UNIWERSYTET
WARMIŃSKO-MAZURSKI
W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ: Bioinżynierii Zwierząt
Dziedzina: Nauki Rolnicze
Dyscyplina: Zootechnika i Rybactwo

mgr Martyna Arciuch-Rutkowska

Rozprawa doktorska

Opracowanie składu przemysłowej mieszanki uzupełniającej pozytywnie wpływającej na wzrost, rozwój oraz odporność ryb hodowlanych

Formulating the composition of an industrial supplementary mixture with a positive effect on the growth, development and immunity of farmed fish

Praca wykonana w Katedrze Ichtiologii i Akwakultury

Promotor: prof. dr hab. inż. Dariusz Kucharczyk
Katedra Ichtiologii i Akwakultury, Wydział Bioinżynierii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Promotor pomocniczy: dr Michał Krzysztof Łuczyński
ChemProf Doradztwo Chemiczne s.c. Katarzyna Łuczyńska i Michał Łuczyński

Olsztyn, 2024

Badania finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach programu „Doktorat Wdrożeniowy” (edycja IV), nr umowy DWD/4/80/2020.

Badania finansowane przez ChemProf Doradztwo Chemiczne s.c. Katarzyna Łuczyńska i Michał Łuczyński w ramach działalności badawczo-rozwojowej firmy.





Spis publikacji naukowych

Podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej stanowi cykl trzech powiązanych tematycznie publikacji naukowych dotyczących badań nad opracowaniem składu przemysłowej mieszanki uzupełniającej pozytywnie wpływającej na wzrost, rozwój oraz odporność ryb hodowlanych:

P1: Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Łuczyński, M.K, Jasiński, S., Kucharczyk, D. (2024). Effects of the diet enrichment with β-glucan, sodium salt of butyric acid and vitamins on growth parameters and the profile of the gut microbiome of juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*). *Animal Feed Science and Technology*, *310*, 115941.

IF = 2,5; **IF$_{5\text{-year}}$** = 2,9; **MNiSW**[1] = 200 pkt

P2: Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Łuczyński, M.K., Hussain, S.M., Kucharczyk, D. (2024). Next-Generation Sequencing to Determine Changes in the Intestinal Microbiome of Juvenile Sturgeon Hybrid (*Acipenser gueldenstaedtii*♀ × *Acipenser baerii*♂*)* Resulting from Sodium Butyrate, β-Glucan and Vitamin Supplementation. *Genes, 15(10),* 1276.

IF = 2,8; **IF$_{5\text{-year}}$**= 3,3; **MNiSW** = 100 pkt

P3: Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Łuczyński, M.K, Kucharczyk, D. (2024). Effect of diet enriching with a sodium butyrate, β-glucan and vitamins on growth, HSP70 gene expression and gut microbiome of *Coregonus maraena* fry. *Research in Veterinary Science, w trakcie recenzji*.

IF = 2,2; **IF$_{5\text{-year}}$** = 2,3; **MNiSW** = 100 pkt

Sumarycznie:

IF = 7,5

IF$_{5\text{-year}}$= 8,5

MNiSW = 400 pkt

1 Liczba punktów zgodna z komunikatem Ministra Nauki z dnia 5 stycznia 2024 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych.

Spis treści

Wykaz skrótów stosowanych w rozprawie doktorskiej **6**

Streszczenie **8**

Abstract **9**

1. Wstęp **10**

1.1. Rozwój akwakultury i ograniczenia z tym związane 10

1.2. Charakterystyka wybranych substancji aktywnych i ich oddziaływanie na funkcjonowanie organizmu ryb 11

1.2.1. Maślan sodu i β-glukan 11

1.2.2. Witaminy 13

1.3. Wybrane parametry wpływające na odporność ryb hodowlanych 14

1.3.1. Mikrobiom jelitowy 14

1.3.2. Aktywność lizozymu 15

1.3.3. Kortyzol oraz białko HSP70 16

1.4. Akwakultura wybranych gatunków ryb hodowlanych 17

1.4.1. Sum afrykański (*Clarias gariepinus*) 17

1.4.2. Hybryda jesiotra rosyjskiego i jesiotra syberyjskiego (*Acipenser gueldenstaedtii*♀ × *Acipenser baerii*♂) 18

1.4.3. Sieja (*Coregonus maraena*) 18

2. Hipotezy, cele badawcze oraz zakres badań **20**

2.1. Hipotezy badawcze 20

2.2. Cele badawcze 20

2.3. Zakres badań 21

3. Materiały i metody **22**

3.1. Oświadczenie etyczne 22

3.2. Pochodzenie, podchów wstępny oraz aklimatyzacja ryb 22

3.3. Przygotowanie mieszanek paszowych uzupełniających (MPU) 24

3.4. Przygotowanie pasz eksperymentalnych 25

3.5. Przebieg eksperymentów żywieniowych 25

3.6. Wykonane analizy 26

3.6.1. Wskaźniki hodowlane ryb 26

3.6.2. Parametry wpływające na odporność ryb 26

3.6.2.1. Mikrobiom jelitowy 26

3.6.2.2. Aktywność lizozymu we krwi....27
3.6.2.3. Stężenie kortyzolu we krwi....28
3.6.2.4. Ekspresja genu HSP70....28
3.7. Analiza statystyczna....29
4. Wyniki....31
4.1. Wskaźniki hodowlane badanych ryb....31
4.1.1. Sum afrykański....32
4.1.2. Hybryda jesiotrów....33
4.1.3. Sieja....33
4.2. Mikrobiom jelitowy....33
4.2.1. Wskaźniki α- i β-różnorodności badanych mikrobiomów jelitowych 33
4.2.1.1. Sum afrykański....34
4.2.1.2. Hybryda jesiotrów....36
4.2.1.3. Sieja....38
4.2.2. Profil mikrobiomów jelitowych badanych ryb....39
4.2.2.1. Sum afrykański....39
4.2.2.2. Hybryda jesiotrów....41
4.2.2.3. Sieja....42
4.3. Aktywność lizozymu w osoczu krwi hybrydy jesiotrów....44
4.4. Stężenie kortyzolu w osoczu krwi hybrydy jesiotrów....44
4.5. Ekspresja genu HSP70 w tkance wątrobowej siei....45
5. Dyskusja....46
6. Podsumowanie....51
7. Wnioski....54
8. Wdrożenie produktu w firmie ChemProf s.c....56
Spis literatury....57
Spis tabel....73
Spis rysunków....74
Załączniki....76

Wykaz skrótów stosowanych w rozprawie doktorskiej

ACTH (ang. *adrenocorticotropic hormone*) - hormon adrenokortykotropowy

ANOVA (ang. *analysis of variance*) – analiza wariancji

ASVs (ang. *amplicone sequence variants*) – warianty sekwencji amplikonu

CF (ang. *cannibalism factor*) – współczynnik kanibalizmu

CRH (ang. *corticotropin releasing hormone*) - hormon uwalniający kortykotropinę

DNA (ang. *deoxyribonucleic acid*) – kwas deoksyrybonukleinowy

ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) – test immunoenzymatyczny

EUMOFA (ang. *European Market Observatory for fisheries and aquaculture products*) - Europejskie Centrum Monitorowania Rynku Produktów Rybołówstwa i Akwakultury

FAO (ang. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) - Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa

$\mathbf{F_L}$ (ang. *final length*) – długość końcowa

GPCRs (ang. *G-protein-coupled receptors*) – receptory sprzężone z białkiem G

GPR (ang. *G-protein-coupled receptor*) – receptor sprzężony z białkiem G

HDAC (ang. *histone deacetylases*) - deacetylaza histonowa

HSP (ang. *heat-shock protein*) – białko szoku cieplnego

IgA (ang. *immunoglobulin A*) – immunoglobulina A

$\mathbf{I_L}$ (ang. *initial length*) – długość początkowa

$\mathbf{F_W}$ (ang. *final weight*) – masa końcowa

IL-1 (ang. *interleukin-1)* – interleukina 1

IUCN (ang. *International Union for Conservation of Nature*) - Międzynarodowa Unia Ochrony Przyrody i Zasobów Naturalnych

$\mathbf{I_W}$ (ang. *initial weight*) – masa początkowa

K (ang. *condition factor*) - współczynnik kondycji

L_A (ang. *lysozyme activity*) – aktywność lizozymu

LAB (ang. *lactic acid bacteria*) – bakterie kwasu mlekowego

LG (ang. *length gain*) - przyrost długości

MC2-R (ang. *melanocortin 2 receptor*) - receptor melanokortyny 2

MPU (ang. *supplementary feed mixture*) – mieszanka paszowa uzupełniająca

NK (ang. *"natural killer" cells*) – komórki „naturalni zabójcy"

NGS (ang. *Next-Generation Sequencing*) – sekwencjonowanie nowej generacji

Olfr 78 (ang. *olfactory receptor 78*) – receptor węchowy 78

PCoA (ang. *principal coordinate analysis*) – analiza głównych współrzędnych

PCR (ang. *polimerase chain reaction*) – łańcuchowa reakcja polizmerazy

PE (ang. *pair-end sequencing technology*) – technologia sekwencjonowania z dwóch stron

qRT-PCR (ang. *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*) – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją

RAS (ang. *recirculated aquaculture system*) - recyrkulowany system akwakulturowy

Real-Time PCR (ang. *real time polymerase chain reaction*) – łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym

RNA (ang. *ribonucleic acid*) – kwas rybonukleinowy

SCFAs (ang. *short-chain fatty acids*) – krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe

SD (ang. *standard deviation*) – odchylenie standardowe

SGR (ang. *specific growth rate*) – względny dobowy przyrost masy

SR (ang. *survival rate*) - współczynnik przeżywalności

WG (ang. *weight gain*) - przyrost masy

Streszczenie

Akwakultura od ponad 70 lat jest najszybciej rozwijającą się gałęzią rolnictwa. Jednak intensyfikacja procesów produkcji stawia przed hodowcami i naukowcami nowe wyzwania, a jednym z nich jest spadek odporności na stres oraz choroby zakaźne u ryb hodowlanych. Ograniczenie wpływu czynników stresogennych w akwakulturze jest ważnym aspektem wpływającym na wydajność oraz opłacalność hodowli. Wprowadzenie do diety ryb nie-antybiotykowych substancji aktywnych o działaniu immunomodulacyjnym oraz przeciwdziałającym immunosupresji jest najbardziej obiecującym rozwiązaniem, zarówno z punktu widzenia hodowcy, jak i konsumenta.

Niniejsza praca miała na celu opracowanie mieszanki paszowej uzupełniającej, przyspieszającej tempo wzrostu ryb oraz poprawiającej parametry odpornościowe. W tym celu przeprowadzono doświadczenia żywieniowe na trzech gatunkach ryb akwakulturowych – sumie afrykańskim (*Clarias gariepinus)*, hybrydzie jesiotra rosyjskiego i jesiotra syberyjskiego (*Acipenser gueldenstaedtii*♀ × *Acipenser baerii*♂) oraz siei (*Coregonus maraena*). Paszę wzbogacono mieszankami o różnych proporcjach substancji aktywnych o udowodnionym działaniu immunostymulującym oraz wspierającym rozwój ryb (maślan sodu, β-glukan oraz witaminy - A, D3, E, K, C). Po 30-dniowym okresie wzbogaconego żywienia określono wskaźniki hodowlane, profil mikrobiomu jelitowego, poziom kortyzolu i aktywność lizozymu oraz ekspresję genu HSP70.

Suplementacja diety wybranych gatunków ryb badaną kompozycją wywołuje wyraźną poprawę wskaźników wzrostowych, a u siei także przeżywalności. Po okresie wzbogaconego żywienia stwierdzono zwiększenie bioróżnorodności gatunkowej w badanych mikrobiomach. Ponadto określono wzrost liczby bakterii probiotycznych w stosunku do bakterii potencjalnie patogennych w jelitach badanych ryb. Suplementacja diety wybraną kompozycją bezpośrednio jak i pośrednio wpływa na poprawę parametrów odpornościowych u badanych gatunków ryb.

Zastosowanie produktu w komercyjnych hodowlach ryb może przyczynić się do ograniczenia stosowania leków i antybiotyków w akwakulturze poprzez wspieranie zarówno rozwoju jak i układu odpornościowego ryb hodowlanych.

Słowa klucze: β-glukan, akwakultura, immunomodulacja, maślan sodu, mikrobiom jelitowy

Abstract

Aquaculture has been the fastest growing branch of agriculture for over 70 years. However, the intensification of production processes poses new challenges for breeders and scientists, one of which is a decrease in resistance to stress and infectious diseases in farmed fish. Reducing the impact of stress factors in aquaculture is an important aspect affecting the efficiency and profitability of farming. The introduction of non-antibiotic active substances with immunomodulatory and anti-immunosuppression properties into the fish diet is the most promising solution, both from the point of view of the breeder and the consumer.

This work was aimed at developing the composition of a supplementary feed mixture that accelerates the growth rate of fish and improves immune parameters. For this purpose, feeding experiments were carried out on three species of aquaculture fish: African catfish (*Clarias gariepinus*), hybrid of Russian sturgeon and Siberian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*♀ × *Acipenser baerii*♂), whitefish (*Coregonus maraena*). The feed was enriched with mixtures with various proportions of active substances with proven immunostimulating effects and supporting fish development (sodium butyrate, β-glucan and vitamins A, D3, E, K, C). After a 30-day period of enriched nutrition, breeding indicators, intestinal microbiome profile, cortisol level and lysozyme activity, as well as HSP70 gene expression were determined.

Supplementing the diet of selected fish species with the tested composition causes a significant improvement in growth indicators and also survival rate in whitefish. After a period of enriched nutrition, an increase in species biodiversity was found in the examined microbiomes. Moreover, the increase in the number of probiotic bacteria in relation to potentially pathogenic bacteria in the intestines of the tested fish was determined. Dietary supplementation with a selected composition directly and indirectly improves immune parameters in the tested fish species.

Use of the product in commercial fish farming can help reduce the use of drugs and antibiotics in aquaculture by supporting both the development and immune systems of farmed fish.

Key words: β-glucan, aquaculture, immunomodulation, intestinal microbiome, sodium butyrate

1. Wstęp

1.1. Rozwój akwakultury i ograniczenia z tym związane

W ostatnich dekadach odnotowuje się wyraźny wzrost produkcji oraz spożycia żywności pochodzącej z akwakultury. W raporcie Organizacji Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) opublikowanym w 2024 roku, wykazano, że 2022 rok był rekordowy pod względem światowej produkcji żywności pochodzącej z rybołówstwa i akwakultury. Łącznie wyprodukowano 223,2 mln ton ryb i owoców morza. Ponadto w 2022 roku po raz pierwszy produkcja akwakulturowa przewyższyła połowy i osiągnęła poziom 130,9 mln ton, stanowiąc 51% całkowitej produkcji zwierząt wodnych w celach konsumpcyjnych i przetwórczych (FAO, 2024). Dalszy rozwój akwakultury ma szczególne znaczenie dla utrzymania światowego bezpieczeństwa żywnościowego oraz wspierania zdrowego odżywiania ze względu na dostarczanie mięsa o wysokiej jakości strawnego białka zwierzęcego, kwasów tłuszczowych (w szczególności omega-3) oraz niezbędnych minerałów i witamin (FAO, 2024).

W każdej hodowli zwierząt jak również w akwakulturze występują pewne ograniczenia. Jednym z ważniejszych problemów jest spadek odporności na choroby jako skutek wielu czynników stresogennych (Martos-Sitcha i in., 2020). Stres w akwakulturze wywołany wieloma czynnikami fizycznymi (np. nieodpowiednia temperatura, niedobory tlenu, hałas, zbyt duża obsada), chemicznymi (np. zanieczyszczenia chemiczne, produkty przemiany materii, nieodpowiednie parametry wody), biologicznymi (np. obecność mikroorganizmów patogennych, pasożytów) oraz związanymi z wykonywaniem procedur (np. sortowanie, leczenie, transportowanie) może przyczynić się do spowolnionego tempa wzrostu, immunosupresji oraz w konsekwencji do wzrostu odsetka śmiertelności w hodowli spowodowanym rozwojem infekcji bakteryjnych lub wirusowych (Ciji i Akhtar, 2021). Często nieuzasadnione stosowanie leków, w tym również antybiotyków, wywołuje jedynie krótkotrwałe rezultaty (czasową poprawę stanu zdrowotnego), prowadząc do rozwoju antybiotykoopornych bakterii i zaburzeń równowagi mikrobiomu jelitowego ryb (Domenico i in., 2017; Abdel-Latif i in., 2022a, 2022b). Konsekwencją powyższych działań jest znaczące obniżenie odporności ryb hodowlanych. W związku z powyższym, racjonalne ograniczenie stresu, łagodzenie jego skutków oraz poprawa odporności stały się ważnym aspektem decydującym o powodzeniu i opłacalności hodowli ryb oraz innych zwierząt wodnych (Ciji i Akhtar, 2021).

W ostatnich latach przeprowadzono wiele badań mających na celu opracowanie odpowiedniej strategii poprawy ogólnego stanu fizjologicznego ryb w akwakulturze. Okazuje się, że suplementacja diety substancjami aktywnymi lub nutraceutykami w postaci dodatków do pasz jest najbardziej pragmatyczna i obiecująca (Ciji i Akhtar, 2021). Ponadto zasadne jest wprowadzenie profilaktycznej suplementacji w postaci immunostymulatorów, witamin oraz innych składników odżywczych przeciwdziałających immunosupresji wywołanej między innymi stresem (Jarmołowicz i in., 2017; Yamamoto i in., 2020; Nowosad i in., 2023). Istotne jest także bezpieczeństwo ich stosowania, zarówno dla środowiska jak i człowieka jako późniejszego konsumenta. Zadaniem naukowców jest zatem poszukiwanie nie-antybiotykowych immunostymulatorów, które będą wzmacniać immunokompetentność organizmu ryb jak i ich odporność na stres (Wei i in., 2016; Abdel-Latif i in., 2022c; 2023). Z przeglądu literatury naukowej wynika, że powyższymi właściwościami charakteryzują się między innymi kwasy organiczne, również w postaci soli (np. maślan sodu), prebiotyki (np. β-glukan) oraz witaminy (Dawood i in., 2020a; Yamamoto i in., 2020).

1.2. Charakterystyka wybranych substancji aktywnych i ich oddziaływanie na funkcjonowanie organizmu ryb

1.2.1. Maślan sodu i β-glukan

Maślan sodu jest to organiczna sól o charakterystycznym zapachu, powstająca poprzez chelatowanie kwasu masłowego mineralnym sodem. Forma soli jest bardziej stabilna, ponadto zapach jest mniej intensywny niż kwasu masłowego. Dlatego też maślan sodu jest coraz częściej stosowany jako dodatek paszowy w żywieniu ryb oraz innych zwierząt hodowlanych (Abdel-Latif i in., 2020). Związek ten po dysocjacji w środowisku przewodu pokarmowego jest głównym źródłem energii dla kolonocytów, bezpośrednio wpływając na proliferację, dojrzewanie oraz różnicowanie komórek błony śluzowej jelit (Makowski i in., 2022). Ze względu na zwiększenie powierzchni chłonnej kosmków jelitowych, kwas masłowy przyczynia się do poprawy wchłaniania oraz przyswajania składników odżywczych zawartych w paszy, a to z kolei prowadzi do zwiększenia pobierania pokarmu oraz przyspieszenia tempa wzrostu ryb (Abdel-Mohsen i in., 2018; Omosowone i in., 2018; Zhang i in., 2020; El-Sharkawy i in., 2023). Ponadto suplementacja maślanem sodu pozytywnie wpływa na mikrobiom jelitowy ryb powodując zwiększenie liczby probiotycznych bakterii kwasu mlekowego

(LAB), przy jednoczesnej redukcji liczby mikroorganizmów potencjalnie chorobotwórczych takich jak bakterie z grupy coli, z rodzaju *Vibrio, Aeromonas* oraz *Gammaproteobacteria* (Zhang i in., 2016; Tian i in., 2017; Abdel-Mohsen i in., 2018; Rimoldi i in., 2018).

β-glukan jest związkiem organicznym należącym do polisacharydów, stanowiącym frakcję błonnika pokarmowego. Związek ten jest pozyskiwany z wielu źródeł takich jak drożdże, pleśnie, algi, bakterie, a także rośliny wyższe (Ahmad i in., 2012). Wiele badań przeprowadzonych na rybach dowodzi, że β-glukan jest idealnym związkiem immunostymulującym, korzystnie wpływającym zarówno na odporność na choroby jak i stres ryb hodowlanych (Meena i in., 2013; Domenico i in., 2017; Yamamoto i in, 2018, 2020). Może być stosowany jako środek zapobiegawczy i regeneracyjny w przypadku infekcji bakteryjnych czy wirusowych, ponadto wykazuje wielorakie działanie biologiczne w tym przeciwdrobnoustrojowe, przeciwutleniające i przeciwzapalne (Dawood i in., 2020b; Dawood i in., 2020c). β-glukan w dwojaki sposób wpływa na poprawę odporności ryb, poprzez bezpośrednie i pośrednie działanie. Bezpośrednie działanie immunomodulacyjne polega na łączeniu cząsteczek β-glukanu z odpowiednimi receptorami w przewodzie pokarmowym ryb i wywołaniu konkretnej odpowiedzi immunologicznej. Natomiast działanie pośrednie powiązane jest z właściwościami prebiotycznymi β-glukanu, który w wyniku fermentacji prowadzonej przez mikroorganizmy jelitowe przekształcany jest w krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA) i tym samym wpływa na skład mikrobiomu jelitowego ryb (Petit i in., 2022).

Zarówno maślan sodu jak i β-glukan prowadzą do zwiększenia puli SCFA w przewodzie pokarmowym ryb. SCFA stanowią swoiste mediatory między mikrobiomem jelitowym, a organizmem gospodarza i odgrywają kluczową rolę zarówno w procesach metabolicznych jak i odpornościowych. Ich głównym zadaniem, a w szczególności kwasu masłowego jest zapewnienie integralności komórek nabłonka jelit (kolonocytów) oraz ich odżywianie. Ponadto biorą udział w utrzymaniu równowagi mikrobiomu jelitowego poprzez oddziaływanie na nabłonek przewodu pokarmowego i wytwarzanie białek przeciwdrobnoustrojowych skierowanych przeciwko bakteriom patogennym (Martin-Gallausiaux i in., 2021). Dodatkowo, wykazano, że SCFA obniżając pH w przewodzie pokarmowym, ograniczają możliwość rozwoju niektórych patogenów (Merrifield i Rodiles, 2015). Rola SCFA nie ogranicza się jedynie do poziomu układu pokarmowego. Poprzez układ krwionośny krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe łączą się z receptorami innych narządów i regulują między innymi procesy odpornościowe

oraz metaboliczne (Markowiak-Kopeć i Śliżewska, 2020). U ssaków dowiedziono, że SCFA wpływają na funkcje fizjologiczne poprzez hamowanie deacetylaz histonowych (HDAC) lub aktywację receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR) w ten sposób regulując ekspresję wielu genów (Lin i in., 2015; Parada Venegas i in., 2019). Ponadto scharakteryzowano receptory pośredniczące (GPCRs, GPR41, GPR43, GPR109A i Olfr 78) w oddziaływaniu SCFA na funkcjonowanie organizmów wyższych, które nadal są nieznane u zwierząt wodnych (Tran i in., 2020). W akwakulturze SCFA wykorzystywane są głównie jako promotory wzrostu, jednak ostatnie badania dowodzą także o ich roli w stymulacji układu odpornościowego organizmów wodnych (Hoseinifar i in., 2017; Zhang i in., 2020b). Wykazano, że kwas masłowy wpływa na wzrost ekspresji genów IL-1 oraz zwiększenie liczby neutrofili jelitowych przez co przyczynia się do poprawy odporności danio pręgowanego (*Danio rerio*) (Shan i in., 2021). Ponadto kwas masłowy obecny w diecie powoduje ograniczenie rozwoju *Aeromonas hydrophila* w organizmie amura białego (*Ctenopharyngodon idella*) (Tian i in., 2017). Stwierdzono także, że krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, takie jak kwas octowy, propionowy oraz masłowy indukują wzrost aktywności przeciwbakteryjnej makrofagów izolowanych z nerki turbota (*Scophthalmus maximus*) (Zhang i in., 2020b).

1.2.2. Witaminy

Witaminy stanowią ważny element prawidłowego funkcjonowania zwierząt, w tym także ryb (Langi i in., 2024). Ze względu na brak lub niedostateczną syntezę poszczególnych witamin w organizmie ryb, muszą być dostarczone wraz z pokarmem (Geay i Kestemont, 2015). W związku z tym, że witaminy w paszach komponowanych są często niestabilne między innymi ze względu na warunki procesów produkcyjnych oraz późniejsze przechowywanie, powinny być podawane w postaci suplementów lub dodatków paszowych (Gasco i in., 2018). Jedną z lepiej zbadanych witamin wpływających na funkcjonowanie oraz odporność ryb jest witamina C (kwas askorbinowy), która jest niezbędna do prawidłowego rozwoju. Odpowiada ona między innymi za wchłanianie składników odżywczych. Niedobory witaminy C prowadzą do deformacji strukturalnych (skrzywienie kręgosłupa, pęknięcia czaszki) oraz krwotoków. Ponadto niezbędna jest do syntezy kolagenu w celu utrzymania integralności strukturalnej i szkieletowej ryb (Adeyemi-Doro i Iyiola, 2018). Obecność witaminy A (retinol) w organizmie ryb jest konieczna do rozwoju układu kostnego

oraz prawidłowego widzenia (Udo, 2017) podobnie jak witamina D3 (cholekalcyferol). Ponadto witamina D3 jest szczególnie ważna ze względu na jej udział w procesach odpornościowych. Koniecznością jest jej podawanie wraz z dietą z powodu niedostatecznego poziomu syntezy w organizmie ryb. Powodem tego jest prawdopodobnie zbyt mała ilość światła UV docierającego do ryb poprzez warstwę wody (Lock i in., 2010; Dominguez i in., 2021). Witaminę E (tokoferol) również należy dostarczać wraz z pożywieniem, ponieważ ryby nie mają zdolności jej syntezy. Pełni ona rolę przeciwutleniacza, chroni przed stresem oksydacyjnym oraz bierze udział w reakcjach immunologicznych (Saheli i in., 2021). Ważną rolę w zdrowiu ryb pełni również witamina K (menachinon), która jest niezbędna do syntezy białek odpowiadających za krzepnięcie krwi. Ponadto witamina K, reguluje poziom wapnia i wpływa na prawidłowy rozwój szkieletu. Niedobory tej witaminy przyczyniają się do zaburzeń wzrostu, deformacji kości, problemów z poruszaniem się oraz zwiększonej podatność na urazy (Sivagurunathan i in., 2023). Odpowiednie poziomy witamin są szczególnie istotne w warunkach intensywnej akwakultury, ze względu na szybkie tempo wzrostu ryb i potencjalnie dużą ilość czynników stresogennych.

1.3. Wybrane parametry wpływające na odporność ryb hodowlanych

1.3.1. Mikrobiom jelitowy

Mikrobiom jelitowy ryb, w przeciwieństwie do ssaków, jest wciąż niedostatecznie poznany, wiadomo jednak, że pełni on istotną rolę w wielu procesach fizjologicznych gospodarza związanych między innymi z trawieniem, metabolizmem oraz odpornością (Johny i in., 2021). Badania prowadzone na danio pręgowanym potwierdzają obecność 212 genów odpowiadających między innymi za odżywianie, metabolizm oraz odporność, których ekspresja regulowana jest obecnością lub brakiem określonych gatunków drobnoustrojów jelitowych (Rawls i in., 2004). Z tego też względu mikrobiom jelitowy określany jest często mianem „ekstra organu" (Diwan i in., 2022). Na jego skład u ryb ma wpływ wiele czynników, takich jak temperatura wody, jej zasolenie, pora roku, a także nawyki żywieniowe gospodarza, jego poziom troficzny, płeć i wiek (Gallo i in., 2020; Diwan i in., 2022). Mikrobiom jelitowy ryb w znacznym stopniu oddziałuje na układ trawienny i metabolizm poprzez wytwarzanie enzymów trawiennych, witamin i innych związków ułatwiających wchłanianie składników odżywczych zawartych w diecie, przez

co wpływa na pobieranie paszy i jej wykorzystanie oraz tempo wzrostu (Tsuchiya i in., 2008; Romero i in., 2014; Ray i in., 2012). Udowodniono również, że drobnoustroje jelitowe poprzez produkcję związków sygnalizacyjnych oraz aktywację nerwu błędnego w jelicie są w stanie oddziaływać na układ nerwowy oraz oś podwzgórze-przysadka-nadnercza, zarządzając w ten sposób reakcją na stres (Mohanta i in., 2020; Cui i in., 2022). Mikrobiom jelitowy odgrywa również kluczową rolę w procesach odpowiedzi immunologicznej organizmu poprzez regulację funkcjonowania bariery błony śluzowej jelit gospodarza (Pamer, 2007). Błona śluzowa jelit jako miejsce interakcji bakterii chorobotwórczych z gospodarzem stanowi pierwszą linię obrony przed patogenami. Komórki nabłonka, sterowane między innymi przez bakterie probiotyczne obecne w jelitach, przyczyniają się do wytwarzania substancji przeciwdrobnoustrojowych (składniki dopełniacza, mucyny, enzymy oraz defensyny) (Silphaduang i in., 2006; Zou i in., 2007). Ponadto mikrobiom jelitowy, czyli bakterie komensalne obecne w błonie śluzowej jelit wpływają na funkcjonowanie tkanki limfatycznej i wytwarzanie przez limfocyty immunoglobuliny A (IgA) – najważniejszej cząsteczki swoistej odpowiedzi immunologicznej. Nieobecność tak zwanych bakterii luminalnych skutkuje zahamowaniem wytwarzania IgA i możliwością rozwoju bakterii patogennych w organizmie gospodarza (Hormannsperger i Haller, 2010). Dysbioza mikrobiomu jelitowego powoduje zaburzenia wszystkich powyższych procesów i funkcji przez co prowadzi do rozwoju stanów zapalnych oraz chorób w organizmie (Diwan i in., 2022).

1.3.2. Aktywność lizozymu

Lizozym jest jedną z pierwszych linii obrony organizmu przed patogenami, enzym ten stanowi jeden z mechanizmów nieswoistej odpowiedzi immunologicznej (Yamamoto i in., 2020). Ze względu na mniej zróżnicowaną odporność swoistą, odporność wrodzona (nieswoista), w tym aktywność lizozymu, stanowi jeden z ważniejszych mechanizmów obronnych organizmu ryb (Jimenez-Cantizano i in., 2008; Wiszniewski i in., 2022). Działanie lizozymu polega na hydrolizie warstwy peptydoglikanu ścian komórkowych głównie bakterii Gram-dodatnich. Enzym ten jest w stanie również degradować wewnętrzną warstwę peptydoglikanu bakterii Gram-ujemnych, jednak po wcześniejszym jej odsłonięciu w wyniku innych mechanizmów wrodzonej odporności organizmu (Saurabh i Sahoo, 2008; Harikrishnan i in., 2011). Aktywność lizozymu w organizmie zwiększa się w wyniku infekcji, stresu, ale także pod wpływem substancji aktywnych

obecnych w pożywieniu (Li i in., 2021). Immunostymulatory podane w diecie ryb są w stanie wywołać zwiększenie wydzielania lizozymu. Dowiedziono, że neutrofile, komórki NK (komórki „Natural Killer") i makrofagi posiadają odpowiednie receptory, które w obecności odpowiedniego immunostymulatora aktywują mechanizmy odpowiedzi immunologicznej takie jak fagocytoza i uwalnianie cytokin. Cytokiny te stymulują produkcję nowych białych krwinek, co zwiększa wydzielanie lizozymu (Khanjani i in., 2022).

1.3.3. Kortyzol oraz białko HSP70

Kortyzol jest powszechnie stosowanym wskaźnikiem poziomu stresu u zwierząt. Jest to hormon wydzielany przez komórki nadnerczy w wyniku działania czynników stresogennych (Marinho de Mello i in., 2019). Wydzielanie kortyzolu odbywa się za pośrednictwem układu neuroendokrynnego tworzącego oś podwzgórze-przysadka-nadnercza. W odpowiedzi na czynnik stresogenny podwzgórze uwalnia peptydowy CRH (hormon uwalniający kortykotropinę) do krwi, który stymuluje wydzielanie ACTH (hormon adrenokortykotropowy) z przedniego płata przysadki mózgowej. ACTH w nadnerczach aktywuje MC2-R (receptor melanokortyny 2) do syntezy oraz uwalniania kortyzolu do krwi (Lemos i in., 2023). Kortyzol w osoczu krwi występuje w formie biologicznie aktywnej oraz niezwiązanej, następnie jest albo rozkładany w uwolnieniem kortyzonu lub wychwytywany przez tkanki poprzez bierną dyfuzję, gdzie za pośrednictwem odpowiednich receptorów między innymi reguluje ekspresję genów (Faught i in., 2016; Sadoul i in., 2019). Długotrwały stres i jednocześnie wysoki poziom kortyzolu mogą doprowadzić do stanu immunosupresji, czyli upośledzenia układu odpornościowego, a w konsekwencji do rozwoju infekcji bakteryjnych lub wirusowych (Marinho de Mello i in., 2019).

Białka szoku cieplnego (HSP) to wysoce konserwatywne białka opiekuńcze, które produkowane są w większych ilościach w sytuacjach stresowych w celu ochrony komórek przed uszkodzeniami (Liu i in., 2023). Zależność pomiędzy syntezą białek HSP70 w trakcie sytuacji stresogennej może służyć jako wskaźnik poziomu stresu, który jest mniej podatny na fluktuacje i wpływ innych czynników (Balakrishnan i in., 2023). HSP70 są najczęściej badaną grupą spośród wszystkich grup białek szoku cieplnego ze względu na ich szerokie zaangażowanie w wielu procesach komórkowych takich jak fałdowanie białek, transport przez błony komórkowe oraz ich agregacja. Białka HSP70

tworzą swoisty bufor, który pozwala na przystosowanie się komórek do stanu wywołanego czynnikami zewnętrznymi lub wewnętrznymi (Giri i in., 2014 Cheng i in., 2016). HSP70 biorą także udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej, apoptozy i stanu zapalenia organizmu, ponadto pośredniczą między komórkami, indukując produkcję cytokin prozapalnych i adhezyn (Pockey, 2003; Roberts i in., 2010). HSP70 regulują zarówno odporność wrodzoną jak i nabytą (Sun i MacRae, 2005).

1.4. Akwakultura wybranych gatunków ryb hodowlanych

1.4.1. Sum afrykański (*Clarias gariepinus*)

Sum afrykański (*Clarias gariepinus*) jest jednym z najważniejszych i najbardziej obiecujących gatunków akwakulturowych na świecie. Początek jego globalnej produkcji nastąpił około 2005 roku, natomiast w 2015 roku jego produkcja wyniosła już około 246 tysięcy ton (FAO, 2017). Sum afrykański hodowany jest w wielu krajach na całym świecie. Głównymi krajami produkującymi suma afrykańskiego w Afryce są: Nigeria, Kenia, Republika Południowej Afryki, Kamerun, Mali, Egipt, Ghana, Uganda, w Azji: Syryjska Republika Arabska, Chiny, Tajlandia, w Ameryce Południowej: Brazylia, a w Europie: Holandia, Węgry, Belgia, Włochy (FAO, 2023; Segaran i in., 2023). Gatunek ten jest popularny wśród konsumentów ze względu na dietetyczne właściwości i walory mięsa. Mięso suma afrykańskiego charakteryzuje się niską zawartością tłuszczu oraz wysoką zawartością strawnego białka i kwasów omega-3 (Abdel-Mobdy i in., 2021). Duża popularność suma afrykańskiego w akwakulturze wiąże się także z dużymi zdolnościami adaptacyjnymi oraz odpornością na niekorzystne warunków środowiska. Sum afrykański posiada dodatkowe narządy oddechowe składające się ze zmodyfikowanych łuków skrzelowych, co pozwala mu na bytowanie w wodzie o niskiej zawartości tlenu. Ponadto wykorzystując wyspecjalizowane mechanizmy fizjologiczne może przetrwać w wodzie o wysokim stężeniu soli oraz amoniaku (Lisachov i in., 2023). W akwakulturze sum afrykański hodowany jest zazwyczaj w dużym zagęszczeniu obsady co może przyczynić się do rozprzestrzeniania chorób zakaźnych, infekcji oraz zahamowania tempa wzrostu. W związku z powyższym istotne jest opracowanie odpowiednich protokołów żywienia poprawiających odporność na stres i choroby tego gatunku (Wang i in., 2013; Abutalb i in., 2022).

1.4.2. Hybryda jesiotra rosyjskiego i jesiotra syberyjskiego (*Acipenser gueldenstaedtii*♀ × *Acipenser baerii*♂)

Ze wszystkich kręgowców na świecie jesiotry są najbardziej narażone na wyginięcie (Brevè i in., 2022; Lobanov i in., 2023). Według Międzynarodowej Unii Ochrony Przyrody i Zasobów Naturalnych (IUCN) cztery gatunki jesiotra uznano już za wymarłe (Zhang i in., 2020). Spadek liczebności dzikich jesiotrów, spowodowany głównie przełowieniem, kłusownictwem i degradacją środowiska, doprowadził do znacznego rozwoju akwakultury tej grupy gatunków ryb w ostatnich latach (Stakenas i Pilinkovskij, 2019). W 1984 roku produkcja akwakulturowa jesiotrów wynosiła 150 ton, podczas gdy w XXI wieku gwałtownie wzrosła i osiągnęła w 2020 roku około 123 500 ton (EUMOFA, 2023). Obecnie jesiotry są hodowane na całym świecie nie tylko w celu pozyskiwania kawioru ale również ze względu na smaczne mięso (Havelka i Arai, 2018; Lobanov i in., 2023). W tym celu hoduje się około 20 gatunków jesiotrów i ich mieszańców. Jednak tylko pięć gatunków i dwa mieszańce jesiotrów odpowiadają za 90% całkowitej produkcji kawioru (Lobanov i in., 2023). Pod względem produkcyjności wyróżniają się dwa gatunki, które stanowią łącznie ponad 50% produkcji: jesiotr syberyjski (*Acipenser baerii*) – 31% i jesiotr rosyjski (*Acipenser gueldenstaedtii*) – 20,4% (Bronzi i in., 2011; Bronzi i in., 2019). Mięso jesiotra również zyskuje coraz większą popularność także na rynku europejskim i azjatyckim ze względu na swoją konsystencję i smak (Bronzi i in., 2019; Macheridis i in., 2020). Ponadto skład mięsa jesiotra pod względem zawartości białka i tłuszczu jest porównywalny do mięsa ryb łososiowatych (Gao i in., 2020). Intensywna akwakultura jesiotrów, zwłaszcza mieszańców, spowodowała wzrost zapotrzebowania na specjalistyczne pasze i dodatki paszowe, które będą miały pozytywny wpływ na ich wzrost i rozwój. Oprócz tego istotna jest także poprawa odporności na infekcje bakteryjne oraz wirusowe (Lee i in., 2018).

1.4.3. Sieja (*Coregonus maraena*)

Sieja (*Coregonus maraena*) to gatunek ryb z rodziny łososiowatych, ceniony ze względu na wysoką jakość mięsa oraz korzystny profil kwasów tłuszczowych. Szczególnym zainteresowaniem konsumentów cieszy się w południowym obszarze Morza Bałtyckiego, gdzie naturalnie zasiedla wody słonawe i słodkie w obszarach przybrzeżnych (Linhartová i in., 2018). Dramatyczny spadek liczebności populacji tego gatunku w środowisku naturalnym spowodowany przełowieniami, zmianami

klimatycznymi oraz zanieczyszczeniami spowodował uruchomienie w latach dziewięćdziesiątych programu, mającego na celu akwakulturową produkcję materiału zarybieniowego (Bochert i in., 2017). Rozpoczęcie hodowli siei w recyrkulowanych systemach akwakulturowych (RAS[2]) umożliwiło także pokrycie zapotrzebowania na cele konsumpcyjne (Kucharczyk i in., 2023). Komercyjna hodowla siei obarczona jest ryzykiem, ponieważ gatunek ten jest szczególnie podatny na stres wywołany powszechnymi praktykami stosowanymi w akwakulturze oraz zmiennymi warunkami środowiska wodnego między innymi niską zawartością tlenu (Hjelmstedt i in., 2021). Ponadto sieja jako gatunek ryb łososiowatych jest narażona na infekcję *Aeromonas salmonicida,* który wywołuje chorobę – wrzodzienicę ryb łososiowatych (*furunculosis salmonum)*. Infekcja ta charakteryzuje się dużą zachorowalnością i śmiertelnością wśród ryb łososiowatych, podczas gdy inne gatunki ryb mogą być jedynie jej bezobjawowymi nosicielami (Altmann i in., 2016; Godoy i in., 2024). W związku z powyższym wyzwaniem dla akwakultury siei jest stworzenie i opracowanie pasz oraz dodatków paszowych wpływających na skuteczne łagodzenie stresu i wzmocnienie układu immunologicznego organizmu.

2 RAS (ang. Recirculatory Aquaculture System), Recyrkulowany System Akwakulturowy - technologia, w której woda jest poddawana recyrkulacji i ponownie wykorzystywana po filtracji mechanicznej i biologicznej oraz usunięciu zawiesin i metabolitów. Metodę tę stosuje się do hodowli różnych gatunków ryb w dużym zagęszczeniu, wykorzystując minimum przestrzeni.

2. Hipotezy, cele badawcze oraz zakres badań

2.1. Hipotezy badawcze

Na podstawie analizy problemu badawczego i aktualnej literatury przedmiotowej dotyczącej wpływu suplementacji diety na wzrost, rozwój oraz odporność ryb hodowlanych podstawiono następujące hipotezy badawcze:

H1: Odpowiednio dobrana kompozycja maślanu sodu, β-glukanu i witamin podanych w diecie wpływa na poprawę wskaźników hodowlanych ryb na przykładzie suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus*), hybrydy jesiotrów (*Acipenser gueldenstaedtii*♀ × *Acipenser baerii*♂) oraz siei (*Coregonus maraena*).

H2: Różnorodność oraz profil mikrobiomu jelitowego ryb są zależne od zastosowanej suplementacji związków aktywnych takich jak maślan sodu, β-glukan oraz witaminy.

H3: Stres u ryb hodowlanych może być łagodzony przez dietę wzbogaconą odpowiednią kompozycją substancji aktywnych.

H4: Odpowiednia kompozycja immunostymulatorów takich jak maślan sodu, β-glukan oraz witaminy w diecie wpływa na modulację mechanizmów wrodzonej odporności nieswoistej.

2.2. Cele badawcze

Powyższe hipotezy posłużyły do sformułowania głównego celu dysertacji doktorskiej jakim jest opracowanie składu przemysłowej mieszanki uzupełniającej pozytywnie wpływającej na wzrost, rozwój oraz odporność ryb hodowlanych. Cel główny zrealizowano poprzez realizację celów szczegółowych:

C1: Przeprowadzenie doświadczeń żywieniowych na różnych gatunkach ryb hodowlanych we wczesnych stadiach rozwoju z wykorzystaniem różnych wariantów suplementacji diety maślanem sodu, β-glukanem oraz witaminami.

C2: Określenie wskaźników hodowlanych po okresie wzbogaconego żywienia ryb.

C3: Ocena wpływu suplementacji diety ryb hodowlanych związkami aktywnymi na profil i różnorodność mikrobiomu jelitowego.

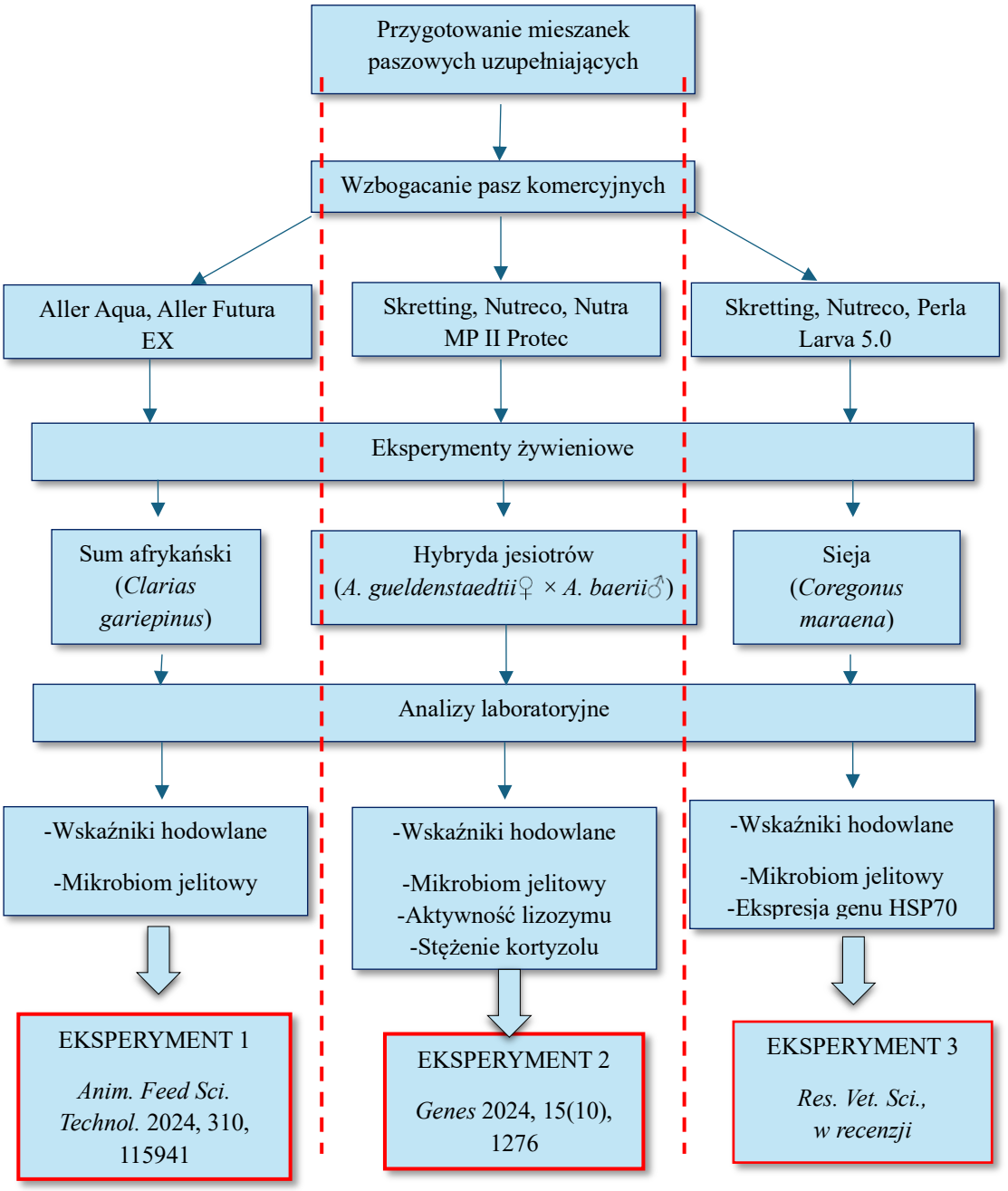
C4: Ocena wpływu suplementacji diety ryb hodowlanych związkami aktywnymi na poziom kortyzolu oraz ekspresję genu HSP70.

C5: Określenie aktywności lizozymu - podstawowego mechanizmu odporności nieswoistej ryb po okresie wzbogaconego żywienia.

C6: Wybór najkorzystniejszego wariantu składu mieszanki paszowej uzupełniającej wpływającego na poprawę wskaźników hodowlanych, odporności oraz redukcję stresu ryb hodowlanych.

2.3. Zakres badań

Zakres badań w ramach rozprawy doktorskiej przedstawiono na schemacie (Rys. 1).



Rysunek 1. Schemat blokowy przedstawiający zakres i poszczególne etapy badań w ramach rozprawy doktorskiej.

3. Materiały i metody

Do badań wybrano trzy gatunki ryb należących do różnych rodzin: suma afrykańskiego, (*Clarias gariepinus*; sumowate) hybrydę jesiotra rosyjskiego i jesiotra syberyjskiego, (*Acipenser gueldenstaedtii*♀ × *Acipenser baerii*♂; jesiotrowate) oraz sieję (*Coregonus maraena*; łososiowate). Są to gatunki popularne w hodowli akwakulturowej, zarówno ze względu na walory ekonomiczne jak i potencjał komercyjny. W Europie gatunki te są powszechnie hodowane na dużą skalę, zarówno w celu sprzedaży mięsa, jak i pozyskania kawioru (w przypadku jesiotra).

3.1. Oświadczenie etyczne

Wszystkie doświadczenia przeprowadzono zgodnie z polskimi i międzynarodowymi wytycznymi dotyczącymi zwierząt doświadczalnych. Zastosowane procedury z udziałem zwierząt przeprowadzono zgodnie z opinią Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie (LKE/11/2023). W trakcie doświadczeń zwierzęta nie były narażone na działanie toksycznych substancji, zapewniono pełny dobrostan z nieograniczonym dostępem do paszy. Zapewniono także optymalne warunki środowiskowe dla wybranych gatunków ryb.

3.2. Pochodzenie, podchów wstępny oraz aklimatyzacja ryb

Doświadczenia żywieniowe przeprowadzono na rybach pochodzących zarówno z hodowli UWM w Olsztynie (sum afrykański) jaki i z komercyjnych gospodarstw rybackich (hybryda jesiotrów, sieja). Do przeprowadzenia pierwszego eksperymentu wykorzystano suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus*) w stadium narybkowym, pochodzącego z hodowli prowadzonej przez Katedrę Ichtiologii i Akwakultury w Centrum Akwakultury i Inżynierii Ekologicznej UWM w Olsztynie. W tym celu w kontrolowanych warunkach przeprowadzono sztuczny rozród, inseminację oraz inkubację ikry zgodnie z metodyką opisaną przez Kucharczyk i in. (2019) oraz Abdel-Latif i in. (2021). Drugi eksperyment przeprowadzono na hybrydzie jesiotrów (*A. gueldenstaedtii*♀ × *A. baerii*♂) w stadium narybkowym pozyskanej z gospodarstwa rybackiego Wąsosze koło Konina (województwo wielkopolskie, Polska). Narybek siei (*Coregonus maraena*) do przeprowadzenia trzeciego eksperymentu pozyskano z gospodarstwa rybackiego Szwaderki (województwo warmińsko-mazurskie, Polska).

Pozyskane ze sztucznego rozrodu larwy suma afrykańskiego podchowano do stadium narybkowego w recyrkulacyjnych systemach akwakultury (RAS). W tym celu przez pierwsze dwa tygodnie larwy karmiono trzy razy dziennie świeżo wyklutymi naupliusami solowca (*Artemia sp.*) (Ocean Nutrition, Dartmouth, Kanada). Po tym czasie wprowadzono karmienie cztery razy na dobę paszą komponowaną Aller Futura EX (Aller Aqua, Christiansfeld, Dania) powszechnie stosowaną przez polskich hodowców (Nowosad i in., 2023). Następnie ryby przesortowano, dobrano pod względem średniej masy oraz długości ciała i obsadzono w 20 L akwariach po 50 sztuk w każdym, w celu przystosowania do warunków doświadczenia (Tab. 2). W okresie aklimatyzacji temperatura wody wynosiła 25,0 ± 0,1°C, a pH – 7,8 (Hanna HI 98128, Eden Way, UK). Ponadto kontrolowano saturację oraz natlenienie wody (OxyGuard Pacific, Farum, Denmark), poziom azotanów (Hach LCK339, Ames, USA), azotynów (Hach LCK341, Ames, USA) i amoniaku (Hach LCK303, Ames, USA) (Nowosad i in., 2013). Doświadczenie żywieniowe z paszą wzbogaconą rozpoczęto w momencie, gdy ryby osiągnęły średnią masę 0,48 ± 0,17 g oraz średnią długość 3,89 ± 0,45 mm (n = 50).

Narybek jesiotrów o masie średniej około 5 g i długości około 10 cm przetransportowano z gospodarstwa rybackiego do Centrum Akwakultury i Inżynierii Ekologicznej w odpowiednio zabezpieczonych workach z tlenem w jak najkrótszym czasie. Ryby przesortowano i obsadzono w 20 L akwariach po 12 sztuk w każdym w celu aklimatyzacji do warunków doświadczalnych (Tab. 2). W tym czasie temperaturę wody utrzymywano na poziomie 18,0 ± 0,1 °C, natomiast pH wynosiło 7,9 (Hanna HI 98128, Eden Way, UK). Kontrolowano saturację oraz natlenienie wody (OxyGuard Pacific, Farum, Denmark), poziom azotanów (Hach LCK339, Ames, USA), azotynów (Hach LCK341, Ames, USA) i amoniaku (Hach LCK303, Ames, USA) (Nowosad i in., 2013). Narybek jesiotrów karmiono cztery razy na dobę paszą komponowaną Skretting Nutra MP II Protec (Nutreco, Stavanger, Norway), popularną wśród polskich hodowców jesiotrów. Doświadczenie żywieniowe rozpoczęto, gdy ryby osiągnęły średnią masę 8,56 ± 1,50 g oraz średnią długość 12,50 ± 0,68 cm (n=22).

Narybek siei przewieziono z gospodarstwa rybackiego do Centrum Akwakultury i Inżynierii Ekologicznej w odpowiednio zabezpieczonych workach z tlenem w jak najkrótszym czasie. Następnie ryby przesortowano i obsadzono w 20 L akwariach po 150 sztuk w każdym w celu przystosowania do warunków doświadczenia (Tab. 2). Podczas aklimatyzacji temperatura wody wynosiła 18.5 ± 0.1 °C, natomiast pH – 7,6 (Hanna HI 98128, Eden Way, UK). Kontrolowano saturację oraz natlenienie wody

(OxyGuard Pacific, Farum, Denmark), poziom azotanów (Hach LCK339, Ames, USA), azotynów (Hach LCK341, Ames, USA) i amoniaku (Hach LCK303, Ames, USA) (Nowosad i in., 2013). Narybek siei karmiono cztery razy na dobę paszą komponowaną Skretting Perla Larva 5.0 (Nutreco, Stravanger, Norway). Doświadczenie żywieniowe rozpoczęto w momencie, gdy narybek siei osiągnął średnią masę 0,14 ± 0,05 g i średnią długość 2,62 ± 0,37 cm (n= 50).

