



**POLITECHNIKA
BYDGOSKA**
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

RADA NAUKOWA DYSCYPLINY ZOOTECHNIKA I RYBACTWO

ROZPRAWA DOKTORSKA

**W formie zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów
naukowych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo**

mgr Ewa Aleksandra Ziółkowska

Wpływ dodatku prebiotyku na wskaźniki biochemiczne krwi, wartość
odżywczą mięsa i mikrostrukturę tkanek ryb

*The effect of the prebiotic addition on the blood biochemical
parameters, nutritional value of meat and microstructure of fish
tissues*

DZIEDZINA: Nauki rolnicze

DYSCYPLINA: Zootechnika i rybactwo

PROMOTOR PRACY:

dr hab. inż. Magdalena Stanek, prof. PBŚ
Katedra Fizjologii Zwierząt i Zoofizjoterapii,
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Politechnika Bydgoska

PROMOTOR POMOCNICZY:

dr inż. Mateusz Rawski
Pracownia Rybactwa Śródlądowego i Akwakultury, Katedra Zoologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Bydgoszcz, 2022

Źródła finansowania

Praca została zrealizowana w ramach grantu nr PPI/APM/2019/1/00003 sfinansowanego przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej (NAWA); „EcoSET. Ecology, Science, Education and Technology. Umiejdzynarodowienie Politechniki Bydgoskiej w obszarze nauki i edukacji”.

Badania realizowane ze środków statutowych nr BN 52/2019 Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt Politechniki Bydgoskiej (Katedra Fizjologii Zwierząt i Zoofizjoterapii).

Badania realizowane ze środków statutowych nr 506.511.04.00 Pracowni Rybactwa Śródlądowego i Akwakultury, Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytet Przyrodniczego w Poznaniu.

Badanie realizowane ze środków własnych Zakładu Doświadczalnego Technologii Produkcji Pasz i Akwakultury w Muchocinie, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu.

Podziękowania

Serdeczne podziękowania kieruję do Pani promotor dr hab. inż. Magdaleny Stanek Prof. PBŚ. Dziękuję za nieocenioną pomoc udzieloną zarówno podczas całej naszej współpracy jak i w przygotowaniu rozprawy doktorskiej. Dziękuję za wyrozumiałość, cierpliwość oraz motywację w realizacji kolejnych celów. Dziękuję za wiarę we mnie na każdym etapie naszej współpracy.

Serdecznie dziękuję również Panu promotorowi dr inż. Mateuszowi Rawskiemu, za pomoc na każdym etapie powstawania niniejszej pracy. Za cenne rady oraz za wyrozumiałość.

Pragnę podziękować również Pani dr hab. inż. Joannie Boguckiej Prof. PBŚ, dzięki której pokochałam histologię oraz Panu Prof. UPP dr hab. inż. Janowi Mazurkiewiczowi. Dziękuję każdemu z osobna za wsparcie oraz wskazówki, których wartość jest dla mnie bezcenna.

Pragnę podziękować wszystkim pracownikom Katedry Fizjologii Zwierząt i Zoofizjoterapii, za życzliwość oraz okazaną mi pomoc.

Chciałabym podziękować również mojemu mężowi, za nieustanne wsparcie oraz nigdy niegasnącą wiarę we mnie.

SPIS TREŚCI

1.	WSTĘP	7
2.	Wykaz artykułów naukowych stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej.....	10
3.	Uzasadnienie spójności tematycznej cyklu publikacji rozprawy	11
3.1.	Hipoteza badawcza, cel i zakres badań.....	12
3.2.	Materiały i metody badań	13
3.2.1	Układ doświadczalny i plan badań	13
3.2.2	Charakterystyka zastosowanego preparatu prebiotycznego	13
3.2.3	Analiza parametrów wzrostu	13
3.2.4	Ubój ryb oraz pobór materiału biologicznego	14
3.2.5	Oznaczenie wartości wskaźników biochemicznych krwi.....	14
3.2.6	Oznaczenie poziomu cholesterolu całkowitego.....	14
3.2.7	Oznaczenie poziomu tłuszczu oraz profilu kwasów tłuszczowych.....	14
3.2.8	Oznaczenie poziomu składników mineralnych	15
3.2.9	Analizy histologiczne	15
3.2.10	Analiza statystyczna	16
3.3.	Wyniki	16
3.3.1	Wpływ suplementacji trans-galaktooligosacharydem na parametry wzrostu.....	16
3.3.2	Wpływ suplementacji trans-galaktooligosacharydem na poziom wskaźników biochemicznych krwi.....	16
3.3.3	Wpływ suplementacji trans-galaktooligosacharydem na zawartość cholesterolu całkowitego.....	17
3.3.4	Wpływ suplementacji trans-galaktooligosacharydem na zawartość tłuszczu i profil kwasów tłuszczowych	17
3.3.5	Wpływ suplementacji trans-galaktooligosacharydem na poziom składników mineralnych oraz ich wzajemne korelacje.....	17
3.3.6	Wpływ suplementacji trans-galaktooligosacharydem na parametry histologiczne.	18
3.4.	Dyskusja.....	19
3.4.1	Wpływ dodatku trans-galaktooligosacharydu na wyniki odchowu oraz wskaźniki biochemiczne krwi.....	19
3.4.2	Wpływ dodatku trans-galaktooligosacharydu na poziom cholesterolu i tłuszczu całkowitego oraz na profil kwasów tłuszczowych	20
3.4.3	Wpływ dodatku trans-galaktooligosacharydu na zawartość składników mineralnych w wybranych tkankach karpia pospolitego.....	21
3.4.4	Wpływ dodatku trans-galaktooligosacharydu na parametry histologiczne jelit oraz mikrostrukturę mięśni karpia pospolitego	22
3.5.	Podsumowanie wyników i wnioski	24
3.6.	literatura	25
4.	Streszczenie	30
5.	Abstract.....	31
6.	Załączniki.....	32
6.1.	Kopie artykułów naukowych stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej	32
6.2.	Oświadczenie Autora rozprawy doktorskiej.....	81
6.3.	Oświadczenia Współautorów artykułów naukowych.....	83

1. WSTĘP

Rosnąca skala konsumpcji ryb spowodowała, że akwakultura stała się najszybciej rozwijającą gałęzią produkcji zwierzęcej na świecie (FAO 2020). Wśród konsumentów, których świadomość w zakresie ochrony przyrody i jakości produktu rośnie, obserwuje się tendencje do wybierania produktów zwierzęcych pochodzących z chowu prowadzonego metodami zrównoważonymi. W celu zaspokojenia tych potrzeb, zwiększa się zastosowanie dodatków paszowych o charakterze naturalnym, wspomagających homeostazę organizmu i w sposób pozytywny wpływających na status zdrowotny i fizjologiczny zwierząt gospodarskich, w tym również ryb. Zwiększająca się wiedza konsumentów dotycząca wpływu szeregu czynników żywieniowych na efekty produkcyjne i wartość odżywczą mięsa ryb generuje potrzebę realizacji badań z tego zakresu. Jednym z najbardziej rozpowszechnionych gatunków słodkowodnych ryb hodowlanych na świecie i jednocześnie gatunkiem modelowym jest karp pospolity (*Cyprinus carpio* L.), który zaliczany jest do ryb wszystkożernych, posiadających niskie wymagania żywieniowe (Dawood i Koshio 2016; Abdel-Rawwab i Monier 2017). W środowisku naturalnym dieta karpi opiera się na biomase produkowanej przez zbiornik wodny. W systemach ekstensywnych produkcja oparta jest na tzw. wydajności naturalnej stawu. W półintensywnym systemie chowu gatunek ten jest częściowo dokarmiany paszami gospodarskimi, a w intensywnym niemalże lub całkowicie zależny od żywienia paszami komponowanymi. Skład diety karpi przekłada się na cechy fizjologiczne organizmu. Jednym z elementów układu pokarmowego karpi jest pseudożołądek, czyli część jelita, w której magazynowany jest pokarm w środowisku zasadowym. Trawienie i wchłanianie składników pokarmowych odbywa się w jelicie (Nwana i Schwarz 2007). Z uwagi na specyficzną budowę układu pokarmowego karpi, trawienie niektórych antyodżywczych składników paszy może być utrudnione bądź przebiegać wolniej, a w konsekwencji może wpływać na homeostazę przewodu pokarmowego, której zaburzenie w sytuacjach obniżonej odporności może prowadzić do wystąpienia subklinicznych i klinicznych infekcji u ryb. Z punktu widzenia zdrowotności i wyników produkcyjnych bardzo ważna jest dbałość o zachowanie odpowiedniego składu mikrobioty jelitowej, która w istotny sposób wpływa na współczynniki strawności składników pokarmowych, prawidłowy wzrost, funkcjonowanie oraz regulację odpowiedzi immunologicznej tych zwierząt, a w efekcie na jakość surowca mięsnego (Akhter i in. 2015). W celu modulacji mikrobioty jelitowej powszechne jest stosowanie szerokiego spektrum dodatków paszowych, do których można zaliczyć probiotyki oraz prebiotyki. Preparaty prebiotyczne stanowią źródło węgla oraz energii dla bakterii probiotycznych, a ich suplementacja przyczynia się również do zahamowania wzrostu patogennych drobnoustrojów żyjących w układzie pokarmowym, zachowując równowagę mikrobioty w jelitach, zwiększenia odporności zwierząt na stres oraz utrzymania odpowiedniej homeostazy w organizmie (Cao i in. 2019; Hussein i in. 2016; Ebrahimi i in. 2012). Doniesienia naukowe potwierdzają również immunostymulujące działanie prebiotyków (Havenaar i in. 1999; Paulsen i in. 2003; Hoseinifar i in. 2014). Usprawnienie metabolizmu składników odżywczych w przewodzie pokarmowym poprzez dodatek do paszy produktów prebiotycznych, może wpłynąć korzystnie na wartość odżywczą mięsa, na skutek poprawy zawartości białka, tłuszczu czy składników mineralnych (McCabe i in. 2015; Whisner i Castillo 2018).

Do oceny homeostazy organizmu – jego stanu zdrowotnego i odżywienia służą analizy wskaźników biochemicznych krwi (Gultepe i in. 2012), w tym profilu białkowego (białko całkowite, albuminy, globuliny, mocznik), tłuszczowego (cholesterol całkowity, HDL, LDL, trójglicerydy) czy wątrobowego (ALT, AST, ALP, bilirubina). Jednym z czynników zaburzających utrzymanie homeostazy w organizmie ryb jest stres, który może przyczyniać się do zwiększenia przepuszczalności nabłonka powierzchniowego w obrębie m.in. skrzelii, a w konsekwencji do zmniejszenia odporności na patogeny. Ponadto, ciągłe narażanie ryb na

czynniki wywołujące intensywny i przewlekły stres, może prowadzić do zahamowania wzrostu oraz do zaburzenia procesów rozrodczych. Stężenie hormonów tarczycy, kortyzolu oraz glukozy w surowicy krwi stanowi istotny wskaźnik poziomu stresu w organizmie (Wendelaar 1997; Mirghaed i in. 2018).

Natomiast do oceny wpływu bioaktywnych dodatków paszowych na zdrowotność przewodu pokarmowego niezbędne jest wykonanie pomiarów histologicznych będących wyznacznikiem potencjału wchłaniania składników odżywczych. Zwiększenie wysokości oraz szerokości kosmków jelitowych wiąże się ze zwiększeniem pola powierzchni chłonnej jelit oraz aktywności enzymów trawiennych, co w konsekwencji oddziałuje na zwiększenie zdolności wchłaniania składników odżywczych i wzrost ryb (Guerreiro i in. 2018; Korylyak 2015).

Budowa histologiczna tkanki mięśniowej dostarcza informacji na temat struktury poszczególnych włókien mięśniowych, które są podstawową jednostką funkcjonalną tkanki mięśniowej. Wzrost tkanki mięśniowej ryb odbywa się zarówno w sposób hipertroficzny, jak i hiperplastyczny, co w konsekwencji daje nam charakterystyczny dla ryb wygląd mozaikowy. Zbyt szybki przyrost masy ciała może przyczyniać się do zniszczenia włókien mięśniowych, a w konsekwencji do powstawania zmian histopatologicznych. Ponadto analizy histologiczne mięśni mogą dostarczać informacji na temat sposobu rozmieszczenia tłuszczu śródmięśniowego, co jest niezwykle istotne z punktu widzenia konsumenckiego, ponieważ tłuszcz śródmięśniowy wpływa na smak, soczystość i jędrność mięsa (Bogucka i in. 2018). Natomiast spożywanie mięsa ryb bogatego w tłuszcz i zawierającego właściwy profil kwasów tłuszczowych zmniejsza ryzyko wystąpienia chorób wieńcowych wśród konsumentów (Levitan i in. 2010; Guerreiro i in. 2015; Mazurkiewicz i in. 2008;).

Mięso ryb jest bogatym źródłem składników mineralnych, na poziom których wpływa wiele czynników związanych z jakością paszy oraz parametrami fizyko-chemicznymi wody (Lall 2002). Zachwianie równowagi mineralnej może być przyczyną zaburzenia stanu homeostazy i powodować deformację ciała, co w konsekwencji stanowi bardzo ważny problem zdrowotny i ekonomiczny dla akwakultury (Kamler i in. 2012; Sikorska 2010). Substancje prebiotyczne wpływają na produkcję krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych obniżając pH jelit oraz regulują czynniki odpowiedzialne za transport metali dwuwartościowych, co przyczynia się do poprawy wchłaniania substancji mineralnych, a w efekcie do zapewnienia równowagi mineralnej w różnych tkankach ryb (Whisner i Castillo 2018; McCabe i in. 2015; Gibson i in. 2017). Preparaty prebiotyczne mogą stymulować proliferację komórek nabłonka, zwiększając powierzchnię wchłaniania i jednocześnie wspomagają ekspresję białek odpowiedzialnych za transport składników mineralnych w komórkach nabłonka (Yeung i in. 2005). Ponadto, substancje takie jak FOS (fruktooligosacharydy) czy GOS (transgalaktooligosacharyd), sprzyjają wzrostowi *Bifidobacterium* spp., które stymulują syntezę witaminy B6, odpowiedzialną za lepszą absorpcję niektórych metali, np.: cynku.

Preparat prebiotyczny użyty w prezentowanym cyklu badań, to trans-galaktooligosacharyd (GOS). Badania Tzortzis i in. (2005) potwierdziły, że prebiotyk pozyskany tą metodą wpłynął korzystnie na wzrost *Bifidobacterium* spp., należących do *Actinobacteria* licznie występujących w jelitach ryb (Banerjee i in. 2017). Bakterie te w obecności transgalaktooligosacharydu wykazały się zwiększonym tempem namnażania i produkcją krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w porównaniu z innymi dostępnymi na rynku oligosacharydami. Badania *in ovo* z udziałem prebiotyku Bi²tos zawierającego transgalaktoloigosacharyd stosowany w poniższej dysertacji potwierdziły korzystny wpływ tej substancji bioaktywnej na mikrobiotę jelitową jednodniowych kurcząt brojlerów (Bednarczyk i in. 2016) oraz brojlerów w 42 dobie życia (Sławińska i in. 2019). Badania potwierdziły również korzystny wpływ Bi²tos na mikrostrukturę jelita cienkiego, a tym samym na poprawę wchłaniania składników odżywczych u kurcząt brojlerów (Bogucka i in. 2016; Sobolewska i in. 2017).

Pomimo licznych badań nad mikrobiomem i zastosowaniem alimentarnych metod jego modulacji, niewiele jest dostępnych badań dotyczących zastosowania transgalaktooligosacharydów w warunkach *in vivo* w żywieniu ryb, dlatego też podjęto badania o charakterze eksperymentalnym mające na celu ocenę wpływu GOS na wzrost, rozwój i nutrifizjologię ryb z zastosowaniem karpia jako gatunku modelowego.

2. WYKAZ ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH STANOWIĄCYCH CYKL PUBLIKACJI ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

- 1) **(Publikacja 1) Ziółkowska E.,** Bogucka J., Dankowiakowska A., Rawski M., Mazurkiewicz J., Stanek M. Effects of a trans-galactooligosaccharide on biochemical blood parameters and intestine morphometric parameters of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Animals*, 2020, 10(4), 723, doi: 10.3390/ani10040723
pkt. MNiSW²⁰²⁰ = 100
Impact Factor²⁰²⁰ = 2,752
- 2) **(Publikacja 2) Ziółkowska E.,** Bogucka J., Mazurkiewicz J., Rawski M., Róžański Sz., Stanek M. Effects of a trans-galactooligosaccharide on minerals content of common carp (*Cyprinus carpio* L.) tissues. *Biological Trace Element Research*, 2021, 199, 4792-4804. doi: 10.1007/s12011-021-02600-w.
pkt. MEiN²⁰²¹ = 70
Impact Factor²⁰²¹ = 3,738
- 3) **(Publikacja 3) Ziółkowska E.,** Bogucka J., Rawski M., Mazurkiewicz J., Maiorano G., Stanek M. The first insights on trans-galactooligosaccharide effects on fatty acids profile and microstructure of muscle in common carp. *Annals of Animal Science*, 2022, 22(1), 305-324. doi: 10.2478/aoas-2021-0030
pkt. MEiN²⁰²² = 140
Impact Factor²⁰²² = 2,090

Podsumowanie wskaźnika cyklu publikacji :

Sumaryczna liczba punktów MNiSW = 310

Sumaryczny *Impact Factor* = 8,580

3. UZASADNIENIE SPÓJNOŚCI TEMATYCZNEJ CYKLU PUBLIKACJI ROZPRAWY

Problematyka badawcza prezentowanej rozprawy doktorskiej dotyczy wpływu dodatku do paszy trans-galaktooligosacharydu na parametry wzrostu, stan fizjologiczny oraz na wartość odżywczą i mikrostrukturę mięsa karpia pospolitego (*Cyprinus carpio* L). Na przestrzeni ostatnich lat obserwuje się szybki rozwój sektora rolnictwa jakim jest hodowla ryb, co niesie ze sobą konieczność obniżenia kosztów produkcji poprzez zwiększenie wchłaniania substancji odżywczych z paszy oraz poprawę funkcjonowania układu immunologicznego zwierząt. Doskonałym przykładem substancji korzystnie wpływających zarówno na system immunologiczny, jak i na układ pokarmowy zwierząt są preparaty prebiotyczne. W publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej jako czynnik doświadczalny zastosowano trans-galaktooligosacharyd (GOS) otrzymywany na drodze enzymatycznej transgalaktozylacji laktozy przez komórki *Bifidobacterium bifidum*. Oligosacharyd ten w sposób specyficzny oddziałuje na mikrobiotę jelitową, wpływa korzystnie na wzrost *Bifidiobacterium* spp., dlatego też w sposób bezpieczny może przyczynić się do polepszenia parametrów fizjologicznych ryb. Aby określić wpływ wybranego dodatku paszowego na funkcjonowanie organizmu, dokonano analizy parametrów wzrostu, wskaźników biochemicznych krwi w celu określenia stanu zdrowotnego ryb oraz pomiarów histologicznych jelit (**Publikacja 1**). Częściowo korzystne wyniki uzyskane na tym etapie doświadczenia skłoniły zespół do podjęcia badań dotyczących wpływu dodatku do paszy substancji prebiotycznej na zawartości tłuszczu, cholesterolu i profilu kwasów tłuszczowych w mięsie oraz na mikrostrukturę mięśnia karpia (**Publikacja 3**). Pozytywne wyniki uzyskane w **Publikacji 1**, dotyczące parametrów morfometrycznych jelita przyczyniły się do realizacji dalszych analiz dotyczących wpływu trans-galaktooligosacharydu na stopień wchłaniania składników mineralnych ze światła jelita oraz na stopień ich kumulacji w wybranych tkankach karpia (**Publikacja 2**).

Spójność tematyczna cyklu publikacji wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej wynika z przeprowadzenia kompleksowych analiz, dzięki którym podjęto się próby dokładnego wyjaśnienia oddziaływania wybranej substancji prebiotycznej na funkcjonowanie organizmu karpia.

3.1. HIPOTEZA BADAWCZA, CEL I ZAKRES BADAŃ

Główna hipoteza sformułowana w niniejszej rozprawie doktorskiej brzmi następująco: „Dodatek do paszy prebiotyku w postaci trans-galaktooligosacharydu wpływa na stan fizjologiczny oraz na wartość odżywczą i mikrostrukturę mięsa karpia (*Cyprinus carpio* L.)”.

Hipotezy szczegółowe:

Hipoteza 1 Dodatek do paszy trans-galaktooligosacharydu wpływa pozytywnie na parametry wzrostu, wskaźniki biochemiczne krwi oraz na parametry morfometryczne jelit karpia.

Hipoteza 2 Dodatek do paszy trans-galaktooligosacharydu wpływa pozytywnie na stopień wchłaniania wybranych składników mineralnych oraz na równowagę mineralną w organizmie poprzez regulację kumulacji składników mineralnych w mięsie, skrzelach i szkielecie karpia.

Hipoteza 3 Dodatek do paszy trans-galaktooligosacharydu wpływa korzystnie na poziom cholesterolu, tłuszczu i profil kwasów tłuszczowych, w tym kwasów wielonienasyconych oraz na mikrostrukturę mięśni karpia.

Celem ogólnym sformułowanym w rozprawie doktorskiej była analiza wpływu prebiotyku GOS na wzrost, rozwój i status fizjologiczny karpia.

Cele szczegółowe:

Cel 1 Analiza wpływu dodatku do paszy trans-galaktooligosacharydu na parametry wzrostu i wskaźniki wykorzystania paszy, parametry biochemiczne krwi oraz na parametry morfometryczne jelit karpia.

Cel 2 Analiza wpływu dodatku do paszy trans-galaktooligosacharydu na równowagę mineralną w organizmie poprzez oznaczenie zawartości wybranych składników mineralnych oraz analizę ich wzajemnych korelacji w mięsie, skrzelach i szkielecie karpia.

Cel 3 Analiza wpływu dodatku do paszy trans-galaktooligosacharydu na poziom cholesterolu, tłuszczu oraz na profil kwasów tłuszczowych w mięsie oraz na mikrostrukturę mięśni karpia.

3.2. MATERIAŁY I METODY BADAŃ

3.2.1 Układ doświadczalny i plan badań

Badania składały się z dwóch etapów. Eksperyment *in vivo* z udziałem karpia trwający 60 dni został przeprowadzony w należącym do Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu Zakładzie Doświadczalnym Technologii Produkcji Pasz i Akwakultury (ZDTPPiA) w Muchocinie. Prace laboratoryjne zostały przeprowadzone w Uniwersytecie Technologiczno-Przyrodniczym w Bydgoszczy obecnie Politechnice Bydgoskiej na Wydziale Hodowli i Biologii Zwierząt oraz w Katedrze Nauk Rolniczych, Środowiskowych i Żywności, w Uniwersytecie Molise we Włoszech.

W eksperymencie wzrostowym wykorzystano 300 jednorocznych karpia o średniej masie 180 g (**Publikacja 1, Publikacja 2, Publikacja 3**). Ryby w sposób losowy zostały podzielone na 12 grup i umieszczone w betonowych zbiornikach doświadczalnych o pojemności 40 m³ zasilanych wodą w systemie otwartym. W eksperymencie utworzono trzy grupy badawcze, w której każda grupa posiadała cztery powtórzenia (zbiorniki) po 25 osobników w każdym. Grupy badawcze stanowiły: grupa kontrolna (C), w której zastosowano paszę wytworzoną w ZDTPPiA w Muchocinie, bez dodatków o charakterze pre- lub probiotycznym oraz dwie grupy eksperymentalne (B1 i B2), w których ryby żywione były paszami z dodatkiem transgalaktooligosacharydu w ilości, odpowiednio: 1% (B1) oraz 2% (B2). Pasza była podawana w sposób zautomatyzowany oraz ciągły przez 12 godzin na dobę (8:00-20:00). Skład pasz oraz ich wartości pokarmowe podano w publikacjach (**Publikacja 1, Publikacja 2 i Publikacja 3**).

W dniu zakończenia doświadczenia *in vivo* pobrano próby materiału biologicznego, które poddano następującym analizom:

- oznaczenie poziomu wskaźników biochemicznych krwi; wykonanie analiz histologicznych jelita (**Publikacja 1**),
- oznaczenie poziomu składników mineralnych w mięsie, skrzelach oraz szkieletcie (**Publikacja 2**),
- oznaczenie poziomu cholesterolu całkowitego; oznaczenie poziomu tłuszczu oraz profilu kwasów tłuszczowych w mięsie; wykonanie analiz histologicznych tkanki mięśniowej (**Publikacja 3**).

3.2.2 Charakterystyka zastosowanego preparatu prebiotycznego

Preparatem prebiotycznym użytym w eksperymencie był trans-galaktooligosacharyd GOS (nazwa handlowa: Bi²tos, Clasado Biosciences Ltd., Jersey, UK). Jest to substancja otrzymywana na drodze enzymatycznej transgalaktozylacji laktozy mlecznej, przez całe komórki *Bifidobacterium bifidum* 41171 i jest mieszaniną następujących oligosacharydów: 45% laktozy, 9.9% disacharydów (Gal—(1-3)—Glc; Gal—(1-3)—Gal; Gal—(1-6)—Gal; Gal—(1-6)—Gal), 23.1% trisacharydów (Gal—(1-6)—Gal—(1-4)—Glc; Gal—(1-3)—Gal—(1-4)—Glc), 11.55% tetrasacharydów (Gal—(1-6)—Gal—(1-6)—Gal—(1-4)—Glc), and 10.45% pentasacharydów (Gal—(1-6)—Gal—(1-6)—Gal—(1-6)—Gal—(1-4)—Glc). Badania Tzortzis i in. (2005) potwierdziły, że omawiany preparat prebiotyczny w sposób specyficzny promuje wzrost *Bifidobacterium* spp.

3.2.3 Analiza parametrów wzrostu

W czasie trwania 60-dniowego eksperymentu wszystkie ryby były ważone w odstępach 10 dniowych. Pomiarów te wykonywano w celu ustalenia dziennej dawki pasz dla poszczególnych zbiorników doświadczalnych oraz kontroli przyrostów masy ciała ryb. Na tej podstawie obliczono następujące wskaźniki: przyrost masy ciała (BWG), procentowy przyrost masy ciała

(PWG), względne dobowe tempo wzrostu (SGR), pobranie paszy (FI), współczynnik pokarmowy paszy (FCR) oraz współczynnik wydajności wzrostowej białka pasz (PER).

