiotic, paraprobiotic, and postbiotic effects of *Lactobacillus casei* bacteria on immune function in common carp (*Cyprinus carpio*). *Agricultural Biotechnology Journal*, 18(1), 97-118.

Agricultural Biotechnology Journal, 18(1), 97-118. DOI: 10.22103/jab.2025.23896.1591

Received: October 07, 2025. Received in revised form: December 25, 2025.

Accepted: December 26, 2025. Published online: January 15, 2026.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.

Introduction

The common carp (*Cyprinus carpio*) is known the most important freshwater aquaculture species worldwide, especially in Asia and parts of Europe. This event is related to its rapid growth, adaptability to diverse environments, and significant contribution to aquaculture production. More than 80% of total aquaculture in several European countries is carp, indicating its economic importance. Despite this advantage, outbreaks of bacterial and viral diseases pose a serious threat to sustainable production, leading to considerable economic losses. Old methods for disease management are dependent on antibiotics and chemotherapeutic agents, but these permonace often leads to undesirable consequences, including environmental contamination, accumulation of drug residues in fish tissues, and the emergence of antimicrobial resistance. Thus, developing strategies related to disease management enhancing the fish's innate immune system has become

a priority in aquaculture. One such method is the use of beneficial microbes and their derivatives as dietary supplements. Probiotics or live microorganisms that are benefits to the host, have been widely studied and shown to improve growth, enhance immune responses, and increase disease resistance in aquaculture species. However, some concerns related to the safety of live probiotics remain, including the potential transmission of antibiotic resistance genes, systemic infections, or disruption of the host's natural gut microbiota. These concerns led to the interest in non-viable microbial products such as paraprobiotics (inactivated microbial cells or cell components) and postbiotics (soluble products or metabolites released by live or lysed bacteria). Paraprobiotics and postbiotics were suggested as alternatives that offer the immunomodulatory and antioxidant benefits of probiotics without the risks related to administering live organisms. These alternatives have defined chemical structures, improved stability, and reduced safety concerns, making them promising candidates for functional feed additives in aquaculture. Previous studies in fish have suggested that paraprobiotics and postbiotics can modulate immune responses, enhance antioxidant capacity, and protect fish against pathogen challenges. However, direct comparative studies evaluating their relative effectiveness versus conventional probiotics remain limited. The present study aimed to compare the immunomodulatory, antioxidant, and disease resistance effects of dietary supplementation with a probiotic, a paraprobiotic, and a postbiotic preparation derived from *Lactobacillus casei* CC16 in common carp (*C. carpio*). Over a 56-day feeding trial, fish were fed diets supplemented with live bacteria, heat-killed bacteria, or cell-free supernatant. Subsequent analyses evaluated serum antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation, immune parameters (IgM, lysozyme, myeloperoxidase, complement activity), expression of pro-inflammatory cytokine genes (IL-1β, IL-6, TNF-α), and survival following bacterial challenge with *Aeromonas hydrophila*.

Materials and methods

The bacterial strain *Lactobacillus casei* CC16 was originally isolated from the gut of healthy common carp and obtained from the Iranian Genetic Resources Center. The bacteria were grown in LB broth at 30 °C for 24 h. Probiotic bacteria were treated through incorporating into feed at 1×10^7 CFU/kg diet. Paraprobiotic treatment was prepared through heat-killing, lyophilizing, and adding at an equivalent concentration. Postbiotic treatment was prepared after centrifugation and collecting the cell-free supernatant (CFS) and adding to diets at equivalent levels. A basal commercial diet (47% crude protein, 18% crude lipid, <12% moisture) was used as the control. Therefore, four experimental diets were used: (i) basal control, (ii) probiotic, (iii) paraprobiotic, and (iv) postbiotic. Juvenile carp (14.3 ± 2.7 g) were purchased from a carp farm in northern Iran and acclimatized for two weeks. Fish were randomly distributed into aquaria (80 L, 20 fish each) under controlled water quality conditions (pH 7.6, temperature 16 °C, dissolved oxygen 60%). Triplicate groups were used for each treatment, and fish were fed once daily at 1.5% body weight for 56 days. At the end of the feeding experiment, six fish per treatment were anesthetized and sampled. Blood sampling was carried out from the caudal vein for serum analyses, while intestinal tissue was preserved in RNAlater for gene expression studies. Commercial kits were used to measure serum activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx). Malondialdehyde (MDA) content and total antioxidant capacity (T-AOC) were

assessed to measure lipid peroxidation. Colorimetric or turbidimetric methods were used to measure complement activity (ACH50), total serum immunoglobulin (IgM), lysozyme activity, and myeloperoxidase (MPO) activity. RNA was extracted from intestinal tissue, and qPCR was performed to assess expression of IL-1β, IL-6, and TNF-α. GAPDH and β-actin served as reference genes for normalization. Intraperitoneal injection of *A. hydrophila* at an approximate dose of 3.7×10^5 CFU/mL was used to evaluate disease resistance. Mortality was monitored for 14 days, and survival curves were analyzed using Kaplan–Meier statistics. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's test, with significance set at $P < 0.05$. All experimental procedures involving fish were conducted in accordance with the guidelines for the care and use of laboratory animals established by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). The experimental protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee of Amol University of Special Modern Technologies, Iran (Ir.ausmt.rec.1403.11). Efforts were made to minimize the number of fish used and to reduce suffering during handling, sampling, and bacterial challenge experiments.

Results

The measurement of antioxidant enzyme showed significant treatment effects. Catalase activity remained unchanged across treatments and fish receiving the paraprobiotic diet showed significantly elevated SOD and GPx activities as well as higher total antioxidant capacity compared to control and probiotic groups ($P < 0.05$). MDA levels were significantly decreased in the paraprobiotic group, indicating enhanced protection against oxidative stress. Postbiotic supplementation showed moderate antioxidant benefits, less than the paraprobiotic treatment. Serum immunological markers revealed improvements in fish fed paraprobiotic and postbiotic diets. Total IgM concentration was highest in the paraprobiotic group, significantly higher than all other treatments ($P < 0.05$). Similarly, lysozyme and MPO activities increased in the paraprobiotic and postbiotic groups compared to control and probiotic treatments, reflecting stimulation of nonspecific immune defense mechanisms. However, complement activity (ACH50), did not differ significantly among treatments. Relative expression of pro-inflammatory cytokine genes IL-1β, IL-6, and TNF-α was significantly upregulated in all treatment groups compared to the control ($P < 0.05$). The highest expression of IL-1β and IL-6 expression was observed in the paraprobiotic and postbiotic groups, while TNF-α expression increased across all treatments, with no significant difference between probiotic, paraprobiotic, and postbiotic diets. These results suggest that inactivated bacterial components and metabolites have stronger immunostimulatory effects on gut-associated immune pathways than live probiotics. After infection with *A. hydrophila*, there were different survival rates between treatments. Control fish showed early and high mortality on day 4 post-infection, while probiotic-fed fish showed no significant improvement in survival. In contrast, fish receiving paraprobiotic and postbiotic diets showed delayed onset of mortality and significantly higher survival rates (83% and 71%, respectively) compared to both control and probiotic groups ($P < 0.05$). These results indicate that dietary supplementation with paraprobiotic or postbiotic preparations increases resistance to bacterial infection in common carp.

Conclusions

This study showed that dietary supplementation with paraprobiotics and postbiotics derived from *Lactobacillus casei* CC16 leads to more effective than live probiotics in enhancing immune responses, antioxidant defense, and disease resistance in common carp. Paraprobiotics significantly increased antioxidant enzyme activities, decreased lipid peroxidation, and increased nonspecific immune parameters such as IgM, lysozyme, and MPO activity. Both paraprobiotic and postbiotic treatments led to higher expression of pro-inflammatory cytokine genes and increased survival rate against *A. hydrophila* infection. These results indicated that the use of non-viable microbial derivatives in aquaculture nutrition has some advantages, including improved stability, defined chemical composition, and reduced biosafety concerns compared to live probiotics. Therefore, paraprobiotics and postbiotics show promising alternatives for sustainable disease management in carp aquaculture, with potential applications in enhancing fish health, improving productivity, and reducing reliance on antibiotics. Future research should focus on elucidating the molecular mechanisms underlying these beneficial effects, optimizing dosage and formulation strategies, and exploring their applicability across different aquaculture species

Author contributions

Rashid Alijani Ardeshir performed the experiments. Mina Orang analyzed data. All authors contributed equally to the conceptualization of the article and writing of the original and subsequent drafts.

Data availability statement

Data will be available if it is necessary.

Acknowledgements

The authors would like to thank the laboratory staff of Amol University of Special Modern Technologies for their cooperation in this study.