3.3. Przygotowanie mieszanek paszowych uzupełniających (MPU)

Mieszanki paszowe uzupełniające (MPU) zawierające substancje aktywne, takie jak maślan sodu (WBCIL, Kalkuta, Indie), β-glukan (Trouw Nutrition, Grodzisk Mazowiecki, Polska), witaminę C (Trouw Nutrition, Grodzisk Mazowiecki, Polska), witaminę A (BASF, Ludwigshafen, Niemcy), witaminę D3 (Taizhou Hisound Pharmaceutical, Taizhou, Chiny) witaminę E (NHU, Xinchang, Chiny) i witaminę K (Orffa International, Breda, Holandia) przygotowano w kilku wariantach dla każdego eksperymentu żywieniowego (Tab. 1).

Tabela 1. Skład poszczególnych wariantów mieszanek paszowych uzupełniających (MPU) wykorzystanych w eksperymentach żywieniowych na trzech gatunkach ryb (*Clarias gariepinus, A. gueldenstaedtii♀ × A. baerii♂, Coregonus maraena*).

Gatunki ryb	Mieszanka paszowa uzupełniająca (MPU)	Maślan sodu (mg/ml)	β-glukan (mg/ml)	Witaminy
Sum afrykański (*Clarias gariepinus*)	FQV1	50	20	const.**
	FQV2*	150	20	
	FQV3*	50	60	
	FQV4*	150	60	
Hybryda jesiotrów (*A. gueldenstaedtii♀ × A. baerii♂*)	FQV1	50	20	
	FQV2	150	20	
	FQV3	50	60	
Sieja (*Coregonus maraena*)	FQV1	50	20	
	FQV2	150	20	
	FQV3	50	60	

* Oznaczone w niniejszej tabeli grupy FQV2, FQV3, FQV4 w publikacji Arciuch-Rutkowska i in. (2024) (P1) odpowiadają grupom FQV4, FQV2, FQV3 odpowiednio.

** Stała zawartość witamin we wszystkich wariantach MPU (witamina C – 30 mg/ ml, witamina A – 1200 IU/ ml, witamina D3 – 800 IU/ ml, witamina E – 10 mg/ ml, witamina K – 0,4 mg/ ml).

Poszczególne składniki aktywne rozpuszczono lub zawieszono w mieszaninie olej rzepakowy: woda (1:1; v: v) (Nowosad i in, 2023).

3.4. Przygotowanie pasz eksperymentalnych

Do przygotowania pasz eksperymentalnych wykorzystano komercyjne pasze pełnoporcjowe, powszechnie stosowane w hodowlach wybranych gatunków ryb (Rys. 1). Pasze wzbogacono zgodnie z metodyką przedstawioną przez Nowosad i in. (2023) oraz opisaną w załączonych publikacjach (P1, P2, P3). Procentową zawartość głównych komponentów oraz zawartość poszczególnych składników aktywnych w paszach eksperymentalnych paszy zestawiono w Tabeli 1 (P1, P2, P3).

3.5. Przebieg eksperymentów żywieniowych

Eksperymenty żywieniowe z zastosowaniem paszy wzbogaconej przeprowadzono w recyrkulacyjnych systemach akwakultury typu RAS. Warunki poszczególnych eksperymentów zamieszczono w Tabeli 2.

Tabela 2. Warunki opisujące poszczególne eksperymenty żywieniowe przeprowadzone na trzech gatunkach ryb (*Clarias gariepinus, A. gueldenstaedtii*♀ × *A. baerii*♂*, Coregonus maraena*).

Warunki eksperymentów	**Sum afrykański (*Clarias gariepinus*)**	**Hybryda jesiotrów (*A. gueldenstaedtii*♀ × *A. baerii*♂)**	**Sieja (*Coregonus maraena*)**
Stadium rozwojowe ryb	narybek	narybek	narybek
Masa początkowa ryb (g)	0,48 ± 0,17	8,56 ± 1,50	0,14 ± 0,05
Długość początkowa ryb (cm)	3,89 ± 0,45	12,50 ± 0,68	2,62 ± 0,37
Grupy badawcze	C - kontrola FQV1 FQV2* FQV3* FQV4*	C - kontrola FQV1 FQV2 FQV3	C - kontrola FQV1 FQV2 FQV3
Całkowita liczba ryb	750	144	1800
Liczba ryb na powtórzenie	50	12	150
Czas trwania eksperymentu (dni)	30	30	30

Parametry wody:			
temperatura (°C)	25 ± 1	18,0 ± 0,1	18,5 ± 0,1
pH	8,14 ± 0,26	7,8 ± 0,3	7,97 ± 0,26
saturacja (%)	83,48 ± 6,79	84,00 ± 3,26	84,33 ± 3,33
natlenienie (mg/ml)	6,86 ± 0,61	6,98 ± 0,33	7,03 ± 0,33
stężenie azotanów (mg/L)	< 0,02	< 0,02	< 0,02
stężenie azotynów (mg/L)	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Pora karmień w ciągu doby	8:00, 11:00, 14:00, 17:00	8:00, 11:00, 14:00, 16:00	8:00, 11:00, 14:00, 16:00
Cykliczne pomiary masy i długości ciała	tak	tak	nie
Pobór prób do dalszych analiz	Treść jelita	Treść jelita Krew obwodowa	Treść jelita Tkanka wątrobowa

* Oznaczone w niniejszej tabeli grupy FQV2, FQV3, FQV4 w publikacji Arciuch-Rutkowska i in. (2024) (P1) odpowiadają grupom FQV4, FQV2, FQV3 odpowiednio.

Szczegółowe informacje dotyczące przebiegu poszczególnych eksperymentów żywieniowych i dalszych etapów zamieszczono w załączonych publikacjach (P1, P2, P3).

3.6. Wykonane analizy

3.6.1. Wskaźniki hodowlane ryb

Dane uzyskane w trakcie eksperymentów żywieniowych, takie jak masa, długość oraz śmiertelność ryb wykorzystano do obliczenia wskaźników hodowlanych: WG (przyrost masy; g), LG (przyrost długości; cm), SGR (specyficzny przyrost masy, %/dzień), K (współczynnik kondycji; g/cm^3) SR (współczynnik przeżywalności; %) oraz CF (współczynnik kanibalizmu; %). Wzory wykorzystane do obliczenia powyższych wskaźników zamieszczono w załączonych publikacjach (P1, P2, P3).

3.6.2. Parametry wpływające na odporność ryb

3.6.2.1. Mikrobiom jelitowy

DNA z treści jelit wyizolowano z zastosowaniem dedykowanych komercyjnych zestawów do izolacji metagenomowego DNA z próbek kału (Genomic Mini AX Stool; A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska lub QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit; Qiagen,

Hilden, Niemcy). Izolaty poddano ocenie jakościowej i ilościowej z zastosowaniem spektrofotometru Nanodrop (Thermo Scientific Nanodrop One, Waltham, USA). Próbki DNA, spełniające wymagania zostały wykorzystane do sekwencjonowania metagenomowego na podstawie podjednostki 16S rRNA. Sekwencjonowanie NGS przeprowadzono w firmie zewnętrznej (Genomed, Warszawa, Polska).

Do analizy metagenomowej wykorzystano charakterystyczny dla genu 16S rRNA hiperzmienny region V3-V4. W celu amplifikacji i stworzenia bibliotek użyto specyficzne primery 341F oraz 785R oraz komercyjny zestaw Q5 Hot Start High-Fidelity 2× Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, Anglia). Sekwencjonowanie metagenomowe przeprowadzono z zastosowaniem technologii paired-end (PE), 2×300nt na aparacie MiSeq stosując zestaw v3 (Illumina, San Diego, USA). Wstępną analizę danych polegającą na demultipleksowaniu próbek oraz generowaniu surowych odczytów przeprowadzono stosując oprogramowanie MiSeq Reporter (MSR) v2.6 (Illumina, San Diego, USA). Pełną analizę bioinformatyczną klasyfikującą surowe odczyty do gatunku przeprowadzono z zastosowaniem oprogramowania QIIME 2 (Bokulich i in., 2018; Bolyen i in., 2019). Pakiet DADA2 zastosowano do oddzielenia sekwencji pochodzenia biologicznego od powstałych w trakcie sekwencjonowania oraz wyodrębnienia sekwencji ASV (Amplicon Sequence Variant) (Callahan i in., 2016). W końcowym etapie analizy przyporządkowano sekwencje ASV do odpowiedniej taksonomii stosując podejście hybrydowe. Przyporządkowano sekwencje ASV względem sekwencji zamieszczonych w bazie Silva 138 (vsearch), natomiast nietypowe sekwencje klasyfikowano w oparciu o techniki uczenia się maszynowego (sklearn) (Rognes i in., 2016; Bolyen i in., 2019). Metodykę wykorzystano we wszystkich przeprowadzonych eksperymentach.

3.6.2.2. Aktywność lizozymu we krwi

Aktywność lizozymu w osoczu krwi oznaczono stosując metodę turbidymetryczną z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Lysozyme Activity Kit (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Oznaczenie przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta, polegającym na lizie komórek *Micrococcus lysodeikticus.* Absorbancję badanych próbek mierzono przy 450 nm w temperaturze 25°C stosując spektrofotometr UV/Vis (Lambda 265, PerkinElmer, Waltham, USA). Pomiar przeprowadzono w dwóch powtórzeniach

wobec próby ślepej. Aktywność lizozymu (L_A; U/ ml) obliczono ze wzoru (Novriadi i in. 2021):

$$L_A = (\Delta A_{450}/min\ test - \Delta A_{450}/min\ ślepa) d_f / 0{,}001 \times V_{test}$$

d_f – współczynnik rozcieńczenia, 0,001 - ΔA_{450} (wartość wynikająca z definicji aktywności jednostki lizozymu), V_{test} (ml) - objętość próbki badanej.

Jedna jednostka lizozymu prowadzi do zmiany o 0,001 wartości ΔA_{450} na minutę przy pH 6,24 w temperaturze 25 °C przy użyciu zawiesiny *M. lysodeikticus* jako substratu w 2,6 ml mieszaniny reakcyjnej. Metodykę wykorzystano do określenia aktywności lizozymu we krwi hybrydy jesiotrów (*A. gueldenstaedtii*♀ × *A. baerii*♂) (P2).

3.6.2.3. Stężenie kortyzolu we krwi

Stężenie kortyzolu w osoczu krwi ryb oznaczono wykorzystując komercyjny zestaw Fish (Cortisol) ELISA Kit (SunRed Biological Technology, Szanghaj, Chiny). Analizę oraz obliczenia przeprowadzono zgodnie z procedurą producenta testu z wykorzystaniem czytnika mikropłytek i jego wewnętrznego oprogramowania (BK-EL10C, BIOBASE, Shandong, Chiny). Pomiar wykonano przy długości fali 450 nm. Metodykę wykorzystano do określenia stężenia kortyzolu we krwi hybrydy jesiotrów (*A. gueldenstaedtii*♀ × *A. baerii*♂) (P2).

3.6.2.4. Ekspresja genu HSP70

RNA z tkanki wątrobowej wyizolowano z zastosowaniem zestawu miRNeasy Tissue/Cells Advanced Mini Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy) zgodnie z zaleceniami producenta. W celu weryfikacji integralności izolatów RNA zastosowano elektroforezę w 1,2% żelu agarozowym. Czystość oraz ilość otrzymanego RNA zweryfikowano z zastosowaniem spektrofotometru Nanodrop (Thermo Scientific Nanodrop One, Waltham, USA).

Analizę ekspresji genu HSP70 przeprowadzono stosując jednoetapowy zestaw QuantiNova SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy). Do przeprowadzenia reakcji wykorzystano termocykler do Real-Time PCR (AriaMx Real Time PCR, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Reakcje RT-PCR i qRT-PCR przeprowadzono zgodnie z rekomendacjami producenta: odwrotna transkrypcja – 10 min/ 50 °C, etap wstępnej

aktywacji PCR – 2 min/ 95 °C oraz denaturacja – 5 s/ 95 °C i wydłużanie – 10 s/ 60 °C w 40 cyklach. qRT-PCR przeprowadzono stosując specyficzne startery dla genu HSP70 (F:5'ATAAGGTCGCCTGAGCAAGG3';R:5'AGTGGTCTAAGACAGTTCAAGTCC3) zaprojektowane w programie PrimerBlast i zweryfikowane poprzez wykonanie krzywej topnienia w następujących warunkach: 30 s/ 95 °C, 30 s/ 65 °C, 30 s/ 95 °C (Ye i in., 2012; Buwono i in., 2024). Względną ekspresję HSP70 określono metodą ΔΔCt (Schmittgen i Livak, 2008; Pfaffl 2016). Jako endogenny standard (gen referencyjny) zastosowano gen β-aktynę, który nie wykazał statystycznie istotnych różnic w zmiennych warunkach doświadczalnych ($p < 0,05$) (Brzuzan i in. 2011). Określono wydajności reakcji badanego genu HSP70 (96 %) i genu referencyjnego (100 %), natomiast liniowość serii kolejnych rozcieńczeń nie była niższa niż 0,99 (Bustin i in., 2009). Analizę uzyskanych danych wykonano z wykorzystaniem oprogramowania Aria (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Metodykę wykorzystano do określenia ekspresji genu HSP70 siei (*Coregonus maraena*) (P3).

3.7. Analiza statystyczna

Wskaźniki hodowlane (WG, LG, SGR, K, SR i CF) przedstawiono jako wyniki średnie wraz z odchyleniem standardowym (SD). Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu programu Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc.; Palo Alto, Kalifornia, USA). Normalność i jednorodność wariancji oznaczano stosując testy statystyczne Shapiro-Wilka i Leven'a. Wskaźniki WG, LG, SGR, SR, aktywność lizozymu oraz stężenie kortyzolu statystycznie analizowano za pomocą jednoczynnikowej analizy ANOVA i testu post-hoc Tukey'a przy poziomie istotności $p < 0,05$, natomiast CF analizowano z wykorzystaniem testu post-hoc Duncana przy poziomie istotności $p < 0,05$.

Wskaźniki α-różnorodności, takie jak wskaźnik Shannon'a, wskaźnik Simpson'a, wskaźnik równocenności oraz wskaźnik Chao-1 obliczono z wykorzystaniem programu PAST 4.03 (Uniwersytet w Oslo, Oslo, Norwegia). Powyższe wskaźniki oraz dane pochodzące z analiz ekspresji genu HSP70 analizowano statystycznie stosując nieparametryczny test Kruskala-Wallisa przy poziomie istotności $p < 0,05$. Unikalne i powszechne ASV przedstawiono na diagramie Venna. β-różnorodność mikrobiomów jelitowych przedstawiono stosując analizę głównych współrzędnych (PCoA) z miarą odległości Bray-Curtis'a. Analizę statystyczną liczebności poszczególnych taksonów w mikrobiomie jelitowym przeprowadzono stosując jednoczynnikowy test ANOVA

z testem post-hoc Ducana przy poziomie istotności $p < 0,05$ (P1) lub nieparametryczny test Kruskala-Wallisa przy poziomie istotności $p < 0,05$ (P2, P3).

4. Wyniki

4.1. Wskaźniki hodowlane badanych ryb

Istotnie najwyższe wartości wskaźników hodowanych po okresie wzbogaconego żywienia ryb zaobserwowano w grupach badawczych, gdzie osobniki doświadczalne karmiono paszą wzbogaconą maślanem sodu, β-glukanem oraz witaminami ($p < 0,05$). Grupa kontrolna (niesuplementowana) przeważnie charakteryzowała się najniższymi wartościami wskaźników hodowlanych (Tab. 3).

Tabela 3. Wskaźniki hodowlane (średnia ± SD) suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus*), hybrydy jesiotrów (*A. gueldenstaedtii*♀ × *A. baerii*♂) oraz siei (*Coregonus maraena*) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3, FQV4) wobec grup kontrolnych (C, niesuplementowanych).

Sum afrykański (*Clarias gariepinus*)					
Wskaźniki hodowlane	**C**	**FQV1**	**FQV2***	**FQV3***	**FQV4***
I_W (g)			0,48 ± 0,17		
I_L (cm)			3,89 ± 0,45		
F_W (g)	8,10 ± 2,26^{d}	17,13 ± 6,17^{a}	12,68 ± 3,97^{c}	16,63 ± 5,05^{ab}	13,60 ± 3,77^{bc}
F_L (cm)	10,33 ±1,00^{d}	12,44 ± 1,32^{a}	11,28 ±1,07^{c}	12,25 ± 1,24^{ab}	11,52 ± 1,05^{bc}
WG (g)	7,62 ± 2,26^{d}	16,65 ± 6,17^{a}	12,20 ± 3,97^{c}	16,15 ± 5,05^{ab}	13,12 ± 3,77^{bc}
LG (cm)	6,23 ± 1,00^{d}	8,74 ± 1,32^{a}	7,59 ± 1,07^{c}	8,62 ± 1,24^{ab}	7,88 ± 1,05^{bc}
SGR (%/dzień)	4,70 ± 0,33^{c}	5,37 ± 0,33^{a}	5,07 ± 0,34^{c}	5,37 ± 0,33^{ab}	5,15 ± 0,29^{bc}
K (g/ cm^3)	0,76 ± 0,01^{b}	0,81 ± 0,01^{ab}	0,80 ± 0,01^{ab}	0,84 ± 0,03^{a}	0,82 ± 0,02^{ab}
SR (%)	80,00 ± 8,00	87,30 ± 4,60	89,30 ± 3,10	90,70 ± 4,20	90,70 ± 5,00
CF (%)	8,00 ± 5,30^{a}	0	1,30 ± 1,20^{b}	2,00 ± 0,00^{b}	0

Hybryda jesiotrów (*A. gueldenstaedtii*♀ × *A. baerii*♂)				
Wskaźniki hodowlane	**C**	**FQV1**	**FQV2**	**FQV3**
I_W (g)		8,56 ± 1,50		
I_L (cm)		12,50 ± 0,68		

F_W (g)	49,63 ± 7,53^{b}	51,68 ± 5,23^{ab}	54,14 ± 11,16^{a}	47,20 ± 8,27^{b}
F_L (cm)	22,37 ± 1,15^{ab}	22,55 ± 0,95^{ab}	22,91 ± 1,35^{a}	22,05 ± 1,04^{b}
WG (g)	40,62 ± 5,64^{b}	44,04 ± 4,67^{ab}	47,24 ± 10,54^{a}	39,66 ± 8,68^{b}
LG (cm)	9,89 ± 0,95^{ab}	10,21 ± 0,88^{ab}	10,57 ± 1,31^{a}	9,76 ± 0,98^{b}
SGR (%/dzień)	4,56 ± 0,52^{ab}	4,71 ± 0,34^{ab}	4,82 ± 0,67^{a}	4,38 ± 0,57^{b}
K (g/ cm^3)	0,44 ± 0,03	0,45 ± 0,03	0,45 ± 0,02	0,43 ± 0,05
SR (%)	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	97,2 ± 4,8

Sieja (*Coregonus maraena*)				
Wskaźniki hodowlane	**C**	**FQV1**	**FQV2**	**FQV3**
I_W (g)	0,14 ± 0,05			
I_L (cm)	2,62 ± 0,38			
F_W (g)	1,08 ± 0,48^{b}	1,55 ± 0,39^{a}	1,60 ± 0,37^{a}	1,69 ± 0,54^{a}
F_L (cm)	5,35 ± 0,68^{b}	6,10 ± 0,44^{a}	6,21 ± 0,41^{a}	6,22 ± 0,65^{a}
WG (g)	0,94 ± 0,48^{b}	1,41 ± 0,39^{a}	1,46 ± 0,37^{a}	1,55 ± 0,54^{a}
LG (cm)	2,73 ± 0,68^{b}	3,48 ± 0,44^{a}	3,59 ± 0,4^{a}	3,60 ± 0,65^{a}
SGR (%/dzień)	6,45 ± 1,34^{b}	7,82 ± 0,84^{a}	7,95 ± 0,74^{a}	8,03 ± 1,17^{a}
K (g/ cm^3)	0,67 ± 0,06	0,67 ± 0,04	0,66 ± 0,06	0,68 ± 0,04
SR (%)	50,00 ± 2,83^{b}	76,22 ± 2,34^{a}	74,67 ± 5,03 ^{a}	79,78 ± 8,39^{a}

* Oznaczone w niniejszej tabeli grupy FQV2, FQV3, FQV4 w publikacji Arciuch-Rutkowska i in. (2024) (P1) odpowiadają grupom FQV4, FQV2, FQV3 odpowiednio.

I_W – masa początkowa, I_L – długość początkowa, F_W – masa końcowa, F_L – długość końcowa, WG – przyrost masy, LG – przyrost długości, SGR – specyficzny przyrost masy, K – współczynnik kondycji, SR – współczynnik przeżywalności, CF – współczynnik kanibalizmu.

Dane oznaczone różnymi indeksami literowymi w danym wierszu wykazują statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$).

4.1.1. Sum afrykański

Grupa FQV1 charakteryzowała się statystycznie najwyższymi wartościami wskaźników hodowlanych takich jak WG, LG, SGR w porównaniu do pozostałych grup suplementowanych oraz grupy kontrolnej ($p < 0,05$). Najwyższą wartość K określono

w grupie FQV3 ($p < 0,05$). Ponadto zastosowana suplementacja diety suma afrykańskiego wywołała istotne obniżenie wartości współczynnika CF w grupie FQV1 i FQV4 do 0, natomiast w grupie FQV2 do 1,3%, a w grupie FQV3 do 2,0% ($p < 0,05$) (Tab. 4).

4.1.2. Hybryda jesiotrów

Po okresie wzbogaconego żywienia hybrydy jesiotrów grupa FQV2 charakteryzowała się istotnie najwyższymi wartościami wskaźników hodowlanych takich jak WG, LG i SGR ($p < 0,05$) w porównaniu do pozostałych grup. Grupa FQV3 oraz grupa kontrolna wykazywały najniższe wartości powyższych wskaźników ($p < 0,05$). Współczynnik kondycji w grupie FQV2 przyjął najwyższą wartość, jednak nie wykazano istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). SR we wszystkich grupach był równy bądź bliski 100% (Tab. 4).

4.1.3. Sieja

Po zakończeniu wzbogaconego żywienia, ryby z grup suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3) charakteryzowały się istotnie wyższymi wartościami wskaźników hodowlanych takich jak WG, LG, SGR i SR w porównaniu do ryb z grupy kontrolnej ($p < 0,05$). Przy czym grupa FQV3 wykazywała najwyższe ich wartości. Ponadto współczynnik przeżywalności w grupach badawczych był średnio o około 27% wyższy niż w grupie kontrolnej ($p < 0,05$) (Tab. 4).

4.2. Mikrobiom jelitowy

4.2.1. Wskaźniki α- i β-różnorodności badanych mikrobiomów jelitowych

Na podstawie uzyskanych danych bioinformatycznych określono indeksy α-różnorodności (Shannon'a, Simpson'a oraz Chao-1) badanych mikrobiomów jelitowych po okresie wzbogaconego żywienia. Ryby z grup suplementowanych przeważnie charakteryzowały się wyższymi wartościami indeksów α-różnorodności w porównaniu do odpowiadających im ryb z grup kontrolnych (Tab. 4). Ponadto po okresie wzbogaconego żywienia każdy z gatunków wykazywał inną liczbą unikalnych oraz powszechnych ASV określających bogactwo gatunkowe.

Tabela 4. Indeksy α-różnorodności (średnia ± SD) charakteryzujące mikrobiom jelitowy narybku suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus*), hybrydy jesiotrów (*A. gueldenstaedtii*♀ × *A. baerii*♂) oraz siei (*Coregonus maraena*) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3, FQV4) wobec grup kontrolnych (C, niesuplementowanych).

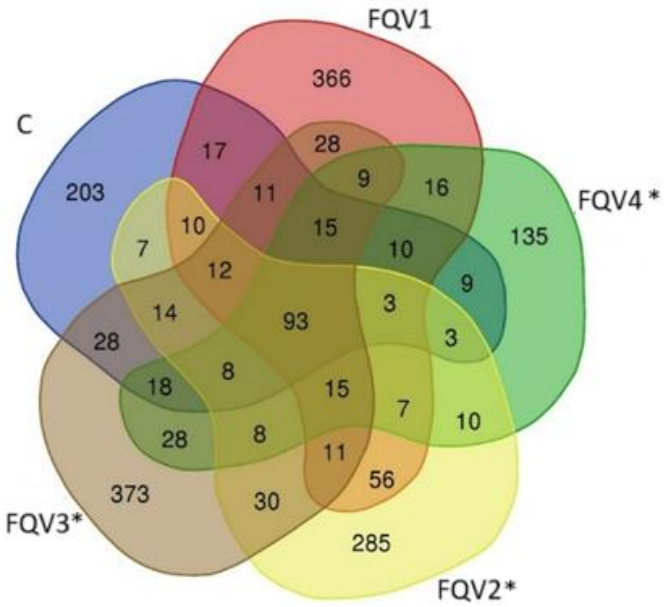
Gatunki ryb	Wariant suplementacji	Indeksy α-różnorodności		
		Shannon	Simpson	Chao-1
Sum afrykański (*Clarias gariepinus*)	C	3,04 ± 0,78	0,84 ± 0,15	161,33 ± 52,20
	FQV1	2,97 ± 0,56	0,84 ± 0,15	195,33 ± 58,62
	FQV2*	2,01 ± 0,78	0,60 ± 0,14	225,50 ± 100,76
	FQV3*	3,24 ± 0,87	0,86 ± 0,14	214,67 ± 87,81
	FQV4*	2,82 ± 0,66	0,80 ± 0,01	138,33 ± 51,73
Hybryda jesiotrów (*A. gueldenstaedtii*♀ × *A. baerii*♂)	C	1,79 ± 0,64	0,63 ± 0,15	179,20 ± 87,19
	FQV1	2,31 ± 0,40	0,75 ± 0,09	254,20 ± 46,95
	FQV2	2,19 ± 0,77	0,69 ± 0,18	167,40 ± 74,26
	FQV3	1,97 ± 0,52	0,69 ± 0,13	159,80 ± 80,29
Sieja (*Coregonus maraena*)	C	4,13 ± 0,30	0,95 ± 0,04	517,17 ± 68,62
	FQV1	4,31 ± 0,33	0,95 ± 0,02	548,30 ± 73,03
	FQV2	4,35 ± 0,41	0,96 ± 0,02	480,08 ± 83,26
	FQV3	4,50 ± 0,14	0,97 ± 0,01	627,05 ± 60,37

* Oznaczone w niniejszej tabeli grupy FQV2, FQV3, FQV4 w publikacji Arciuch-Rutkowska i in. (2024) (P1) odpowiadają grupom FQV4, FQV2, FQV3 odpowiednio.

4.2.1.1. Sum afrykański

Mikrobiomy jelitowe sumów afrykańskich w grupie FQV3 charakteryzowały się najwyższymi wartościami indeksów α-różnorodności takimi jak indeks Shanonn'a oraz indeks Simpson'a, w porównaniu do pozostałych grup, odpowiednio 3,24 ± 0,87 (indeks Shannon'a) oraz 0,86 ± 0,14 (indeks Simpson'a). Grupa FQV2 wykazywała najniższe wartości wyżej wymienionych indeksów – 2,01 ± 0,78 (indeks Shannon'a) oraz 0,60 ± 0,14 (indeks Simpsona). Najwyższą wartość indeksu Chao-1 świadczącego o bogactwie taksonów mikrobiomu określono w grupie FQV2 (225,50 ± 100,76 taksonów) oraz FQV3 (214,67 ± 87,81 taksonów), natomiast najniższą w grupie FQV4 (138,33 ± 51,73) oraz w grupie kontrolnej (161,33 ± 52,20 taksonów) (Tab. 4).

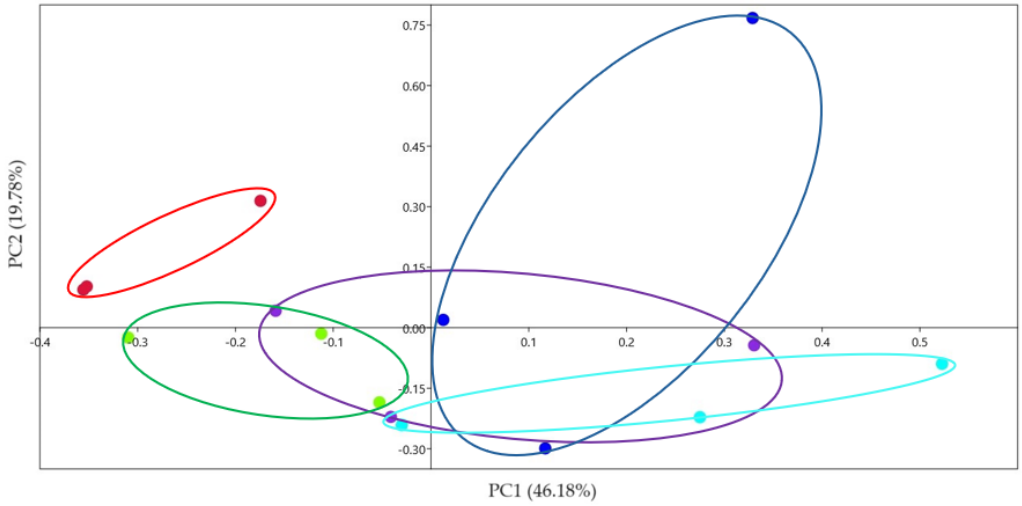
Ryby z grupy FQV3 oraz FQV1 charakteryzowały się największą liczbą unikalnych ASV, odpowiednio 373 oraz 366. Natomiast najniższą wartość unikalnych ASV określono dla ryb z grupy FQV4 (135) oraz kontrolnej (203). Liczba powszechnych, charakterystycznych dla wszystkich grup ASV wynosiła 93 (Rys. 2).



*Oznaczone na rysunku grupy FQV2, FQV3, FQV4 w publikacji Arciuch-Rutkowska i in. (2024) (P1) odpowiadają grupom FQV4, FQV2, FQV3 odpowiednio.

Rysunek 2. Diagram Venna przedstawiający powszechne i unikalne ASVs charakteryzujące mikrobiom jelitowy narybku suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus*) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3, FQV4) wobec grupy kontrolnej (C, niesuplementowanej).

Dwuwymiarowy wykres PCoA ukazuje 66% całkowitej wariancji między poszczególnymi osobnikami. Zmienność wewnątrz grup FQV2 i FQV3 jest znacznie mniejsza niż zmienność w obrębie grup C, FQV1, FQV4 (Rys. 3).

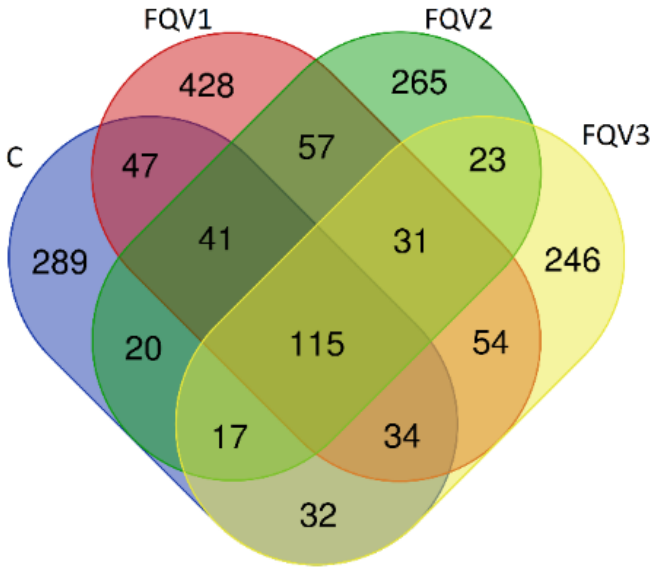


Rysunek 3. Analiza PCoA z miarą odległości Bray-Curtis'a mikrobiomów jelitowych narybku suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus*) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3, FQV4) wobec grupy kontrolnej (C, niesuplementowanej). Punkty tego samego koloru oznaczają osobniki z tej samej grupy (C – jasnoniebieski, FQV1 – granatowy, FQV2 – czerwony, FQV3 – zielony FQV4 – fioletowy).

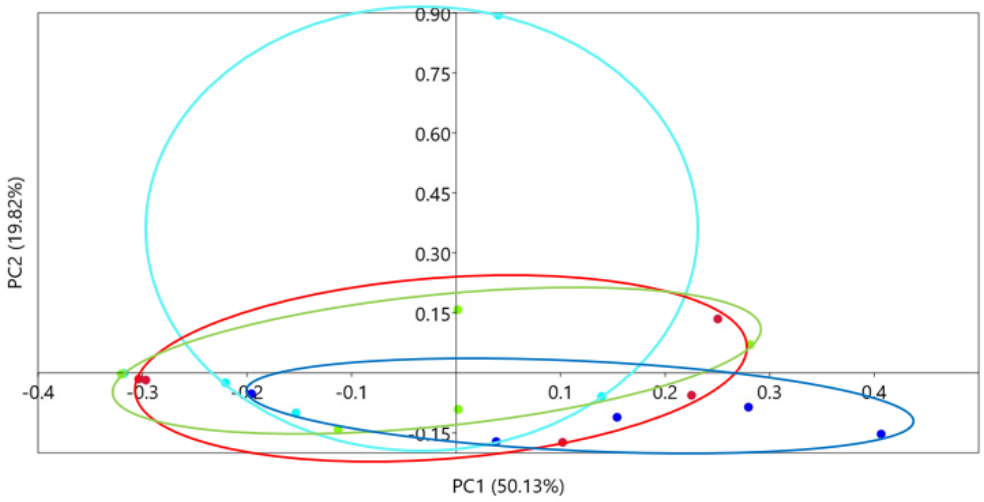
4.2.1.2. Hybryda jesiotrów

Jesiotry w grupie FQV1 charakteryzowały się najwyższą wartością indeksów α-różnorodności opisujących mikrobiomy jelitowe – 2,31 ± 0,40 (indeks Shannon'a) i 0,75 ± 0,09 (indeks Simpson'a) w porównaniu do pozostałych grup. Najniższe wartości powyższych indeksów określono w grupie kontrolnej – 1,79 ± 0,64 (indeks Shannona'a) oraz 0,63 ± 0,15 (indeks Simpson'a). Najwyższe bogactwo taksonów mikrobiomu (Chao-1) oznaczono w grupie FQV1 - 254,20 ± 46,95 taksonów, natomiast najniższe w grupie FQV3 - 159,80 ± 80,29 taksonów (Tab. 4). Ryby z grupy FQV1 charakteryzowały się również najwyższą liczbą unikalnych, charakterystycznych tylko dla tej grupy ASV – 423, natomiast grupa FQV3 wykazywała najniższą liczbę unikalnych ASV – 246. Liczba powszechnych ASV, występujących w każdej grupie to 115 (Rys. 4).

Dwuwymiarowy wykres PCoA ukazuje 70% całkowitej wariancji między poszczególnymi osobnikami. Zmienność wewnątrz grup: FQV1, FQV2, FQV3 jest znacznie mniejsza niż zmienność w obrębie grup kontrolnej. Zmienność między grupami suplementowanymi (FQV1 – FQV3) jest niewielka (Rys. 5).



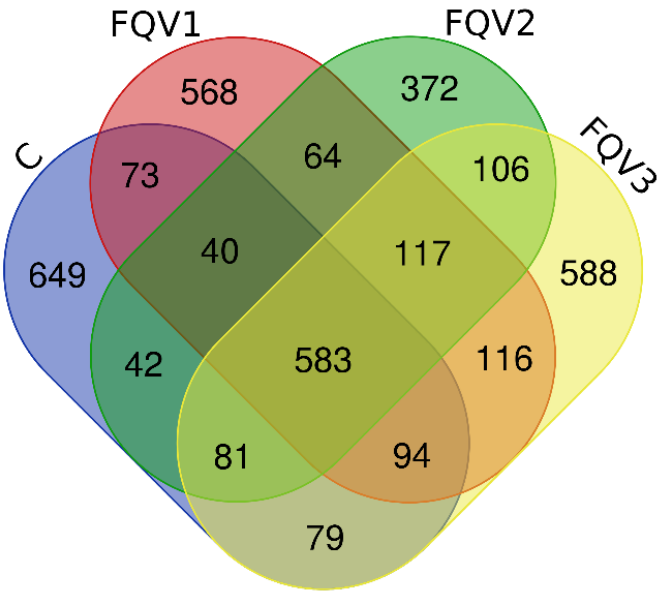
Rysunek 4. Diagram Venna przedstawiający powszechne i unikalne ASVs charakteryzujące mikrobiom narybku hybrydy jesiotrów (*A. gueldenstaedtii*♀ × *A. baerii*♂) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3) wobec grupy kontrolnej (C, niesuplementowanej).



Rysunek 5. Analiza PCoA z miarą odległości Bray-Curtis'a mikrobiomów jelitowych narybku hybrydy jesiotrów (*A. gueldenstaedtii*♀ × *A. baerii*♂) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3) wobec grupy kontrolnej (C, niesuplementowanej). Punkty tego samego koloru oznaczają osobniki z tej samej grupy (C – jasnoniebieski, FQV1 – granatowy, FQV2 – czerwony, FQV3 – zielony).

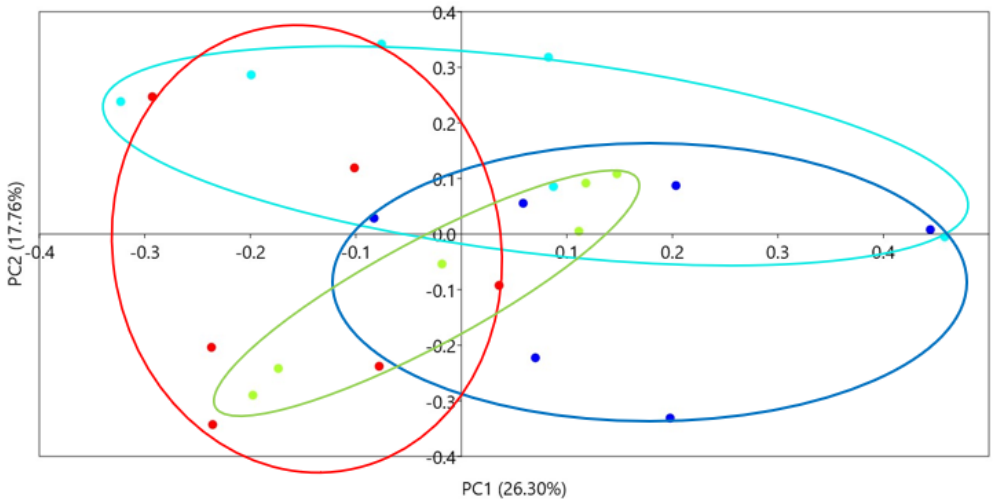
4.2.1.3. Sieja

Po okresie wzbogaconego żywienia mikrobiomy jelitowe ryb w grupie FQV3 wykazywały najwyższą wartość indeksów α-różnorodności w porównaniu do pozostałych grup. Indeks Shanonn'a wynosił 4,50 ± 0,14, natomiast indeks Simpson'a - 0,97 ± 0,01. Grupa kontrolna charakteryzowała się najniższą wartością indeksu Shannon'a - 4,13 ± 0,30. W grupie kontrolnej, FQV1 oraz FQV2 oznaczono podobną wartość indeksu Simpson'a, odpowiednio 0,95 ± 0,04, 0,95 ± 0,02 oraz 0,96 ± 0,02. Mikrobiomy jelitowe ryb w grupie FQV3 charakteryzowały się największym bogactwem taksonów (627,05 ± 60,37 taksonów), natomiast w grupie kontrolnej oznaczono najniższą wartość współczynnika Chao-1 (517,17 ± 68,62) (Tab. 4). W grupie kontrolnej oraz FQV3 wykazano najwyższą liczbę charakterystycznych ASV, odpowiednio, C – 649 oraz FQV3 – 588. Najmniej unikalnych ASV oznaczono w grupie FQV3 – 372. Liczba powszechnych ASV, obecnych we wszystkich grupach badanych to 583 (Rys. 6).



Rysunek 6. Diagram Venna przedstawiający powszechne i unikalne ASVs charakteryzujące mikrobiom narybku siei (*Coregonus maraena*) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3) wobec grupy kontrolnej (C, niesuplementowanej).

Dwuwymiarowy wykres PCoA ukazuje 44% całkowitej wariancji między poszczególnymi osobnikami. Zmienność wewnątrz grupy FQV3 jest znacznie mniejsza niż zmienność w obrębie grup: C, FQV1, FQV2. Zmienność między poszczególnymi grupami jest niewielka (Rys. 7).



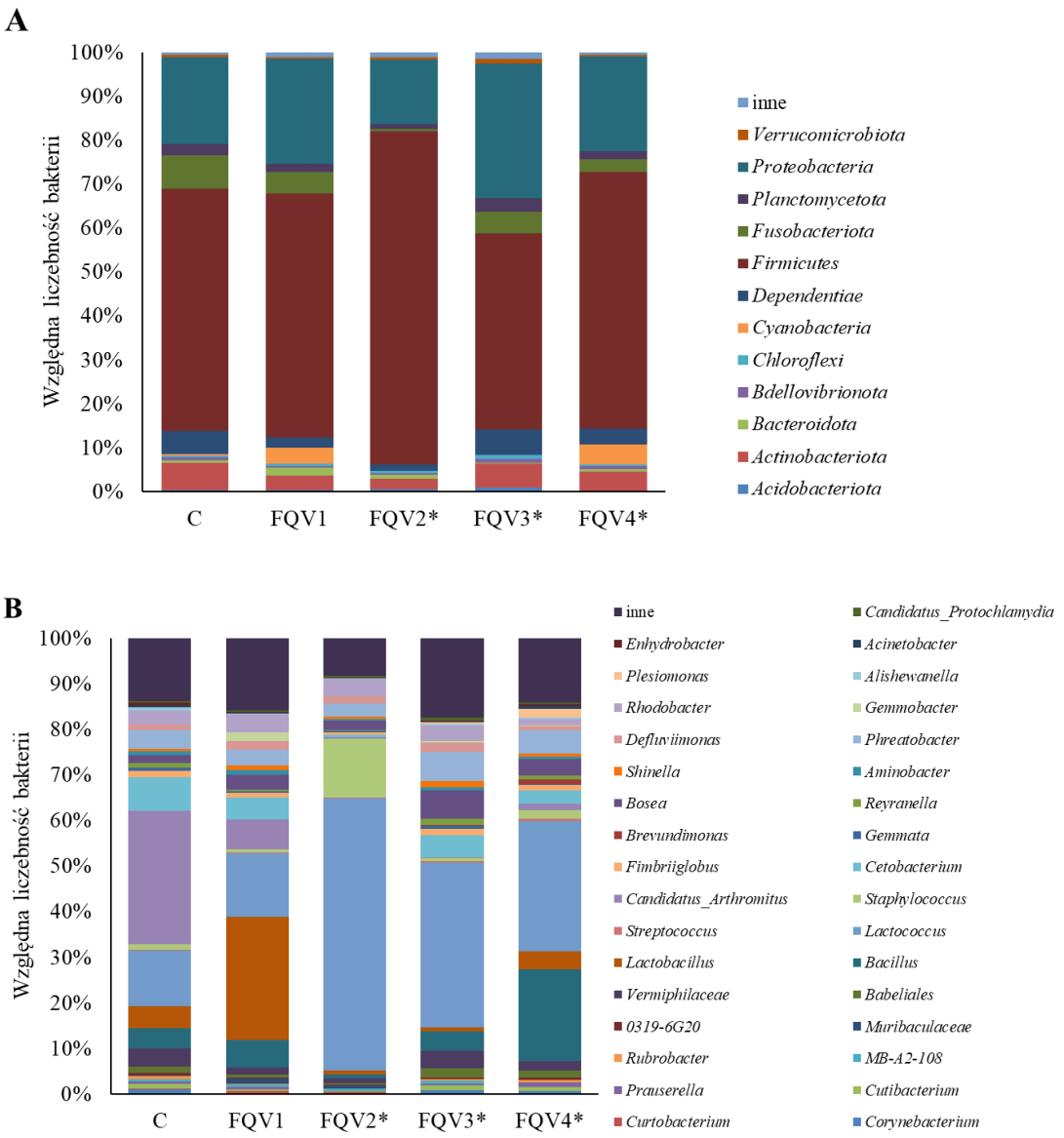
Rysunek 7. Analiza PCoA z miarą odległości Bray-Curtis'a mikrobiomów jelitowych narybku siei (*Coregonus maraena*) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3) wobec grupy kontrolnej (C, niesuplementowanej). Punkty tego samego koloru oznaczają osobniki z tej samej grupy (C – jasnoniebieski, FQV1 – granatowy, FQV2 – czerwony, FQV3 – zielony).

4.2.2. Profil mikrobiomów jelitowych badanych ryb

Na podstawie uzyskanych danych określono względną liczebność bakterii jelitowych na poziomie gromady oraz rodzaju w każdej grupie dla każdego badanego gatunku. Wyniki przedstawiono na wykresach słupkowych.

4.2.2.1. Sum afrykański

We wszystkich badanych grupach na poziomie gromady dominowały *Firmicutes*. Grupa FQV2 charakteryzowała się największym ich udziałem (75,76%), natomiast w grupie FQV3 określono najmniejszą liczebność *Firmicutes* (44,52%). We wszystkich grupach określono także *Proteobacteria*, w zakresie od 14,66% (FQV2) do 30,65% (FQV3) oraz *Actinobacteriota, Fusobacteriota, Dependentiae* (Rys. 8A).



*Oznaczone na rysunku grupy FQV2, FQV3, FQV4 w publikacji Arciuch-Rutkowska i in. (2024) (P1) odpowiadają grupom FQV4, FQV2, FQV3 odpowiednio.

Rysunek 8. Średnia względna liczebność bakterii na poziomie gromady (A) oraz rodzaju (B) w mikrobiomie jelitowym narybku suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus*) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3, FQV4) wobec grupy kontrolnej (C, niesuplementowanej).

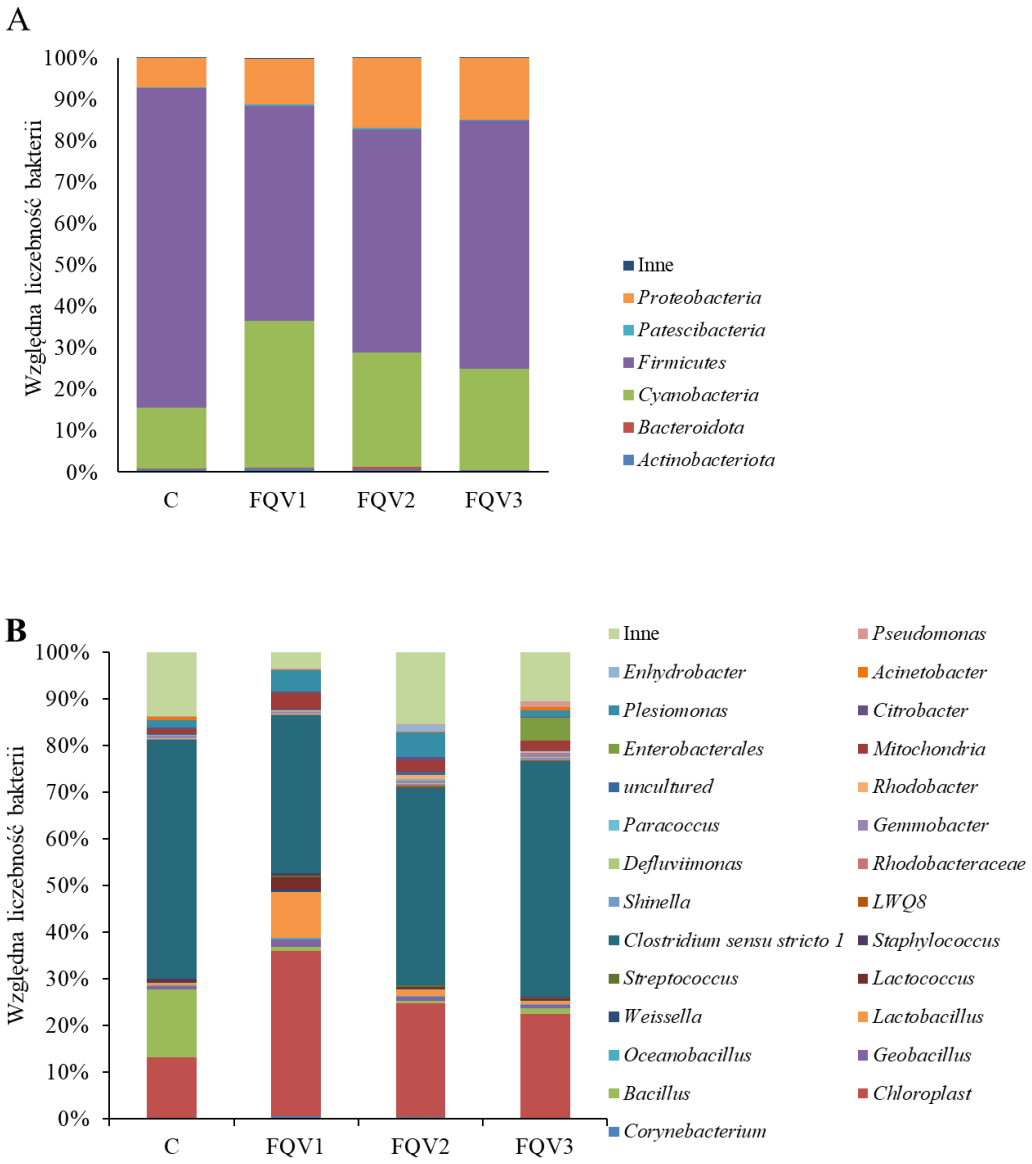
Na poziomie rodzaju określono bakterie *Lactococcus*, które najczęściej występowały w grupie FQV2 (59,66%), zaś najrzadziej w grupie kontrolnej – 12,29%. Rodzaj *Lactobacillus* charakteryzował się największym udziałem w grupie FQV1 – 27,08%, zaś najmniejszym w grupie FQV2 (0,87%). Określono także rodzaj *Bacillus* we wszystkich grupach w zakresie od 0,85% (FQV2) do 20,13% (FQV4).

Zaobserwowano także obecność *Staphylococcus, Cetobacterium* oraz *Vermiphilaceae* we wszystkich grupach, w zakresie od 0,65% (grupa FQV1) do 13,02% (grupa FQV2) dla *Staphylococcus*, od 0,52% (FQV2) do 7,48% (C) dla *Cetobacterium* oraz od 1,12% (FQV2) do 3,96% (C) dla *Vermiphilaceae*. Ponadto w grupie kontrolnej (C) stwierdzono największy odsetek mikroorganizmów z rodzaju *Candidatus Arthromitus* (29,25%). Dodatkowo wykazano również obecność *Bosea*, *Phreatobecter* oraz *Rhodobacter* na poziomie kilku procentw każdej grupie (Rys. 8B).

4.2.2.2. Hybryda jesiotrów

We wszystkich badanych grupach na poziomie gromady dominowały *Firmicutes*, z czego największym ich udziałem charakteryzowała się grupa kontrolna (77,25%). W grupach suplementowanych udział *Firmicutes* wynosił ponad 50%. *Cyanobacteria* oznaczono we wszystkich grupach w zakresie od 14,69% (C) do 35,51% (FQV1). Ponadto we wszystkich grupach określono *Proteobacteria*, w grupie kontrolnej na poziomie około 7%, natomiast w pozostałych grupach na poziomie około 15% (Rys. 9A).

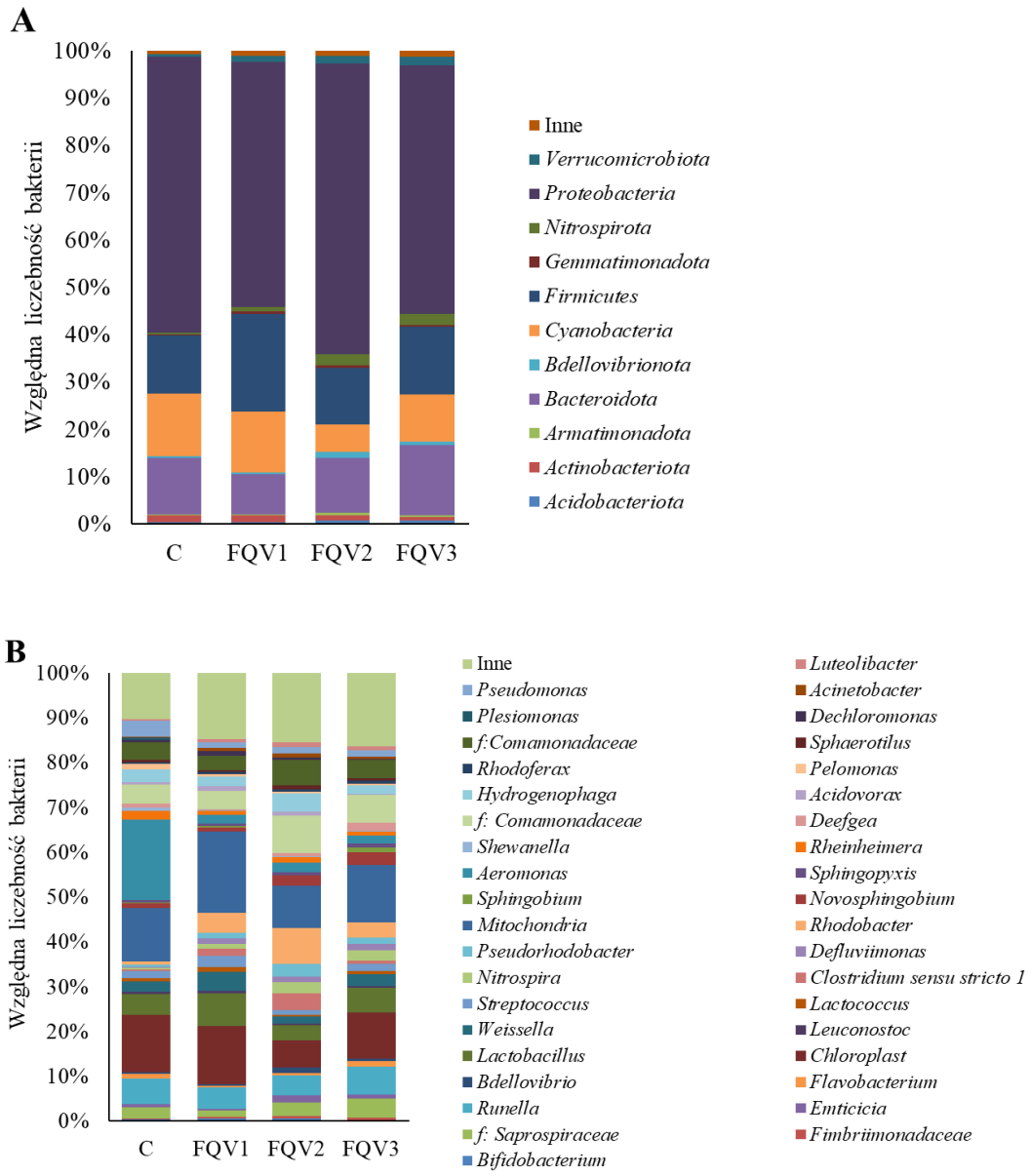
Na poziomie rodzaju licznie występującymi bakteriami we wszystkich grupach były *Clostridium sensu stricto* 1. Największy ich udział określono w grupie kontrolnej – 57,74%, natomiast w grupach badawczych odpowiednio, FQV1 – 33,90%, FQV2 – 48,16%, FQV3 – 55,23%. W grupie kontrolnej określono także duży udział rodzaju *Bacillus* (16,35 %), natomiast w grupach suplementowanych *Bacillus* występował w zakresie od 0,58% (FQV2) do 1,36% (FQV3). Bakterie kwasu mlekowego (LAB) z rodzaju *Lactobacillus* oraz *Lactococcus* najliczniej występowały w grupie FQV1, odpowiednio *Lactobacillus* – 9,82%, *Lactococcus* – 2,52%. Ponadto oznaczono rodzaj *Plesiomonas*, najczęściej występujący grupie FQV2 (5,88%) oraz FQV1 (4,54%). Grupa kontrolna oraz FQV3 charakteryzowały się udziałem *Plesiomonas* na poziomie poniżej 2% (Rys. 9B).