BWG (g) = końcowa masa ciała (g) – początkowa masa ciała (g)

PWG (%) = $(\text{końcowa masa ciała (g)} - \text{początkowa masa ciała (g)}) / \text{początkowa masa ciała (g)} \times 100$

SGR (%/dzień) = $(\text{Ln końcowa masa ciała} - \text{Ln początkowa masa ciała}) / \text{liczba dni karmienia} \times 100$

FI (g) = ilość paszy (g) – ilość paszy niezjedzonej (g)

FCR = całkowita ilość zjedzonej paszy (g) / całkowita masa ciała (g)

PER = $(\text{przyrost masy ciała (g)} / (\text{pobranie paszy (g)} \times \text{ilość białka w diecie (\%)}))$

3.2.4 Ubój ryb oraz pobór materiału biologicznego

Ryby poddano dekapitacji po wykonaniu znieczulenia z użyciem metanosulfonianu trikainy (500 mg/L, MS-222, Sigma Aldrich). Uśmierceni zostały poddane cztery ryby z każdego zbiornika, czyli łącznie 16 ryb na grupę (n=16). Następnie pobrano mięsień prosty grzbietowy (*Musculus rectus dorsalis*), proksymalny odcinek jelita, łuki skrzelowe oraz szkielet (kręgosłup z żebrami) w celu wykonania analiz chemicznych i histologicznych. Krew, którą pobrano *post mortem* z żyły ogonowej, poddano wirowaniu (10 min, 3000 obr./min) w celu pozyskania surowicy.

3.2.5 Oznaczenie wartości wskaźników biochemicznych krwi

Pozyskane próby surowicy krwi zostały poddane analizie pod kątem wskaźników biochemicznych za pomocą analizatora biochemicznego MINDRAY BS-120, przy użyciu odczynników referencyjnych firmy Stamar® (Dąbrowa Górnicza, Polska). Poziom insuliny ($\mu\text{U/mL}$) oraz trójiodotyroniny (TT3) (nmol/L) został oznaczony metodą radioimmunologiczną, przy użyciu zestawów Ria-CT i INS-IRMA RIA (DIASource Immunoassays S.A, Belgium) oraz automatycznego podajnika próbek NZ-322 z licznikiem gamma dla izotopu ^{125}I (Gamma Művek, Hungary) (**Publikacja 1**).

3.2.6 Oznaczenie poziomu cholesterolu całkowitego

Cholesterol całkowity (TCH) oznaczono przy pomocy systemu HPLC (Kontron Instruments, Milan, Italy), z kolumną z odwróconym układem faz (Phenomenex, Torrance, CA) oraz fazą ruchomą w układzie acetonitryl:2-propanol (55:45, vol/vol; przepływ 1.0 mL/min) na podstawie wstępnej ekstrakcji metodą Maraschiello i in. (1996). Oznaczenie ilościowe zawartości cholesterolu oparto na metodzie wzorca zewnętrznego (Sigma, St. Louis, MO) (**Publikacja 3**).

3.2.7 Oznaczenie poziomu tłuszczu oraz profilu kwasów tłuszczowych

Tłuszcz całkowity (TL) wyekstrahowano zgodnie z procedurą Folcha i in. (1957). Procentowy udział kwasów tłuszczowych (FA) oznaczono przy pomocy chromatografu gazowego GC Trace 2000 (ThermoQuest EC Instruments) wyposażonego w detektor płomieniowo-jonizacyjny (260°C) i kolumnę kapilarną z topionej krzemionki (Zebron ZB-88, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Na podstawie uzyskanego profilu KT obliczono stosunek kwasów tłuszczowych n-6 do n-3 oraz stosunek wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) do nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA). Ponadto obliczono wskaźnik aterogeny

(miażdżycowy) (AI) oraz wskaźnik trombogenny (zawałowy) (TI) zgodnie ze wzorami opracowanymi przez Ulbricht i Southgate (1991) (**Publikacja 3**).

3.2.8 Oznaczenie poziomu składników mineralnych

Stężenie składników mineralnych oznaczono we wstępnie zliofilizowanych próbach mięsa, skrzeli oraz szkieletu (**Publikacja 2**). Analizy większości pierwiastków wykonano za pomocą atomowej spektroskopii absorpcyjnej (ASA) ze spektrofotometrem SOLAR S4. Zawartość fosforu analizowano za pomocą metody kolometrycznej (ISO 13730:1996) przy użyciu spektrofotometru Lambda 25 (Perkin-Elmer) przy długości fali 430 nm. Do wykonania analiz wykorzystano certyfikowane roztwory wzorcowe (Merck) oraz certyfikowane materiały referencyjne Fish Muscle ERM®-BB422 i Aquatic Plant BCR®-670 (European Reference Materials®) (**Publikacja 2**).

3.2.9 Analizy histologiczne

Bezpośrednio po eutanazji zostały pobrane próby jelita oraz mięśni, które posłużyły do wykonania analiz histologicznych.

Do wykonania analiz jelit wykorzystano proksymalny odcinek jelita karpia (**Publikacja 1**). Próbki jelita po uboju zostały utrwalone w 4% formalinie zbuforowanej CaCO₃. Za pomocą procesora tkankowego (Thermo Shandon, Runcorn, Wielka Brytania) próbki zostały utrwalone, odwodnione, prześwietlone i przepojone parafiną, a następnie zatopienie w bloczki parafinowe w stacji do zatapiania (Medite, Burgdorf, Niemcy). Tak przygotowane bloczki zostały pocięte na skrawki o grubości 10 µm na mikrotomie rotacyjnym (Thermo Shandon, Runcorn, Wielka Brytania), następnie umieszczone na szkiełkach podstawowych. Materiał biologiczny został odparafinowany, a następnie poddany barwieniu PAS z odczynnikiem Schiffa w celu dokonania pomiarów wysokości i szerokości kosmków jelitowych, głębokości krypt jelitowych oraz grubości mięśniówki. Dla wykonania pomiarów wysokości kosmków jelitowych wybrano losowo z przekroju poprzecznego 10 kosmków. Długość mierzono od szczytu kosmka do jego podstawy w miejscu ujścia krypty jelitowej. Szerokość kosmka mierzono w połowie jego długości. Następnie obliczono powierzchnię kosmków według wzoru podanego przez Sakamoto i in. (2000):

Pole powierzchni kosmka jelitowego = $(2\pi) \times (\text{szerokość kosmka} / 2) \times (\text{wysokość kosmka})$

Głębokość krypt jelitowych zdefiniowana została jako głębokość inwaginacji pomiędzy sąsiadującymi kosmkami jelitowymi i jako taka była mierzona między 10 kosmkami (Uni i in. 1998). Na podstawie wysokości kosmków jelitowych oraz głębokości krypt obliczono stosunek omawianych parametrów (VH/CD) (**Publikacja 1**).

Do wykonania analiz histologicznych zostały pobrane próby mięśnia prostego grzbietowego (*Musculus rectus dorsalis*) (**Publikacja 3**). Pobrany materiał został zamrożony w ciekłym azocie w temperaturze -196°C, a następnie ścięty w kriostacie (Thermo Shandon/Thermo Fisher Scientific, Wielka Brytania) na 10 µm skrawki. Ścinki umieszczono na szkiełku podstawowym i poddano następującym metodom barwienia: hematoksyliną oraz eozyną (HE) w celu pomiaru średnic włókien mięśniowych, gęstości włókien mięśniowych (która została obliczona na podstawie średniej liczby włókien mięśniowych przypadających na określoną jednostkę powierzchni) oraz oceny rozległości występowania zmian histopatologicznych. Analizowane zmiany histopatologiczne dotyczyły: włókien olbrzymich, występowania martwicy włókien z fagocytozą, atrofii włókien oraz rozszczepu włókien

(splittingu). Ponadto na podstawie wykonanego barwienia HE, dokonano również subiektywnej oceny przerostu tkanki łącznej: 0-brak zmian; +-przerost tkanki łącznej. Wykonano również barwienie na aktywność reduktazy tetrazolinowej (NADH-TR) w celu określenia typów włókien mięśniowych występujących w analizowanym mięśni. Wykonano również barwienie czerwienią oleistą (Red-oil) w celu określenia rozmieszczenia tłuszczu śródmięśniowego (**Publikacja 3**).

Rejestrację obrazu mikroskopowego wykonano za pomocą mikroskopu NIKON Ci-L wyposażonego w kamerę NIKON DS-Fi3 oraz oprogramowanie NIS ELEMENTS, który posłużył zarówno do wykonania pomiarów (**Publikacja 1, Publikacja 3**) jak i analiz zakresu zmian histopatologicznych (**Publikacja 3**).

3.2.10 Analiza statystyczna

Obliczenia statystyczne zostały wykonane za pomocą programu Statistica 13.1 software (Dell, Round Rock, TX, USA, 2018) (**Publikacja 1, Publikacja 2 oraz Publikacja 3**). Rozkład normalny potwierdzono testem Shapiro-Wilka, a jednorodność wariancji testem Levene'a. Różnice istotne statystycznie (przy $P \leq 0,05$) pomiędzy grupami zostały zweryfikowane za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), a następnie testami post-hoc Tuckeya (**Publikacja 1, Publikacja 2**) oraz Duncana (**Publikacja 3**). Parametry wzrostu obliczono dla każdego powtórzenia ($n=4$). Analizy biochemiczne, chemiczne i histologiczne wykonano dla 16 ryb z każdej grupy doświadczalnej ($n=16$) (**Publikacja 1, Publikacja 2 oraz Publikacja 3**). Interakcje pomiędzy składnikami mineralnymi oznaczonymi w poszczególnych tkankach (**Publikacja 2**) oszacowano na podstawie analizy współczynnika korelacji Pearsona.

3.3. WYNIKI

3.3.1 Wpływ suplementacji trans-galaktooligosacharydem na parametry wzrostu

Trans-galaktooligosacharyd podawany w paszy przez 60 dni w dawkach 1% i 2%, nie wpłynął istotnie na parametry wzrostu karpia (**Publikacja 1**). Przeanalizowane parametry, tj. przyrost masy ciała (BWG), procentowy przyrost masy ciała (PWG), względne dobowe tempo wzrostu (SGR), pobranie paszy (FI), współczynnik pokarmowy paszy (FCR) oraz współczynnik wydajności wzrostowej białka (PER) nie różniły się istotnie pomiędzy grupami eksperymentalnymi.

3.3.2 Wpływ suplementacji trans-galaktooligosacharydem na poziom wskaźników biochemicznych krwi

Wykazano istotnie wyższy poziom fosforu ($P < 0,05$) w surowicy krwi ryb karmionych paszą z 1% dodatkiem trans-galaktooligosacharydu (grupa badawcza B1) (13,62 mg/dl) w porównaniu do grupy badawczej B2 (11,81 mg/dl), czyli grupy ryb karmionych paszą z 2% dodatkiem trans-galaktooligosacharydu. Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie w zawartości tego składnika mineralnego w grupach B1 i B2 w odniesieniu do grupy kontrolnej (C) (**Publikacja 1**). Nie stwierdzono istotnych różnic ($P > 0,05$) w poziomie wskaźników dla profilu białkowego (TP, albumina, globulina i mocznik) i tłuszczowego (cholesterol całkowity, trójglicerydy oraz NEFA) pomiędzy eksperymentalnymi grupami. Ponadto, nie stwierdzono istotnego wpływu dodatku do paszy trans-galaktooligosacharydu na aktywność ALT i ALP oraz na poziom glukozy, trójjodotyroniny, insuliny i wapnia.

3.3.3 Wpływ suplementacji trans-galaktooligosacharydem na zawartość cholesterolu całkowitego

Wykazano brak istotnego wpływu suplementacji diety prebiotykiem GOS, dodanego do paszy zarówno w ilości 1% jak i 2% dodatku, na poziom cholesterolu całkowitego (TCH) w mięsie karpia (**Publikacja 3**).

3.3.4 Wpływ suplementacji trans-galaktooligosacharydem na zawartość tłuszczu i profil kwasów tłuszczowych

Stwierdzono statystycznie istotnie wyższą zawartość tłuszczu całkowitego (TL) ($P < 0,05$) w mięsie ryb z grupy B1 (3,21 g/100g), w porównaniu z grupą B2 (2,23 g/100g). Natomiast nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie w zawartości tłuszczu w grupach B1 i B2 odniesieniu do grupy kontrolnej (C) (**Publikacja 3**).

Analiza profilu kwasów tłuszczowych potwierdziła brak istotnego wpływu suplementacji trans-galaktooligosacharydem, zarówno w ilości 1% jak i 2% dodatku, na zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA), jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) oraz wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) (**Publikacja 3**). Nie stwierdzono również istotnych różnic w stosunkach PUFA/SFA, n-3/n-6 oraz n-6/n-3 pomiędzy analizowanymi grupami. Badania potwierdziły, że dodatek do paszy trans-galaktooligosacharydu w ilości 1% i 2% wpłynął istotnie na obniżenie udziału procentowego kwasu mirystynowego (C14:0) oraz kwasu linolowego (C18:2 n-6). 1% dodatek do paszy GOS wpłynął istotnie na poziom kwasu oleopalmitynowego (C16:1 n-7) oraz kwasów tłuszczowych z szeregu n-6, zaś 2% dodatek do paszy GOS spowodował istotny wzrost udziału procentowego kwasu stearynowego (C18:0) oraz kwasu arachidonowego (C20:4 n-6). Nie potwierdzono istotnego wpływu dodatku do paszy GOS na poziom wskaźników AI oraz TI.

3.3.5 Wpływ suplementacji trans-galaktooligosacharydem na poziom składników mineralnych oraz ich wzajemne korelacje

Stwierdzono brak istotnych różnic w zawartości Ca i P ($P > 0,05$) u ryb karmionych paszą z 1% i 2% dodatkiem GOS w porównaniu z grupą kontrolną w obrębie każdej badanej tkanki (mięsa, skrzelu oraz szkieletu) (**Publikacja 2**). Najwyższy poziom Mg wykryto w szkielecie ryb karmionych paszą z 1% dodatkiem GOS ($2,51 \text{ g kg}^{-1}$) i był istotnie wyższy w porównaniu z grupą kontrolną ($2,11 \text{ g kg}^{-1}$), ale wynik ten był zbliżony do wartości oznaczonej dla ryb karmionych paszą z 2% dodatkiem GOS ($2,34 \text{ g kg}^{-1}$). Analizy potwierdziły również, że wzbogacanie paszy GOS istotnie wpłynęło na obniżenie stężenia Zn w szkielecie oraz na wzrost stężenia tego metalu w mięsie. Dodatek do paszy GOS wykazał statystycznie istotne różnice w poziomie Fe pomiędzy grupami doświadczalnymi w obrębie wszystkich tkanek. Najwyższe stężenie tego metalu oznaczono w grupie B2 zarówno w mięsie ($209,32 \text{ mg/kg}$), szkielecie ($447,89 \text{ mg/kg}$) oraz w skrzelach ($586,52 \text{ mg/kg}$).

2% dodatek GOS do paszy wpłynął istotnie na dodatnie korelacje między Fe-Ca ($r = 0,997867$; $P < 0,05$) w skrzelach i między Fe-Zn ($r = 0,997237$; $P < 0,05$) w szkielecie. Również dodatnie współczynniki korelacji między Mg-P w mięsie ($r = 0,999855$; $P < 0,05$) oraz w szkielecie ($r = 0,995238$; $P < 0,05$) obliczono w grupie B2.

3.3.6 Wpływ suplementacji trans-galaktooligosacharydem na parametry histologiczne

Analizy statystyczne wykazały istotny wpływ trans-galaktooligosacharydu zarówno na wysokość jak i szerokość kosmków jelitowych (**Publikacja 1**). Zarówno w przypadku wysokości kosmków jelitowych jak i szerokości kosmków jelitowych stwierdzono istotny wpływ dodawanego prebiotyku w grupach badawczych w odniesieniu do grupy kontrolnej. W przypadku wysokości kosmków jelitowych, najkorzystniejszy okazał się dodatek prebiotyku w ilości 1% (B1- 1040,98 μm). Natomiast w przypadku szerokości kosmków, najwyższe wartości uzyskano w grupie badawczej z dodatkiem prebiotyku w ilości 2% (B2 – 150,05 μm). Dodatek prebiotyku zarówno w ilości 1% oraz 2% w sposób istotny wpłynął również na zwiększenie pola powierzchni chłonnej jelit względem grupy kontrolnej. Największe pole powierzchni chłonnej stwierdzono w grupie badawczej B1 (471050,33 μm^2). Nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych między badanymi grupami w przypadku głębokości krypt jelitowych. Otrzymane wyniki stosunku wysokości kosmków jelitowych do głębokości krypt, pozwoliły stwierdzić istotnie statystycznie ($P < 0,05$) zwiększenie stosunku wysokości kosmków jelitowych do głębokości krypt, pomiędzy grupami badawczymi, a grupą kontrolną. Różnice istotne statystycznie wykazano również dla grubości warstwy mięśniowej pomiędzy grupą badawczą B2, a grupą kontrolną.

Odpowiednie trawienie i wchłanianie substancji odżywczych wpływa na wzrost i rozwój włókien mięśniowych. Mięsień prosty grzbietowy karpia charakteryzował się 100% występowaniem włókien mięśniowych o metabolizmie glikolitycznym (włókna białe αW) (**Publikacja 3**). Analizy włókien mięśniowych wykazały brak różnic w średnicy i gęstości włókien, natomiast zaobserwowano zwiększenie procentowego udziału włókien prawidłowych. Wartości istotne statystycznie odnotowano dla grupy badawczej z dodatkiem 2% GOS (B2 – 96,31%), w odniesieniu do grupy kontrolnej (C – 93,81%). Było to związane ze zmniejszeniem, w sposób istotny statystycznie, ilości zmian atroficznych z 3,23% (C) do 1,58% (B2). Tendencję spadkową w odniesieniu do grup badawczych zauważono również w przypadku rozszczepienia włókien (splittingu), jednakże wartości te nie były istotne statystycznie. Ponadto wraz ze wzrostem stężenia dodawanego prebiotyku, dochodziło do zmniejszenia przerostu tkanki łącznej. W celu identyfikacji rozmieszczenia tłuszczu śródmięśniowego, wykonano barwienie czerwienią oleistą, na podstawie którego wykazano rozmieszczenie tłuszczu śródmięśniowego wokół włókien mięśniowych. W **Publikacji 3** dokonano również przydziału średnic włókien mięśniowych do poszczególnych klas. Różnice nie były istotne statystycznie, jednakże najwięcej włókien mięśniowych białych we wszystkich grupach odnotowano w przedziale 41-50 μm , natomiast najniższy odsetek stanowiły włókna mięśniowe w klasie $< 20 \mu\text{m}$.

3.4. DYSKUSJA

Analiza danych dotyczących parametrów wzrostu, wartości wskaźników biochemicznych krwi, parametrów histologicznych jelita i mikrostruktury mięśni oraz składu chemicznego mięsa w zakresie profilu tłuszczowego czy mineralnego, pozwala w dużym stopniu ocenić wpływ wybranego dodatku paszowego na funkcjonowanie i rozwój całego organizmu. W literaturze naukowej opublikowano dotychczas liczne, niekiedy rozbieżne dane w zakresie mechanizmu działania i skali oddziaływania szeregu preparatów prebiotycznych na status nutrifizjologiczny, zdrowotny i kondycję odżywienia zwierząt. Trans-galaktooligosacharyd użyty w niniejszym eksperymencie został przeanalizowany na tej samej grupie badawczej również przez Pietrzak i in. (2020) pod kątem immunomodulującego wpływu na błonę śluzową skóry karpia. Autorzy potwierdzili właściwości przeciwwirusowe i antybakteryjne analizowanej substancji bioaktywnej. Niniejsza dysertacja dotyczy analizy wyników uzyskanych na podstawie eksperymentu żywieniowego z użyciem trans-galaktooligosacharydu, przeprowadzonego na karpkach. Wyniki uzyskane z kolejno przeprowadzonych etapów badań zawarto w trzech publikacjach naukowych. W **publikacji 1** przeanalizowano wpływ dodatku trans-galaktooligosacharydu na wskaźniki biochemiczne krwi oraz na parametry histologiczne jelit. W **publikacji 2** określono wpływ dodatku trans-galaktooligosacharydu na poziom składników mineralnych w wybranych tkankach karpia. Natomiast **publikacja 3** dotyczyła wpływu dodatku trans-galaktooligosacharydu na poziom cholesterolu i tłuszczu całkowitego, na profil kwasów tłuszczowych oraz na parametry histologiczne mięśni karpia.

3.4.1 Wpływ dodatku trans-galaktooligosacharydu na wyniki odchowu oraz wskaźniki biochemiczne krwi

Analiza parametrów wzrostu wykazała brak istotnego wpływu dodatku trans-galaktooligosacharydu, zarówno w ilości 1% jak i 2%, na przyrost masy ciała (BWG), procentowy przyrost masy ciała (PWG), względne dzienne tempo wzrostu (SGR%), pobranie paszy (FI), współczynnik pokarmowy paszy (FCR) oraz współczynnik wydajności wzrostowej białka (PER) (**Publikacja 1**). Potwierdziły to również badania Akrami i in. (2010), Gultepe i in. (2012) oraz Talpur i in. (2014), ponieważ na wartość tych parametrów ma wpływ szereg czynników biologicznych i środowiskowych, do których można zaliczyć gatunek i wiek zwierzęcia, temperaturę, odczyn, natlenienie oraz zasolenie wody (Dawood i Kashio 2016). Jak podaje Amani Denji i in. (2015), brak wpływu prebiotyków na wydajność wzrostu karpia można przypisać niezdolności mikrobioty jelitowej do fermentacji nadmiernych ilości prebiotyków. Ponadto, w przypadku zwierząt, dla których warunki chowu i skład paszy są optymalne, dodatek prebiotyku może nie mieć wpływu na wydajność wzrostu, co wskazuje na wykorzystanie pełnego potencjału genetycznego.

O stanie zdrowia oraz o prawidłowym funkcjonowaniu organizmu informują wartości parametrów biochemicznych krwi. Wyniki eksperymentu potwierdziły brak istotnych różnic w poziomie wskaźników białkowych, tłuszczowych, enzymów wątrobowych (ALT, ALP) oraz glukozy i trójjodotyroniny (czyli wskaźników stresu) pomiędzy grupami eksperymentalnymi, a kontrolną (**Publikacja 1**). Może to świadczyć o zachowaniu homeostazy w odpowiedzi na zadany czynnik żywieniowy. Stres wywołuje wzrost poziomu katecholamin (adrenaliny i glukagonu), które stymulują glikogenolizę, prowadząc do wzrostu poziomu glukozy we krwi. Ebrahimi i in. (2012) i Andrews i in. (2009) zaobserwowali znacząco wyższy poziom TP i albuminy w surowicy ryb z rodziny *Cyprinidae* otrzymujących paszę z dodatkiem MOS (mannooligosacharydów) w porównaniu z grupą kontrolną. Zwiększona konwersja białek z paszy dzięki proteolitycznemu działaniu prebiotyków może wynikać z lepszego przylegania prebiotyków do błony śluzowej jelit i inaktywacji patogenów. Zaś zwiększenie aktywności

enzymatycznej bakterii przez mikrobiotę jelitową może wpływać korzystnie na przepuszczalność śluzówki jelita i regulację układu odpornościowego (Chang i in. 2003).

Istotnie wyższe wartości fosforu w surowicy krwi ryb z grupy B1 w porównaniu z osobnikami z grupy B2 wskazują, że włączenie do diety 1% dodatku trans-galaktooligosacharydu spowodowało lepsze wchłanianie tego pierwiastka z jelita (**Publikacja 1**), jednakże brak różnic w zawartości fosforu pomiędzy grupami B1 i B2 a grupą kontrolną powoduje, że hipoteza ta wymaga dalszych badań. Badania przeprowadzone na świniach potwierdziły korzystny wpływ fosforu na układ odpornościowy oraz mikrobiotę jelitową (Heyer i in. 2015). Pietrzak i in. (2020) przeprowadzając doświadczenia na tej samej grupie ryb potwierdzili, że suplementacja trans-galaktooligosacharydem wywierała immunomodulujący wpływ na błonę śluzową skóry karpia, co przejawiało się zwiększoną ekspresją genów zaangażowanych w produkcję cytokin, lizozymu i białek ostrej fazy.

Na skutek braku istotnego wpływu GOS na parametry wzrostu oraz wskaźniki biochemiczne krwi, postanowiono przeprowadzić dalsze analizy związane z poziomem cholesterolu i tłuszczu całkowitego oraz profilem kwasów tłuszczowych, czyli parametrów decydujących o wartości odżywczej mięsa.

3.4.2 Wpływ dodatku trans-galaktooligosacharydu na poziom cholesterolu i tłuszczu całkowitego oraz na profil kwasów tłuszczowych

Istotnymi parametrami wpływającymi na jakość mięsa ryb jest poziom tłuszczu i cholesterolu. Jak potwierdziły badania, trans-galaktooligosacharyd może obniżać stężenie TG w surowicy poprzez zwiększenie katabolizmu lipoprotein. Niniejsze właściwości GOS wynikają również ze zdolności hamowania aktywności enzymów lipogennych, tj. karboksylaza acetylo-CoA (ACC), syntaza kwasów tłuszczowych (FAS), enzym jabłczanowy (ME), liaza cytrynianowa ATP (ACLY) i dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PD) (Guerreiro i in. 2017a; Ulbricht i Southgate 1991; Delzenne i Kok 2001; Delzenne i in. 2002; Wang i in. 2016). Nasze badania potwierdziły, że suplementacja GOS nie wpłynęła istotnie na poziom lipidów całkowitych (TL) ($P > 0,05$) w mięsie analizowanych karpia (**Publikacja 3**), co mogło wynikać z adaptacji mikrobioty jelitowej ryb do zastosowanego czynnika eksperymentalnego (Guerreiro i in. 2017b). Drugą z hipotez jest założenie, że GOS jako prebiotyk o niskim stopniu polimeryzacji (PD) w dawce 1% i 2% był zbyt słaby w stosunku do enzymów odpowiedzialnych za metabolizm lipidów. Analiza właściwości hipolipidemicznych krótkołańcuchowych prebiotyków takich jak FOS zastosowanych u ludzi potwierdziła, że propionian (produkt fermentacji) hamował syntezę cholesterolu poprzez hamowanie zarówno syntazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA (HMG-CoA), jak i reduktazy HMG-CoA (Bornet i in. 2002). Suplementacja GOS nie wpłynęła istotnie na poziom cholesterolu całkowitego w mięsie badanych karpia ($P > 0,05$) (**Publikacja 3**).

Kolejnym etapem doświadczenia, bardzo ważnym z punktu widzenia konsumenta, była analiza wpływu trans-galaktooligosacharydu na profil kwasów tłuszczowych w mięsie karpia (**Publikacja 3**). Badania potwierdziły, że suplementacja GOS istotnie wpłynęła na poziom kwasu mirystynowego (C14:0), oleopalmitynowego (C16:1 n-7), stearynowego (C18:0), linolowego (C18:2 n-6), arachidonowego (C20:4 n-6) ($P < 0,05$). Poziom kwasu mirystynowego był niższy w grupie B1 i B2 w porównaniu z kontrolą, zaś udział procentowy kwasu stearynowego był wyższy w grupie B2 w porównaniu z grupami B1 i C. Kwas mirystynowy powoduje znaczny wzrost zawartości cholesterolu całkowitego i LDL w surowicy, dlatego uzyskany wynik wydaje się być korzystnym efektem suplementacji GOS. Kwas stearynowy, w przeciwieństwie do innych nasyconych kwasów tłuszczowych (takich jak laurynowy, mirystynowy i palmitynowy), nie podnosi poziomu cholesterolu w surowicy, a tym samym nie zwiększa ryzyka choroby wieńcowej. Dzieje się tak, ponieważ kwas stearynowy przekształcany

jest w jednonienasycony kwas oleinowy (C18:1 n-9). Badania na szczurach karmionych mieszanką inuliny i oligofruktozy wykazały, że substancje te powodują zmniejszenie przyrostu masy ciała i tłuszczu trzewnego, co może mieć znaczenie w regulacji metabolizmu kwasów tłuszczowych w wątrobie. Skutecznym inhibitorem syntezy kwasów tłuszczowych *de novo* jest propionian, produkt metabolizmu prebiotyków (Sun i in. 2017; Demigné i in. 1995).