Ethical Considerations

All experimental procedures involving fish were conducted in accordance with the guidelines for the care and use of laboratory animals established by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). The experimental protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee of Amol University of Special Modern Technologies, Iran (Ir.ausmt.rec.1403.11). Efforts were made to minimize the number of fish used and to reduce suffering during handling, sampling, and bacterial challenge experiment. The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Funding

The study was funded by the University of Amol University of Special Modern Technologies, Iran. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

مقایسه اثر پروبیوتیک، پاراپروبیوتیک و پست‌بیوتیک باکتری *Lactobacillus casei* برای تقویت عملکرد ایمنی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

رشید علیجانی اردشیر

*نویسنده مسئول: استادیار گروه زیست فناوری، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، مازندران، ایران.
رایانامه: r.alijani@ausmt.ac.ir

مینا اورنگ

گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری، ساری، ایران. رایانامه: orangmina402@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۱۵ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۴/۱۰/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۰۵

چکیده

هدف: کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) مهمترین ماهی آب شیرین با پراکنش جهانی است که به دلیل سازگاری و پتانسیل آن در آبزی پروری تجاری ارزش دارد. با این حال، حساسیت آن به بیماری‌ها مستلزم استراتژی‌های مدیریت پایدار بیماری است. این مطالعه به مقایسه پتانسیل استفاده از مکمل‌های پروبیوتیک، پاراپروبیوتیک، و پست بیوتیک مشتق شده از CC16 *Lactobacillus casei* به مدت ۵۶ روز برای افزایش پاسخ ایمنی و ظرفیت آنتی اکسیدانی کپور معمولی و بهبود مقاومت آنها در برابر عفونت *Aeromonas hydrophila* می‌پردازد.

مواد و روش‌ها: چهار رژیم غذایی آزمایشی مورد استفاده قرار گرفت: یک رژیم غذایی پایه بدون باکتری به عنوان شاهد، یک رژیم غذایی پایه با کشت ۲۴ ساعته *L. casei* (پروبیوتیک)، یک رژیم غذایی پایه با کشت ۲۴ ساعته و سپس کشته شده *L. casei* (پاراپروبیوتیک) و یک رژیم غذایی پایه با مایع رویی بدون سلول (پست بیوتیک) از یک کشت زنده ۲۴ ساعته *L. casei* . ماهی‌ها در آکواریوم های ۸۰ لیتری به مدت ۵۶ روز با جیره‌های آزمایشی تهیه شده تغذیه شدند. پس از آزمایش تغذیه، ماهی ها بیهوش و از ورید دمی خون و در نهایت سرم تهیه شد. پس از تشریح ، بافت روده نمونه برداری شد. پس از نمونه برداری، سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی، پراکسیداسیون لیپیدی، سیستم کمپلمان در سرم (ACH50)، غلظت کل ایمنوگلوبولین(IgM)، فعالیت لیزوزیم سرم، فعالیت میلوپراکسیداز(MPO)، بیان ژن‌های ایمنی (IL-1β, TNFα, and IL-6) و آزمون چالش باکتریایی انجام شد.

نتایج: نشان داد که تیمار پاراپروبیوتیک نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی، به طور قابل‌توجهی دفاع آنتی‌اکسیدانی و پاسخ ایمنی را افزایش داد، که با افزایش سطح آنزیم‌های آنتی اکسیدانی (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز) و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی همراه بود ($P<0.05$). همچنین افزایش ایمونوگلوبولین M، لیزوزیم و فعالیت‌های میلوپراکسیداز، و افزایش بیان سیتوکین‌های پیش‌التهابی (IL-1β، TNFα و IL-6) در گروه پاراپروبیوتیک و پست بیوتیک نسبت

به گروه‌های دیگر کاملا مشهود بود.گروه‌های پاراپروبیوتیک و پست بیوتیک نرخ بقای بالاتری را در آزمون چالش باکتریایی نشان دادند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نتیجه‌گیری می‌کند که پاراپروبیوتیک‌ها و پست‌بیوتیک‌ها در تقویت سیستم ایمنی ماهی کپور معمولی مؤثر هستند و به دلیل ساختار شیمیایی تعریف‌شده، خواص ویژه تقویت‌کننده سیستم ایمنی و ماندگاری طولانی‌تر، نسبت به پروبیوتیک‌های زنده مزیت‌هایی دارند و و یک راه امیدوارکننده برای پیشگیری از بیماری در پرورش ماهی کپور فراهم کند.

کلیدواژه‌ها: پاراپروبیوتیک، پروبیوتیک، پست بیوتیک، تقویت ایمنی، مکمل تغذیه ایی

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: علیجانی اردشیر رشید، اورنگ مینا (۱۴۰۵) مقایسه اثر پروبیوتیک، پاراپروبیوتیک و پست‌بیوتیک باکتری Lactobacillus casei برای تقویت عملکرد ایمنی در ماهی کپور معمولی (Cyprinus carpio). *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۸(۱)، ۹۷-۱۱۸.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.

مقدمه

کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) از جمله مهم ترین ماهیان آب شیرین محسوب می شود و تقریباً در تمام کشورهای جهان توزیع شده است اما در آسیا و برخی کشورهای اروپایی بسیار محبوب است (Rahman, 2015). به دلیل محبوبیت بالای آن، توزیع آن به طور گسترده توسط انسان گسترش یافته است. کپور معمولی سومین گونه پرمصرف در سراسر جهان است. این به عنوان یک کاندید بالقوه برای آبزی پروری تجاری در آسیا و برخی از کشورهای اروپایی در نظر گرفته می شود زیرا دارای قابلیت سازگاری بسیار بالایی با محیط و غذا است (Vilizzi, 2012). در برخی از کشورهای اروپایی، بیش از ۸۰ درصد از کل تولید ماهی از ماهی کپور معمولی حاصل می شود (Vilizzi, 2012). با وجود اینکه کپور معمولی به عنوان یک گونه مقاوم در آبزی‌پروری شناخته می‌شود که دارای رشد سریع بوده و سازگاری بالایی با محیط‌های مختلف پرورشی است ، شیوع مکرر بیماری‌های ویروسی وباکتریایی به طور مداوم تولید را مختل کرده و خسارات اقتصادی قابل توجهی را به دنبال دارد (Al-Shammari et al., 2019; Machat et al., 2021). به‌طور سنتی، شیوع بیماری‌های ماهی با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و شیمی‌درمانی کنترل می‌شده است که اثرات جانبی قابل توجهی بر محیط آبی و خود ماهی دارد (Dewi et al., 2022). یک استراتژی پایدار شامل تقویت مکانیسم‌های دفاعی ذاتی و افزایش ایمنی ماهی از طریق استفاده از ایمنی‌بخش‌های سازگار زیستی یا پروبیوتیک‌های قوی است (Amenyogbe et al., 2020). پروبیوتیک‌ها روشی موثر برای تنظیم عملکرد ایمنی و بهبود سلامت میزبان ارائه می‌دهند (Lazado et al., 2015). با این حال، نگرانی‌هایی در مورد خطرات احتمالی سلامت و ایمنی پروبیوتیک‌های زنده، مانند انتقال ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی، عفونت‌های سیستمیک و تداخل با میکروبیوتای سالم روده، مطرح شده است (Piqué et al., 2019). این خطرات ممکن است بسته به سویه باکتری متفاوت باشد (Alayande et al., 2020). در نتیجه، مفاهیم نوظهوری مانند پست‌بیوتیک‌ها و پاراپروبیوتیک‌ها توجه ویژه‌ایی را در جامعه علمی به خود جلب کرده‌اند، زیرا عملکردهای امیدوارکننده‌ای آنها در بسیاری از مطالعات به اثبات رسیده است، در حالی که نگرانی‌های ایمنی مرتبط با پروبیوتیک‌های زنده را کاهش می‌دهند (Dawood et al., 2019;