Rysunek 9. Średnia względna liczebność bakterii na poziomie gromady (A) oraz rodzaju (B) w mikrobiomie jelitowym narybku hybrydy jesiotrów (*A. gueldenstaedtii*♀ × *A. baerii*♂) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3) wobec grupy kontrolnej (C, niesuplementowanej).

4.2.2.3. Sieja

Na poziomie gromady wszystkie badane grupy charakteryzowały się największym udziałem *Proteobacteria* w przedziale od 51,80% do 61,23%. Określono także duży odsetek *Firmicutes*, największy w grupie FQV1 (20,50%). Największy udział gromady *Bacteroidota* określono w grupie FQV3 (14,80%), zaś najmniejszy w grupie FQV1 (8,47%). Największym udziałem *Nitrospirota* charakteryzowała się grupa FQV3 (2,42%), natomiast najmniejszym grupa C (0,28%) (Rys. 10A).



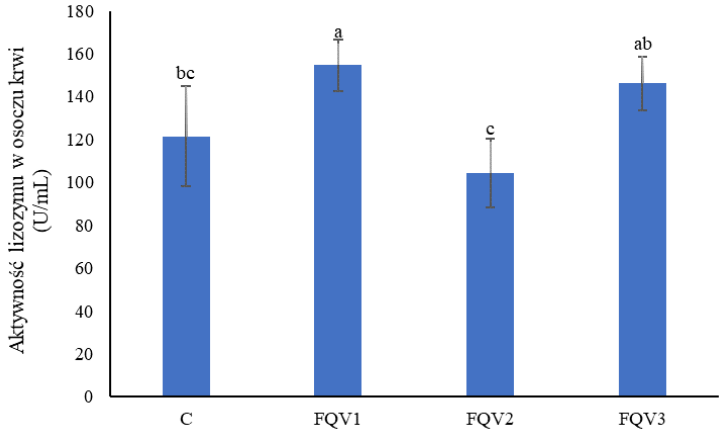
Rysunek 10. Średnia względna liczebność bakterii na poziomie gromady (A) oraz rodzaju (B) w mikrobiomie jelitowym narybku siei (*Coregonus maraena*) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3) wobec grupy kontrolnej (C, niesuplementowanej).

Na poziomie rodzaju określono największą liczebność bakterii z grupy LAB (w tym *Lactobacillus*). Największy udział zaobserwowano w grupie FQV1 (7,15%), a najmniejszy w grupie kontrolnej (4,79%). Ponadto określono także rodzaje *Lactococcus* oraz *Streptococcus* najliczniej występujące w grupie FQV1, odpowiednio 1,01% - *Lactococcus* oraz 2,39% - *Streptococcus*. Rodzaj *Bifidobacterium* w najczęściej występował w grupie FQV1 (0,63%). Grupa kontrola charakteryzowała się istotnie

największym udziałem rodzaju *Aeromonas* – 18,43%, natomiast w grupach suplementowanych oznaczono niewielki ich udział (około 2%). Rodzaje *Shewanella* i *Pseudomonas* istotnie najczęściej występowały w grupie kontrolnej (Rys. 10B).

4.3. Aktywność lizozymu w osoczu krwi hybrydy jesiotrów

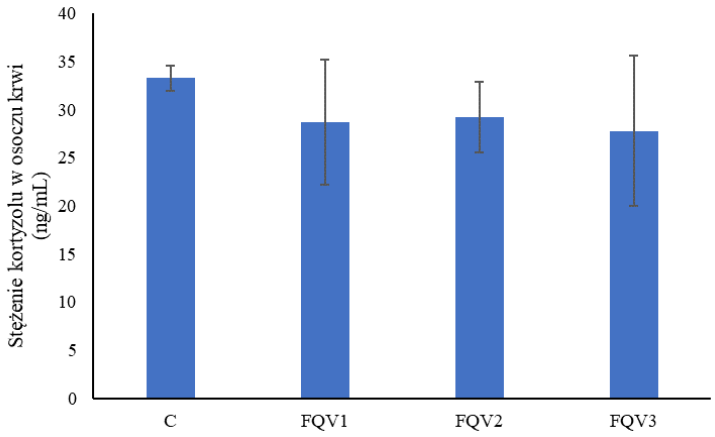
Najwyższą aktywność lizozymu we krwi hybrydy jesiotrów oznaczono w grupie FQV1 (154,64 ± 12,01 U/ ml) oraz FQV3 (146,09 ± 12,33 U/ ml) ($p < 0,05$). Grupa kontrolna oraz FQV2 charakteryzowała się najniższym poziomem aktywności lizozymu, odpowiednio 121,37 ± 23,39 U/ml w grupie kontrolnej oraz 104,39 ± 15,94 U/ ml w grupie FQV2 ($p < 0,05$) (Rys. 11).



Rysunek 11. Aktywność lizozymu (U/ ml) w osoczu krwi (średnia ± SD) narybku hybrydy jesiotrów (*A. gueldenstaedtii*♀ *x A. baerii*♂) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3) wobec grupy kontrolnej (C, niesuplementowanej). Wartości słupków oznaczone różnymi indeksami literowymi różnią się statystycznie ($p < 0,05$).

4.4. Stężenie kortyzolu w osoczu krwi hybrydy jesiotrów

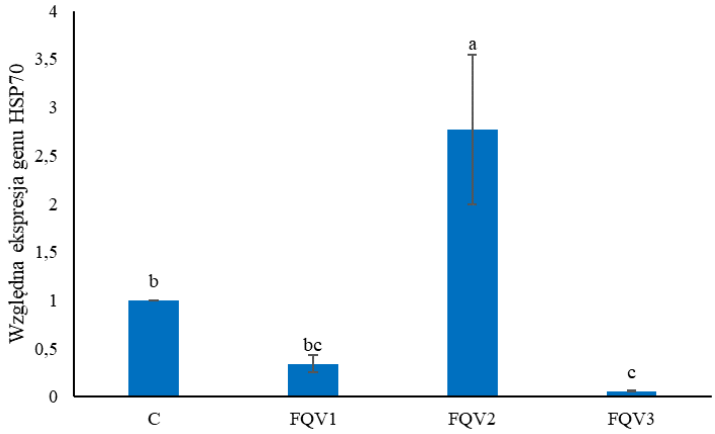
Ryby z grupy kontrolnej charakteryzowały się najwyższym poziomem kortyzolu (33,26 ± 1,30 ng/ ml) w porównaniu do ryb z grup suplementowanych, jednak analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic między grupami ($p > 0,05$). Najniższą koncentrację oznaczono w osoczu krwi ryb z grup FQV3 (27,75 ± 7,80 mg/ ml) oraz FQV1 (28,66 ± 6,50 ng/ ml). Średnie stężenie badanego hormonu w osoczu krwi w grupie FQV2 wynosiło 29,18 ± 3,67 ng/ ml (Rys. 12).



Rysunek 12. Stężenie kortyzolu (ng/ ml) w osoczu krwi (średnia ± SD) narybku hybrydy jesiotrów (*A. gueldenstaedtii*♀ × *A. baerii*♂) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3) wobec grupy kontrolnej (C, niesuplementowanej).

4.5. Ekspresja genu HSP70 w tkance wątrobowej siei

Względną ekspresję genu HSP70 w tkance wątrobowej siei (*Coregonus maraena)* przedstawiono na wykresie (Rys. 13). Zaobserwowano wyraźną regulację ekspresji badanego genu w górę w grupie FQV2 w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0,05$). Grupa FQV3 charakteryzowała się zauważalną regulacją ekspresji genu w dół porównując do kontroli oraz pozostałych grup badawczych ($p < 0,05$).



Rysunek 13. Względny poziom ekspresji genu HSP70 (średnia ± SD) w tkance wątrobowej narybku siei (*Coregonus maraena*) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3) wobec grupy kontrolnej (C, niesuplementowanej). Wartości słupków oznaczone różnymi indeksami literowymi różnią się statystycznie ($p < 0,05$).

5. Dyskusja

Substancje aktywne wykorzystane do przygotowania badanego dodatku paszowego takie jak maślan sodu oraz β-glukan z powodzeniem stosowane są w suplementacji żywienia zwierząt, w tym ryb hodowlanych. Stosuje się je w celu poprawy zarówno wskaźników hodowlanych jak i odporności na stres oraz choroby zakaźne (Meena i in., 2013; El-Sharkawy i in., 2023). W większości badanych i stosowanych produktów, są to preparaty jednoskładnikowe, zawierające tylko maślan sodu lub β-glukan (Lin i in., 2023; Ciji i in., 2023). Zastosowanie dodatku paszowego zawierającego zarówno maślan sodu, β-glukan oraz witaminy (C, A, D3, E i K) powoduje synergiczne, pozytywne oddziaływanie na tempo wzrostu i poprawę wskaźników mających bezpośredni jak i pośredni wpływ na odporność ryb, co potwierdzono w niniejszej rozprawie doktorskiej.

Badania przeprowadzone na wielu gatunkach ryb, w tym na okoniu wielkogębowym (*Micropterus salmoides*), karpiu pruskim (*Carassius auratus var pengze*), tilapii nilowej (*Oreochromis niloticus*), arapaima (*Arapaima gigas*) jesiotrze perskim (*Acipenser persicus*) czy pstrągu tęczowym (*Oncorhynchus mykiss*) dowodzą, że zarówno maślan sodu jak i β-glukan suplementowane wraz z dietą wykazują pozytywne efekty w odniesieniu do wskaźników hodowlanych oraz odpornościowych (El-Naby i in., 2019; Luz i in., 2019; Fang i in., 2021; Chen i in., 2023; Aramli i in., 2015; Khanjani i in., 2021). Optymalne dawki jednoskładnikowych preparatów wahają się od 1,2 do 5,0 g/ kg paszy dla maślanu sodu, natomiast w przypadku β-glukanu w zakresie 1,0 – 2,0 g/ kg paszy. W przypadku badanej kompozycji substancji aktywnych optymalnie najlepsze efekty u wszystkich badanych gatunków ryb osiągnięto stosując wariant suplementacji FQV1 (na 1 kg paszy: 50 mg maślanu sodu, 20 mg β-glukanu, 30 mg witaminy C, 1200 IU witaminy A, 800 IU witaminy D3, 10 mg witaminy E oraz 0,4 mg witaminy K). Biorąc powyższe pod uwagę wywnioskowano, że pozytywne efekty stosowania suplementacji diety ryb pod względem wzrostu oraz poprawy odporności zależą nie tylko od badanego gatunku ale także od składu zastosowanej kompozycji. Ponadto wykazano, że zawartość poszczególnych składników aktywnych może być mniejsza przy zastosowaniu kilku substancji aktywnych łącznie, niż w przypadku preparatów jednoskładnikowych. Jest to możliwe dzięki synergicznemu oddziaływaniu składników dodatku paszowego na organizm ryb.

Połączenie maślanu sodu oraz β-glukanu w preparacie wzbogacającym dietę ryb prowadzi do zwiększenia w jelitach puli krótko-łańcuchowych kwasów tłuszczowych

(SCFA). Cząsteczki te są szczególnie ważne ze względu na pełnioną rolę swoistych mediatorów na linii gospodarz – mikrobiom jelitowy, biorących udział w szeregu procesów metabolicznych i immunologicznych (Martin-Gallausiaux i in., 2021; Arciuch-Rutkowska i in., 2024). W przeciwieństwie do ssaków rola SCFA u ryb nie jest dostatecznie poznana. Jednak badania przeprowadzone na gatunkach ryb: danio pręgowanym (*Danio rerio*), karasiu pospolitym (*Carassius carassius*) czy karpiu pospolitym (*Cyprinus carpio*), dowodzą, że SCFA (głównie kwas masłowy oraz kwas propionowy) biorą udział w procesach immunologicznych poprzez wpływ na ekspresję genów cytokin prozapalnych takich jak TNFα oraz IL-1β. Ponadto pośrednio oddziałują na zwiększenie liczby neutrofili jelitowych (Liu i in., 2014; Shan i in., 2021; Li i in., 2022). Zbadano także wpływ SCFA pochodzących z diety wzbogaconej o maślan sodu oraz β-glukan na wzrost oraz odporność suma afrykańskiego w stadium juwenilnym. Po czasie wzbogaconego żywienia zaobserwowano zarówno poprawę tempa wzrostu ryb suplementowanych, jak i modulację ekspresji genów cytokin prozapalnych, takich jak IL-1β, TNFα i HSP70 (Arciuch-Rutkowska i in., 2024). W prezentowanej pracy również potwierdzono pozytywny wpływ SCFA na modulację ekspresji genów HSP70, które odgrywają znaczącą rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej (Roberts i in., 2010). Badania Baharloei i in. (2021) dowodzą, że indukcja HSP70 u jesiotra perskiego prowadzi do modulacji odpowiedzi immunologicznej i tym samym chroni organizm przed infekcjami bakteryjnymi. W związku z powyższym stymulacja produkcji białek HSP70 przez organizm ryb w odpowiedzi na wzbogacanie diety w źródło SCFA może być alternatywą dla stosowania leków i antybiotyków w akwakulturze.

Udowodniono również, że zastosowana suplementacja maślanem sodu, β-glukanem oraz witaminami reguluje immunologiczną odpowiedź nieswoistą organizmu na przykładzie aktywności lizozymu we krwi hybrydy jesiotrów. W przypadku ryb z grupy FQV1 oraz FQV3 wykazano najwyższy poziom aktywności tego enzymu w porównaniu do grupy FQV2 oraz grupy kontrolnej. Odpowiednie receptory glukanu na powierzchni komórek związanych z odpornością aktywują mechanizmy odpowiedzi immunologicznej i zwiększają wydzielanie lizozymu we krwi (Khanjani i in., 2022). Powyższe tezy potwierdzono także w badaniach na krakaczu żółtym (*Pseudosciaena crocea*), rybie rohu (*Labeo rohita*) oraz doradzie czerwonej (*Pagrus major*), gdzie dodatek β-glukanu w diecie zwiększył aktywność lizozymu we krwi w porównaniu do grup niesuplementowanych (Misra i in., 2006; Ai i in., 2007; Dawood i in., 2017). Inni autorzy sugerują również, że β-glukan w diecie ryb przyczynia się do obniżenia poziomu

kortyzolu we krwi nawet w trakcie infekcji bakteryjnej *Aeromonas hydrophila* oraz warunkach stresowych (Voloski i in., 2019; Dawood i in., 2020d; Lopes i in., 2022). W niniejszym badaniu również zaobserwowano obniżenie poziomu kortyzolu we krwi hybrydy jesiotrów w porównaniu do grupy niesuplementowanej, jednak nie były to statystycznie istotne różnice.

Istotnym czynnikiem wpływających na funkcjonowanie organizmu zwierząt, w tym ryb jest mikrobiom jelitowy. Pełni on ważną rolę w budowaniu odporności organizmu na infekcje bakteryjne i wirusowe oraz inne choroby (Johny i in., 2021). Mikrobiom jelitowy ryb w porównaniu do ssaków jest wciąż niedostatecznie poznany. Szczegółowe określenie zależności między gospodarzem, a jego mikrobiomem pozwoliłoby na rozwiązanie problemów stojących przed akwakulturą takich jak choroby metaboliczne ryb czy nagminne stosowanie leków i antybiotyków (Kim i in., 2021). Badania, które mają na celu szczegółowe poznanie relacji i kooperacji wewnątrz struktury mikrobiomu jelitowego mogą przyczynić się do stworzenia produktów wspomagających jego funkcjonowanie oraz całego organizmu ryb (Luan i in., 2023). Ważnym aspektem mikrobiomu jelitowego jest jego różnorodność gatunkowa, która wpływa na odporność organizmu przeciwko patogennym drobnoustrojom (Wah-Suárez i in., 2022; Li i in., 2022; Hitch i in., 2022). Duża bioróżnorodność mikrobiomu jelitowego u łososia atlantyckiego (*Salmo salar L.*) sprzyja interakcji poszczególnych grup mikroorganizmów w trakcie stanu zapalnego organizmu i umożliwia jego zwalczanie (Bozzi i in., 2021). Z tego powodu istotne jest, aby poprzez odpowiednią suplementację diety wpływać również na rozwój bioróżnorodności mikrobiomów jelitowych ryb (Arciuch-Rutkowska i in., 2024). W niniejszej pracy wykazano, że odpowiednio dobrana dawka maślanu sodu, β-glukanu oraz witamin i zastosowanie ich w suplementacji diety badanych ryb wpływają na wzrost bioróżnorodności oraz bogactwo gatunkowe mikrobiomów jelitowych.

Udowodniono, że suplementacja maślanem sodu, β-glukanem oraz witaminami, a w szczególności wariant FQV1 wywołuje pozytywne zmiany w składzie procentowym poszczególnych grup mikroorganizmów badanych mikrobiomów. W każdym przypadku zaobserwowano wzrost liczby bakterii probiotycznych z rodzajów *Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus* oraz *Bifidobacterium* w porównaniu do grup kontrolnych, niesuplementowanych. Powyżej wymienione rodzaje bakterii probiotycznych wypierają ze struktury mikrobiomu jelitowego patogeny poprzez konkurencję o miejsce bytowania oraz składniki odżywcze, a także poprzez wytwarzanie związków hamujących ich rozwój (Torres-Maravilla i in., 2024). Ponadto u ryb z grup kontrolnych wykazano wyższą

liczebnością mikroorganizmów potencjalnie chorobotwórczych takich jak *Candidatus Arthromitus*, *Clostridium sensu stricto* czy *Aeromonas.* Podobne wyniki uzyskano w badaniach nad innymi gatunkami ryb. Dieta ryb wzbogacona o kwasy organiczne i prebiotyki wywołuje zwiększenie liczby bakterii probiotycznych. Badania Tian i in. (2017) dowodzą, że maślan sodu obecny w diecie amura białego (*Ctenopharyngodon idella*) promuje rozwój bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, przy jednoczesnej redukcji bakterii potencjalnie chorobotwórczych takich jak *Aeromonas* i *Escherichia coli*. Badania przeprowadzone przez Carballo i in. (2019) na soli senegalskiej (*Solea senegalensis*) z żywieniem wzbogaconym o β-glukan również potwierdzają dobroczynny wpływ tego prebiotyku na profil mikrobiomu jelitowego. Stwierdzono, że β-glukan pozyskiwany z drożdży wpływa na ograniczenie liczebności bakterii chorobotwórczych z rodzaju *Vibrio sp*.

W trakcie suplementacji diety ryb jest ważny jest także odpowiedni okres podawania wzbogaconej diety. Jest to istotne ze względów ekonomicznych aby osiągnąć oczekiwany efekt w jak najkrótszym czasie. Na podstawie analizy literatury przedmiotowej określono, że miesięczny okres suplementacji we wczesnych stadiach rozwojowych jest wystarczający aby odnotować istotne zmiany zarówno pod względem wskaźników hodowlanych jak i poprawy odporności. Okazuje się, że już 14-dniowe żywienie piranii pacu (*Piaractus mesopotamicus*) paszą wzbogaconą β-glukanem spowodowało obniżenie poziomu kortyzolu we krwi zarówno przed jak i po indukowanej infekcji bakteryjnej, co potwierdza immunomodulacyjne działanie β-glukanu w krótkim czasie podawania (Lopes i in., 2022). Badania żywieniowe prowadzone na sumie afrykańskim ze wzbogaceniem diety o pyłek pszczeli także potwierdzają, że 21-dniowa suplementacja wywołuje pozytywne zmiany w mikrobiomie jelitowym ryb, powodując przyspieszenie wzrostu oraz zwiększenie liczby bakterii probiotycznych w porównaniu do mikrobiomów jelitowych ryb z grup niesuplementowanych (Nowosad i in., 2023). Czterotygodniowy podchów dorsza (*Epinephelus coioides*) z żywieniem wzbogaconym o *Saccharomyces cerevisiae* (zawierającym β-glukan w ścianie komórkowej) wywołał znaczący przyrost masy ryb oraz zwiększenie aktywności lizozymu we krwi porównując do grupy kontrolnej niesuplementowanej (Chiu i in., 2010). W przypadku labraksa cętkowanego (*Lateolabrax maculatus*) również odnotowano pozytywne efekty 30-dniowego wzbogaconego żywienia o szczepy probiotyczne. Po założonym okresie zaobserwowano poprawę wskaźników wzrostowych oraz odpornościowych takich jak zwiększenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy oraz lizozymu we krwi

(Fu i in., 2023). W prezentowanych badaniach potwierdzono, że 30-dniowy okres wzbogaconego żywienia we wczesnym stadium rozwojowym ryb jest wystarczający, aby zaobserwować istotne zmiany, zarówno w zakresie wzrostu jaki jak i odporności. Jest to szczególnie przydatne pod względem komercjalizacji opracowanego preparatu, który dzięki miesięcznemu zastosowaniu pozwala na uzyskanie dobrej jakości materiał do dalszej komercyjnej hodowli ryb.

6. Podsumowanie

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej dostarczają wiedzy na temat synergicznego oddziaływania kompozycji maślanu sodu w połączeniu z β-glukanem i witaminami na wybrane parametry wzrostowo-rozwojowe oraz odpornościowe na przykładzie trzech gatunków ryb hodowlanych. Uzyskane dane pozwalają na określenie, który wariant suplementacji diety wywołał najlepsze efekty u badanych gatunków (Tab. 5).

Tabela 5. Podsumowanie uzyskanych wyników badań oraz określenie najbardziej korzystnych wariantów suplementacji diety pod kątem wybranych parametrów u wybranych gatunków ryb.

Cecha	**Sum afrykański (*Clarias gariepinus*)**	**Hybryda jesiotrów (*A. gueldenstaedtii*♀ × *A. baerii*♂)**	**Sieja (*Coregonus maraena*)**
Poprawa wskaźników hodowlanych	FQV1 (50NaB, 20βG)	FQV2 (150NaB, 20βG)	FQV3 (50NaB, 60βG)
Wzrost różnorodności i bogactwa taksonów mikrobiomu jelitowego	FQV3* (50NaB, 60βG)	FQV1 (50NaB, 20βG)	FQV3 (50NaB, 60βG)
Wzrost liczby bakterii probiotycznych	FQV1 (50NaB, 20βG) FQV2* (150NaB, 20βG)	FQV1 (50NaB, 20βG)	FQV1 (50NaB, 20βG)
Redukcja liczby bakterii potencjalnie chorobotwórczych	FQV1 (50NaB, 20βG) FQV2* (150NaB, 20βG) FQV3* (50NaB, 60βG) FQV4* (150NaB, 60βG)	FQV1 (50NaB, 20βG)	FQV1 (50NaB, 20βG) FQV2 (150NaB, 20βG) FQV3 (50NaB, 60βG)
Wzrost aktywności lizozymu	NB	FQV1 (50NaB, 20βG)	NB
Obniżenie stężenia kortyzolu	NB	FQV1 (50NaB, 20βG) FQV2 (150NaB, 20βG) FQV3 (50NaB, 60βG)	NB

Ekspresja genów HSP70	NB	NB	FQV2 (150NaB, 20βG)

*Oznaczone na rysunku grupy FQV2, FQV3, FQV4 w publikacji Arciuch-Rutkowska i in. (2024) (P1) odpowiadają grupom FQV4, FQV2, FQV3 odpowiednio.

NaB – maślan sodu; βG – β-glukan, NB – nie badano.

Wartości liczbowe w tabeli oznaczają mg związku aktywnego/ kg paszy.

Zawartość witamin jest stała dla wszystkich wariantów suplementacji (witamina C – 30 mg/ kg, witamina A – 1200 IU/ kg, witamina D3 – 800 IU/ kg, witamina E – 10 mg/ kg, witamina K – 0,4 mg/ kg).

Przedstawione dane sugerują, że suplementacja diety ryb maślanem sodu, β-glukanem oraz witaminami wymaga indywidualnego podejścia dla każdego gatunku. Jednakże najbardziej uniwersalnym wariantem wzbogacenia paszy podstawowej jest wariant FQV1, gdzie zawartość poszczególnych substancji aktywnych w przeliczeniu na 1 kg paszy wynosi: 50 mg maślanu sodu, 20 mg β-glukanu, 30 mg witaminy C, 1200 IU witaminy A, 800 IU witaminy D3, 10 mg witaminy E oraz 0,4 mg witaminy K. Powyższa suplementacja diety wpłynęła na poprawę parametrów hodowlanych wywołując przyspieszenie tempa wzrostu badanych gatunków ryb. Ponadto dodatek do paszy w postaci mieszanki paszowej uzupełniającej FQV1 wywołał pozytywne zmiany w mikrobiomach jelitowych badanych gatunków ryb. W każdym przypadku zaobserwowano wzrost liczby bakterii probiotycznych z rodzajów: *Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus* czy *Bifidobacterium*, przy jednoczesnej redukcji bakterii potencjalnie chorobotwórczych takich jak: *Candidatus Arthromitus*, *Clostridium sensu stricto* czy *Aeromonas*. Dodatkowo suplementacja FQV1 w większości przypadków pozytywnie wpłynęła zarówno na obniżenie poziomu stresu hybrydy jesiotrów oraz siei jak i poprawę mechanizmów odporności nieswoistej jesiotrów. W związku z powyższym wariant FQV1 wybrano jako najbardziej korzystną suplementację diety ryb hodowanych na przykładzie suma afrykańskiego, hybrydy jesiotrów oraz siei.

Profilaktyczne stosowanie w akwakulturze suplementacji FQV1 może przynieść szereg korzyści wpływających zarówno na wydajność jak i opłacalność hodowli. Dodatek do paszy w postaci FQV1 może przyczynić się do redukcji częstotliwości występowania chorób bakteryjnych lub wirusowych w hodowli wywołanych na przykład stresem. Jest to możliwe poprzez wzmocnienie układu immunologicznego ryb. Ponadto wprowadzenie do diety ryb hodowlanych FQV1 może ograniczyć nieuzasadnione stosowanie leków oraz antybiotyków, które wywierają negatywny wpływ zarówno na mikrobiom ryb jak

i środowisko powodując rozwój patogennych bakterii antybiotykoopornych. Dodatkowo suplementacja FQV1 powodując zwiększenie powierzchni chłonnej jelit i efektywniejsze wykorzystanie składników odżywczych przyczynia się do przyspieszenia tempa wzrostu ryb.

Niniejsza rozprawa doktorska poza aspektem wdrożeniowym niesie szereg korzyści dla rozwoju dyscypliny naukowej. Molekularna charakterystyka mikrobiomów jelitowych trzech gatunków ryb posiada dużą wartość naukową. Mikrobiom ryb w porównaniu do innych zwierząt, a zwłaszcza ssaków jest słabo poznany, dlatego też wyniki tej pracy są cennym źródłem informacji do dalszych badań osi mikrobiom jelitowy – gospodarz. Przedstawione badania mogą być dalej kontynuowane poprzez wykonanie między innymi testów obciążeniowych (challange testów) z wykorzystaniem szczepów patogennych ryb po profilaktycznym 30-dniowym stosowaniu preparatu. Reakcja organizmu ryb na obecność drobnoustrojów chorobotwórczych stałaby się cenną informacją do dalszego rozwoju dodatku paszowego w postaci mieszanki paszowej uzupełniającej. Ponadto łączenie FQV1 z innymi substancjami aktywnymi mogłoby wzmocnić działanie immunomodulacyjne oraz promujące wzrost.

7. Wnioski

Zaprezentowane wyniki pozwoliły na zweryfikowanie postawionych hipotez badawczych oraz wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Zastosowanie w żywieniu narybku ryb hodowlanych suplementacji w postaci maślanu sodu w połączeniu z β-glukanem i witaminami istotnie wpływa na przyspieszenie ich tempa wzrostu (H1).
2. Po zastosowaniu suplementacji (maślan sodu + β-glukan + witaminy) zjawisko kanibalizmu powszechne u suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus*) jest istotnie redukowane (H1).
3. W przypadku siei (*Coregonus maraena*) dodatek do pasz w postaci maślanu sodu, β-glukanu oraz witamin znacząco poprawia przeżywalność (H1).
4. Bogactwo taksonów mikrobiomu jelitowego siei (*Coregonus maraena*) jest średnio 3-krotnie większe niż suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus*) i hybrydy jesiotrów (*A. gueldenstaedtii*♀ *x A. baerii*♂) (H2).
5. Suplementacja diety β-glukanem w ilości 60 mg/ kg paszy i maślanem sodu – 20 mg/ kg paszy u suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus*) i siei (*Coregonus maraena*) powoduje zwiększenie różnorodności i bogactwa taksonów mikrobiomu jelitowego (H2).
6. Suplementacja diety hybrydy jesiotrów β-glukanem w ilości 20 mg/ kg oraz maślanem sodu – 50 mg/ kg paszy wywołuje zwiększenie różnorodności oraz bogactwa taksonów mikrobiomu jelitowego (H2).
7. Zastosowana suplementacja diety badanych ryb nie wywołuje ilościowych zmian podstawowych gromad bakterii - *Firmicutes i Proteobacteria* tworzących rdzeń mikrobiomu jelitowego (H2).
8. Wzbogacenie diety ryb o maślan sodu (50 mg/ kg paszy), β-glukan (20 mg/kg paszy) oraz witaminy sprzyja rozwojowi bakterii probiotycznych z rodzajów *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* i *Streptococcus* w jelitach (H2).
9. Zastosowane dodatków paszowych w żywieniu ryb w postaci maślanu sodu w połączeniu z β-glukanem i witaminami ogranicza rozwój bakterii potencjalnie chorobotwórczych takich jak *Candidatus Arthromitus*, *Clostridium sensu stricto* 1 oraz z rodzaju *Aeromonas* (H2).

10. Zwiększenie ilości immunostymulatora (β-glukanu) do 60 mg/ kg paszy w kompozycji suplementacyjnej wywołuje zwiększenie ekspresji genów białek HSP70 odpowiedzialnych za ochronę komórek przed uszkodzeniami (H3).
11. Aktywność lizozymu jako podstawowego mechanizmu wrodzonej odporności nieswoistej ryb zwiększa się istotnie pod wpływem wzbogacenia diety hybrydy jesiotrów w maślan sodu, β-glukan oraz witaminy (H4).

8. Wdrożenie produktu w firmie ChemProf s.c.

Wybrany wariant suplementacji (FQV1), który wykazał optymalnie najlepsze efekty w zakresie poprawy parametrów wzrostowych oraz odpornościowych u trzech badanych gatunków ryb w warunkach laboratoryjnych przekazano do testów w skali przemysłowej. Dodatek paszowy testowano w gospodarstwie rybackim Wąsosze koło Konina, gdzie odnotowano wyraźny spadek śmiertelności oraz przyspieszenie tempa wzrostu jesiotrów po zastosowaniu wzbogaconego żywienia we wczesnym stadium rozwojowym. Dodatek paszowy przetestowano także w skali przemysłowej na rybach akwariowych w gospodarstwie rybackim „Warmia-Fish". Po okresie wzbogaconego żywienia zaobserwowano poprawę odporności ryb, a tym samym obniżenie śmiertelności w hodowli.

Wdrażanemu preparatowi w firmie Chemprof Doradztwo Chemiczne s.c. nadano nazwę – FishQuatro. W celu komercjalizacji produktu stworzona została pierwsza wersja logo oraz opracowano szczegółową formulację technologiczna, która została zweryfikowana na linii produkcyjnej (Rys. 14). Produkt FishQuatro jest płynnym preparatem w postaci emulsji do samodzielnego zastosowania przez hodowców w gospodarstwie. Wdrażany produkt FishQuatro będzie uzupełnieniem portfolio produktów firmy, dzięki czemu firma ChemProf może pozyskać nowych klientów i rozszerzyć swoją działalność.



Rysunek 14. Pierwsza, prototypowa wersja logo produktu FishQuatro (ChemProf, Olsztyn, Polska).

Spis literatury

Abdel-Latif, H.M.R., Abdel-Daim, M.M., Shukry, M., Nowosad, J., Kucharczyk, D. (2022a). Benefits and applications of *Moringa oleifera* as a plant protein source in Aquafeed: A review. *Aquaculture, 547*, 737369.

Abdel-Latif, H.M.R., El-Ashram, S., Yilmaz, S., Naiel, M.A.E., Kari, Z.A., Khalidah, N., Hamid, N.K.A., Dawood, M.A.O., Nowosad, J., Kucharczyk, D. (2022b). The effectiveness of *Arthrospira platensis* and microalgae in relieving stressful conditions affecting finfish and shellfish species: An overview. *Aquaculture Reports, 24*, 101135.

Abdel-Latif, H.M.R., Dawood, M.A.O., Alagawany, M., Faggio, C., Nowosad, J., Kucharczyk, D. (2022c). Health benefits and potential applications of fucoidan (FCD) extracted from brown seaweeds in aquaculture: An updated review. *Fish and Shellfish Immunology, 122*, s. 115–130.

Abdel-Latif, H.M.R., Abdel-Tawwab, M., Dawood, M.A.O., Menanteau-Ledouble, S., El-Matbouli, M. (2020). Benefits of Dietary Butyric Acid, Sodium Butyrate, and Their Protected Forms in Aquafeeds: A Review. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, *28*(4), s. 421–448.

Abdel-Latif, H.M.R., Shukry, M., Saad, M.F., Mohamed, N.A., Nowosad, J.; Kucharczyk, D. (2021). Effects of GnRHa and hCG with or without dopamine receptor antagonists on the spawning efficiency of African catfish (*Clarias gariepinus*) reared in hatchery conditions. *Animal Reproduction Science, 31*, 106798.

Abdel-Mobdy, H.E., Abdel-Aal, H.A., Souzan, S.L., Nassar, A.G. (2021). Nutritional Value of African Catfish (*Clarias gariepinus*) Meat. *Asian Journal of Applied Chemistry Research, 8,* s. 31–39.

Abdel-Mohsen, H.H., Wassef, E.A., El-Bermawy, N.M., Abdel-Meguid, N.E., Saleh, N.E., Barakat, K.M. Shaltout, O.E. (2018). Advantageous effects of dietary butyrate on growth, immunity response, intestinal microbiota and histomorphology of European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) fry. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries***,** *22*, s. 93–110.

Abutalb, A., Hussein, M., Amin, A., Abdelghny, M. (2022). Effect of different feeding times on growth performance and blood parameters of African catfish (*Clarias*

gariepinus) under different stocking densities. *Al-Azhar Journal of Agricultural Research, 48*(1), s. 153-167.

Adeyemi-Doro, O., Iyiola, A. (2018). Vitamin C: An Important Nutritional Factor in Fish Diets. *Journal of Agriculture and Ecology Research International, 16*, s. 1-7.

Ahmad, A., Anjum, F.M., Zahoor, T., Nawaz, H., Dilshad, S.M. (2012). Beta Glucan: A Valuable Functional Ingredient in Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition 52*(3), s. 201–212.

Ai, Q., Mai, K., Zhang, L., Tan, B., Zhang, W., Xu, W., Li, H. (2007). Effects of dietary β-1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish and Shellfish Immunology, 22*, s. 394‑402.

Altmann, S., Korytář, T., Kaczmarzyk, D., Nipkow, M., Kühn, C., Goldammer, T., Rebl, A., (2016). Toll-like receptors in maraena whitefish: Evolutionary relationship among salmonid fishes and patterns of response to *Aeromonas salmonicida*. *Fish and Shellfish Immunology, 54*, s. 391-401.

Aramli, M.S., Kamangar, B., Nazari, R.M. (2015). Effects of dietaryβ-glucan on the growth and innate immune response of juvenile Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. *Fish and Shellfish Immunology, 47*, s. 606–610.

Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Gil, Ł., Czarnik, U., Kucharczyk, D. (2024). Synergistic Effect of Dietary Supplementation with Sodium Butyrate, β-Glucan and Vitamins on Growth Performance, Cortisol Level, Intestinal Microbiome and Expression of Immune-Related Genes in Juvenile African Catfish (*Clarias gariepinus*). *International Journal of Molecular Science, 25*, 4619.

Baharloei, M., Heidari, B., Zamani, H., Ghafouri, H., Hadavi, M. (2021). Effects of heat shock protein inducer on Hsp70 gene expression and immune parameters during *Streptococcus iniae* infection in a Persian sturgeon fry. *Veterinary Research Forum, 12(4)*, s. 473-479.

Balakrishnan, K.N., Ramiah, S.K., Zulkifli, I. (2023). Heat Shock Protein Response to Stress in Poultry: A Review. *Animals, 13*, 317.

Bokulich, N., Kaehler, B., Rideout, J., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G., Caporaso, J. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequenceswith QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome, 6*(1), 90.

Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F. i in. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology, 37*(8), s. 852–857.

Bozzi, D., Rasmussen, J.A., Carøe, C., Sveier, H., Nordøy, K., Gilbert, M.T.P., Limborg, M.T. (2021). Salmon gut microbiota correlates withdisease infection status: Potential for monitoring health in farmed animals. *Animal Microbiome, 3*, 30.

Brevé, N.W.P., Leuven, R.S.E.W., Buijse, A.D., Murk, A.J., Venema, J., Nagelkerke, L.A.J. (2022). The conservation paradox of critically endangered fish species: Trading alien sturgeons versus native sturgeon reintroduction in the Rhine-Meuse river delta. *Science of the Total Environment, 848*, 157641.

Bronzi, P., Rosenthal, H., Gessner, J. (2011). Global sturgeon aquaculture production: an overview. *Journal of Applied Ichthyology, 27*(2), s. 169–175.

Bronzi, P., Chebanov, M., Michaels, J.T. Wei, Q., Rosenthal, H., Gessner, J. (2019). Sturgeon meat and caviar production: Global update 2017. *Journal of Applied Ichthyology, 35*(1), s. 257–266.

Brzuzan, P., Woźny, M., Góra, M., Łuczyński, M.K., Jabłońska A. (2011). Benzo[a]pyrene and cyclopenta[c]phenanthrene suppress expression of p53 in head kidney of rainbow trout. *Environmental Biotechnology, 7*, s. 41-45.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L. i in. (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry, 55*, s. 611–622.

Buwono, I.D., Grandiosa, R., Mulyani, Y., Pratiwy, F.M. (2024). GnRHr, LHr, and Vg gene expression levels and ovarian development of G5 transgenic mutiara female catfish *(Clarias gariepinus*) after exposure photoperiod induction. *Discover Applied Sciences, 6*, 63.

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J., Holmes, S.P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods, 13,* s. 581–583.

Carballo, C., Pinto, P.I.S., Mateus, A.P., Berbel, C., Guerreiro, C.C., Martinez-Blanch, J.F., Codoñer, F.M., Mantecon, L., Power, D.M., Manchado, M. (2019). Yeast β-glucans and microalgal extracts modulate the immune response and gut microbiome in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish and Shellfish Immunology, 92*, s. 31‑39.

Chen, W., Gao, S., Chang, K., Zhao, X., Niu, B. (2023). Dietary sodium butyrate supplementation improves fish growth, intestinal microbiota composition, and liver health in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) fed high-fat diets. *Aquaculture, 564*, 739040.

Cheng, J., Xun, X.G., Kong, Y.F., Wang, S., Yang, Z., Li, Y., Kong, D., Wang, S., Zhang, L., Hu, X. i in. (2016). Hsp70 gene expansions in the scallop Patinopecten yessoensis and their expression regulation after exposure to the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Fish and Shellfish Immunology, 58*, 266–273.

Chiu, C.-H., Cheng, C.-H., Gua, W.-R., Guu, Y.-K., Cheng, W. (2010). Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides. Fish and Shellfish Immunology, 29*, s. 1053–1059.

Ciji, A., Akhtar, M.S. (2021), Stress management in aquaculture: a review of dietary interventions. *Reviews in Aquaculture, 13*, s. 2190-2247.

Ciji, A., Tripathi, P.H., Pandey, A., Akhtar, M.S. (2023). Expression of genes encoding non-specific immunity, anti-oxidative status and aquaporins in β-glucan-fed golden mahseer (*Tor putitora*) juveniles under ammonia stress. *Fish and Shellfish Immunology Reports, 4*, 100100.

Cui, X., Zhang, Q., Zhang, Q., Zhang, Y., Chen, H., Liu, G., Zhu, L. (2022). Research progress of the gut microbiome in hybrid fish. *Microorganisms 10*, 891.

Dawood, M.A.O., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., El Basuini, M.F., Hossain, M.S., Nhu, T.H., Moss, A.S., Dossou, S., Wei, H. (2017). Dietary supplementation

of β-glucan improves growth performance, the innate immune response and stress resistance of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture Nutrition*, *23*, s. 148‑159.

Dawood, M.A.O., Metwally, A.E.-S., El-Sharawy, M.E., Atta, A.M., Elbialy, Z.I., Abdel-Latif, H.M.R., Paray, B.A. (2020a). The role of β-glucan in the growth, intestinal morphometry, and immune-related gene and heat shock protein expressions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under different stocking densities. *Aquaculture, 523*, 735205.

Dawood, M.A.O., Eweedah, N.M., Moustafa, E.M., Shahin, M.G. (2020b). Synbiotic Effects of *Aspergillus oryzae* and β-Glucan on Growth and Oxidative and Immune Responses of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins, 12*(1), s. 172–183.

Dawood, M.A.O., Moustafa, E.M., Elbialy, Z.I., Farrag, F., Lolo, E.E.E., Abdel-Daim, H.A., Abdel- Daim, M.M., Van Doan, H. (2020c). *Lactobacillus plantarum* L-137 and/ or β-glucan impacted the histopathological, antioxidant, immune-related genes and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Aeromonas hydrophila*. *Research in Veterinary Science,130,* s. 212–221.

Dawood, M.A.O., Abdel-Razik, N.I., Gewaily, M.S., Sewilam, H., Paray, B.A., Soliman, A.A., Abdelhiee, E.Y., Aboubakr, M., Doan, H.V., El-Sabagh, M. i in. (2020). β-Glucan improved the immunity, hepato-renal, and histopathology disorders induced by chlorpyrifos in Nile tilapia. *Aquaculture Reports*, *18*, 100549.

Diwan, A.D., Harke, S.N., Gopalkrishna, Panche, A.N. (2022). Aquaculture industry prospective from gut microbiome of fish and shellfish: An overview. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 106*, s. 441–469.

Domenico, J.D., Canova, R., Soveral, L. de F., Nied, C.O., Costa, M.M., Frandoloso, R., Kreutz, L.C. (2017). Immunomodulatory effects of dietary β-glucan in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Pesquisa Veterinaria Brasileira, 37*(1), 73–78.

Dominguez, D., Montero, D., Zamorano, M.J., Castro, P., Fontanillas, R., Prabhu, P.A.J., Izquierdo, M. (2021). Effects of vitamin D3 supplementation in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles fed diets high in plant based feedstuffs. *Aquaculture, 543*, 736991.

El-Naby, A.S.A., Khattaby, A.E.A., Samir, F., Awad, S.M.M., Abdel-Tawwab, M. (2019). Stimulatory effect of dietary butyrate on growth, immune response, and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* against *Aeromonas hydrophila* infection. *Animal Feed Science and Technology, 254*, 114212.

El-Sharkawy, E.A., El-Razek, I.M.A., Amer, A.A., Soliman, A.A., Shukry, M., Gewaily, M.S., Téllez-Isaías, G., Kari, Z.A., Dawood, M.A.O. (2023). Effects of sodium butyrate on the growth performance, digestive enzyme activity, intestinal health, and immune responses of Thinlip Grey Mullet (*Liza ramada*) juveniles. *Aquaculture Reports, 30*, 101530.

EUMOFA, (2023). Sturgeon meat and other by-products of caviar. Production, trade, and consumption in and outside the eu. Maritime Affairs and Fisheries.

Fang, L., Wang, Q., Guo, X., Pan, X., Li, X. (2021). Effects of dietary sodium butyrate on growth performance, antioxidant capacity, intestinal histomorphology and immune response in juvenile Pengze crucian carp (*Carassius auratus Pengze*). *Aquaculture Reports, 21*, 100828.

FAO, (2017). Fishery and Aquaculture Statistics. Global Aquaculture Production 1950-2015 (FishstatJ). Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

FAO, (2023). Cultured Aquatic Species Fact Sheets: Cultured Aquatic Species Information Programme Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, Rome.

FAO, (2024). In Brief to The State of World Fisheries and Aquaculture 2024. Blue Transformation in action. Rome.

Faught, E., Aluru, N., Vijayan, M.M. (2016). The Molecular Stress Response. *Fish Physiology, 35*, s. 113–166.

Fu, W., Duan, P., Wang, Q., Song, J., Wang, Y., Zhang, Z., Wang, P., Jiang, H., Zhang, X., Song, G. i in. (2023). Effect of *Pseudomonas stutzeri* F2 on rearing water quality and growth, innate immunity, visceral morphology and gut microbiota structure of juvenile spotted seabass (*Lateolabrax maculatus*). *Aquaculture Reports, 30*, 101536.

Gallo, B.D., Farrell, J.M., Leydet, B. (2020). Use of next generation sequencing to compare simple habitat and species level differences in the gut microbiota of an invasive and native freshwater fish species. *PeerJ,*, *8*, 10237.

Gao, R., Wijaya, G.Y., Yu, J., Jin, W., Bai, F., Wang, J., Yuan, L. (2020). Assessing gel properties of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) surimi prepared by high-temperature setting (40 °C) for different durations. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 100*, s. 3147-3156.

Gasco, L., Gai, F., Maricchiolo, G., Genovese, L., Ragonese, S., Bottari, T., Caruso, G. (2018). Supplementation of Vitamins, Minerals, Enzymes and Antioxidants in Fish Feeds. W: Gasco, L., Gai, F., Maricchiolo, G., Genovese, L., Ragonese, S., Bottari, T., Caruso, G. (red.), *Feeds for the Aquaculture Sector, Current Situation and Alternative Sources* (s. 63-94). Cham, Springer.

Geay, F., Kestemont, P. (2015). Feeding and nutrition of percid fishes during ongrowing stages. W: Kestemont, P., Dabrowski, K., Summerfelt, R.C. (red.), *Biology and Culture of Percid Fishes* (s. 587-622). Dordrecht, Springer.

Giri, S.S., Sen, S.S., Sukumaran, V. (2014). Role of HSP70 in cytoplasm protection against thermal stress in rohu, *Labeo rohita*. *Fish and Shellfish Immunology, 41*, s. 294–299.

Godoy, M., Montes de Oca, M., Suarez, R., Martinez, A., Pontigo, J.P., Caro, D., Kusch, K., Coca, Y., Bohle, H., Bayliss, S. i in. (2024). Genomics of Re-Emergent *Aeromonas salmonicida* in Atlantic Salmon Outbreaks. *Microorganisms, 12*(1), 64.

Harikrishnan, R., Kim, J.S., Kim, M.C., Balasundaram, C., Heo, M.S. (2011). Molecular characterization, phylogeny, and expression pattern of c-type lysozyme in kelp grouper, *Epinephelus bruneus*. *Fish and Shellfish Immunology, 31*(4), s. 588–594.

Havelka, M., Arai, K. (2018). Hybridization and Polyploidization in Sturgeon. W: Wang, H.P, Piferrer, F., Chen, S.L., Shen Z.G. (red.), *Sex Control in Aquaculture* (669-687). Wiley.

Hitch, T.C.A., Hall, L.J., Walsh, S.K., Leventhal, G.E., Slack, E., deWouters, T., Walter, J., Clavel, T. (2022). Microbiome-based interventions to modulate gut ecology and the immune system. *Mucosal Immunology, 15*, s. 1095–1113.

Hjelmstedt, P., Brijs, J., Berg, C., Axelsson, M., Sandblom, E., Roques, J.A.C., Sundh, H., Sundell, K., Kiessling, A., Gräns, A. (2021). Continuous physiological welfare evaluation of European whitefish (*Coregonus lavaretus*) during common aquaculture practices leading up to slaughter. *Aquaculture, 534*, 736258.

Hoseinifar, S.H., Sun, Y.-Z., Caipang, C.M. (2017). Short-chain fatty acids as feed supplements for sustainable aquaculture: an updated view. *Aquaculture Research, 48*, s. 1380–91.

Hormannsperger, G., Haller, D. (2010). Molecular crosstalk of probiotic bacteria with the intestinal immune system: clinical relevance in the context of inflammatory bowel disease. *International Journal of Medical Microbiology, 300*, s. 63–73.

Jarmołowicz, S., Rożyński, M., Kowalska, A., Zakęś, Z. (2018). Growth in juvenile pikeperch (*Sander lucioperca* L.) stimulated with yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, extract. *Aquaculture Research, 49*, s. 614–620.

Jiménez-Cantizano, R.M., Infante, C., Martin-Antonio, B., Ponce, M., Hachero, I., Navas, J.I., Manchado, M. (2008). Molecular characterization, phylogeny, and expression of c-type and g-type lysozymes in brill (*Scophthalmus rhombus*). *Fish and Shellfish Immunology 25*(1–2), s. 57-65.

Johny, T.K., Puthusseri, R.M., Bhat, S.G. (2021). A primer on metagenomics and next-generation sequencing in fish gut microbiome research. *Aquaculture Research, 52*, s. 4574-4600.

Khanjani, M.H., Ghaedi, G., Sharifinia, M. (2021). Effects of diets containing β-glucan on survival, growth performance, haematological, immunity and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Aquaculture Research, 53(3)*, s. 1842-1850.

Khanjani, M., Sharifinia, M., Ghaedi, G. (2022). β-glucan as a promising food additive and immunostimulant in aquaculture industry. *Annals of Animal Science, 22*(3), s. 817-827.

Kim, P.S., Shin, N.R., Lee, J.B. Kim, M.S., Whon, T.W., Hyun, D.W., Yun, J.H., Jung, M.J., Kim, J.Y., Bae, J.W. (2019). Host habitat is the major determinant of the gut microbiome of Fish. *Microbiome, 9*, 166.

Kucharczyk, D., Kucharczyk, D.J., Nowosad, J., Omirzhanova, N. (2019). Optimization of artificial insemination outcomes of African catfish *(Clarias gariepinus*) with differing hatchery conditions. *Animal Reproduction Science, 211*, 106222.

Kucharczyk, D., Jaczewski, J., Nowosad, J., Łuczyński, M., Piech, P., Dietrich, G., Kucharczyk, D., Drężek, J., Kotsyumbas, I., Muzyka, W. i in. (2023). Artificial reproduction of the indoor-cultured brackish form of maraena whitefish (*Coregonus maraena*) under recirculated aquaculture system (RAS) conditions. *Animal Reproduction Science*, *257*, 107329.

Langi, S., Maulu, S., Hasimuna, O.J., Kaleinasho Kapula, V., Tjipute, M. (2024). Nutritional requirements and effect of culture conditions on the performance of the African catfish (*Clarias gariepinus*): A review. *Cogent Food and Agriculture, 10*, 2302642.

Lee, S., Zhao, H., Li, Y., Binkowski, F., Deng, D.-F., Shepherd, B., Hung, S., Bai, S. (2018). Evaluation of formulated feed for juvenile lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) based on growth performance and nutrient retention. *North American Journal of Aquaculture, 80*, s. 223-236.

Lemos, L.S., Angarica, L.M., Hauser-Davis, R.A., Quinete, N. (2023). Cortisol as a Stress Indicator in Fish: Sampling Methods, Analytical Techniques, and Organic Pollutant Exposure Assessments. *International Journal of Environmental Research and Public Health, 20*(13), 6237.

Li, L., Cardoso, J.C.R., Félix, R.C., Mateus, A.P., Canário, A.V.M., Power, D.M. (2021). Fish lysozyme gene family evolution and divergent function in early development. *Developmental and Comparative Immunology, 114*, 103772.

Li, S., Heng, X., Guo, L., Lessing, D.J., Chu, W. (2022). SCFAs improve disease resistance via modulate gut microbiota, enhance immune response and increase antioxidative capacity in the host. *Fish and Shellfish Immunology, 120*, s. 560-568.

Li, P., Ma, X., Liu, D., Wei, Y., Li, P., Hou, H., Yao, J., Chen, A., Liang, Y., Zhou, Z. i in. (2022). A microbiome abundant environment remodels the intestinal microbiota and improves resistance to obesity induced by chlorpyrifos in mice. *Environmental Pollution, 315*, 120415.

Lin, M.Y., de Zoete, M.R., van Putten, J.P., Strijbis, K. (2015). Redirection of Epithelial Immune Responses by Short-Chain Fatty Acids through Inhibition of Histone Deacetylases. *Frontiers in Immunology, 6*, 554.

Lin, X., Chen, Y., Ruenkoed, S., Li, X., Leng, X. (2023). Dietary effects of supplementing *Clostridium butyricum* culture or sodium butyrate in low fishmeal diet on growth, serum indicators, intestinal histology and microbiota of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture Reports, 33*, 101827.

Linhartová, Z., Krejsa, J., Zajíc, T., Másílko, J., Samples, S., Mráz, J. (2018). Proximate and fatty acid composition of 13 important freshwater fish species in central Europe. *Aquaculture International, 26*(2), s. 695–711.

Lisachov, A., Nguyen, D., Panthum, T., Ahmad, S., Singchat, W., Ponjarat, J., Jaisamut, K., Srisapoome, P., Duengkae, P., Hatachote, S. i in. (2023). Emerging importance of bighead catfish (*Clarias macrocephalus*) and north African catfish (*C. gariepinus*) as a bioresource and their genomic perspective. *Aquaculture, 573*, 739585.