Mięso ryb jest bogatym źródłem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, np.: kwasu eikozapentaenowego (EPA) oraz kwasu dokozaheksaenowego (DHA) należących do grupy kwasów omega 3. Odgrywają one istotną rolę w budowie oraz funkcjonowaniu błon biologicznych, m.in. w ośrodkowym układzie nerwowym, jednakże poziomy tych kwasów różnią się w zależności od gatunku ryby (Neuringer i in. 1986; Steffens i Wirth 2007). Preparaty prebiotyczne powodują zmianę w składzie flory jelitowej oraz wpływają na jej wzrost i aktywność metaboliczną. Może to zwiększyć poziom długołańcuchowych PUFA, ponieważ bakterie posiadają enzymy odpowiedzialne za elongację i desaturację kwasów tłuszczowych (Macfarlane i in. 2006). W naszych badaniach potwierdziliśmy istotnie wyższą zawartość kwasu arachidonowego (C20:4 n-6) w grupie B2 w porównaniu z grupami B1 i C. Jest to potwierdzeniem zwiększenia aktywności desaturazy i elongazy w tej grupie ryb. Kindt i in. (2018) potwierdzili, że mikrobiota jelitowa wspomagała proces desaturacji i elongacji wątrobowych kwasów tłuszczowych u myszy (desaturacja Δ -9 palmitynianu [C16:0] do palmitoleinianu [C16:1 n-7] i wydłużenie α -linolenianu [C18:3 n-6] do kwasu dihomo- γ -linolenowego [DGLA, C20:3 n-6]).

3.4.3 Wpływ dodatku trans-galaktooligosacharydu na zawartość składników mineralnych w wybranych tkankach karpia pospolitego

Ryby są jednym z najcenniejszych źródeł składników mineralnych w diecie człowieka i zwierząt. Niedobory poszczególnych pierwiastków w organizmie mogą przyczynić się do powstania m.in. nadciśnienia, demineralizacji kości, zahamowania wzrostu lub do zaburzeń funkcjonowania systemu nerwowego. Związki mineralne kumulują się w różnych tkankach w odmiennych ilościach, a wpływa na to wiele czynników endo- i egzogennych. Ponieważ niedobory składników mineralnych prowadzące do deformacji ciała ryb są dużym problemem hodowców ryb, podjęto się analizy wpływu prebiotyku na zawartość makroelementów (Ca, P i Mg) oraz mikroelementów (Fe i Zn) w mięsie, skrzelach i szkielecie karpia (**Publikacja 2**).

Badania wykazały, że suplementacja paszy trans-galaktooligosacharydem wpłynęła istotnie na poziom Mg w szkielecie, Zn w mięsie i szkielecie oraz Fe we wszystkich analizowanych tkankach ($P < 0,05$). W grupie ryb żywionych 2% dodatkiem trans-galaktooligosacharydu (grupa B2) oznaczono istotnie najwyższe poziomy Fe w szkielecie, skrzelach i mięsie w porównaniu z grupą kontrolną i grupą B1. Jednakże nie potwierdzono tej tendencji w przypadku pozostałych składników mineralnych. Jak potwierdził Guerreiro i in. (2017a), możliwe jest, że bakterie jelitowe zaadaptowały się do czynnika modyfikującego dietę. Badania Biggs i in. (2007) wykazały, że zbyt wysoka dawka prebiotyku może mieć negatywny wpływ na układ pokarmowy i opóźnić wzrost zwierząt. Przyczyną może być niezdolność bakterii jelitowych do fermentacji dużej ilości prebiotyku dostarczanego w diecie. W grupie ryb żywionych 1% dodatkiem trans-galaktooligosacharydu (grupa B1) oznaczono istotnie najwyższe poziomy Mg i Fe w szkielecie oraz Zn w mięsie w porównaniu z grupą kontrolną. Cynk jest mikroelementem odgrywającym istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu układu odpornościowego. Badania Pietrzak i in. (2020) przeprowadzone na tej samej grupie zwierząt, potwierdziły pozytywny wpływ trans-galaktooligosacharydu na układ immunologiczny. Analizy wykazały, że poziom Zn w mięsie karpia był istotnie wyższy w grupie B1 i B2 w porównaniu z kontrolą. Potwierdza to hipotezę, że bakterie jelitowe są odpowiedzialne za syntezę niektórych witamin (np.: B6) wspomagających wchłanianie składników mineralnych.

Ponadto, zwiększona przyswajalność składników mineralnych może wynikać ze wzmożonej produkcji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych tj.: proponian, maślan i octan, obniżenia wartości pH w świetle jelit, jak również z pozytywnego wpływu prebiotyku na parametry morfometryczne jelita (**Publikacja 1**). Z kolei brak wpływu prebiotyku na wchłanianie składników mineralnych z jelita może być spowodowany zbyt krótkim czasem trwania eksperymentu (Cashman 2003) lub niewłaściwą dawką substancji bioaktywnej, ale hipotezy te wymagają dalszych badań.

3.4.4 Wpływ dodatku trans-galaktooligosacharydu na parametry histologiczne jelit oraz mikrostrukturę mięśni karpia pospolitego

Analiza morfometryczna jelita dostarcza informacji, na temat wpływu wybranych dodatków paszowych na funkcjonowanie i rozwój nabłonka jelitowego, a w konsekwencji na zdolność do wchłaniania substancji odżywczych. Analizy histologiczne jelit karpia suplementowanych trans-galaktooligosacharydem wykazały istotny statystycznie wpływ prebiotyku zarówno na wysokość jak i szerokość kosmków jelitowych, a w konsekwencji na zwiększenie pola powierzchni chłonnej jelit (**Publikacja 1**). Różnice istotne statystycznie wystąpiły pomiędzy grupami badawczymi, a grupą kontrolną, jednakże nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami eksperymentalnymi. Pozytywny wpływ prebiotyków tj. MOS, FOS czy GOS, na parametry morfometryczne jelit ryb, został już wielokrotnie zbadany i potwierdzony przez naukowców (Yuji-Sado i in. 2015; Zhou i in. 2010; Anguiano i in. 2013). Ponadto zwiększenie pola powierzchni chłonnej jelit, wiąże się ze zwiększoną przyswajalnością składników odżywczych oraz mineralnych, co w konsekwencji wpływa na poprawę parametrów biochemicznych krwi, profilu kwasów tłuszczowych, składu mineralnego poszczególnych tkanek oraz może przyczynić się do zwiększenia przyrostu masy ciała (Pryor i in. 2003; Peterson i in. 2012). Niezwykle istotną zdolnością prebiotyków jest ich wpływ na układ odpornościowy organizmu. Poprawa parametrów morfometrycznych jelit, świadczy o pozytywnym wpływie dodatku paszowego na nabłonek jelitowy, który natomiast tworzy barierę dla bakterii chorobotwórczych oraz zabezpiecza organizm przed wniknięciem substancji toksycznych (Dimitroglou i in. 2010). Natomiast o jakości nabłonka jelitowego świadczy stosunek głębokości krypt jelitowych do wysokości kosmków. Dokonując analizy otrzymanych wyników stwierdzono różnice istotne statystycznie dotyczące stosunku VH/CD, pomiędzy grupami badawczymi, a grupą kontrolną. Utrzymanie głębokości krypt na stałym poziomie przy równoczesnym wydłużeniu kosmków jelitowych świadczy o mniejszej utracie enterocytów z powierzchni kosmków jelitowych, a tym samym o mniejszym nakładzie energetycznym na dokonywanie podziałów mitotycznych (Adibmoradi i in. 2006; Adibmoradi i in. 2016; Yang i in. 2018). Różnice istotne statystycznie stwierdzono dla grubości warstwy mięśniowej w grupie B2 w stosunku do grupy kontrolnej (B2 - 65,82 μm ; C - 51,08 μm). Zwiększenie grubości warstwy mięśniowej wpływa na poprawę tempa przesuwania treści pokarmowych w jelitach, jednakże może w sposób negatywny wpłynąć na wchłanianie składników odżywczych (Alshamy i in. 2018).

Zwiększenie zdolności wchłaniania składników odżywczych oraz substancji mineralnych, może wpłynąć w sposób pozytywny na rozwój włókien mięśniowych. Mięśnie szkieletowe ryb charakteryzują się występowaniem głównie włókien mięśniowych glikolitycznych, co stwierdzono w **Publikacji 3**. Włókna mięśniowe ryb rosną zarówno w sposób hipertroficzny jak i hiperplastyczny, co przyczynia się do powstania charakterystycznego mozaikowatego wyglądu mięśnia. Konsekwencją tego jest występowanie różnych średnic włókien mięśniowych na analizowanym obszarze mikroskopowym. Przydział średnic włókien mięśniowych do poszczególnych klas został wykonany w **Publikacji 3**. Priester i in. (2011) wykazali, że wraz ze wzrostem wielkości ryb, dochodzi do zwiększenia średnicy włókien

mięśniowych. Analizy statystyczne wykonane w **Publikacji 3** nie wykazały istotnych różnic dotyczących średnicy włókien mięśniowych, można zatem przypuszczać, że jest to związane z równoczesnym występowaniem braku różnic dotyczących parametrów wzrostowych karpia. Natomiast analizy wykazały różnice istotne statystycznie dotyczące zmian histopatologicznych. Różnice obserwowane były w przypadku atrofii włókien mięśniowych. Dodatek trans-galaktooligosacharydu spowodował zmniejszenie w sposób istotny statystycznie występowania ilości włókien atroficznych w grupie B2 w porównaniu do grupy kontrolnej. Jak podaje literatura (Hugh i in. 1976), zmniejszenie ilości włókien atroficznych może być spowodowane zwiększeniem ilości pobieranych składników odżywczych z pożywienia, które będą wpływały w sposób korzystny na rozwój prawidłowych włókien mięśniowych, co również wykazały analizy statystyczne w **Publikacji 3**. W grupie eksperymentalnej B2, w której ryby były karmione dodatkiem paszowym w ilości 2 % zaobserwowano zwiększenie się, w sposób istotny statystycznie, liczby prawidłowych włókien mięśniowych w porównaniu do grupy kontrolnej. Wzrost prawidłowych włókien mięśniowych oraz zmniejszenie ilości włókien atroficznych mogło być związane z ilością tkanki łącznej. W **publikacji 3** zaobserwowano przerost tkanki łącznej w grupie kontrolnej, który mógł spowodować nacisk na naczynia włosowate poszczególnych włókien mięśniowych, co mogło przyczynić się do mniej efektywnego ich dotlenienia oraz odżywienia (Koomkronng i in. 2015). Natomiast suplementacja ryb dodatkiem paszowym w postaci trans-galaktooligosacharydu spowodowała zmniejszenie ilości tkanki łącznej. Ilość tkanki łącznej w mięsie jest również cechą istotną z punktu widzenia konsumenckiego, ponieważ jej grubość będzie wpływała na kruchość mięsa.

3.5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że zastosowany w paszy dodatek prebiotyku wpłynął w dużym stopniu zarówno na wartość odżywczą i mikrostrukturę mięsa, jak i na stan fizjologiczny karpia utrzymywanych w warunkach akwakultury. Wyniki eksperymentu *in vivo* oraz analiz laboratoryjnych materiału biologicznego opisane w publikacjach naukowych, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, pozwoliły częściowo potwierdzić hipotezy szczegółowe.

Zastosowany prebiotyk częściowo wpłynął na parametry morfometryczne jelit karpia, natomiast nie wpłynął na parametry biochemiczne krwi, na parametry wzrostu i wskaźniki wykorzystania paszy (**Publikacja 1**).

Zastosowany prebiotyk wpłynął istotnie na stopień kumulacji wybranych składników mineralnych w mięsie, skrzelach i szkielecie karpia, na interakcje między makro- i mikroelementami, a tym samym na równowagę mineralną w organizmie (**Publikacja 2**).

Trans-galaktooligosacharyd częściowo wpłynął na profil kwasów tłuszczowych oraz mikrostrukturę mięśni karpia, natomiast nie wpłynął na poziom cholesterolu oraz tłuszczu całkowitego (**Publikacja 3**).

Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Suplementacja diety karpia trans-galaktooligosacharydem spowodowała zwiększenie wysokości (o 31,82% w grupie B1 i o 24,37% w grupie B2), szerokości kosmków jelitowych (o 18,60% w grupie B1 i o 23,28% w grupie B2), co w konsekwencji przyczyniło się do zwiększenia pola powierzchni chłonnej przewodu pokarmowego (**Publikacja 1**).
2. Zwiększenie pola powierzchni chłonnej jelit wpłynęło pozytywnie na stopień bioakumulacji wybranych składników mineralnych w tkankach karpia (**Publikacja 2**).
3. Wprowadzenie trans-galaktooligosacharydu do diety przyczyniło się do wzrostu stężenia cynku w mięśniach i jego obniżenia w szkielecie, wzrostu poziomu żelaza w mięśniach, skrzelach i szkielecie oraz wzrostu stężenia magnezu w szkielecie karpia (**Publikacja 2**).
4. Dodatek do paszy trans-galaktooligosacharydu w ilości 2% wpłynął korzystnie na poziom kwasu arachidonowego (w mięsie ryb z grupy B2 odnotowano wzrost udziału procentowego tego kwasu o 43,33%, w porównaniu z grupą kontrolną) (**Publikacja 3**).
5. Zastosowanie trans-galaktooligosacharydu w diecie karpia w ilości 2% spowodowało zwiększenie udziału włókien mięśniowych o prawidłowej budowie (o 2,66%) oraz jego obniżenie w przypadku włókien atroficznych (o 51,08%) w porównaniu z grupą kontrolną (**Publikacja 3**).

3.6. LITERATURA

- [1] Abdel-Rawwab M., Monier M.N., 2018. Stimulatory effect of dietary taurine on growth performance, digestive enzymes activity, antioxidant capacity, and tolerance of common carp, *Cyprinus carpio* L., fry to salinity stress. *Fish Physiol Biochem.* 44, 639-649. doi:10.1007/s10695-017-0459-8
- [2] Adibmoradi M., Navidshad B., Seifdavati M., Royan M., 2006. Effect of dietary garlic meal on histological structure of small intestine in broiler chickens. *J. Poult. Sci.* 43, 378–383. doi:10.2141/jpsa.43.378.
- [3] Adibmoradi M., Navidsha B., Faseleh Jahromi M., 2016. The effect of moderate levels of finely ground insoluble fiber on small intestine morphology, nutrient digestibility and performance of broiler chickens. *Ital. J. Anim. Sci.* 15, 310–317. doi:10.1080/1828051X.2016.1147335
- [4] Akhter N., Wu B., Memon A.M., Mohsin M., 2015. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish Shellfish Immunol.* 45, 733–741.
- [5] Akrami R., Karimabadi A., Mohammadzadeh H., Ahmadifar E., 2010. Effect of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, survival, body composition and salinity stress resistance in Kutum (*Rutilus frisii kutum*) fry stage. *J. Mar. Sci. Technol.* 8, 47–57.
- [6] Alshamy Z., Richardson K.C., Hünigen H., Hafez H.M., Plendl J., et al., 2018. Comparison of the gastrointestinal tract of a dual-purpose to a broiler chicken line: A qualitative and quantitative macroscopic and microscopic study. *PLOS ONE.* 13(10), e0204921. doi:10.1371/journal.pone.0204921
- [7] Amani Denji K., Razeghi Mansour M., Akrami R., Ghobadi S., Jafarpour S.A., Mirbeygi S.K., 2015. Effect of dietary prebiotic mannan oligosaccharide (MOS) on growth performance, intestinal microflora, body composition, haematological and blood serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *J. Fish Aquat. Sci.* 10, 255–265.
- [8] Andrews S.R., Sahu N.P., Pal A.K., Kumar S., 2009. Haematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: Effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. *Aquac. Res.* 41, 61–69.
- [9] Anguiano M., Pohlenz C., Buentello A., Gatlin D.M., 2013. The effects of prebiotics on the digestive enzymes and gut histomorphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*) and hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). *Br. J. Nutr.* 109, 623–629.
- [10] Banerjee G., Ray A.K., 2017. Bacterial symbiosis in the fish gut and its role in health and metabolism. *Symbiosis.* 72,1–11. doi:10.1007/s13199-016-0441-8
- [11] Bednarczyk M., Stadnicka K., Kozłowska I., Abiuso C., Tavaniello S., Dankowiakowska A., 2016. Influence of different prebiotics and mode of their administration on broiler chicken performance. *Animal.* 10, 1–9.
- [12] Biggs P., Parsons C.M., Fahey G.C., 2007. The effects of several oligosaccharides on growth performance, nutrient digestibility, and cecal microbial populations in young chicks. *Poult Sci.* 86(11):2327 – 2336. doi:10.3382/ps.2007-00427
- [13] Bogucka J., Dankowiakowska A., Elminowska-Wenda G., Sobolewska A., Szczerba A., Bednarczyk M., 2016. Effects of prebiotics and synbiotics delivered in ovo on broiler small intestine histomorphology during the first days after hatching. *Folia Biol.* 64, 131–143.
- [14] Bogucka J., Miguel Ribeiro D., Da Costa R.P.R., Bednarczyk, M., 2018. Effect of synbiotic dietary supplementation on histological and histopathological parameters of Pectoralis Major muscle of broiler chickens. *Czech J Anim Sci.* 63(7), 263-271.

- [15] Bornet F.R.J., Brouns F., Tashiro, Y., Duvillier V., 2002. Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. *Dig Liver Dis*, 34 (2), 6111-20.
- [16] Cao H., Yu R., Zhang Y., Hu B., Jian S., Wen Ch., 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*). *Aquacult.* 508, 106-112. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.04.064
- [17] Cashman K., 2003. Prebiotics and calcium bioavailability. *Curr Issues Intest Microbiol.* 4,21 – 32.
- [18] Chang C.F., Su M.S., Chen H.Y., Liao I.C., 2003. Dietary β -1,3-betaglucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 297–310.
- [19] Dawood M.A.O., Koshio S., 2016. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture : a review. *Aquaculture.* 454,243 – 251. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.12.033
- [20] Delzenne N.M., Kok N., 2001. Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism. *Am J Clin Nutr*, 73, 456S–8S.
- [21] Delzenne N.M., Daubioul C., Neyrinck A., Lasa M., Taper H.S., 2002. Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: review of biochemical events and future prospects. *Br. J. Nutr*, 87(2), 255–259. doi:10.1079/BJN/2002545
- [22] Demigné C., Morand C., Levrat M., Besson C., Moundras C., Rémésy C., 1995. Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *Br. J. Nutr*, 74(2), 209-219. doi:10.1079/BJN19950124
- [23] Dimitroglou A., Davies S.J., Sweetman J., Pascal D., Chatzifotis S., 2010. Dietary supplementation of mannanoligosaccharide on white sea bream (*Diplodus sargus* L.) larvae: Effects on development, gut morphology and salinity tolerance. *Aquac. Res.* 41, 245–251.
- [24] Ebrahimi G., Ouraji H., Khalesi M., Sudagar M., Barari A., Zarei Dangesaraki M., Jani Khalili K., 2012. Effects of a prebiotic, Immunogen®, on feed utilization, body composition, immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in the common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus) fingerlings. *J Anim Physiol a Anim Nutr.* 96, 591–599.
- [25] FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. doi: 10.4060/ca9229en
- [26] Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Bio. Chem*, 226, 497-509.
- [27] Gibson G.R., Hutkins R., Sanders M.E., Prescott S.L., Reimer R.A., Salminen S.J., Scott K., Stanton C., Swanson K.S., Cani P.D., Verbeke K., Reid G., 2017. Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 14,491 – 502. doi:10.1038/nrgastro.2017.75
- [28] Guerreiro I., Olivia-Teles A., Enes P., 2015. Improved glucose and lipid metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed short-chain fructooligosaccharides and xylooligosaccharides. *Aquacult.* 441, 57-63. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.02.015
- [29] Guerreiro I., Oliva-Teles A., Enes P., 2017a. Prebiotics as functional ingredients: focus on Mediterranean fish aquaculture. *Reviews in Aquacult.* 0, 1–33. doi:10.1111/raq.12201
- [30] Guerreiro I., Serra C.R., Pousão-Ferreira P., Oliva-Teles A., Enes P., 2017b. Prebiotics effect on growth performance, hepatic intermediary metabolism, gut microbiota and digestive enzymes of white seabream (*Diplodus sargus*). *Aquacult Nutrit* 24(1):153 – 163. doi:10.1111/anu.12543

- [31] Guerreiro I., Olivia-Teles A., Enes P., 2018. Prebiotics as functional ingredients: Focus on Mediterranean fish aquaculture. *Rev. Aquac.* 10, 800–832.
- [32] Gultepe N., Hisar O., Salnur S., Hossu B., Tansel Tanrikul T., Aydin S., 2012. Preliminary assessment of dietary mannan oligosaccharides on growth performance and health status of gilthead seabream (*Sparus auratus*). *J. Aquat. Anim. Health.* 24, 37–42.
- [33] Havenaar R., Bonnin-Marol S., Van Dokkum W., Petites S., Schaafsma G., 1999. Inulin: Fermentation and microbial ecology in the intestinal tract. *Food Rev. Int.* 15, 109–120.
- [34] Heyer C.M.E., Weiss E., Schmucker S., Rodehutschord M., Hoelzle L.E., Mosenthin R., Stefanski V., 2015. The impact of phosphorus on the immune system and the intestinal microbiota with special focus on the pig. *Nutr. Res. Rev.* 28, 67–82.
- [35] Hoseinifar S.H., Soleimani N., Ringø E., 2014. Effects of dietary fructo-oligosaccharide supplementation on the growth performance, haemato-immunological parameters, gut microbiota and stress resistance of common carp (*Cyprinus carpio*) fry. *Br. J. Nutr.* 112, 1296–1302.
- [36] Hugh A., Poston Gerald F., Combs Jr., Louis L., 1976. Vitamin E and Selenium Interrelations in the Diet of Atlantic Salmon (*Salmo salar*): Gross, Histological and Biochemical Deficiency Signs, *J Nutr.* 106, 7,892–904. doi:10.1093/jn/106.7.892
- [37] Hussein M.S., Zaghlol A., Abd E.I., Hakim N.F., Nawsany M., Abo-State H.A., 2016. Effect of different growth promoters on growth performance, feed utilization and body composition of common carp (*Cyprinus carpio*). *J Fish Aquat Sci.* 11, 370-377.
- [38] Kamler E., Kamiński R., Wolnicki J., Sikorska J., Wałowski J., 2012. Effects of diet and temperature on condition, proximate composition and three major macro elements, Ca, P and Mg, in barbel *Barbus barbus* juveniles. *Rev Fish Biol Fish* 18(4):767 – 777. doi:10.1007/s11160-012-9256-8
- [39] Kindt et al., 2018. The gut microbiota promotes hepatic fatty acid desaturation and elongation in mice. *Nat. Commun.* 9:3760, 1-15. doi:10.1038/s41467-018-05767-4
- [40] Koomkroong N., Theerawatanasirikul S., Boonkaewwan C., Jaturasitha S., Kayan A., 2015. Breed-related number and size of muscle fibres and their response to carcass quality in chickens. *Italian Journal of Animal Science*, 14, 638–642.
- [41] Korylyak M.Z., 2015. Morphological characteristics intestine two-years carp hepatopancreas and in applying milled fruits thistle. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series. Vet. Sci.* 17, 218–223.
- [42] Lall S.P., 2002. The minerals. In: Halver J.E. and Hardy R.W, *Fish Nutrition.* 259 – 308.
- [43] Levitan E.B., Wolk A., Mittleman M.A., 2010. Fatty fish, marine ω -3 fatty acids and incidence of heart failure. *Eur. J. Clin. Nutr.* 64(6), 587–594. doi:10.1038/ejcn.2010.50.
- [44] Macfarlane S., Macfarlane G.T., Cummings J., 2006. Review Article: Prebiotics in the gastrointestinal tract. *Aliment. Pharmacol. Ther.* (24), 701-14. doi:10.1111/j.1365-2036.2006.03042.x.
- [45] Maraschiello C., Diaz I., Garcia Regueiro J.A., 1996. Determination of cholesterol in fat and muscle of pig by HPLC and capillary gas chromatography with solvent venting injection. *HRC CC J High Resolut Chromatogr Chromatogr Commun*, 19, 165–168.
- [46] Mazurkiewicz J., Przybył A., Golski J., 2008. Usability of fermacto prebiotic in feeds for common carp (*Cyprinus carpio* L.) fry. *Nauka Przyroda Technologie.* (2), 3.
- [47] McCabe L., Britton R.A., Parameswaran N., 2015. Prebiotic and probiotic regulation of bone health: role of the intestine and its microbiome. *Curr Osteoporos Rep.* 13(6),363 – 371. doi:10.1007/s11914-015-0292-x
- [48] Mirghaed A.T., Hoseini S.S.M., Ghelichpour M., 2018. Effects of dietary 1,8-cineole supplementation on physiological, immunological and antioxidant responses to crowding stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 81, 182–189.