Z.-Y. Liu et al., 2023; Meng et al., 2023). پاراپروبیوتیک‌ها به استفاده از سلول‌های میکروبی غیرفعال یا بخش‌های سلولی اشاره دارد که با مصرف در مقادیر کافی، فواید سلامتی را برای میزبان به همراه دارد (Tavverniti & Guglielmetti, 2011). پست‌بیوتیک‌ها محصولات محلول یا محصولات متابولیکی هستند که توسط باکتری‌های پروبیوتیک زنده یا پس از لیز باکتریایی آزاد می‌شوند و فواید فیزیولوژیکی برای میزبان فراهم می‌کنند (Aguilar-Toalá et al., 2018). استفاده از باکتری‌های مفید، پاراپروبیوتیک‌ها و یا پست‌بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری، چه به عنوان پروبیوتیک، متابولیت‌ها یا اجزای سلولی، مفید نشان داده شده است (Perez et al., 2014). پروبیوتیک‌ها و پاراپروبیوتیک با تاثیر بر گیرنده‌های سلولی در سلول‌های ایمنی روده سبب فعال‌سازی این گیرنده‌ها و ایجاد آبشارهای سیگنال‌دهی منجر می‌شود که در نهایت به افزایش تولید سیتوکین‌های پیش‌التهابی نظیر اینترفرون نوع ۱ (IFN-I)، مانند اینترلوکین- ۱ (IL-1α)، اینترلوکین-۶ (IL-6)، فاکتور نکروز توموری (TNF-α) و سایر میانجی‌های التهابی می‌انجامد و منجر به افزایش ورود عوامل مؤثر ایمنی و فعال‌سازی سیستم ایمنی غیر اختصاصی می‌شود (Almeida-da-Silva et al., 2023; Soomro et al., 2021). علاوه بر افزایش تولید IFN-I و سیتوکین‌های پیش‌التهابی، پاسخ ایمنی با تخریب مستقیم سلول‌های آلوده از طریق پیروپتوز یا اتوفاژی تقویت می‌شود (Martins et al., 2023). مسیرهای سیگنال‌دهی داخل سلولی پس از تشخیص الگوهای مولکولی مرتبط با آسیب (DAMP)[1] فعال شده و منجر به ترشح سیتوکین‌ها و کموکین‌های مختلف می‌شوند که تسهیل‌کننده التهاب ضروری برای ترمیم و بازسازی بافت است (Martins et al., 2023). برخی مطالعات پیشین برتری‌های پاراپروبیوتیک‌ها و پست‌بیوتیک‌ها نسبت به پروبیوتیک‌های سنتی را نشان دادند که از جمله آن می توان به ساختار مولکولی شناخته شده، فرم‌های خالص، مکانیسم عمل خاص، دسترسی بهتر به تعاملات الگوهای مولکولی میکروبی (MAMP)[2] با گیرنده‌های تشخیص الگو[3] (PRR) برای فعال‌سازی مسیرهای پایین‌دستی خاص و در دسترس بودن تولید بهبود یافته (Nataraj et al., 2020). *Lactobacillus casei* CC16، شناسایی شده در روده کپور معمولی سالم، آثار پروبیوتیک قابل توجهی را در حیوانات آبزی، به ویژه در کپور معمولی نشان داده است (Tian et al., 2019). با این وجود مطالعات بسیار اندکی به مقایسه اثر ایمنیایی پروبیوتیک‌ها، پست بیوتیک‌ها و پاراپروبیوتیک‌ها پرداخته اند . به علاوه، اپی‌ژنوم که شامل مکانیسم‌های مختلفی مانند متیلاسیونDNA ، بازسازی کروماتین، تغییرات دم هیستون، میکروRNA ها وRNA های غیرکدکننده بلند است، با عوامل محیطی نظیر تغذیه، عوامل بیماری‌زا و آب‌وهوا تعامل می‌کند تا پروفایل‌های بیان ژن و ظهور فنوتیپ‌های خاص را تحت تأثیر قرار دهد (Shahsavari et al., 2023; Mohammadabadi et al., 2023). این تعاملات پیچیده هستند و در سطوح متعددی رخ می‌دهند، شامل گفت‌وگوی پویا بین ژنوم، اپی‌ژنوم و محرک‌های محیطی. (Amiri Roudbar et al., 2020) شواهد رو به افزایش نشان می‌دهد که تنوع اپی‌ژنومی نقش مهمی در تعیین نتایج سلامتی و ویژگی‌های تولیدی ایفا می‌کند (Alavi et al., 2022; Safaei et al., 2022). بیان ژن‌های یوکاریوتی به‌صورت زمانی و مکانی از طریق مکانیسم‌های کنترلی چندبعدی تنظیم می‌شود (Hajalizadeh et al., 2021). تنها زیرمجموعه محدودی از کل ژنوم در هر نوع بافت به‌صورت فعال بیان می‌شود و بیان ژن به مراحل رشد وابسته است .(Heidarpour et al., 2011; Khabiri et al., 2023) در نتیجه، الگوهای بیان ژن در یوکاریوت‌ها مختص بافت هستند (Mohammadabadi & Asadollahpour Nanaei, 2021; Mohammadabadi)

[1] Recognize damage-associated molecular patterns
[2] Microbial-associated molecular patterns
[3] Pattern recognition receptors

et al., 2024). علاوه بر این، سطوح محصولات ژنی سنتز شده در یک بافت معین، و همچنین آن‌هایی که توسط بافت‌های دیگر تأمین می‌شوند، به‌طور جمعی بیان ژن را تنظیم می‌کنند (Shokri et al., 2023). تغییرات اپی‌ژنتیکی به‌عنوان مکانیسمی حیاتی عمل می‌کنند که از طریق آن عوامل محیطی اثری ماندگار بر ژنوم به جا می‌گذارند (Mohammadabadi et al., 2022a). این تغییرات می‌توانند ارثی باشند و بر نسل‌های بعدی بدون تغییر در توالی DNA تأثیر بگذارند (Mohammadabadi et al., 2025). به‌عنوان مثال، تغذیه مادر در دوران بارداری نشان داده شده است که تغییرات اپی‌ژنتیکی را ایجاد می‌کند که بر متابولیسم، رشد و حساسیت به بیماری در فرزندان تأثیر می‌گذارد (Safaei et al., 2024). به‌طور مشابه، استرس‌های محیطی مانند قرار گرفتن در معرض سموم یا عوامل بیماری‌زا می‌توانند پاسخ‌های اپی‌ژنتیکی را تحریک کنند که بیان ژن و عملکرد سلولی را تغییر می‌دهند (Noori et al., 2017). درک مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی می‌تواند استراتژی‌های پرورش را بهبود بخشد، بهره‌وری را افزایش دهد و مقاومت به بیماری را تقویت کند (Roudbar et al., 2015). علاوه بر این، نشانگرهای اپی‌ژنتیکی به‌طور فزاینده‌ای برای پیش‌بینی عملکرد و نتایج سلامتی استفاده می‌شوند و ابزاری ارزشمند برای دقت ارائه می‌دهند (Mohamadinejad et al., 2024). یکی از جنبه‌های اساسی تحقیقات ژنتیکی شامل بررسی ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با ویژگی‌های خاص است که در سطوح سلولی و کروموزومی بررسی می‌شوند (Bordbar et al., 2022). پیشرفت در درک این فرآیندهای تنظیمی پتانسیل قابل‌توجهی برای بهبود بینش‌های بیولوژیکی و کاربردهای عملی در سلامت و تولید دارد (Arabpour et al., 2021). تحقیقات بیشتر در مورد نشانگرهای اپی‌ژنتیکی و نقش آن‌ها در تنظیم ژن به استراتژی‌های درمانی مؤثرتر و درک بهتر سیستم‌های بیولوژیکی پیچیده کمک خواهد کرد (Mohammadabadi et al., 2022b). لذا، این مطالعه به بررسی تأثیر مکمل‌های پروبیوتیک، پاراپروبیوتیک و پست‌بیوتیک حاصل از باکتری *Lactobacillus casei* بر بیان سیتوکین‌های پیش‌التهابی، تغییرات در سیستم آنتی‌اکسیدانی و همچنین مقاومت در برابر عفونت چالش‌برانگیز *Aeromonas hydrophila* در کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به منظور بررسی مقایسه‌ایی عملکرد ایمنی پرداخته است.

مواد و روش‌ها

آماده سازی سویه باکتریایی: سویه از مرکز ذخایر ژنتیکی ایران تهیه شد. باکتری‌ها در محیط کشت LB (NB، کالازیست، تهران، ایران) کشت و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت یک شب انکوبه شدند. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی بدون سلول (CFS) جمع آوری و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. علاوه بر این، پلت باکتری سه بار شسته شد، دوباره در PBS استریل به غلظت مناسب معلق شد. بخشی از سوسپانسیون باکتریایی زنده در اثر حرارت کشته شد (Shawky et al., 2023). پس از آن، نمونه‌ها به کمک خشک کن انجمادی خشک شدند تا پودرهایی از باکتری‌های کشته شده در اثر حرارت و CFS بدست آید که سپس در فرمول‌بندی جیره‌های آزمایشی مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه رژیم غذایی آزمایشی: یک خوراک تجاری به عنوان جیره پایه، شامل گلوله‌های غذایی با ترکیب تقریبی زیر بر اساس ماده خشک: ۴۷ درصد پروتئین خام، ۱۸ درصد چربی خام، ۲ درصد فیبر خام، ۱۴ درصد خاکستر، ۱.۱ درصد فسفر کل، ۴۲۰۰ کیلوکالری بر کیلوگرم تغذیه با انرژی قابل هضم و کمتر از ۱۲ درصد رطوبت بود. گلوله‌ها دارای قطر متوسط ۳/۵-۴ میلی متر بودند و این خوراک از کارخانه خوراک آبزیان پیور دانه (آمل،ایران) تهیه شد. چهار رژیم غذایی آزمایشی مورد استفاده قرار گرفت که عبارت

از یک رژیم غذایی پایه بدون باکتری به عنوان شاهد، یک رژیم غذایی پایه با کشت زنده ۲۴ ساعته *L. casei* (۱۰^۷ CFU/kg رژیم غذایی) (پروبیوتیک)، یک رژیم غذایی پایه با ۲۴ –ساعت کشت باکتری کشته شده *L. casei* (پاراپروبیوتیک) و یک رژیم غذایی پایه با مایع رویی بدون سلول (پست بیوتیک) سانتریفیوژ شده از یک کشت زنده ۲۴ ساعته *L. casei* (۱۰^۷ CFU/kg جیره) بودند. دوزهای پیشنهادی بر اساس مطالعه قبلی انتخاب شد (Mohammadian et al., 2019). این رژیم‌ها دو بار در هفته تهیه می شدند. نمونه‌های یخ زده و هموژنیزه شده قبل از اضافه شدن به خوراک تجاری در نرمال سالین استریل حل شدند. جیره‌ها در دمای اتاق به مدت ۱ ساعت در هوا خشک شدند، بسته بندی شدند و تا زمان استفاده در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

ماهی و شرایط آزمایش: بچه ماهی کپور معمولی جوان (*Cyprinus carpio*) (وزن بدن ۲/۷ ± ۱۴/۳ گرم) از مزرعه پرورش کپور کمانگر (در بابل، مازندران) تهیه شد. این ماهیان در شرایط استاندارد و عاری از بیماری و انگل به مدت دو هفته پرورش داده شدند. ماهی‌ها در آکواریوم‌های ۸۰ لیتری (هر کدام ۲۰ ماهی) را تحت شرایط جریان با نرخ تبادل آب ۹ لیتر در ساعت نگهداری شدند. آکواریوم‌ها با آب شیر دکلره شده پر شدند، به طور مداوم از نظر pH (۷/۶)، اشباع اکسیژن (۶۰٪)، سختی (۱۲ °dH)، هدایت (۷۲۹ µS/cm) و دما (۱۶ درجه سانتی گراد) بررسی شدند. دوره نوری بر روی یک چرخه روشنایی تاریکی ۱۵:۹ ساعت تنظیم شد. در طول دوره آزمایش، ماهیان روزانه دو بار با جیره تجاری (پیوردانه، آمل، ایران) با ۱/۵ درصد وزن بدن تغذیه شدند. سپس ماهی‌ها به مدت ۵۶ روز با جیره‌های آزمایشی تهیه شده تغذیه شدند.