Liu, W., Yang, Y., Zhang, J., Gatlin, D.M., Ringø, E., Zhou, Z. (2014). Effects of dietary microencapsulated sodium butyrate on growth, intestinal mucosal morphology, immune response and adhesive bacteria in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) pre-fed with or without oxidised oil. *British Journal of Nutrition, 112(1)*, s. 15–29.

Liu, Y., Chen, T., Zhao, J., Chen, X. (2023). Chrysene alters the expression pattern of HSP70 genes in mandarin Fish. *Aquaculture and Fisheries, w trakcie wydania*.

Lobanov, V.P., Pate, J., Joyce, J. (2023). Sturgeon and paddlefish: Review of research on broodstock and early life stage management. *Aquaculture and Fisheries, 9*(6), s. 871-882.

Lock, E.J., Waagbo, R., Bonga, S.W., Flik, G. (2010). The significance of vitamin D for fish: A review. *Aquaculture Nutrition, 16*, s. 100–116.

Lopes, L.M.F., Marinho de Mello, M.M., Urbinati, E.C. (2022). β-Glucan reduces cortisol plasma levels, enhances innate immune system after *A. hydrophila* inoculation, and has lipolytic effects on the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture, 546*, 737411.

Luan, T., Li, M., Zhou, W., Yao, Y., Yang, Y., Zhang, Z., Ringø, E., Olsen, R.E., Clarke, J.L., Xie, S. i in. (2023). The Fish Microbiota: Research Progress and Potential Applications. *Engineering, 29*, s. 137-146.

Luz, J., Ramos, A.P., Melo, J.F., Braga, L.G. (2019). Use of sodium butyrate in the feeding of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) juvenile. *Aquaculture, 510*, s. 248-255.

Macheridis, S., Hansson, M.C., Foley, B.P. (2020). Fish in a barrel: Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) from the Baltic Sea wreck of the royal Danish flagship Gribshunden (1495). *Journal of Archaeological Science, 33*, 102480.

Markowiak-Kopeć, P., Śliżewska, K. (2020). The Effect of Probiotics on the Production of Short-Chain Fatty Acids by Human Intestinal Microbiome. *Nutrients, 12*, 1107.

Makowski, Z., Lipiński, K., Mazur-Kuśnirek, M. (2022). The Effects of Sodium Butyrate, Coated Sodium Butyrate, and Butyric Acid Glycerides on Nutrient Digestibility, Gastrointestinal Function, and Fecal Microbiota in Turkeys. *Animals*, *12*(14), 1836.

Martin-Gallausiaux, C., Marinelli, L., Blottière, H.M., Larraufie, P., Lapaque, N. (2021). SCFA: Mechanisms and functional importance in the gut. *Proceedings of the Nutrition Society, 80*, s. 37–49.

Marinho de Mello, M.M., de Fátima Pereira de Faria, C., Zanuzzo, F.S., Urbinati, E.C. (2019). β-glucan modulates cortisol levels in stressed pacu (*Piaractus mesopotamicus*) inoculated with heat-killed *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology, 93*, s. 1076-1083.

Martos-Sitcha, J.A., Mancera, J.M., Prunet, P., Magnoni, L.J. (2020). Welfare and Stressors in Fish: Challenges Facing Aquaculture. *Frontiers in Physiology. 11*, 162.

Meena, D.K., Das, P., Kumar, S., Mandal, S.C., Prusty, A.K., Singh, S.K., Akhtar, M.S., Behera, B.K., Kumar, K., Pal, A.K. i in. (2013). Beta Glucan: An Ideal Immunostimulant in Aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry, 39*, s. 431–457.

Merrifield, D.L., Rodiles, A. (2015). The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues. W: Beck, B.H., Peatman, E. (red.), *Mucosal Health in Aquaculture* (s. 273–295). Academic Press.

Misra, C.K., Das, B.K., Mukherjee, S.C., Pattnaik, P. (2006). Effect of Multiple Injections of β-Glucan on Non-Specific Immune Response and Disease Resistance in *Labeo rohita* Fingerlings. *Fish and Shellfish Immunology, 20*, s. 305‑319.

Mohanta, L., Das, B.C., Patri, M. (2020). Microbial communities modulating brain functioning and behaviors in zebrafish: a mechanistic approach. *Microbial Pathogenesis, 145*, 104251.

Novriadi, R., Fadhilah, R., Wahyudi, A.E., Trullàs, C. (2021). Effects of hydrolysable tannins on the growth performance, total haemocyte counts and lysozyme activity of pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Reports, 21*, 100796.

Nowosad, J., Żarski, D., Biłas, M., Dryl, K., Krejszeff, S., Kucharczyk, D. (2013). Dynamics of ammonia excretion in juvenile common tench, *Tinca tinca* (L.), during intensive rearing under controlled conditions. *Aquaculture International, 21(4)*, s. 629–637.

Nowosad, J., Jasiński, S., Arciuch-Rutkowska, M., Abdel-Latif, H.M.R., Wróbel, M., Mikiewicz, M., Zielonka, L., Kotsyumbas, I.Y., Muzyka, V.P., Brezvvn, O.M. i in. (2023). Effects of Bee Pollen on growth performance, intestinal microbiota and histomorphometry in African Catfish. *Animals, 13*, 132.

Omosowone, O., Dada, A., Adeparusi, E. (2018). Comparison of dietary butyric acid supplementation effect on growth performance and body composition of *Clarias gariepinus* and *Oreochromis niloticus* fingerlings. *Iranian Journal of Fisheries Sciences, 17*, s. 403–412.

Pamer, E.G. (2007). Immune responses to commensal and environmental microbes. *Nature Immunology, 8,* s. 1173–1178.

Parada Venegas, D., De la Fuente, M.K., Landskron, G., González, M.J., Quera, R., Dijkstra, G., Harmsen, H.J.M., Faber, K.N., Hermoso, M.A. (2019). Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Frontiers in Immunology, 10*, 277.

Petit, J., Bailey, E.C., Wheeler, R.T., de Oliveira, C.A.F., Forlenza, M., Wiegertjes, G.F. (2019). Studies Into Beta-Glucan Recognition in Fish Suggests a Key Role for the C-Type Lectin Pathway. *Frontiers in Immunology, 10*, 280.

Pfaffl, M.W. (2016) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research, 29*, e45.

Pockley, A.G. (2003). Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet (London, England), 362*(9382), s. 469-476.

Rawls, J.F., Samuel, B.S., Gordon, J.I. (2004). Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101*, s. 4596–4601.

Ray, A.K., Ghosh, K., Ringø, E. (2012). Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquaculture Nutrition, 18*, s. 465–492.

Rimoldi, S., Gliozheni, E., Ascione, C., Gini, E., Terova, G. (2018). Effect of a specific composition of short-and medium-chain fatty acid 1-monoglycerides on growth performances and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *PeerJ, 31*(6), 5355.

Roberts, R.J., Carmelo, A., Saliba, C., Bossier, P., Sung, Y.Y. (2010). Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: A review. *The Journal of Fish Diseases, 33*, s. 789-801.

Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ, 4*, e2584.

Romero, J., Ringø, E., Merrifield, D.L. (2014). The gut microbiota of fish. W: Merrifield, D.L., Ringø E. (red.), *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics* (s. 75-100). London, Wiley.

Sadoul B., Geffroy B. (2019). Measuring Cortisol, the Major Stress Hormone in Fishes. *Journal of Fish Biology, 94*, s. 540–555.

Saheli, M., Islami, H.R., Mohseni, M., Soltani, M. (2021). Effects of dietary vitamin E on growth performance, body composition, antioxidant capacity, and some immune responses in Caspian trout (*Salmo caspius*). *Aquaculture Reports, 21*, 100857.

Saurabh, S., Sahoo, P.K. (2008). Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research, 39*, s. 223-239.

Schmittgen, T.D., Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols, 3*, s. 1101–1108.

Segaran, T.C., Azra, M.N., Piah, R.M., Lananan, F., T´ellez-Isaías, G., Gao, H., Torsabo, D., Kari, Z.A., Noordin, N.M. (2023). Catfishes: A global review of the literature. *Heliyon, 9*(9), e20081.

Shan, C., Li, M., Liu, Z., Xu, R., Qiao, F., Du, Z.-Y., Zhang, M.-L. (2021). *Pediococcus pentosaceus* enhances host resistance against pathogen by increasing IL-1 production: Understanding probiotic effectiveness and administration duration. *Frontiers in Immunology, 12*, 766401.

Silphaduang, U., Colorni, A., Noga, E.J. (2006). Evidence for widespread distribution of piscidins antimicrobial peptides in teleost fish. *Diseases of Aquatic Organisms, 72,* s. 241–252.

Sivagurunathan, U., Dominguez, D., Tseng, Y., Zamorano, M.J., Prabhu, A.J., Izquierdo, M. (2023). Deficiency and excess in dietary vitamin K3 negatively affect gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae performance and bone health. *Aquaculture, 574*, 739646.

Stakenas, S., Pilinkovskij, A. (2019). Migration patterns and survival of stocked atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus* mitchill, 1815) in nemunas basin, baltic sea. *Journal of Applied Ichthyology, 35*(1), s. 128–137.

Sun, Y., MacRae, T.H. (2005). Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cellular and Molecular Life Sciences, 62*(21), s. 2460–2476.

Tian, L., Zhou, X.-Q., Jiang, W.-D., Liu, Y., Wu, P., Jiang, J., Kuang, S.-Y., Tang, L., Tang, W.-N., Zhang, Y.-A. i in. (2017). Sodium butyrate improved intestinal immune function associated with NF-jB and p38MAPK signalling pathways in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish and Shellfish Immunology, 66*, s. 548–563.

Torres-Maravilla, E., Parra, M., Maisey, K., Vargas, R.A., Cabezas-Cruz, A., Gonzalez, A., Tello, M., Bermúdez-Humarán, L.G. (2024). Importance of Probiotics in Fish Aquaculture: Towards the Identification and Design of Novel Probiotics. *Microorganisms, 12*, 626.

Tran, N.T., Li, Z., Wang, S., Zheng, H., Aweya, J.J., Wen, X., Li, S. (2020). Progress and perspectives of short-chain fatty acids in aquaculture. *Cellular and Molecular Life Sciences, 12*, s. 283–298.

Tsuchiya, C., Sakata, T., Sugita, H. (2008). Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. *Letters in Applied Microbiology, 46*(1), s. 43–48.

Udo, I.U. (2017). Effects of Dietary Vitamin A level on Growth, Feed Utilization and Survival of Juvenile North African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Livestock Research for Rural Development, 29*, 22.

Voloski, A.P., de Figueiredo Soveral, L., Dazzi, C.C., Sutili, F., Frandoloso, R., Kreutz, L.C. (2019). β -Glucan improves wound healing in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Fish and Shellfish Immunology, 93*, s. 575‑579.

Wah-Suárez, M.I., Vázquez, M.A.M., Bosques-Padilla, F.J. (2022). Inflammatory bowel disease: The role of commensal microbiome in immune regulation. *Gastroenterología y Hepatología* (Engl. Ed.), *45*, s. 626–636.

Wang, X. (2013). Effects of Stocking Density on Growth, Nonspecific Immune Response, and Antioxidant Status in African Catfish (*Clarias gariepinus*). *The Israeli journal of aquaculture-Bamidgeh, 65*, s. 1.

Wei, W., Sun, J., Liu, C., Xue, Z. (2016). Application of immunostimulants in aquaculture: current knowledge and future perspectives. *Aquaculture Research, 48*, s. 1–23.

Wiszniewski, G., Jarmołowicz, S., Hassaan, M.S., Soaudy, M.R., Kamaszewski, M., Szudrowicz, H., Terech-Majewska, E., Pajdak-Czaus, J., Wiechetek, W., Siwicki, A.K. (2022). Beneficial effects of dietary papain supplementation in juvenile sterlet (*Acipenser ruthenus*): Growth, intestinal topography, digestive enzymes, antioxidant response, immune response, and response to a challenge test. *Aquaculture Reports, 22*, 100923.

Yamamoto, F.Y., Sutili, F.J., Hume, M., Gatlin III, D.M. (2018). The Effect of β-1,3-Glucan Derived From *Euglena Gracilis* (Algamune™) on the Innate

Immunological Responses of Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus* L.). *The Journal of Fish Diseases, 41,* s. 1579–1588.

Yamamoto, F.Y., Castillo, S., de Cruz, C.R., Chen, K., Hume, M.E., Gatlin, D.M. (2020). Synergistic effects of the β-1,3 glucan paramylon and vitamin C on immunological responses of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) were pronounced in vitro but more moderate *in vivo*. *Aquaculture, 526*, 735394.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L., (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics, 13*, 134.

Zhang, H., Yi, L., Sun, R., Zhou, H., Xu, W., Zhang, W., Mai, K. (2016). Effects of dietary citric acid on growth performance, mineral status and intestinal digestive enzyme activities of large yellow croaker *Larimichthys crocea* (Richardson, 1846) fed high plant protein diets. *Aquaculture, 453*, s. 147–153.

Zhang, J., Zhong, L., Chi, S., Chu, W., Liu, Y., Hu, Y. (2020). Sodium butyrate supplementation in high-soybean meal diets for juvenile rice field eel (*Monopterus albus*): Effects on growth, immune response and intestinal health. *Aquaculture, 520*, 734952.

Zhang, J., Zhang, H., Liu, M., Lan, Y., Sun, H., Mai, K., Wan, M. (2020b). Short-Chain Fatty Acids Promote Intracellular Bactericidal Activity in Head Kidney Macrophages From Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) *via* Hypoxia Inducible Factor-1α. *Frontiers in Immunol*ogy*, 11*, 615536.

Zhang, H., Jarić, I., Roberts, D.L., He, Y., Du, H., Wu, J., Wang, Ch., Wei, Q. (2020c). Extinction of one of the world's largest freshwater fishes: Lessons for conserving the endangered Yangtze fauna. *Science of the Total Environment, 710*, 136242.

Zou, J., Mercier, C., Koussounadis, A., Secombes, C. (2007). Discovery of multiple betadefensins like homologues in teleost fish. *Molecular Immunology, 44*, s. 638–647.

Spis tabel

Tabela 1. Skład poszczególnych wariantów mieszanek paszowych uzupełniających (MPU) wykorzystanych w eksperymentach żywieniowych na trzech gatunkach ryb (*Clarias gariepinus, A. gueldenstaedtii*♀ × *A. baerii*♂*, Coregonus maraena*).....24

Tabela 2. Warunki opisujące poszczególne eksperymenty żywieniowe przeprowadzone na trzech gatunkach ryb (*Clarias gariepinus, A. gueldenstaedtii*♀ × *A. baerii*♂*, Coregonus maraena*). 25

Tabela 3. Wskaźniki hodowlane (średnia ± SD) suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus*), hybrydy jesiotrów (*A. gueldenstaedtii*♀ × *A. baerii*♂) oraz siei (*Coregonus maraena*) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3, FQV4) wobec grup kontrolnych (C, niesuplementowanych). 31

Tabela 4. Indeksy α-różnorodności (średnia ± SD) charakteryzujące mikrobiom jelitowy narybku suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus*), hybrydy jesiotrów (*A. gueldenstaedtii*♀ × *A. baerii*♂) oraz siei (*Coregonus maraena*) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3, FQV4) wobec grup kontrolnych (C, niesuplementowanych). 34

Tabela 5. Podsumowanie uzyskanych wyników badań oraz określenie najbardziej korzystnych wariantów suplementacji diety pod kątem wybranych parametrów u wybranych gatunków ryb. 51

Spis rysunków

Rysunek 1. Schemat blokowy przedstawiający zakres i poszczególne etapy badań w ramach rozprawy doktorskiej. 21

Rysunek 2. Diagram Venna przedstawiający powszechne i unikalne ASVs charakteryzujące mikrobiom jelitowy narybku suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus*) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3, FQV4) wobec grupy kontrolnej (C, niesuplementowanej). 35

Rysunek 3. Analiza PCoA z miarą odległości Bray-Curtis'a mikrobiomów jelitowych narybku suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus*) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3, FQV4) wobec grupy kontrolnej (C, niesuplementowanej). Punkty tego samego koloru oznaczają osobniki z tej samej grupy (C – jasnoniebieski, FQV1 – granatowy, FQV2 – czerwony, FQV3 – zielony FQV4 – fioletowy). 36

Rysunek 4. Diagram Venna przedstawiający powszechne i unikalne ASVs charakteryzujące mikrobiom narybku hybrydy jesiotrów (*A. gueldenstaedtii*♀ × *A. baerii*♂) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3) wobec grupy kontrolnej (C, niesuplementowanej). 37

Rysunek 5. Analiza PCoA z miarą odległości Bray-Curtis'a mikrobiomów jelitowych narybku hybrydy jesiotrów (*A. gueldenstaedtii*♀ × *A. baerii*♂) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3) wobec grupy kontrolnej (C, niesuplementowanej). Punkty tego samego koloru oznaczają osobniki z tej samej grupy (C – jasnoniebieski, FQV1 – granatowy, FQV2 – czerwony, FQV3 – zielony). 37

Rysunek 6. Diagram Venna przedstawiający powszechne i unikalne ASVs charakteryzujące mikrobiom narybku siei (*Coregonus maraena*) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3) wobec grupy kontrolnej (C, niesuplementowanej)..... 38

Rysunek 7. Analiza PCoA z miarą odległości Bray-Curtis'a mikrobiomów jelitowych narybku siei (*Coregonus maraena*) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3) wobec grupy kontrolnej (C, niesuplementowanej). Punkty tego samego koloru oznaczają osobniki z tej samej grupy (C – jasnoniebieski, FQV1 – granatowy, FQV2 – czerwony, FQV3 – zielony). 39

Rysunek 8. Średnia względna liczebność bakterii na poziomie gromady (A) oraz rodzaju (B) w mikrobiomie jelitowym narybku suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus*) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3, FQV4) wobec grupy kontrolnej (C, niesuplementowanej). 40

Rysunek 9. Średnia względna liczebność bakterii na poziomie gromady (A) oraz rodzaju (B) w mikrobiomie jelitowym narybku hybrydy jesiotrów (*A. gueldenstaedtii*♀ × *A. baerii*♂) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3) wobec grupy kontrolnej (C, niesuplementowanej). 42

Rysunek 10. Średnia względna liczebność bakterii na poziomie gromady (A) oraz rodzaju (B) w mikrobiomie jelitowym narybku siei (*Coregonus maraena*) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3) wobec grupy kontrolnej (C, niesuplementowanej). 43

Rysunek 11. Aktywność lizozymu (U/ ml) w osoczu krwi (średnia ± SD) narybku hybrydy jesiotrów (*A. gueldenstaedtii*♀ *x A. baerii*♂) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3) wobec grupy kontrolnej (C, niesuplementowanej). Wartości słupków oznaczone różnymi indeksami literowymi różnią się statystycznie ($p < 0,05$).....44

Rysunek 12. Stężenie kortyzolu (ng/ ml) w osoczu krwi (średnia ± SD) narybku hybrydy jesiotrów (*A. gueldenstaedtii*♀ × *A. baerii*♂) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3) wobec grupy kontrolnej (C, niesuplementowanej).....45

Rysunek 13. Względny poziom ekspresji genu HSP70 (średnia ± SD) w tkance wątrobowej narybku siei (*Coregonus maraena*) po okresie wzbogaconego żywienia w grupach suplementowanych (FQV1, FQV2, FQV3) wobec grupy kontrolnej (C, niesuplementowanej). Wartości słupków oznaczone różnymi indeksami literowymi różnią się statystycznie ($p < 0,05$).....45

Rysunek 14. Pierwsza, prototypowa wersja logo produktu FishQuatro (ChemProf, Olsztyn, Polska). 56

Załączniki

Załącznik I

Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Jasiński, S. Łuczyński, M., Kucharczyk, D. (2024). Effects of the diet enrichment with β-glucan, sodium salt of butyric acid and vitamins on growth parameters and the profile of the gut microbiome of juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*). *Animal Feed Science and Technology*, *310*, 115941.

Olsztyn, 03.12.2024

Martyna Arciuch-Rutkowska
(imię i nazwisko kandydata)

Zootechnika i Rybactwo
(dyscyplina naukowa)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy: **Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Jasiński, S. Łuczyński, M., Kucharczyk, D. 2024, Effects of the diet enrichment with β-glucan, sodium salt of butyric acid and vitamins on growth parameters and the profile of the gut microbiome of juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*), Animal Feed Science and Technology, 310, 115941** mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na opracowywaniu koncepcji badań, opracowaniu i walidacji metod, wykonaniu części eksperymentalnej, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu draftu publikacji oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje.

Martyna Arciuch-Rutkowska

(podpis kandydata)

Olsztyn, 02.12.2024

Dr inż. Joanna Nowosad
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE

współautora/~~współautorów~~

Oświadczam, że w pracy: **Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Jasiński, S. Łuczyński, M., Kucharczyk, D. 2024, Effects of the diet enrichment with β-glucan, sodium salt of butyric acid and vitamins on growth parameters and the profile of the gut microbiome of juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*), Animal Feed Science and Technology, 310, 115941** mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na współwykonaniu części eksperymentalnej, weryfikacji metod badawczych oraz pomocy w przygotowaniu manuskryptu publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Martynę Arciuch-Rutkowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr Martyny Arciuch-Rutkowskiej polegający na opracowywaniu koncepcji badań, opracowaniu i walidacji metod, wykonaniu części eksperymentalnej, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu draftu publikacji oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje.

Joanna Nowosad

(podpis/podpisy)

Świnoujście, 10.09.2024

mgr inż. Szymon Jasiński

(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i rybactwo
Prof. dr hab. Dorota Witkowska
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Jasiński, S., Łuczyński, M., Kucharczyk, D. 2024, Effects of the diet enrichment with β-glucan, sodium salt of butyric acid and vitamins on growth parameters and the profile of the gut microbiome of juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*), Animal Feed Science and Technology, 310, 115941 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: współuczestnictwie w prowadzeniu doświadczenia i weryfikacji uzyskanych danych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Martynę Arciuch-Rutkowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr Martyny Arciuch-Rutkowskiej polegający na opracowaniu koncepcji doświadczenia, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i walidacji metod badawczych, wykonaniu analiz laboratoryjnych, weryfikacji uzyskanych danych, wizualizacji danych oraz opracowaniu oryginalnej wersji publikacji.

Szymon Jasiński

.....

podpis

Olsztyn, 04.12.2024

Dr Michał Krzysztof Łuczyński
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE

współautora/~~współautorów~~

Oświadczam, że w pracy: **Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Jasiński, S. Łuczyński, M., Kucharczyk, D. 2024, Effects of the diet enrichment with β-glucan, sodium salt of butyric acid and vitamins on growth parameters and the profile of the gut microbiome of juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*), Animal Feed Science and Technology, 310, 115941** mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na pozyskaniu finansowania, nadzorze nad prowadzeniem doświadczenia oraz pomocy w przygotowaniu manuskryptu publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Martynę Arciuch-Rutkowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr Martyny Arciuch-Rutkowskiej polegający na opracowywaniu koncepcji badań, opracowaniu i walidacji metod, wykonaniu części eksperymentalnej, wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu draftu publikacji oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje.

.....

(podpis/podpisy)

Olsztyn, 04.12.2024

Prof. dr hab. inż. Dariusz Kucharczyk
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE

współautora/~~współautorów~~

Oświadczam, że w pracy: **Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Jasiński, S. Łuczyński, M., Kucharczyk, D. 2024, Effects of the diet enrichment with β-glucan, sodium salt of butyric acid and vitamins on growth parameters and the profile of the gut microbiome of juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*), Animal Feed Science and Technology, 310, 115941** mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na opracowaniu koncepcji badań, pozyskaniu finansowania, nadzorze nad prowadzeniem doświadczenia oraz przygotowaniem manuskryptu publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Martynę Arciuch-Rutkowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr Martyny Arciuch-Rutkowskiej polegający na opracowywaniu koncepcji badań, opracowaniu i walidacji metod, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu draftu publikacji oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje.

D. Kucharczyk

(podpis/podpisy)

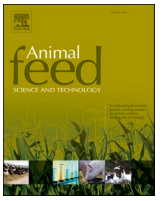
Animal Feed Science and Technology 310 (2024) 115941



Contents lists available at ScienceDirect

Animal Feed Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anifeedsci





Effects of the diet enrichment with β-glucan, sodium salt of butyric acid and vitamins on growth parameters and the profile of the gut microbiome of juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*)

Martyna Arciuch-Rutkowska [a,b,*], Joanna Nowosad [a,b,c], Michał Krzysztof Łuczyński [a], Szymon Jasiński [b], Dariusz Kucharczyk [a,b,*]

[a] *Department of Research and Development, Chemprof, Gutkowo 54B, Olsztyn 11-041, Poland*
[b] *Department of Ichthyology and Aquaculture, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Al. Warszawska 117A, Olsztyn 10-957, Poland*
[c] *Department of Ichthyology, Hydrobiology and Aquatic Ecology, National Inland Fisheries Research Institute, Olsztyn 10-719, Poland*

ARTICLE INFO

Keywords:
African catfish
Growth performance
Intestinal microbiome
Juvenile
Prebiotics

ABSTRACT

This study assessed the effect of the addition of active substances, i.e., β-glucan, sodium butyrate and vitamins (C, A, D_3, E, K) to the diet of juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*) on growth parameters and the intestinal microbiome. For this purpose, a four-week rearing of juveniles African catfish in a recirculating aquaculture system (RAS) under controlled conditions at 25°C was conducted. The fish were fed commercial feed (control group - C), which was enriched with various levels of sodium butyrate and β-glucan (FQV1 – FQV4). After the experiment, growth parameters such as weight gain (WG; g), length gain (LG; cm), specific growth rate (SGR; % d^{-1}), condition factor (K) survival rate (SR; %) and cannibalism factor (CF; %) were determined. The profile of the intestinal microbiome was also determined using Next-Generation Sequencing (NGS) based on the analysis of the 16 S rRNA subunit. The obtained results indicated that feed supplementation with active substances in appropriate doses had a positive effect on the growth parameters of tested fish. Compared to the control group, statistically significant differences were obtained in WG (C - 7.62 g; FQV3 - FQV1 respectively 12.2–16.65 g), in WL (C - 6.23 cm; FQV3 - FQV1 respectively 7.59–8.74 cm), in SGR (C - 4.7%/d; FQV3 – V1 respectively 12.20 – 16.65 g), in K (C – 0.76; V3 – FQV4 respectively 0.80 – 0.84) ($P < 0.05$). In addition, the control group had the highest value of CF (8.0%) compared to the research groups ($P < 0.05$). The values of α-diversity metrics did not show statistically significant differences. However, the number of unique amplicon sequence variants (ASVs) in research groups confirmed that enriching the diet with the active substances increases the biodiversity of intestinal microbiome (C - 203; FQV4 - 373). In research groups and the control group, *Firmicutes* and *Proteobacteria* dominated, additionally, an increased number of beneficial lactic acid bacteria (LAB) of the *Lactococcus* and *Bacillus* genus was observed, while the number of potentially pathogenic bacteria of the *Candidatus* genus was reduced ($P < 0.05$). Principal coordinate analysis (PCoA) determining β-diversity showed that the

Abbreviations: ASVs, amplicon sequence variants; CF, cannibalism factor; DAH, days afer hatching; FAO, Food and Agriculture Organization; FOS, fructooligosaccharides; GOS, galactooligosaccharides; IL, initial length; IU, international unit; IW, initial weight; K, condition factor; LAB, lactic acid bacteria; LG, length gain; MOS, mannooligosaccharides; MS-222, tricaine methanesulfonate; NGS, next-generation sequencing; PCoA, principal cooridinate analysis; RAS, recirculating aquaculture system; SCFA, short chain fatty acid; SGR, specific growth rate; SR, survival rate; WG, weight gain.

* Corresponding author at: Department of Research and Development, Chemprof, Gutkowo 54B, Olsztyn 11-041, Poland
E-mail addresses: martyna.arciuch@chemprof.pl (M. Arciuch-Rutkowska), darekk56@gmail.com (D. Kucharczyk).

https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2024.115941
Received 12 September 2023; Received in revised form 30 January 2024; Accepted 28 February 2024
Available online 1 March 2024
0377-8401/© 2024 Elsevier B.V. All rights reserved.

FQV3 was characterized by varied species composition compared to the other groups. The obtained results showed that a carefully selected composition of active ingredients used in the diet of juvenile African catfish has a beneficial effect on the profile and biodiversity of the intestinal microbiome, which indirectly improves resistance to infections and increases breeding indicators.

1. Introduction

In recent years, aquaculture has been gaining importance, increasing its fish and seafood production from 41 million metric tons in 1993–120 million metric tons in 2019 (Pasch and Palm, 2021). The Food and Agriculture Organization (FAO) has identified aquaculture as the fastest growing food production sector (FAO, 2016a, 2016b). The most commonly farmed fish species in the world are common carp (*Cyprinus carpio*), tilapia sp. (*Oreochromis sp.*), Atlantic salmon (*Salmo salar*) and catfish of the following species: Amur catfish (*Silurus asotus*), channel catfish (*Ictalurus puncuatus*), striped catfish (*Pangasius hypophthalmus*) and African catfish (*Clarias gariepinus*) (FAO, 2014). According to the FAO (2017), the African catfish is one of the most important and promising aquaculture species. Its rapid global production occurred in 2005 and in 2015 amounted to about 246 million metric tons (FAO, 2017). This species is cultured in many countries around the world. The main producer countries are: in Africa (Nigeria, Kenya, South Africa, Cameroon, Mali, Egypt, Ghana, Uganda) in Asia (Syrian Arab Republic, China, Thailand) in South America (Brazil) and in Europe (Netherlands, Hungary, Belgium, Italy) (FAO, 2023; Segaran et al., 2023). Many studies are being conducted on the development of reproduction protocols and breeding of African catfish in controlled conditions in order to increase the efficiency and profitability of production by reducing feed costs, shortening rearing time (accelerating growth rate) and increasing animal immunity.

There are some limitations in any animal breeding, also in aquaculture. One of them is the reduction of resistance to infection as a result of many stressors (Dawood et al., 2020a). Infectious diseases are one of the causes of losses in modern aquaculture, while the use of antibiotics gives only short-term positive results. In the long term, the administration of antibiotics causes an increase in the number of antibiotic-resistant bacteria. In addition, residues of these substances in animal tissues and water significantly limit their use. It is important to look for innovative solutions to modulate immunity to infections (Domenico et al., 2017; Abdel-Latif et al., 2022a, 2022b). Inducing much more efficient and effective use of nutrients, increasing survival and accelerating growth rate is also desirable. It is reasonable to introduce supplementation in the form of immunostimulators, vitamins and other nutrients supporting the immune system and improving the general physiological condition of fish (Yamamoto et al., 2020; Nowosad et al., 2023). The task of scientists is the search for non-antibiotic immunostimulants that will enhance the immune response to pathogens. It is important that they are safe for the aquatic environment and for humans as a future consumer (Wei et al., 2016; Abdel-Latif et al., 2022c; 2023). A review of the literature shows that there are many substances that can cause the effect desired by fish farmers. These are primarily active substances that have a prebiotic effect, supporting the development of beneficial microbiota, such as organic acids in the form of salts, e.g., sodium butyrate and glucans (Dawood et al., 2020b). Glucans are organic chemical compounds belonging to polysaccharides, they are included in the fraction of dietary fiber. β-glucan is isolated from bacterial cells, algae, yeasts, fungi, molds and higher plants. Depending on the source, they have a different structure. Each of the available forms has greater or lesser health-promoting properties for both animals and humans (Ahmad et al., 2012). According to the current state of knowledge, the most biologically active form is the β-1,3/1,6-glucan, which has β-1,6 and β-1,3 bonds in its molecule (Zechner- Krpan et al., 2010). Studies using β-glucan in aquaculture have shown that this compound improves the growth efficiency and physiological condition of fish. β-glucan can also be used as a preventive and regenerative agent for bacterial infections (Dawood et al., 2020a). Additionally, β-glucan has multiple biological activities, including antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory effects (Dawood et al., 2020c). A fish diet enriched with β-glucan contributes to the improvement of a number of parameters of the innate immune response. These properties make β-glucan an ideal molecule to stimulate immunity in fish farming (Domenico et al., 2017). It has been shown that β-glucan also reduces the risk of *Aeromonas hydrophila* infection, affects the activation of antioxidant enzymes and reduces the risk of local enteritis. Research conducted by Yamamoto et al. (2020) proves that β-glucan in combination with other compounds, i.e., vitamin C, has a synergistic effect, improving immune response in fish. An undoubted advantage of β-glucan is also its beneficial effect on the colonization of the digestive tract with beneficial microflora, which converts glucans into short-chain fatty acids (SCFAs) (Reyes-Becerril et al., 2020). Sodium butyrate (C_3H_7COONa) is an organic sodium salt of butyric acid, which belongs to SCFA. In recent years, there has been an increase in interest in this molecule in aquaculture. This is due to the possibility of a positive impact on the growth and development parameters of fish (Wu et al., 2020). Many scientific studies focus on determining the intestinal microbiome of fish, whose diet has been enriched with short-chain fatty acids such as butyric acid and its salts. These studies show that the introduction of butyric acid or its salts (in the encapsulated or free form) into the diet has a positive effect on the intestinal microbiota profile. The addition of butyrate increases the number of probiotic bacteria like lactic acid bacteria (LAB), e.g., *Lactobacillus spp*. It also reduces the number of potentially pathogenic bacteria such as coliforms, *Vibrio, Aeromonas* or *Grammaproteobacteria* (e.g., Zhang et al., 2016; Tian et al., 2017; Abdel-Mohsen et al., 2018; Rimoldi et al., 2018). Numerous studies have shown a positive effect of dietary supplementation with butyrate on the growth and development of fish. Research was conducted on species such as European seabass (*Dicentrarchus labrax*), sea bream (*Sparus aurata*), African catfish, goldfish (*Carassius auratus*), common carp and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Abdel-Latif et al., 2020). Supplementing the diet of fish with sodium butyrate significantly improves feed intake, increases final body weight and affects growth rate (Chen et al., 2023).

Many studies have been conducted on the introduction of functional feeding of African catfish to improve breeding performance. An example of innovative supplementation is the enrichment of the diet of juvenile African catfish with prebiotic bee pollen, which

improves growth parameters and has a positive effect on the cannibalism factor and the amount of LAB in the intestines (Nowosad et al., 2023). However, in the literature there is little information on the effect of juvenile African catfish dietary supplementation on the intestinal microbiome profile, which plays a decisive role in building resistance to stress or diseases. Considering the above reports, it was hypothesized that dietary supplementation with a preparation containing β-glucan, sodium butyrate and vitamins (FishQuatro) accelerates growth and improves resistance to stress and infections by modulating the intestinal microbiome of fish.

The aim of the study in connection with the above hypothesis was to check whether enriching the diet of juvenile African catfish with FishQuatro will improve growth indicators and the intestinal microbiome profile. All these aspects can contribute to improving the efficiency and quality of this species intensive culture.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

The experiment was conducted in accordance with polish and international guidelines for experimental animals. Moreover, the experiment was not carried out on protected or endangered species. The procedures involving animals used in the experiment were carried out in accordance with the decision of the Local Ethical Committee for Animal Experiments in Olsztyn (LKE/11/2023).

During the experiment, the fish were not exposed to any toxic substances, did not feel any distress, moreover, full welfare was ensured with unlimited access to feed, daily monitoring of optimal environmental parameters for this species and cleaning of the tanks from faeces and feed residues.

2.2. The origin of the experimental fish

Sexually immature post-fry (juvenile) African catfish were used for the experiment. Experimental specimens were obtained from the breeding of African catfish conducted by the Department of Ichthyology and Aquaculture of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn. Artificial reproduction was performed using Ovaprim (Syndel, Nanaimo, Canada) at dose of 0.5 mL/kg body weight. Artificial reproduction, insemination and incubation of eggs under controlled conditions were conducted according to the methodology described by Kucharczyk et al. (2019) and Abdel-Latif et al. (2021).

2.3. Initial rearing

The obtained larvae were raised to the fry stage in a recirculating aquaculture system (RAS) in the Department of Ichthyology and Aquaculture of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn. For the first two weeks of rearing, the larvae were fed freshly hatched brine shrimp nauplii (*Artemia sp.*) (Ocean Nutrition, Dartmouth, Canada) three times a day. In the next stage, a compound feed (Aller Aqua, Aller Futura EX, Christiansfeld, Denmark), as used by Polish catfish fish-farmers, was administered four times a day (Nowosad et al., 2023). During the pre-rearing period the water temperature was 25.0 ± 0.1°C (Hanna HI 98128, Eden Way, UK). Additionally, the level of nitrates (Hach LCK339, Ames, USA), nitrites (Hach LCK341, Ames, USA) and ammonia (Hach LCK303, Ames, USA) was controlled (Nowosad et al., 2013). 750 post-fry with an average weight of 0.48 ± 0.17 g and an average length of 3.89 ± 0.45 mm (mean ± SD; n = 50) and age 26 DAH (days after hatching) were used for the experiment.

Table 1
Composition of the feed used in the control group and research groups during the feeding experiment on post-fry and juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*).

	Groups				
	C	FQV1	FQV2	FQV3	FQV4
Main components					
crude protein (%)	60.50				
crude fat (%)	14.15				
carbohydrates (%)	6.05				
cellulose (%)	0.78				
Active ingredients					
sodium butyrate (mg/ kg)	ND	50	150	150	50
β- glucan (mg/ kg)	ND	20	60	20	60
vitamin C (mg/ kg)	ND	30	30	30	30
vitamin E (mg/ kg)	ND	10	10	10	10
vitamin K (mg/ kg)	ND	0.4	0.4	0.4	0.4
vitamin A (IU/ kg)	10000	11200(10000)	11200(10000)	11200(10000)	11200(10000)
vitamin D3 (IU/ kg)	1000	1800(1000)	1800(1000)	1800(1000)	1800(1000)

C – control group, FQV1 - FQV4 – research groups.
IU, international unit of vitamin; ND, no data.
The content of active ingredients given in the table is the sum of the enrichment and the manufacturer's declaration. The content of active ingredients declared by the manufacturer is given in brackets.

2.4. Experimental feed

A commercial complete feed with a crude protein content – 62%, crude fat – 12%, carbohydrates – 6.2%, cellulose – 0.8%, crude ash - 13%, phosphorus - 1.4%, and sodium - 0.9% was used in the experiment. This feed, with pellet size of 0.9 – 1.5 mm, was previously successfully used to rearing juvenile African catfish (Nowosad et al., 2023). The experimental feed for the research groups was prepared by enriching the commercial feed with FishQuatro supplements containing active substances in appropriate doses (Table 1). Enrichment was performed by adding 1 mL of FishQuatro supplements to 50 mL mixture of rapeseed oil and water (1:1, v/v), then homogenized and sprayed onto 1 kg of commercial feed. The feed for the control group was supplemented only with a mixture of oil and water (1:1, v/v) in the same volume as in the research groups. The enriched feed was dried at room temperature for 24 h.

2.5. Description of the experiment

Experimental individuals (n = 750) were divided into five groups in 15 tanks (50 fish /20 L tank; in triplicate). During the experiment, the water temperature was maintained at 25.0 ± 0.1°C (OxyGuard Pacyfic, Farum, Denmark), water parameters such as pH (Hanna HI 98128, Eden Way, UK), oxygenation and saturation of water (OxyGuard Pacyfic, Farum, Denmark) and ammonia concentration (Hach LCK303, Ames, USA) were also monitored (Sikora et al., 2020, 2022). The experiment was conducted for 4 weeks. This is enough time to observe the effect of using dietary supplementation, because the growth rate of fish at this stage is very fast. On average, the final weight of the fish was 28 times greater than the initial weight. The African catfish post-fry and juveniles were fed to satiation (*ad libitum*) four times a day at regular times (8:00, 11:00, 14:00, 17:00) (Prusińska et al., 2020; Nowosad et al., 2023). Before morning feeding, tanks were cleaned of faeces, uneaten feed and dead fish. Mortality of individuals (N_m) was recorded daily. At the end of the experiment, the fish in each tank (N_e) were counted to calculate the cannibalism factor (CF) and survival rate (SR) in each group (El-Asely et al., 2014). The survival rate (SR; %) was calculated according to the formula:

$$SR\ (\%) = (N_e / N_i) \times 100 \quad (1)$$

N_i, number of fish at the beginning of the experiment; N_e, number of fish at the end of the experiment.

Cannibalism factor (CF; %) was calculated according to the formula:

$$CF\ (\%) = (N_i - N_m - N_e) / N_i \times 100 \quad (2)$$

N_i, number of fish at the beginning of the experiment; N_e, number of fish at the end of the experiment; N_m, number of dead fish.

2.6. Cyclic measurement of fish body weight and length

Randomly selected individuals (n =10) from each tank were weighed on scales (± 0.01 g; KERN ABJ; 320–4NM, Balingen Germany) and measured with calipers (± 0.1 mm; Geko G01493, Poland) at weekly intervals. Before the measurements, the fish were anaesthetized with MS-222 (Sigma - Aldrich, Saint Louis, USA) at a dose 0.15 g/L water (Nowosad et al., 2023). After the measurements and recovery from anesthesia fish were transferred to the appropriate tanks. (Piech et al., 2023). The obtained results were used to calculate growth parameters such as: weight gain (WG), length gain (LG), specific growth rate (SGR) and condition factor (K) (El - Asely et al., 2014). The above parameters were calculated according to the formulas:

$$WG\ (g) = (FW - IW) \quad (3)$$

FW, final weight (g); IW, initial weight (g).

$$LG\ (cm) = (FL - IL) \quad (4)$$

FL, final length (cm); IL, initial lenght (cm).

$$SGR\ (\%) = (\ln FW - \ln IW) / T \times 100 \quad (5)$$

FW, final weight (g); IW, initial weight (g); T, number of days of rearing.

$$K\ (g/cm^3) = (BW \times 100) \times BL^{-3} \quad (6)$$

BW, body weight (g); BL, body lenght (cm).

2.7. Preparation of samples for metagenomic sequencing by NGS technology

At the end of the experiment, randomly selected fish (n = 15) were euthanized with overdose of MS-222 (Sigma - Aldrich, Saint Louis, USA) to collect intestinal content. The body surface of the fish was decontaminated with 70% isopropanol (Pol-aura, Olsztyn, Poland). The intestines were dissected under sterile conditions in laminar flow chamber (ESCO AC2–3E8-TU, Singapore) using sterile instruments. Intestinal content was collected into sterile tubes and stored at - 80°C for further analysis (Labfreez LFZ-86L340, Hunan, China) (Dulski et al., 2020). Approximately 100 mg of intestinal contents were collected for DNA isolation. Commercial DNA isolation kit Genomic Mini AX Stool (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) was used for DNA isolation. The isolation procedure was performed

using the manufacturer's protocol. The isolated DNA samples were secured and stored at −80°C. In order to control the quality of the isolated DNA, electrophoresis was performed in a 1% agarose gel. The amount of DNA was determined using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific Nanodrop One, Waltham, USA). After determining the quality and quantity of the isolated DNA, metagenomic sequencing analyzes of the samples based on the 16 S rRNA subunit were performed.

2.8. Sequencing and preparation of metagenomic libraries

NGS (Next-Generation Sequencing) sequencing was performed by an external company (Genomed S.A, Warsaw, Poland) using the Illumina protocol "16 S Metagenomic Sequencing Library Preparation" and the MiSeq Illumina system (Illumina, San Diego, CA, USA). Metagenomic analysis of bacterial and archaeal populations was conducted on the basis of the hypervariable region V3-V4 of the 16 S rRNA gene. Specific primer sequences 341 F and 785 R were used to amplify the selected region and prepare the library. PCR was performed using Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, England), reaction conditions were used as recommended by the manufacturer. Sequencing was performed in paired-end (PE) technology, 2×300 nt, using the Illumina v3 kit (Illumina, San Diego, CA, USA).

2.9. Bioinformatic analysis

Bioinformatics analysis ensuring the classification of reads to the species level was performed with the QIIME 2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) software package based on the Silva 138 reference sequence database (Bolyen et al., 2019). The DADA2 package was also used, which allowed for the separation of sequences of biological origin from those newly created in the sequencing process. DADA2 was used also for the isolation of unique sequences of biological origin - ASV (amplicon sequence varianat) (Callahan et al., 2016). The analysis was conducted in several stages. First, the quality of the readings was checked using the FIGARO tool (Sasada et al., 2020). Then, data processing was performed by removing adapter sequences and discarding too short reads. In the next stage, unique ASVs were selected through the denoising process, i.e., filtering out incorrect sequences, combining paired reads in paired-end mode, dereplication and filtering chimeras. In the final stage, the taxonomy was assigned to the ASV sequences based on the Silva database (Bolyen et al., 2019).

2.10. Statistical analysis

Growth parameters, i.e., WG, LG, SGR, K, SR and CF, were given as average results with standard deviation (SD). Statistical analyzes were performed using Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc.; Palo Alto, CA, USA). Normality and homogeneity of variance were evaluated using the Shapiro-Wilk and Leven tests. WG, LG, SGR and SR were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test at a significance level of $P < 0.05$, while CF was analyzed using Duncan's post-hoc test. The result of bioinformatics analyzes obtained using the QIIME2 software are reported as the mean result with standard deviation. The α-diversity metrics, i.e., Shannon, Simpson, Evenness and Chao-1, were calculated using the PAST 4.03 program (University of Oslo, Oslo, Norway), and statistically analyzed using the non-parametric Kruscal-Wallis test at the significance level of $P < 0.05$. The number of common and unique ASVs is shown in the Venn diagram (bioinformatics.psb.ugent.be). The β-diversity metrics were developed using the PAST4.03 program using PCoA (Principal Coordinate Analysis) analysis using the Bray-Curtis distance. In order to determine the diversity of the gut microbiome of each group, the relative abundance (%) of each occurring taxon was calculated and presented in graphs. Comparison of the groups in terms of number of taxa present in the gut microbiome was made using the one-way ANOVA test with the Ducan post-hoc test at the significance level of $P < 0.05$.

Table 2
Breeding indicators (mean ± SD) of post-fry and juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*) fed commercial feed in the control group and feed supplemented with sodium butyrate, β-glucan, and vitamins in research groups during a feeding experiment.

Breeding indicators	Groups				
	C	FQV1	FQV2	FQV3	FQV4
IW (g)	0.48 ± 0.17	0.48 ± 0.17	0.48 ± 0.17	0.48 ± 0.17	0.48 ± 0.17
IL (cm)	3.89 ± 0.45	3.89 ± 0.45	3.89 ± 0.45	3.89 ± 0.45	3.89 ± 0.45
WG (g)	7.62 ± 2.26 d	16.65 ± 6.17 a	13.12 ± 3.77 bc	12.20 ± 3.97c	16.15 ± 5.05 ab
LG (cm)	6.23 ± 1.00 d	8.74 ± 1.32 a	7.88 ± 1.05 bc	7.59 ± 1.07c	8.62 ± 1.24 ab
SGR (%/ day)	4.70 ± 0.33c	5.37 ± 0.33 a	5.15 ± 0.29 bc	5.07 ± 0.34c	5.37 ± 0.33 ab
K (CF/ fish)	0.76 ± 0.01 b	0.81 ± 0.01 ab	0.82 ± 0.02 ab	0.80 ± 0.01 ab	0.84 ± 0.03 a
SR (%)	80.00 ± 8.00 a	87.30 ± 4.60 a	90.70 ± 5.00 a	89.30 ± 3.10 a	90.70 ± 4.20 a
CF (%)	8.00 ± 5.30 a	0	0	1.30 ± 1.20 b	2.00 ± 0 b

C – control group, FQV1 - FQV4 – research groups.
Mean values in the same row marked with the same superscript are not significantly different ($P > 0.05$).
IW, initial weight; IL, initial length; WG, weight gain; LG, length gain; SGR, specific growth rate; K, condition factor; SR, survival rate; CF, cannibalism factor.

3. Results

3.1. Growth parameters

The weight gain (WG) of fish in research groups (FQV1 – FQV4) was significantly higher ($P < 0.05$) than in the control group (group C) (Table 2). The highest weight gain (WG) of the fish body at the end of the experiment was observed in groups FQV1 (16.65 ± 6.17 g) and FQV4 (16.15 ± 5.05 g) ($P < 0.05$). Fish from groups FQV1 and FQV4 also showed the highest value of body length gain (WL) after feeding with enriched feed, 8.74 ± 1.32 cm and 8.62 ± 1.24 cm, respectively ($P < 0.05$). The SGR was the highest in the FQV1 and FQV4 groups (both 5.37 ± 0.33%/ day), while the control group showed the lowest value of SGR (4.70 ± 0.33%/ day) ($P < 0.05$). The FQV4 group was also characterized by the highest value of the condition factor (K) (0.84 ± 0.03) ($P < 0.05$). Survival rate (SR) in all groups was similar (80.00 ± 8.00% for group C; 90.70 ± 5.00% for FQV2; 90.70 ± 4.20% for FQV4), without significant statistical differences ($P > 0.05$). At the end of the experiment, the highest cannibalism factor (CF) was observed in the control group (8.00 ± 5.30%), while the research groups were characterized by lower values (2.00 ± 0% for the FQV4; 0 for the FQV1 and FQV2) ($P < 0.05$) (Table 2).

The Fig. 1 shows the change in the average body weight and average body length (Fig. 1A and B, respectively) of the fish during the 4-week rearing of the African catfish fed with the enriched feed versus the control group. Fish from the FQV1 and FQV4 groups were characterized by the fastest growth rate compared to the FQV2 and FQV3 groups and the control group ($P < 0.05$). All research groups (FQV1 - FQV4) showed a faster increase in body length over time compared to the control group (C) ($P < 0.05$).

3.2. Sequencing data

Bioinformatics analyzes, based on Silva 138 database, allowed the classification of raw sequence reads to the species of microorganisms. As a result of the conducted analyses, a total of 823,859 sequence reads from all intestinal content samples (58,847.07 ± 12,194.25 reads) were taxonomically classified (Table 3). The use of the DADA2 package allowed to obtain 1846 ASV, which is 251.00 ± 136.45 on average per sample (Table 3). Regarding the groups, the highest observations index was shown in the FQV3 (320.50 ± 243.95) and FQV4 (304.67 ± 209.96), and the lowest in the FQV2 group (175.00 ± 20.07) (Table 3). The Shanonn, Simpson and Evenness indexes (indicating the species biodiversity of the microbiome of the analyzed samples) differed between the groups, however, these differences were not statistically significant ($P > 0.05$) (Table 3). The Chao-1 index, characterizing the species richness of microorganisms, showed the highest value in the FQV3 group (225.50 ± 100.76), and the lowest in the FQV2 group (138.33 ± 51.73), however, the statistical analysis did not show significant differences between the groups ($P > 0.05$) (Table 3).

The common and unique ASV characterizing the gut microbiome of tested fish were shown in the Venn diagram (Fig. 2). The number of common ASV sequence variances present in research groups (FQV1 – FQV4) and control (C) was 93. Unique ASVs specific to

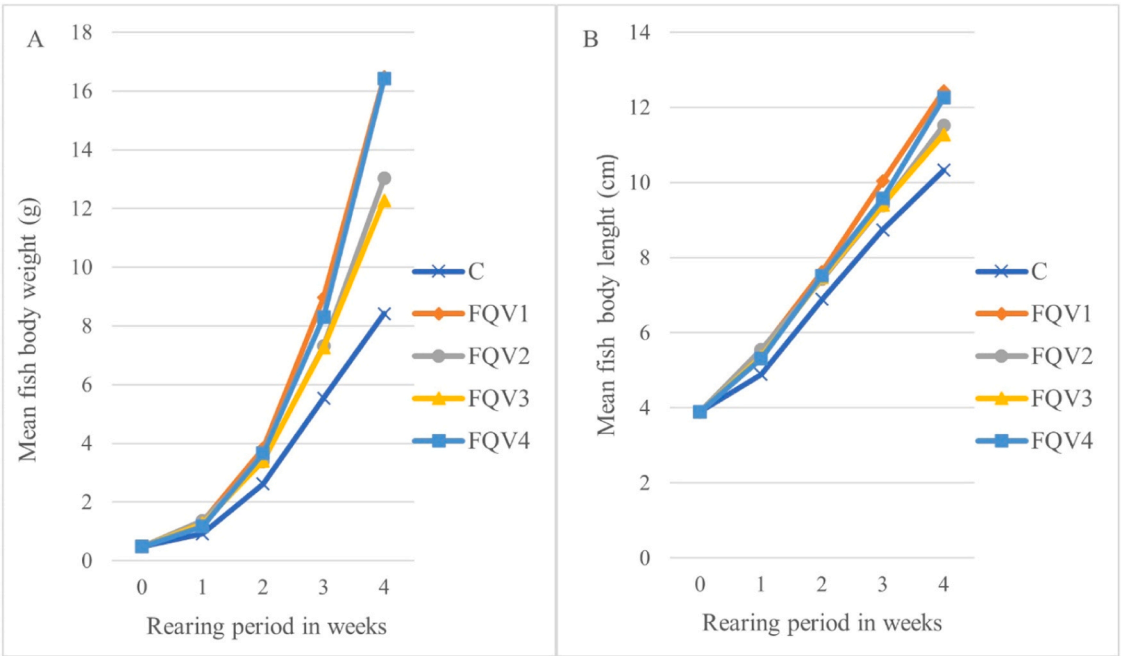


Fig. 1. Graphs of weight gain (A) and length gain (B) of body juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*) fed commercial feed in the control group and feed supplemented with sodium butyrate, β-glucan, and vitamins in research groups during a feeding experiment. C – control group, FQV1 - FQV4 – research groups.

Table 3
Results (mean ± SD) of bioinformatic analyzes of readings from sequencing DNA samples of intestinal content and α-diversity metrics of intestinal microbiome juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*) fed commercial feed in the control group and feed supplemented with sodium butyrate, β-glucan, and vitamins in research groups during a feeding experiment.

Group	Counts	Observations	Shannon index	Simpson index	Evenness index	Chao-1
C	41812.00±1138.89	202.33±63.14	3.04±0.78	084±0.15	0.15±0.07	161.33±52.20
FQV1	56222.00±8999.22	275.67±172.71	2.97±0.56	0.84±0.15	0.14±0.08	195.33±58.62
FQV2	61780.33±8645.87	175.00±20.07	2.82±0.66	0.80±0.01	0.14±0.03	138.33±51.73
FQV3	72670.50±2761.25	320.50±243.95	2.01±0.78	0.60±0.14	0.04±0.10	225.50±100.76
FQV4	66358.33±8452.95	304.67±209.96	3.24±0.87	0.86±0.14	0.15±0.08	214.67±87.81
Total number of counts taxonomically classified			823859.00			
Mean number of counts per sample			58847.07 ± 12194.25			
Total number of ASV			1846.00			

C – control group, FQV1 -FQV4 – research groups.