- [49] Neuringer M., Connor W.E., 1986. n-3 fatty acids in the brain and retina: evidence for their essentiality. *Nutr Rev. Sep*, 44(9):285-94. doi:10.1111/j.1753-4887.1986.tb07660.x.
- [50] Nwanna L.C., Schwarz F.J., 2007. Effect of supplemental phytase on growth, phosphorus digestibility and bone mineralization of common carp (*Cyprinus carpio* L). *Aquac Res.* 38(10),1037 – 1044. doi:10.1111/j.1365-2109.2007.01752.x
- [51] Paulsen S.M., Lunde H., Engstad R.E., Robertsen B., 2003. In vivo effects of beta-glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 14, 39–54.
- [52] Peterson B.C., Booth N.J., Barrows F.T., Manning B.B., 2012. Improved survival in channel catfish fed mannanoligosaccharides in an extruded diet. *Open J. Anim. Sci.* 2, 57–61.
- [53] Pietrzak E., Mazurkiewicz J., Slawinska A., 2020. Innate Immune Responses of Skin Mucosa in Common Carp (*Cyprinus Carpio*) Fed a Diet Supplemented with Galactooligosaccharides. *Animals*, 10, 438.
- [54] Priester C., Lindsay C. M., Stephen T. K., Wade O. W., Richard M. D., 2011. Growth patterns and nuclear distribution in white muscle fibres from black sea bass, *Centropristis striata*: evidence for the influence of diffusion. *J. Exp. Biol*, 214, 1230-1239. doi:10.1242/jeb.053199
- [55] Pryor G.S., Royes J.B., Chapman F.A., Miles, R.D., 2003. Mannan oligosaccharides in fish nutrition: Effects of dietary supplementation on growth and gastrointestinal villi structure in Gulf of Mexico sturgeon. *N. Am. J. Aquac.* 65, 106–111.
- [56] Sakamoto K., Hirose H., Onizuka A., Hayashi M., Futamura N., Kawamura Y., Ezaki T., 2000. Quantitative study of changes in intestinal morphology and mucus gel on total parenteral nutrition in rats. *J. Surg. Res.* 94, 99–106.
- [57] Sikorska J., 2010. Dietary causes of body deformities in larval and juvenile fish in aquaculture. Part 1. Mineral substances. *Komunikaty Rybackie* 4(117):1 – 4
- [58] Sławińska A., Dunisławska A., Płowiec A., Radomska M., Lachmanska J., Siwek M., Tavaniello S., Maiorano G., 2019. Modulation of microbial communities and mucosal gene expression in chicken intestines after galactooligosaccharides delivery In Ovo. *PLoS ONE.* 14, e0212318.
- [59] Sobolewska A., Bogucka J., Dankowiakowska A., Elminowska-Wenda G., Stadnicka K., Bednarczyk M., 2017. The impact of synbiotic administration through in ovo technology on the microstructure of a broiler chicken small intestine tissue on the 1st and 42nd day of rearing. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 8, 61.
- [60] Steffens W., Wirth M., 2007. Influence of nutrition on the lipid quality of pond fish: common carp (*Cyprinus carpio*) and tench (*Tinca tinca*). *Aquac Int.* 15, 313–319. doi:10.1007/s10499-007-9088-z
- [61] Sun W., Li X., Xu H., Chen J., Xu X., Leng X., 2017. Effects of dietary geniposide on growth, flesh quality, and lipid metabolism of Grass carp, *Ctenopharyngodon Idella*. *J World Aquac Soc*, 48(6), 927-937. doi:10.1111/jwas.12412
- [62] Talpur A.D., Munir M.B., Mary A., Hashim R., 2014. Dietary probiotics and prebiotics improved food acceptability, growth performance, hematology and immunological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in snakehead (*Channa striata*) fingerlings. *Aquaculture.* 426–427, 14–20.
- [63] Tzortzis G., Goulas A., Gibson G.R., 2005. Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *Appl Microbiol Biotechnol.* 68(3),412 – 416. doi:10.1007/s00253-005-1919-0
- [64] Ulbricht T.L.V., Southgate D.A.T., 1991. Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet*, 338, 985-992.

- [65] Wang J., Zhang D., Sun Y., Wang S., Li P., Gatlin D.M., Zhang L., 2016. Effect of a dairy-yeast prebiotic (GroBiotic-A) on growth performance, body composition, antioxidant capacity and immune functions of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Aquac. Res.* 47, 398–408. doi:10.1111/are.12501
- [66] Wendelaar Bonga S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol Rev.* Jul,77(3),591-625. doi: 10.1152/physrev.1997.77.3.591
- [67] Whisner C.M., Castillo L.F., 2018. Prebiotics, bone and mineral metabolism. *Calcif Tissue Int.* 102,443 – 479. doi:10.1007/s00223-017-0339-3
- [68] Yang H., Li X., Huan D., Xu Z., Zhang Y. Leng X., 2018. Effect of three positively buoyant dietary supplements on the buoyancy of feces, growth and intestinal health Tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Aquac. Fish.* 3, 72–78.
- [69] Yeung C.K., Glahn R.P., Welch R.M., Miller D.D., 2005. Prebiotics and iron bioavailability – is there a connection? *Int J Food Sci.* 70(5):88 –92
- [70] Yuji-Sado R., Raulino-Domanski F., de Freitas P., Baioco-Sales F., 2015. Growth, immune status and intestinal morphology of Nile tilapia fed dietary prebiotics (mannan oligosaccharides-MOS). *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 43, 944–952.
- [71] Zhou Q.C., Buentello J.A., Gatlin D.M., 2010. Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquacult.* 309, 253–257.

4. STRESZCZENIE

Wpływ dodatku prebiotyku na wskaźniki biochemiczne krwi, wartość odżywczą mięsa i mikrostrukturę tkanek ryb

Mgr Ewa Aleksandra Ziótkowska

Słowa kluczowe: GOS, karp, profil kwasów tłuszczowych, histologia, składniki mineralne

Rosnąca skala konsumpcji ryb spowodowała, że akwakultura stała się najszybciej rozwijającą się gałęzią produkcji zwierzęcej na świecie. Globalnie, kluczowym dla niej gatunkiem jest karp pospolity (*Cyprinus carpio*). W celu modulacji mikrobiomu jelitowego, ważnego dla zdrowia zwierząt i przebiegu procesów trawiennych, stosuje się szereg dodatków paszowych, do których zaliczane są m.in. prebiotyki, probiotyki oraz synbiotyki. Preparaty prebiotyczne przyczyniają się do rozwoju korzystnej mikroflory, co poprzez mechanizmy kompetycyjnego wypierania prowadzi do zahamowania wzrostu patogennych drobnoustrojów zasiedlających przewód pokarmowy zwierząt. Bezpośrednie działanie preparatów prebiotycznych wpływa na homeostazę mikrobiomu jelitowego oraz metabolizmu składników odżywczych, czego efektem jest poprawa jakości mięsa poprzez zwiększenie ilości białka, tłuszczu, składników mineralnych oraz węglowodanów. Celem podjętych badań była analiza wpływu prebiotyku GOS na wzrost, rozwój i status fizjologiczny karpia. W ramach eksperymentu, dokonano podziału ryb na trzy grupy: kontrolną – bez zastosowania dodatków paszowych mających wpływ na mikrobiom przewodu pokarmowego oraz dwie doświadczalne z 1% i 2% udziałem GOS. Po zakończeniu 60 dniowego testu *in vivo* pobrano materiał biologiczny i wykonano analizy biochemiczne związane z tłuszczem, profilem kwasów tłuszczowych i składem mineralnym oraz wykonano pomiary histologiczne jelit i mięśni. Ponadto dokonano analizy wyników odchowu ryb.

Dodatek do paszy GOS nie wpłynął istotnie na parametry wzrostowe, ale przyczynił się do poprawy parametrów histologicznych - zwiększenia powierzchni chłonnej jelit. Nastąpił wzrost zawartości cynku w mięsie oraz żelaza w mięsie i skrzelach, a także magnezu w szkielecie. Zastosowany prebiotyk nie wpłynął na parametry biochemiczne krwi, za wyjątkiem poziomu fosforu pomiędzy grupą B1 i B2. Dodatek GOS wpłynął również w korzystny sposób na profil kwasów tłuszczowych w mięśniach oraz przyczynił się do zmniejszenia ilości zmian atroficznych, oraz procentowego wzrostu udziału włókien mięśniowych o prawidłowej budowie.

5. ABSTRACT

The effect of the prebiotic addition on the blood biochemical parameters, nutritional value of meat and microstructure of fish tissues

Ewa Aleksandra Ziólkowska

Keywords: GOS, carp, fatty acid profile, histology, minerals

The growing scale of fish consumption has made aquaculture the fastest growing branch of animal production in the world. Globally, a key role is played by common carp (*Cyprinus carpio*). In order to modulate the intestinal microbiome, which is important for animal health and the course of digestive processes, a number of feed additives are used, including prebiotics, probiotics and synbiotics. Prebiotic preparations contribute to the development of beneficial microflora which through the mechanisms of competitive displacement inhibits the growth of pathogenic microorganisms inhabiting the digestive tract of animals. The direct action of prebiotic preparations affects the homeostasis of the intestinal microbiome and the metabolism of nutrients, which results in the improvement of meat quality by increasing the amount of protein, fat, minerals and carbohydrates. The aim of the research was to analyse the effect of the GOS prebiotic on the growth, development and physiological status of carp. As a part of the experiment, the fish were divided into three groups: the control - without the use of feed additives affecting the gastrointestinal microbiome, and two experimental ones with 1% and 2% of GOS addition. After the 60-day *in vivo* test, the material was collected and biochemical analyses related to the fat, fatty acid profile and mineral composition, as well as histological measurements of the intestines and muscles were performed. Moreover, the results of fish rearing were analysed.

The addition of GOS to the feed did not significantly affect the growth parameters. However, it contributed to the improvement of histological parameters - an increase in the intestinal area. There was an increase in the content of zinc in the meat and iron in the meat and gills, as well as in the magnesium in the skeleton. The prebiotic used in the feed did not affect the biochemical parameters of the blood, except for the level of phosphorus between groups B1 and B2. The addition of GOS had also a beneficial effect on the fatty acid profile in the muscles and contributed to the reduction of the number of atrophic changes and the percentage increase in the proportion of muscle fibres with a normal structure.

6. ZAŁĄCZNIKI

6.1. KOPIE ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH STANOWIĄCYCH CYKL PUBLIKACJI ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Article

Effects of a Trans-Galactooligosaccharide on Biochemical Blood Parameters and Intestine Morphometric Parameters of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.)

Ewa Ziółkowska ^{1,*}, Joanna Bogucka ¹, Agata Dankowiakowska ¹, Mateusz Rawski ², Jan Mazurkiewicz ² and Magdalena Stanek ¹

¹ Department of Animal Physiology, Physiotherapy and Nutrition, Faculty of Animal Breeding and Biology, UTP University of Science and Technology, Mazowiecka 28, 85-004 Bydgoszcz, Poland; bogucka@utp.edu.pl (J.B.); agata.dankowiakowska@utp.edu.pl (A.D.); winiarska@utp.edu.pl (M.S.)

² Division of Inland Fisheries and Aquaculture, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 71C 60-625 Poznań, Poland; mateusz.rawski@up.poznan.pl (M.R.); jan.mazurkiewicz@up.poznan.pl (J.M.)

* Correspondence: ewa.ziolkowska@utp.edu.pl

Received: 24 February 2020; Accepted: 17 April 2020; Published: 21 April 2020

Simple Summary: Probiotics are important feed additives used in aquaculture. These are substances that are breeding grounds for beneficial bacteria and that inhibit the development of pathogens; accelerate healing and regeneration of the intestinal epithelium; increase mucus production; help maintain normal pH in the intestine; limit the growth of pathogenic bacteria; increase calcium, iron and magnesium absorption; and also have beneficial effects on glucose and protein metabolism in the liver. The saccharide-based prebiotic used in the carp experiment had a positive effect on intestine morphometric parameters. Supplementation of this prebiotic had no negative effect on growth performance and did not disturb the homeostasis of the fish, as demonstrated by the values of biochemical blood parameters.

Abstract: The aim of the study was to evaluate the effects of a trans-galactooligosaccharide prebiotic (GOS) on the growth performance, biochemical blood parameters, and intestine morphometric parameters of common carp. The 60-day-long experiment was performed on one-year-old fish with a mean body weight of 180 g (± 5 g). Three diets were used: control diet 1 (C) with no microbiota affecting feed additives, diet 2 (B1) with 1% of prebiotic, and diet 3 (B2) with 2% of prebiotic, in four replications (tanks) per treatment and 25 fish per tank. At the end of the trial, 16 individuals from each group were used for analyses. The study showed that GOS supplementation did not affect growth performance. In turn, the prebiotic had a positive effect on the development of the intestine, and increased the height, width, and surface of the villi in B1 and B2 groups. The content of phosphorus (P) was significantly higher in B1 group compared with B2 group, which indicated that 1% addition of prebiotic causes better absorption of P from the intestine. The other biochemical indicators—namely lipid, protein and hepatic parameters, insulin, and Ca—were not affected by GOS treatment, which may indicate similar metabolic balance of fish in each experimental group. Serum triiodothyronine (TT₃) and glucose (stress markers) concentrations were not significantly different among treatments groups. GOS may be recommended as a feed additive for common carp due to its positive effects on fish physiology and development of the gastrointestinal tract. However, our results suggest that 1% diet supplementation causes satisfactory reactions for the abovementioned aspects in comparison to control or 2% supplementation.

Keywords: blood; fish; histology; intestine; parameters; prebiotic

1. Introduction

In all livestock, the composition of gut microbiota is one of the most important factors determining the proper growth and functioning of the animal body and preventing diseases. It is believed that the gut microbiome is crucial for both the digestion and assimilation of nutrients, as well as regulation of the immune response [1]. In aquaculture, where population density and environmental pressure increase the risk of alterations in gut health (disturbed intestinal homeostasis), many feed supplements are used for prophylaxis and normalization of the gut microbiome growth [2].

Prebiotics are a carbon and energy source for both physiological gut microorganisms and beneficial ones contained in probiotics supplied with feed. Prebiotics contain a range of substances that promote the growth and proliferation of lactic acid bacteria and play a very important role in inhibiting the growth of pathogenic gut microbial flora while stimulating microorganisms beneficial for the animal host (e.g., fructooligosaccharides (FOS), transgalactooligosaccharides (t-GOS), inulin, and mannanooligosaccharides (MOS) [3]. An immunostimulating effect of prebiotics has also been reported, including their ability to activate T and B lymphocytes, which increase the immune resistance of the body to pathogenic microorganisms [4–6]. Hoseinifar et al. [7] confirmed that prebiotics can significantly increase the leukocyte count and improve the resistance of animals to stress.

One of the most comprehensive methods of assessing the health and welfare of the animal, as well as the proper function of individual internal organs, relies on the analyses of hematological and biochemical parameters of blood. These parameters can be used to assess the homeostasis of the body, the nutritional status, and to detect possible symptoms of a disease [8]. The most important analyzed parameters are: total protein (TP), albumin, globulin and alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL), urea, triglycerides (TG), bilirubin and creatinine [9–11]. glucose, cortisol, and thyroid hormones T₃ and T₄, which are important indicators of stress [12].

However, the histological analysis of the gastrointestinal tract is necessary for the complete assessment of digestion and absorption of food. Thus, histological examination of the digestive system, especially of the intestine, is crucial regarding prebiotic use [13]. Important parameters are the height and width of the villi and depth of the crypt, as demonstrated by Asaduzzaman et al. [14] for Malaysian mahseer (*Tor tambroides*), Akter et al. [15] for striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*), Qiyou et al. [16] for hybrid sturgeon (*Acipenser schrenckii* × *Huso dauricus*), Yang et al. [17] for tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*), Korylyak [18] for common carp, and Zhang et al. [19] for Koi carp (*Cyprinus carpio*). Larger villi mean more absorptive surfaces and higher digestive enzymes, which are supposed to increase nutrient absorption and fish growth. A review of the literature shows positive effects of trans-galactooligosaccharide supplied in different doses on growth performance parameters, blood biochemical indices, and intestinal microstructure in carp aquaculture. The results demonstrate that prebiotics usually improve growth factors (final body weight, food conversion ratio, and protein efficiency ratio) [20]. In one study, the Trans-Galactooligosaccharide (GOS) -treated group (obtained from lactose) had significantly higher total protein and serum lysozyme activity than other treatments ($p < 0.05$) [21]. Analyses carried out by Mehrabi et al. [22] conformed that dietary inclusions of GOS (Primalac®, and to a lesser extent Immunowall®, or their mixture) positively affect most of the parameters examined in the experimental *C. carpio*, leading to improved growth performance, enhanced body composition, and stimulated fish immune system.

Prebiotics used in the experiments (trade name Bi²tos, Clasado Biosciences Ltd., Jersey, UK) were manufactured via enzymatic transgalactosylation of milk lactose by the whole cells of *Bifidobacterium bifidum* 41171. For this reason, Bi²tos specifically promotes growth of *Bifidobacterium* spp. [23]. The genome of *Bifidobacterium* spp. encodes carbohydrate-degrading enzymes with high affinity to GOS

[24]. In fermentation experiments carried out by Tzortzis et al. [23], *B. bifidum* showed an increased preference towards the produced galactooligosaccharide mixture, displaying higher growth rate and short-chain fatty acid production when compared with commercially available oligosaccharides. Bi²tos delivered in ovo on day 12 of egg incubation increased the lactobacilli and bifidobacteria fecal counts of 1-day-old chicks [25]. Sławińska et al. [26] showed the effects of microbiota modulation with in ovo stimulation in adult broiler chickens. Bi²tos was used in projects investigating the microstructure of a broiler chicken small intestine and the results confirmed a significant effect of this prebiotic on the histomorphology of this tissue and an effect on gut structure, which should contribute to improvement in nutrient absorption in the gut [27,28].

The aim of this study was to analyze the effects of dietary supplementation with 1% and 2% trans-galactooligosaccharide (GOS) on growth performance, selected biochemical blood parameters, and intestine morphometric parameters, and to verify which GOS dose may positively affect good health, proper development of the intestine, and growth performance parameters of common carp.

2. Material and Methods

2.1. Fish Culture and Feeding

The study was carried out in strict accordance with the recommendations of the National Ethics Commission (Warsaw, Poland). All procedures and experiments complied with the guidelines of the Local Ethics Commission of the Poznań University of Life Sciences (Poznań, Poland) with respect to animal experimentation and care of animals under study, and all efforts were made to minimize suffering according to Polish law and the EU Directive (no. 2010/63/EU) [29]. All members of the research team were trained in animal care, handling, and euthanasia by the Polish Laboratory Animal Science Association (PolLASA).

The diets were formulated according to common carp nutritional requirements. All experimental diets were processed by extrusion using a single-screw warm extruder (Metalchem S-60 Gliwice, Poland). The extrusion conditions were as follows: a 90 °C cylinder temperature in the zone of increasing pressure, a 100 °C cylinder temperature in the zone of high pressure, a 110 °C head temperature, a 52-rpm speed screw, and a 6-mm nozzle diameter. The diets were calculated as isonitrogenous (35% crude protein) and isoenergetic (18.5 MJ kg⁻¹), with less than 4% crude fibers, and were formulated to meet carp nutritional requirements [30–32]. Three experimental diets were used: control diet 1 (C) without feed additives, diet 2 (B1), and diet 3 (B2) with 1% and 2% Bi²tos, respectively (Table 1.).

Table 1. Dietary formulation and calculated nutritive values of experimental feeds.

Ingredient	Composition (%)		
	C	B1	B2
Fish meal ¹	12.3	12.3	12.3
Blood meal ²	10.0	10.0	10.0
DDGS ³	11.0	11.0	11.0
Soybean meal ⁴	15.0	15.0	15.0
Rapeseed meal ⁵	10.0	10.0	10.0
Wheat meal	32.8	31.8	30.8
Fish oil ⁶	4.6	4.6	4.6
Soybean lecithin ⁷	1.0	1.0	1.0
Vitamin-mineral premix ⁸	1.5	1.5	1.5
Vitamin premix ⁹	0.1	0.1	0.1
Choline chloride	0.2	0.2	0.2
Fodder chalk	1.5	1.5	1.5
Prebiotic ¹⁰	0	1	2
Approximate composition (% dry matter)			
Crude protein	35.06		
Crude lipid	9.08		
Crude fibers	3.93		
Total phosphorus	0.83		
Calcium	1.36		
Ash	7.17		
Gross energy (MJ·kg ⁻¹)	18.51		
Essential amino acids	g/100g of crude protein		
Arginine	4.53		
Histidine	2.8		
Lysine	3.5		
Tryptophan	1.04		
Phenylalanine + Tyrosine	4.96		
Methionine + Cysteine	1.75		
Threonine	3.13		
Leucine	6.72		
Isoleucine	3.9		
Valine	4.97		

¹ Danish fishmeal, Type F, 72% total protein, 12% fat, FF Ska-gen, Denmark; ² AP 301 P, 92% total protein, APC (GB) Ltd, Ings Road, Doncaster, UK; ³ Dried Distillers Grains with Solubles, >45% total protein, <6% ash; ⁴ Toasted, 46–47% total protein, 1% fat; ⁵ 33% total protein, 2% fat; ⁶ Agro-fish, Kartoszyno, Poland; ⁷ BergaPure, deoiled lecithin, 97% pure lecithin, Berg + Schmidt GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany; ⁸ Polfamix W, BASF Polska Ltd. Kutno, Poland—1 kg contains: vitamin A 1,000,000 IU, vitamin D 3 200,000 IU, vitamin E 1.5 g, vitamin K 0.2 g, vitamin B 1 0.05 g, vitamin B 2 0.4 g, vitamin B 12 0.001 g, nicotinic acid 2.5 g, D-calcium pantothenate 1.0 g, choline chloride 7.5 g, folic acid 0.1 g, methionine 150.0 g, lysine 150.0 g, Fe 2.5 g, Mn 6.5 g, Cu 0.8 g, Co 0.04 g, Zn 4.0 g, J 0.008 g, carrier up to 1000.0 g; ⁹ Vitazol AD 3 E, BIOWET Drwalew, Poland—1 kg contains: vitamin A 50,000 IU, vitamin D 3 5000 IU, vitamin E 30.0 mg, vitamin C 100.0 mg; ¹⁰ Bitos® transgalactooligosaccharide (GOS), (Clasado Ltd, Reading, UK); dry powder containing a mixture (wt:wt) of the following oligosaccharides: 45% lactose, 9.9% disaccharides (Gal-(β1-3)-Glc; Gal-(β1-3)-Gal; Gal-(β1-6)-Gal; Gal-(α1-6)-Gal), 23.1% trisaccharides (Gal-(β1-6)-Gal-(β1-4)-Glc; Gal-(β1-3)-Gal-(β1-4)-Glc), 11.55% tetrasaccharides (Gal-(β1-6)-Gal-(β1-6)-Gal-(β1-4)-Glc), and 10.45% pentasaccharides (Gal-(β1-6)-Gal-(β1-6)-Gal-(β1-6)-Gal-(β1-4)-Glc).

The growth trial was done in the Experimental Station for Feed Production Technology and Aquaculture in Muchocin, Poland. Three-hundred one-year-old common carp (mean body weight 180 g) were used. The fish were randomly allocated into 12 concrete ponds (40 m³), with 25 fish per pond (according to Horváth [33]). The experiments were carried out in four replications. Each pond was equipped with an automatic band feeder allowing for the continuous supply of feed over 12 h

per day. The calculated daily feed dose for each pond was given every day at 9:00 a.m., consumption was controlled visually twice a day, and the rate was corrected if needed. The daily feed dose was restricted to avoid feed loss, while the feeding rate was calculated with consideration of water temperature, current fish biomass, and consumption from the previous day, according to Miyatake's [34] recommendations. A constant flow of water in the experimental system was ensured by an open flow system with a mechanical pre-filtration chamber. Control of water physio-chemical parameters (water temperature and content of oxygen solved in water) was carried out with the use of microcomputer oxymeter Elmetron CO-315 (Figure 1). The trial lasted 60 days.

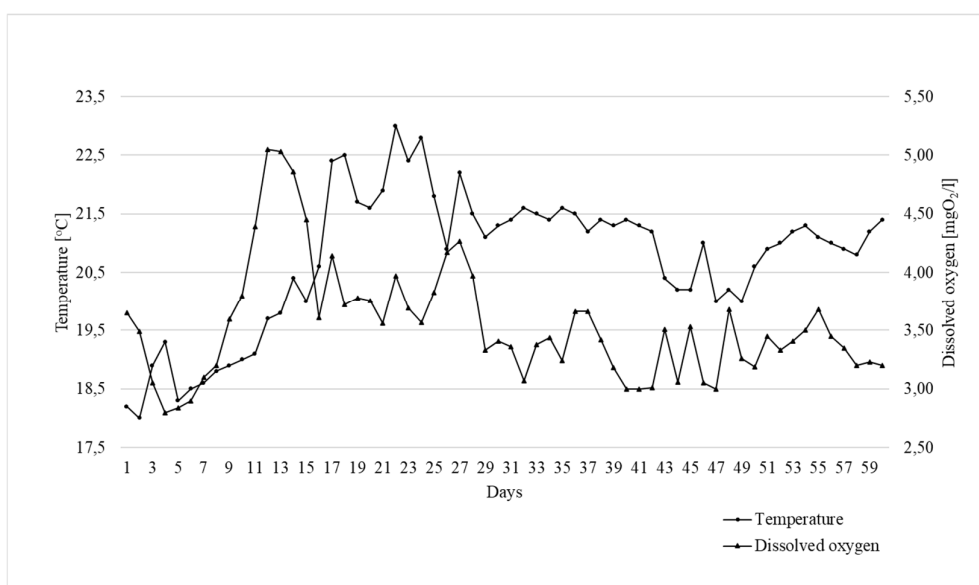


Figure 1. Changes in temperature (°C) and dissolved oxygen (mgO₂/L) during trial.

2.2. Growth Analyses

During the growth trial, all fish were weighed at 10-day intervals for feed dose control. The following calculations were done during the experiment:

$$\text{Body Weight Gain (BWG)} = W_2 \text{ (g)} - W_1 \text{ (g)} \quad (1)$$

$$\text{Feed Intake (FI)} = \text{feed intake (g)} \quad (2)$$

$$\text{Feed Conversion Ratio (FCR)} = \text{FI (g)}/\text{BWG (g)} \quad (3)$$

$$\text{Specific Growth Rate (SGR\%)} = 100(\ln W_2 - \ln W_1)/T \quad (4)$$

$$\text{Protein Efficiency Ratio (PER)} = \text{BWG (g)}/\text{protein intake (g)} \quad (5)$$

$$\text{Percentage Weight Gain} = (\text{PWG}/W_1) \cdot 100\% \quad (6)$$

where W_1 is the initial weight (g), W_2 is the final weight (g), and T is the number of days in the feeding period.

At the end of the growth trial, each fish was individually weighed 24 h after the last feeding time. Then, four fish per pond were killed by decapitation after anesthesia (by immersion in 500 mg/L of MS-222 solution) and blood samples were collected post-mortem for further analyses. The number of fish was based on earlier studies performed by the authors [35,36] to give a necessary sample size for laboratory and statistical analysis and to avoid unnecessary animal sacrifice (according to 4R policy). All remaining animals were further kept in the experimental station.

2.3. Biochemical Analyses

Blood samples ($n = 48$) taken from the caudal vein were centrifuged after thrombus formation into obtain serum. Biochemical blood parameters were measured using a MINDRAY BS-120 biochemical analyzer and reference reagents from Stamar® (Dąbrowa Górnicza, Poland). The analyzer was calibrated using a Multicalibrator 877UE in the presence of Qualinorm BS120 and Qualipath BS120. Insulin ($\mu\text{U/mL}$) and total triiodothyronine (TT_3) (nmol/L) were analyzed with the DIASource radioimmunoassay method using Ria-CT and INS-IRMA RIA kits (DIASource Immunoassays S.A, Belgium) and a NZ-322 automatic sample changer with a gamma counter for ^{125}I isotopes (Gamma Művek, Hungary).