نمونه‌گیری: پس از آزمایش تغذیه، شش ماهی از هر تیمار با استفاده از ۲–فنوکسی اتانول (۰/۳ میلی لیتر در لیتر) بیهوش شدند و با استفاده از سرنگ ۳ میلی لیتری از ورید دمی خون گرفته شد. خون در یک لوله ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد، به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد لخته شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گرادg ۳۰۰۰ برای به دست آوردن سرم سانتریفیوژ شد. نمونه‌های سرم در دمای ۸۰– درجه سانتی گراد برای تجزیه و تحلیل بعدی نگهداری شدند. پس از ضدعفونی سطوح پهلو و شکمی با اتانول ۷۰ درصد، ماهی‌ها به‌صورت غیرعفونی تشریح شدند و روده با کمک نرمال سالین استریل شست و شو داده شد و ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت روده جمع‌آوری شد و بلافاصله طبق روش در RNAlater (Qiagen، Hilden، آلمان) برای اقدامات بعدی نگهداری شد.

فعالیت آنتی اکسیدانی و سنجش پراکسیداسیون لیپیدی: از کیت‌های سنجش تجاری از (ZellBio GmbH (Veltinerweg، آلمان) برای ارزیابی سطوح سوپراکسید دیسموتاز (SOD, Germany، ZB-SOD-96A)، کاتالاز (CAT، ZB-CAT-96A, Germany)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPx, Germany، ZB-GPX-96A)، مالون دی آلدئید (MDA، ZB-MDA-96A, Germany)، و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (T-AOC, Germany، ZB-TAC-96A) در نمونه‌های سرم استفاده شد. فعالیت SOD با تبدیل رنگ سنجی آنیون سوپراکسید به پراکسید هیدروژن و اکسیژن در طول موج ۴۲۰ نانومتر بررسی شد. فعالیت CAT با تجزیه ۱ میکرومول H2O2 به آب و O2 در یک دقیقه، با حساسیت ۰/۵ U/mL ارزیابی شد. فعالیت‌های GPX به صورت کالریمتری در طول موج ۴۱۲ نانومتر، با حساسیت ۵ واحد در میلی لیتر برای نمونه‌های سرم تعیین شد. سطوح MDA با اندازه گیری ترکیب اضافی MDA-TBA حاصل از واکنش بین MDA و تیوباربیتوریک اسید (TBA) در دماهای بالا، با کمی سازی در ۵۳۵ نانومتر در یک محیط اسیدی (حساسیت: ۰/۱ میکرومولار) تعیین شد. سطوح ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (

- T AOC) از طریق سنجش رنگ سنجی اندازه گیری شد. کاهش اکسیداسیون در ۴۹۰ نانومتر، در مقایسه با اسید آسکوربیک به عنوان استاندارد، با حساسیت ۰/۱ میلی مولار (۱۰۰ میکرومول در لیتر) برای سنجش استفاده شد (Adineh et al., 2021).

سنجش‌های ایمنی-سنجش سیستم کمپلمان در سرم (ACH50): روش ارزیابی فعالیت سیستم کمپلمان بر اساس مطالعه Nayak et al. بود (Nayak et al., 2018). در این ارزیابی گلبول‌های قرمز خرگوش (RaRBC) با ترکیب نمونه‌های سرم با بافر ورونال حاوی یون‌های منیزیم (Mg^{2+})، EGTA و RaRBC را بررسی می‌کند. رقت‌های متوالی از سرم ماهی در بافر ورونال تهیه شد. سپس هر رقت با حجم مساوی از سوسپانسیون ۲ درصد گلبول قرمز خرگوش مخلوط و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه به آرامی انکوبه شد. پس از پایان انکوباسیون، واکنش با افزودن ۱ میلی‌لیتر بافر سرد ورونال متوقف و نمونه‌ها در ۳۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند.پس از یک دوره انکوباسیون ۲ ساعته، محیط واکنش سانتریفیوژ شد و جذب محلول حاصل در طول موج ۴۱۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار ACH_{50} به عنوان حجمی از سرم تعریف شد که باعث لیز شدن ۵۰ درصد گلبول‌های قرمز می‌شود. این مقدار با رسم منحنی درصد همولیز در برابر حجم سرم و محاسبه نقطه متناظر با ۵۰٪ همولیز تعیین شد. در نهایت نتایج به صورت واحد در میلی‌لیتر سرم (U/mL) بیان گردید.

غلظت کل ایمونوگلوبولین (IgM): سطح کل IgM سرم با استفاده از روش ایمونوسوربنت متصل به آنزیم (ELISA) با یک کیت تجاری (Cusabio، Hubei، چین)، به دنبال پروتکل ارائه شده اندازه‌گیری شد (Sun et al., 2010). صفحات الایزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از صفحه خوان خوانده شدند. کنترل منفی با استفاده از نمونه‌های فاقد آنتی بادی بیوتین تهیه شد. میانگین جذب کنترل‌های منفی برای هر صفحه از چگالی نوری در ۴۵۰ نانومتر کم شد.

فعالیت لیزوزیم سرم: فعالیت لیزوزیم با استفاده از روش کدورت سنجی ارزیابی شد (Mohammadian et al., 2020). *Micrococcus lysodeikticus* (۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر، مرکز ذخایر ژنتیکی ایران) در بافر فسفات سدیم (۲۰ میلی مولار، pH۵ /۸) معلق شد و ۱۳۵ میکرولیتر از سوسپانسیون همگن در چاهک‌های یک صفحه میکروستر ۹۶ توزیع شد. به دنبال آن ۱۵ میکرولیتر نمونه سرم اضافه شد. قرائت جذب در ۴۵۰ نانومتر هر ۲ دقیقه در دمای اتاق در مدت ۶ دقیقه انجام شد. نتایج به عنوان واحد در هر میلی لیتر گزارش شد، با یک واحد فعالیت لیزوزیم مربوط به مقدار آنزیم که منجر به کاهش ۰/۰۰۱ واحد جذب در ۴۵۰ نانومتر در دقیقه شد.

فعالیت میلوپراکسیداز (MPO): برای ارزیابی فعالیت میلوپراکسیداز (MPO)، ۱۵ میکرولیتر سرم در ۱۳۵ میکرولیتر محلول بافر هنکس (HBSS، اصلاح شده بدون Ca2+ و Mg2+) در یک صفحه ۹۶ چاهی رقیق شد. متعاقبا، ۲۵ میکرولیتر از ۳،۳'، ۵،۵'-تترا متیل بنزیدین (TMB، ۲۰ میلی مولار، سیگما ، آلمان) و ۲۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن رقیق شده (H_2O_2، ۵ میلی مولار، سیگما ، آلمان) به هر چاهک اضافه شد. واکنش دقیقاً پس از ۲ دقیقه با افزودن ۲۵ میکرولیتر اسید سولفوریک رقیق (H_2SO_4, سیگما ، آلمان) خاتمه یافت و چگالی نوری با استفاده از میکروپلیت خوان در ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Mohapatra et al., 2014).

بیان ژن‌های ایمنی: RNA کل (۲۵ میلی گرم در هر بافت) از بافت روده با استفاده از کیت جداسازی RNA (EX6101، سیناکلون، تهران، ایران) طبق دستورالعمل سازنده استخراج شد. به طور خلاصه، بافت روده در بافر لیزکننده کیت قرار گرفت و با استفاده از هموژنایزر مکانیکی یا پیستون پلاستیکی خرد و یکنواخت شد. پس از افزودن معرف فنولی-گوانیدینی و کلروفرم، نمونه‌ها