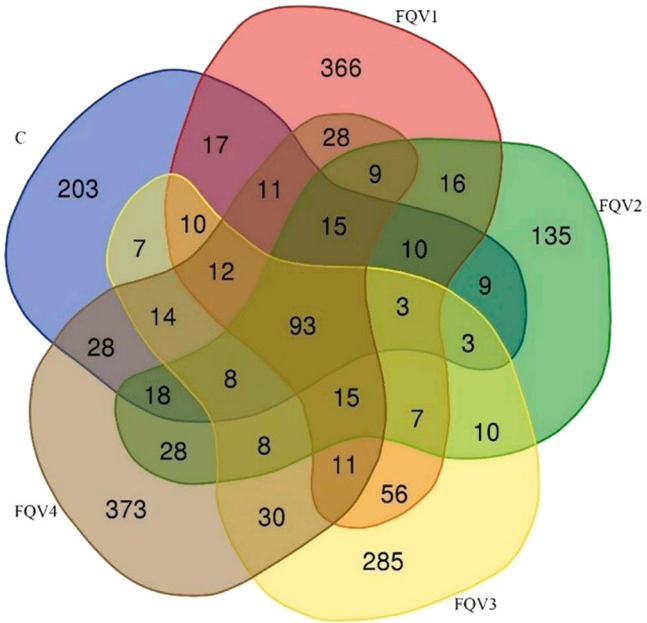


Fig. 2. Venn diagram showing common and unique ASVs characterizing the intestinal microbiome of juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*) fed commercial feed in the control group and feed supplemented with sodium butyrate, β-glucan, and vitamins in research groups during a feeding experiment. C – control group, FQV1 - FQV4 – research groups.

the group ranged from 135 to 373. The highest number of ASVs was observed in FQV1 groups (366) and FQV4 (373).

3.3. Gut microbiome

Based on the obtained data, the gut microbiome of fish fed with feed with various levels of active ingredients at the *Phylum* and *Genus* level were determined (Fig. 3A and B). In each research group (FQV1 – FQV4) and the control group (C) *Firmicutes* dominated, the number ranged from 44.52% (FQV4) to 75.76% (FQV3). In addition, there were also *Proteobacteria* (14.66–30.65%; FQV3 - FQV4 groups, respectively), *Actinobacteriota, Fusobacteriota, Dependentiae* (Fig. 3A). Fig. 3B shows the relative abundance (%) of bacteria at the *Genus* level. *Lactococcus* was present in all groups, but the highest abundance was found in the FQV3 (59.66%), and the smallest in the C group (12.29%), in the remaining groups the relative abundance of *Lactococcus* was as follows: FQV1 – 13.95%, FQV2 – 28.67%, FQV4 – 36.14% ($P < 0.05$). *Lactobacillus* was present in all research groups and in the control group, its highest abundance was in the FQV1 (27.08%), and the lowest in the FQV3 (0.87%). Moreover, *Bacillus* was present in all groups, ranging from 0.85% (FQV3) to 20.13% (FQV2) ($P < 0.05$). *Staphylococcus, Cetobacterium* and *Vermiphilaceae* were also observed in all groups, ranging from 0.65% (FQV1) to 13.02% (FQV3) for Staphylococcus, from 0.52% (FQV3) to 7.48% (C) for *Cetobacterium*, from 1.12% (FQV3) to 3.96% (C) for *Vermiphilaceae*. In the control group (C) a high abundance of *Candidatus Arthromitus* was observed (29.25%) ($P < 0.05$). These microorganisms were also present in experimental groups, but in smaller abundance. The lowest number of them was observed in the FQV4 group (0.18%) ($P < 0.05$). In addition, the presence of *Bosea, Phreatobecter* and *Rhodobacter* at the level of few percent was also demonstrated.

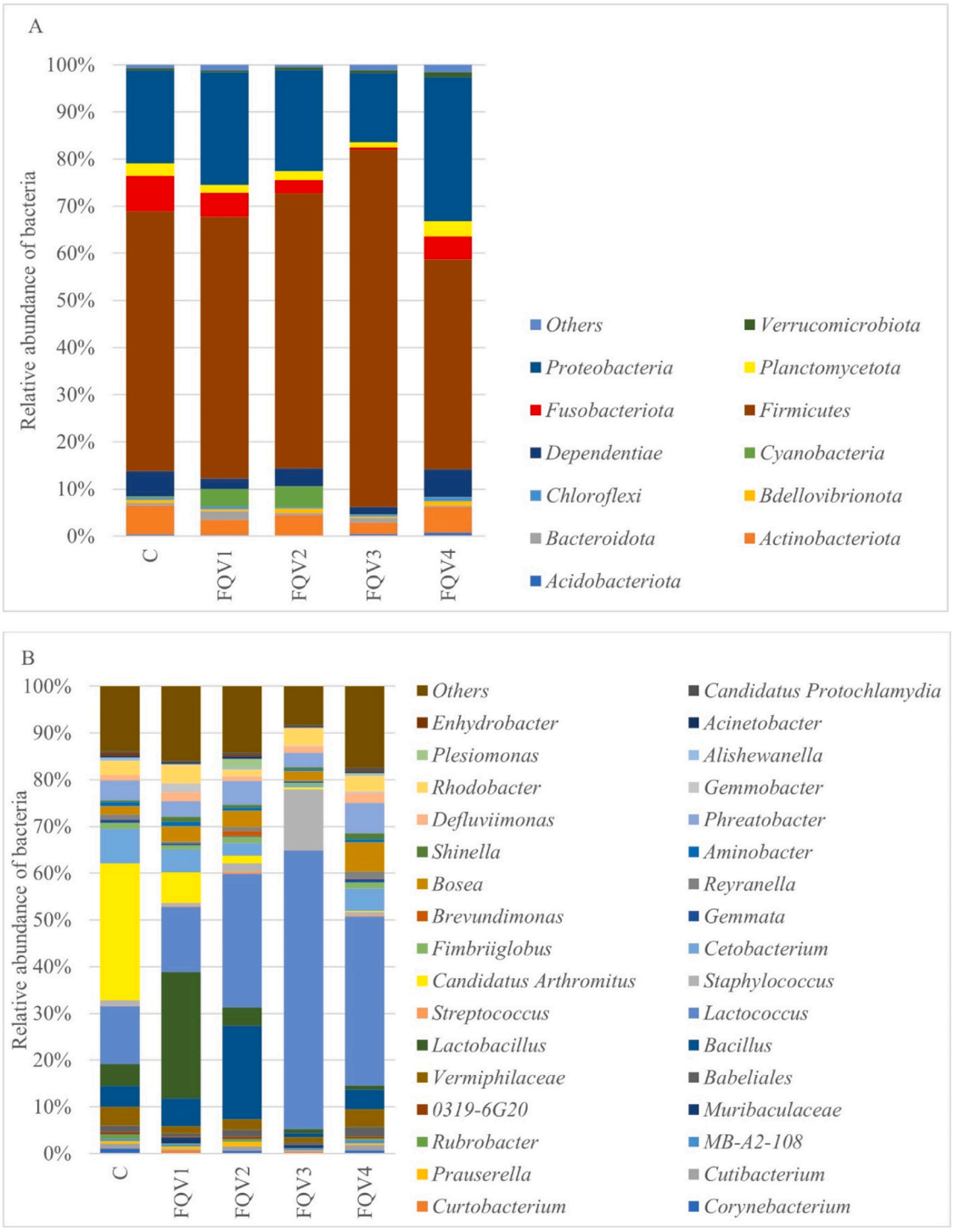


Fig. 3. Relative abundance of bacteria (%) at *Phylum* (A) and *Genus* (B) level in the intestinal microbiome of juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*) fed commercial feed in the control group and feed supplemented with sodium butyrate, β-glucan and vitamins in research groups during a feeding experiment. Bacteria less than 0.5% are summarized and labeled as "others". C – control group, FQV1 - FQV4 – research groups.

Table 4 presents bacteria that differed significantly in terms of the mean number in each group ($P < 0.05$). *Prauserella, Bacillus* and *Acinetobacter* were most frequently observed in the FQV2 group compared to the other groups. However, *Lactococcus* was most common in groups FQV3 and FQV4. *Bosea* and *Sinella* were most frequently observed in the FQV4 group. *Candidatus Arthromitus* was statistically most common in the control group compared to the other groups ($P < 0.05$).

Table 4
Average number of bacteria on *Genus* level detected in the intestinal microbiome juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*) fed commercial feed in the control group and feed supplemented with sodium butyrate, β-glucan and vitamins in research groups during a feeding experiment. The table shows only *Genus*, that differed significantly between the groups.

Genus	Groups				
	C	FQV1	FQV2	FQV3	FQV4
Prauserella	232.33 b	263.33 b	583.67 a	46.67 b	245.00 b
Bacillus	1926.33 ab	3065.67 ab	12686.67 a	553.33 b	2642.33 ab
Lactococcus	5147.33 b	7591.00 b	18513.67 b	48344.33 a	24661.33 ab
Candidatus Arthromitus	12134.67 a	3135.67 ab	959.00 b	194.33 b	115.67 b
Bosea	788.00 b	1675.67 ab	1980.00 ab	1658.33 ab	4090.67 a
Shinella	196.67 b	585.67 ab	370.00 ab	416.00 ab	791.67 a
Acinetobacter	132.67 ab	128.67 ab	435.00 a	19.67 b	147.33 ab

C – control group, FQV1 – FQV4 – research groups.
The table shows only *Genus*, that differed significantly between the groups.
Mean values in the same row marked with the same superscript are not significantly different (P >0.05).

The β-diversity analysis was performed using the Bray-Curtis distance measure. The obtained data was used to perform PCoA analysis, the results are shown in the graph (Fig. 4). The analysis shows that groups FQV1, FQV2 and the control group show a similar profile of the intestinal microbiome. However, the FQV3 group and the FQV4 group show a different microbiota composition compared to the other groups.

4. Discussion

Present research shows that supplementing the diet of juvenile African catfish with preparations consisting of sodium butyrate, β-glucan and vitamins (FishQuatro) in various proportions had a beneficial effect on growth parameters such as WG, WL, SGR, condition factor (K) and cannibalism (CF) when breeding this species. There was no significant effect of supplementation on the survival of the examined fish, but in the control group it was on average 9.5% lower than in the research groups. The FQV1 supplementation variant (combination of sodium butyrate at a dose of 50 mg/kg of feed and β-glucan at a dose of 20 mg/kg of feed with additional vitamins (C, A, D_3, E, K) had the most beneficial effect on the improvement of growth parameters. These studies have also shown a positive effect of FQV1 supplementation on the intestinal microbiome profile of juvenile African catfish. Enrichment of the feed resulted in an increase in the number of probiotic bacteria such *as Lactococcus* and *Lactobacillus*. It probably also resulted in a reduction in the number of potentially pathogenic bacteria, such as *Candidatus Arthromitus*, which are much more common in the control group than in the study groups.

Scientists are constantly looking for other solutions to modulate resistance to common pathogens found in aquaculture. These include the use of probiotics, prebiotics that support the functioning of the microbiome, herbs and other substances of natural origin.

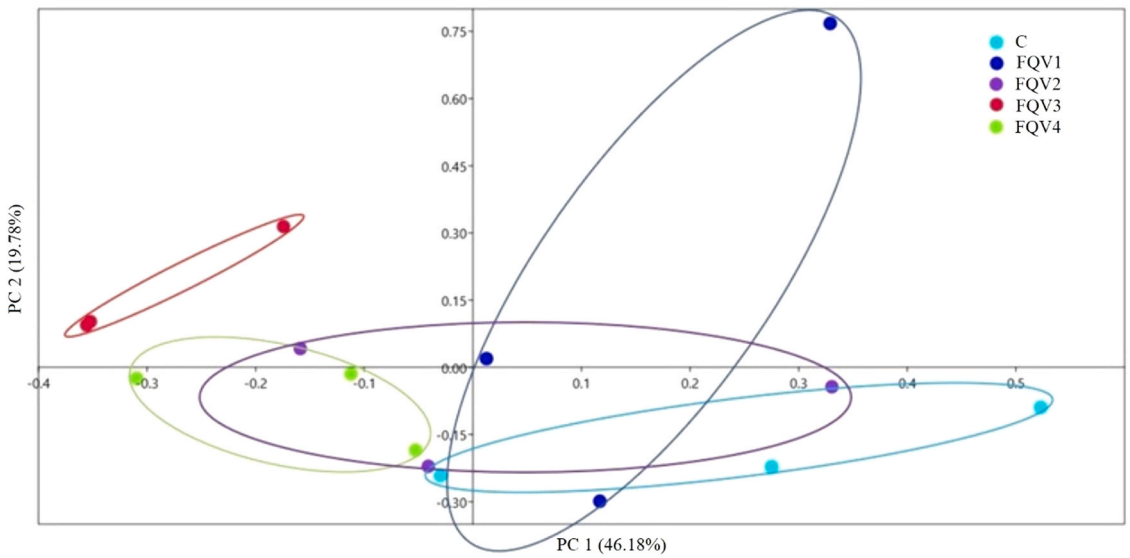


Fig. 4. Principal Coordinate Analysis (PCoA) using the Bray-Curtis distance of the intestinal microbiome of juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*) fed commercial feed in the control group and feed supplemented with sodium butyrate, β-glucan and vitamins in research groups during a feeding experiment. Points of the same color mean individuals from the same group. C – control group, FQV1 - FQV4 – research groups.

(Jami et. al. 2019; Souza et al., 2020; Hoseinifar et al., 2020; Mohammadian et al., 2019; Abdel- Latif et al., 2020b). Many studies also focus on the search for new dietary supplements that improve both the growth and immune parameters of African catfish. Many authors obtain similar results showing the positive impact of natural ingredients supplemented in feed on the general physiological condition of fish and other animals. Kari et al. (2021) sought an alternative to fishmeal commonly used in African catfish feed. The use of fermented soybean pulp in the amount of 50% fishmeal in African catfish feed resulted in a significant increase body weight, SGR and condition factor. Research on African catfish diet supplementation was also conducted by Gabriel et al. (2021), they supplemented the feed with *aloe-vera* and garlic extracts. This supplementation caused an acceleration of the growth rate and SGR compared to the non-supplemented group. The possibility of supplementing the African catfish diet with prebiotics such as FOS (fructooligosaccharides), MOS (mannanoligosaccharides), GOS (galactooligosaccharides) was also investigated, and the obtained results prove that the addition of MOS to the diet has a positive effect on the growth efficiency and length of the intestinal villi of African catfish (Genc et al., 2020).

Other authors, examining the impact of individual compounds included in FishQuatro (sodium butyrate and β-glucan), come to similar conclusions regarding their impact on fish growth parameters (2020; Luz et al., 2019; Abdel-Tawwab et al., 2021). Studies conducted on juvenile Pengze crucian carp (*Carassius auratus var. pengze*) have shown that a sodium butyrate content of 2000 mg/kg of feed improves the WG and SGR of the tested fish after a period of enriched nutrition (Fang et al., 2021). Consistent results were also obtained by other authors examining the effect of sodium butyrate added to feed on growth, e.g. juvenile Nile tilapia and arapaima fish *(Arapaima gigas*). It was concluded that enrichment of feed with sodium butyrate at a dose of 1200 mg/kg of feed causes the best effects of body weight gain (WG) and SGR. In addition, an increase in the survival rate of the tested fish was also observed after the period of enriched feeding (Urach et al., 2020; Luz et al., 2019). The possibility of using other forms of sodium butyrate, e.g., in the form of nanoparticles, to enrich the feed for juvenile Nile tilapia was also investigated. Nanoparticle content of 1.0 – 1.5 mg/kg in the basic feed was found to have a significant effect on final body weight and SGR (Abdel-Tawwab et al., 2021). Similar studies were conducted by Monier et al. (2022) where analyzing the effect of sodium butyrate nanoparticles on the growth efficiency of Nile tilapia. The obtained results confirm that the dose of sodium butyrate nanoparticles at the level of 1.0–2.5 mg/kg of feed has a positive effect on the growth parameters, i.e. SGR and body weight gain (WG) of the tested fish. In addition, the effect of other forms of sodium butyrate e.g., microencapsulated sodium butyrate, on growth and morphometric parameters was also studied. The research concluded that the form of sodium butyrate in the capsule improves growth efficiency and has a positive effect on increasing the density of intestinal microvilli in common carp (Liu et al., 2014).

The literature also widely describes the use of β-glucan as a single supplementation or in combination with other substances and probiotics to enrich the basic diet of farmed fish (Aramli et al., 2015; Do Huu et al., 2016; Jami et al., 2019, 2015). Among other things, research was conducted on dietary supplementation of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) pompano fish (*Trachinotus ovatus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). It turns out that the introduction of 0.1–0.2% β-glucan into the feed significantly improves growth parameters, i.e., final body weight and SGR, and also significantly affects the survival rate (Aramli et al., 2015; Do Huu et al., 2016; Khanjani et al., 2021a). The effect of dietary supplementation with β-glucan of such fish species as Caspian trout (*Salmo trutta caspius*), common carp or red sea bream (*Pagrus major*) was also studied. Feed enrichment with β-glucan in combination with other ingredients and *Lactobacillus* probiotics also improves growth parameters such as final body weight, SGR and condition factor (Jami et al., 2019; Mohammadian et al., 2019; Dawood et al., 2015).

The improvement of the animals growth parameters, including WG and SGR, after the use of butyric acid salts in combination with β-glucan as a feed additive may be caused for several reasons. SCFAs (Short-Chain Fatty Acids), which includes butyric acid, provide a source of energy for enterocytes, enabling their regeneration. In addition, butyric acid improves the proliferation of intestinal epithelial cells by increasing the height of the intestinal villi. The result is improved absorption of nutrients contained in the feed (Liu et al., 2014; Abdel-Latif et al., 2020). Additionally, butyric acid or sodium butyrate has the ability to improve the bioavailability of nutrients contained in the diet. Administration of butyric acid reduces acidity in the intestines, which enables chelation of minerals and dephosphorylation of phytic acid from plant protein sources. After these transformations, the bioavailability of minerals increases (i.e. phosphorus, zinc, calcium) (Hoseinifar et al., 2017). SCFAs also prevent the oxidation of some amino acids, which results in the absorption of these ingredients in the fish intestines, increasing their bioavailability (Ng and Koh, 2017). An additional advantage of administering sodium butyrate or butyric acid is improved feed digestibility caused by stimulation of the exocrine function of the pancreas. Increasing the secretion of digestive enzymes, i.e. amylase and lipase, facilitates the digestion and absorption of nutrients contained in the feed (Ahsan et al., 2016). β-glucan, as a prebiotic belonging to polysaccharides, in addition to its immunostimulating properties, is a nutrient for probiotic bacteria living in the digestive system of animals (Khanjani et al., 2021b). As a result of fermentation by intestinal microorganisms, β-glucan is transformed into SCFAs, which improve intestinal function (Reyes-Becerril et al., 2020). In a study conducted by Cao et al. (2019) and Dawood et al. (2020d) showed that enriching the fish diet with β-glucan increases the length and width of intestinal villi, which improves the absorption of nutrients. Moreover, β-glucan supports the intestinal barrier function, stimulates intestinal immune cells and has a positive effect on the intestinal microbiome, reducing the toxicity of pathogens and promoting the growth of probiotic bacteria (Jayachandran et al., 2018). Due to the above, it can be concluded that the main role of β-glucan is primarily to support animal immunity, which may also indirectly improve breeding indicators. The use simultaneously of both sodium butyrate and β-glucan in present study with proven beneficial effects on growth parameters resulted in significant weight increases of juvenile Afican catfish. The 4-week period of rearing fish with a diet enriched with FishQuatro turned out to be sufficient to demonstrate a significant positive effect of the FishQuatro supplement on growth performance.

Scientific research proves the significant importance of biodiversity and species richness of the microbiome in the fight against diseases and pathogens that threaten health (Wah-Suárez et al., 2022; Li et al., 2022; Morgan et al., 2013; Hitch et al., 2022). The α-diversity index (Simpson, Shanonn, Evenness, Chao-1) and the number of unique ASVs testify to the greatest species biodiversity of

the intestinal microbiome in the FQV4 group. Obtained by Bozzi et al. (2021) results allow to conclude that the high biodiversity of the intestinal microbiome population is conducive to the cooperation of microorganisms in the intestinal community in the event of a disease state. The interaction affects the modulation of the immune response and the increase in the resistance of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). In the control group, microorganisms of the genus *Candidatus* were observed, which can be dangerous pathogens that cause inflammation in the body. This is a new group of potential fish pathogens that have been isolated from rainbow trout with symptoms of gastroenteritis and Atlantic salmon with bronchitis (Del-Pozo et al., 2009; Austin, 2011). From the many scientific studies conducted by Gupta et al. (2019) and Foysal et al. (2020) shows that (LAB) can modulate and influence the interaction in the microbiome, leading to the displacement of pathogenic bacteria including *Candidatus Arthromitus*. Additionally, a higher percentage of *Bacillus* was observed in the FQV2 than in the other groups and the control group. Bacteria of this type seem to be an ideal probiotic for aquaculture applications, because they prevent the development of pathogens, and improve the assimilation of nutrients, thereby increasing the profitability of farming (Olmos et al., 2020). Numerous scientific studies report on the positive effect of dietary supplementation with organic acids or their salts, i.e., butyric acid or its sodium salt, on the intestinal microbiome of aquaculture animals. For example, Tian et al. (2017) present the positive effect of sodium butyrate on the microbiota of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). According to their research, sodium butyrate in the diet causes an increase in the number of *Lactobacillus*, while reducing *Aeromonas* and *Escherichia coli*. Adbel-Mohsen et al. (2018) also reached similar conclusions examining the effect of enriching the diet of fry European seabass (*Dicentrachus labrax*) with sodium butyrate. The research shows that the addition of sodium butyrate causes bacterial balance by supporting probiotic bacteria and inhibiting the growth of pathogens in the intestines. Comparable results are obtained by the authors examining the possibility of using β-glucan as a supplement modulating the immune response. Carballo et al. (2019) using yeast β-glucan as a dietary supplement for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) notice a positive effect in the form of a significant reduction in the number of pathogenic bacteria *Vibrio sp*. Similar conclusions on the impact of β-glucan are also reached by authors dealing with the breeding of other animals e.g., yellow-feathered broilers. Research on broilers proves the positive effect of β-1,3/1,6-glucan in the diet on the intestinal microbiome profile. β-glucan supports the growth of beneficial bacteria like *Alistipes, Bacteroides* and *Faecalibacterium* (Wang et al., 2022).

High doses of sodium butyrate and β-glucan used by other authors are probably the result of enriching the diet with sodium butyrate or glucan only. FishQuatro is a complex multi-ingredient composition, so the concentration of individual ingredients does not have to be so high. This also affects the economic aspect, reducinging the price of the product. The combination of all ingredients has a positive effect on the development and diversity of the intestinal microbiome of fish, which directly affects the increase in the value of growth indicators. Faster growth of fish can be obtained without increasing the feed input. This study shows that after using FishQuatro, during a four-week rearing period, an average of 2.2 times greater weight gains of reared fish was obtained compared to the control group. Presumably, the increase in the diversity of the intestinal microbiome had a positive effect on the more efficient use of feed (absorption). In addition, economic aspects are also important here. Lower content of active substances translates into lower production costs of the preparation, and this affects the final price of the product.

5. Conclusions

The obtained research results lead to the conclusion that a carefully selected composition of active ingredients such as sodium butyrate, β-glucan and vitamins used in the diet of juvenile African catfish causes a number of benefits. FishQuatro favorably accelerates the growth rate while having a positive effect on the species profile and biodiversity of the microbiome. The results obtained in these studies suggest that it is justified to conduct additional research in the future on the impact of the FishQuatro addition on the immune parameters of fish. This will expand knowledge about the impact of this feed additive on the fish's body. Improvement of immunity may increase the efficiency of breeding by reducing the occurrence of infectious disease outbreaks.

The best results were achieved with the use of FQV1 supplementation with the lowest raw material costs of this variant. The proposed supplementation may become an excellent complementary supplement in modern aquaculture, thanks to its impact on many health aspects of fish. Despite the positive results obtained, the proposed composition should be evaluated on other species of farmed fish in order to check the universality of this product.

Funding

Work carried out as part of the implementation doctorate program (4th edition) financed by the Polish Ministry of Education and Science (application number: 486036, contract number: DWD/4/80/2020).

CRediT authorship contribution statement

Michał Krzysztof Łuczyński: Conceptualization, Resources, Supervision, Writing – review & editing. **Joanna Nowosad:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Szymon Jasiński:** Data curation, Formal analysis. **Martyna Arciuch-Rutkowska:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Visualization, Writing – original draft. **Dariusz Kucharczyk:** Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The Authors declare no competing financial interest. All Authors have read and agreed to the submitted version of the manuscript. The content of the manuscript has not been published or submitted for publication elsewhere.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Dean of the Faculty of Animal Bioengineering, Professor Urszula Czarnik, for agreeing to use the rooms and equipment at the Center for Aquaculture and Ecological Engineering, UWM in Olsztyn.

References

Abdel-Latif, H.M.R., Abdel-Tawwab, M., Dawood, M.A.O., Menanteau-Ledouble, S., El-Matbouli, M., 2020. Benefits of dietary butyric acid, sodium butyrate, and their protected forms in aquafeeds: a review. Rev. Fish. Sci. Aquac. 28 (4), 421–448. https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1758899.

Abdel-Latif, H.M.R., Shukry, M., Saad, M.F., Mohamed, N.A., Nowosad, J., Kucharczyk, D., 2021. Effects of GnRHa and hCG with or without dopamine receptor antagonists on the spawning efficiency of African catfish (*Clarias gariepinus*) reared in hatchery conditions. Anim. Reprod. Sci. 231, 106798 https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106798.

Abdel-Latif, H.M.R., Dawood, M.A.O., Alagawany, M., Faggio, C., Nowosad, J., Kucharczyk, D., 2022c. Health benefits and potential applications of fucoidan (FCD) extracted from brown seaweeds in aquaculture: An updated review. Fish. Shellfish Immunol. 122, 115–130. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.01.039.

Abdel-Latif, H.M.R., Abdel Daim, M., Shukry, M., Nowosad, J., Kucharczyk, D., 2022a. Benefits and applications of *Moringa oleifera* as a plant protein source in Aquafeed: A review. Aquaculture 547, 737369. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737369.

Abdel-Latif, H.M.R., El-Ashram, S., Yilmaz, S., Naiel, M.A.E., Kari, Z.A., Khalidah, N., Hamid, N.K.A., Dawood, M.A.O., Nowosad, J., Kucharczyk, D., 2022b. The effectiveness of *Arthrospira platensis* and microalgae in relieving stressful conditions affecting finfish and shellfish species: An overview. Aquac. Rep. 24, 101135 https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101135.

Abdel-Latif, H.M.R., Yilmaz, S., Kucharczyk, D., 2023. Functionality and applications of phytochemicals in aquaculture nutrition. Front. Vet. Sci. 10, 1218542 https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1218542.

Abdel-Mohsen, H., Wassef, E., El-Bermawy, N., Abdel-Meguid, N., Saleh, N., Barakat, K., Shaltout, O., 2018. Advantageous effects of dietary butyrate on growth, immunity response, intestinal microbiota and histomorphology of European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) fry. Egypt J. Aquat. Biol. Fish. 22 (4), 93–110. https://doi.org/10.21608/ejabf.2018.12055.

Abdel-Tawwab, M., Shukry, M., Farrag, F.A., El-Shafai, N.M., Dawood, M.A.O., Abdel-Latif, H.M.R., 2021. Die]tary sodium butyrate nanoparticles enhanced growth, digestive enzyme activities, intestinal histomorphometry, and transcription of growth-related genes in Nile tilapia juveniles. Aquaculture 536, 736467. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736467.

Ahmad, A., Anjum, F.M., Zahoor, T., Nawaz, H., Dilshad, S.M., 2012. Beta Glucan: A Valuable Functional Ingredient in Foods. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 52 (3), 201–212. https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499806.

Ahsan, U., Cengiz, Ö., Raza, I., Kuter, E., Chacher, M.F.A., Iqbal, Z., Umar, S., Çakir, S., 2016. Sodium butyrate in chicken nutrition: the dynamics of performance, gut microbiota, gut morphology, and immunity. Worlds Poult. Sci. J. 72 (2), 265–275. https://doi.org/10.1017/S0043933916000210.

Aramli, M.S., Kamangar, B., Nazari, R.M., 2015. Effects of dietary β-glucan on the growth and innate immune response of juvenile Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. Fish. Shellfish Immunol. 47 (1), 606–610. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.10.004.

Austin, B., 2011. Taxonomy of bacterial fish pathogens. Vet. Res. 42 (1), 20. https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-20.

Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J.E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C.J., Brown, C.T., Callahan, B.J., Caraballo-Rodríguez, A.M., Chase, J., Cope, E.K., Da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P.C., Douglas, G.M., Durall, D.M., Duvallet, C., Edwardson, C.F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J.M., Gibbons, S.M., Gibson, D.L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G.A., Janssen, S., Jarmusch, A.K., Jiang, L., Kaehler, B.D., Kang, K.B., Keefe, C. R., Keim, P., Kelley, S.T., Knights, D., Koester, I., Kosciolek, T., Kreps, J., Langille, M.G.I., Lee, J., Ley, R., Liu, Y.X., Loftfield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B.D., McDonald, D., McIver, L.J., Melnik, A.V., Metcalf, J.L., Morgan, S.C., Morton, J.T., Naimey, A.T., Navas-Molina, J.A., Nothias, L.F., Orchanian, S.B., Pearson, T., Peoples, S.L., Petras, D., Preuss, M.L., Pruesse, E., Rasmussen, L.B., Rivers, A., Robeson, M.S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S.J., Spear, J.R., Swafford, A.D., Thompson, L.R., Torres, P.J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P.J., Ul-Hasan, S., van der Hooft, J.J. J., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., von Hippel, M., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K.C., Williamson, C.H.D., Willis, A.D., Xu, Z. Z., Zaneveld, J.R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R., Caporaso, J.G., 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nat. Biotechnol. 37 (8), 852–857. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9.

Bozzi, D., Rasmussen, J.A., Carøe, C., Sveier, H., Nordøy, K., Gilbert, M.T.P., Limborg, M.T., 2021. Salmon gut microbiota correlates with disease infection status: potential for monitoring health in farmed animals. Anim. Micro 3 (1), 30. https://doi.org/10.1186/s42523-021-00096-2.

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nat. Methods 13, 581–583. https://doi.org/10.1038/nmeth.3869.

Cao, H., Yu, R., Zhang, Y., Hu, B., Jian, S., Wen, C., Kajbaf, K., Kumar, V., Yang, G., 2019. Effects of dietary supplementation with β-glucan and *Bacillus subtilis* on growth, fillet quality, immune capacity, and antioxidant status of Pengze crucian carp (*Carassius auratus var. Pengze*). Aquaculture 508, 106–112. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.064.

Carballo, C., Pinto, P.I.S., Mateus, A.P., Berbel, C., Guerreiro, C.C., Martinez-Blanch, J.F., Codoñer, F.M., Mantecon, L., Power, D.M., Manchado, M., 2019. Yeast β-glucans and microalgal extracts modulate the immune response and gut microbiome in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Fish. Shellfish Immunol. 92, 31–39. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.05.044.

Chen, W., Gao, S., Chang, K., Zhao, X., Niu, B., 2023. Dietary sodium butyrate supplementation improves fish growth, intestinal microbiota composition, and liver health in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) fed high-fat diets. Aquaculture 564, 739040. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739040.

Dawood, M.A.O., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., 2015. Interaction effects of dietary supplementation of heat-killed *Lactobacillus plantarum* and b-glucan on growth performance, digestibility and immune response of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. Fish. Shellfish Immunol. 45 (1), 33–42. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.033.

Dawood, M.A.O., Metwally, A.E.-S., El-Sharawy, M.E., Atta, A.M., Elbialy, Z.I., Abdel-Latif, H.M.R., Paray, B.A., 2020b. The role of β-glucan in the growth, intestinal morphometry, and immune-related gene and heat shock protein expressions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under different stocking densities. Aquaculture 523, 735205. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735205.

Dawood, M.A.O., Moustafa, E.M., Elbialy, Z.I., Farrag, F., Lolo, E.E.E., Abdel-Daim, H.A., Abdel- Daim, M.M., Van Doan, H., 2020c. *Lactobacillus plantarum* L-137 and/or β-glucan impacted the histopathological, antioxidant, immune-related genes and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against Aeromonas hydrophila. Res. Vet. Sci. 130, 212–221. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.03.019.

Dawood, M.A.O., Metwally, A., El-Sharawy, M.E., Atta, A.M., Elbialy, Z.I., Abdel-Latif, H.M.R., Paray, B.A., 2020d. The role of β-glucan in the growth, intestinal morphometry, and immune-related gene and heat shock protein expressions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under different stocking densities. Aquaculture 523, 735205. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735205.

Dawood, M.A.O., Eweedah, N.M., Moustafa, E.M., Shahin, M.G., 2020a. Synbiotic Effects of *Aspergillus oryzae* and β-Glucan on Growth and Oxidative and Immune Responses of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Probiotics Antimicrob. Proteins 12 (1), 172–183. https://doi.org/10.1007/s12602-018-9513-9.

Del-Pozo, J., Crumlish, M., Ferguson, H.W., Turnbull, J.F., 2009. A retrospective cross-sectional study on "*Candidatus arthromitus*" associated rainbow trout gastroenteritis (RTGE) in the UK. Aquaculture 290, 22–27. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.009.

Do Huu, H., Sang, M.H., Thanh Thuy, N.T., 2016. Dietary b-glucan improved growth performance, *Vibrio* counts, haematological parameters and stress resistance of pompano fish, *Trachinotus ovatus Linnaeus*, 1758. Fish. Shellfish Immunol. 54, 402e410. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.161.

Domenico, J.D., Canova, R., Soveral, L. de F., Nied, C.O., Costa, M.M., Frandoloso, R., Kreutz, L.C., 2017. Immunomodulatory effects of dietary β-glucan in silver catfish (*Rhamdia quelen*). Pesq. Vet. Bras. 37 (1), 73–78. https://doi.org/10.1590/S0100-736×2017000100012.

Dulski, T., Kozłowski, K., Ciesielski, S., 2020. Habitat and seasonality shape the structure of tench (*Tinca tinca L.*) gut microbiome. Sci. Rep. 10 (1), 4460. https://doi.org/10.1038/s41598-020-61351-1.

El-Asely, A.M., Abbass, A.A., Austin, B., 2014. Honey bee pollen improves growth, immunity and protection of Nile tilapia (Oreochromis niloticus) against infection with Aeromonas hydrophila. Fish. Shellfish Immunol. 40, 500–506. https://doi.org/10.3390/ani13010132.

Fang, L., Wang, Q., Guo, X., Pan, X., Li, X., 2021. Effects of dietary sodium butyrate on growth performance, antioxidant capacity, intestinal histomorphology and immune response in juvenile Pengze crucian carp (*Carassius auratus Pengze*). Aquac. Rep. 21, 100828 https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100828.

FAO, 2014. Fishery and Aquaculture Statistics. Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

FAO, 2016a. The State of World Fisheries and Aquaculture-Contributing to food security and nutrition for all. Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

FAO, 2016b. Cultured Aquatic Species Information Programme: Clarias gariepinus. Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome.

FAO, 2017. Fishery and Aquaculture Statistics. Global Aquaculture Production 1950-2015 (FishstatJ). Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

FAO, 2023. Cultured Aquatic Species Fact Sheets: Cultured Aquatic Species Information Programme Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, Rome.

Foysal, M.J., Fotedar, R., Siddik, M.A.B., Tay, A., 2020. *Lactobacillus acidophilus* and L. plantarum improve health status, modulate gut microbiota and innate immune response of marron (*Cherax cainii*). Sci. Rep. 10 (1), 5916. https://doi.org/10.1038/s41598-020-62655-y.

Gabriel, N.N., Wilhelm, M.R., Habte-Tsion, H.M., Chimwamurombe, P., Omoregie, E., 2021. The effects of dietary garlic (*Allium sativum*) and *Aloe vera* crude extract mixtures supplementation on growth performance, feed utilization, hematological parameters, whole body composition, and survival at low pH in African catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles. Sci. Afr. 11, e00671 https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00671.

Genc, E., Genc, M.A., Kaya, D., Secer, F.S., Qaranjiki, A., Güroy, D., 2020. Effect of prebiotics on the growth performance, hematological, biochemical and histological parameters of African catfish (*Clarias gariepinus*) in recirculating aquaculture system. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 44, 1222–1231. https://doi.org/10.3906/vet-2005-106.

Gupta, S., Fečkaninová, A., Lokesh, J., Koščová, J., Sørensen, M., Fernandes, J., Kiron, V., 2019. *Lactobacillus* Dominate in the Intestine of Atlantic Salmon Fed Dietary Probiotics. Front. Microbiol. 11 (9), 3247 doi:.3389/fmicb.2018.03247.

Hitch, T.C.A., Hall, L.J., Walsh, S.K., Leventhal, G.E., Slack, E., de Wouters, T., Walter, J., Clavel, T., 2022. Microbiome-based interventions to modulate gut ecology and the immune system. Mucosal Immunol. 15 (6), 1095–1113. https://doi.org/10.1038/s41385-022-00564-1.

Hoseinifar, H.S., Sun, Y., Zhou, Z., Van Doan, H., Davies, S.J., Harikrishnan, R., 2020. Boosting Immune Function and Disease Bio-Control Through Environment-Friendly and Sustainable Approaches in Finfish Aquaculture: Herbal Therapy Scenarios. Rev. Fish. Sci. Aquac. 28 (3), 303–321. https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1731420.

Hoseinifar, S.H., Sun, Y.Z., Caipang, C.M., 2017. Short-chain fatty acids as feed supplements for sustainable aquaculture: an updated view. Aquac. Res. 48 (4), 1380–1391. https://doi.org/10.1111/are.13239.

Jami, M.J., Kenari, A.A., Paknejad, H., Mohsenic, M., 2019. Effects of dietary b-glucan, mannan oligosaccharide, *Lactobacillus plantarum* and their combinations on growth performance, immunity and immune related gene expression of Caspian trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877). Fish. Shellfish Immunol. 91, 202–208. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.05.024.

Jayachandran, M., Chen, J., Chung, S.S.M., Xu, B., 2018. A critical review on the impacts of β-glucans on gut microbiota and human health. J. Nutr. Biochem. 6, 101–110. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.06.010.

Kari, Z.A., Kabir, M.A., Mat, K., Rusli, N.D., Razab, M.K.A.A., Ariff, N.S.N.A., Edinur, H.A., Rahim, M.Z.A., Pati, S., Dawood, M.A.O., Wei, L.S., 2021. The possibility of replacing fish meal with fermented soy pulp on the growth performance, blood biochemistry, liver, and intestinal morphology of African catfish (*Clarias gariepinus*). Aquac. Rep. 21, 100815 https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100815.

Khanjani, M.H., Sharifinia, M., Ghaedi, G., 2021b. β-glucan as a promising food additive and immunostimulant in aquaculture industry. Ann. Anim. Sci. 22, 817–827. https://doi.org/10.2478/aoas-2021-0083.

Khanjani, M.H., Ghaedi, G., Sharifinia, M., 2021a. Effects of diets containing β-glucan on survival, growth performance, haematological, immunity and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. Aquac. Res. 53 (3) doi: 0.1111/are.15712.

Kucharczyk, D., Kucharczyk, D.J., Nowosad, J., Omirzhanova, N., 2019. Optimization of artificial insemination outcomes of African catfish (*Clarias gariepinus*) with differing hatchery conditions. Anim. Reprod. Sci. 211, 106222 https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106222.

Li, P., Ma, X., Liu, D., Wei, Y., Li, P., Hou, H., Yao, J., Chen, A., Liang, Y., Zhou, Z., Wang, P., 2022. A microbiome abundant environment remodels the intestinal microbiota and improves resistance to obesity induced by chlorpyrifos in mice. Environ. Pollut. 315, 120415 https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120415.

Liu, W., Yang, Y., Zhang, J., Gatlin, D.M., Ringø, E., Zhou, Z., 2014. Effects of dietary microencapsulated sodium butyrate on growth, intestinal mucosal morphology, immune response and adhesive bacteria in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) pre-fed with or without oxidised oil. Br. J. Nutr. 112 (1), 15–29. https://doi.org/10.1017/S0007114514000610.

Luz, J., Ramos, A.P., Melo, J.F., Braga, L.G., 2019. Use of sodium butyrate in the feeding of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) juvenile. Aquaculture 510, 248–255. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.065.

Mohammadian, T., Nasirpour, M., Tabandeh, M., Mesbah, M., 2019. Synbiotic effects of β-glucan, mannan oligosaccharide and *Lactobacillus casei* on growth performance, intestine enzymes activities, immunehematological parameters and immune-related gene expression in common carp, *Cyprinus carpio*: An experimental infection with *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture 511, 634197. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.06.011.

Monier, M.N., Abd El-Naby, M.N., Samir, A.S., Samir, F., Abdel-Tawwab, M., 2022. Positive effects of dietary nanosized sodium butyrate on growth performance, immune, antioxidant indices, and resistance of Nile tilapia to waterborne copper toxicity. Aquac. Rep. 26, 101323 https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101323.

Morgan, X.C., Segata, N., Huttenhower, C., 2013. Biodiversity and functional genomics in the human microbiome. Trends Genet 29 (1), 51–58. https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.09.005.

Ng, W.-K., Koh, C.-B., 2017. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. Rev. Aquacult. 9 (4), 342–368. https://doi.org/10.1111/raq.12141.

Nowosad, J., Żarski, D., Biłas, M., Dryl, K., Krejszeff, S., Kucharczyk, D., 2013. Dynamics of ammonia excretion in juvenile common tench, *Tinca tinca* (L.), during intensive rearing under controlled conditions. Aquac. Int. 21 (4), 629–637. https://doi.org/10.1007/s10499-012-9596-3.

Nowosad, J., Jasiński, S., Arciuch-Rutkowska, M., Abdel-Latif, H.M.R., Wróbel, M., Mikiewicz, M., Zielonka, L., Kotsyumbas, I.Y., Muzyka, V.P., Brezvvn, O.M., Dietrich, G., Kucharczyk, D., 2023. Effects of Bee Pollen on growth performance, intestinal microbiota and histomorphometry in African Catfish. Animals 13, 132. https://doi.org/10.3390/ani13010132.

Pasch, J., Palm, H.W., 2021. Economic Analysis and Improvement Opportunities of African Catfish (*Clarias gariepinus*) Aquaculture in Northern Germany. Sustainability 13, 13569. https://doi.org/10.3390/su132413569.

Piech, P., Kujawa, R., Nowosad, J., Kucharczyk, D., Targońska, K., Szmyt, M., 2023. Influence of temperature and stocking density during rearing on larval blue bream, *Ballerus ballerus* (L.). Fish. Aquat. Life 31 (1), 31–43. https://doi.org/10.2478/aopf-2023-0004.

Prusińska, M., Nowosad, J., Jarmołowicz, S., Mikiewicz, M., Duda, A., Wiszniewski, G., Sikora, M., Biegaj, M., Samselska, A., Arciuch-Rutkowska, M., Targońska, K., Otrocka-Domagala, I., Kucharczyk, D., 2020. Effect of feeding barbel larvae (*Barbus barbus* (L, 1758)) *Artemia sp*. nauplii enriched with PUFAs on their growth and

survival rate, blood composition, alimentary tract histological structure and body chemical composition. Aquac. Rep. 18, 100492 https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100492.

Reyes-Becerril, M., Angulo, M., Sanchez, V., Guluarte, C., Angulo, C., 2020. β-D-glucan from marine yeast *Debaryomyces hansenii* BCS004 enhanced intestinal health and glucan-expressed receptor genes in Pacific red snapper *Lutjanus peru*. Microb. Pathog. 143, 104141 https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104141.

Rimoldi, S., Gliozheni, E., Ascione, C., Gini, E., Terova, G., 2018. Effect of a specific composition of short-and medium-chain fatty acid 1-monoglycerides on growth performances and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). PeerJ 31 (6), 5355 doi: 10.7717/peerj.5355.

Sasada, R., Weinstein, M., Prem, A., Jin, M., Bhasin, J., 2020. FIGARO: An efficient and objective tool for optimizing microbiome rRNA gene trimming parameters. J. Biomol. Tech. 31 (Suppl), S2. https://doi.org/10.1101/610394.

Segaran, T.C., Azra, M.N., Piah, R.M., Lananan, F., Téllez-Isaías, G., Gao, H., Torsabo, D., Kari, Z.A., Noordin, N.M., 2023. Catfishes: A global review of the literature. Heliyon 9 (9), e20081. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e20081.

Sikora, M., Nowosad, J., Kucharczyk, D., 2020. Comparison of Different Biofilter Media During Biological Bed Maturation Using Common Carp as a Biogen Donor. Appl. Sci. 10, 626. https://doi.org/10.3390/app10020626.

Sikora, M., Nowosad, J., Kucharczyk, D., 2022. Nitrogen compound oxidation rate in recirculation systems using three biological filter medias in rearing common carp (*Cyprinus carpio L.*) juveniles. Aquaculture 547, 737532. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737532.

Souza, F.P., de Lima, E.C.S., Pandolfi, V.C.F., Leite, N.G., Murari, P.J., Leal, C.N.S., Mainardi, R.M., Suphoronski, S.A., Favero, L.M., Koch, J.F.A., Pereira, U.P., Lopera-Barrero, N.M., 2020. Effect of β-glucan in water on growth performance, blood status and intestinal microbiota in tilapia under hypoxia. Aquac. Rep. 17, 100369 https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100369.

Tian, L., Zhou, X.-Q., Jiang, W.-D., Liu, Y., Wu, P., Jiang, J., Kuang, S.-Y., Tang, L., Tang, W.-N., Zhang, Y.-A., Xie, F., Feng, L., 2017. Sodium butyrate improved intestinal immune function associated with NF-jB and p38MAPK signalling pathways in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Fish. Shellfish Immunol. 66, 548–563. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.049.

Urach, B.deF., Ramos, A.P.deS., Luz, J.R., Magalhaes, F.O., Schorer, M., Braga, L.G.T., 2020. Sodium butyrate improves the performance of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linneaus, 1758). Res, Soc. Dev. 9 (9), e551997535 https://doi.org/10.33448/rsd-v9i9.7535.

Wah-Suárez, M.I., Vázquez, M.A.M., Bosques-Padilla, F.J., 2022. Inflammatory bowel disease: The role of commensal microbiome in immune regulation. Gastroenterol. ía Y. Hepatol. ía (Engl. Ed.) 45 (8), 626–636. https://doi.org/10.1016/j.gastre.2021.08.001.

Wang, J., Zheng, Z., Yang, H., Chen, J., Xiao, Y., Ji, X., Zhang, Z., He, H., Ding, B., Tang, B., 2022. Effect of β-1,3/1,6-glucan on gut microbiota of yellow-feathered broilers. AMB Expr. 12 (1), 115. https://doi.org/10.1186/s13568-022-01458-y.

Wei, W., Sun, J., Liu, C., Xue, Z., 2016. Application of immunostimulants in aquaculture: current knowledge and future perspectives. Aquac. Res. 48, 1–23. https://doi.org/10.1111/are.13161.

Wu, X., Wang, L., Xie, Q., Tan, P., 2020. Effects of dietary sodium butyrate on growth, diet conversion, body chemical compositions and distal intestinal health in yellow drum (*Nibea albiflora*, Richardson). Aquac. Res. 51 (1), 69–79. https://doi.org/10.1111/are.14348.

Yamamoto, F.Y., Castillo, S., de Cruz, C.R., Chen, K., Hume, M.E., Gatlin, D.M., 2020. Synergistic effects of the β-1,3 glucan paramylon and vitamin C on immunological responses of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) were pronounced in vitro but more moderate in vivo. Aquaculture 526, 735394. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735394.

Zechner- Krpan, V., Petravić- Tominac, V., Galović, P., Galović, V., Filipović-Grćić, J., Srečec, S., 2010. Application of different drying methods on β-glucan isolated from spent Brewer's yeast using alkaline procedure. Agric. Conspec. Sci. 75 (1), 45–50.

Zhang, H., Yi, L., Sun, R., Zhou, H., Xu, W., Zhang, W., Mai, K., 2016. Effects of dietary citric acid on growth performance, mineral status and intestinal digestive enzyme activities of large yellow croaker Larimichthys crocea (Richardson, 1846) fed high plant protein diets. Aquaculture 453, 147–153. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.032.

Załącznik II

Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Łuczyński, M.K., Hussain, S.M., Kucharczyk, D. (2024). Next-Generation Sequencing to Determine Changes in the Intestinal Microbiome of Juvenile Sturgeon Hybrid (*Acipenser Gueldenstaedtii*♀ × *Acipenser Baerii*♂*)* Resulting from Sodium Butyrate, β-Glucan and Vitamin Supplementation. *Genes, 15(10),* 1276.

Olsztyn, 03.12.2024

Martyna Arciuch-Rutkowska
(imię i nazwisko kandydata)

Zootechnika i Rybactwo
(dyscyplina naukowa)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy: **Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Łuczyński, M.K., Hussain, S.M., Kucharczyk, D. 2024, Next-Generation Sequencing to Determine Changes in the Intestinal Microbiome of Juvenile Sturgeon Hybrid (*Acipenser Gueldenstaedtii*♀ × *Acipenser Baerii*♂) Resulting from Sodium Butyrate, β-Glucan and Vitamin Supplementation, Genes, 15(10), 1276** mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na opracowywaniu koncepcji badań, opracowaniu i walidacji metod, wykonaniu części eksperymentalnej, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu draftu publikacji oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje.

Martyna Arciuch-Rutkowska

(podpis kandydata)

Olsztyn, 02.12.2024

Dr inż. Joanna Nowosad
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE

współautora/~~współautorów~~

Oświadczam, że w pracy: **Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Łuczyński, M.K., Hussain, S.M., Kucharczyk, D. 2024, Next-Generation Sequencing to Determine Changes in the Intestinal Microbiome of Juvenile Sturgeon Hybrid (*Acipenser Gueldenstaedtii*♀ × *Acipenser Baerii*♂) Resulting from Sodium Butyrate, β-Glucan and Vitamin Supplementation, Genes, 15(10), 1276** mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na współwykonaniu części eksperymentalnej, weryfikacji metod badawczych, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych oraz pomocy w przygotowaniu manuskryptu publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Martynę Arciuch-Rutkowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr Martyny Arciuch-Rutkowskiej polegający na opracowywaniu koncepcji badań, opracowaniu i walidacji metod, wykonaniu części eksperymentalnej, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu draftu publikacji oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje.

Joanna Nowosad

(podpis/podpisy)

Olsztyn, 04.12.2024

Dr Michał Krzysztof Łuczyński
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE

współautora/~~współautorów~~

Oświadczam, że w pracy: **Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Łuczyński, M.K., Hussain, S.M., Kucharczyk, D. 2024, Next-Generation Sequencing to Determine Changes in the Intestinal Microbiome of Juvenile Sturgeon Hybrid (*Acipenser Gueldenstaedtii*♀ × *Acipenser Baerii*♂) Resulting from Sodium Butyrate, β-Glucan and Vitamin Supplementation, Genes, 15(10), 1276** mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na pozyskaniu finansowania, nadzorze nad prowadzeniem doświadczenia oraz pomocy w przygotowaniu manuskryptu publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Martynę Arciuch-Rutkowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr Martyny Arciuch-Rutkowskiej polegający na opracowywaniu koncepcji badań, opracowaniu i walidacji metod, wykonaniu części eksperymentalnej, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu draftu publikacji oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje.

.....

(podpis/podpisy)

Faisalabad, 03.12.2024

Dr Syed Makhdoom Hussain
(professional title/degree/academic title, name and surname)

Chairman of the Scientific Council of the Discipline
Zootechnics and Fisheries
University of Warmia and Mazury in Olsztyn
Prof. Ph.D. Dorota Witkowska

STATEMENT
co-author/co-authors

I declare that in the paper: **Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Łuczyński, M.K., Hussain, S.M., Kucharczyk, D. 2024. Next-Generation Sequencing to Determine Changes in the Intestinal Microbiome of Juvenile Sturgeon Hybrid (*Acipenser gueldenstaedtii*♀ × *Acipenser baerii*♂) Resulting from Sodium Butyrate, β-Glucan and Vitamin Supplementation, Genes, 15(10), 1276**, my substantive contribution to its preparation consisted in verifying the research methods and the prepared manuscript of the publication.

At the same time, I consent to the submission of the above-mentioned paper by Martyna Arciuch-Rutkowska, MA, as part of her doctoral dissertation in the form of a thematically coherent set of scientific articles published in scientific journals.

I declare that an independent and separable part of the above-mentioned the work demonstrates the individual contribution of the candidate, Martyna Arciuch-Rutkowska, M.A., consisting in developing the research concept, developing and validating methods, performing the experimental part, developing and interpreting the obtained results, preparing a draft of the publication and preparing responses to reviews.

Makhdoom

.....

(signature)

Olsztyn, 04.12.2024

Prof. dr hab. inż. Dariusz Kucharczyk
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE

współautora/~~współautorów~~

Oświadczam, że w pracy: **Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Łuczyński, M.K., Hussain, S.M., Kucharczyk, D. 2024, Next-Generation Sequencing to Determine Changes in the Intestinal Microbiome of Juvenile Sturgeon Hybrid (*Acipenser Gueldenstaedtii*♀ × *Acipenser Baerii*♂) Resulting from Sodium Butyrate, β-Glucan and Vitamin Supplementation, Genes, 15(10), 1276** mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na opracowaniu koncepcji badań, pozyskaniu finansowania, nadzorze nad prowadzeniem doświadczenia oraz przygotowaniem manuskryptu publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Martynę Arciuch-Rutkowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr Martyny Arciuch-Rutkowskiej polegający na opracowywaniu koncepcji badań, opracowaniu i walidacji metod, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu draftu publikacji oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje.