2.4. Histological Analyses

Samples of the proximal intestine for histological analyses ($n = 48$) (approximately 2 cm long) were taken from fish directly post-mortem. Individual segments of the intestine were rinsed with 0.9% normal saline and then preserved in 4% formalin buffered with CaCO_3 solution. Preserved samples were dehydrated, cleared, infiltrated with paraffin in a tissue processor (Thermo Shandon, Runcorn, UK), and then embedded in paraffin blocks using a paraffin embedding system (Medite, Burgdorf, Germany). Paraffin blocks were cut on a rotary microtome (Thermo Shandon, Runcorn, UK) into 10 μm slices, which were then placed on microscope slides coated with chicken egg whites with the addition of glycerine. Specimens were deparaffinized, rehydrated, and then stained with the PAS (Periodic acid-Schiff) technique using the Schiff reagent for intestinal morphometric analysis. A Nikon Ci-L microscope integrated with a Nikon DS-Fi3 camera and NIS Elements software (Nikon Instruments Inc.) was used to measure the height and width of villi, depth of intestinal crypts, and thickness of the muscular layer. The height of the villi was measured for 10 randomly selected villi samples on the cross-section of a specimen. The length was measured from the top of the villus to its base at the ostium of the crypt. The width of the villus was measured at the mid-point of its length. The surface area of the villi was calculated based on the formula proposed by Sakamoto et al. [37]: $(2\pi) \times (\text{VW}/2) \times (\text{VH})$, where VW = villus width, and VH = villus height. The depth of intestinal crypt was defined as the depth of invagination between adjacent villi for 10 measured villi [38].

2.5. Statistical Analyses

Statistical calculations were made using STATISTICA 13.1 software (Dell, Round Rock, TX, USA, 2018). The arithmetic mean (\bar{x}) and standard deviation (SD) were calculated. The normal distribution of data was confirmed using the Shapiro–Wilk test, while the homogeneity of variance was verified using the Levene test. Significant differences between the groups were tested with one-way analysis of variance (ANOVA), while Tukey's test was used for multiple comparisons. The level of significance was determined at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Growth Performance

The growth performance of common carp receiving feed supplemented with the prebiotic and control fish is presented in Table 2. Analyses showed no significant differences in the calculated parameters between the groups and no mortality was observed during the entire experimental period.

Table 2. The effect of prebiotic Bi²tos[®] on growth performance of common carp (*Cyprinus carpio* L.).

Items	Control n = 4	B1 n = 4	B2 n = 4	p-Value
FBW (g/fish)	503 ± 8.24	502 ± 23.2	503 ± 24.1	0.997
BWG(g/fish)	321 ± 8.86	319 ± 24.7	321 ± 24.7	0.988
FI(g/fish)	385 ± 3.01	388 ± 9.09	385 ± 9.60	0.636
FCR	1.22 ± 0.03	1.22 ± 0.07	1.20 ± 0.07	0.907
SGR(%/fish/day)	2.03 ± 0.04	2.02 ± 0.11	2.03 ± 0.11	0.962
PER	2.35 ± 0.06	2.35 ± 0.13	2.38 ± 0.14	0.897
PWG (%)	176 ± 6.12	174 ± 15.1	176 ± 14.4	0.967

FBW = final body weight; BWG = body weight gain; FI = feed intake; FCR = feed conversion ratio; SGR = specific growth rate; PER = protein efficiency ratio; PWG = percent weight gain.

3.2. Biochemical Blood Parameters

The biochemical blood parameters measured in fish are presented in Table 3. Statistical analyses revealed a significant effect of prebiotic supplementation on the levels of phosphorus (P) ($p < 0.05$). The highest concentration of P was calculated in the samples of fish fed a diet with 1% prebiotic (group B1). The level of P was significantly higher in B1 group (13.62 mg/dL) than in B2 group (11.81 mg/dL). In terms of the protein profile (TP, albumin, globulin and urea), there were no significant ($p > 0.05$) differences among treatment groups. As analyses confirmed, lipid profile indicators (TC, TG, and NEFA) were not significantly ($p > 0.05$) affected by dietary GOS. Dietary supplementation of GOS had no stimulating effect on the thyroid hormone triiodothyronine (TT₃) or glucose (stress marker) in the serum of carp. The content of TT₃ was at a similar level in C, B1, and B2 groups. The same GOS effect was obtained for glucose and insulin. ALT and ALP activities did not significantly ($p > 0.05$) differ between treatments. Dietary inclusion of 1% or 2% GOS did not significantly affect ($p > 0.05$) Ca concentration.

Table 3. The effect of prebiotic Bi²tos[®] on biochemical blood parameters in serum of common carp (*Cyprinus carpio* L.).

Items	Control n = 16	B1 n = 16	B2 n = 16	p-Value
TP (g/dL)	3.11 ± 0.32	3.09 ± 0.23	3.15 ± 0.35	0.838
Albumin (g/dL)	1.49 ± 0.11	1.50 ± 0.06	1.51 ± 0.06	0.891
Globulin (g/dL)	1.62 ± 0.26	1.59 ± 0.19	1.64 ± 0.31	0.871
Urea (mg/dL)	15.20 ± 1.98	17.53 ± 2.14	14.47 ± 4.50	0.538
TC (mg/dL)	148.88 ± 10.90	150.50 ± 12.46	153.38 ± 19.25	0.682
TG (mg/dL)	281 ± 99	348 ± 97	294 ± 88	0.122
NEFA (mmol/L)	0.31 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.910
ALT (u/L)	25.75 ± 8.14	23.38 ± 6.91	20.44 ± 8.16	0.164
ALP (u/L)	116.19 ± 59.24	110.88 ± 66.21	78.88 ± 38.04	0.135
Ca (mg/dL)	11.06 ± 0.55	11.15 ± 0.71	10.88 ± 0.74	0.511
P (mg/dL)	12.37 ± 2.19 ^{ab}	13.62 ± 2.11 ^a	11.81 ± 1.59 ^b	0.039
Ca/P	0.92 ± 0.15	0.84 ± 0.16	0.93 ± 0.09	0.139
Glucose (mg/dL)	82 ± 15.71	75 ± 17.99	73 ± 13.69	0.118
Insulin (U/mL)	2.57 ± 0.33	2.60 ± 0.28	2.65 ± 0.13	0.854
TT ₃ hormone (nmol/L)	3.09 ± 1.29	4.58 ± 0.90	4.57 ± 1.90	0.138

Values marked with the different letters in the same line are significantly different ($p \leq 0.05$ Tukey's test). TP = total protein, TC = total cholesterol, TG = triglycerides, NEFA = non-esterified fatty acid, ALT = alanine aminotransferase, ALP = alkaline phosphatase, TT₃ = thyroid hormone.

3.3. Histological Measurements

Intestinal morphometric analyses demonstrated that the addition of GOS caused approximately 24% and 32% increases in villi height in groups B2 and B1, respectively (Table 4). Fish from the experimental groups also had significantly thicker villi ($p < 0.05$) compared to controls. Both the height and width of the villi correlated with their surface area, which was more than 50% greater in both groups of common carp receiving feed with the prebiotics. However, no significant differences in the depth of crypts were found between the analyzed groups. Our experiments also revealed that the supplementation of fish diet with the prebiotics significantly increased ($p < 0.05$) the Villi height (VH)/Crypt depth (CD) ratio, which may indicate the maturity of the intestinal mucosa.

Table 4. The effect of prebiotic Bi2tos® on histological measurements of intestines of common carp (*Cyprinus carpio* L.).

Items	Control <i>n</i> = 16	B1 <i>n</i> = 16	B2 <i>n</i> = 16	<i>p</i> - Value
Villi height VH (µm)	788.96 ^b ± 139.96	1040.98 ^a ± 159.65	981.2 ^{1a} ± 152.58	<0.001
Villi width VW (µm)	121.71 ^b ± 14.98	144.35 ^a ± 18.65	150.05 ^a ± 14.17	<0.001
Villus surface VS (µm ²)	300407.72 ^b ± 61527.71	471050,33 ^a ± 93853.46	462453,40 ^a ± 88447.20	<0.001
Crypt depth CD (µm)	175.39 ± 52.98	177.76 ± 25.97	148.15 ± 39.96	0.094
Tunica muscularis thickness (µm)	51.08 ^b ± 6.72	57.41 ^{a,b} ± 7.12	65.82 ^a ± 13.74	<0.001
Villi height/Crypt depth (VH/CD)	4.73 ^b ± 1.15	6.03 ^a ± 1.56	6.91 ^a ± 1.46	<0.001

Values marked with the different letters (a,b) in the same line are significantly different ($p \leq 0.05$, Tukey's test).

Moreover, fish receiving the diet with 2% GOS had a significantly thicker ($p < 0.05$) muscular layer compared to the control group. The results of histological measurements are shown in Figure 2.

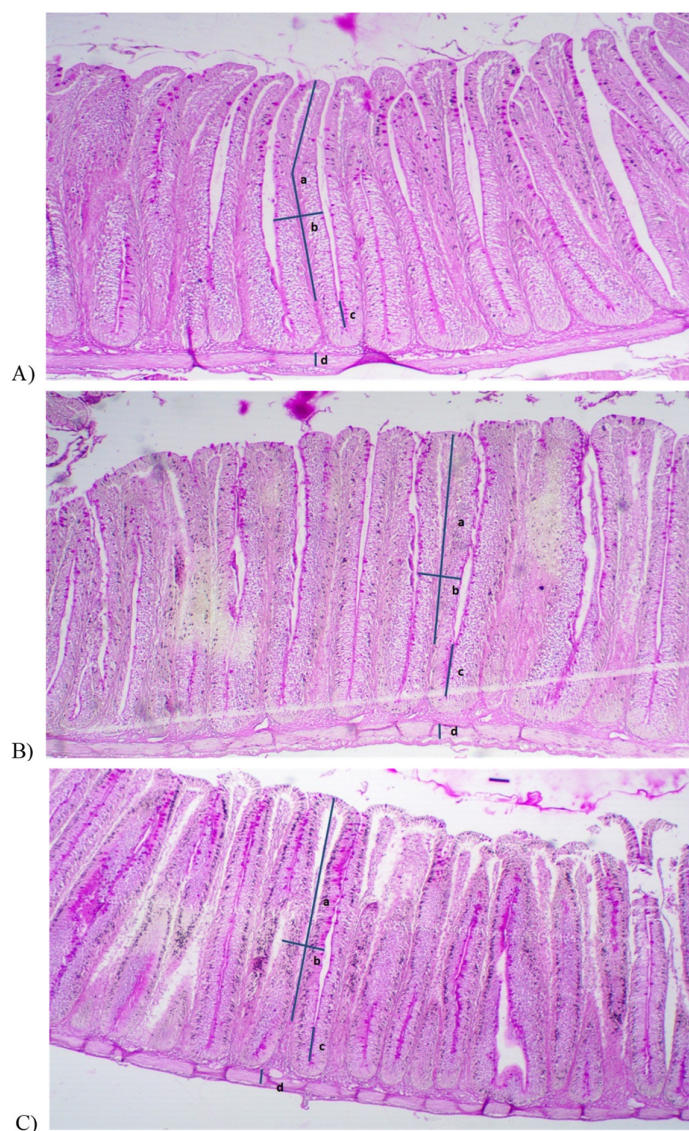


Figure 2. Light microscopy of the anterior portion of the intestine of common carp fed different prebiotic concentrations in the diet: (A) control group, (B) 1% Bi²tos®, (C) 2% Bi²tos®; a = villi height; b = villi width; c = crypt depth; d = tunica muscular thickness.

4. Discussion

4.1. Growth

Similarly to our results, several studies confirmed no effect of prebiotic supplementation on the growth performance of various fish species [8,39,40]. This could be explained by the fact that the effect of prebiotics may vary depending on the solubility, fish species, and water temperature [20]. In addition, as Denji et al. [41] suggested, the lack of effects of prebiotics on the growth performance of common carp may be attributed to the inability of intestinal microbiota to ferment excessive levels of prebiotics. However, in the case of animals for which rearing or environmental conditions and feed composition are optimal, there may be no effect on the growth performance, indicating use of the full genetic potential. Thus, in such cases, the effects of feed additives—including prebiotics when animal welfare is maintained or no challenging dietary or pathogenic factors are used—should be further investigated. This was done in the present study to explain the mode of prebiotic action. In this case, the presented study blood biochemistry and histomorphological parameters were analyzed.

4.2. Blood Biochemistry

In this study, we confirmed that GOS supplementation affected phosphorus (P) levels in the serum of analyzed common carp. Significantly higher values of P in B1 group compared to B2 group indicate that dietary inclusion of 1% prebiotic causes better absorption of P from the intestine. Studies with pigs suggest that P may influence the immune system and the intestinal microbiota [42]. Research carried out by Pietrzak et al. [43] on the same group of fish confirmed that dietary supplementation of Bi²tos exerted immunomodulatory effects on skin mucosa, which was manifested by mRNA expression of the genes involved in cytokine, lysozyme, and acute-phase protein production, and which activated immunomodulatory pathways leading to gene expression modulation in skin-associated lymphoid tissues (SALT) of common carp.

There were no significant differences in the protein profile (TP, albumin, globulin) between GOS treatment and control groups, which may result from the same metabolic turnover manifested in a similar degree of utilization of feed nutrients and the same protein requirements for maintaining metabolic balance. As Ebrahimi et al. [44] reported, analyses of blood samples taken from common carp for the diet supplemented with Immunogen® (Soroush Radian Co., Teheran, Iran), a prebiotic containing β-glucan and MOS (glucmannoproteins extracted from yeast *Saccharomyces cerevisiae*), revealed significant differences in the levels of TP (23.4–27.7 g/L), albumin (10.7–12.1 g/L), and globulin (12.7–15.6 g/L), and the increase in these parameters was positively correlated with doses of the prebiotic. Andrews et al. [45] observed significantly higher serum levels of TP and albumin in rohu fish (*Labeo rohita*) from the *Cyprinidae* family receiving feed with a MOS compared to the control. Better feed conversion of proteins from the food by the proteolytic action of prebiotics may be related to adherence of probiotics to intestinal mucosa and pathogen inactivation, along with modification of dietary proteins and bacterial enzymatic activity by intestinal micro flora, which influence gut mucosal permeability and regulation of the immune system [46,47].

As our analyses confirmed, GOS supplementation did not affect the lipid profile (TC, TG, and NEFA), which similarly to the protein profile, may indicate metabolic balance within all experimental groups. No significant differences in TC content between GOS-treated and control groups were found, as decreased cholesterol levels indicate a possible disease, an increased degree of physiological discomfort (stress), or a dysfunction of lipidic metabolism [48]. Our results are in line with Ye et al. [49], who reported that prebiotic (FOS and MOS) supplementation had no effect on the blood levels of TC and TG in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Studies on mice using inulin as a prebiotic have shown that intestinal fermentation of fibers suppressed plasma and liver cholesterol, as well as triglyceride levels [50].

Similarly to our results for liver enzymes obtained for carp, analyses carried out by Ahmdifar et al. [51] and Hoseinifar et al. [11] for beluga (*Huso huso*) and Amani Denji et al. [41] for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) confirmed no significant differences in the levels of ALP or ALT between experimental groups. Because the increase in plasma AST and ALT may be connected to stress conditions, hepatocellular damages, or cellular degradation [3], we may conclude that the GOS has no adverse effect on the health status or condition of fish.

Prebiotics can increase the immune resistance (tolerance) of fish to stressors. Stress induces an increase in the levels of catecholamines (adrenaline and glucagon), which stimulate the glycogenolysis, leading to an increase in blood glucose levels. Glucose in serum is a major metabolite of carbohydrate metabolism. The amount of glucose in fish blood depends on the fish species or type, range from 25 to 350 mg/dL [3]. In our study, we confirm no significant differences in terms of glucose between GOS-treated and control groups. Similarly to our results, Silva et al. [52] reported constant values of glucose in the groups of tilapia supplemented with the probiotic *Bacillus amyloliquefaciens*, while Akrami et al. [3] reported similar results for MOS-treated (active mannan oligosaccharide®, Biorigin, Lencois Paulista, São Paulo, Brazil) beluga (*Huso huso*). These results may reflect the homeostatic state of fish against adverse conditions. Similarly to our results for the TT₃ hormone (stress markers), no significant differences in levels of TT₃ were observed by Adel et al. [53] for beluga sturgeon (*Huso huso*) fed with a prebiotic (brewer's yeast), of by Mirghaed et al. [12] for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with essential oil of *Eucalyptus* sp. compared to control groups.

4.3. Histology

Based on the conducted research, we confirm that dietary supplementation of GOS has contributed to the improvement of intestinal morphometric parameters by increasing the height and width of intestinal villi, which are responsible for the intestinal absorbent surface area. Both the height and width of the villi, which are correlated with their surface area, were significantly higher in GOS-treated groups compared to control. Similar results were obtained by Yuji-Sado et al. [54], who reported a positive effect of MOS supplementation on the intestinal microstructure in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). In their study, fish fed 0.4% dietary MOS presented the highest ($p < 0.05$) intestinal fold height ($430.27 \pm 89.72 \mu\text{m}$) compared to control, while fish fed 0.4% and 0.6% dietary MOS showed significant increases in muscular layer thickness ($72.5 \pm 21.95 \mu\text{m}$ and $71.44 \pm 24.48 \mu\text{m}$, respectively). It is worth noting that in the research by Zhou et al. [55], the height of microvilli in the proximal intestine was similar in groups supplemented with various prebiotic substances, including MOS, FOS, GOS, and galacto-gluco-mannans from hemicellulose extract (Previda™), and was significantly higher compared to the control group. As Anguiano et al. [56] revealed, GOS and MOS (Bio-Mos®, Alltech, Inc., Nicholasville, KY, USA) also significantly increased the height of microvilli in the anterior intestine in red drum (*Sciaenops ocellatus*) and hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) compared to the control group. However, the increase in prebiotic levels in the diet in our research did not affect fish growth parameters. The consequences of improved intestinal morphometric parameters are better absorption and utilization of nutrients; however, supplementation with fish diet prebiotics is still controversial, because improving intestinal morphometric parameters does not always have a positive effect on growth parameters and feed utilization, which was confirmed by Dimitroglou et al. [57,58], Salze et al. [59], and Zhou et al. [55]. This can be explained by the complex structure of the oligosaccharides used, the length of their feeding period, fish breeding conditions, or the method of preparation of feed [60–62].

Improving the morphological parameters of the intestine may contribute to the increase of fish immunity and consequently improved survival. Peterson et al. [61] showed that the addition of the prebiotic derived from a specific strain of *Saccharomyces cerevisiae* (Bio-Mos®) increased survival in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), while weight gain and growth efficiency were similar. Improvement of intestinal morphology affects the maintenance of a healthy mucosal epithelium and defense against pathogenic bacteria [57]. This is due to the role played by goblet cells, which are specialized epithelial cells responsible for the secretion and distribution of mucins and that form a mucus layer, which has a protective function against mechanical and enzymatic damage to the intestine, as well as against pathogens. Torrecillas et al. [63], in their research on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), observed that prebiotics, including MOS (Bio-Mos®), may increase the secretion of mucus in the intestines. To improve the passage of food, the muscular layer responsible for intestinal peristalsis grows thicker, which was also observed in our own study.

5. Conclusions

The results of the present study revealed that prebiotics could be a potential dietary additive for farmed common carp. The supplementation of feed with 1% and 2% GOS significantly enhanced the development of the intestine, increased the height and width of the villi, and increased their surface area. In our study, the supplementation of a prebiotic had an effect on higher phosphorus absorption in the intestine. No differences in the biochemical blood parameters between the experimental groups may indicate maintenance of the metabolic balance of fish due to the prebiotic used. Similarly, the lack of changes in growth performance parameters under GOS treatment (in good rearing conditions) indicates that fish may be more resistant to potential deterioration of conditions or negative impacts of the environment and pathogens. The present study indicates that the prebiotic can be used as a feed supplement to modulate the intestinal histomorphology in common carp. Further research on the effects of prebiotics should be carried out, because fluctuations in hematological and biochemical variables may be associated with characteristics of species, inclusion rates of supplements, ingredients of diets, and rearing periods.

Author Contributions: conceptualization, E.Z., M.S.; methodology, E.Z., M.S., J.B., and J.M.; formal analysis, M.S.; investigation, E.Z., M.R., A.D., and M.S.; resources, M.S., J.M., and J.B.; data curation, E.Z., M.R., A.D., and M.S.; writing—original draft preparation, M.S., E.Z.; writing—review and editing, M.S., J.B., J.M., M.R., and E.Z.; visualization, M.S., J.B., J.M.; supervision, M.S., J.B.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

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

References

1. Akhter, N.; Wu, B.; Memon, A.M.; Mohsin, M. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish Shellfish Immunol.* **2015**, *45*, 733–741.
2. Uzar, T.; Andrzejewski, W.; Mazurkiewicz, J. Microbiome of the digestive tract and probiotic therapy in cyprinids. *Pol. J. Nat. Sci.* **2019**, *34*, 157–170.
3. Akrami, R.; Mansour, M.R.; Ghobadi, S.; Ahmadifar, E.; Khoshroudi, M.S.; Haji, M.S.M. Effect of prebiotic mannan oligosaccharide on hematological and blood serum biochemical parameters of cultured juvenile great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1754). *J. Appl. Ichthyol.* **2013**, *29*, 1214–1218.
4. Havenaar, R.; Bonnin-Marol, S.; Van Dokkum, W.; Petites, S.; Schaafsma, G. Inulin: Fermentation and microbial ecology in the intestinal tract. *Food Rev. Int.* **1999**, *15*, 109–120.
5. Kumari, J.; Sahoo, P.K. Dietary beta-1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, *Clarias batrachus* (L.). *J. Fish Dis.* **2006**, *29*, 95–101.
6. Paulsen, S.M.; Lunde, H.; Engstad, R.E.; Robertsen, B. In vivo effects of beta-glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.* **2003**, *14*, 39–54.
7. Hoseinifar, S.H.; Soleimani, N.; Ringø, E. Effects of dietary fructo-oligosaccharide supplementation on the growth performance, haemato-immunological parameters, gut microbiota and stress resistance of common carp (*Cyprinus carpio*) fry. *Br. J. Nutr.* **2014**, *112*, 1296–1302.
8. Gultepe, N.; Hisar, O.; Salnur, S.; Hossu, B.; Tansel Tanrikul, T.; Aydin, S. Preliminary assessment of dietary mannan oligosaccharides on growth performance and health status of gilthead seabream (*Sparus auratus*). *J. Aquat. Anim. Health* **2012**, *24*, 37–42.
9. Akrami, R.; Gharaei, A.; Karami, R. Age and sex specific variation in hematological and serum biochemical parameters of beluga (*Huso huso* Linnaeus, 1758). *IJAB* **2013**, *1*, 132–137.
10. Blaxhall, P.C.; Daisley, K.W. Routine haematological methods for use with fish blood. *J. Fish Biol.* **1973**, *5*, 771–781.
11. Hoseinifar, S.H.; Mirvaghefi, A.; Merrifield, D.L.; Amiri, B.M.; Yelghi, S.; Bastami, K.D. The study of some haematological and serum biochemical parameters of juvenile beluga (*Huso huso*) fed oligofructose. *Fish Physiol. Biochem.* **2011**, *37*, 91–96.
12. Mirghaed, A.T.; Hoseini, S.S.M.; Ghelichpour, M. Effects of dietary 1,8-cineole supplementation on physiological, immunological and antioxidant responses to crowding stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* **2018**, *81*, 182–189.
13. Guerreiro, I.; Olivia-Teles, A.; Enes, P. Prebiotics as functional ingredients: Focus on Mediterranean fish aquaculture. *Rev. Aquac.* **2018**, *10*, 800–832.
14. Asaduzzaman, M.D.; Iehata, S.; Aker, S.; Kader, M.D.A.; Ghosh, S.K.; Nurul Absar Khan, M.; Abol-Muna, A.B. Effects of host gut-derived probiotic bacteria on gut morphology, microbiota composition and volatile short chain fatty acids production of Malaysian Mahseer Tor tambroides. *Aquac. Res.* **2018**, *9*, 53–61.
15. Akter, M.N.; Sutriana, A.; Talpur, A.D.; Hashim, R. Dietary supplementation with mannan oligosaccharide influences growth, digestive enzymes, gut morphology, and microbiota in juvenile stripes catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Aquac. Int.* **2016**, *24*, 127–144.
16. Qiyu, X.; Qing, Z.; Hong, X.; Changan, W. Dietary glutamine supplementation improves growth performance and intestinal digestion/absorption ability in young hybrid sturgeon (*Acipenser schrenckii* ♀ × *Huso dauricus* ♂). *J. Appl. Ichthyol.* **2011**, *27*, 721–726.
17. Yang, H.; Li, X.; Huan, D.; Xu, Z.; Zhang, Y.; Leng, X. Effect of three positively buoyant dietary supplements on the buoyancy of feces, growth and intestinal health Tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquac. Fish.* **2018**, *3*, 72–78.