سانتریفیوژ شدند. فاز آبی حاوی RNA به اتانول افزوده شد و سپس روی ستون منتقل گردید تا مولکول‌های RNA به سطح ستون متصل شوند. ستون‌ها چند بار با بافر شستشو شسته شدند تا نمک‌ها، DNA و پروتئین‌های باقیمانده حذف شوند. در نهایت RNA خالص با استفاده از آبRNase-free از ستون جدا و در میکروتیوب استریل جمع‌آوری شد. RNA خالص شده با استفاده از اسپکتروفتومتر NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) در ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر کمی سازی و از نظر کیفیت ارزیابی شد. متعاقباً، ۱ میکروگرم از RNA کل تحت تیمار DNase I برای حذف DNA ژنومی باقیمانده قرار گرفت و با استفاده از کیت سنتز cDNA (EX6101، سیناکلون، تهران، ایران) به cDNA معکوس رونویسی شد. کنترل منفی به طور همزمان اجرا شد(RNA یا آنزیم حذف شده است) cDNA حاصل تا ۱:۱۰ رقیق شد و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. سطح بیان ژن‌های هدف شامل IL-6، TNF-α، IL1 β، (جدول ۱)، با استفاده از سیستم LightCycler 480 (Roche Diagnostics، بازل، سوئیس) ارزیابی شد. هر واکنش تکثیر ۱۰ میکرولیتری شامل ۲ میکرولیتر آب با درجه PCR، ۵ میکرولیتر LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics)، ۲ میکرولیتر قالب cDNA رقیق شده (۱:۱۰) و ۰/۵ میکرولیتر (غلظت نهایی ۵۰۰ نانومولار) پرایمر بود. برای هر واکنش یک نمونه کنترل بدون الگو، در نظر گرفته شد. پروتکل qPCR شامل یک فرآیند سه مرحله‌ای بود: فعال‌سازی اولیه آنزیم در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، به دنبال آن ۴۰ چرخه دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، آنلینگ در دمای تنظیم شده پرایمر به مدت ۱۰ ثانیه، و گسترش آن در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه. چرخه کمی (Cq) با استفاده از روش حداکثر مشتق دوم تعیین شد، که حداکثر نرخ افزایش DNA تازه سنتز شده را در هر چرخه اندازه‌گیری می‌کند، که در نسخه ۱.۵.۰ نرم‌افزار Light Cycler 480 (Roche Diagnostics) پیاده‌سازی شده است. برای تأیید ویژگی تقویت، محصولات PCR از هر جفت پرایمر تحت آنالیز منحنی ذوب و الکتروفورز ژل آگارز برای تأیید بصری قرار گرفتند. کارایی واکنش PCR (E) برای هر آزمایش از طریق رقت‌های سریالی ۱۰ برابری cDNA به طور تصادفی ادغام شده تعیین شد. ژن مرجع شامل گلیسرآلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH)، β-اکتین (β ACT)، با رتبه بندی بیان ژن نسبی با توجه به ضریب تغییرات آنها (CV) و واریانس بین گونه ای، همانطور که قبلا توضیح داده شد، در نظر گرفته شد (Kortner et al., 2011). بیان میانگین هندسی GAPDH، β ACT به عنوان یک عامل نرمال سازی عمل می کند. میانگین بیان نرمال شده ژن‌های هدف از مقادیر Cq خام با استفاده از روش‌های کمی سازی نسبی محاسبه شد. تمام سنجش‌های RT- qPCR با سه تکرار بیولوژیکی، که هر کدام از سه تکرار فنی تشکیل شده‌اند، انجام شد.

آزمون چالش باکتریایی: باکتری *A. hydrophila* به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت تریپتیک سوی بروث (TSB) کشت داده شد. پس از پایان آزمایش، هفت ماهی از هر تکرار به مدت ۱۴ روز با *A. hydrophila* چالش شدند. گروه‌های ماهی‌ها تزریق داخل صفاقی سلول‌های باکتریایی را در هفت غلظت مختلف، اندازه‌گیری شده در واحد کلنی‌زایی (CFU) در میلی‌لیتر، با دوز ۵۰۰ میکرولیتر به ازای هر ماهی دریافت کردند. یک گروه کنترل نیز وجود داشت که محلول ۱٪ NaCl با pH ۸/۵ دریافت کرد. مشاهدات به مدت چهار روز در محدوده دمایی ۲۵ تا ۲۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد و میزان مرگ و میر، علائم بیماری و جداسازی مجدد باکتری از کبد و طحال ثبت شد. آنالیز پروبیت در نرم‌افزار SPSS دوز نیمه‌کشنده (LD_{50}) را تعیین کرد. تمام مراحل حیوانی مطابق با اصول تحقیقات زیست‌پزشکی انجام شد. LD_{50} برای *A. hydrophila* برابر با $۷/۳\times۱۰^{۵}$ CFU در میلی‌لیتر محاسبه شد. باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت تریپتیک سوی بروث کشت داده شدند. هر ماهی در گروه‌های رژیم غذایی آزمایشی، تزریق داخل صفاقی ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون

باکتریایی در محلول نمکی (۰/۹وزنی/حجمی) با غلظت باکتریایی تقریبی $۷/۳\times۱۰^{۵}$ CFU در میلی‌لیتر دریافت کرد. ماهی‌های کنترل ۱۰۰ میکرولیتر PBS دریافت کردند. مشاهدات دقیق در طول چالش باکتریایی شامل علائم بالینی و تغییرات رفتاری بود و موارد مرگ و میر روزانه برای محاسبه نرخ مرگ و میر تجمعی ثبت شد (Adel et al., 2021).

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر

Table 1. Primer's sequence used in the present study

Annealing tem.	GenBank accession no.	(5'-3') Sequence	Gene name
58.2	AY102632	AGCAGCGGGTGGAGGATGTA CCTCAGAAATGGCGGTGGAC	IL-6
59	AJ311800	GGTGATGGTGTCGAGGAGGAA TGGAAAGACACCTGGCTGTA	TNF-α
58.5	AB010701.1	ACCAGCTGGATTTGTCAGAAG ACATACTGAATTGAACTTTG	IL1 β
57.3	AJ870982.1	GAGCACCGTTCATGCTATC GACCATCCCTCCACAGTTTT	GAPDH
58	M24113.1	AGGGTGGCAATGATCTCTGT GTCTCAAACATGATCTGTGTCAT	β ACT

آنالیز آماری: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۷ آنالیز شدند. آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) به دنبال آزمون چند مقایسه‌ای توکی (Tukey's multiple range tests) برای مقایسه‌ی میانگین‌ها به کار گرفته شد. نرخ بقای ماهی‌ها پس از آزمون‌های چالش با استفاده از ابزار آنلاین SRPLOT تعیین گردید. سطح معنی‌داری در آستانه‌ی P کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. تحلیل بقا با استفاده از روش کاپلان–مایر انجام شد و تفاوت‌های گروهی با استفاده از آزمون رتبه لگاریتمی (منتل–کاکس) مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج و بحث

فعالیت آنتی اکسیدانی و سنجش پراکسیداسیون لیپیدی:فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه‌های آزمایشی تغییر معنی داری را نشان نداد ($P>0.05$)(جدول ۲). در حالیکه فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز و همچنین سطوح آنتی اکسیدانی کل در گروه تیمارشده با پاراپروبیوتیک نسبت به سایرگروه‌های آزمایشی به طور معنی داری بیشتر بود($P<0.05$)(جدول ۲). برخلاف آن، سطوح مالون دی آلدهید به طور معنی داری در گروه تیمار شده با پاراپروبیوتیک نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی کمتر بود ($P<0.05$)(جدول ۲).

سنجش‌های ایمنی: فعالیت سیستم کمپلمان در گروه‌های آزمایشی تغییر معنی داری را نشان نداد ($P>0.05$)(جدول ۳). مقدار ایمونوگلوبولین M در گروه پاراپروبیوتیک به طورمعنی داری بیش از سایر گروه‌های آزمایشی بود($P<0.05$)(جدول ۳).همچنین

مقدار فعالیت لیزیوزیم و میلوپراکسیداز در گروه‌های آزمایشی به طورمعنی داری نسبت به گروه شاهد افزایش نشان داد، بیشترین افزایش مشاهده شده در گروه پاراپروبیوتیک بود ($P<0.05$)(جدول ۲).

جدول ۲. شاخص‌های استرس اکسیداتیو در سرم ماهی کپور معمولی پس از تغذیه با جیره‌های پروبیوتیک، پاراپروبیوتیک و پست بیوتیک به مدت ۵۶ روز (میانگین± انحراف معیار)

Table 2. Oxidative stress indices in serum of common carp after feeding with probiotic, paraprobiotic and postbiotic diets for 56 days (Mean ± standard deviation), different letters in each row indicate significant differences

پست بیوتیک Postbiotic	پاراپروبیوتیک Paraprobiotic	پروبیوتیک Probiotic	شاهد Control	شاخص Indicator
118.2±21.11 *b	115.1± 10.45 b	111.1± 15.32 b	101.1± 10.12 a	کاتالاز Catalase (U/mL)
90± 21.61 a	105± 12.28 b	91± 10.73 a	90± 13.65 a	سوپراکسید دیسموتاز Superoxide dismutase (U/mL)
411.1± 16.9 c	428.2± 12.32 b	390.4± 23.11 a	390.3± 15.18 a	گلوتاتیون پراکسیداز Glutathione peroxidase (U/mL)
1127.2± 14.17 a	1231.2± 13.15 c	1125.3± 10.15 a	1110.1± 13.17 a	سطوح آنتی اکسیدانی کل Total antioxidant levels (µmol /mL)
95.71±4 b	71.1±2.0 c	13.66 ±5.0 b	10.31±6.0 a	سطوح مالون دی آلدهید Malondialdehyde levels (µmol /mL)

* حروف متفاوت در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی دار برای هر شاخص بین تیمارهای مختلف است.