D. Kucharczyk

(podpis/podpisy)

genes

MDPI

Article

Next-Generation Sequencing to Determine Changes in the Intestinal Microbiome of Juvenile Sturgeon Hybrid (*Acipenser gueldenstaedtii*♀ × *Acipenser baerii*♂) Resulting from Sodium Butyrate, B-Glucan and Vitamin Supplementation

Martyna Arciuch-Rutkowska [1,2], Joanna Nowosad [1,2,3,*], Michał Krzysztof Łuczyński [1], Syed Makhdoom Hussain [4] and Dariusz Kucharczyk [1,2,*]

[1] Department of Research and Development, Chemprof, Gutkowo 54B, 11-041 Olsztyn, Poland; martyna.arciuch-rutkowska@chemprof.pl or martyna.arciuch-rutkowska@uwm.edu.pl (M.A.-R.); michal.luczynski@chemprof.pl (M.K.Ł.)
[2] Department of Ichthyology and Aquaculture, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Al. Warszawska 117A, 10-957 Olsztyn, Poland
[3] Department of Ichthyology, Hydrobiology and Aquatic Ecology, National Inland Fisheries Research Institute, Ul. Oczapowskiego 10, 10-719 Olsztyn, Poland
[4] Department of Zoology, Government College University Faisalabad, Punjab 38000, Pakistan; drmakhdoom90@gmail.com
* Correspondence: nowosad.joanna@gmail.com (J.N.); darekk56@gmail.com (D.K.)

Abstract: Background/Objectives: The effect of sodium butyrate (NaB), β-glucan (βG) and vitamins in the diet on gut microbiome, cortisol level, lysozyme activity and growth parameters of juvenile hybrid sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*♀ × *Acipenser baerii*♂) was determined. **Methods:** Sturgeon hybrids (n = 144) were divided into three groups with enriched feeding (mg/kg of feed): FQV1 (50 NaB; 20 βG; const. vitamins), FQV2 (150 NaB; 20 βG; const. vitamins), FQV3 (50 NaB; 60 βG; const. vitamins) and control (not supplemented), each group in triplicate, 12 fish in each repetition. Rearing was carried out for 30 days in controlled conditions. Gut microbiome was characterized using Next Generation Sequencing (NGS) of DNA samples isolated from intestinal content. Cortisol level was determined using the ELISA test. Lysozyme activity was measured by turbidimetric test. **Results**: Based on data obtained from NGS, it was determined that the FQV1 group is characterized by the highest values of diversity indices (Shannon, Simpson and Chao-1) and the largest number of ASVs (Amplicon Sequence Variants). The highest abundance of probiotic bacteria (*Lactobacillus*, *Lactococcus*) was determined in the FQV1 group. The highest cortisol concentration was determined in the control (33.26 ng/mL), while the lowest was in FQV3 (27.75 ng/mL). The highest lysozyme activity was observed in FQV1 (154.64 U/mL), and the lowest in FQV2 (104.39 U/mL) and control (121.37 U/mL) ($p < 0.05$). FQV2 was characterized by significantly more favorable values of breeding indicators ($p < 0.05$). **Conclusions:** The obtained results prove that an appropriate composition of NaB, βG and vitamins can be used in the commercial breeding of juvenile hybrid sturgeons.

Keywords: cortisol level; lysozyme activity; metagenome; short-chain fatty acid; prebiotic; 16S rRNA; α-diversity indexes

Citation: Arciuch-Rutkowska, M.; Nowosad, J.; Łuczyński, M.K.; Hussain, S.M.; Kucharczyk, D. Next-Generation Sequencing to Determine Changes in the Intestinal Microbiome of Juvenile Sturgeon Hybrid (*Acipenser gueldenstaedtii*♀ × *Acipenser baerii*♂) Resulting from Sodium Butyrate, B-Glucan and Vitamin Supplementation. *Genes* **2024**, *15*, 1276. https://doi.org/10.3390/genes15101276

Academic Editor: Xiaojun Song

Received: 27 August 2024
Revised: 23 September 2024
Accepted: 27 September 2024
Published: 28 September 2024

Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The decline in the number of wild sturgeons, caused mainly by overfishing, poaching and environmental degradation, has indirectly led to the significant development of aquaculture of this group of fish species over recent years [1]. In 1984, sturgeon aquaculture production was 150 metric tonnes, while in the 21st century it increased rapidly and reached approximately 123 500 metric tonnes in 2020 [2]. Currently, sturgeons are farmed

all over the world due to obtaining caviar and meat as a secondary product [3]. An important part of sturgeon breeding is their hybrids. In the case of fish, interspecific hybridization is used to improve the breeding characteristics of the offspring, which show better phenotypic characteristics than the parent stocks. One of the most desirable hybrids in sturgeon aquaculture is a hybrid of Siberian and Russian sturgeons. Research conducted by Shivaramu et al. [4] prove a faster growth rate of hybrids of these species and higher survival compared to pure parental lines.

Intensive aquaculture of sturgeons, especially hybrids, has resulted in an increase in demand for specialized feeds that will have a positive impact on their growth and immunity [5]. The introduction of supplementation of basic feeds with active substances can support the immune system in response to infections in the organism of fish, e.g., by increasing the activity of lysozyme as the first line of defense against pathogens (non-specific response) [6–8]. Moreover, it is important that these substances are safe for the entire aquatic environment and for humans, as the subsequent consumers [9–11]. This group of compounds includes, among others, glucans and salts of short-chain fatty acids (SCFAs), e.g., sodium butyrate [12–16]. These substances support intestinal function and have a prebiotic effect, supporting the nutrition and functioning of the intestinal microbiome of hosts [12,13,17,18].

The intestinal microbiome of fish is still poorly understood, but it is known that, like mammals, it has a significant impact, among others, on host metabolism, reproduction and immunity [19]. The composition of the fish intestinal microbiome is influenced by many factors, such as water temperature and salinity, the host's eating habits and its trophic level [20]. Through intestinal bacteria, vitamins, enzymes supporting the digestion process and SCFAs, molecules responsible for the nutrition of colonocytes are produced [21]. Additionally, lactic acid bacteria (LAB), by secreting antimicrobial compounds, can fight developing pathogens, leading to the creation of a balanced microbiome community. However, disturbed microflora may also have a negative impact on the growth and development of the host, leading to a decrease in immunity and the development of diseases [21].

The microbiome can be analyzed by traditional microbiological methods and molecular methods. Classic microbiological methods involve many errors, including the fact that only a small percentage of bacteria can be cultivated in laboratory conditions. An effective and quick method for determining the microbiome is the Next-Generation Sequencing (NGS) method [22]. The method involves high-throughput sequencing of the metagenome of an environment based on a marker in the form of the 16S rRNA subunit. The obtained sequences are then assigned to the appropriate species using reference sequence databases [23]. Scientific reports show that the intestinal microbiome is recognized as an "additional organ" and performs many important functions, and that obtaining information on its composition is very important, due to, e.g., nutritional manipulations aimed at improving immunity or growth rate [19,24]. This is particularly important in animal breeding, including aquaculture [24]. It is emphasized that research on the functions of the fish intestinal microbiome may lead to the sustainable development of aquaculture production [23].

The aim of this study was to determine, using the NGS method, the impact of 30-day administration of feed enriched with sodium butyrate, β-glucan and vitamins on changes in the gut microbiome community of juvenile hybrid sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*♀ × *Acipenser baerii*♂). In addition, the level of cortisol and lysozyme activity in the blood were determined as determinants of immunity. As a part of breeding, indicators reflecting the impact of enriched nutrition on growth were also determined.

2. Materials and Methods

2.1. The Origin of the Experimental Fish

For the experiment, fish were obtained from the Wąsosze Fishing Farm near Konin (Wielkopolska, Poland). Artificial reproduction was performed according to the protocol described by Fopp-Bayat et al. [25]. The fish were raised to a weight of approx. 5 g and a length of 10 cm. The fry were transported to the Center for Aquaculture and Ecological Engineering (Department of Ichthyology and Aquaculture, Faculty of Animal Bioengineering, UWM in Olsztyn) in bags with oxygen. Before starting the experiment, the fish were acclimatized for a week to adapt to the new conditions. The water temperature was maintained at 18.0 ± 0.1 °C. pH (Hanna HI 98128, Eden Way, UK) and water oxygenation (OxyGuard Pacific, Farum, Denmark) was also monitored. The fish were fed at regular times (8:00, 11:00, 14:00, 16:00) to satiation, with Skretting complete feed (Nutreco; Nutra MP II Protec, Stavanger, Norway), commonly used in Polish farms for raising sturgeon fry with similar body dimensions.

2.2. Experimental Feed

The commercial complete feed (Skretting, Nutreco, Nutra MP II Protec, Stavanger, Norway) was used for enrichment with sodium butyrate, β-glucan and vitamin. The detailed composition of the commercial feed is shown in the Table S1. The experimental feed was prepared in three variants: FQV1, FQV2 and FQV3. Feed enrichment was performed according to the methodology described by Nowosad et al. [26] and Arciuch-Rutkowska et al. [27], by introducing 1 mL of an appropriate suspension of active substances (V1, V2, V3) into 50 mL of a mixture of rapeseed oil and water (1:1, *v*:*v*). The whole was homogenized and injected onto 1 kg of commercial feed. The feed for the control group was enriched only with a mixture of oil and water (1:1, *v*:*v*). The enriched feed was mixed and convection-dried for 24 h/23 °C. The content of active substances in the feed after enrichment is presented in Table 1.

Table 1. Active ingredients of the enriched feed used during the experiment on juvenile sturgeon hybrid (*Acipenser gueldenstaedtii* × *Acipenser baerii*). C–control group, FQV1, FQV2, and FQV3 groups fed enriched feed with sodium butyrate, β-glucan and vitamins.

Active Ingredients *	Groups			
	C	FQV1	FQV2	FQV3
sodium butyrate (mg/kg)	Not included	50	150	50
β-glucan (mg/kg)	Not included	20	20	60
vitamin C (mg/kg)	Not included	30	30	30
vitamin E (mg/kg)	Not included	10	10	10
vitamin K (mg/kg)	Not included	0.4	0.4	0.4
vitamin A (IU/kg)	7500	8700	8700	8700
vitamin D3 (IU/kg)	1125	1925	1925	1925

* The values of vitamin A and vitamin D3 were taken from the feed manufacturer's label and calculated based on the amounts of added active ingredients.

2.3. Feeding Experiment

A total of 144 juvenile hybrids sturgeons were used to conduct the experiment. At the beginning of the experiment, the average body weight of experimental individuals was 8.56 ± 1.50 g and the average body length was 12.50 ± 0.68 cm (mean ± SD; $n = 22$). Twelve 20 L tanks were used to conduct the experiment and 12 fish were placed in each tank. The experiment was performed for 3 research groups (enriched: FQV1, FQV2, and FQV3) and a control group (not supplemented, C), each in triplicate. The water temperature was kept constant at 18.0 ± 0.1 °C. The following parameters were monitored and noted daily: pH-average 7.8 ± 0.32) (Hanna HI 98128, Eden Way, UK), water oxygenation—average 6.98 ±

0.33 mg/L and saturation—average 84 ± 3.26% (OxyGuard Pacific, Farum, Denmark), nitrite level (LCK 341) and ammonium nitrogen (LCK 304) [28]. During the experiment, the average concentration of nitrite and ammonium nitrogen was below 0.02 mg/L. Fish were fed until satiation four times a day (8:00 a.m., 11:00 a.m., 2:00 p.m., 4:00 p.m.). The experiment was conducted for 30 days. The duration of the experiment was assumed to be until the average body weight of fish in the control group increased by 5 times. The survival rate (SR; %) was calculated for each group at the end of experiment [29].

$$SR\ (\%) = (N_e/N_b) \times 100 \quad (1)$$

N_b—initial number of fish; N_e—final number of fish

2.4. Periodic Measurement of Fish and Sampling

Measurements of body weight and length of experimental individuals were performed weekly during the experiment and at the end of the experiment. Fish were caught from each group (n = 15) and anesthetized using MS-222 anesthetic (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) (0.15 g/L water). Fish were weighed (±0.01 g; KERN ABJ; 320-4NM, Frankfurt, Germany) and measured using a caliper (±0.1 mm; Geko G01493, Kietlin, Poland). After completing all the data from the experiment, they were used to calculate breeding indicators: weight gain (WG; g), length gain (LG; cm), specific growth rate (SGR; % d^{-1}), and condition factor (K; g/cm^3), according to the formulas [30,31]:

$$WG\ (g) = (FW - IW) \quad (2)$$

FW—final weight (g), IW—initial weight (g)

$$LG\ (cm) = (FL - IL) \quad (3)$$

FL—final length (cm), IL—initial length (cm)

$$SGR\ (\%) = (\ln FW - \ln IW)/T \times 100\% \quad (4)$$

FW—final weight (g), IW—initial weight (g), T—number of days of rearing

$$K\ (g/cm^3) = (BW \cdot 100) \cdot L^{-3} \quad (5)$$

BW—body weight (g), L—body length (cm)

In order to collect samples for further analysis, after the end of the experiment, randomly selected fish (n = 5 from each group) were euthanized using an overdose of MS-222 (Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Blood was collected from the tail vein into heparin tubes (FL Medical, Torreglia, Italy). To obtain plasma, the blood was centrifuged (10,000× g/10 min; IKA G-L S000, IKA, Staufen, Germany) and frozen until cortisol concentration and lysozyme activity analyses were performed [32]. The surface of the fish body was disinfected (70% isopropanol) and the contents of the intestines were collected into sterile tubes under sterile conditions (ESCO AC2-3E8-TU, Singapore). Samples were stored at −80 °C until metagenomic analyzes began [33].

2.5. DNA Isolation, NGS Sequencing and Bioinformatic Analysis

DNA from the intestine contents was isolated using the commercial QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Cat. no. 51604; Qiagen, Hilden, Germany). The manufacturer's protocol was used for the DNA isolation. After isolation, the quality of DNA was examined by electrophoresis in agarose gel. The quantity and purity of the DNA samples were determined using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific Nanodrop One, Waltham, MA, USA). Samples of metagenomic DNA were stored at −80 °C. NGS (Next-Generation Sequencing) was performed at an external company (Genomed SA; Warsaw, Poland) using the MiSeq system (Illumina, San Diego, CA, USA) and paired-end (PE) technology (2 × 300 nt) using v3 kit (Cat. no. MS-102-3003; Illumina, San Diego, CA, USA). A protocol 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina, San Diego, CA, USA) and specific primers 341F and 785R were used to prepare the libraries. Metagenomic

analysis was performed based on the 16S rRNA gene (V3–V4 region). Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix (Cat. no. M0494X; New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) was used for PCR following the manufacturer's protocol.

QIIME 2 was used to perform bioinformatics processing [34]. Raw reads were classified to the taxon level based on the generated ASVs and the Silva 138 reference sequence database. The DADA2 package was used to distinguish sequences of biological origin from sequences generated during sequencing [35]. The FIGARO tool was used to check the quality of readings. Adapter sequences and short reads were removed during the analyses [36].

2.6. Analysis of Cortisol Concentration and Lysozyme Activity in the Blood Plasma

The commercial Fish (Cortisol) ELISA Kit (Cat. no. 201-00-0027; SunRed Biological Technology, Shanghai, China) was used for analysis. Cortisol concentration analysis was performed according to the manufacturer's procedure instructions, using a microplate reader (BK-EL10C, BIOBASE, Shandong, China) at a wavelength of 450 nm. The test's detection range was set at 0.8–200 ng/mL, with a minimum sensitivity of 0.712 ng/mL.

Lysozyme activity in blood plasma was determined using the turbidimetric method using the commercial Lysozyme Activity Kit (Cat. no. LY0100; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). The assay was performed according to the manufacturer's protocol, which involved the lysis of *Micrococcus lysodeikticus* cells. The absorbance of the tested samples was measured at 450 nm at 25 °C using a UV/Vis spectrophotometer (Lambda 265, PerkinElmer, Waltham, MA, USA). The measurement was performed in two repetitions against a blank sample. The test's detection limit was 0.8 mg/mL. Lysozyme activity (LA; U/mL) was calculated from the formula [37]:

$$LA\ (U/mL) = (\Delta A\ 450/min\ test - \Delta A\ 450/min\ blank)\ df/(0.001)(V\ test) \quad (6)$$

df—dilution factor; 0.001—ΔA_{450} (as per the unit definition); V_{test}—volume of sample (mL)

One unit of lysozyme leads to a change of 0.001 in the ΔA_{450} value per minute at pH 6.24 at 25 °C, using a suspension of *M. lysodeikticus* as substrate in 2.6 mL of the reaction mixture.

2.7. Statistical Analysis

Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc.; Palo Alto, CA, USA) was used to perform statistical analyses. Shapiro–Wilk and Leven tests were used to verify normality and homogeneity of variances. Parameters such as WG, LG, SGR, SR, cortisol concentration and lysozyme activity in the blood were statistically analyzed using one-way ANOVA and Tukey's test as a post hoc test ($p < 0.05$).

The results of the bioinformatic analysis are given as the mean with standard deviation. The α-diversity were calculated using the PAST 4.03 program (University of Oslo, Oslo, Norway). Statistical analysis was performed using the non-parametric Kruskal–Wallis test ($p < 0.05$). β-diversity was plotted using PCoA (Principal Coordinate Analysis) with the Bray–Curtis distance (PAST4.03). Relative abundance of bacteria (%) was calculated at the Phylum and Genus levels, and presented in bar charts.

3. Results

3.1. Breeding Indicators

Breeding indicators of juvenile sturgeon hybrids are presented in Table 2. The highest WG value was observed in the FQV2 group (47.24 ± 10.54 g), while the lowest was in the FQV3 group (39.66 ± 8.68 g) ($p < 0.05$). The FQV2 group also had the highest LG (10.57 ± 1.31 cm) and SGR (4.82 ± 0.67) ($p < 0.05$). The lowest SGR value was demonstrated in the FQV3 group (4.38 ± 0.57%). The condition factor (K) and SR were at a similar level in all groups and no significant statistical differences were found between the groups ($p > 0.05$).

Table 2. Breeding indicators (mean ± SD) of juvenile sturgeon hybrid (*Acipenser gueldenstaedtii* × *Acipenser baerii*) fed commercial feed in the control group (C) and enriched feed with sodium butyrate, β-glucan and vitamins in research groups (FQV1, FQV2,and FQV3) during a feeding experiment. Mean values in the same row marked with a different letter are statistically different ($p < 0.05$).

Breeding Indicators	Groups			
	C	FQV1	FQV2	FQV3
IW (g)	8.56 ± 1.50	8.56 ± 1.50	8.56 ± 1.50	8.56 ± 1.50
IL (cm)	12.50 ± 0.68	12.50 ± 0.68	12.50 ± 0.68	12.50 ± 0.68
FW (g)	49.63 ± 7.53 ^{b}	51.68 ± 5.23 ^{ab}	54.14 ± 11.16 ^{a}	47.20 ± 8.27 ^{b}
FL (cm)	22.37 ± 1.15 ^{ab}	22.55 ± 0.95 ^{ab}	22.91 ± 1.35 ^{a}	22.05 ± 1.04 ^{b}
WG (g)	40.62 ± 5.64 ^{b}	44.04 ± 4.67 ^{ab}	47.24 ± 10.54 ^{a}	39.66 ± 8.68 ^{b}
LG (cm)	9.89 ± 0.95 ^{ab}	10.21 ± 0.88 ^{ab}	10.57 ± 1.31 ^{a}	9.76 ± 0.98 ^{b}
SGR (%/day)	4.56 ± 0.52 ^{ab}	4.71 ± 0.34 ^{ab}	4.82 ± 0.67 ^{a}	4.38 ± 0.57 ^{b}
K (K/fish)	0.44 ± 0.03	0.45 ± 0.03	0.45 ± 0.02	0.43 ± 0.05
SR (%)	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	97.2 ± 4.8

IW—initial weight; IL—initial length; FW—final weight; FL—final length; WG—weight gain; LG—length gain; SGR—specific growth rate; K—condition factor; SR—survival rate.

3.2. Sequencing Data and Diversity of Gut Microbiome

Data from metagenomic sequencing of DNA isolated from the intestinal contents of the experimental fish are summarized in Table 3. Bioinformatics analyses allowed for the taxonomic classification of 2,008,080.00 reads. On average, there were 100,404.00 ± 23,546.31 readings per sample. A total of 1785.00 ASV sequences were also extracted from all analyzed samples. The number of counts in all groups was at a similar level, but the highest was in the FQV2 group (107,145.60 ± 37,173.80). Differences between groups were not statistically significant ($p > 0.05$). In the FQV1 group, the number of observations was the highest (254.80 ± 46.91), while in groups C, FQV2 and FQV3, the number of observations was at a similar level. There were no statistically significant differences between the study groups ($p > 0.05$).

Table 3. Data (mean ± SD) from bioinformatic analysis of the intestinal microbiome of juvenile sturgeon hybrid (*Acipenser gueldenstaedtii* × *Acipenser baerii*) fed commercial feed in the control group (C) and enriched feed with sodium butyrate, β-glucan and vitamins in research groups (FQV1, FQV2,and FQV3) during a feeding experiment.

Group	Counts	Observations
C	94,505.20 ± 17,161.98	179.40 ± 87.45
FQV1	105,357.20 ± 12,016.35	254.80 ± 46.91
FQV2	107,145.60 ± 37,173.80	168.40 ± 73.19
FQV3	94,608.00 ± 27,899.12	170.60 ± 66.45
Total number of counts taxonomically classified		2,008,080.00
Mean number of counts per sample		100,404.00 ± 23,546.31
Total number of ASV		1785.00

α-diversity coefficients (Simpson index, Shannon index and Evenness index) and Chao-1 index was determined for the studied groups (Figure 1). The FQV1 group was characterized by the highest Simpson index (0.75 ± 0.09) and Shannon index (2.32 ± 0.40). In the control group, the above-mentioned indexes had the lowest values: for the Simpson index it was 0.63 ± 0.17, and for the Shannon index it was 1.79 ± 0.64. Evenness index had the highest value in the FQV2 group (0.08 ± 0.06), while the lowest was in the control group and FQV1; in both cases, its value was 0.04 ± 0.01. Index values did not show statistically significant differences between groups ($p > 0.05$). The FQV1 group was characterized by the highest Chao-1 index (254.20 ± 46.95), while in the FQV3 group this index had the

lowest value of all groups (159.80 ± 80.29). Differences in the Chao-1 index value between groups were not statistically significant ($p > 0.05$).

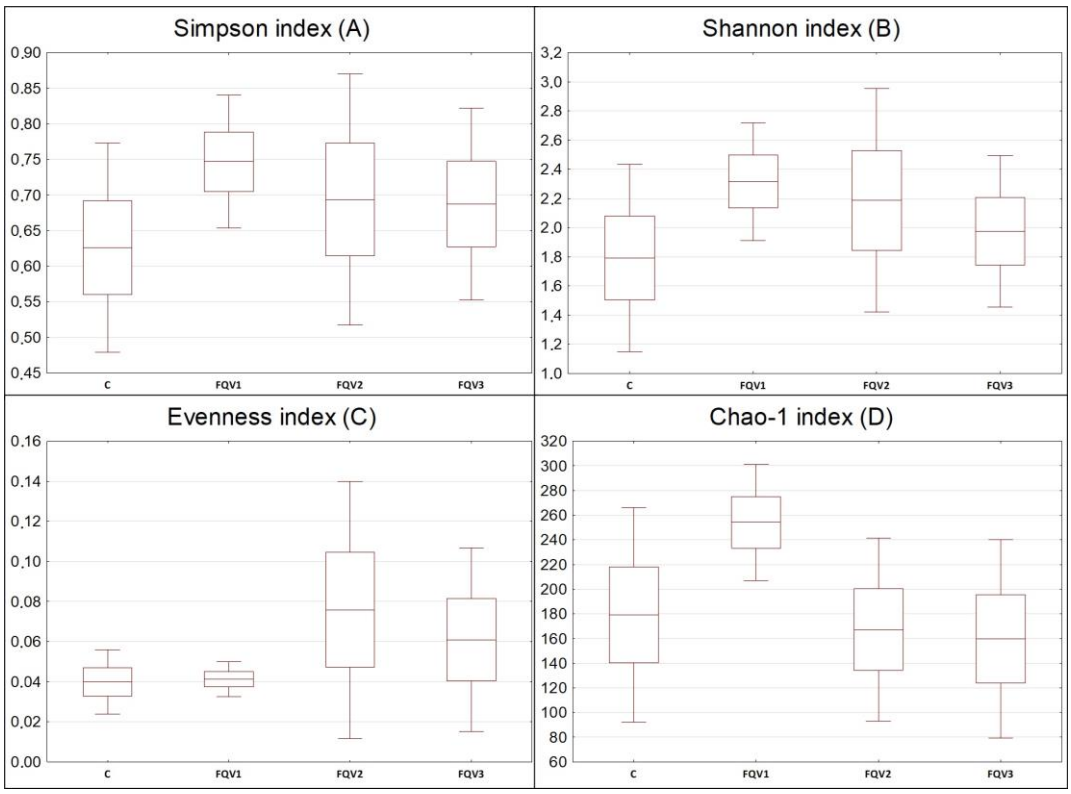
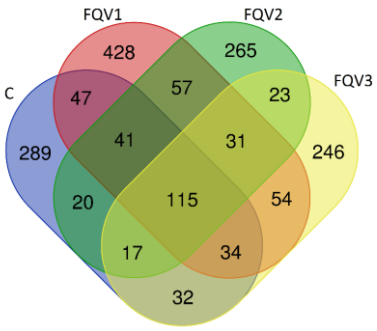


Figure 1. α-diversity indexes of intestinal microbiome juvenile sturgeon hybrid (*Acipenser gueldenstaedtii* × *Acipenser baerii*) fed commercial feed in the control group (C) and enriched feed with sodium butyrate, β-glucan and vitamins in research groups (FQV1, FQV2, and FQV3) during a feeding experiment.

The number of common and unique ASVs is shown in a Venn diagram and table (Figure 2). The analysis showed that the number of common ASVs occurring in all groups was 115. However, the group with the highest rate of unique ASVs was the FQV1 group (428). The FQV3 group had the lowest number of unique ASVs (246).



Group	C	FQV1	FQV2	FQV3	FQV1/ FQV2	FQV1/ FQV3	FQV2/ FQV3	FQV1/ FQV2/ FQV3
ASV	289	428	265	246	57	54	23	32
ASV with C group		47	20	32	41	34	17	115

Figure 2. Common and unique ASVs of the intestinal microbiome of juvenile sturgeon hybrid (*Acipenser gueldenstaedtii* × *Acipenser baerii*) fed commercial feed in the control group (C) and enriched feed with sodium butyrate, β-glucan and vitamins in research groups (FQV1, FQV2, and FQV3) during a feeding experiment.

The β-diversity of the microbiome community was analyzed by PCoA analysis using the Bray–Curtis distance. The results of the analysis are presented at Figure 3. The research groups (FQV1–FQV3) show great similarity in terms of microbiome community, with the FQV2 and FQV3 groups being the most similar. The control group was the group with the greatest microbiome diversity.

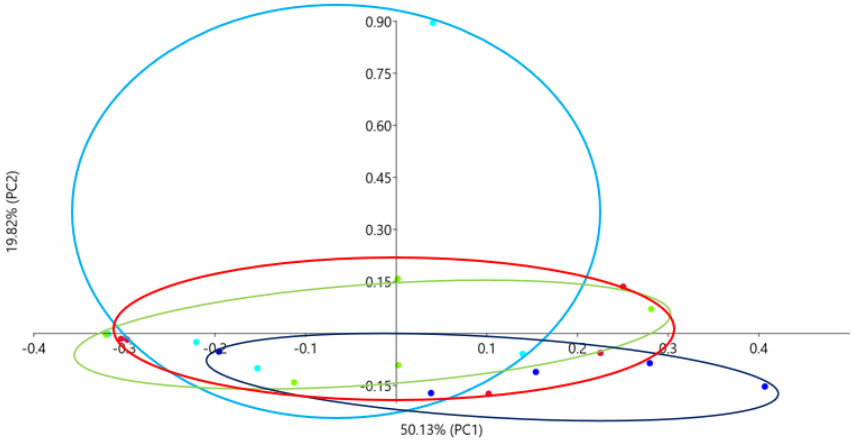


Figure 3. PCoA (Principal Coordinate Analysis) analysis of the intestinal microbiome of juvenile sturgeon hybrid (*Acipenser gueldenstaedtii* × *Acipenser baerii*) fed commercial feed in the control group (C) and enriched feed with sodium butyrate, β-glucan and vitamins in supplemented groups (FQV1, FQV2, and FQV3) during a feeding experiment. Points of the same color mean individuals from the same group (C—light blue points, FQV1—dark blue points, FQV2—red points and FQV3—green points).

3.3. Profile of Gut Microbiome

Based on data obtained from bioinformatic analyses, the profile of intestinal microbiome of juvenile sturgeon hybrids was determined in the research groups (FQV1, FQV2, and FQV3) and in the control group (C). At the Phylum level in all research groups and the control group, *Firmicutes* dominated, with the largest share in the control group (77.25%; Figure 4A). In the research groups (FQV1–FQV3), the share of *Firmicutes* was over 50%. *Cyanobacteria* were present in all groups, most abundantly in the FQV1 (35.51%), and least frequently in the control group (14.69%). *Proteobacteria* had a large share in the microbiome community of all groups. The control group showed the lowest occurrence (6.89%), and in the research groups *Proteobacteria* occurred at the level of approximately 15%.

The graph (Figure 4B) shows the relative abundance of bacteria of all groups at the Genus level. The most abundant type of bacteria in all groups is *Clostridium sensu stricto 1*. It is the most abundant bacteria in the control group—57.74%, while in the research groups, respectively, FQV1—33.90%, FQV2—48.16%, and FQV3—55.23%. In the control group, *Bacillus* has a large share (16.35%), while in the research groups their share ranges from 0.58% (FQV2) to 1.36% (FQV3). Lactic acid bacteria (LAB), *Lactobacillus* and *Lactococcus* are most abundant in the FQV1 group, respectively, *Lactobacillus*—9.82%, *Lactococcus*—2.52%. In the remaining groups, the percentage share in the microbiome community was approximately 1% or less. Additionally, *Plesiomonas* was also present, most often in the FQV2 (5.88%). In the control and FQV3 groups, the share of Plesiomonas was below 2%. *Shinella* was statistically most common in the FQV3 group, and least frequent in the FQV1

group ($p < 0.05$). However, the occurrence of *Rhodobacter* statistically differed between the groups; it was most common in the FQV2 group and least common in the control group.

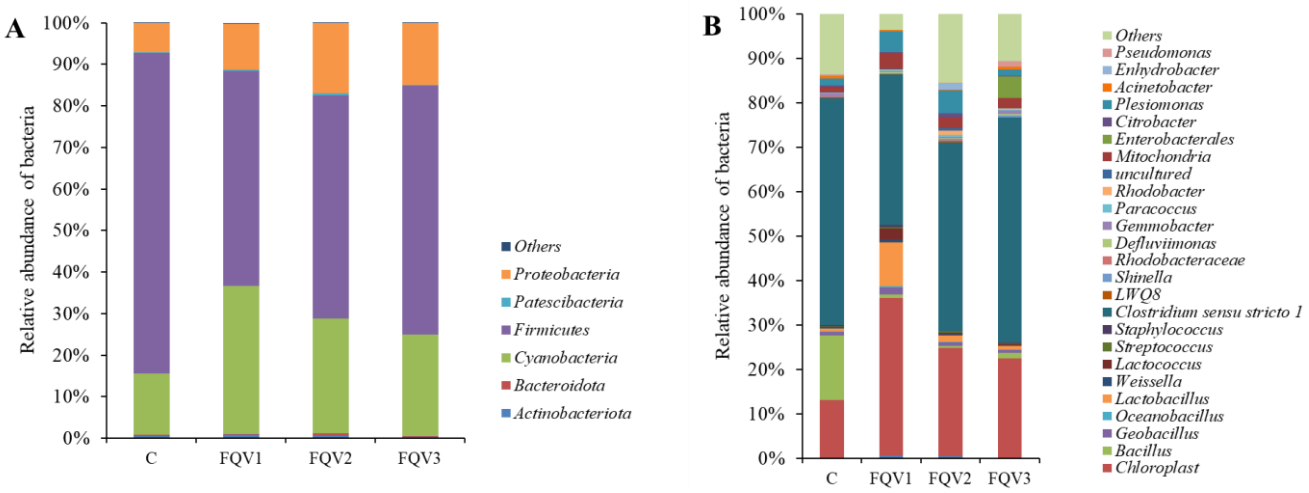


Figure 4. Relative abundance of bacteria (%) at Phylum (**A**) and Genus (**B**) level in the intestinal microbiome of juvenile sturgeon hybrid (*Acipenser gueldenstaedtii* × *Acipenser baerii*) fed commercial feed in the control group (C) and enriched feed with sodium butyrate, β-glucan and vitamins in research groups (FQV1, FQV2, and FQV3) during a feeding experiment. Bacteria less than 0.5% are summarized and labeled as "others".

3.4. Cortisol Concentration and Lysozyme Activity in Blood Plasma

The control group had the highest cortisol concentration (33.26 ± 1.30 ng/mL) compared to the research groups, but the differences between the groups were not statistically significant ($p > 0.05$). The lowest cortisol level was observed in the FQV3 group (27.75 ± 7.80 mg/mL) (Figure 5).

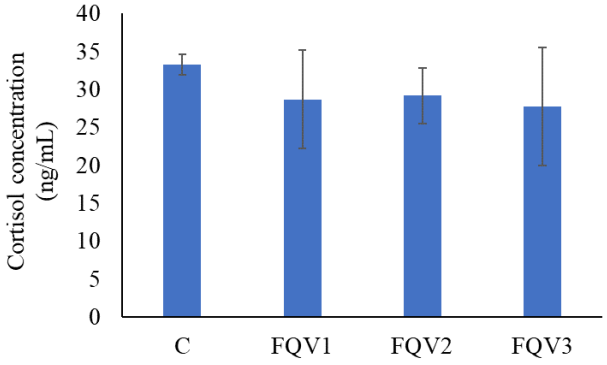


Figure 5. Cortisol concentration (ng/mL) in the blood plasma (mean ± SD) of juvenile sturgeon hybrid (*Acipenser gueldenstaedtii* × *Acipenser baerii*) fed commercial feed in the control group (C) and enriched feed with sodium butyrate, β-glucan and vitamins in research groups (FQV1, FQV2, and FQV3) during a feeding experiment.

The highest lysozyme activity was observed in FQV1 (154.64 ± 12.01 U/mL) ($p < 0.05$). In the FQV2 group, the lowest enzymatic activity in blood plasma was determined, and was 104.39 ± 15.94 U/mL, respectively, ($p < 0.05$) (Figure 6).

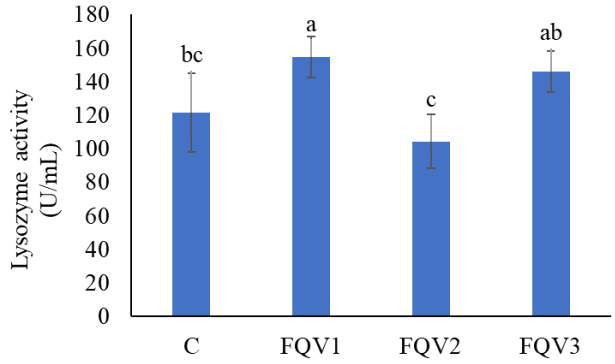


Figure 6. Lysozyme activity (U/mL) in blood plasma (mean ± SD) of juvenile sturgeon hybrid (*Acipenser gueldenstaedtii* × *Acipenser baerii*) fed commercial feed in the control group (C) and enriched feed with sodium butyrate, β-glucan and vitamins in research groups (FQV1, FQV2, and FQV3) during a feeding experiment. Bars marked with a different letter are statistically different ($p < 0.05$).

4. Discussion

This study used the NGS metagenomic sequencing method to determine changes in the diversity and profile of gut microbiome of sturgeon hybrid (*Acipenser gueldenstaedtii*♀ × *Acipenser baerii*♂) as a result of enriching the diet with sodium butyrate, β-glucan and vitamins compared to the control group fed with unenriched feed. The FQV1 group was characterized by the highest values of α-diversity and species richness indices. Moreover, in the FQV1 group, the highest percentage of probiotic bacteria was determined, i.e., *Lactobacillus* and *Lactococcus*, compared to the other groups. Other parameters indicating the level of immunity were also checked, i.e., cortisol level and lysozyme activity in the blood. The introduced supplementation did not cause a significant reduction in the level of cortisol in the blood of the tested fish. Compared to the control group, the supplemented groups recorded an average decrease in blood cortisol concentration of 14.22%. The highest lysozyme activity in the blood was determined in the FQV1 group, which was on average 27.41% higher than in the control group. The influence of enrichment on the growth rate of the tested fish was also determined.

Intestinal microbiome is one of the main factors that have a direct impact on the health and immunity of animals. Compared to mammals, the gut microbiome of fish is poorly understood. Nevertheless, it is known that the composition of the microbiome depends on the fish species, environmental conditions and, above all, diet [38]. In recent years, NGS metagenomic sequencing has been widely used in research on the fish microbiome community, due to the accuracy of the data obtained and relatively low cost [23]. Present study investigated the impact of sodium butyrate and β-glucan addition on the biodiversity and gut microbiome profile of sturgeon using NGS data. Numerous scientific works emphasize the importance of the biodiversity of the microbiome community in the fight against pathogens and inflammation [39–41]. The introduction of sodium butyrate and β-glucan supplementation to the diet of African catfish at the fry and juvenile stages caused modulation of α-diversity indicators such as Shannon, Simpson and Chao-1 index, compared to the unsupplemented control group [27,42]. This is because the active substances such as sodium butyrate and β-glucan have a direct and indirect effect on the intestinal microbiome and its biodiversity [42]. β-glucan is a source of energy and a nutrient for intestinal bacteria, influencing their growth in the intestinal environment [43]. In contrast, sodium butyrate increases the growth of bacteria producing pro-inflammatory SCFAs [44]. This study showed that dietary supplementation of juvenile hybrid sturgeon in the FQV1 group significantly influenced the α-diversity indices of the intestinal microbiome compared to the control group. The Chao-1 index indicating the species richness of the fish microbiome in the FQV1 group is approximately 1.4 times higher than in the control group. The above is also confirmed by the analysis of unique ASVs, which indicate

species diversity. A significant increase in the number of unique ASVs was observed in the FQV1 group compared to the other groups and the control group (approximately 1.5x). The results presented by Bozzi et al. [45] prove that the high species diversity of the microbiome allows for the cooperation of microorganisms in the intestinal environment, especially in the event of inflammation in the body. This statement is also confirmed in this paper. In the FQV1 group, where the highest species biodiversity was observed, the highest activity of lysozyme was also determined, which is responsible for one of the first lines of defense against pathogens [46].

Increase in the relative number of LAB bacteria of the genus *Lactobacillus* and *Lactococcus* was observed in the FQV1 group compared to the other groups. In the control group, the highest share of pathogenic bacteria—*C. sensu stricto 1*—was determined, while the FQV1 group had the lowest share. This bacterium is an opportunistic pathogen, responsible for the occurrence of intestinal inflammation [47]. Other authors also reach similar conclusions, observing an increased frequency in LAB occurrence and a simultaneous reduction in the number of pathogenic bacteria due to the supplementation of the fish diet with salts of organic acids and prebiotics. Tian et al. [48] showed that enriching the diet of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) with sodium butyrate has a positive effect on the intestinal microbiome profile, promoting the *Lactobacillus* genus, while reducing the number of pathogenic bacteria, i.e., *Aeromonas* and *Escherichia coli*. Adbel-Mohsen et al. [18], in their research, also confirmed the positive effect of sodium butyrate on the microbiome of European seabass fry (*Dicentrachus labrax*). β-glucan also modulates the composition of the fish gut microbiome. An example is research conducted on Senegalese sole (*Solea senegalensis)*, where β-glucan obtained from yeast was used as a dietary supplement. It has been shown that β-glucan administered with the diet has a positive effect in reducing the number of pathogenic bacteria *Vibrio sp* [49].

In the group fed with the feed with the highest content of β-glucan-FQV3 (60 mg/kg) and sodium butyrate at the level of 50 mg/kg, a high level of lysozyme activity in the blood was observed, compared to the control group. It turns out that neutrophils, Natural Killer (NK) cells and macrophages have glucan receptors, the presence of which activates cells and immune response mechanisms, i.e., phagocytosis and cytokine release. These cytokines stimulate the production of new white blood cells, which increase the secretion of lysozyme [50]. Studies conducted on yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*), Indian carp (*Labeo rohita*) and sea bream (*Pagrus major*) also prove that enriching the diet with β-glucan increases the activity of lysozyme in the blood, compared to unsupplemented groups [51–53]. Moreover, it is found that β-glucan in the diet contributes to increased resistance to stress caused by low salinity [53]. A commonly accepted measure of stress in fish is the level of cortisol, a glucocorticoid hormone released into the blood by intrarenal cells. As a result of long-term stress and, consequently, high levels of cortisol in the blood, immunosuppression may occur. This condition contributes to the impairment of the immune response, which makes the fish more vulnerable to bacterial or viral infections [54]. It turns out that supplementing the fish diet with β-glucan contributes to the inhibition of cortisol secretion. Lopes et al. [13], in their studies on pacu (*Piaractus mesopotamicus*), also confirm that β-glucan significantly reduces the concentration of cortisol in the blood, even during bacterial infection with *Aeromonas hydrophila*. Similar conclusions were also reached by Dawood et al. [55], examining the effect of β-glucan in the diet on, among others, blood cortisol levels after exposure to chlorpyrifos. The use of Nile tilapia β-glucan in the diet significantly reduced the level of cortisol in the blood, compared to the unsupplemented group. The influence of 0.1% and 0.5% β-glucan solution administered in the form of a bath on the level of cortisol in the blood and the healing of wounds in silver catfish (*Rhamdia quelen*) was also investigated. It was found that daily bathing in 0.5% β-glucan reduces the level of cortisol in the blood and accelerates wound healing [56]. However, in this study, no significant reduction in cortisol in the blood was observed after using b-glucan as a dietary supplement.

Many scientists focus on supplementing animal feed with single active ingredients such as sodium butyrate or β-glucan. Sodium butyrate is a particularly interesting compound, due to its proven effect on stimulating the growth and improving the intestinal function also of aquatic animals [57]. Studies on the feeding of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) have shown that the higher the dose of butyrate in the diet (up to 2 g/kg of feed), the more favorable the growth parameters such as body weight gain rate (WGR) and SGR [58]. Research conducted by Fang et al. [59] on Pengze Prussian carp (*Carassius auratus var pengze*) show a similar trend. The dose of sodium butyrate at the level of 2.0–4.0 g/kg of feed caused a faster increase in fish weight compared to the group fed with feed with a lower butyrate content (1.0 g/kg) and the control group. Studies on dietary supplementation of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*) with sodium butyrate showed a similar relationship, finding an improvement in final body weight and SGR with increasing sodium butyrate content in the diet (up to 2.0 g/kg feed) [60]. Studies conducted on arapaima fish (*Arapaima gigas*) indicate that the most beneficial dose is 1.2 g of butyrate/kg of feed. This dose induces the best weight gain and SGR, and also improves SR [61]. The literature review and the presented data show that the optimal doses of sodium butyrate in the diet as a growth stimulator largely depend not only on the form, but also on the species, of the fish examined.

Many studies also focus on single supplementation of dietary β-glucan on breeding parameters and parameters of the immune response of aquatic animals. The effect of dietary supplementation of juvenile Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) with β-glucan in the form of the commercial product MacroGard was examined. It has been shown that a dose of β-glucan of 2.0 g/kg of feed causes an acceleration in the growth rate and SGR of the tested fish [62]. Similar conclusions were also reached by Do Huu et al. [63], examining the effect of β-glucan on the breeding performance of pompano fish (*T. ovatus*). The dose of β-glucan at the level of 0.1–0.2% significantly improved the final body weight and SGR, and also increased the survival rate of the fish. A dietary dose of 0.2% β-glucan was also used by Khanjani et al. [64], examining its effect on the growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). A significant improvement in the survival rate and growth rate of fish after a period of enriched feeding was demonstrated. However, research conducted on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) indicates that dietary supplementation with β-glucan has no effect on growth rate [65]. However, it was observed that a dose of 0.4–0.5% significantly promoted the immune response and resistance to infections in the tested fish. Sealey et al. [66], in their studies on rainbow trout, found a positive effect on survival during IHNV viral infection. β-glucan in combination with other ingredients, such as mannan oligosaccharide and *Lactobacillus plantarum*, produces much better effects than each of these ingredients given separately in the fish diet. Their synergistic effect improves growth parameters, as well as the innate immune response [67].

The beneficial doses of sodium butyrate and β-glucan in the fish diet as growth stimulants largely depend on the tested fish species and/or additional substances with a synergistic effect. In this study, the most favorable values of breeding indicators were determined in the group fed with feed enriched with the FQV2 variant, which contained the highest amount of sodium butyrate-150 mg/kg of feed among all research groups and β-glucan, at the level of 20 mg/kg of feed. Appropriate feed utilization by farmed fish indirectly affects the growth rate, and is associated with the economic effect of breeding. However, the intestinal microbiome of fish is crucial in improving the bioavailability of nutrients contained in feed. Studies on determining the influence of intestinal microorganisms on feed utilization were mainly conducted on mammals. There is little information in the literature on the role of the fish intestinal microbiome in feed absorption [68,69]. In fish, the mechanisms responsible for the regulation of metabolism by the intestinal microbiome are insufficiently understood. It is assumed that the mechanisms of SCFA formation as secondary metabolites of the intestinal microbiome in fish and mammals are similar. However, the effects of SCFAs on fish metabolism through appropriate receptors require further research [38].

β-glucan, used by the intestinal microbiome as an energy source, is converted to SCFA, mainly to acetate, propionic and butyric acid. However, as a result of butyrate dissociation, butyric acid is formed [70]. The resulting SCFAs are mediators between intestinal microorganisms and the host. SCFAs, especially butyric acid, play a significant role in the nutrition of colonocytes, enabling their regeneration and proliferation by increasing the height of the intestinal villi [71]. The result is better absorption and utilization of nutrients contained in the feed in metabolic pathways [10,72,73]. SCFAs also improve the bioavailability of certain dietary amino acids by preventing their oxidation in the gastrointestinal tract [74]. In addition, SCFAs stimulate the exocrine function of the pancreas by increasing the secretion of digestive enzymes. These enzymes contribute to improving the digestibility and assimilability of feed [75]. Moreover, it turns out that the composition of the intestinal microbiome of predatory fish species such as sturgeon is closely related to the activity of the protein-digesting enzyme trypsin, and, in herbivorous species, to the activity of cellulase and amylase [76]. Short-chain fatty acids are also involved in maintaining an appropriate profile of intestinal microorganisms by regulating the secretion of antimicrobial proteins by the intestinal epithelium [77]. It turns out that SCFAs produced in the intestines, after entering the bloodstream, also affect other organs. As a result of connection with appropriate receptors on the surface, they regulate many processes, thus influencing metabolism, inflammation and immunity [78]. There is little scientific information about the role of SCFAs on the fish, but research conducted on zebrafish (*Danio rerio*) suggests that butyric acid derived from the fermentation of polysaccharides has an impact on the regulation of resistance to infections, increasing the expression of IL-1β and the percentage of intestinal neutrophils [79].

Many scientists undertake research to determine the appropriate time for administering supplements, in order to reduce it to a minimum. It turns out many times that a monthly (or even shorter) supplementation period is sufficient to notice significant changes in the intestinal microbiome, immunity or growth. This finding is consistent with studies conducted on other fish species. A four-week period of rearing juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*) using the above-mentioned substances was sufficient to notice significant changes in the intestinal microbiome profile—an increase in the *Lactobacillus* population and a decrease in the percentage of the pathogenic *Candidatus* Arthromitus strain, compared to the control group. Moreover, a significant improvement in growth rate was observed in all supplemented groups, together with a reduction in cannibalism [27]. Another research on juvenile African catfish using bee pollen as a feed additive at various concentrations has shown that a three-week rearing period with enriched nutrition is sufficient to significantly improve growth parameters and induce positive changes in the intestinal microbiome, leading to an increase in lactic acid bacteria, compared to the control group [26]. Similarly, research on juvenile *P. mesopotamicus* demonstrates that even a 14-day period of feeding with β-glucan-enriched feed is enough to produce noticeable effects, such as reduced cortisol levels both at rest and after bacterial infection, thereby confirming the immunomodulatory effect of β-glucan in a short timeframe [13]. A study by Chiu et al. [80] shows that four weeks of rearing grouper (*Epinephelus coioides*) with *Saccharomyces cerevisiae*-enriched feed resulted in a weight gain of over 200%, compared to the unsupplemented group. Additionally, immunological parameters, including lysozyme activity in the blood, were significantly higher (approximately three times) than in the control group, after 28 days. Fu et al. [81] used a 33-day rearing period of sea bass (*Lateolabrax maculatus*) with probiotic supplementation administered in water. It has been observed that a 30-day rearing period is enough to significantly improve growth and immunity. The supplemented groups showed significantly higher activities of superoxide dismutase, catalase and lysozyme. In addition, changes in the microbiome (increase in the number of microorganisms) were observed. Another study investigated the effect of a feed additive consisting of chitosan and *Acinetobacter* KU011TH on a hybrid of catfish (*C. gariepinus* × *Clarias macrocephalus*) over a 28-day period. Four weeks of rearing were sufficient to demonstrate significant changes in lysozyme activity in the blood, and other

immunological parameters, compared to the control group [82]. The results obtained in this study also confirm that a 30-day administration of sodium butyrate, β-glucan and vitamin is sufficient to observe significant changes in the intestinal microbiome and other measured parameters. This is particularly useful in terms of commercialization and the creation of preparations that can be used for a month, thus obtaining good-quality stocking material for further commercial fish breeding.

5. Conclusions

The research results presented in this study allow us to conclude the appropriate selection of active ingredients (sodium butyrate, β-glucan and vitamins) in the nutrition of juvenile hybrid sturgeon for the modulation of the intestinal microbiome profile, promoting probiotic bacteria and, at the same time, displacing potentially pathogenic species. Moreover, the above substances positively regulate the immune response of the fish's immune system. Supplementation increases the activity of lysozyme in the blood—the first line of defense against pathogens. However, compared to the control group, there was no significant reduction in the level of cortisol—the stress hormone—in the supplemented groups. The supplementation also has a positive effect on the growth rate of the tested fish.

Summarizing the obtained research results, it can be concluded that supplementing the diet of hybrid sturgeon with sodium butyrate and β-glucan may increase the efficiency of breeding this species by reducing the occurrence of infectious disease outbreaks. The presented supplementation can become a starting point for creating a complementary feed mixture recommended for use in sturgeon aquaculture.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/genes15101276/s1, Table S1: Composition of commercial feed used in the feeding experiment on juvenile sturgeon hybrid (*Acipenser gueldenstaedtii* × *Acipenser baerii*).

Author Contributions: Conceptualization, M.A.-R., J.N., M.K.Ł. and D.K.; methodology, M.A.-R., J.N. and D.K.; validation, M.A.-R. and J.N.; formal analysis, M.A.-R. and J.N.; investigation, D.K.; resources, D.K. and M.K.Ł.; data curation, M.A.-R.; writing—original draft preparation, M.A.-R.; writing—review and editing, J.N., M.K.Ł., S.M.H. and D.K.; visualization, M.A.-R.; supervision, D.K.; project administration, M.A.-R. and D.K.; funding acquisition, M.K.Ł. and D.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Work carried out as part of the Industrial PhD program (4th edition) financed by the Polish Ministry of Education and Science (application number: 486036, contract number: DWD/4/80/2020) and by the Department of Research and Development, Chemprof, Olsztyn.

Institutional Review Board Statement: The procedures involving animals used in the experiment were carried out in accordance with the decision of the Local Ethical Committee for Animal Experiments in Olsztyn (LKE/11/2023).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data used to support the results of this study are available from the corresponding author, upon request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Stakenas, S.; Pilinkovskij, A. Migration patterns and survival of stocked Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus* Mitchill, 1815) in nemunas basin, Baltic Sea. *J. Appl. Ichthyol.* **2019**, *35*, 128–137. https://doi.org/10.1111/jai.13871.
2. EUMOFA. *Sturgeon Meat and Other by-Products of Caviar. Production, Trade, and Consumption In and Outside the EU*; Maritime Affairs and Fisheries: Brussel, Belgium, 2023.
3. Havelka, M.; Arai, K. Hybridization and Polyploidization in Sturgeon. In *Sex Control in Aquaculture*, 1st ed.; Wang, H.P., Piferrer, F., Chen, S.L., Shen, Z.G., Eds.; Wiley: Oxford, UK, 2018; Volume 1, pp. 669–687. https://doi.org/10.1002/9781119127291.ch34.