18. Korylyak, M.Z. Morphological characteristics intestine two-years carp hepatopancreas and in applying milled fruits thistle. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series. Vet. Sci.* **2015**, *17*, 218–223.
19. Zhang, R.; Wang, X.W.; Zhu, J.Y.; Liu, L.L.; Liu, Y.C.; Zhu, H. Dietary sanguinarine affected immune response, digestive enzyme activity and intestinal microbiota of Koi carp (*Cyprinus carpioid*). *Aquaculture* **2019**, *502*, 72–79.
20. Dawood, M.A.O.; Koshio, S. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review. *Aquaculture* **2016**, *454*, 243–251.
21. Hoseinifar, S.H.; Ahmadi, A.; Raeisi, M.; Hoseini, S.M.; Khalili, M.; Behnampour, N. Comparative study on immunomodulatory and growth enhancing effects of three prebiotics (galactooligosaccharide, fructooligosaccharide and inulin) in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquac. Res.* **2017**, *48*, 3298–3307.
22. Mehrabi, F.; Khalesi, M.K.; Hazaie, K. Effects of Pre- and Probiotics on Growth, Survival, Body Composition, and Hematology of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Fry from the Caspian Sea Introduction. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* **2018**, *18*, 597–602.
23. Tzortzis, G.; Goulas, A.K.; Gibson, G.R. Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *68*, 412–416.
24. Pokusaeva, K.; Fitzgerald, G.F.; Sinderen, D. Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. *Genes Nutr.* **2011**, *6*, 285.
25. Bednarczyk, M.; Stadnicka, K.; Kozłowska, I.; Abiuso, C.; Tavaniello, S.; Dankowiakowska, A. Influence of different prebiotics and mode of their administration on broiler chicken performance. *Animal* **2016**, *10*, 1–9.
26. Sławińska, A.; Dunisławska, A.; Plowiec, A.; Radomska, M.; Lachmanska, J.; Siwek, M.; Tavaniello, S.; Maiorano, G. Modulation of microbial communities and mucosal gene expression in chicken intestines after galactooligosaccharides delivery In Ovo. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0212318.
27. Bogucka, J.; Dankowiakowska, A.; Elminowska-Wenda, G.; Sobolewska, A.; Szczerba, A.; Bednarczyk, M. Effects of prebiotics and synbiotics delivered in ovo on broiler small intestine histomorphology during the first days after hatching. *Folia Biol.* **2016**, *64*, 131–143.
28. Sobolewska, A.; Bogucka, J.; Dankowiakowska, A.; Elminowska-Wenda, G.; Stadnicka, K.; Bednarczyk, M. The impact of synbiotic administration through in ovo technology on the microstructure of a broiler chicken small intestine tissue on the 1st and 42nd day of rearing. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2017**, *8*, 61.
29. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *J. Eur. Union* **2010**, *276*, 33–79.
30. NRC. *Nutrient Requirement of Fish and Shrimp. Animal Nutrition Series*; The National Academies Press: Washington, DC, USA, 2011.
31. De Silva, S.S.; Anderson, T.A. *Fish Nutrition in Aquaculture*; Chapman & Hall: London, UK, 1995; p. 319.
32. Takeuchi, T.; Satoh, S.; Kiron, V. Common carp, *Cyprinus carpio*. In *Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture*; Webster, C.D., Lim, C., Eds.; CABI Publishing: New York, NY, USA, 2002; pp. 245–261.
33. Horváth, L.; Tamás, G.; Seagrave, C. *Carp and Pond Fish Culture*, 2nd ed.; Blackwell Science: Oxford, UK, 2002.
34. Miyatake, H. Carp. *Yoshoku* **1997**, *34*, 108–111. (In Japanese)
35. Hoffmann, L.; Rawski, M.; Nogales-Merida, S.; Mazurkiewicz, J. Dietary inclusion of *Tenebrio molitor* meal in sea trout larvae rearing: Effects on fish growth performance, survival, condition, and GIT and liver enzymatic activity. *Ann. Anim. Sci.* **2020**. doi:10.2478/aoas-2020-0002.
36. Jozefiak, A.; Nogales-Merida, S.; Rawski, M.; Kierończyk, B.; Mazurkiewicz, J. Effects of insect diets on the gastrointestinal tract health and growth performance of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt, 1869). *BMC Veter. Res.* **2019**, *15*, 348.
37. Sakamoto, K.; Hirose, H.; Onizuka, A.; Hayashi, M.; Futamuta, N.; Kawamura, Y.; Ezaki, T. Quantitative study of changes in intestinal morphology and mucus gel on total parenteral nutrition in rats. *J. Surg. Res.* **2000**, *94*, 99–106.
38. Uni, Z.; Ganot, S.; Sklan, D. Post-hatch development of mucosal function in the broiler small intestines. *Poult. Sci.* **1998**, *77*, 75–82.

39. Akrami, R.; Karimabadi, A.; Mohammadzadeh, H.; Ahmadifar, E. Effect of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, survival, body composition and salinity stress resistance in Kutum (*Rutilus frisii kutum*) fry stage. *J. Mar. Sci. Technol.* **2010**, *8*, 47–57.
40. Talpur, A.D.; Munir, M.B.; Mary, A.; Hashim, R. Dietary probiotics and prebiotics improved food acceptability, growth performance, hematology and immunological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in snakehead (*Channa striata*) fingerlings. *Aquaculture* **2014**, *426–427*, 14–20.
41. Amani Denji, K.; Razeghi Mansour, M.; Akrami, R.; Ghobadi, S.; Jafarpour, S.A.; Mirbeygi, S.K. Effect of dietary prebiotic mannan oligosaccharide (MOS) on growth performance, intestinal microflora, body composition, haematological and blood serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *J. Fish Aquat. Sci.* **2015**, *10*, 255–265.
42. Heyer, C.M.E.; Weiss, E.; Schmucker, S.; Rodehutsord, M.; Hoelzle, L.E.; Mosenthin, R.; Stefanski, V. The impact of phosphorus on the immune system and the intestinal microbiota with special focus on the pig. *Nutr. Res. Rev.* **2015**, *28*, 67–82.
43. Pietrzak, E.; Mazurkiewicz, J.; Slawinska, A. Innate Immune Responses of Skin Mucosa in Common Carp (*Cyprinus Carpio*) Fed a Diet Supplemented with Galactooligosaccharides. *Animals* **2020**, *10*, 438.
44. Ebrahimi, G.; Ouraji, H.; Khales, M.K.; Sudagar, M.; Barari, A.; Zarei Dangesaraki, M.; Jani Khalili, K.H. Effects of a prebiotics, Immunogen® on feed utilization, body composition, immunity and resistance of *Aeromonas hydrophila* infection in the common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus) fingerlings. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2012**, *96*, 591–599.
45. Andrews, S.R.; Sahu, N.P.; Pal, A.K.; Kumar, S. Haematological modulation and growth of Labeo rohita fingerlings: Effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. *Aquac. Res.* **2009**, *41*, 61–69.
46. Mátéová, S.; Saly, J.; Tuèková, M.; Koscová, J.; Nemcová, R.; Gaálová, M.; Baranová, D. Effect of probiotics, prebiotics and herb oil on performance and metabolic parameters of broiler chickens. *MedWet* **2008**, *64*, 294–297.
47. Chang, C.F.; Su, M.S.; Chen, H.Y.; Liao, I.C. Dietary β -1,3-betaglucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.* **2003**, *15*, 297–310.
48. Patriche, T.; Patriche, N.; Bocioc, E.; Coadă, M.T. Serum biochemical parameters of farmed carp (*Cyprinus carpio*). *AAFL Bioflux* **2011**, *4*, 137–140.
49. Ye, J.D.; Wang, K.; Li, F.D.; Sun, Y.Z. Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquac. Nutr.* **2011**, *17*, e902–e912.
50. Mistry, R.H.; Gu, F.; Schols, H.A.; Verkade, H.J.; Tietge, U.J.F. Effect of the prebiotic fiber inulin on cholesterol metabolism in wildtype mice. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 13238.
51. Ahmdifar, E.; Akrami, R.; Ghelichi, A.; Zarejabad, A. Effects of different dietary prebiotic inulin levels on blood serum enzymes, hematologic, and biochemical parameters of great sturgeon (*Huso huso*) juveniles. *Comp. Haematol. Int.* **2011**, *20*, 447–451.
52. Silva, T.F.A.; Petrillo, T.R.; Yunis-Aguinaga, J.; Marcusso, P.F.; Claudiano, G.S.; de Moraes, F.R.; de Moraes, J.R.E. Effects of the probiotics *Bacillus amyloliquefaciens* on growth performance, hematology and intestinal morfometry in cage-reared Nile tilapia. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* **2015**, *43*, 963–971.
53. Adel, M.; Nayak, S.; Lazzado, C.C.; Yeganeh, S. Effect of dietary prebiotic GroBiotic®—A on growth performance, plasma thyroid hormones and mucosal immunity of great sturgeon, *Huso huso* (Linnaeus, 1758). *J. Appl. Ichthyol.* **2016**, *32*, 825–831.
54. Yuji-Sado, R.; Raulino-Domanski, F.; de Freitas, P.; Baioco-Sales, F. Growth, immune status and intestinal morphology of Nile tilapia fed dietary prebiotics (mannan oligosaccharides-MOS). *Lat. Am. J. Aquat. Res.* **2015**, *43*, 944–952.
55. Zhou, Q.C.; Buentello, J.A.; Gatlin, D.M. Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* **2010**, *309*, 253–257.
56. Anguiano, M.; Pohlenz, C.; Buentello, A.; Gatlin, D.M. The effects of prebiotics on the digestive enzymes and gut histomorphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*) and hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). *Br. J. Nutr.* **2013**, *109*, 623–629.

57. Dimitroglou, A.; Merrifield, D.L.; Spring, P.; Sweetman, J.; Moate, R.; Davies, S.J. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilization, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **2010**, *300*, 182–188.
58. Dimitroglou, A.; Davies, S.J.; Sweetman, J.; Pascal, D.; Chatzifotis, S. Dietary supplementation of mannanoligosaccharide on white sea bream (*Diplodus sargus* L.) larvae: Effects on development, gut morphology and salinity tolerance. *Aquac. Res.* **2010**, *41*, 245–251.
59. Salze, G.; Mclean, E.; Schwarz, M.H.; Craig, S.R. Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia. *Aquaculture* **2008**, *274*, 148–152.
60. Pryor, G.S.; Royes, J.B.; Chapman, F.A.; Miles, R.D. Mannan oligosaccharides in fish nutrition: Effects of dietary supplementation on growth and gastrointestinal villi structure in Gulf of Mexico sturgeon. *N. Am. J. Aquac.* **2003**, *65*, 106–111.
61. Peterson, B.C.; Booth, N.J.; Barrows, F.T.; Manning, B.B. Improved survival in channel catfish fed mannanoligosaccharides in an extruded diet. *Open J. Anim. Sci.* **2012**, *2*, 57–61.
62. Torrecillas, S.; Makol, A.; Caballero, R.J.; Montero, D.; Robaina, R.; Real, F.; Sweetman, J.; Tort, L.; Izquierdo, M.S. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish Shellfish Immunol.* **2007**, *23*, 969–981.
63. Torrecillas, S.; Makol, A.; Caballero, M.J.; Montero, D.; Ginés, R.; Sweetman, S.; Izquierdo, M. Improved feed utilization, intestine mucus production and immune parameters in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) feed mannan oligosaccharides (MOS). *Aquac. Nutr.* **2011**, *17*, 223–233.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Effects of a Trans-Galactooligosaccharide on Minerals Content of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Tissues

Ewa Ziółkowska¹ · Joanna Bogucka¹ · Jan Mazurkiewicz² · Mateusz Rawski² · Szymon Rózański³ · Magdalena Stanek¹

Received: 28 October 2020 / Accepted: 13 January 2021 / Published online: 26 January 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

Common carp (*Cyprinus carpio* L.) is a dominant fish species in aquaculture, and as it is a stomachless species, absorption and digestion of nutrients take place in the intestine. The aim of the study was to evaluate the effects of a prebiotic on the content of selected minerals found in the meat, gills, and skeleton of common carp. The research applied trans-galactooligosaccharide (GOS) prebiotic produced by enzymatic transgalactosylation of milk lactose by whole cells of *Bifidobacterium bifidum*. The following diets have been applied: control diet without feed additives (C), diet 2 (B1) with 1% of GOS, and diet 3 (B2) with 2% of GOS. In the freeze-dried samples, concentrations of the analyzed metals were determined using atomic absorption spectroscopy (AAS). The content of phosphorus was determined using colorimetric method. The analyses confirmed that the highest level of Mg was detected in the skeleton of fish fed with 1% GOS (2.51 g kg⁻¹) and was significantly higher compared the control treatment (2.11 g kg⁻¹) ($P < 0.05$). Zn content in fish meat fed with 1% GOS (35.41 mg kg⁻¹) was significantly higher ($P < 0.05$) than in the control group (24.59 mg kg⁻¹). The tissue that accumulated the greatest amount of Zn was the gills. GOS had a positive effect on Fe accumulation in the meat, gills, and skeleton. It has been concluded that supplementation of feed with 2% GOS significantly influenced the positive correlations between Mg and P in the meat and skeleton, Fe–Ca correlation in gills, and Fe–Zn correlation in the skeleton.

Keywords Prebiotic · Carp · Meat · Gills · Skeleton · Minerals

Introduction

Fish is one of the most valuable food sources of minerals, the concentration of which is influenced by many endogenous and exogenous factors. There are many factors present in the feed that can inhibit the absorption of minerals, e.g., phytates, fibers, and heavy metals [1–3]. Moreover, the degree of mineral absorption is influenced by the physicochemical

properties of water, such as hardness, salinity, and pH [3, 4]. Changes in the dietary composition and mineral concentration of rearing water could have an impact on the mineral balance in fish tissues and proper physiological state of animals. One of the most serious health and economic problems in the world of marine and freshwater aquaculture is the fish body deformation [5, 6]. Initially, deformations of the food-based skeleton were explained by the vitamin C deficiency in diet, yet currently the main cause of these deformations has been attributed to the deficiency of minerals [6]. A research has confirmed that the presence and proper balance between Ca, P, Mg and Zn are necessary for the correct mineralization of the fish skeleton [3, 6, 7]. Moreover, since excessive Fe intake inhibits Zn absorption (antagonistic effect), analyzing Fe levels should also be considered.

Common carp (*Cyprinus carpio* L.) has been a dominant fish species in the world aquaculture production [8] and was the first species introduced into Polish aquaculture. The first records on farming date back to the twelfth century, and after the year 1550, common carp accounted for about 75–80% of all fish farmed in ponds. Poland and the Czech Republic are

✉ Ewa Ziółkowska
ewa.ziolkowska@utp.edu.pl

¹ Department of Animal Physiology, Physiotherapy and Nutrition, Faculty of Animal Breeding and Biology, UTP University of Science and Technology, Mazowiecka 28, 85-004 Bydgoszcz, Poland

² Division of Inland Fisheries and Aquaculture, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 71C, 60-625 Poznań, Poland

³ Laboratory of Feed and Raw Animal Materials, Faculty of Animal Breeding and Biology, UTP University of Science and Technology, Mazowiecka 28, 85-004 Bydgoszcz, Poland

the largest producers of common carp in the European Union, and the annual production of consumable common carp in Poland ranges between 15 and 23,000 t [9, 10]. Common carp is an omnivorous species with low nutritional requirements, both in terms of the feed composition and its production technology. In addition, common carp farmed in ponds largely relies on a natural diet which usually consists of the biomass produced by the pond. Carp does not have functional stomach, and digestion takes place in the intestine hence from digestibility food, and assimilation is limited. Due to the fact that the cyprinids do not have acid-secreting stomachs, the mineral absorption from organic compounds (in particular phosphorus) may be reduced [11, 12].

In recent years, the influence of various factors on the degree of fish mineralization has been studied such as different starter diets or water temperature [6, 13–15]. To our knowledge, there is little data available on the effect of prebiotics on the accumulation of minerals in different tissues of common carp. As confirmed by research prebiotics (e.g., fructooligosaccharides (FOS), transgalactooligosaccharides (t-GOS), inulin, and mannanooligosaccharides (MOS)) have a positive effect on the gut microbiota composition. They inhibit the growth of pathogenic gut microbial flora while stimulating the growth of microorganisms beneficial for the animal host. Beneficial gut bacteria can improve the body's natural defenses, synthesize vitamins, and bind toxins and heavy metals. In aquaculture, prebiotics are increasingly used due to their positive effect on growth stimulation, use of feed, gut microflora, gut morphology, immune system, and disease resistance [8, 16–23]. These bioactive substances play an important role in regulating mineral metabolism, mineral bioavailability, and bone health [23–27]. Moreover, prebiotics affect the production of short-chain fatty acids, lowering the intestinal pH, regulating the factors responsible for the transport of divalent metals, thanks to which they improve the absorption of metals and skeletal health [28–32]. Some authors confirmed, that prebiotics and their products of fermentation by intestinal microflora have an enhancing effect on Fe and Zn absorption [23, 24, 33, 34]. Therefore, it definitely seemed valid to analyze the degree of absorption of minerals by carp family member (representatives of the *Cyprinidae* family) under prebiotic supplementation.

The prebiotic used in this experiment, under the trade name Bi²tos, is manufactured by Clasado (Biosciences Ltd., Jersey, UK) by enzymatic transgalactosylation of milk lactose by whole cells of *Bifidobacterium bifidum* 41171. For this reason, Bi²tos specifically promotes growth of *Bifidobacterium* spp. [35]. Our previous research revealed that the supplementation of feed with 1% and 2% Bi²tos significantly enhanced the development of the intestine, increased the height and width of the villi, and increased their surface area [36], which may contribute to increased absorption of nutrients from the gut.

The aim of the present study was to analyze the effects of dietary supplementation of a trans-galactooligosaccharide

(GOS) on the content of selected minerals in the meat, gills, and skeleton of common carp and on the correlations between minerals analyzed.

Material and Methods

Studies on live animals were carried out in strict accordance with the recommendations of the National Ethics Commission (Warsaw, Poland). All members of the research staff were trained in animal care, handling, and euthanasia. Fish health and welfare and the environmental conditions in the experimental tanks were checked twice daily by visual observation of animal behavior and by checking water quality parameters, such as oxygen saturation, temperature, and water flow. After sedation, the animals were decapitated according to the American Veterinary Medical Association Guidelines for the Euthanasia of Animals [37]. According to Polish law and an EU directive (no 2010/63/EU) [38], the experiments conducted in this study did not require approval from the Local Ethical Committee for Experiments on Animals in Poznań.

Experimental Diets

The experimental diets were calculated as isonitrogenous (35.1% crude protein) and isoenergetic (18.5 MJ kg⁻¹) with less than 4% of crude fiber and were formulated according to common carp nutritional requirements [39–41]. Three experimental diets were used: control diet 1 (C) without feed additives, diet 2 with 1% of GOS (B1), and diet 3 (B2) with 2% of GOS (Table 1).

The experimental diets were prepared according to the following procedures below:

1. Preparation of components of the diets: individual components weighed out; ground in a percussion mill until very fine (mesh size 1 mm).
2. Preparation of the premix: vitamin and mineral components, soybean lecithin, choline chloride, chalk, and prebiotic were added to the carrier (soybean meal); mixed for 5 min in a cubic mixer.
3. Preparation of the diets: all ingredients and the premix mixed in a drum mixer for 5 min.
4. Conditioning the diets: hot water added; mixed in blade mixer for 5 min.
5. Extrusion: Metalchem S-60 single screw warm extruder (Gliwice, Poland), the extrusion conditions were as follows: a 90 °C cylinder temperature in the zone of increasing pressure, a 100 °C cylinder temperature in the zone of high pressure, a 110 °C head temperature, a 52-rpm speed screw, and a 6-mm nozzle diameter.
6. Drying: on mesh under a stream of heated air.
7. Sifting: the dust fraction sifted off in a percussion sifter.

Table 1 Dietary formulation and proximate composition of feed

Ingredient	Composition (%)		
	C	B1	B2
Fish meal ¹	12.3	12.3	12.3
Blood meal ²	10.0	10.0	10.0
DDGS ³	11.0	11.0	11.0
Soybean meal ⁴	15.0	15.0	15.0
Rapeseed meal ⁵	10.0	10.0	10.0
Wheat meal	32.8	31.8	30.8
Fish oil ⁶	4.6	4.6	4.6
Soybean lecithin ⁷	1.0	1.0	1.0
Vitamin-mineral premix ⁸	1.5	1.5	1.5
Vitamin premix ⁹	0.1	0.1	0.1
Choline chloride	0.2	0.2	0.2
Fodder chalk	1.5	1.5	1.5
Prebiotic ¹⁰	0.0	1.0	2.0
Proximate composition (% dry matter)			
Crude protein	35.06		
Crude lipid	9.08		
Crude fiber	3.93		
Total phosphorus	0.83		
Calcium	1.36		
Ash	7.17		
Gross energy (MJ·kg ⁻¹)	18.51		
Essential amino acids	g/100 g of crude protein		
Arginine	4.53		
Histidine	2.8		
Lysine	3.5		
Tryptophan	1.04		
Phenylalanine + tyrosine	4.96		
Methionine + cysteine	1.75		
Threonine	3.13		
Leucine	6.72		
Isoleucine	3.9		
Valine	4.97		

¹ Danish fishmeal, Type F, 72% total protein, 12% fat, FF Ska-gen, Denmark

² AP 301 P, 92% total protein, APC (GB) Ltd., Ings Road, Doncaster, UK

³ Dried distillers grains with solubles, >45% total protein, <6% ash

⁴ Toasted, 46–47% total protein, 1% fat

⁵ 33% total protein, 2% fat

⁶ Agro-fish, Kartoszyo, Poland

⁷ BergaPure, deoiled lecithin, 97% pure lecithin, Berg + Schmidt GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany

⁸ Polfamix W, BASF Polska Ltd. Kutno, Poland—1 kg contains vitamin A 1000000 IU, vitamin D3 200,000 IU, vitamin E 1.5 g, vitamin K 0.2 g, vitamin B1 0.05 g, vitamin B2 0.4 g, vitamin B12 0.001 g, nicotinic acid 2.5 g, Dcalcium pantothenate 1.0 g, choline chloride 7.5 g, folic acid 0.1 g, methionine 150.0 g, lysine 150.0 g, Fe 2.5 g, Mn 6.5 g, Cu 0.8 g, Co 0.04 g, Zn 4.0 g, J 0.008 g, carrier up to 1000.0 g

⁹ Vitazol AD3E, BOWET Drwalew, Poland—1 kg contains vitamin A 50000 IU, vitamin D3 5000 IU, vitamin E 30.0 mg, vitamin C 100.0 mg

¹⁰ Bitos® trans-galactooligosaccharide (GOS), Clasado Ltd.; dry powder containing a mixture (wt: wt) of the following oligosaccharides: 45% lactose, 9.9% disaccharides [Gal-(β1-3)-Glc; Gal-(β1-3)-Gal; Gal-(β1-6)-Gal; Gal-(α1-6)-Gal], 23.1% trisaccharides [Gal-(β1-6)-Gal-(β1-4)-Glc; Gal-(β1-3)-Gal-(β1-4)-Glc], 11.55% tetrasaccharides [Gal-(β1-6)-Gal-(β1-6)-Gal-(β1-4)-Glc], and 10.45% pentasaccharides [Gal-(β1-6)-Gal-(β1-6)-Gal-(β1-6)-Gal-(β1-4)-Glc]

8. Oiling: fish oil heated to 50 °C in quantities of 4.6% was used to coat extruded diet in a pelletizing drum.
9. Final sifting: the dust fraction sifted off in a percussion sifter.

Prepared feeds have been packed in foil bags and stored minus 18 °C until use.

Fish Culture

The 60-day growth trial was carried out in the Experimental Station for Feed Production Technology and Aquaculture in Muchocin (Poland). Three hundred one-year-old common carp (mean body weight 180 g) were used. The fish were randomly stocked into 12 concrete ponds (40 m³), at a density of 25 fish per pond according to Horváth et al. [42]. The experiment was carried out in four replications (four ponds per treatment). Each pond was equipped with an automatic band feeder allowing for the continuous supply of feed during 12 h per day. The calculated daily feed dose for each pond was given every day at 9.00 a.m., its consumption was controlled visually twice a day, and rate was corrected if needed. The daily feed dose was restricted to assure that all feed supplied was consumed. The feeding rate was calculated in consideration of fish biomass in each pond which was corrected every 10 days on the basis of control bulk weighing of all fish; measurements of the current average daily water temperature and feed consumption from previous day were used for the additional correction according to Miyatake's [43] recommendations, which resulted in feeding rate ranging from 1.8 to 3.3% of fish biomass. A constant flow of water in the experimental system was ensured by an open flow system with a mechanical pre-filtration chamber providing total exchange of water capacity in each pond every 12 h. During the experimental period, control of water physio-chemical parameters was carried out with the use of microcomputer oximeter Elmetron CO-315. Average daily water temperature and pH were studied which ranged from 17.7 °C to 22.7 °C and 7.2 to 7.6, respectively. Dissolved oxygen was kept above 3.5 mg O₂/L, and hypoxia conditions were not observed in the experiment (details are described in Ziółkowska et al. [36]).

During the experiment, fish were anesthetized by immersion in 130 mg/L tricaine methanesulfonate (MS-222, Sigma Aldrich) for weighing at 10-day intervals for feed rate control. Body weight gain (BWG), feed intake (FI), feed conversion ratio (FCR), specific growth rate (SGR), protein efficiency ratio (PER), and percentage weight gain (PWG) were calculated (details are described in Ziółkowska et al. [36]).

Sample Preparation

At the end of the experiment, four fish per pond were euthanized by immersion in 500 mg L⁻¹ of MS-222 [44] for tissue

sampling for metals analysis. The number of individuals subjected to analyses was based on earlier studies performed by Hoffman et al. [45] and Józefiak et al. [46] to provide a necessary sample size for laboratory and statistical analysis, and to avoid unnecessary animal sacrificing (according to 4R policy).

The meat samples for analyses were taken from the large side muscle of fish body above the lateral line, the gills that was branchial arch with filaments, and the skeleton that was a spine with ribs. The meat, gills, and skeleton were crumbled and freeze-dried in Lyovac GT2 freeze-drier by Finn-Aqua (Finland) (parameters: temperature – 40 °C, pressure 6·10⁻² mbar, duration at least 48 h).

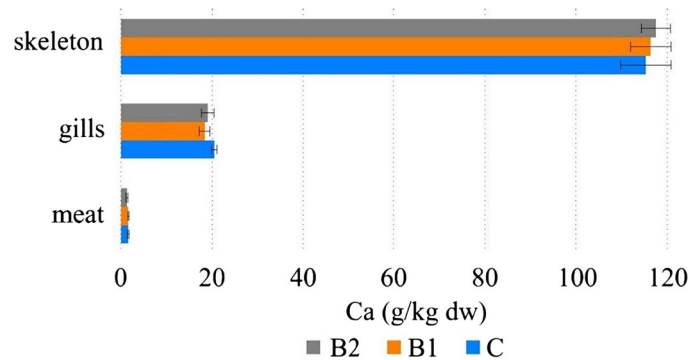
Minerals Analyses

Metal concentrations were determined in freeze-dried samples after *aqua regia* digestion (ISO 11466:1995) using atomic absorption spectroscopy (AAS) with a SOLAR S4 spectrophotometer. Phosphorus content was analyzed with colorimetric method (ISO 13730:1996), by spectrophotometer Lambda 25, Perkin-Elmer (at wavelength 430 nm). The concentrations of the metals were calculated from linear calibration plots obtained from measurements of the working standard solutions. Certified AAS Merck standard solutions were used for the calibration of the standard curves, and validation was conducted on Certified Reference Material Fish Muscle ERM®-BB422 and Certified Reference Material Aquatic Plant BCR®-670. All determinations were made in triplicate, and the data for samples of the meat were corrected to oven-dry (105 °C) moisture content. Tissue concentrations of the metals were given in mg kg⁻¹ dry weight (mg kg⁻¹ d.w.) for Zn and Fe and g kg⁻¹ dry weight (g kg⁻¹ d.w.) for Mg, Ca, and P. Minerals analyses were conducted at UTP University of Science and Technology in Bydgoszcz (Poland).

Statistical Analyses

Statistical calculations were made using Statistica 13.0 software (StatSoft 13.0). The arithmetic mean (\bar{x}) and standard deviation (SD) were calculated. Four fish per pond ($n = 16$; 16 fish for each treatment) were collected for minerals analyses. Significant differences between the groups were tested with one-way analysis of variance (ANOVA), and Tukey's test was used for multiple comparisons. The normality of the data was tested using the Shapiro-Wilk's test and the homogeneity of variance was verified by means of the Levene's test. The level of significance was determined at $P \leq 0.05$. Interrelationships between analyzed minerals in the individual tissues were determined based on the Pearson's correlation coefficients.

Fig. 1 Effect of GOS supplementation on Ca concentration (g kg^{-1} d.w.) in tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.)