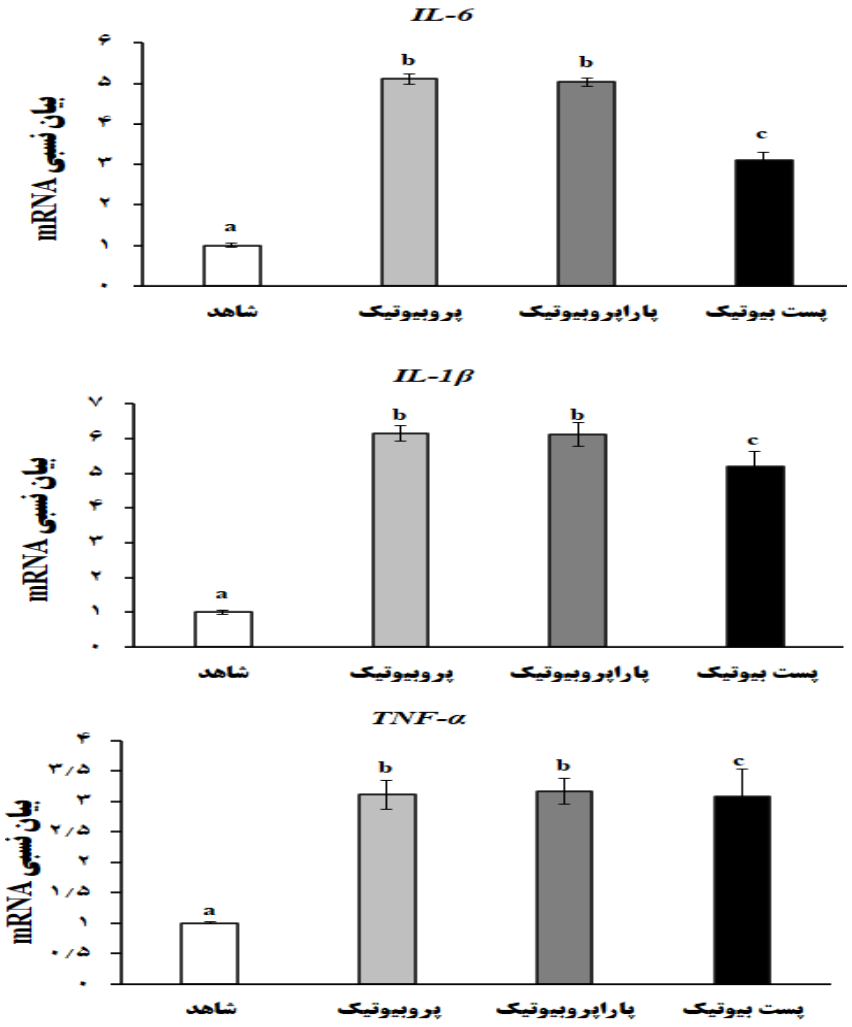
جدول ۳. شاخص‌های ایمنی در سرم ماهی کپور معمولی پس از تغذیه با جیره‌های پروبیوتیک، پاراپروبیوتیک و پست بیوتیک به مدت ۵۶ روز (میانگین± انحراف معیار)

Table 3. Immune indices in serum of common carp after feeding with probiotic, paraprobiotic and postbiotic diets for 56 days. (Mean ± standard deviation), different letters in each row indicate significant differences

پست بیوتیک Postbiotic	پاراپروبیوتیک Paraprobiotic	پروبیوتیک Probiotic	شاهد Control	پارامتر ایمنی Safety parameter
118.2±21.11 a*	115.1± 10.45 a	111.1± 15.32 a	112.1± 10.2 a	ACH50 (U/mL)
90±21.61 a	105± 12.28 b	91± 10.73 a	91± 21.66 a	ایمونوگلوبولین M Immunoglobulin M (mg/dl)
411.1± 16.9 b	428.2± 12.32 c	390.4± 23.11 b	270.2± 11.42 a	لیزوزیم Lysozyme (U/mL min)
1127.2± 14.17 b	1231.2± 13.15 c	1125.3± 10.15 b	1031± 15.1 a	میلوپروکسیداز Myeloperoxidase (O.D. 450 nm)

*حروف متفاوت در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی دار برای هر شاخص بین تیمارهای مختلف است

بیان ژن‌های ایمنی: تیمار مکمل‌های پروبیوتیک، پاراپروبیوتیک و پست بیوتیک سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های ایمنی در ماهی مپور معمولی شد ($P<0.05$)(شکل ۱). بیشترین افزایش بیان ژن‌های IL-6 و IL-1β در تیمارهای پاراپروبیوتیک و پست بیوتیک مشاهده شد ($P<0.05$)(شکل ۱). بیان TNF-α در همه تیمارهای آزمایش شده نسبت به گروه شاهد افزایش بیان نشان داد ($P<0.05$)(شکل ۱).

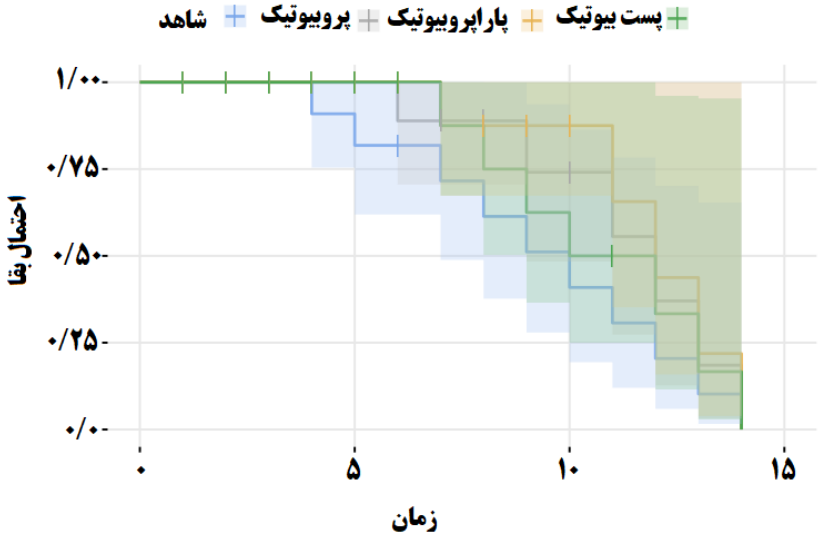


شکل ۱. بیان نسبی ژن‌های سایتوکین‌های ایمنی در بافت روده ماهی کپور معمولی پس از تغذیه با جیره‌های پروبیوتیک، پاراپروبیوتیک و پست بیوتیک به مدت ۵۶ روز. (میانگین± انحراف معیار)، حروف متفاوت در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی دار است

Figure 1. Relative expression of immune cytokine genes in the intestinal tissue of common carp after feeding with probiotic, paraprobiotic and postbiotic diets for 56 days. (Mean ± SD), different letters in each row indicate significant differences

آزمون چالش باکتریایی: در طول دوره عفونت ۱۴ روزه با *A. hydrophila* ، تفاوت‌های قابل توجهی در الگوهای مرگ و میر در بین گروه‌های آزمایشی مشاهده شد (شکل ۲) .گروه شاهد شروع زودتر مرگ و میر را در مقایسه با سایر گروه‌ها از روز

چهارم شروع کرد. در مقابل، ماهی‌هایی که با جیره‌های همراه با پاراپروبیوتیک و پست بیوتیک تغذیه مشده بودند، مرگ و میر تاخیری را تجربه کردند. تفاوت معنی داری در میزان بقا بین تیمارهای شاهد و پروبیوتیک مشاهده نشد (P>0.05)(شکل ۲). با این حال، میزان بقای گروه‌های پاراپروبیوتیک (۸۳٪) و پست بیوتیک (۷۱٪) به طور قابل توجهی بیشتر از سایرگروه‌های آزمایشی بود (P<0.05)(شکل ۲).



شکل ۲. تجزیه و تحلیل بقای کاپلان-مایر ماهی کپور معمولی عفونی شده با *A. hydrophila* پس از تغذیه با جیره‌های غذایی با مکمل پروبیوتیک، پاراپروبیوتیک و پست بیوتیک پس از ٥٦ روز. منتل-کاکس=٠/٠٤

Figure 2. Kaplan-Meier survival analysis of common carp infected with A. hydrophila after feeding probiotic, paraprobiotic and postbiotic supplemented diets after 56 days. Mantel-Cox = 0.04

نتیجه‌گیری: به طور کلی مطالعه حاضرنشان داد که استفاده از پروبیوتیک‌ها، پاراپروبیوتیک‌ها و پست‌بیوتیک‌های مشتق از *L. casei* به عنوان مکمل غذایی، عملکرد رشد، پاسخ‌های ایمنی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در کپور معمولی را به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد. پاراپروبیوتیک‌ها و پست‌بیوتیک‌ها که شامل سلول‌های میکروبی غیرفعال یا محصولات متابولیکی آن‌ها هستند، در مقایسه با مداخلات میکروبی زنده، خطرات کمتری دارند و در عین حال به طور موثر سلامت ماهی را بهبود می‌بخشند. ساختار شیمیایی مشخص، ایمنی و پایداری آن‌ها، این ترکیبات را برای آبزی‌پروری ایده‌آل می‌سازد. این مطالعه افزایش بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی را گزارش می‌کند که نشان‌دهنده پتانسیل این مکمل‌ها در تقویت ایمنی ذاتی است که برای مقاومت در برابر بیماری ضروری است. بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانی و عملکرد رشد نشان می‌دهد که این مشتقات میکروبی با بهبود استفاده از خوراک و نرخ رشد، هم سلامت و هم بهره‌وری اقتصادی را افزایش می‌دهند. تحقیقات آینده باید مکانیسم‌های مولکولی این محصولات میکروبی را روشن کند و آثار سویه‌ها و فرمولاسیون‌های مختلف را بررسی نماید.

سپاسگزاری: نویسندگان بر خود لازم میدانند تا از پرسنل آزمایشگاه دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل جهت همکاری در این مطالعه تشکر نماید.