4. Shivaramu, S.; Vuong, D.T.; Havelka, M.; Šachlová, H.; Lebeda, I.; Kašpar, V.; Flajšhans, M. Influence of interspecific hybridization on fitness-related traits in Siberian sturgeon and Russian sturgeon. *Czech J. Anim. Sci.* **2019**, *64*, 78–88. https://doi.org/10.17221 /165/2018-CJAS.
5. Lee, S.; Zhao, H.; Li, Y.; Binkowski, F.; Deng, D.-F.; Shepherd, B.; Hung, S.; Bai, S. Evaluation of formulated feed for juvenile lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) based on growth performance and nutrient retention. *N. Am. J. Aquac.* **2018**, *80*, 223–236. https://doi.org/10.1002/naaq.10026.
6. Yamamoto, F.Y.; Castillo, S.; de Cruz, C.R.; Chen, K.; Hume, M.E.; Gatlin, D.M. Synergistic effects of the β-1,3 glucan paramylon and vitamin C on immunological responses of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × M. *saxatilis*) were pronounced in vitro but more moderate in vivo. *Aquaculture* **2020**, *526*, 735394. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735394.
7. Hussain, S.M.; Jamil, M.; Ali, S.; Shahzad, M.M.; Hussain, M.; Ahmad, N.; Riaz, D. Gene expression, growth performance and body composition of *Labeo rohita* fingerlings fed on polyphenols supplement. *Sains Malays.* **2023**, *52*, 3357–3370. http://doi.org/10.17576/jsm-2023-5212-02.
8. Mathiessen, H.; Jaafar, R.M.; Al-Jubury, A.; von Gersdorff Jørgensen, L.; Kania, P.W.; Buchmann, K. Comparative In Vitro and In Vivo Effects of Feed Additives on Rainbow Trout Response to *Ichthyophthirius multifiliis*. *N. Am. J. Aquac.* **2021**, *83*, 67–77. https://doi.org/10.1002/naaq.10167.
9. Abdel-Latif, H.M.R.; Dawood, M.A.O.; Alagawany, M.; Faggio, C.; Nowosad, J.; Kucharczyk, D. Health benefits and potential applications of fucoidan (FCD) extracted from brown seaweeds in aquaculture: An updated review. *Fish Shellfish Immunol.* **2022**, *122*, 115–130. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.01.039.
10. Hoseinifar, S.H.; Sun, Y.-Z.; Caipang, C.M. Short-chain fatty acids as feed supplements for sustainable aquaculture: An updated view. *Aquac. Res*. **2017**, *48*, 1380–1391. https://doi.org/10.1111/are.13239.
11. Dawood, M.A.O.; Metwally, A.E.-S.; El-Sharawy, M.E.; Atta, A.M.; Elbialy, Z.I.; Abdel-Latif, H.M.R.; Paray, B.A. The role of β-glucan in the growth, intestinal morphometry, and immune-related gene and heat shock protein expressions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under different stocking densities. *Aquaculture* **2020**, *523*, 735205. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735205.
12. Dawood, M.A.O.; Eweedah, N.M.; Moustafa, E.M.; Shahin, M.G. Synbiotic Effects of *Aspergillus oryzae* and β-Glucan on Growth and Oxidative and Immune Responses of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2020**, *12*, 172–183. https://doi.org/10.1007/s12602-018-9513-9.
13. Lopes, L.M.F.; Marinho de Mello, M.M.; Urbinati, E.C. β-Glucan reduces cortisol plasma levels, enhances innate immune system after *A. hydrophila* inoculation, and has lipolytic effects on the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture* **2022**, *546*, 737411. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737411.
14. Reyes-Becerril, M.; Angulo, M.; Sanchez, V.; Guluarte, C.; Angulo, C. β-D-glucan from marine yeast *Debaryomyces hansenii* BCS004 enhanced intestinal health and glucan-expressed receptor genes in Pacific red snapper *Lutjanus peru*. *Microb. Pathog.* **2020**, *143*, 104141. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104141.
15. Wu, X.; Wang, L.; Xie, Q.; Tan, P. Effects of dietary sodium butyrate on growth, diet conversion, body chemical compositions and distal intestinal health in yellow drum (*Nibea albiflora*, Richardson). *Aquac. Res.* **2020**, *51*, 69–79. https://doi.org/doi: 10.1111/are.14348.
16. Zhang, H.; Yi, L.; Sun, R.; Zhou, H.; Xu, W.; Zhang, W.; Mai, K. Effects of dietary citric acid on growth performance, mineral status and intestinal digestive enzyme activities of large yellow croaker *Larimichthys crocea* (Richardson, 1846) fed high plant protein diets. *Aquaculture* **2016**, *453*, 147–153. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015. 11.032.
17. Abdel-Mohsen, H.; Wassef, E.; El-Bermawy, N.; Abdel-Meguid, N.; Saleh, N.; Barakat, K.; Shaltout, O. Advantageous effects of dietary butyrate on growth, immunity response, intestinal microbiota and histomorphology of European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) fry. *Egypt. J. Aquat. Biol. Fish.* **2018**, *22*, 93–110. https://doi.org/10.21608/ ejabf.2018.12055.
18. Rimoldi, S.; Gliozheni, E.; Ascione, C.; Gini, E.; Terova, G. Effect of a specific composition of short-and medium-chain fatty acid 1-monoglycerides on growth performances and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *PeerJ* **2018**, *31*, 5355. https://doi.org/10.7717/peerj.5355.
19. Johny, T.K.; Puthusseri, R.M.; Bhat, S.G. A primer on metagenomics and next-generation sequencing in fish gut microbiome research. *Aquac. Res.* **2021**, *52*, 4574–4600. https://doi.org/10.1111/are.15373.
20. Gallo, B.D.; Farrell, J.M.; Leydet, B. Use of next generation sequencing to compare simple habitat and species level differences in the gut microbiota of an invasive and native freshwater fish species. *PeerJ* **2020**, *8*, 10237. https://doi.org/10.7717/peerj.10237.
21. Rimoldi, S.; Terova, G.; Ascione, C.; Giannico, R.; Brambilla, F. Next generation sequencing for gut microbiome characterization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed animal by-product meals as an alternative to fishmeal protein sources. *PLoS ONE* **2018**, *13*, 0193652. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193652.
22. Llewellyn, M.S.; Boutin, S.; Hoseinifar, S.H.; Derome, N. Teleost microbiomes: The state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 207. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00207.
23. Diwan, A.D.; Harke, S.N.; Gopalkrishna; Panche, A.N. Aquaculture industry prospective from gut microbiome of fish and shellfish: An overview. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2022**, *106*, 441–469. https://doi.org/10.1111/jpn.13619.
24. Tarnecki, A.M.; Burgos, F.A.; Ray, C.L.; Arias, C.R. Fish intestinal microbiome: Diversity and symbiosis unraveled by metagenomics. *J. Appl. Microbiol.* **2017**, *123*, 2–17. https://doi.org/10.1111/jam.13415.

25. Fopp-Bayat, D.; Ciemniewski, T.; Cejko, B.I. Embryonic Development and Survival of Siberian Sturgeon × Russian Sturgeon (*Acipenser baerii* × *Acipenser gueldenstaedtii*) Hybrids Cultured in a RAS System. *Animals* **2023**, *13*, 42. https://doi.org/10.3390/ani13010042.
26. Nowosad, J.; Jasiński, S.; Arciuch-Rutkowska, M.; Abdel-Latif, H.M.R.; Wróbel, M.; Mikiewicz, M.; Zielonka, Ł.; Kotsyumbas, I.Y.; Muzyka, V.P.; Brezvyn, O.M.; et al. Effects of Bee Pollen on Growth Performance, Intestinal Microbiota and Histomorphometry in African Catfish. *Animals* **2023**, *13*, 132. https://doi.org/10.3390/ani13010132.
27. Arciuch-Rutkowska, M.; Nowosad, J.; Jasiński, S.; Łuczyński, M.; Kucharczyk, D. Effects of the diet enrichment with β-glucan, sodium salt of butyric acid and vitamins on growth parameters and the profile of the gut microbiome of juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*). *Anim. Feed Sci. Technol.* **2024**, *310*, 115941. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2024.115941.
28. Sikora, M.; Nowosad, J.; Biegaj, M.; Kucharczyk, D.; Dębowski, M. The possibility of application of agglomerate elastomers (EPP) as media for biological bed in aquaculture. *Aquac. Res.* **2018**, *49*, 2988–2994. https://doi.org/10.1111/are.13758.
29. Suratip, N.; Charoenwattanasak, S.; Klahan, R.; Herault, M.; Yuangsoi, B. An investigation into the effects of using protein hydrolysate in low fish meal diets on growth performance, feed utilization and health status of snakehead fish (*Channa striata*) fingerling. *Aquac. Rep.* **2023**, *30*, 101623. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101623.
30. El-Asely, A.M.; Abbass, A.A.; Austin, B. Honey bee pollen improves growth, immunity and protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against infection with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* **2014**, *40*, 500–506. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.07.017.
31. Riaz, D.; Hussain, S.M.; Hussain, M.; Muhammad Zubair-ul-Hassan Arsalan, M.Z.-H.; Naeem, E. Probiotics Supplementation for Improving Growth Performance, Nutrient Digestibility and Hematology of *Catla catla* Fingerlings Fed Sunflower Meal-Based Diet. *Pak. J. Zool.* **2024**, *56*, 1369–1377. https://doi.org/10.17582/journal.pjz/20221010111027.
32. Sadoul, B.; Geffroy, B. Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes. *J. Fish Biol.* **2019**, *94*, 540–555. https://doi.org/10.1111/jfb.13904.
33. Dulski, T.; Kozłowski, K.; Ciesielski, S. Habitat and seasonality shape the structure of tench (*Tinca tinca* L.) gut microbiome. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 4460. https://doi.org/10.1038/s41598-020-61351-1.
34. Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.C.; Al-Ghalith, G.A.; Alexander, H.; Alm, E.J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 852–857. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9.
35. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.; Holmes, S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 581–583. https://doi.org/10.1038/nmeth.3869.
36. Sasada, R.; Weinstein, M.; Prem, A.; Jin, M.; Bhasin, J. FIGARO: An efficient and objective tool for optimizing microbiome rRNA gene trimming parameters. *J. Biomol. Tech.* **2020**, *31*, S2.
37. Novriadi, R.; Fadhilah, R.; Wahyudi, A.E.; Trullàs, C. Effects of hydrolysable tannins on the growth performance, total haemocyte counts and lysozyme activity of pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Rep.* **2021**, *21*, 100796. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100796.
38. Luan, Y.; Li, M.; Zhou, W.; Yao, Y.; Yang, Y.; Zhang, Z.; Ringø, E.; Olsen, R.E.; Clarke, J.L.; Xie, S.; et al. The Fish Microbiota: Research Progress and Potential Applications. *Engineering* **2023**, *29*, 137–146. https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.12.011.
39. Wah-Suárez, M.I.; Vázquez, M.A.M.; Bosques-Padilla, F.J. Inflammatory bowel disease: The role of commensal microbiome in immune regulation. *Gastroenterol. Hepatol. (Engl. Ed.)* **2022**, *45*, 626–636. https://doi.org/10.1016/j.gastre.2021.08.001.
40. Li, P.; Ma, X.; Liu, D.; Wei, Y.; Li, P.; Hou, H.; Yao, J.; Chen, A.; Liang, Y.; Zhou, Z.; et al. A microbiome abundant environment remodels the intestinal microbiota and improves resistance to obesity induced by chlorpyrifos in mice. *Environ. Pollut.* **2022**, *315*, 120415. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120415.
41. Hitch, T.C.A.; Hall, L.J.; Walsh, S.K.; Leventhal, G.E.; Slack, E.; de Wouters, T.; Walter, J.; Clavel, T. Microbiome-based interventions to modulate gut ecology and the immune system. *Mucosal Immunol.* **2022**, *15*, 1095–1113. https://doi.org/10.1038/s41385-022-00564-1.
42. Arciuch-Rutkowska, M.; Nowosad, J.; Gil, Ł.; Czarnik, U.; Kucharczyk, D. Synergistic Effect of Dietary Supplementation with Sodium Butyrate, β-Glucan and Vitamins on Growth Performance, Cortisol Level, Intestinal Microbiome and Expression of Immune-Related Genes in Juvenile African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 4619. https://doi.org/10.3390/ijms25094619.
43. Singh, R.P.; Bhardwaj, A. b-glucans: A potential source for maintaining gut microbiota and the immune system. *Front. Nutr.* **2023**, *10*, 1143682. https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1143682.
44. Facchin, S.; Vitulo, N.; Calgaro, M.; Buda, A.; Romualdi, C.; Pohl, D.; Perini, B.; Lorenzon, G.; Marinelli, C.; D'Incà, R.; et al. Microbiota changes induced by microencapsulated sodium butyrate in patients with inflammatory bowel disease. *Neurogastroenterol. Motil.* **2020**, *32*, e13914. https://doi:10.1111/nmo.13914.
45. Bozzi, D.; Rasmussen, J.A.; Carøe, C.; Sveier, H.; Nordøy, K.; Gilbert, M.T.P.; Limborg, M.T. Salmon gut microbiota correlates with disease infection status: Potential for monitoring health in farmed animals. *Anim. Microbiome* **2021**, *3*, 30. https://doi.org/10.1186/s42523-021-00096-2.
46. Ragland, S.A.; Criss, A.K. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006512. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006512.

47. Hu, C.; Niu, X.; Chen, S.; Wen, J.; Bao, M.; Mohyuddin, S.G.; Yong, Y.; Liu, X.; Wu, L.; Yu, Z.; et al. A Comprehensive Analysis of the Colonic Flora Diversity, Short Chain Fatty Acid Metabolism, Transcripts, and Biochemical Indexes in Heat-Stressed Pigs. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 717723. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.717723.
48. Tian, L.; Zhou, X.-Q.; Jiang, W.-D.; Liu, Y.; Wu, P.; Jiang, J.; Kuang, S.-Y.; Tang, L.; Tang, W.-N.; Zhang, Y.-A.; et al. Sodium butyrate improved intestinal immune function associated with NF-jB and p38MAPK signalling pathways in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish Shellfish Immunol.* **2017**, *66*, 548–563. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.049.
49. Carballo, C.; Pinto, P.I.S.; Mateus, A.P.; Berbel, C.; Guerreiro, C.C.; Martinez-Blanch, J.F.; Codoñer, F.M.; Mantecon, L.; Power, D.M.; Manchado, M. Yeast β-glucans and microalgal extracts modulate the immune response and gut microbiome in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish Shellfish Immunol.* **2019**, *92*, 31–39. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.05.044.
50. Khanjani, M.; Sharifinia, M.; Ghaedi, G. β-glucan as a promising food additive and immunostimulant in aquaculture industry. *Ann. Anim. Sci.* **2022**, *22*, 817–827. https://doi.org/10.2478/aoas-2021-0083.
51. Ai, Q.; Mai, K.; Zhang, L.; Tan, B.; Zhang, W.; Xu, W.; Li, H. Effects of dietary β-1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish Shellfish Immunol.* **2007**, *22*, 394–402. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.06.011.
52. Misra, C.K.; Das, B.K.; Mukherjee, S.C.; Pattnaik, P. Effect of Multiple Injections of β-Glucan on Non-Specific Immune Response and Disease Resistance in *Labeo rohita* Fingerlings. *Fish Shellfish Immunol.* **2006**, *20*, 305–319. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.05.007.
53. Dawood, M.A.O.; Koshio, S.; Ishikawa, M.; Yokoyama, S.; El Basuini, M.F.; Hossain, M.S.; Nhu, T.H.; Moss, A.S.; Dossou, S.; Wei, H. Dietary supplementation of β-glucan improves growth performance, the innate immune response and stress resistance of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquac. Nutr.* **2017**, *23*, 148–159. https://doi.org/10.1111/anu.12376.
54. Marinho de Mello, M.M.; de Fátima Pereira de Faria, C.; Zanuzzo, F.S.; Urbinati, E.C. β-glucan modulates cortisol levels in stressed pacu (*Piaractus mesopotamicus*) inoculated with heat-killed *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* **2019**, *93*, 1076–1083. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.07.068.
55. Dawood, M.A.O.; Abdel-Razik, N.I.; Gewaily, M.S.; Sewilam, H.; Paray, B.A.; Soliman, A.A.; Abdelhiee, E.Y.; Aboubakr, M.; Doan, H.V.; El-Sabagh, M.; et al. β-Glucan improved the immunity, hepato-renal, and histopathology disorders induced by chlorpyrifos in Nile tilapia. *Aquac. Rep.* **2020**, *18*, 100549. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100549.
56. Voloski, A.P.; de Figueiredo Soveral, L.; Dazzi, C.C.; Sutili, F.; Frandoloso, R.; Kreutz, L.C. β-Glucan improves wound healing in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Fish Shellfish Immunol.* **2019**, *93*, 575–579. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.08.010.
57. El-Sharkawy, E.A.; El-Razek, I.M.A.; Amer, A.A.; Soliman, A.A.; Shukry, M.; Gewaily, M.S.; Téllez-Isaías, G.; Kari, Z.A.; Dawood, M.A.O. Effects of sodium butyrate on the growth performance, digestive enzyme activity, intestinal health, and immune responses of Thinlip Grey Mullet (*Liza ramada*) juveniles. *Aquac. Rep.* **2023**, *30*, 101530. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101530.
58. Chen, W.; Gao, S.; Chang, K.; Zhao, X.; Niu, B. Dietary sodium butyrate supplementation improves fish growth, intestinal microbiota composition, and liver health in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) fed high-fat diets. *Aquaculture* **2023**, *564*, 739040. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739040.
59. Fang, L.; Wang, Q.; Guo, X.; Pan, X.; Li, X. Effects of dietary sodium butyrate on growth performance, antioxidant capacity, intestinal histomorphology and immune response in juvenile Pengze crucian carp (*Carassius auratus* Pengze). *Aquac. Rep.* **2021**, *21*, 100828. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100828.
60. Zhou, C.; Lin, H.; Huang, Z.; Wang, J.; Wang, Y.; Yu, W. Effect of dietary sodium butyrate on growth performance, enzyme activities and intestinal proliferation-related gene expression of juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus*. *Aquac. Nutr.* **2019**, *25*, 1261–1271. https://doi.org/10.1111/anu.12940.
61. Luz, J.; Ramos, A.P.; Melo, J.F.; Braga, L.G. Use of sodium butyrate in the feeding of Arapaima gigas (Schinz, 1822) juvenile. *Aquaculture* **2019**, *510*, 248–255. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.065.
62. Aramli, M.S.; Kamangar, B.; Nazari, R.M. Effects of dietaryβ-glucan on the growth and innate immune response of juvenile Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. *Fish Shellfish Immunol.* **2015**, *47*, 606–610. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.10.004.
63. Do Huu, H.; Sang, M.H.; Thanh Thuy, N.T. Dietary β-glucan improved growth performance, *Vibrio* counts, haematological parameters and stress resistance of pompano fish, *Trachinotus ovatus* Linnaeus, 1758. *Fish Shellfish Immunol.* **2016**, *54*, 402–410. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.161.
64. Khanjani, M.H.; Ghaedi, G.; Sharifinia, M. Effects of diets containing β-glucan on survival, growth performance, haematological, immunity and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Aquac. Res.* **2021**, *53*, 1842–1850. https://doi.org/0.1111/are.15712.
65. Dou, X.; Huang, H.; Li, Y.; Deng, J.; Tan, B. Effects of dietary β-glucan on growth rate, antioxidant status, immune response, and resistance against *Aeromonas hydrophila* in genetic improvement of farmed tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*). *Aquac. Rep.* **2023**, *29*, 101480. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101480.
66. Sealey, W.M.; Barrows, F.T.; Hang, A.; Johansen, K.A.; Overturf, K.; LaPatra, S.E.; Hardy, R.W. Evaluation of the ability of barley genotypes containing different amounts of β-glucan to alter growth and disease resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2008**, *141*, 115–128. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.05.022.
67. Jami, M.J.; Kenari, A.A.; Paknejad, H.; Mohseni, M. Effects of dietary b-glucan, mannan oligosaccharide, *Lactobacillus plantarum* and their combinations on growth performance, immunity and immune related gene expression of Caspian trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877). *Fish Shellfish Immunol.* **2019**, *91*, 202–208. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.05.024.

68. Singh, K.M.; Shah, T.M.; Reddy, B.; Deshpande, S.; Rank, D.N.; Joshi, C.G. Taxonomic and gene-centric metagenomics of the fecal microbiome of low and high feed conversion ratio (FCR) broilers. *J. Appl. Genet.* **2014**, *55*, 145–154. https://doi.org/10.1007/s13353-013-0179-4.
69. Bergamaschi, M.; Tiezzi, F.; Howard, J.; Huang, Y.J.; Gray, K.A.; Schillebeeckx, C.; McNulty, N.P.; Maltecca, C. Gut microbiome composition differences among breeds impact feed efficiency in swine. *Microbiome* **2020**, *8*, 110. https://doi.org/10.1186/s40168-020-00888-9.
70. Hee, B.; Wells, J.M. Microbial Regulation of Host Physiology by Short-chain Fatty Acids. *Trends Microbiol.* **2021**, *29*, 700–712. https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.02.001.
71. Martin-Gallausiaux, C.; Marinelli, L.; Blottière, H.M.; Larraufie, P.; Lapaque, N. SCFA: Mechanisms and functional importance in the gut. *Proc. Nutr. Soc.* **2021**, *80*, 37–49. https://doi.org/10.1017/S0029665120006916.
72. Liu, W.; Yang, Y.; Zhang, J.; Gatlin, D.M.; Ringø, E.; Zhou, Z. Effects of dietary microencapsulated sodium butyrate on growth, intestinal mucosal morphology, immune response and adhesive bacteria in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) pre-fed with or without oxidised oil. *Br. J. Nutr.* **2014**, *112*, 15–29. https://doi.org/10.1017/S0007114514000610.
73. Abdel-Latif, H.M.R.; Abdel-Tawwab, M.; Dawood, M.A.O.; Menanteau-Ledouble, S.; El-Matbouli, M. Benefits of Dietary Butyric Acid, Sodium Butyrate, and Their Protected Forms in Aquafeeds: A Review. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* **2020**, *28*, 421–448. https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1758899.
74. Ng, W.-K.; Koh, C.-B. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. *Rev. Aquac.* **2017**, *9*, 342–368. https://doi.org/10.1111/raq.12141.
75. Ahsan, U.; Cengiz, Ö.; Raza, I.; Kuter, E.; Chacher, M.F.A.; Iqbal, Z.; Umar, S.; Çakir, S. Sodium butyrate in chicken nutrition: The dynamics of performance, gut microbiota, gut morphology, and immunity. *World's Poult. Sci. J.* **2016**, *72*, 265–275. https://doi.org/10.1017/S0043933916000210.
76. Liu, H.; Guo, X.; Gooneratne, R.; Lai, R.; Zeng, C.; Zhan, F.; Wang, W. The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24340. https://doi.org/10.1038/srep24340.
77. Jayachandran, M.; Chen, J.; Chung, S.S.M.; Xu, B. A critical review on the impacts of β-glucans on gut microbiota and human health. *J. Nutr. Biochem.* **2018**, *6*, 101–110. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.06.010.
78. Markowiak-Kopeć, P.; Śliżewska, K. The Effect of Probiotics on the Production of Short-Chain Fatty Acids by Human Intestinal Microbiome. *Nutrients* **2020**, *12*, 1107. https://doi.org/10.3390/nu12041107.
79. Shan, C.; Li, M.; Liu, Z.; Xu, R.; Qiao, F.; Du, Z.-Y.; Zhang, M.-L. *Pediococcus pentosaceus* enhances host resistance against pathogen by increasing IL-1β production: Understanding probiotic effectiveness and administration duration. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 766401. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.766401.
80. Chiu, C.-H.; Cheng, C.-H.; Gua, W.-R.; Guu, Y.-K.; Cheng, W. Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol*. **2010**, *29*, 1053–1059. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.08.019.
81. Fu, W.; Duan, P.; Wang, Q.; Song, J.; Wang, Y.; Zhang, Z.; Wang, P.; Jiang, H.; Zhang, X.; Song, G.; et al. Effect of *Pseudomonas stutzeri* F2 on rearing water quality and growth, innate immunity, visceral morphology and gut microbiota structure of juvenile spotted seabass (*Lateolabrax maculatus*). *Aquac. Rep.* **2023**, *30*, 101536. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101536.
82. Say, P.; Nimitkul, S.; Bunnoy, A.; Na-Nakorn, U.; Srisapoome, P. Effects of the combination of chitosan and *Acinetobacter* KU011TH on the growth and health performances and disease resistance of juvenile hybrid catfish (*Clarias gariepinus* × *C. macrocephalus*). *Fish Shellfish Immunol*. **2023**, *142*, 109177. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.109177.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Table S1. Composition of commercial feed used in the feeding experiment on juvenile sturgeon hybrid (*Acipenser gueldenstaedtii x Acipenser baerii*).

Composition*: Fish meal, fields beans, fish oil, soybean meal, wheat gluten, soy protein concentrate, canola oil	
Ingredients*	**Content ***
crude protein (%)	49
crude fat (%)	19
crude fiber (%)	1.6
raw ash (%)	9.5
calcium (%)	2
phosphorus (%)	1.2
sodium (%)	0.6
Vitamin A (U/kg)	7500
Vitamin D3 (U/kg)	1125
Iron (iron sulfate monohydrate) (mg/kg)	60
Iodine (calcium iodate anhydrous) (mg/kg)	3
Copper (copper sulfate pentahydrate) (mg/kg)	8
Manganese (manganese sulfate monohydrate) (mg/kg)	23
Zinc (zinc sulfate monohydrate) (mg/kg)	130
Zinc (Zinc-amino acid helate) (mg/kg)	50
BHT (antioxidant) (mg/kg)	75

* Values taken from the feed manufacturer's label.

Załącznik III

Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Łuczyński, M., Kucharczyk, D. (2024). Effect of diet enriching with a sodium butyrate, β-glucan and vitamins on growth, HSP70 gene expression and gut microbiome of *Coregonus maraena* fry. *Research in Veterinary Science, w trakcie recenzji*.

Olsztyn, 03.12.2024

Martyna Arciuch-Rutkowska
(imię i nazwisko kandydata)

Zootechnika i Rybactwo
(dyscyplina naukowa)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w manuskrypcie: **Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Łuczyński, M., Kucharczyk, D. 2024, Effect of diet enriching with a sodium butyrate, β-glucan and vitamins on growth, HSP70 gene expression and gut microbiome of *Coregonus maraena* fry,** który jest w trakcie recenzji w czasopiśmie **Research in Veterinary Science**, mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na opracowywaniu koncepcji badań, opracowaniu i walidacji metod, wykonaniu analiz laboratoryjnych, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu draftu publikacji.

Martyna Arciuch-Rutkowska

(podpis kandydata)

Olsztyn, 02.12.2024

Dr inż. Joanna Nowosad
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE

współautora/~~współautorów~~

Oświadczam, że w manuskrypcie: **Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Łuczyński, M., Kucharczyk, D. 2024, Effect of diet enriching with a sodium butyrate, β-glucan and vitamins on growth, HSP70 gene expression and gut microbiome of *Coregonus maraena* fry,** który jest w trakcie recenzji w czasopiśmie **Research in Veterinary Science** mój wkład merytoryczny w jego przygotowanie polegał na współwykonaniu części eksperymentalnej, weryfikacji metod badawczych, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych oraz pomocy w przygotowaniu manuskryptu publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Martynę Arciuch-Rutkowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr Martyny Arciuch-Rutkowskiej polegający na opracowywaniu koncepcji badań, opracowaniu i walidacji metod, wykonaniu części eksperymentalnej, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu draftu publikacji.

.....Joanna Nowosad.....

(podpis/podpisy)

Olsztyn, 04.12.2024

Dr Michał Krzysztof Łuczyński
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE

współautora/~~współautorów~~

Oświadczam, że w manuskrypcie: **Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Łuczyński, M., Kucharczyk, D. 2024, Effect of diet enriching with a sodium butyrate, β-glucan and vitamins on growth, HSP70 gene expression and gut microbiome of *Coregonus maraena* fry,** który jest w trakcie recenzji w czasopiśmie **Research in Veterinary Science** mój wkład merytoryczny w jego przygotowanie polegał na pozyskaniu finansowania, nadzorze nad prowadzeniem doświadczenia oraz pomocy w przygotowaniu manuskryptu publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Martynę Arciuch-Rutkowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr Martyny Arciuch-Rutkowskiej polegający na opracowywaniu koncepcji badań, opracowaniu i walidacji metod, wykonaniu części eksperymentalnej, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu draftu publikacji.

.....

(podpis/podpisy)

Olsztyn, 04.12.2024

Prof. dr hab. inż. Dariusz Kucharczyk
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE

współautora/~~współautorów~~

Oświadczam, że w manuskrypcie: **Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Łuczyński, M., Kucharczyk, D. 2024, Effect of diet enriching with a sodium butyrate, β-glucan and vitamins on growth, HSP70 gene expression and gut microbiome of *Coregonus maraena* fry,** który jest w trakcie recenzji w czasopiśmie **Research in Veterinary Science** mój wkład merytoryczny w jego przygotowanie polegał na opracowaniu koncepcji badań, pozyskaniu finansowania, nadzorze nad prowadzeniem doświadczenia oraz przygotowaniem manuskryptu publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr Martynę Arciuch-Rutkowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr Martyny Arciuch-Rutkowskiej polegający na opracowywaniu koncepcji badań, opracowaniu i walidacji metod, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu draftu publikacji.

D. Kucharczyk

(podpis/podpisy)

Effect of diet enriching with a sodium butyrate, β-glucan and vitamins on growth, HSP70 gene expression and gut microbiome of *Coregonus maraena* fry.

Martyna Arciuch-Rutkowska[a,b], Joanna Nowosad[a,b], Michał Łuczyński[b], Dariusz Kucharczyk[a,b*]

[a] – Department of Research and Development, Chemprof, Gutkowo 54B, 11–041 Olsztyn, Poland (martyna.arciuch-rutkowska@chemprof.pl MA-R, joanna.nowosad@chemprof.pl JN, michal.luczynski@chemprof.pl MŁ)

[b] – Department of Ichthyology and Aquaculture, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Al. Warszawska 117A, 10-957 Olsztyn, Poland (martyna.arciuch-rutkowska@uwm.edu.pl MA-R)

[*]Correspondence: darekk56@gmail.com

Abstract

The effect of diet enriched with sodium butyrate, β-glucan and vitamins (A, D3, E, K, C) on growth performance, expression of HSP70 gene and profile of gut microbiome of juvenile maraena whitefish (*Coregonus maraena*) during 30-day feeding trial was assessed. Fish (n=1800) were divided into three groups with enriched feeding (mg/kg of feed): FQV1 (50 sodium butyrate; 20 β-glucan; const. vitamins), FQV2 (150 sodium butyrate; 20 β-glucan; const. vitamins), FQV3 (50 sodium butyrate; 60 β-glucan; const. vitamins) and control group (not enriched), each group in triplicate, 150 fish in each repetition. After the period of enriched feeding, a significant improvement in breeding parameters such as body weight gain (WG), length gain (LG), specific growth rate (SGR), condition factor (K) and survival rate (SR) was

observed ($P < 0.05$). Diet enrichment also significantly influenced the expression of the HSP70 gene, with the highest up-regulation in the FQV2 group ($P < 0.05$). The FQV1 group was characterized by the highest share of lactic acid bacteria, while in the control group the highest share of potentially pathogenic bacteria of the *Aeromonas* genus was observed ($P < 0.05$). The conducted research suggests that the 30-days supplementation with sodium butyrate, β-glucan and vitamins directly improves growth and indirectly improves immune parameters by modulating the expression of the HSP70 gene and the intestinal microbiome. The data obtained can be the basis for creating a feed additive that improves growth rate and resistance to stress and disease of fish.

Key words: *Aeromonas*, feed additives, fish, heat shock protein, lactic acid bacteria, prebiotics, short-chain fatty acid

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; ASVs, amplicon sequence variants; FAO, Food and Agriculture Organization; HSP, heat shock protein; IL, initial length; IU, international unit; IW, initial weight; K, condition factor; LAB, lactic acid bacteria; LG, length gain; MS-222, tricaine methanesulfonate; NGS, next-generation sequencing; PCoA, principal cooridinate analysis; PE, paired-end;qRT-PCR, quantitative Real-Time Polimerase Chain Reaction; RAS, recirculating aquaculture system; SCFA, short-chain fatty acid; SGR, specific growth rate; SR, survival rate; T3SS, type 3 secretion system; WG, weight gain

1. Introduction

In recent decades, aquaculture has become one of the most important sectors of food production. There is a significant increase in fish and seafood production, which has reached 223.2 million tonnes in 2022 year (FAO, 2024). The intensification of aquaculture production has certain

limitations. A high density of fish in a farm causes stress, which contributes to decreased immunity and the development of bacterial or viral infections. As a consequence, fish mortality in aquaculture increases (Dawood et al., 2020a). Therefore, with the development of aquaculture, there is an increasing demand for specialized feeds, that will partially offset the above-mentioned effects of intensive fish farming by improving the condition and resistance to fish diseases, and as a result, increasing production. Dietary supplementation can improve the overall health and resistance to diseases and minimize the use of antibiotics in aquaculture (Abdel-Latif et al., 2024). Animal diseases on fish farms can cause significant economic losses, as they may require expensive interventions and even lead to the destruction of entire herds (FAO, 2022). Unlike antibiotics, non-antibiotic feed additives, apart from their positive impact on animal health, do not reduce the microorganisms responsible for the neutralization of nitrogen compounds (responsible for the nitrification and denitrification processes) in the breeding circuit. In addition, feed enriched with active substances often have better digestibility and absorption, which reduces feed waste and reduces waste (Naylor et al., 2021).

Fish feed enrichment with active substances can improve breeding indicators and immune parameters of fish and reduce stress levels (Dawood et al., 2020a, 2020b; Nowosad et al., 2023; Arciuch-Rutkowska et al., 2024a, 2024b, 2024c). In response to stress caused by: too high or low temperature, anoxia, ischemia, the presence of toxins, malnutrition, as well as microbiological damage, highly conserved HSP70 (Heat Shock Protein) are produced in all cells (Roberts et al., 2010). This is the best-known group of chaperone proteins among all HSPs. The relationship between the synthesis of HSP70 proteins by cells during stress can be used as a specific indicator of environmental stress, which is less susceptible to fluctuations than commonly used indicators such as cortisol or hematocrit (Roberts et al., 2010; Balakrishnan et al., 2023). Long-term stress disrupts the negative stress feedback mechanism and causes the tertiary reactions to stress, resulting in deterioration of appetite, reduced growth rate,

reproductive capacity and impairment of the immune system, the so-called immunosuppression (Hjelmstedt et al., 2021). This condition weakens the organism and may promote the development of inflammation caused by pathogens, e.g. *Aeromonas salmonicida*, which is common among salmonid fish (Lee et al., 2020). *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida* is the most pathogenic subspecies for salmonid fish. This bacterium causes *furunculosis salmonum*, which is characterized by high morbidity and mortality among salmonids, while other fish species can only be its asymptomatic carriers (Altmann et al., 2016; Godoy et al., 2024). The pathogenicity of *A. salmonicida* is related to the production of virulence factors, i.e. A-layer, secretion of lipases and proteases, which disturb the immune system of the infected organism (Girard et al., 2022). The bacterial type 3 secretion system (T3SS) is of great interest. Its function is to produce proteins that disrupt immune signaling and thus suppress inflammation in the infected fish body (Vanden Bergh and Frey, 2014). In order to prevent infections, protective vaccinations are used, but the only effective form of treatment for infection caused by *A. salmonicida* is antibiotic therapy based on florfenicol and oxytetracycline (Desbois et al., 2020). The common problem of the development of antibiotic resistance prompts the search for alternative methods of treatment and improvement of immunity, such as the use of supplementation in the form of probiotics, prebiotics, and immunostimulants (Menanteau-Ledouble et al., 2016). This group of compounds includes, among others: glucans, including β-glucan and salts of short-chain fatty acids, i.e. sodium butyrate (Hoseinifar et al., 2017; Dawood et al., 2020a).

β-glucan is a polysaccharide belonging to the dietary fiber fraction. It is used in aquaculture as a preventive and regenerative measure after infections of aquatic organisms (Dawood et al., 2020b). Sodium butyrate is also used in aquaculture, among others as a compound that promotes growth rate (Wu et al., 2020). Sodium butyrate and β-glucan influence the profile of the intestinal microbiome, causing an increase in the number of LAB (Lactic Acid Bacteria), while

inhibiting the development of potentially pathogenic bacteria, such as *Vibrio* and *Aeromonas* (Rimoldi et al., 2018; Arciuch-Rutkowska et al., 2024a, 2024b). The composition of the above-mentioned compounds additionally enriched with vitamins (A, D3, E, K, C) brings a number of benefits in fish breeding, i.e. faster growth, higher survival and modulation of the intestinal microbiome (Arciuch-Rutkowska 2024a, 2024b).

Maraena whitefish (*Coregonus maraena*) - a species of salmonid fish, is a valued cold-water fish species due to its meat quality and favorable fatty acid profile (Linhartová et al., 2018). Under natural conditions, maraena whitefish inhabit fresh and brackish waters, e.g. coastal areas of the Baltic Sea and the North Sea. Due to climate change, water pollution and intensive fishing, the number of whitefish in the natural environment is drastically decreasing (Cejko et al., 2024). The developing maraena whitefish aquaculture (especially in the Nordic countries) aims to reduce catches from the wild (Siikavuopio et al., 2012). Controlled reproduction of maraena whitefish in aquaculture in RAS (Recirculating Aquaculture System) enables the production of stocking material and fish for consumption (Stejskal et al., 2021a; Kucharczyk et al., 2023). There are two key, most sensitive periods in maraena whitefish rearing when mortality is high. The first one concerns the larval period (larviculture), where whitefish larvae are usually fed with mixed food. The second key development period of whitefish is the initial juvenile stage (average weight of fry: 0.2 - 1 g), where the whitefish fry are fed with commercial feed (Sebesta et al., 2018; Stejskal et al., 2021b). One of the problems in the commercial breeding of juvenile maraena whitefish is susceptibility to stress caused by common practices used in aquaculture, such as sorting, and variable conditions of the aquatic environment, e.g. low oxygen content (Hjelmstedt et al., 2021). So far, no research has been carried out on improving the breeding and immune parameters of maraena whitefish by introducing supplementation of the basic diet with sodium butyrate, β-glucan and vitamins.

It was hypothesized that, 30-day enrichment of the diet of maraena whitefish (*Coregonus maraena*) in the early juvenile stage (average fry weight - 0.14 g) with FishQuatro containing β-glucan, sodium butyrate and vitamins improves the efficiency and quality of breeding whitefish fry. This is a stage of high sensitivity and high mortality due to the transition from feeding with live feed to commercial dried feed. Therefore, supporting the fish's organism, including the immune system, during this period is particularly important. The aim of this study was to investigate whether enriching the diet of maraena whitefish would affect breeding indices: WG (weight gain), LG (length gain), SGR (specific growth rate), K (condition factor) and SR (survival rate), HSP70 gene expression and the intestinal microbiome profile, including the genus of *Aeromonas*.

2. Materials and methods

2.1.Ethic statement

The experiment was conducted in accordance with Polish and international guidelines for experimental animals (EU Directive 2010/63 for the protection of animals used for scientific purposes). Procedures involving animals were carried out in accordance with the decision of the Local Ethical Committee for Animal Experiments in Olsztyn (LKE/11/2023).

2.2.Fish acclimatization

The whitefish fry were obtained from the Fishing Farm (Szwaderki, Warmian-Masurian Voivodeship, Poland) and transported to the Center of Aquaculture and Ecological Engineering (Department of Ichthyology and Aquaculture, UWM in Olsztyn) in bags with oxygen. During the week-long acclimatization, the pH (Hanna HI 98128, Eden Way, UK) and water oxygenation (OxyGuard Pacific, Farum, Denmark) were controlled. During the initial rearing, the water temperature was kept at 18.5 ± 0.1 °C. The fish were fed to satiation with commercial

146 feed (Perla Larva 5.0, Skretting, Stravanger, Norway; crude protein - 62%, crude fat - 11%)
147 until the fry reached the expected weight and body length.
148

149 *2.3.Feed enrichment*

150 Commercial complete feed (Skretting, Perla Larva 5.0, Stavanger, Norway) was used as the
151 base feed for enrichment. The feed for groups - FQV1, FQV2, FQV3 was enriched according
152 to Nowosad et al. (2023). The enrichment mixtures of sodium butyrate, β-glucan and vitamins
153 (V1, V2, V3) in the amount of 1 mL was homogenized with 50 mL of a mixture of rapeseed oil
154 and water (1:1, v:v). The resulting mixture was injected onto 1 kg of commercial feed. The feed
155 for control group was enriched only with 50 mL mixture of oil and water (1:1, v:v). The
156 prepared feeds were dried at room temperature for 24 hours. The enriched feed contained
157 60.49% crude protein, 22.76% crude fat, 17.75% carbohydrates, 2.63% crude fiber, 6.04% raw
158 ash and 0.74% phosphorus and active compounds (Tab. 1).

159 *2.4.Feeding experiment*

160 The experiment was carried out on 1800 maraena whitefish fry. The fish were placed in twelve
161 20L tanks, 150 fish each. The fish were divided into 4 experimental groups: three supplemented
162 groups (FQV1, FQV2, FQV3) and a control group (C). The experiment was performed in
163 triplicate. The initial average body weight of experimental fish was 0.14 ± 0.05 g, and the
164 average body length - 2.62 ± 0.37 cm. The water temperature was kept at 18.5 ± 0.1 °C. The
165 following were checked and recorded daily: pH (Hanna HI 98128, Eden Way, UK),
166 oxygenation and saturation of water (OxyGuard Pacific, Farum, Denmark). Fish were fed four
167 times a day (8:00 a.m., 11:00 a.m., 2:00 p.m., 4:00 p.m.) for satiation. Each time before feeding,
168 the tank was cleaned of feces and uneaten feed. The enriched fish nutrition lasted 30 days. The
169 assumption of the experiment was to start the experiment on fish with a developed digestive

system and end it when fry with a final weight exceeding 1 g and a length exceeding 5 cm in the supplemented groups. Obtaining the above assumptions suggests the end of the second key period when mortality is very high (Flüchter, 1980; Stejskal et al., 2021).

The duration of the experiment was determined based on previous experiments on other fish species (Nowosad et al., 2023; Arciuch-Rutkowska et al., 2024a, 2024b, 2024c). Moreover, in the case of whitefish at this stage, 30 days of supplementation can significantly reduce mortality at the critical point in their development (Flüchter, 1980). The number of dead fish was recorded daily. Survival rate (SR) was calculated for each group according to the formula (Suratip et al., 2023):

$$SR\ (\%) = (F_n / I_n) \times 100; \quad (1)$$

I_n – initial number of fish; F_n – final number of fish.

2.5.Sampling

After completing enriched nutrition, 18 fish from each group were randomly caught and euthanized using solution of MS-222 (0.09 g/L) (Sigma - Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Body weight measured on a scale with an accuracy of ± 0.01 g (KERN ABJ; 440 - 49A, Frankfurt, Germany), body length was measured using a caliper with an accuracy of ± 0.1 mm (Geko G01493, Kietlin, Poland). The obtained measurement results were used to calculate breeding indicators such as weight gain (WG; g), length gain (LG; cm), specific growth rate (SGR; % d^{-1}) and condition factor (K; g/ cm^3) (El-Asely et al., 2014):

$$WG\ (g) = (W_f - W_i); \quad (2)$$

W_f – final weight (g), W_i – initial weight (g).

$$LG\ (cm) = (L_f - L_i); \quad (3)$$

L_f – final length (cm), L_i – initial length (cm).

$$SGR\ (\%\ d^{-1}) = (\ln W_f - \ln W_i) / T \times 100\%; \quad (4)$$

W_f – final weight (g), W_i – initial weight (g), T – number of days of the experiment.

$K\ (g/cm^3) = (W_b \cdot 100) \cdot L_b^{-3}$; (5)

W_b – weight of body (g), L_b – length of body (cm).

The body surface of five measured fish from each group was disinfected with a 70% isopropanol. The midgut was dissected under sterile conditions and placed in Eppendorf tubes (Dulski et al., 2020). Liver tissue was collected and placed in solution of RNAprotect Tissue Reagent (Qiagen, Hilden, Germany) to protect RNA from degradation. Samples were stored at -80 °C (Labfreez LFZ-86L340, Beijing, China) until nucleic acid isolation began.

2.6.RNA isolation and expression of HSP70 gene

RNA was isolated using the miRNeasy Tissue/Cells Advanced Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Gel electrophoresis (1.2%) was used to verify the integrity of RNA samples. The quality and quantity of the obtained RNA were checked using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific Nanodrop One, Waltham, MA, USA). HSP70 gene expression analysis was performed using the one-step QuantiNova SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) in a Real-Time PCR thermal cycler (AriaMx Real Time PCR, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). To conduct the RT-PCR and qRT-PCR the following conditions were used according to the manufacturer's recommendations: reverse transcription – 10 min/ 50 °C, PCR initial activation step – 2 min/ 95 °C and 40 cycles of denaturation – 5 s/ 95 °C and extension – 10 s/ 60 °C. The qRT-PCR was performed using specific primers for the HSP70 gene (F: 5'ATAAGGTCGCCTGAGCAAGG3', R: 5'AGTGGTCTAAGACAGTTCAAGTCC3') designed in the PrimerBlast (Ye et al., 2012). In order to verify the specificity of the primers, a melting curve was performed at the end of the reaction under the following conditions: 30 s/ 95 °C, 30 s/ 65 °C, 30 sec/ 95 °C (Buwono et al., 2024). The total volume of the reaction mixture was 20 ul (10 ul RT PCR Master Mix, 0.2 ul RT-Mix, 1 μM mix of primers, temple of RNA approx. 200 ng, nuclease free water to total

volume). The relative expression of HSP70 was determined using the ΔΔCt method (Schmittgen and Livak, 2008; Bustin et al., 2009; Pfaffl, 2016). As an endogenous standard (reference gene) was used β-actin (F: 5'GTGGCGCTGGACTTTGAGCA3', R: 5'ACCGAGGAAGGAGGGCTGGA3'), which showed no significant differences under different experimental conditions ($P < 0.05$) (Brzuzan et al., 2011). The reaction efficiency for the tested gene and the reference was similar (HSP70 – 96%, β-actin – 100%). The linearity of the dilution series (5x) was 0.99. To analyze the received data, aria software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used.

2.7.DNA isolation and metagenomic sequencing by NGS method

The QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used to isolate DNA from the intestinal content of whitefish. Gel electrophoresis (1%) was used for qualitative assessment of the isolated DNA. The quantity and purity of DNA samples were determined using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific Nanodrop One, Waltham, MA, USA). The Illumina methodology (16S Metagenomic Sequencing Library Preparation) and the MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) were used for metagenomic sequencing of DNA samples. The microbial population was determined using the V3/V4 hypervariable region 16S rRNA using primers 341F (5'CCTACGGGNGGCWGCAG3') and 785R (5'GACTACHVGGGTATCTAATCC3'). The Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) was used to perform the PCR. The main sequencing was performed using the v3 kit (Illumina, San Diego, CA, USA) and the PE (paired-end) methodology, 2x300nt (Arciuch-Rutkowska et al., 2024a, 2024b).

The QIIME 2 program was used to perform bioinformatics processing of the obtained results. The obtained raw readings were adjusted to the level of microorganisms present in the intestinal content (Bolyen et al., 2019). The DADA2 package was used to distinguish unique sequences of biological origin - ASVs (Amplicon Sequence Variants) from incorrect sequences generated

during sequencing (Callahan et al., 2016). The quality of the obtained reads was determined using the FIGARO tool, removing adapter sequences and too short sequences. The Silva database was used to match the appropriate taxon based on specific ASVs (Bolyen et al., 2019).

2.8.Statistical analysis

Statistical analyzes were performed using Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc.; Palo Alto, CA, USA). Shapiro-Wilk and Leven tests were used to determine normality and homogeneity of variances. Breeding indices (WG, LG, SGR, K, SR) were presented as mean results with standard deviation (mean ± SD). Statistical analysis of breeding indicators was performed using one-way ANOVA and Tuckey's post-hoc test ($P < 0.05$). The results of the bioinformatic analyzes were presented as mean results with standard error (mean ± SE). α-diversity indices (Shannon index, Simpson index, Eveness index, Chao-1) were calculated using the PAST 4.03 program (University of Oslo, Oslo, Norway) and presented on plots. Statistical analysis of α-diversity indices, HSP70 gene expression and relative abundance of bacteria was performed using the non-parametric Kruscal-Wallis test ($P < 0.05$). Principal coordinate analysis (PCoA) with the Bray-Curtis distance was used to determine the β-diversity of the gut microbiome of the fish.

3. Results

3.1.Breeding indicators

The highest values of growth parameters (WG, LG, SGR, K) and SR were determined in the FQV3 group. All supplemented groups showed significantly higher values of growth parameters compared to the unsupplemented control group ($P < 0.05$). Survival rate in the control group was on average 26.89% lower than in the supplemented groups ($P < 0.05$). The highest SR value was found in the FQV3 group - 79.78% (Tab. 2).

3.2.Expression level of HSP70 gene

The relative expression of the HSP70 gene is plotted (Fig. 1). Up-regulation of the expression of HSP70 gene was observed in the FQV2 group compared to the control group ($P < 0.05$). However, down-regulation of the expression of tested gene compared to the control was determined in the FQV3 group.

3.3.Microbiome

3.3.1. Data from DNA sequencing

Data from bioinformatic analyzes are summarized in Tab. 3. The highest number of counts and observations was determined in the FQV3 group ($P < 0.05$). The total number of ASVs was 3582. Control group, FQV1 and FQV3 showed the highest number of unique ASVs, C - 649, FQV1 - 568, FQV3 - 588, respectively. The number of common ASVs characteristic of all groups was 583 (Fig. 2).

The values of metrics characterizing α-diversity of microbiome of maraena whitefish for all groups are presented in Fig. 3. The highest values of Simson and Shannon indexes were determined in the FQV3 group, while the lowest in the control group ($P > 0.05$). The FQV2 group had the highest Evenness index, while the control group had the lowest ($P > 0.05$). The value of the Chao-1 index was significantly highest in the FQV3 group, while the lowest in the FQV2 group ($P < 0.05$).

PCoA analysis with the Bray-Curtis distance was used to determine the β-diversity of intestinal microbiomes of whitefish fry in groups. The analysis showed the most clustered results for samples from the FQV3 group. Groups C, FQV1, FQV2 showed scattered results for individual samples (Fig. 4).

293 *3.3.2. Profile of gut microbiome*

294 The microbiome profile for each group was determined at the Phylum (Fig. 5) and Genus (Fig.
295 6) level. In all groups at the Phylum level, *Proteobacteria* dominated, ranging from 51.80 to
296 61.23%. A large share of *Firmicutes* was also determined, the highest in the FQV1 group -
297 20.50%. *Bacteroidota* had the highest share in the FQV3 group - 14.80% and the lowest in
298 FQV1 - 8.47%. The FQV3 group had the highest percentage of *Nitrospirota* (2.42%), and the
299 lowest - control (0.28%) ($P < 0.05$) (Tab. 4). At the Genus level, lactic acid bacteria (including
300 Lactobacillus) were determined, with the highest share in the FQV1 group - 7.15%, and the
301 lowest in the control group - 4.79%. In addition, *Lactococcus* and *Streptococcus* were also
302 determined, with the significantly highest proportion occurring in the FQV1 group, 1.01% for
303 *Lactococcus* and 2.39% for *Streptococcus*, respectively ($P < 0.05$) (Tab. 4). *Bifidobacterium*
304 was most abundant in the FQV1 group - 0.63%. *Nitrospira* occurred significantly least
305 frequently in the control group, and most frequently in FQV3 - 2.42% ($P < 0.05$) (Tab. 4). The
306 control group was characterized by the significantly highest share of *Aeromonas* - 18.43%,
307 while in the supplemented groups their low share in the microbiome community was
308 determined (approx. 2%). *Shewanella* and *Pseudomonas* were significantly most common in
309 the control group ($P < 0.05$) (Tab. 4).

310 **4. Discussion**

311 The effect of dietary supplementation of maraena whitefish with feed additive - FishQuatro on
312 basic breeding indicators (WG, LG, SGR, K, SR) was examined. The effect of the above
313 supplementation on the expression of the HSP70 gene as an indicator of stress and immunity
314 was determined. The intestinal microbiome profile of the fish after a period of enriched feeding
315 was also examined. Growth parameters, i.e. WG, LG and SGR in all supplemented groups
316 (FQV1, FQV2, FQV3) were significantly higher compared to the control group ($P < 0.05$). A
317 statistically significant improvement in survival rate was observed in the supplemented groups,

318 approximately 27% higher than in the control group. In the intestinal microbiomes of the
319 supplemented groups, the presence of the lactic acid bacteria - *Lactococcus, Lactobacillus* and
320 *Streptococus* - was detected. The control group showed a higher percentage of potentially
321 pathogenic bacteria such as *Shewanella, Pseudomonas* and *Aeromonas*. Additionally,
322 modulation of HSP70 gene expression was observed under the influence of supplementation in
323 the FQV2 and FQV3 groups.

324 Active compounds included in FishQuatro - sodium butyrate and β-glucan are successfully used
325 as agents promoting growth and stimulating the immunity of farmed fish (Meena et al., 2013;
326 El-Sharkawy et al., 2023; Arciuch-Rutkowska et al., 2024a, 2024b). Many authors use them
327 individually, not combining them in one supplementation (Lin et al., 2023; Ciji et al., 2023).
328 The beneficial effects of sodium butyrate in promoting growth and improving intestinal
329 function have been proven in studies on many fish species, including largemouth bass
330 (*Micropterus salmoides*), Pengze Prussian carp (*Carassius auratus var pengze*), golden
331 pompano (*Trachinotus ovatus*), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and arapaima fish
332 (*Arapaima gigas*). Suggested doses range from 1.2 – 5.0 g/kg of feed (Zhou et al., 2019; El-
333 Naby et al., 2019; Luz et al., 2019; Fang et al., 2021; Chen et al., 2023). β-glucan also has a
334 growth-promoting effect in fish such as Persian stugeon (*Acipenser persicus*), pompano fish
335 (*Trachinotus ovatus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). It has been shown that the most
336 beneficial doses of β-glucan in the fish diet to improve growth and survival rate from 1.0 to 2.0
337 g/kg of feed (Aramli et al., 2015; Do Huu et al., 2016; Khanjani et al., 2021). Taking the above
338 into account, the effect of dietary supplementation of fish with sodium butyrate and β-glucan
339 depends not only on doses and species, but also on the additional substances used. These
340 substances, acting synergistically, can strengthen the organism of fish. This was confirmed in
341 the presented paper.

When feeding animals, including fish, it is important to determine the optimal time of administering enriched feed. Many studies confirm that a 30-day supplementation period is sufficient to notice significant changes in terms of acceleration of growth rate, intestinal microbiome profile and improvement of immunity (Chiu et al., 2010; Fu et al., 2023; Say et al., 2023). This was confirmed in studies on African catfish, where a 4-week period of rearing with enriched nutrition resulted in both accelerated growth and significant changes in the intestinal microbiome, causing the development of probiotic bacteria (Nowosad et al., 2023; Arciuch-Rutkowska et al., 2024a). Other studies show that even 14 days of enriched feeding of fish with β-glucan, using the example of *Piaractus mesopotamicus*, reduces cortisol levels and proves the immunomodulatory effect of β-glucan (Lopes et al, 2022). This knowledge is very important from the point of view of commercialization of the tested products. Monthly rearing of fish with enriched nutrition is sufficient to produce good quality material for further commercial rearing.