Tissues/group	C	B1	B2	<i>p</i> value	SEM
skeleton	115.30	116.37	117.49	0.942900	2.53
gills	20.50	18.38	19.11	0.395628	0.64
meat	1.58	1.64	1.35	0.491700	0.10

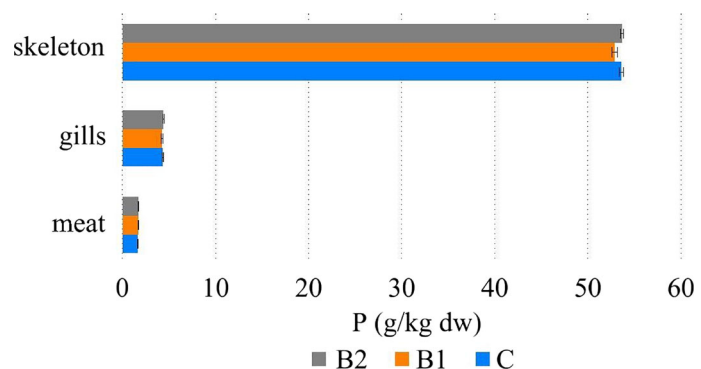
Results

Concentrations of Minerals

The results of the present study showed that Ca, Mg, and P concentration increased in tissues in the following order: meat < gills < skeleton. Zn and Fe concentration increased in the following order: meat < skeleton < gills (Figs. 1, 2, 3, 4, and 5). Analyses confirmed no statistically significant differences in Ca and P content between fish fed 1 and 2% GOS compared control treatment (0% GOS) for each tissue (Figs. 1 and 2). Ca/P ratio in the meat was 0.83, in the gills 4.65, and in the skeleton 2.13. The analyses confirmed that the value of this coefficient in the skeleton was significantly higher in B1 (2.25) and B2 (2.22) groups compared to the control (1.91). The highest level of Mg was detected in the skeleton of fish fed 1% GOS (2.51 g kg^{-1} d.w.), and was significantly higher compared control treatment (0% GOS) (2.11 g kg^{-1} d.w.), but this result was similar to the value determined for fish fed 1% GOS (2.34 g kg^{-1}). There were no statistically significant

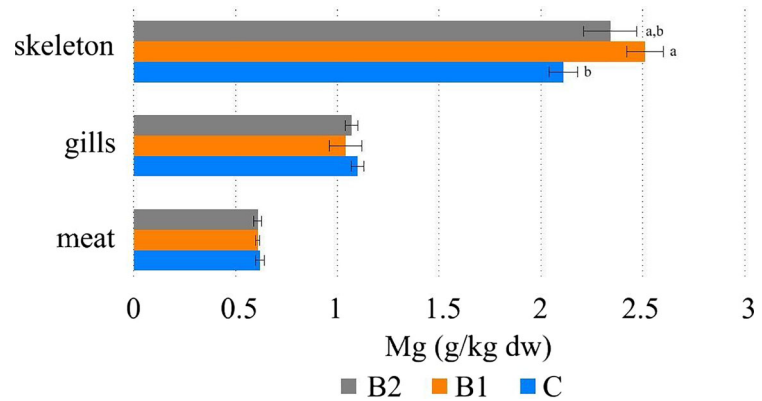
differences in Mg content between the experimental groups, both in the case of the meat and the gills (Fig. 3). The results of the present study showed that Zn contents in fish fed 1% GOS (31.21 mg kg^{-1} d.w.) and 2% GOS (35.41 mg kg^{-1} d.w.) were significantly higher than control group (24.59 mg kg^{-1}) (Fig. 4). Furthermore, it was found that enhancing feed GOS significantly affect the decrease in the Zn concentration in the skeleton. As our analyses of carp indicated, GOS addition caused statistically significant differences in Fe level between the experimental groups within all tissues (Fig. 5). Higher level of Fe was in the meat of fish fed 2% GOS ($290.32 \text{ mg kg}^{-1}$ d.w.) in comparison with control group (94.86 mg kg^{-1} d.w.) and fish fed 1% GOS ($111.33 \text{ mg kg}^{-1}$ d.w.). The concentration of this metal in the gills was in the range from $524.02 \text{ mg kg}^{-1}$ d.w. (C group) to $586.52 \text{ mg kg}^{-1}$ d.w. (B2 group), and these values differed significantly. Fe content in the skeleton differed significantly between the C group ($172.85 \text{ mg kg}^{-1}$ d.w.), B1 group (372.4 mg kg^{-1} d.w.), and B2 group ($447.89 \text{ mg kg}^{-1}$ d.w.).

Fig. 2 Effect of GOS supplementation on P concentration (g kg^{-1} d.w.) in tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.)



Tissues/group	C	B1	B2	<i>p</i> value	SEM
skeleton	53.63	52.89	53.70	0.055099	0.16
gills	4.33	4.23	4.40	0.402803	0.04
meat	1.68	1.69	1.72	0.806272	0.02

Fig. 3 Effect of GOS supplementation on Mg concentration (g kg^{-1} d.w.) in tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.)



Tissues/group	C	B1	B2	<i>p</i> value	SEM
skeleton	2.11 ^b	2.51 ^a	2.34 ^{a,b}	0.026017	0.06
gills	1.10	1.04	1.07	0.727582	0.03
meat	0.62	0.61	0.61	0.933160	0.01

values in one line marked with different letters, differ statistically significantly at $P < 0.05$; B1 – 1% Bi²tos®, B2 – 2% Bi²tos®

Correlations Between Minerals

Statistically significant correlation coefficients between Fe–Ca ($r = 0.997867$; $P < 0.05$) in the gills and Fe–Zn ($r = 0.997237$; $P < 0.05$) in the skeleton were observed in B2 group. Also, positive correlation coefficients between Mg–P in the meat ($r = 0.999855$; $P < 0.05$) and in the skeleton ($r = 0.995238$; $P < 0.05$) were calculated in B2 group (Table 2).

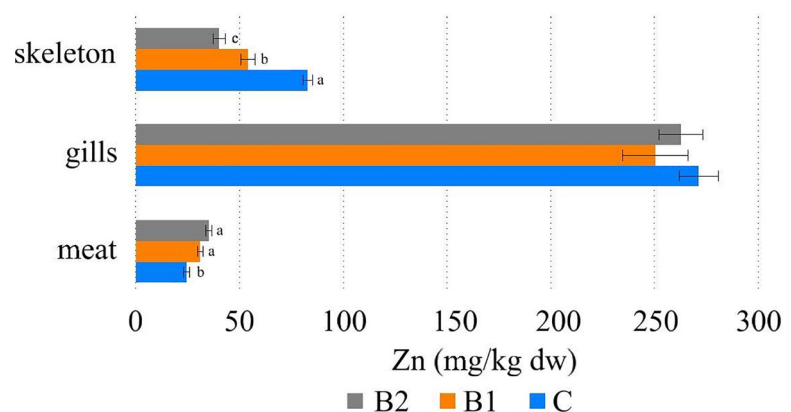
Discussion

Calcium Concentrations

Calcium (Ca) is one of the most abundant cations in the fish body and affects the structure of the skeletal system and

maintaining a proper acid-base balance. Absorption of Ca from the gastrointestinal tract is controlled by hormones such as parathyroid hormones (PTH), calcitonin, and 1,25-dihydroxycholecalciferol [3]. As confirmed by research, muscle tissue is not the main site of Ca accumulation in fish as opposed to the fish scales, bones, and skin [3, 47]. Our results on Ca accumulation in various tissues of common carp were in agreement with Brucka-Jastrzębska et al. [48] and Łuczyńska et al. [49]. Numerous studies have confirmed that prebiotics such as oligofructose, inulin, galactooligosaccharides, resistant starches, and lactulose effectively stimulate Ca absorption [2, 50]. It has been hypothesized that short-chain fatty acids (SCFA), acetate, propionate, and butyrate, and other organic acids (e.g., lactate) produced by prebiotics lower the pH of light in the large intestine, which is associated with an increased amount of soluble Ca, especially in the caecum [33]. Studies

Fig. 4 Effect of GOS supplementation on Zn concentration (mg kg^{-1} d.w.) in tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.)



Tissues/group	C	B1	B2	<i>p</i> value	SEM
skeleton	82.63 ^a	54.16 ^b	40.23 ^c	< 0.000001	3.41
gills	271.31	250.41	262.97	0.489796	7.06
meat	24.59 ^b	31.21 ^a	35.41 ^a	0.000029	1.10

values in one line marked with different letters, differ statistically significantly at $P < 0.05$; B1 – 1% Bi²tos®, B2 – 2% Bi²tos®

have shown that the effect of the prebiotic on Ca absorption depends on the content of this mineral in the diet. Effect of GOS on Ca absorption was more effective when dietary Ca was higher than the recommended level [50, 51]. Our analyses showed no statistically significant differences in Ca content between fish fed 1 and 2% GOS compared control treatment (0% GOS) for each tissue. Therefore, further research is necessary to analyze the effect of different amounts of Ca in the diet on the effectiveness of the prebiotic activity on Ca absorption. Ortiz et al. [33] determined that content of Ca in the fillet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) was not affected by prebiotic supplementation at inclusion level of 5 g kg⁻¹ (FOS oligofructose BENE0 P95; Beneo-Orafti Españã SL, Barcelona, Spain). The lack of effect of the prebiotic on the absorption of Ca from the intestine may be due to the fact that the duration of the experiment was too short [50].

Magnesium Concentration

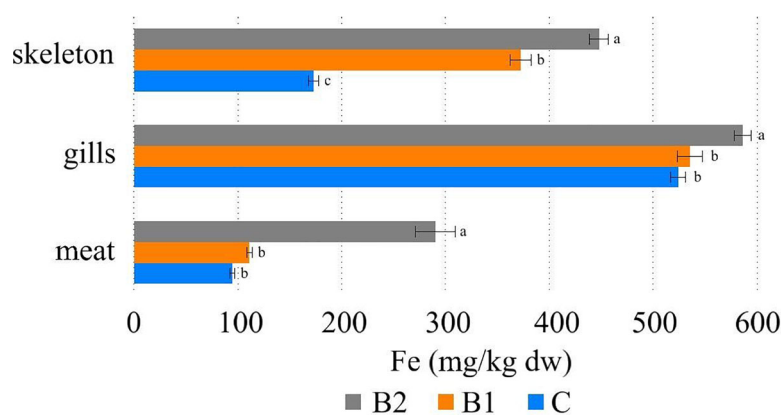
Magnesium (Mg) is a cofactor of almost 300 enzymes, and thus participates in the transformation of carbohydrates, proteins, lipids, and nucleic acids. This metal plays an important role in the transmission of information between muscles and nerves, and it inhibits the process of blood clotting, owing to which it prevents the formation of clots. Mg, like Ca and phosphorus (P), is necessary for bone mineralization and it accumulates in the greatest amounts in bones [52]. Our results regarding the level of Mg accumulation in various tissues were in line with Brucka-Jastrzębska et al. [48], Brucka-Jastrzębska and Protasowicki [53], Brucka-Jastrzębska and Kawczuga [54], and Łuczyńska et al. [49]. The results of the present study showed that the highest level of this mineral was detected in the skeleton of fish fed 1% GOS (2.51 g kg⁻¹ d.w.), and was significantly higher compared control treatment (0% GOS

(2.11 g kg⁻¹ d.w.). However, 2% GOS supplementation did not cause a significant increase in Mg content. As Guerreiro et al. [55] confirmed, it is possible that fish gut bacteria community and digestive enzymatic activity had to adapt to the dietary modification. The results of studies on the effect of prebiotics on animal health are often contradictory, as fermentability of prebiotics may be affected by several factors, such as the type and dose of the prebiotic for example. The study of Biggs et al. [56] demonstrated that excessively high prebiotic dose may have a negative impact on the gastrointestinal system and may delay the growth of animals. This could be related to the inability of gut bacteria to ferment the high amount of prebiotic provided in the diet. The opposite hypothesis is that GOS, as a prebiotic with a low degree of polymerization (PD), at a dose of 1 and 2%, proved to be too weak in relation to the enzymes responsible for mineral metabolism. So, further research is needed to understand this mechanism. Our analyses confirmed no statistically significant differences in Mg content between treatment groups, both in the case of the meat and the gills. These results were in line with Ortiz et al. [33], who demonstrated that Mg content in the fillet of rainbow trout was not affected by prebiotic supplementation at inclusion level of 5 g kg⁻¹. Factors that can reduce Mg absorption are fiber, phytates, P, Ca, or vitamin D.

Phosphorus Concentration

Phosphorus (P) is a structural component of DNA, RNA, and phospholipids, involved in the photosynthesis and synthesis of organic compounds and responsible for the proper condition of teeth and bones. Fish can be a rich source of P; the concentration of which, depending on the species, can reach up to 200 mg per 100 g of meat. Phosphorus deficiency in the fish bodies can lead to excessive fat accumulation and poor

Fig. 5 Effect of GOS supplementation on Fe concentration (mg kg⁻¹ d.w.) in tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.)



Tissue/group	C	B1	B2	<i>p</i> value	SEM
skeleton	172.85 ^c	372.40 ^b	447.89 ^a	<0.000001	20.16
gills	524.02 ^b	535.66 ^b	586.52 ^a	0.000087	6.97
meat	94.86 ^b	111.33 ^b	290.32 ^a	<0.000001	16.21

values in one line marked with different letters, differ statistically significantly at *P*<0.05; B1 – 1% Bi²tos®, B2 – 2% Bi²tos®

Table 2 Effect of GOS supplementation on mineral correlation in tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.)

Tissues	Group	Minerals	Correlation coefficients values (r)				
			Ca	P	Mg	Zn	
meat	C	P	-0.848689				
		Mg	0.578071	-0.059033			
		Zn	-0.522277	-0.007777	-0.997767		
		Fe	0.971402	-0.949999	0.367790	-0.304856	
	B1	P	0.225148				
		Mg	-0.039164	0.033006			
		Zn	0.053271	-0.218170	-0.211447		
	B2	Fe	-0.539374	0.398583	0.390499	0.037665	
		P	0.324344				
		Mg	0.308206	0.999855			
	gills	C	Zn	0.526919	0.974871	0.970941	
			Fe	-0.999823	-0.342066	-0.326032	-0.542800
P			0.451383				
Mg			0.102977	0.831992			
B1		Zn	-0.489005	0.075579	-0.082084		
		Fe	-0.342147	0.261913	0.422110	0.477769	
		P	-0.084785				
B2		Mg	0.585839	-0.857180			
		Zn	0.759106	-0.712984	0.972276		
		Fe	0.244280	-0.986924	0.928984	0.816681	
skeleton		C	P	0.472731			
			Mg	0.826345	-0.105625		
	Zn		0.197073	-0.770763	0.714970		
	Fe		0.997867	0.529242	0.787824	0.132660	
	B1	P	0.630995				
		Mg	0.759933	0.275228			
		Zn	-0.216576	-0.503354	-0.547748		
	B2	Fe	0.673275	0.240347	0.990319	-0.631448	
		P	0.531779				
		Mg	0.767650	0.380443			
	B2	Zn	-0.481985	-0.396673	-0.535817		
		Fe	-0.788896	-0.525375	-0.398765	-0.10209	
P		-0.826754					
Mg		-0.767979	0.995238				
B2	Zn	-0.455535	0.877420	0.920004			
	Fe	-0.388142	0.839356	0.888347	0.997237		

Correlation coefficients marked in bold are statistically significant with $P < 0.05$; B1-1% Bi² tos®, B2-2% Bi² tos®

skeletal mineralization and deformity [3]. It has also been shown that some phosphorus-containing compounds, such as phosphatidylinositol, play a very important role in preventing skeletal deformities [57]. Because the content of this mineral in the water is too low, and moreover, the efficiency of its absorption from feed is low, P should be supplemented with the feed [58]. Our studies have shown that as is the case of Ca, P concentration increased in the following

order: meat < gills < skeleton (Figs. 1 and 2), but there were no statistically significant differences in P content between fish fed 1 and 2% GOS compared control treatment (0% GOS) for all tissues. However, noteworthy is the moderate increase in P of 2.33% (in the meat) recorded between C and B2 groups. Similarly, Ortiz et al. [33] demonstrated that content of P in the fillet of rainbow trout was not affected by FOS supplementation at inclusion level of 5 g kg⁻¹.

In vertebrates, calcium forms a complex with phosphorus as hydroxyapatite, which is responsible for the structure and the mechanical strength of bones [59], and therefore, the Ca/P ratio is the most important indicator of good bone health because it prevents the reduction of bone mineral density [7]. The ratio of Ca to P in the whole body of several fish species ranges from 0.7 to 1.6 [7]. As numerous studies show, the value of this ratio should be 1:1 in consumed products, because the excess of calcium over phosphorus causes the formation of calcium triphosphate, which is not absorbed as this form of calcium triphosphate is not biologically available [59, 60]. Our analyses confirmed that Ca/P ratio in the skeleton was affected by GOS supplementation and its value increased from 1.91 (C group) to 2.25 (B1) and 2.22 (B2). Our results were similar to those obtained by Nwana and Swartz [12] for common carp fed phytase.

Zinc Concentration

Zinc (Zn) plays an important role in the proper functioning of an organism, especially of the immune system; it is a component of many metalloenzymes, regulates metabolism of carbohydrates, proteins, nucleic acids, and participates in insulin synthesis and in bone mineralization [60, 61]. The reduced rate of Zn uptake may be due to the presence of high amounts of calcium phosphate in feeds containing vegetable proteins, fiber, oxalates, phytates, and Fe [6]. Our results regarding Zn concentration in various tissues were in agreement with Bochenek et al. [62], Brucka-Jastrzębska et al. [48], Papagiannis et al. [63], and Jabeen et al. [64]. Prebiotic effect analyses revealed significantly higher amounts of Zn in the meat of fish from B1 and B2 groups in comparison with C group. Prebiotics like FOS and GOS promote growth of *Bifidobacterium* spp. that affect the synthesis of vitamin B6, which is responsible for better Zn absorption [65]. Since there is little data in the literature on this topic with regard to carp, further research is required. On the other hand, prebiotics affect the production of short-chain fatty acids, lowering the intestinal pH, which may contribute to better absorption of Zn. As confirmed by numerous studies, the gills play active and passive roles in exchanges between the body and its aquatic environment, and this tissue is the major storage site for Zn [3, 66, 67], which our research confirmed. However, our studies did not confirm a significantly positive effect of GOS supplementation on Zn concentration in the gills in B1 and B2 groups compared to C group, in contrast to the results obtained by Madreseh et al. [23] for rainbow trout lactulose-fed.

Iron Concentration

Iron (Fe) is a cofactor of many enzymes and a component of blood and muscle chromoproteins. This metal supports the

proper functioning of the nervous and immune systems. In addition, Fe is responsible for the detoxification of harmful substances in the liver and prevents anemia, as it is responsible for the production of red blood cells. Fe content of the muscles of fish is an important criterion for their suitability for consumption. Factors that inhibit Fe absorption from intestine are fiber, phytates, polyphenols, and tannins [3]. Fe deficiency causes anemia, but its excess leads to the formation of reactive oxygen species, resulting in cell and tissue damage. Therefore, Fe homeostasis must be strictly controlled to maintain balance [68]. Carp analyses showed that the tendency of Fe accumulation in various tissues was similar to those determined by Brucka-Jastrzębska et al. [48], Brucka-Jastrzębska and Protasowicki [53], and Tekin Özan and Aktan [69]. As our analyses indicated, GOS addition caused significantly higher level of Fe in the meat of fish fed 2% GOS in comparison with C and B1 groups. These results were in contradiction with Ortiz et al. [33]. Research confirms the beneficial effect of prebiotics on Fe absorption because fermentation of these substances by the natural intestinal microflora may lower pH and promote the reduction of Fe(III) to Fe(II), whose solubility is better. Moreover, prebiotics can stimulate the proliferation of epithelial cells to increase the absorption surface and stimulate the expression of proteins responsible for the transport of minerals in epithelial cells [24]. In our previous study with the same fish [36], a significantly accelerated development of the intestine, an increase in the height and width of the villi and an increase in their surface due to the GOS were found. As confirmed by research, propionate which is produced by intestinal fermentation of oligosaccharides may stimulate promoting 6-aminolevulinate synthesis (γ -keto carboxylic acid and precursor to the synthesis of porphyrins). Also, oligosaccharides may lead to a change in iron-binding proteins, e.g., mucin and enhance Fe absorption in the small intestine [70]. Carp analyses indicated that the tissues which contained the largest amounts of Fe were the gills. Fe is taken up by the gills in the form of free ions and chelates of this element [34]. The hypothesis is that in a highly alkaline and oxidizing environment, Fe uptake through the gill epithelium is limited. Our research supports this hypothesis as we have observed a significantly higher concentration of Fe in the gills of fish fed 1 and 2% GOS, which may be due to the prebiotic lowering environmental pH, but this mechanism requires further research.

Minerals Interactions

Antagonist relationships occur when minerals have a similar electronic configuration and ion radius and compete for binding sites. Synergistic relationships occur when one element strengthens the role of another. In turn, the complex interrelationships between Fe, Zn, and Cu are more complex [3]. Understanding the mechanism of the correlation of one

element with another can be used as an indicator of their collocation in biological tissues [71]. Studies of Wepener et al. [72] have shown that Cu (and possibly Fe) will have a greater tendency to accumulate in the gills than, for example, Zn or Ca. Our analyses confirmed positive correlation between Fe and Ca in the gills in B2 group which indicated that Ca had affinity for divalent metal transporter (DMT1) [71, 73]. It can be concluded that Fe and Ca may share uptake pathway via the DMT-1. However, it should be taken into account that the interaction between Fe and Ca depends on the form of calcium. Carbonates and phosphates, unlike calcium citrate, inhibit Fe absorption. Despite the fact that GOS supplementation did not affect the level of Ca accumulation in carp tissues, our analysis showed that 2% GOS addition caused a statistically significant increase in Fe in the gills. This could have had a significant impact on the positive correlation between these minerals in B2 group.

Positive correlations between Fe and Zn and between Mg and P in the skeleton in B2 group were calculated, despite the fact that these elements are considered antagonists to each other. Despite the fact that our studies confirmed the greatest accumulation capacity of Zn in the gills and Zn content in the skeleton was lower, this metal confirmed a synergistic interaction with Fe in the group of fish treated with 2% GOS supplementation. The interaction between Fe and Zn depends on the ratio of these metals to each other. The lack of published data on this topic requires further research on Zn metabolism, especially based on the analysis of vitamins and other minerals affecting Zn absorption.

Analyses confirmed positive correlation between Mg and P in the meat in B2 group. Although P and Mg are mainly involved in the bone mineralization process, their presence in the muscles is essential for the proper functioning of the organism. Both of these macroelements are responsible for conducting nerve impulses. Therefore, taking into account their proven antagonistic effect, the use of 2% GOS supplementation should be considered positive with regard to the correlation between these two elements. Due to the fact that there is no available published data about the effects of GOS on the relationship between minerals in carp tissues, this requires further analyses.

Conclusions

The results from the current study showed that dietary GOS supplementation had a positive effect on absorption of some minerals in common carp tissues. The feed with 1 and 2% of GOS supplementation significantly enhanced the concentration of Zn in the meat and skeleton. Fe concentration was significantly higher in the B2 group compared to B1 and C in the meat and gills. One percent and 2% GOS supplementation significantly enhanced Fe content in the skeleton. Mg

concentration was significantly higher in the skeleton of fish from B1 group compared to C group. A significant effect of 1 and 2% GOS supplementation on Ca/P ratio in the skeleton was also confirmed. Supplementation of feed with 2% GOS significantly influenced the positive correlations between Mg and P in the meat and skeleton, Fe–Ca correlation in gills, and Fe–Zn correlation in the skeleton. Based on the analysis of the mineral profile in different tissues, we can conclude that the prebiotic could be a potential dietary additive for farmed common carp, due to the significant increase in Fe and Zn, for example. The increased absorption of certain minerals may be caused due to the production of short-chain fatty acids, lowering the intestinal pH and regulating the factors responsible for the transport of divalent metals. Absorption of metals may be enhanced by vitamin synthesized by intestinal bacteria, which population is supported prebiotic. Another factor enhancing the minerals absorption may be an increase of the intestine development, an increase in the height and width of the villi, and an increase in their surface as a result of GOS supplementation, which was confirmed by our previous research on the same fish. Nevertheless, further research is needed in this topic to determine the detailed effects of GOS supplementation on minerals retention and on the interactions between minerals in different fish tissues.

Funding This work has been supported by the Polish National Agency for Academic Exchange under Grant No. PPI/APM/2019/1/00003. Research conducted by the statutory funding No. 506.511.04.00 of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science Poznan University of Life Sciences, Poland; Division of Inland Fisheries and Aquaculture.