References

Adel, M., Dawood, M. A. O., Gholamhosseini, A., Sakhaie, F., & Banaee, M. (2021). Effect of the extract of lemon verbena (*Aloysia citrodora*) on the growth performance, digestive enzyme activities, and immune-related genes in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Aquaculture, 541,* 736797. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736797

Adineh, H., Naderi, M., Nazer, A. M., Yousefi, M., & Ahmadi, E. (2021). Interactive effects of stocking density and dietary supplementation with nano selenium and garlic extract on growth, feed utilization, digestive enzymes, stress responses, and antioxidant capacity of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Journal of the World Aquaculture Society, 52*(4), 789–804. https://doi.org/10.1111/jwas.12747

Aguilar-Toalá, J., Garcia-Varela, R., Garcia, H., Mata-Haro, V., González-Córdova, A., Vallejo-Cordoba, B & „Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 105-114 . https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.009

Alavi, M., Mozafari, M. R., Ghaemi, S., Ashengroph, M., Hasanzadeh Davarani, F., & Mohammadabadi, M. (2022). Interaction of epigallocatechin gallate and quercetin with spike glycoprotein (S-glycoprotein) of SARS-CoV-2: In silico study. *Biomedicines, 10*(12), e3074. https://doi.org/10.3390/biomedicines10123074

Al-Shammari, N., Al-Taee, A., & Khamees, N. (2019). Bacterial disease agents of Cyprinus carpio from some farms in Basra, Iraq. *Ecology, Environment and Conservation*, 25(4), 1554-1558 .

Alayande, K. A., Aiyegoro, O. A., & Ateba, C. N. (2020). Probiotics in animal husbandry: Applicability and associated risk factors. *Sustainability*, 12(3), 1087 . https://doi.org/10.3390/su12031087

Almeida-da-Silva ,C. L. C., Savio, L. E. B., Coutinho-Silva, R., & Ojcius, D. M. (2023). The role of NOD-like receptors in innate immunity. *Frontiers in Immunology*, 14, 1122586 . https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1122586

Amenyogbe, E., Chen, G., Wang, Z., Huang, J., Huang, B., & Li, H. (2020). The exploitation of probiotics, prebiotics and synbiotics in aquaculture: present study, limitations and future directions.: a review. *Aquaculture International*, 28, 1017-1041 https://doi.org/10.1007/s10499-020-00509-0 .

Amiri Roudbar, M., Mohammadabadi, M. R., Ayatollahi Mehrgardi, A., Abdollahi-Arpanahi, R., Momen, M., Morota, G., Brito Lopes, F., Gianola, D., & Rosa, G. J. M. (2020). Integration of single nucleotide variants and whole-genome DNA methylation profiles for classification of rheumatoid arthritis cases from controls. *Heredity, 124*(5), 658-674. https://doi.org/10.1038/s41437-020-0301-4

Anggraeni, A. A., Maharani, A., Bellya, R., Mulyadin, A., & Yuhana, M. (2022). The effects of different dosage applications of Bacillus sp. NP5 paraprobiotic on the growth performance

and resistance of Nile tilapia against *Streptococcus agalactiae* infection. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 21 .(۲). https://doi.org/10.19027/jai.21.2.186-197

Arabpour, Z., Mohammadabadi, M., & Khezri, A. (2021). The expression pattern of p32 gene in femur, humeral muscle, back muscle and back fat tissues of Kermani lambs. *Agricultural Biotechnology Journal*, *13*(4), 183-200. https://doi.org/10.22103/jab.2022.18782.1371

Aydın, B., Çiydem, T., Kaya, E., & Açık, L. (2021). Evaluation of the antioxidant effects of postbiotics and paraprobiotics in lactic acid bacteria isolated from traditional fermented sausages. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi,* (28), 849-852. https://doi.org/10.31590/ejosat.1011409.

Blazheva, D., Mihaylova, D., Averina, O., Slavchev, A., Brazkova ,M., Poluektova, E.,…Krastanov, A. (2022). Antioxidant potential of probiotics and postbiotics: a biotechnological approach to improving their stability. *Russian Journal of Genetics*, 58(9), 1036-1050 .https://doi.org/10.1134/S1022795422090058.

Bordbar, F., Mohammadabadi, M., Jensen, J., Xu, L., Li, J., & Zhang, L. (2022). Identification of candidate genes regulating carcass depth and hind leg circumference in Simmental beef cattle using Illumina Bovine Beadchip and next-generation sequencing. *Animals, 12*(9), e1103. https://doi.org/10.3390/ani12091103.

Dawood, M. A., Magouz, F. I., Salem, M. F., & Abdel-Daim, H. A. (2019). Modulation of digestive enzyme activity, blood health, oxidative responses and growth-related gene expression in GIFT by heat-killed *Lactobacillus plantarum* (L-137). *Aquaculture*, 505, 127-136 .https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.053

Dewi, R. R., Hassan, L., Daud, H. M., Matori, M. F., Nordin, F., Ahmad, N. I., & Zakaria, Z. (2022). Prevalence and antimicrobial resistance of Escherichia coli, Salmonella and Vibrio derived from farm-raised Red Hybrid Tilapia (Oreochromis spp.) and Asian Sea Bass (*Lates calcarifer*, Bloch 1970) on the west coast of Peninsular Malaysia. *Antibiotics*, 11(2), 136 .https://doi.org/10.3390/antibiotics11020136

Hajalizadeh, Z., Dayani, O., Khezri, A., Tahmasbi, R., Mohammadabadi, M., Solodka, T., Kalashnyk, O., Afanasenko, V., & Babenko, O. (2021). Expression of calpastatin gene in Kermani sheep using real-time PCR. *Journal of Livestock Science and Technologies*, *9*(2), 51-57. https://doi.org/10.22103/jlst.2021.18165.1381

Heidarpour, F., Mohammadabadi, M. R., Zaidul, I. S. M., Maherani, B., & Saari, N. (2011). Use of prebiotics in oral delivery of bioactive compounds: A nanotechnology perspective. *Pharmazie, 66*(5), 319-324. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21699064/

Jang, H. J., Song, M. W., Lee, N.-K., & Paik, H.-D. (2018). Antioxidant effects of live and heat-killed probiotic *Lactobacillus plantarum* Ln1 isolated from kimchi. *Journal of Food Science and Technology*, 55, 3174-3180 .https://doi.org/10.1007/s13197-018-3245-4

Khabiri, A., Toroghi, R., Mohammadabadi, M., & Tabatabaeizadeh, S. E. (2023). Introduction of a Newcastle disease virus challenge strain (sub-genotype VII.1.1) isolated in Iran. *Veterinary Research Forum, 14*(4), 221. https://doi.org/10.30466/vrf.2022.548152.3373

Kortner, T. M., Valen, E. C., Kortner, H., Marjara, I. S., Krogdahl, Å., & Bakke, A. M. (2011). Candidate reference genes for quantitative real-time PCR (qPCR) assays during development of a diet-related enteropathy in Atlantic salmon (Salmo salar L.) and the potential pitfalls of uncritical use of normalization software tools. *Aquaculture*, 318(3-4), 355-363 .https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.038

Lazado, C. C., Caipang, C. M. A., & Estante, E. G. (2015). Prospects of host-associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions. *Fish & Shellfish Immunology*, 45(1), 2-12 .https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.023

Liu, F., Dixon, B., del Mar Ortega-Villaizan, M., Tafalla, C., Xu, H., Secombes, C. J., & Wang, T. (2023). Novel insights into the cytokine network of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* using cell lines and primary leukocyte populations. *Fish & Shellfish Immunology*, 137, 108755 .https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108755

Liu, Z.-Y., Yang, H.-L., Ding, X.-Y., Li, S., Cai, G.-H., Ye, J.-D.,…Sun, Y.-Z. (2023). Commensal *Bacillus siamensis* LF4 ameliorates β-conglycinin induced inflammation in intestinal epithelial cells of Lateolabrax maculatus. *Fish & Shellfish Immunology*, 137, 108797 .https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108797

Machat, R., Pojezdal, L., Piackova, V., & Faldyna, M. (2021). Carp edema virus and immune response in carp (*Cyprinus carpio*): Current knowledge. *Journal of Fish Diseases*, 44(4), 371-378 .https://doi.org/10.1111/jfd.13335

Martins, Y. C., Ribeiro-Gomes, F. L., & Daniel-Ribeiro, C. T. (2023). A short history of innate immunity. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 118, e230023 . https://doi.org/10.1590/0074-02760230023

Meng, D., Hao, Q., Zhang, Q., Yu, Z., Liu, S., Yang, Y., Ran, C., Zhang, Z. and Zhou, Z. (2023). A compound of paraprobiotic and postbiotic derived from autochthonous microorganisms improved growth performance, epidermal mucus, liver and gut health and gut microbiota of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 570, 739378 . https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739378

Mohammadian, T., Dezfuly, Z. T., Motlagh, R. G., Jangaran-Nejad, A., Hosseini, S. S., Khaj, H., & Alijani, N. (2020). Effect of encapsulated *lactobacillus bulgaricus* on innate immune system and hematological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), post-administration of Pb. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12, 375-388 . https://doi.org/10.1007/s12602-019-09544-7

Mohammadian, T., Nasirpour, M., Tabandeh, M. R., & Mesbah, M. (2019). Synbiotic effects of β-glucan, mannan oligosaccharide and Lactobacillus casei on growth performance, intestine enzymes activities, immune-hematological parameters and immune-related gene expression in common carp, Cyprinus carpio: An experimental infection with Aeromonas hydrophila. *Aquaculture*, 511, 634197 .