All supplemented groups (FQV1 - FQV3) showed significantly higher values of breeding indicators compared to the control group, of which the most favorable values were achieved in the FQV3 group (sodium butyrate - 50 mg/kg feed, β-glucan - 60 mg/kg feed). During the metabolism of feed enriched with sodium butyrate and β-glucan, larger amounts of SCFA are produced than in the case of unenriched feed. Sodium butyrate, as a result of dissociation in the gastrointestinal tract, turns into butyric acid, while β-glucan, metabolized by intestinal microorganisms, is transformed into acetate, propionic and butyric acid (Hee and Wells, 2021). The emerging SCFAs, as specific mediators between the host and the intestinal microbiome, are involved in a number of metabolic and immune processes (Martin-Gallausiaux et al., 2021). The basic function of SCFA, and in particular butyric acid, is to provide energy to colonocytes, thereby influencing their regeneration and proliferation. As a result, the height of the intestinal villi increases. The absorption of nutrients contained in the feed and their use in further metabolic pathways of the organism improves (Liu et al., 2014; Hoseinifar et al., 2017; Abdel-

Latif et al., 2020). By stimulating the exocrine function of the pancreas, SCFAs contribute to increasing the secretion of pancreatic enzymes necessary for feed digestion (Ahsan et al., 2016). There is little information in the literature on the impact and role of SCFAs produced during metabolism on the functioning of fish, including maraena whitefish. However, research conducted on other species, such as zebrafish (*Danio rerio*), crucian carp (*Carassius carassius*) or common carp (*Cyprinus carpio*), prove that SCFAs, including butyric acid and propionic acid, play an important role in building immunity, among others by influencing the gene expression of pro-inflammatory cytokines (e.g., TNFα, IL-1β) and increasing the number of intestinal neutrophils (Liu et al., 2014; Shan et al., 2021; Li et al., 2022). Research conducted on African catfish at the juvenile stage also confirms the above theses (Arciuch-Rutkowska et al., 2024b). Dietary supplementation of juvenile African catfish with an additive containing sodium butyrate, β-glucan and vitamins resulted in both an improvement in the growth rate of the supplemented fish and modulation of the gene expression of pro-inflammatory cytokines, i.e. IL-1β, TNFα and HSP70 (Arciuch-Rutkowska et al., 2024b). In the presented paper, an interaction between the supplements used and the level of HSP70 gene expression was also observed. Dietary supplementation in the FQV2 group induced up-regulation of the HSP70 gene, while down-regulation was observed in the FQV3 group compared to the control group ($P < 0.05$). It turns out that the role of HSP70 proteins is not only to participate in the folding, translocation and aggregation of proteins, but also to participate in the regulation of the immune response, apoptosis and inflammation of the organism (Pockey, 2003). They become mediators between cells, inducing the production of pro-inflammatory cytokines and adhesins (Roberts et al., 2010). HSP70 strongly affects both innate and adaptive immunity (Sun and MacRae, 2005). Research conducted by Baharloei et al. (2021) on Persian sturgeon confirm that, artificial induction of heat shock proteins (HSP70) influences the modulation of the immune response and thus protects the organism against bacterial infections. In the presented study, the use of a

stimulator in the form of a combination of sodium butyrate and β-glucan resulted in the highest level of HSP70 gene expression in the FQV2 group ($P < 0.05$). Stimulation of the induction of the HSP70 proteins by cells in response to enriching the diet with SCFAs may be an alternative to the use of drugs and antibiotics in aquaculture.

An important aspect of the proper functioning of the immune system is the intestinal microbiome, which is still insufficiently understood in fish (Luan et al., 2023). The fish intestinal microbiome is responsible for digesting feed, maintaining body homeostasis, and modulating immune response (Huang et al., 2020). It turns out that during bacterial infection in zebrafish, through the intestinal microbiome, there is increased expression of alkaline phosphatase, which contributes to the dephosphorylation of lipopolysaccharides of bacterial origin (Bates et al., 2007). In the case of salmonids, little is known about their intestinal microbiome and the impact of its metabolites on the functioning of the organism. It is known that sodium butyrate administered with the diet of Atlantic salmon and rainbow trout significantly improves the expression of genes related to immunity, i.e. IL-1β, IL-10, TGF-β. This proves that both the microbiome and its metabolites have a significant impact on the immunity of salmonids (Vargas et al., 2023).

Research conducted on Atlantic salmon (*Salmo Salar L.*) proves that high biodiversity promotes the fight against pathogens during inflammation (Bozzi et al., 2021). The presented paper shows that the supplementation improves the biodiversity of the tested microbiomes, including the Shannon, Simpson, Eveness and Chao-1 indexes. All supplemented groups (FQV1 – FQV3) showed higher values of Shannon, Simpson, Eveness and Chao-1 indexes compared to the control group. Moreover, the Chao-1 index in the FQV3 group reached the statistically highest value ($P < 0.05$). The above was also confirmed in studies on African catfish fry, where the basic diet was also enriched with sodium butyrate and β-glucan (Arciuch-Rutkowska et al., 2024a). The presented results also suggest the impact of enriching the feed with FishQuatro on

the microbiome profile and the relative abundance of individual groups of microorganisms. The supplementation used (FQV1 - FQV3) resulted in an increase in the number of probiotic bacteria (*Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Bifidobacterium*) compared to the control group. The presence of the above types of bacteria protects the fish against infections by competing for binding sites and nutrients with potentially pathogenic bacteria. Additionally, probiotic bacteria produce substances that inhibit the development of pathogens in intestine (Torres-Maravilla et al., 2024). In the control group, a greater number of potentially pathogenic bacteria were characterized, such as: *Pseudomonas, Aeromonas, Shewanella*. *Pseudomonas* is particularly dangerous because in stressful conditions for fish, i.e., lack of food or too high density, it can cause sepsis, gill necrosis and thus lead to significant losses in breeding (Algammal et al., 2020). *Shewanella*, mainly *Shewanella putrefaciens*, is responsible for the spoilage of fish and other seafood and is also considered an opportunistic fish pathogen. Responsible for for hemorrhages, fin rot and skin ulcers in fish (Jiang et al., 2022).

The supplementation used resulted in a reduction in the number of *Aeromonas* genus, which was particularly desirable due to the high affinity of this bacterium to salmonid fish. The presence of the *Aeromonas* was reduced by approx. 9 times compared to the control group. Fan et al. (2021) after supplementation of rainbow trout (*O. mykiss*) with preparations containing, among others, *Clostridium butyricum* - producing SCFAs including butyrate, observed improved survival rate after artificial induction of *A. salmonicida* infection. In the presented paper, a significant improvement in the survival rate was also observed in the supplemented groups (on average approx. 77%) compared to the control group (50%), in which the percentage of the *Aeromonas* was approx. 18%, while in the research groups only approx. 2%. These results are particularly interesting due to the fact that the development of *Aeromonas salmonicida* in aquaculture contributes to an increase in mortality, especially of salmonids, which translates into large economic losses.

5. Conclusion

In this study, it was shown that enriching the diet with an appropriate dose of sodium butyrate, β-glucan and vitamins (A, D3, E, K, C) produces a number of benefits in the breeding of *Coregonus maraena*. The obtained results prove that appropriate supplementation in the form of enriching the base feed can significantly improve breeding indicators, including survival rate, which plays a key role in breeding this species. The proposed supplementation in the FQV2 group induced the production of HSP70 proteins, which are responsible, among others, for regulating the immune response. Additionally, the supplemented groups were characterized by a significantly better intestinal microbiome profile compared to the control group. The supplementation used promoted the development of probiotic bacteria while inhibiting potentially pathogenic microorganisms. It is concluded that enriching the diet of maraena whitefish significantly reduced the number of the *Aeromonas* genus, one of the most dangerous pathogens of salmonid fish. Taking the above into account, FishQuatro, due to its properties, can be successfully used as a dietary supplement in the breeding of salmonid fish, using the example of maraena whitefish. The obtained data allow to conclude that it can be used as a safe alternative complementary feed mixture for the use of drugs and antibiotics in aquaculture.

Funding

Work carried out as part of the Industrial PhD program (4th edition) financed by the Polish Ministry of Education and Science (application number: 486036, contract number: DWD/4/80/2020).

CRediT authorship contribution statement

Martyna Arciuch-Rutkowska: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Visualization, Writing – original draft. **Joanna Nowosad**: Data curation, Formal analysis, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Michał Krzysztof Łuczyński**: Resources, Supervision, Writing – review & editing. **Dariusz Kucharczyk**: Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Resources, Supervision, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The Authors declare no competing financial interest. All Authors have read and agreed to the submitted version of the manuscript. The content of the manuscript has not been published or submitted for publication elsewhere.

Data availability

The raw sequence from NGS used to support the findings of this study have been deposited in the RepOD repository (https://doi.org/10.18150/VP33KB). Other data used to support the results of this study are available from the corresponding author upon request.

References

Abdel-Latif, H.M.R., Abdel-Tawwab, M., Dawood, M.A.O., Menanteau-Ledouble, S., El-Matbouli, M., 2020. Benefits of Dietary Butyric Acid, Sodium Butyrate, and Their Protected

Forms in Aquafeeds: A Review. Rev. Fish Sci. Aquac. 28(4), 421-448. https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1758899.

Abdel-Latif, H.M.R., Citarasu, T., Turgay, E., Yilmaz, E., Yousefi, M., Shekarabi, P.H., Ahmadifar, E., Nowosad, J., Kucharczyk, D., Yilmaz, S., 2024. Control of yersiniosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: innovative non-antibiotic feed-based strategies. Ann. Anim. Sci. https://doi.org/10.2478/aoas-2024-0087

Ahsan, U., Cengiz, Ö., Raza, I., Kuter, E., Chacher, M.F.A., Iqbal, Z., Umar, S., Çakir, S., 2016. Sodium butyrate in chicken nutrition: the dynamics of performance, gut microbiota, gut morphology, and immunity. Worlds Poult. Sci. J. 72(2), 265-275. https://doi.org/10.1017/S0043933916000210.

Algammal, A., Mabrok, M., Sivaramasamy, E., Youssef, F., Atwa, M., Wahdan, A., Hetta, H., Hozzein, W., 2020. Emerging MDR-*Pseudomonas aeruginosa* in fish commonly harbor *opr*L and *tox*A virulence genes and bla_{TEM}, $bla_{CTX\text{-}M}$, and *tet*A antibiotic-resistance genes. Sci. Rep. 10, 15961. https://doi.org/10.1038/s41598-020-72264-4.

Altmann, S., Korytář, T., Kaczmarzyk, D., Nipkow, M., Kühn, C., Goldammer, T., Rebl, A., 2016. Toll-like receptors in maraena whitefish: Evolutionary relationship among salmonid fishes and patterns of response to *Aeromonas salmonicida*. Fish Shellfish Immunol. 54, 391-401. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.125.

Aramli, M.S., Kamangar, B., Nazari, R.M., 2015. Effects of dietaryβ-glucan on the growth and innate immune response of juvenile Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. Fish Shellfish Immunol. 47, 606–610. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.10.004.

Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Jasiński, S., Łuczyński, M., Kucharczyk, D., 2024a. Effects of the diet enrichment with β-glucan, sodium salt of butyric acid and vitamins on growth parameters and the profile of the gut microbiome of juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*). Anim. Feed Sci. Technol. 310, 115941. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2024.115941.

Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Gil, Ł., Czarnik, U., Kucharczyk, D., 2024b. Synergistic Effect of Dietary Supplementation with Sodium Butyrate, β-Glucan and Vitamins on Growth Performance, Cortisol Level, Intestinal Microbiome and Expression of Immune-Related Genes in Juvenile African Catfish (*Clarias gariepinus*). Int. J. Mol. Sci. 25, 4619. https://doi.org/10.3390/ijms25094619.

Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Łuczyński, M.K., Hussain, S.M., Kucharczyk, D., 2024c. Next-Generation Sequencing to Determine Changes in the Intestinal Microbiome of Juvenile Sturgeon Hybrid (*Acipenser gueldenstaedtii*♀ × *Acipenser baerii*♂) Resulting from Sodium Butyrate, B-Glucan and Vitamin Supplementation. Genes 15, 1276. https://doi.org/10.3390/genes15101276.

Baharloei, M., Heidari, B., Zamani, H., Ghafouri, H., Hadavi, M., 2021. Effects of heat shock protein inducer on Hsp70 gene expression and immune parameters during *Streptococcus iniae*

infection in a Persian sturgeon fry. Vet. Res. Forum. 12(4), 473-479. https://doi.org/10.30466/vrf.2019.115181.2740.

Balakrishnan, K.N., Ramiah, S.K., Zulkifli, I., 2023. Heat Shock Protein Response to Stress in Poultry: A Review. Animals. 13, 317. https://doi.org/10.3390/ani13020317.

Bates, J.M., Akerlund, J., Mittge, E., Guillemin, K., 2007. Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. Cell Host Microbe. 2(6), 371–382. https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.10.010.

Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., et al., 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nat. Biotechnol. 37, 852–857. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9.

Bozzi, D., Rasmussen, J.A., Carøe, C., Sveier, H., Nordøy, K., Gilbert, M.T.P., Limborg, M.T., 2021. Salmon gut microbiota correlates with disease infection status: Potential for monitoring health in farmed animals. Anim. Micro. 3, 30. https://doi.org/10.1186/s42523-021-00096-2.

Brzuzan, P., Woźny, M., Góra, M., Łuczyński, M.K., Jabłońska, A., 2011. Benzo[a]pyrene and cyclopenta[c]phenanthrene suppress expression of p53 in head kidney of rainbow trout. Environ. Biotech. 7, 41-45.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Wittwer, C.T., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., et al., 2009. The MIQE Guidelines:

Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clin. Chem. 55(4), 611–622. https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.11279.

Buwono, I.D., Grandiosa, R., Mulyani, Y., Pratiwy, F., 2024. GnRHr, LHr, and Vg gene expression levels and ovarian development of G5 transgenic mutiara female catfish (*Clarias gariepinus*) after exposure photoperiod induction. Discov. Appl. Sci. 6, 63. https://doi.org/10.1007/s42452-024-05699-3.

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nat. Methods. 13, 581–583. https://doi.org/10.1038/nmeth.3869.

Cejko, B.I., Fopp-Bayat, D., Kujawa, R., 2024. Effect of anti-adhesive supplement doses on sperm motility characteristics in the European whitefish (*Coregonus lavaretus*). Anim. Rep. Sci. 262, 107423. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2024.107423.

Chen, W., Gao, S., Chang, K., Zhao, X., Niu, B., 2023. Dietary sodium butyrate supplementation improves fish growth, intestinal microbiota composition, and liver health in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) fed high-fat diets. Aquaculture. 564, 739040. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739040.

Chiu, C.-H., Cheng, C.-H., Gua, W.-R., Guu, Y.-K., Cheng, W., 2010. Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides.* Fish Shellfish Immunol. 29, 1053–1059. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.08.019.

583 Ciji, A., Tripathi, P.H., Pandey, A., Akhtar, M.S., 2023. Expression of genes encoding non-
584 specific immunity, anti-oxidative status and aquaporins in β-glucan-fed golden mahseer (*Tor*
585 *putitora*) juveniles under ammonia stress. Fish Shellfish Immunol. Rep. 4, 100100.
586 https://doi.org/10.1016/j.fsirep.2023.100100.
587
588 Dawood, M.A.O., Metwally, A.E.-S., El-Sharawy, M.E., Atta, A.M., Elbialy, Z.I., Abdel-Latif,
589 H.M.R., Paray, B.A., 2020a. The role of β-glucan in the growth, intestinal morphometry, and
590 immune-related gene and heat shock protein expressions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)
591 under different stocking densities. Aquaculture. 523, 735205.
592 https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735205.
593
594 Dawood, M.A.O., Eweedah, N.M., Moustafa, E.M., Shahin, M.G., 2020b. Synbiotic Effects of
595 *Aspergillus oryzae* and β-Glucan on Growth and Oxidative and Immune Responses of Nile
596 Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Probiotics Antimicrob. Proteins. 12(1), 172-183.
597 https://doi.org/10.1007/s12602-018-9513-9.
598
599 Desbois, A.P., Cook, K.J., Buba, E., 2020. Antibiotics modulate biofilm formation in fish
600 pathogenic isolates of atypical *Aeromonas salmonicida*. J. Fish Dis. 43, 1373–
601 1379. https://doi.org/10.1111/jfd.13232.
602
603 Do Huu, H., Sang, M.H., Thanh Thuy, N.T., 2016. Dietary β-glucan improved growth
604 performance, *Vibrio* counts, haematological parameters and stress resistance of pompano fish,
605 *Trachinotus ovatus Linnaeus*, 1758. Fish Shellfish Immunol. 54, 402e410.
606 https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.161.
607

608 Dulski, T., Kozłowski, K., Ciesielski, S., 2020. Habitat and seasonality shape the structure of
609 tench (*Tinca tinca* L.) gut microbiome. Sci. Rep. 10(1), 4460. https://doi.org/10.1038/s41598-
610 020-61351-1.
611
612 El-Asely, A.M., Abbass, A.A., Austin, B., 2014. Honey bee pollen improves growth, immunity
613 and protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against infection with *Aeromonas*
614 *hydrophila*. Fish Shellfish Immunol. 40, 500–506. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.07.017.
615
616 El-Naby, A.S.A., Khattaby, A.E.A., Samir, F., Awad, S.M.M., Abdel-Tawwab, M., 2019.
617 Stimulatory effect of dietary butyrate on growth, immune response, and resistance of Nile
618 tilapia, *Oreochromis niloticus* against *Aeromonas hydrophila* infection. Anim. Feed Sci.
619 Technol. 254, 114212. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114212.
620
621 El-Sharkawy, E.A., El-Razek, I.M.A., Amer, A.A., Soliman, A.A., Shukry, M., Gewaily, M.S.,
622 Téllez-Isaías, G., Kari, Z.A., Dawood, M.A.O., 2023. Effects of sodium butyrate on the growth
623 performance, digestive enzyme activity, intestinal health, and immune responses of Thinlip
624 Grey Mullet (*Liza ramada*) juveniles. Aquac. Rep. 30,101530.
625 https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101530.
626
627 Fan, Y., Wang, X., Wang, Y., Liu, H., Yu, X., Li, L., Ye, H., Wang, S., Gai, C., Xu, L., 2021.
628 Potential effects of dietary probiotics with Chinese herb polysaccharides on the growth
629 performance, immunity, disease resistance, and intestinal microbiota of rainbow trout
630 (*Oncorhynchus mykiss*). JWAS. 52(6), 1194–1208. https://doi.org/10.1111/jwas.12757.
631

Fang, L., Wang, Q., Guo, X., Pan, X., Li, X., 2021. Effects of dietary sodium butyrate on growth performance, antioxidant capacity, intestinal histomorphology and immune response in juvenile Pengze crucian carp (*Carassius auratus Pengze*). Aquac. Rep. 21, 100828. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100828.

FAO, 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome. https://doi.org/10.4060/cc0461en.

FAO, 2024. The State of World Fisheries and Aquaculture 2024. Blue Transformation in action. Rome. https://doi.org/10.4060/cd0683en.

Flüchter, J., 1980. Review of the present knowledge of rearing whitefish (Coregonidae) larvae. Aquaculture 19(2), 191-208. https://doi.org/10.1016/0044-8486(80)90019-8.

Fu, W., Duan, P., Wang, Q., Song, J., Wang, Y., Zhang, Z., Wang, P., Jiang, H., Zhang, X., Song, G., et al., 2023. Effect of *Pseudomonas stutzeri* F2 on rearing water quality and growth, innate immunity, visceral morphology and gut microbiota structure of juvenile spotted seabass (*Lateolabrax maculatus*). Aquac. Rep. 30, 101536. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101536.

Girard, S.B., Paquet, V.E., Charette, S.J., 2022. Improvements of virulence factor phenotypic tests for *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*, a major fish pathogen. J. Fish Dis. 45, 177–184. https://doi.org/10.1111/jfd.13547.

Godoy, M., Montes de Oca, M., Suarez, R., Martinez, A., Pontigo, J.P., Caro, D., Kusch, K., Coca, Y., Bohle, H., Bayliss, S., et al., 2024. Genomics of Re-Emergent *Aeromonas salmonicida* in Atlantic Salmon Outbreaks. Microorganisms. 12(1), 64. https://doi.org/10.3390/microorganisms12010064.

Hee, B., Wells, J.M., 2021. Microbial Regulation of Host Physiology by Short-chain Fatty Acids. Trends Microbiol. 29(8), 700–712. https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.02.001.

Hjelmstedt, P., Brijs, J., Berg, C., Axelsson, M., Sandblom, E., Roques, J.A.C., Sundh, H., Sundell, K., Kiessling, A., Gräns, A., 2021. Continuous physiological welfare evaluation of European whitefish (*Coregonus lavaretus*) during common aquaculture practices leading up to slaughter. Aquaculture. 534, 736258. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736258.

Hoseinifar, S.H., Sun, Y.-Z., Caipang, C.M., 2017. Short-chain fatty acids as feed supplements for sustainable aquaculture: an updated view. Aquac. Res. 48(4), 1380-1391. https://doi.org/10.1111/are.13239.

Huang, Q., Sham, R.C., Deng, Y., Mao, Y., Wang, C., Zhang, T., Leung, K., 2020. Diversity of gut microbiomes in marine fishes is shaped by host-related factors. Mol. Ecol. 29(24), 5019-5034. https://doi.org/10.1111/mec.15699.

Jiang, X., Wang, X., Li, L., Niu, C., Pei, C., Zhu, L., Kong, X., 2020. Identification of *Shewanella putrefaciens* as a novel pathogen of the largemouth bass (*Micropterus salmoides*) and histopathological analysis of diseased fish. Front. Cell Infect. Microbiol. 12, 1042977. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1042977.

Khanjani, M.H., Ghaedi, G., Sharifinia, M., 2021. Effects of diets containing β-glucan on survival, growth performance, haematological, immunity and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. Aquac. Res. 53(3), 1842-1850. https://doi.org/0.1111/are.15712.

Kucharczyk, D., Jaczewski, J., Nowosad, J., Łuczyński, M., Piech, P., Dietrich, G., Kucharczyk, D., Drężek, J., Kotsyumbas, I., Muzyka, W., Brezvyn, O., Stejskal, V., 2023. Artificial reproduction of the indoor-cultured brackish form of maraena whitefish (*Coregonus maraena*) under recirculated aquaculture system (RAS) conditions. Anim. Rep. Sci. 257, 107329. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107329.

Lee, P.T., Liao, Z.H., Huang, H.T., Chuang, C.-Y., Nan, F.-H., 2020. β-glucan alleviates the immunosuppressive effects of oxytetracycline on the non-specific immune responses and resistance against *Vibrio alginolyticus* infection in *Epinephelus fuscoguttatus* × *Epinephelus lanceolatus* hybrids. Fish Shellfish Immunol. 100, 467-475. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.03.046.

Li, S., Heng, X., Guo, L., Lessing, D.J., Chu, W., 2022. SCFAs improve disease resistance via modulate gut microbiota, enhance immune response and increase antioxidative capacity in the host. Fish Shellfish Immunol. 120, 560-568. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.12.035

Lin, X., Chen, Y., Ruenkoed, S., Li, X., Leng, X., 2023. Dietary effects of supplementing *Clostridium butyricum* culture or sodium butyrate in low fishmeal diet on growth, serum indicators, intestinal histology and microbiota of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Aquac. Rep. 33, 101827. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101827.

706 Linhartová, Z., Krejsa, J., Zajíc, T., Másílko, J., Samples, S., Mráz, J., 2018. Proximate and
707 fatty acid composition of 13 important freshwater fish species in central Europe. Aquac. Int.
708 26(2), 695–711. https://doi.org/10.1007/s10499-018-0243-5.
709
710 Liu, W., Yang, Y., Zhang, J., Gatlin, D.M., Ringø, E., Zhou, Z., 2014. Effects of dietary
711 microencapsulated sodium butyrate on growth, intestinal mucosal morphology, immune
712 response and adhesive bacteria in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) pre-fed with or
713 without oxidised oil. B. J. Nutr. 112(1), 15–29. https://doi.org/10.1017/S0007114514000610.
714
715 Lopes, L.M.F., Marinho de Mello, M.M., Urbinati, E.C., 2022. β-Glucan reduces cortisol
716 plasma levels, enhances innate immune system after *A. hydrophila* inoculation, and has lipolytic
717 effects on the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Aquaculture. 546, 737411.
718 https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737411.
719
720 Luan, Y., Li, M., Zhou, W., Yao, Y., Yang, Y., Zhang, Z., Ringø, E., Olsen, R.E., Clarke, J.L.,
721 Xie, S., Mai, K., Ran, C., Zhou, Z., 2023. The Fish Microbiota: Research Progress and Potential
722 Applications. Engineering. 29, 137-146. https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.12.011.
723
724 Luz, J., Ramos, A.P., Melo, J.F., Braga, L.G., 2019. Use of sodium butyrate in the feeding of
725 *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) juvenile. Aquaculture. 510, 248-255.
726 https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.065.
727
728 Martin-Gallausiaux, C., Marinelli, L., Blottière, H.M., Larraufie, P., Lapaque, N., 2021. SCFA:
729 mechanisms and functional importance in the gut. Proc. Nutr. Soc. 80(1), 37–49.
730 https://doi.org/10.1017/S0029665120006916.

731 Meena, D.K., Das, P., Kumar, S., Mandal, S.C., Prusty, A.K., Singh, S.K., Akhtar, M.S., Behera,
732 B.K., Kumar, K., Pal, A.K., Mukherjee, S.C., 2013. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in
733 aquaculture (a review). Fish Physiol. Biochem. 39(3), 431–457.
734 https://doi.org/10.1007/s10695-012-9710-5.
735
736 Menanteau-Ledouble, S., Kumar, G., Saleh, M., El-Matbouli, M., 2016. *Aeromonas*
737 *salmonicida:* updates on an old acquaintance. Dis. Aquat. Organ. 120(1), 49–
738 68. https://doi.org/10.3354/dao03006.
739
740 Naylor, R.L., Hardy, R.W., Buschmann A.H., Bush, S.R., Cao, L., Klinger D.H., Little, D.C.,
741 Lubchenco, J., Shumway, S.E., Troell, M., 2021. A 20-year retrospective review of global
742 aquaculture. Nature 591, 551–563. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03308-6
743
744 Nowosad, J., Jasiński, S., Arciuch-Rutkowska, M., Abdel-Latif, H.M.R., Wróbel, M.,
745 Mikiewicz, M., Zielonka, Ł., Kotsyumbas, I.Y., Muzyka, V.P., Brezvvn, O.M., Dietrich, G.,
746 Kucharczyk, D., 2023. Effects of Bee Pollen on Growth Performance, Intestinal Microbiota and
747 Histomorphometry in African Catfish. Animals. 13, 132. https://doi.org/10.3390/ani13010132.
748
749 Pfaffl, M.W., 2016. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.
750 Nucleic Acids Res. 29(9), e45. https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45.
751
752 Pockley, A.G., 2003. Heat shock proteins as regulators of the immune response. Lancet
753 (London, England). 362(9382), 469-476. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14075-5.
754

Rimoldi, S., Gliozheni, E., Ascione, C., Gini, E., Terova, G., 2018. Effect of a specific composition of short-and medium-chain fatty acid 1-monoglycerides on growth performances and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). PeerJ. 31(6), 5355. https://doi.org/10.7717/peerj.5355.

Roberts, R.J., Carmelo, A., Saliba, C., Bossier, P., Sung, Y.Y., 2010. Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: A review. J. Fish Dis. 33, 789-801. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01183.x.

Say, P., Nimitkul, S., Bunnoy, A., Na-Nakorn, U., Srisapoome, P., 2023. Effects of the combination of chitosan and *Acinetobacter* KU011TH on the growth and health performances and disease resistance of juvenile hybrid catfish (*Clarias gariepinus* × *C. macrocephalus*). Fish Shellfish Immunol. 142, 109177. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.109177.

Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat. Protoc. 3(6), 1101–1108. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73.

Sebesta, R., Kucharczyk, D., Nowosad, J., Sikora, M., Stejskal, V., 2018. Effect of temperature on growth and survival of maraena whitefish *Coregonus maraena* (Bloch 1779) larvae in controlled conditions. Aquac. Res. 49(2), 1–7. https://doi.org/10.1111/are.13778

Siikavuopio, S.I., Knudsen, R., Amundsen, P.A., Sæther, B.S., James, P., 2012. Effects of high temperature on the growth of European whitefish (*Coregonus lavaretus L.*). Aquac. Res. 44, 8-12. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02999.x.

780 Shan, C., Li, M., Liu, Z., Xu, R., Qiao, F., Du, Z.-Y., Zhang, M.-L., 2021. *Pediococcus*
781 *pentosaceus* enhances host resistance against pathogen by increasing IL-1β production:
782 understanding probiotic effectiveness and administration duration. Front. Immunol. 12,
783 766401. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.766401.
784
785 Stejskal, V., Matousek, J., Sebesta, R., Nowosad, J., Sikora, M., Kucharczyk, D., 2021a.
786 Stocking density effect on survival and growth of early life stages of maraena
787 whitefish, *Coregonus maraena* (Actinopterygii: Salmoniformes: *Salmonidae*). Acta Ichthyol.
788 Piscat. 51(2), 139-144. https://doi.org/10.3897/aiep.52.64119
789
790 Stejskal, V., Gebauer, T., Sebesta, R., Nowosad, J., Sikora, M., Biegaj, M., Kucharczyk, D.,
791 2021b. Effect of feeding strategy on survival, growth, intestine development, and liver status of
792 maraena whitefish *Coregonus maraena* larvae. J. World Aquac. Soc. 52, 829–842.
793 https://doi.org/10.1111/jwas.12785
794
795 Suratip, N., Charoenwattanasak, S., Klahan, R., Herault, M., Yuangsoi, B., 2023. An
796 investigation into the effects of using protein hydrolysate in low fish meal diets on growth
797 performance, feed utilization and health status of snakehead fish (*Channa striata*) fingerling.
798 Aquac. Rep. 30, 101623. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101623.
799
800 Sun, Y., MacRae, T.H., 2005. Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone
801 function. Cell Mol. Life Sci. 62(21), 2460–2476. https://doi.org/10.1007/s00018-005-5190-4.
802
803 Torres-Maravilla, E., Parra, M., Maisey, K., Vargas, R.A., Cabezas-Cruz, A., Gonzalez, A.,
804 Tello, M., Bermúdez-Humarán, L.G., 2024. Importance of Probiotics in Fish Aquaculture:

Towards the Identification and Design of Novel Probiotics. Microorganisms. 12, 626. https://doi.org/10.3390/microorganisms12030626.

Vanden Bergh, P., Frey, J., 2014. *Aeromonas salmonicida* in the light of its T3SS. Microb. Biotechnol. 7, 381 - 400. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12091.

Vargas, R.A., Soto-Aguilera, S., Parra, M., Herrera, S., Santibañez, A., Kossack, C., Saavedra, C.P., Mora, O., Pineda, M., Gonzalez, O., Gonzalez, A., Maisey, K., Torres-Maravilla, E., Bermúdez-Humarán, L.G., Suárez-Villota, E.Y., Tello, M., 2023. Analysis of microbiota-host communication mediated by butyrate in Atlantic salmon. Comput. Struct. Biotechnol. J. 21, 2558-2578. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.03.050.

Wu, X., Wang, L., Xie, Q., Tan, P., 2020. Effects of dietary sodium butyrate on growth, diet conversion, body chemical compositions and distal intestinal health in yellow drum (*Nibea albiflora*, Richardson). Aquac. Res. 51(1), 69-79. https://doi.org/10.1111/are.14348.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L., 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics. 13, 134. https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134.

Zhou, C., Lin, H., Huang, Z., Wang, J., Wang, Y., Yu, W., 2019. Effect of dietary sodium butyrate on growth performance, enzyme activities and intestinal proliferation-related gene expression of juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus*. Aquacult. Nutr. 25, 1261–1271. https://doi.org/10.1111/anu.12940.

831 Table 1. The content of active compounds of the feed used for the feeding experiment on maraena whitefish
832 (*Coregonus maraena*) fry.

Active ingredient	**Groups**			
	C	**FQV1**	**FQV2**	**FQV3**
vitamin C (mg/ kg)	ND	30	30	30
vitamin E (mg/ kg)		10	10	10
vitamin K (mg/ kg)		0.4	0.4	0.4
vitamin A (IU/ kg)		1200	1200	1200
vitamin D3 (IU/ kg)		800	800	800
sodium butyrate (mg/ kg)		50	150	50
β- glucan (mg/ kg)		20	20	60

833 C – control group, FQV1, FQV2, FQV3 – supplemented groups.

834 IU, international unit of vitamin; ND, no data.

835

836

837

838

839

840

841

842

843

844

845

846

847

848

849

Table 2. Breeding indicators (mean ± SD) of maraena whitefish (*Coregonus maraena*) fry fed commercial feed in the control group (C) and fed with enriched feed in FQV1, FQV2, FQV3 groups during an experiment.

Breeding indicators	**Groups**			
	C	**FQV1**	**FQV2**	**FQV3**
W_i (g)	0.14 ± 0.05			
L_i (cm)	2.62 ± 0.38			
W_f (g)	1.08 ± 0.48 b	1.55 ± 0.39 a	1.60 ± 0.37 a	1.69 ± 0.54 a
L_f (cm)	5.35 ± 0.68 b	6.10 ± 0.44 a	6.21 ± 0.41 a	6.22 ± 0.65 a
WG (g)	0.94 ± 0.48 b	1.41 ± 0.39 a	1.46 ± 0.37 a	1.55 ± 0.54 a
LG (cm)	2.73 ± 0.68 b	3.48 ± 0.44 a	3.59 ± 0.41 a	3.60 ± 0.65 a
SGR (%/d)	6.45 ± 1.34 b	7.82 ± 0.84 a	7.95 ± 0.74 a	8.03 ± 1.17 a
K (g/cm^3)	0.67 ± 0.06	0.67 ± 0.04	0.66 ± 0.06	0.68 ± 0.04
SR (%)	50.00 ± 2.83 b	76.22 ± 2.34 a	74.67 ± 5.03 a	79.78 ± 8.39 a

W_i – initial weight, L_i – initial length, W_f – final weight, L_f – final length, WG - weight gain, LG - length gain, SGR - specific growth rate, K – Fulton's condition factor, SR – survival rate.

Data in row marked with different letters are statistically significant ($P < 0.05$).

Table 3. Results (mean ± SE) of bioinformatic analyzes of gut microbiome of maraena whitefish (*Coregonus maraena*) fry fed commercial feed in the control group (C) and enriched feed in FQV1, FQV2, FQV3 groups during an experiment.

Groups	Counts	Observations
C	70917.83 ± 9641.74 ab	518.83 ± 68.26 ab
FQV1	62455.50 ± 9171.93 b	548.83 ± 71.90 ab
FQV2	72237.17 ± 6300.83 ab	484.50 ± 80.95 b
FQV3	85398.17 ± 16461.50 a	628.33 ± 60.26 a
Total number of counts taxonomically classified		1746052
Mean number of counts per sample		72752.167±13000.449
Total number of ASV		3582

Data in row marked with different letters are statistically significant ($P < 0.05$).

Table 4. Relative abundance (%) of bacteria at Phylum and Genus level in the gut microbiome of maraena whitefish (*Coregonus maraena*) fry fed commercial feed in the control group (C) and fed with enriched feed in FQV1, FQV2, FQV3 groups during an experiment. The table shows bacteria, that differed significantly between the groups ($P < 0.05$).

	Groups			
	C (%)	**FQV1 (%)**	**FQV2 (%)**	**FQV3 (%)**
Phylum				
Nitrospirota	0.28 b	0.98 ab	2.37 ab	2.42 a
Genus				
Lactococcus	0.68 ab	1.01 a	0.40 b	0.65 ab
Streptococcus	1.66 ab	2.39 a	1.08 b	1.70 ab
Nitrospira	0.28 b	0.98 ab	2.37 ab	2.42 a
Shewanella	0.68 a	0.25 ab	0.11 ab	0.05 b
Pseudomonas	3.56 a	1.13 b	1.44 ab	1.56 ab
Aeromonas	18.43 a	1.94 b	2.04 b	1.74 b

The table shows bacteria, that differed significantly between the groups ($P < 0.05$).

Figure 1. Expression of HSP70 gene in liver tissue of maraena whitefish (*Coregonus maraena*) fry fed commercial feed in the control group (C) and fed with enriched feed in FQV1, FQV2, FQV3 groups during an experiment. Groups marked with different letters are statistically significant ($P < 0.05$). The error bars represent the standard error for each group.

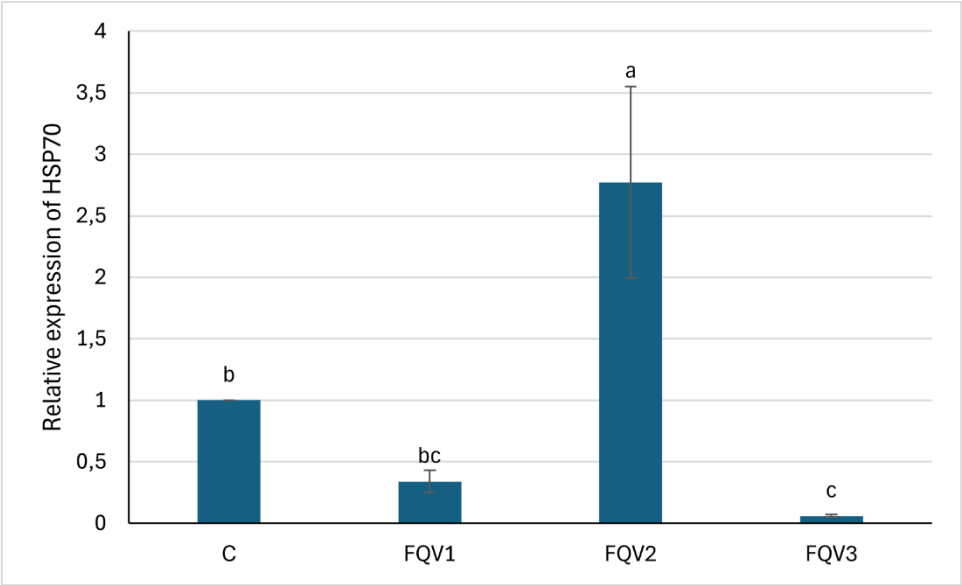
Figure 2. Venn diagram of ASVs characterizing the gut microbiome of maraena whitefish (*Coregonus maraena*) fry fed commercial feed in the control group (C) and enriched feed in FQV1, FQV2 FQV3 groups during an experiment.

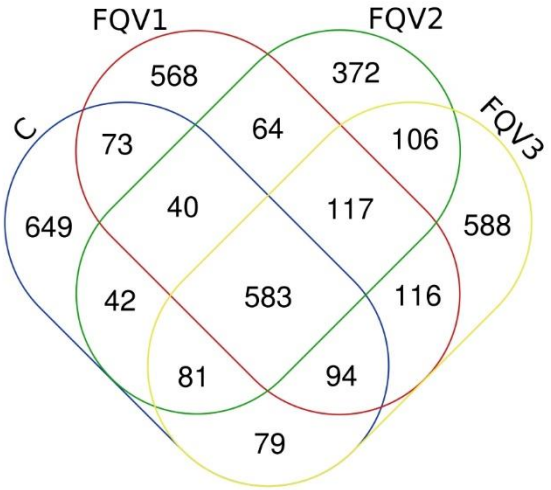
Figure 3. α-diversity metrics (mean ± SE ± SD): Simpson index (A), Shannon index (B), Evenness index (C), Chao – 1 index (D) of gut microbiome of maraena whitefish (*Coregonus maraena*) fry fed commercial feed in the control group (C) and enriched feed in FQV1, FQV2, FQV3 groups during an experiment. Groups marked with different letters are statistically significant ($P < 0.05$).

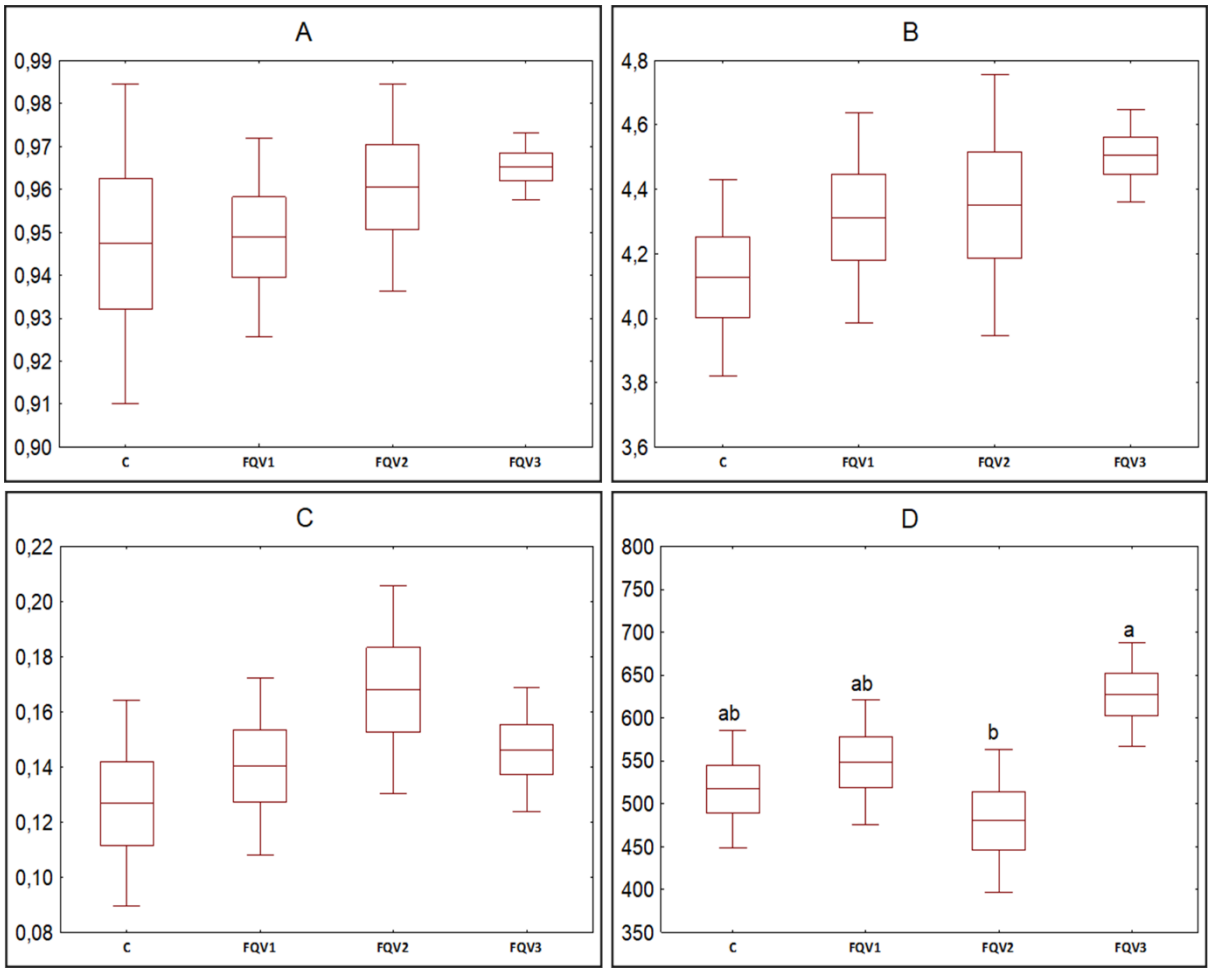
Figure 4. Principal Coordinate Analysis with the Bray-Curtis distance of the gut microbiome of maraena whitefish (*Coregonus maraena*) fry fed commercial feed in the control group (C) and enriched feed in FQV1, FQV2, FQV3 groups during an experiment. Points of the same color mean individuals from the same group (C – black points, FQV1 – green points, FQV2 – purple points, FQV3 – pink points).

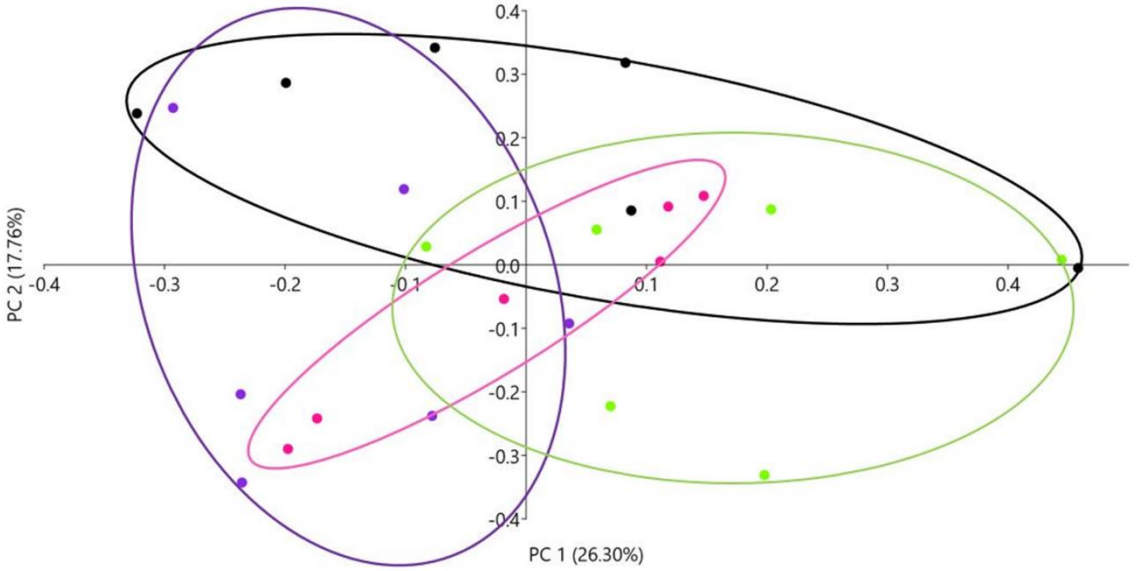
Figure 5. Relative abundance of bacteria at Phylum in the gut microbiome of maraena whitefish (*Coregonus maraena*) fry fed commercial feed in the control group (C) and fed with enriched feed in FQV1, FQV2, FQV3 groups during an experiment.

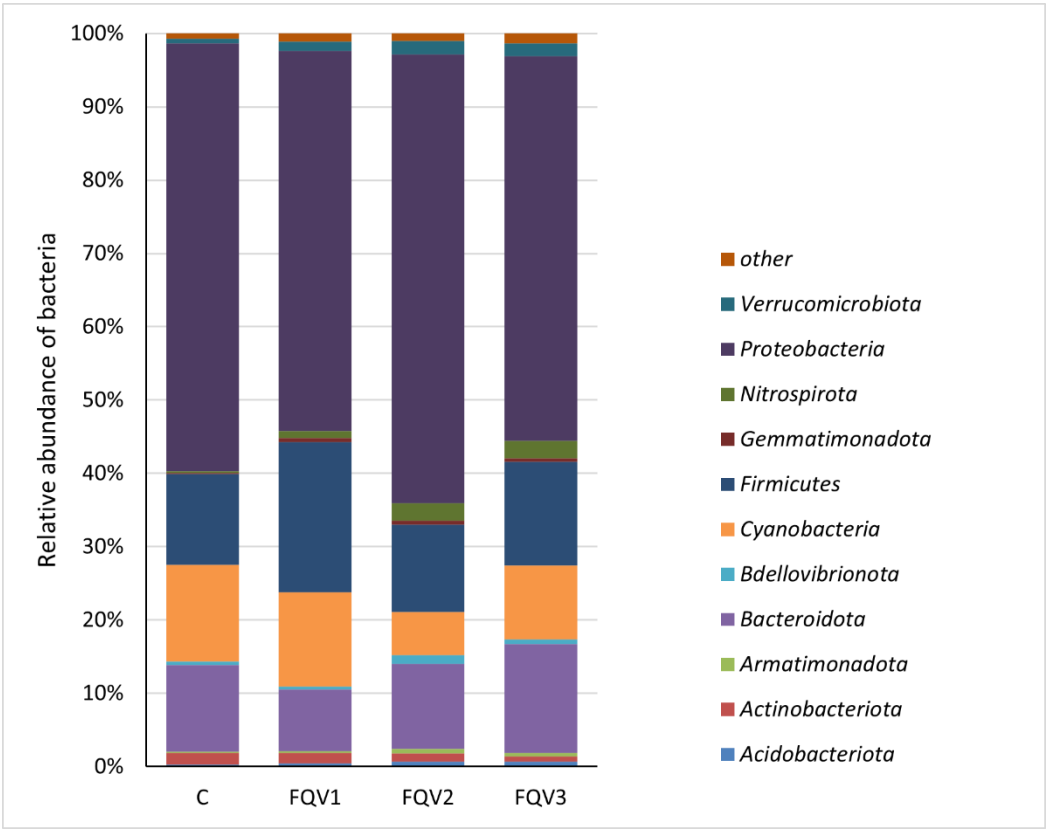
Figure 6. Relative abundance of bacteria at Genus in the gut microbiome of maraena whitefish (*Coregonus maraena*) fry fed commercial feed in the control group (C) and fed with enriched feed in FQV1, FQV2, FQV3 groups during an experiment

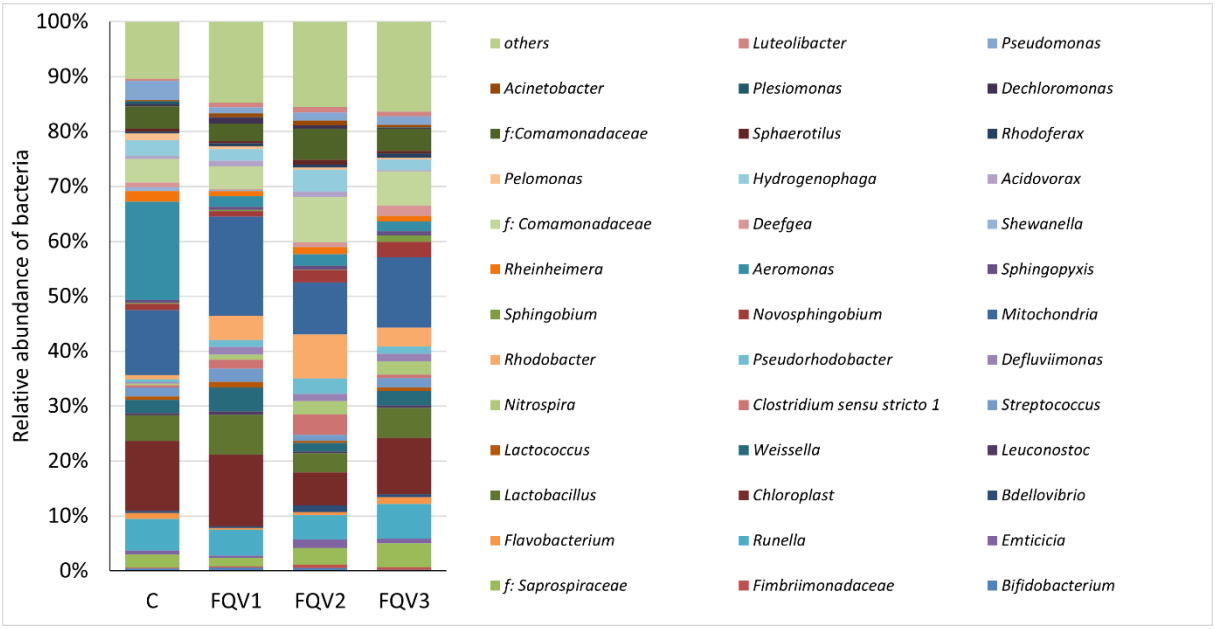

Relative expression of HSP70
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
a
b
bc
c
C
FQV1
FQV2
FQV3


FQV1
FQV2
FQV3
C
568
372
73
64
106
649
40
117
588
42
583
116
81
94
79


A
0,99
0,98
0,97
0,96
0,95
0,94
0,93
0,92
0,91
0,90
C
FQV1
FQV2
FQV3
B
4,8
4,6
4,4
4,2
4,0
3,8
3,6
C
FQV1
FQV2
FQV3
C
0,22
0,20
0,18
0,16
0,14
0,12
0,10
0,08
C
FQV1
FQV2
FQV3
D
800
750
700
650
600
550
500
450
400
350
ab
ab
b
a
C
FQV1
FQV2
FQV3


0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
-0.2
-0.3
-0.4
-0.4
-0.3
-0.2
-0.1
0.1
0.2
0.3
0.4
PC 2 (17.76%)
PC 1 (26.30%)


100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
Relative abundance of bacteria
C
FQV1
FQV2
FQV3
other
Verrucomicrobiota
Proteobacteria
Nitrospirota
Gemmatimonadota
Firmicutes
Cyanobacteria
Bdellovibrionota
Bacteroidota
Armatimonadota
Actinobacteriota
Acidobacteriota


100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
Relative abundance of bacteria
C
FQV1
FQV2
FQV3
others
Luteolibacter
Pseudomonas
Acinetobacter
Plesiomonas
Dechloromonas
f:Comamonadaceae
Sphaerotilus
Rhodoferax
Pelomonas
Hydrogenophaga
Acidovorax
f: Comamonadaceae
Deefgea
Shewanella
Rheinheimera
Aeromonas
Sphingopyxis
Sphingobium
Novosphingobium
Mitochondria
Rhodobacter
Pseudorhodobacter
Defluviimonas
Nitrospira
Clostridium sensu stricto 1
Streptococcus
Lactococcus
Weissella
Leuconostoc
Lactobacillus
Chloroplast
Bdellovibrio
Flavobacterium
Runella
Emticicia
f: Saprospiraceae
Fimbriimonadaceae
Bifidobacterium

1022

Olsztyn, 10.12.2024

Martyna Arciuch-Rutkowska
(imię i nazwisko kandydata)

Zootechnika i Rybactwo
(dyscyplina naukowa)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE
o samodzielnym napisaniu rozprawy doktorskiej

Świadoma odpowiedzialności prawnej oświadczam, że rozprawa doktorska pod tytułem **„Opracowanie składu przemysłowej mieszanki uzupełniającej pozytywnie wpływającej na wzrost, rozwój oraz odporność ryb hodowlanych"** została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie jest i nie była wcześniej podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Ponadto oświadczam, że treść rozprawy doktorskiej przedstawionej przez mnie do obrony, zawarta na przekazywanym nośniku elektronicznym, jest identyczna z jej wersją drukowaną.

W związku z powyższym oświadczam, że wyrażam zgodę na poddanie rozprawy doktorskiej procedurze antyplagiatowej.

Martyna Arciuch-Rutkowska

(podpis kandydata)

Olsztyn, 10.12.2024

Prof. dr hab. inż. Dariusz Kucharczyk

(stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko promotora/~~promotora pomocniczego~~*)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE

promotora/~~promotora pomocniczego~~* rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że rozprawa doktorska mgr Martyny Arciuch-Rutkowskiej pod tytułem **Opracowanie składu przemysłowej mieszanki uzupełniającej pozytywnie wpływającej na wzrost, rozwój oraz odporność ryb hodowlanych** została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

D. Kucharczyk

(podpis promotora)

* *niepotrzebne skreślić*

Olsztyn, 10.12.2024

Dr Michał Krzysztof Łuczyński

(stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko
~~promotora~~/promotora pomocniczego*)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE

~~promotora~~/promotora pomocniczego* rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że rozprawa doktorska mgr Martyny Arciuch-Rutkowskiej pod tytułem **Opracowanie składu przemysłowej mieszanki uzupełniającej pozytywnie wpływającej na wzrost, rozwój oraz odporność ryb hodowlanych** została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

.....

(podpis promotora)

* *niepotrzebne skreślić*