Mohamadinejad, F., Mohammadabadi, M., Roudbari, Z., Eskandarynasab Siahkouhi, S., Babenko, O., Klopenko, N., Borshch, O., Starostenko, I., Kalashnyk, O., & Assadi Soumeh, E. (2024). Analysis of liver transcriptome data to identify the genes affecting lipid metabolism during the embryonic and hatching periods in ROSS breeder broilers. *Journal of Livestock Science and Technologies*, *12*(2), 61-67. https://doi.org/10.22103/jlst.2024.23814.1554

Mohammadabadi, M., & Asadollahpour Nanaei, H. (2021). Leptin gene expression in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. *Agricultural Biotechnology Journal*, *13*(1), 197-214. https://doi.org/10.22103/jab.2021.17334.1305

Mohammadabadi, M., Afsharmanesh, M., Khezri, A., Kheyrodin, H., Babenko, O. I., Borshch, O., Kalashnyk, O., Nechyporenko, O., Afanasenko, V., Slynko, V., & Usenko, S. (2025). Effect of mealworm on GBP4L gene expression in the spleen tissue of Ross broiler chickens. *Agricultural Biotechnology Journal*, 17(2), 343–360. https://doi.org/10.22103/jab.2025.25277.1714

Mohammadabadi, M., Babenko, I., Borshch, O., Kalashnyk, O., Ievstafiieva, Y., & Buchkovska, V. (2024). Measuring the relative expression pattern of the *UCP2* gene in different tissues of the Raini Cashmere goat. *Agricultural Biotechnology Journal, 16*(3), 317-332. https://doi.org/10.22103/jab.2024.24337.1627

Mohammadabadi, M., Golkar, A., & Askari Hesni, M. (2023). The effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) on insulin-like growth factor 1 gene expression in the rumen tissue of Kermani sheep. *Agricultural Biotechnology Journal, 15*(4), 239-256. https://doi.org/10.22103/jab.2023.22647.1530

Mohammadabadi, M., Kheyrodin, H., Latifi, A., & Babenko Ivanivna, O. (2022a). mRNA expression profile of DNAH1 gene in testis tissue of Raini Cashmere goat. *Agricultural Biotechnology Journal*, *14*(3), 243-256. https://doi.org/10.22103/jab.2022.20199.1428

Mohammadabadi, M., Shaban Jorjandy, D., Arabpoor Raghabadi, Z., Abareghi, F., Sasan, H. A., & Bordbar, F. (2022b). The role of fennel on DLK1 gene expression in sheep heart tissue. *Agricultural Biotechnology Journal*, *14*(2), 155-170. https://doi.org/10.22103/jab.2022.19402.1399

Mohapatra, S., Chakraborty, T., Prusty, A. K., PaniPrasad, K., & Mohanta, K. N. (2014). Beneficial effects of dietary probiotics mixture on hemato-immunology and cell apoptosis of *Labeo rohita* fingerlings reared at higher water temperatures. *PloS one*, 9(6), e100929 . https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100929

Nataraj ,B. H., Ali, S. A., Behare, P. V., & Yadav, H. (2020). Postbiotics-parabiotics: The new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microbial Cell Factories*, 19, 1-22 . https://doi.org/10.1186/s12934-020-01426-w

Nayak, S., Portugal, I., & Zilberg, D. (2018). Analyzing complement activity in the serum and body homogenates of different fish species, using rabbit and sheep red blood cells.

Veterinary Immunology and Immunopathology, 199, 39-42 . https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.03.008

Noori, A. N., Behzadi, M. R. B., & Mohammadabadi, M. R. (2017). Expression pattern of Rheb gene in Jabal Barez Red goat. *The Indian Journal of Animal Sciences*, *87*(11), 1375–1378. https://doi.org/10.56093/ijans.v87i11.75890

Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB :(various structures and applications. *Microbial cell factories*, 13, 1-13 . https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S3

Piqué, N., Berlanga, M., & Miñana-Galbis, D. (2019). Health benefits of heat-killed (Tyndallized) probiotics: an overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 25 .۳۴ https://doi.org/10.3390/ijms20102534

Rahman, M. M. (2015). Role of common carp (*Cyprinus carpio*) in aquaculture production systems. *Frontiers in Life Science*, 8(4), 399-410 . https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1045629

Roudbar, M.A., Mohammadabadi, M., & Salmani, V. (2015). Epigenetics: A new challenge in animal breeding. *Genetics in the Third Millennium*, 12(4), 3900–3914.

Safaei, S. M. H., Dadpasand, M., Mohammadabadi, M., Atashi, H., Stavetska, R., Klopenko, N., & Kalashnyk, O. (2022). An *Origanum majorana* leaf diet influences *Myogenin* gene expression, performance, and carcass characteristics in lambs. *Animals, 13*(1), 14. https://doi.org/10.3390/ani13010014

Safaei, S. M. H., Mohammadabadi, M., Moradi, B., Kalashnyk, O., Klopenko, N., Babenko, O., Borshch, O. O., & Afanasenko, V. (2024). Role of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder in increasing testosterone and *IGF1* gene expression in the testis of lamb. *Gene Expression, 23*(2), 98-105. https://doi.org/10.14218/GE.2023.00020

Savan, R., & Sakai, M. (2006). Genomics of fish cytokines. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 1(1), 89-101 . https://doi.org/10.1016/j.cbd.2005.08.005

Shahsavari, M., Mohammadabadi, M., Khezri, A., Borshch, O., Babenko, O., Kalashnyk, O., Afanasenko, V., & Kondratiuk, V. (2022). Effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder consumption on *insulin-like growth factor 1* gene expression in the liver tissue of growing lambs. *Gene Expression, 21*(2), 21-26. https://doi.org/10.14218/GE.2022.00017

Shawky, A., Abd El-Razek, I. M., El-Halawany, R. S., Zaineldin, A. I., Amer, A. A., Gewaily, M. S., & Dawood, M. A. (2023). Dietary effect of heat-inactivated *Bacillus subtilis* on the growth performance, blood biochemistry, immunity, and antioxidative response of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Aquaculture*, 575, 739751 . https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739751

Shokri, S., Khezri, A., Mohammadabadi, M., & Kheyrodin, H. (2023). The expression of MYH7 gene in femur, humeral muscle and back muscle tissues of fattening lambs of the Kermani

breed. *Agricultural Biotechnology Journal*, *15*(2), 217-236. https://doi.org/10.22103/jab.2023.21524.1486

Singh, S. T., Kamilya, D., Kheti, B., Bordoloi, B., & Parhi, J. (2017). Paraprobiotic preparation from Bacillus amyloliquefaciens FPTB16 modulates immune response and immune relevant gene expression in *Catla catla* (Hamilton, 1822). *Fish & Shellfish Immunology*, 66, 35-42 .https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.005

Soomro, M. A., Pavase, T. R., & Hu, G. (2021). Role of pattern recognition receptors in teleost fish: Recent advances .*International Journal of Fish Aquatic Studies*, 9, 136-151 .

Sun, Y.-Z., Yang, H.-L., Ma, R.-L., & Lin, W.-Y. (2010). Probiotic applications of two dominant gut Bacillus strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper Epinephelus coioides. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(5), 803-809 .https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.07.018

Taverniti, V., & Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes & Nutrition*, 6(3), 261-274 .https://doi.org/10.1007/s12263-011-0218-x

Tian, J.X., Kang, Y.H., Chu, G.S., Liu, H.J., Kong, Y.D., Zhao, L.H., Kong, Y.X., Shan, X.F. and Wang, G.Q. (2019). Oral administration of *Lactobacillus casei* expressing flagellin A protein confers effective protection against *Aeromonas veronii* in common carp, *Cyprinus carpio*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 33 . https://doi.org/10.3390/ijms21010033

Tomar, S. K., Anand, S., Sharma, P., Sangwan, V., & Mandal, S. (2015). Role of probiotics, prebiotics, synbiotics and postbiotics in inhibition of pathogens. *The battle against microbial pathogens: basic science, technological advances and educational programs*, 717-732 .

Vilizzi, L. (2012). The common carp, *Cyprinus carpio*, in the Mediterranean region: origin, distribution, economic benefits, impacts and management. *Fisheries Management and Ecology*, 19(2), 93-110 .https://doi.org/10.1111/j.1365-2400.2011.00823.x

Yan, Y. Y., Xia, H. Q., Yang, H. L., Hoseinifar, S., & Sun, Y. Z. (2016). Effects of dietary live or heat-inactivated autochthonous *Bacillus pumilus* SE 5 on growth performance, immune responses and immune gene expression in grouper *Epinephelus coioides*. *Aquaculture Nutrition*, 22(3), 698-707 .https://doi.org/10.1111/anu.12297

Yu, Z., Hao, Q., Liu, S.B., Zhang, Q.S., Chen, X.Y., Li, S.H., Ran, C., Yang, Y.L., Teame, T., Zhang, Z. and Zhou, Z.G. (2023). The positive effects of postbiotic (SWF concentration®) supplemented diet on skin mucus, liver, gut health, the structure and function of gut microbiota of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with high-fat diet. *Fish & Shellfish Immunology*, 135, 108681 .https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108681