Data Availability The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Prabhu PAJ, Schrama JW, Kaushik SJ (2016) Mineral requirements of fish: a systematic review. *Rev Aquac* 8(2):172–219. <https://doi.org/10.1111/raq.12090>
- Krupa-Kozak U, Świątecka D, Bączek N, Brzóska MM (2016) Inulin and fructooligosaccharide affect: in vitro calcium uptake and absorption from calcium-enriched gluten-free bread. *Food Funct* 7:1950–1958. <https://doi.org/10.1039/c6fo00140h>
- Lall SP (2002) The minerals. In: Halver J.E. and Hardy R.W, *Fish Nutrition* 259–308
- Lochmann R, Phillips H, Xie L (2011) Effects of a dairy–yeast prebiotic and water hardness on the growth performance, mineral composition and gut microflora of fathead minnow (*Pimephales promelas*) in recirculating systems. *Aquac* 320(1–2):76–81. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.004>
- Kamler E, Kamiński R, Wolnicki J, Sikorska J, Wałowski J (2012) Effects of diet and temperature on condition, proximate composition and three major macro elements, Ca, P and Mg, in barbel *Barbus barbus* juveniles. *Rev Fish Biol Fish* 18(4):767–777. <https://doi.org/10.1007/s11160-012-9256-8>
- Sikorska J (2010) Dietary causes of body deformities in larval and juvenile fish in aquaculture. Part 1. Mineral substances. *Komunikaty Rybackie* 4(117):1–4
- Lall SP, Lewis-McCrea LM (2007) Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish — an overview. *Aquac*. 267:3–19
- Hussein MS, Zaghlool A, Abd El Hakim NF, El Nawsany M, Abo-State HA (2016) Effect of different growth promoters on growth performance, feed utilization and body composition of common carp (*Cyprinus carpio*). *J Fish Aquat Sci* 11:370–377
- Eurostat (2018) *Agriculture, forestry and fishery statistics. Statistical books.* <https://ec.europa.eu/eurostat/documents/3217494/9455154/KS-FK-18-001-ENN.pdf/a9ddd7db-c40c-48c9-8ed5-a8a90f4faa3f>
- FAO, Fisheries and Aquaculture, National Aquaculture Sector Overview – Poland 2020. http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_poland/en
- Roberts RJ (2002) Nutritional pathology. In: Halver J.E. and Hardy R.W. (eds), *Fish Nutrition, Third Edition.* Elsevier Science 453–504
- Nwanna LC, Schwarz FJ (2007) Effect of supplemental phytase on growth, phosphorus digestibility and bone mineralization of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquac Res* 38(10):1037–1044. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01752.x>
- Kamiński R, Korwin-Kossakowski M, Kuszniarz J, Myszkowski L, Stanny A, Wolnicki J (2005) Response of a juvenile cyprinid, lake minnow *Eupallasella perenurus* (Pallas), to different diets. *Aquac Int* 13:479–486. <https://doi.org/10.1007/s10499-005-7899-3>
- Myszkowski L, Kamiński R, Quiros ML, Stanny A, Wolnicki J (2012) Dry diet-influenced growth, size variability, condition and body deformities in juvenile crucian carp *Carassius carassius* L. reared under controlled conditions. *Arch Pol Fish* 20:157–163. <https://doi.org/10.2478/v10086-012-0019-x>
- Wolnicki J, Myszkowski L, Korwin-Kossakowski M, Kamiński R, Stanny A (2006) Effects of different diets on juvenile tench, *Tinca tinca* (L.) reared under controlled conditions. *Aquac Int* 14:89–98. <https://doi.org/10.1007/s10499-005-9017-y>
- Akrami R, Razeghi Mansour M, Ghobadi S, Ahmadifar E, Shaker Khoshroudi M, Moghimi Haji MS (2013) Effect of prebiotic mannan oligosaccharide on hematological and blood serum biochemical parameters of cultured juvenile great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1754). *J Appl Ichthyol* 29:1214–1218. <https://doi.org/10.1111/jai.12245>
- Bharathi S, Cheryl A, Rajagopalasamy CBT, Uma A, Ahilan B, Aanand S (2019) Functional feed additives used in fish feeds. *Int J Fish Aquat Stud* 7(3):44–52
- Cerezuela R, Meseguer J, Esteban A (2011) Current knowledge in symbiotic use for fish aquaculture: a review. *J Aquac Res Dev S1*: 008. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.S1-008>
- Khangwal I, Shukla P (2019) Potential prebiotics and their transmission mechanisms: recent approaches. *JFDA* 27:649–656
- Mousavi E, Mohammadiazarm H, Mousavi SM, Ghatrami ER (2016) Effects of inulin, savory and onion powders in diet of juveniles carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus 1758) on gut microflora, immune response and blood biochemical parameters. *TrJFAS* 16: 831–838
- Ebrahimi G, Ouraji H, Khales MK, Sudagar M, Barari A, Zarei Dangesaraki M, Jani Khalili KH (2012) Effects of a prebiotics, Immunogen® on feed utilization, body composition, immunity and resistance of *Aeromonas hydrophila* infection in the common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus) fingerlings. *J Anim Physiol Anim Nutr* 96:591–599. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01182.x>
- Ganguly S, Dora KC, Sarkar S, Chowdhury S (2012) Supplementation of prebiotics in fish feed: a review. *Rev Fish Biol Fisheries* 23:195–199. <https://doi.org/10.1007/s11160-012-9291-5>
- Madreseh S, Ghaisari HR, Hosseinzadeh S (2019) Effect of lyophilized, encapsulated *Lactobacillus fermentum* and lactulose feeding on growth performance, heavy metals, and trace element residues in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues. *Probiotics Antimicrob Proteins* 11(4):1257–1263. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9487-7>
- Yeung CK, Glahn RP, Welch RM, Miller DD (2005) Prebiotics and iron bioavailability – is there a connection? *Int J Food Sci* 70(5):88–92
- Yousefian M, Amiri MS (2009) A review of the use of probiotic in aquaculture for fish and shrimp. *Afr J Biotechnol* 8:7313–7318 <http://www.academicjournals.org/AJB>
- Burr G, Hume M, Neill VH, Gatlin DM (2008) Effects of prebiotics on nutrient digestibility of soybean-meal-based diets by red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquacul Res* 39:1680–1686. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02044.x>
- Dawood MAO, Koshio S, Esteban MÁ (2018) Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Rev Aquac* 10(4):950–974. <https://doi.org/10.1111/raq.12209>
- Whisner CM, Castillo LF (2018) Prebiotics, bone and mineral metabolism. *Calcif Tissue Int* 102:443–479. <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0339-3>
- McCabe L, Britton RA, Parameswaran N (2015) Prebiotic and probiotic regulation of bone health: role of the intestine and its microbiome. *Curr Osteoporos Rep* 13(6):363–371. <https://doi.org/10.1007/s11914-015-0292-x>
- Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, Scott K, Stanton C, Swanson KS, Cani PD, Verbeke K, Reid G (2017) Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14:491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Haq Z, Khan AA (2018) Prebiotics: the gut ecology modifiers. *J Entomol Zool Stud* 6(3):1816–1820
- Macfarlane S, Macfarlane GT, Cummings J (2006) Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther* 24: 701–714. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.03042.x>
- Ortiz LT, Velasco RS, Rodriguez M, Trevino J, Tejedor JL, Alzueta C (2012) Effects of inulin and fructooligosaccharides on growth performance, body chemical composition and intestinal microbiota

- of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacul Nut* 19(4):475–482. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00981.x>
34. Niemiec M, Cupiał M, Klimas A, Szelaż-Sikora A, Sikora J (2014) Accumulation of iron in selected elements of the pond ecosystem food chain. *Proceedings of ECOpole* 8(1):231–237. [https://doi.org/10.2429/proc.2014.8\(1\)030](https://doi.org/10.2429/proc.2014.8(1)030)
 35. Tzortzis G, Goulas A, Gibson GR (2005) Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *Appl Microbiol Biotechnol* 68(3):412–416. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1919-0>
 36. Ziółkowska E, Bogucka J, Dankowiakowska A, Rawski M, Mazurkiewicz J, Stanek M (2020) Effects of a trans-galactooligosaccharide on biochemical blood parameters and intestine morphometric parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Animals* 10(4):723. <https://doi.org/10.3390/ani10040723>
 37. Leary S, Underwood W, Anthony R, Cartner S (2013) AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition; AVMA: Schaumburg, 67–73
 38. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes
 39. NRC (2011) Nutrient requirement of fish and shrimp. The National Academies Press, Washington, DC, Animal Nutrition Series
 40. De Silva SS, Anderson TA (1995) Fish nutrition in aquaculture. Chapman & Hall, London, 319 pp
 41. Takeuchi T, Satoh S, Kiron V (2002) Common carp, *Cyprinus carpio*. In: Webster CD, Lim C (eds) Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. CABI Publishing, New York, pp 245–261
 42. Horváth L, Tamás G, Seagrave C (2002) Carp and pond fish culture, 2nd edn. Blackwell Science, Oxford, UK
 43. Miyatake H (1997). *Carp*, *Yoshoku*, 34(5):108–111 (in Japanese)
 44. Topic Popovic N, Strunjak-Perovic I, Coz-Rakovac R, Barisic J, Jadan M, Persin Berakovic A, Sauerborn Klobucar R (2012) Tricaine methane-sulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia. *J Appl Ichthyol* 28:553–564
 45. Hoffmann L, Rawski M, Nogales-Merida S, Mazurkiewicz J (2020) Dietary inclusion of *Tenebrio molitor* meal in sea trout larvae rearing: effects on fish growth performance, survival, condition, and GIT and liver enzymatic activity. *Ann Anim Sci* 20(2): 579–598. <https://doi.org/10.2478/aoas-2020-0002>
 46. Józefiak A, Nogales-Merida S, Rawski M, Kierończyk B, Mazurkiewicz J (2019) Effects of insect diets on the gastrointestinal tract health and growth performance of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt, 1869). *BMC Vet Res* 15:348. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2070-y>
 47. Liang JJ, Liu YJ, Yang ZN, Tian LX, Yang HJ, Liang GY (2012) Dietary calcium requirement and effects on growth and tissue calcium content of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquac Nutr* 18:544–550. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00916.x>
 48. Brucka-Jastrzębska E, Kawczuga D, Rajkowska M, Protasowicki M (2009) Levels of microelements (Cu, Zn, Fe) and macroelements (Mg, Ca) in freshwater fish. *J Elem* 14(3):437–447
 49. Łuczyńska J, Tońska E, Borejszo Z. (2011) Content of macro- and microelements, and fatty acids in muscles of salmon (*Salmo salar* L.), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walb.), and carp (*Cyprinus carpio* L.). *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość* 3(76):162–172
 50. Cashman K (2003) Prebiotics and calcium bioavailability. *Curr Issues Intest Microbiol* 4:21–32
 51. Bromage N, Randall C, Duston J, Thrush Mand Jones J (1993) Environmental control of reproduction in salmonids. In *Recent Advances in Aquaculture IV* pp 55–65
 52. Perez-Conesa D, Lopez G, Abellan P, Ros G (2006) Bioavailability of calcium, magnesium and phosphorus in rats fed probiotic, prebiotic and synbiotic powder follow-up infant formulas and their effect on physiological and nutritional parameters. *J Sci Food Agric* 86:2327–2336
 53. Brucka-Jastrzębska E, Protasowicki M (2006) Levels of selected metals in tissues and organs of 5-month-old carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Sci Pol Piscaria* 5(2):3–16
 54. Brucka-Jastrzębska E, Kawczuga D (2011) Levels of magnesium in tissues and organs of freshwater fish. *J Elem* 16(1):7–20
 55. Guerreiro I, Serra CR, Pousão-Ferreira P, Oliva-Teles A, Enes P (2017) Prebiotics effect on growth performance, hepatic intermediary metabolism, gut microbiota and digestive enzymes of white sea bream (*Diplodus sargus*). *Aquacult Nutrit* 24(1):153–163. <https://doi.org/10.1111/anu.12543>
 56. Biggs P, Parsons CM, Fahey GC (2007) The effects of several oligosaccharides on growth performance, nutrient digestibility, and cecal microbial populations in young chicks. *Poult Sci* 86(11):2327–2336. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00427>
 57. Sikorska J, Wolnicki J, Kamiński R, Stolovich V (2012) Effect of different diets on body mineral content, growth, and survival of barbel, *Barbus barbus* (L.), larvae under controlled conditions. *Arch Pol Fish* 20:3–10. <https://doi.org/10.2478/v10086-012-0001-7>
 58. Cahu C, Zambonino Infante J, Takeuchi T (2001) Nutrients affecting quality in marine fish larval development. *Eur Aquacult Soc Spec Publ* 30:115–116
 59. Ye C-X, Liu YJ, Tian L-X, Mai K-S, Du Z-Y, Yang H-J, Niu J (2006) Effect of dietary calcium and phosphorus on growth, feed efficiency, mineral content and body composition of juvenile grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquacult* 255:263–271. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.12.028>
 60. Chavez-Sanchez C, Martinez-Palacios CA, Martinez-Perez G, Ross LG (2000) Phosphorus and calcium requirements in the diet of the American cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Günther). *Aquac Nutr* 6:1–9. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2000.00118.x>
 61. Kyu Song S, Beck BR, Kim D, Park J, Kim J, Kim HD, Ringø E (2014) Prebiotics as immunostimulants in aquaculture.: a review. *Fish Shellfish Imm* 40(1):40–48. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.06.016>
 62. Bochenek I, Protasowicki M, Brucka-Jastrzębska E (2008) Concentration of Cd, Pb, Zn and Cu in roach *Rutilus rutilus* (L.) from the lower reaches of the Oder River, and their correlation with concentrations of heavy metals in bottom sediments collected in the same area. *Arch Pol Fish* 16(1):21–36
 63. Papagiannis I, Kagalou I, Leonardos J, Petridis D, Kalfakakou V (2004) Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece). *Environ Int* 30:357–362. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2003.08.002>
 64. Jabeen F, Chaudhry AS (2010) Monitoring trace metals in different tissues of *Cyprinus carpio* from the Indus River in Pakistan. *Environ Monit Assess* 170:645–656. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-1263-4>
 65. Dylus E, Buda B, Górska-Frączek S, Brzozowska E, Gamian A (2013) Surface proteins of bacteria of the genus *Bifidobacterium*. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine* 67:402–412. <https://doi.org/10.5604/17322693.1049285>
 66. Dural M, Lugal Göksu MZ, Akif Özak A, Derici B (2006) Bioaccumulation of some heavy metals in different tissues of *Dicentrarchus labrax* L., 1758, *Sparus aurata* L., 1785, and *Mugil cephalus* L., 1758 from the Çamlık Lagoon of the eastern coast of Mediterranean (Turkey). *Environ Monit Assess* 118:65–74
 67. Brooks RR, Rumsey D (1974) Heavy metals in some New Zealand commercial sea fishes mar. *Freshw Res* 8(1):155–166

68. Zhao N, Enns CA (2012) Iron transport machinery of human cells: players and their interactions. *Curr Top Membr* 69:67–93. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394390-3.00003-3>
69. Tekin Özcan S, Aktan N (2012) Relationship of heavy metals in water, sediment and tissues with total length, weight and seasons of *Cyprinus carpio* L,1758 from Işikli Lake (Turkey). *J Zool* 44: 1405–1416 <https://www.researchgate.net/publication/286169833>
70. Grizard D, Barthelemy C (1999) Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents: mode of production and beneficial effects on animal and human health. *Reprod Nutr Dev* 39:563–588
71. Saibua Y, Jamwal A, Feng R, Peak D, Niyogi S (2018) Distribution and speciation of zinc in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during acute waterborne zinc exposure: interactions with cadmium or copper comparative biochemistry and physiology. Part C 206-207:23–31. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.02.004>
72. Wepener V, van Vuren JHJ, Du Preez HH (2001) Uptake and distribution of a copper, iron and zinc mixture in gill, liver and plasma of a freshwater teleost, *Tilapia sparrmanii*. *Water SA* 27(1):99–108
73. Garrick MD, Singleton ST, Vargas F, Kuo HC, Zhao L, Knöpfel M, Davidson T, Costa M, Paradkar P, Roth JA, Garrick LM (2006) DMT1: which metals does it transport? *Biol Res* 39:79–85. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602006000100009>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



THE FIRST INSIGHTS ON TRANS-GALACTOOLIGOSACCHARIDE EFFECTS ON FATTY ACIDS PROFILE AND MICROSTRUCTURE OF MUSCLE IN COMMON CARP*

Ewa Ziolkowska^{1*}, Joanna Bogucka¹, Mateusz Rawski², Jan Mazurkiewicz², Giuseppe Maiorano³, Magdalena Stanek¹

¹Department of Animal Physiology, Physiotherapy and Nutrition, Faculty of Animal Breeding and Biology, Bydgoszcz University of Science and Technology, Mazowiecka 28, 85-004 Bydgoszcz, Poland

²Division of Inland Fisheries and Aquaculture, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 71C, 60-625 Poznań, Poland

³Department of Agricultural, Environmental and Food Sciences, University of Molise, Via F. De Sanctis snc, 86100 Campobasso, Italy

*Corresponding author: ewa.ziolkowska@pbs.edu.pl

Abstract

The aim of the study was to determine the effects of prebiotic GOS on muscle histomorphometry and the total lipid, total cholesterol content and fatty acids profile in the meat of common carp. The 60-day-long experiment was performed on one-year-old fish. Three diets were used in the experiment: control diet 1 (C) with no microbiota affecting feed additives, diet 2 (B1) with 1% of GOS, and diet 3 (B2) with 2% of GOS. At the end of the trial, 16 individuals from each treatment group were used for the analyses. Fish meat from the B1 group had significantly higher lipid content compared to B2, but neither B1 nor B2 groups were different from the control group. The percentages of SFA, MUFA, PUFA, indexes n-3/n-6, PUFA/SFA, AI and TI, and total cholesterol content were not affected, in contrast to C14:0, C16:1 n-7, C18:0, C18:2 n-6, C20:4 n-6, and total n-6 FA. GOS significantly increased the percentage of normal fibres, while the lower amount of fibre atrophy and splitting was observed. The results confirm that diet supplemented with 2% GOS may be recommended as feed additive in carp nutrition due to positive effects on some fatty acids profiles and muscle microstructure.

Key words: cholesterol, fatty acids, meat quality, prebiotics, fish

To meet the growing demand for foods of animal origin, it is necessary to increase the efficiency of animal farming. One of the basic sectors of agriculture that

*This work has been supported by the Polish National Agency for Academic Exchange under Grant No. PPI/APM/2019/1/00003. Research conducted with the statutory funding No. 506.511.04.00 of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Poznań University of Life Sciences, Poland; Division of Inland Fisheries and Aquaculture.

has been developing rapidly over the past few years is fish farming (Godfray et al., 2010; Kurdomanov et al., 2019). However, it is necessary to reduce production costs by improving disease resistance and therefore improving survival, feed efficiency, and the growth performance of farmed fish species. To modulate the intestinal microflora, feed additives and supplements such as probiotics and prebiotics are used. Prebiotics are fermented by beneficial bacteria such as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, and can alter the composition of organisms in the gut microbiome, leading to a decrease in the growth of potentially pathogenic microbes living in the gastrointestinal tract and to an increase in the number of health-beneficial microbiota (Guerreiro et al., 2015; Gridale-Helland et al., 2008; Macfarlane et al., 2006; Talpur et al., 2014). Prebiotics as non-digestible feed additives have the ability to bind water in the intestinal lumen, increasing the volume of the intestinal contents, making them a very good fermentation substrate for probiotics (Mazurkiewicz et al., 2008). All currently accepted prebiotics are carbohydrates, polyphenols and polyunsaturated fatty acids (Gibson et al., 2017; Lockyer and Stanner, 2019).

Moreover, prebiotics were used as feed additives to improve the efficiency of cyprinids production, growth performance, gut microbiota and the activity of digestive enzymes (Markowiak and Śliżewska, 2018; Cao et al., 2019; Dawood and Koshio, 2016; Ebrahimi et al., 2012; Hoffmann et al., 2017; Hoseinifar et al., 2016; Mousavi et al., 2016; Guerreiro et al., 2017 a; Wang et al., 2020). The addition of prebiotics to feed may improve nutrient metabolism and meat quality, as evidenced by an increase in the percentage of protein, fat, minerals and carbohydrates (Cao et al., 2019; Puchała and Pilarczyk, 2007; Sun et al., 2017; Hussein et al., 2016; Scholz-Ahrens et al., 2007). Several studies indicated that prebiotics, such as fructooligosaccharides (FOS), xylooligosaccharides (XOS), galactooligosaccharides (GOS), and immunogen can affect haematological and serum biochemical parameters (Ebrahimi et al., 2012; Mousavi et al., 2016; Akhter et al., 2015; Ziółkowska et al., 2020). Despite the potential benefits of prebiotics to performance, as noted in a wide variety of animal species, information pertaining to their application in aquaculture is abundant, but it is extremely limited with respect to their influence on lipid composition and fatty acids profile.

Lipids are deposited in adipose tissue and, in smaller amounts, in the liver and muscles. Intramuscular fat (IMF) content has a beneficial effect on the taste, juiciness and firmness of fish meat (Hocquette et al., 2010). An appropriate type of fatty acid may contribute to preventing the development of coronary diseases, which is why fish consumption in the world is systematically increasing (Levitan et al., 2010; Schmidt et al., 2005; Leaf et al., 2003; Guillen et al., 2019). Many studies carried out over the years have shown that prebiotics may contribute to increased fish weight gain (Guerreiro et al., 2015; Kurdomanov et al., 2019; Mazurkiewicz et al., 2008). However, faster weight gain can result in the destruction of muscle fibre. A consequence of this may be the appearance of histopathological changes in the muscle (Bogucka et al., 2018).

The prebiotic used in the experiment was trans-galactooligosaccharide, GOS (trade name: Bi²tos, Clasado Biosciences Ltd., Jersey, UK). It is manufactured by enzymatic transgalactosylation of the milk lactose by the whole cells of *Bifidobac-*

terium bifidum 41171 and specifically promotes growth of *Bifidobacterium* spp. (Tzortzis et al., 2005). The genome of *Bifidobacterium* spp. encodes carbohydrate-degrading enzymes with a high affinity to GOS (Pokusaeva et al., 2011). In fermentation experiments carried out by Tzortzis et al. (2005) *B. bifidum* showed an increased preference towards the produced galactooligosaccharide mixture, displaying a higher growth rate and short-chain fatty acid production when compared with commercially available oligosaccharides. *Bifidobacterium*, a member of the *Actinobacteria* group, is present in fish gut and plays an important role in inflammation of the intestine (Banerjee and Ray, 2017; Wang et al., 2020).

The aim of the present study was to analyse the effects of dietary supplementation with 1% and 2% trans-galactooligosaccharide (GOS) on lipid composition and muscle microstructure of common carp. Carp is an important economic fish cultured in Poland, and our country is the largest carp producer in the European Union (FAO, 2020). The research conducted by Hoseinifar et al. (2016) revealed that different prebiotics modulate carp growth and immune response differently, and GOS seems to be the most suitable prebiotic.

Material and methods

Studies on live animals were carried out in strict accordance with the recommendations of the National Ethics Commission (Warsaw, Poland). All members of the research staff were trained in animal care, handling, and euthanasia. Fish health and welfare and the environmental conditions in the experimental tanks were checked twice daily by visual observation of animal behaviour and by checking water quality parameters such as oxygen saturation, temperature, and water flow.

Fish culture and experimental diets

The 60-day growth trial was carried out at the Experimental Station for Feed Production Technology and Aquaculture in Muchocin (Poland). Three hundred one-year-old common carp (mean body weight 180 g) were used. The fish were randomly stocked into 12 concrete ponds (40 m³) at a density of 25 fish per pond in accordance with Horváth et al. (2002). The experiment was carried out in four replications (four ponds per treatment). Each pond was equipped with an automatic band feeder allowing for the continuous supply of feed throughout a daily 12-hour period. The calculated daily feed dose for each pond was given every day at 9:00 a.m.; its consumption was controlled visually twice a day, with the rate corrected if needed. The daily feed dose was restricted to assure that all feed supplied was consumed. The feeding rate was calculated in consideration of the fish biomass in each pond, which was corrected every 10 days on the basis of control by the bulk weighing of all fish; measurements of the current average daily water temperature and prior-day feed consumption were used for additional correction according to Miyatake's (1997) recommendations, which resulted in a feeding rate ranging from 1.8 to 3.3% of the fish biomass. A constant flow of water in the experimental system was ensured by an

open-flow system with a mechanical pre-filtration chamber. During the experimental period, control of water physio-chemical parameters was carried out with the use of microcomputer oxymeter Elmetron CO-315. Measurements were taken of the average daily water temperature and pH, which ranged from 17.7°C to 22.7°C and 7.2 to 7.6 respectively. Dissolved oxygen was kept above 3.5 mg O₂/L, and hypoxia conditions were not observed in the experiment (details are described in Ziółkowska et al., 2020).

The experimental diets were calculated as isonitrogenous (35.1% crude protein) and isoenergetic (18.5 MJ kg⁻¹) with less than 4% of crude fibre and were formulated according to common carp nutritional requirements (NRC, 2011; De Silva and Anderson, 1995; Takeuchi et al., 2002). The extrusion conditions used to prepare the feed were described in detail by Ziółkowska et al. (2020). Three experimental diets were used: control diet 1 (C) without feed additives, diet 2 with 1% of GOS (B1) and diet 3 (B2) with 2% of GOS (Table 1). Details of feed intake, utilisation, and growth parameters are given in Ziółkowska et al. (2020).

Table 1. Dietary formulation and proximate composition of feed

Ingredient	Composition (%)		
	C	B1	B2
1	2	3	4
Fish meal ¹	12.3	12.3	12.3
Blood meal ²	10.0	10.0	10.0
DDGS ³	11.0	11.0	11.0
Soybean meal ⁴	15.0	15.0	15.0
Rapeseed meal ⁵	10.0	10.0	10.0
Wheat meal	32.8	31.8	30.8
Fish oil ⁶	4.6	4.6	4.6
Soybean lecithin ⁷	1.0	1.0	1.0
Vitamin-mineral premix ⁸	1.5	1.5	1.5
Vitamin premix ⁹	0.1	0.1	0.1
Choline chloride	0.2	0.2	0.2
Fodder chalk	1.5	1.5	1.5
Prebiotic ¹⁰	0.0	1.0	2.0
Proximate composition (% dry matter)			
Crude protein	35.06		
Crude lipid	9.08		
Crude fibre	3.93		
Total phosphorus	0.83		
Calcium	1.36		
Ash	7.17		

Table 1 – contd.

1	2	3	4
Gross energy (MJ·kg ⁻¹)		18.51	
Essential amino acids		(g/100 g of crude protein)	
Arginine		4.53	
Histidine		2.8	
Lysine		3.5	
Tryptophan		1.04	
Phenylalanine + Tyrosine		4.96	
Methionine + Cysteine		1.75	
Threonine		3.13	
Leucine		6.72	
Isoleucine		3.9	
Valine		4.97	

¹Danish fishmeal, Type F, 72% total protein, 12% fat, FF Skagen, Denmark.

²AP 301 P, 92% total protein, APC (GB) Ltd, Ings Road, Doncaster, UK.

³Stillage >45% total protein, <6% ash.

⁴Toasted, 46–47% total protein.

⁵33% total protein, 2% fat.

⁶Agro-fish, Kartoszyno, Poland.

⁷BergaPure, deoiled lecithin, 97% pure lecithin, Berg + Schmidt GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany.

⁸Polfamix W, BASF Polska Ltd. Kutno, Poland – 1 kg contains: vitamin A 1000000 IU, vitamin D₃ 200000 IU, vitamin E 1.5 g, vitamin K 0.2 g, vitamin B₁ 0.05 g, vitamin B₂ 0.4 g, vitamin B₁₂ 0.001 g, nicotinic acid 2.5 g, D-calcium pantothenate 1.0 g, choline chloride 7.5 g, folic acid 0.1 g, methionine 150.0 g, lysine 150.0 g, Fe 2.5 g, Mn 6.5 g, Cu 0.8 g, Co 0.04 g, Zn 4.0 g, I 0.008 g, carrier up to 1000.0 g.

⁹Vitazol AD₃E, BIEWET Drwalew, Poland – 1 kg contains: vitamin A 50000 IU, vitamin D₃ 5000 IU, vitamin E 30.0 mg, vitamin C 100.0 mg.

¹⁰Bi²tos® trans-galactooligosaccharide (GOS), Clasado Ltd.

During the experiment the fish were anaesthetised by immersion in 130 mgL⁻¹ tricaine methanesulfonate (MS–222, Sigma Aldrich) for weighing at 10-day intervals for feed rate control. Body weight gain (BWG), feed intake (FI), feed conversion ratio (FCR), specific growth rate (SGR), protein efficiency ratio (PER) and percentage weight gain (PWG) were calculated (details are described in Ziółkowska et al., 2020). At the end of the experiment four fish per pond were euthanised by immersion in 500 mg L⁻¹ of MS–222 (Topic Popovic et al., 2012) for tissue sampling for chemical and histomorphological analysis. After sedation, the animals were decapitated according to the American Veterinary Medical Association Guidelines for the Euthanasia of Animals (Leary et al., 2013). In accordance with Polish law and an EU directive (no 2010/63/EU), the experiments conducted in this study did not require approval from the Local Ethical Committee for Experiments on Animals in Poznań. The number of individuals subjected to analyses was based on earlier studies performed by Hoffmann et al. (2020) and Józefiak et al. (2019) to provide a necessary sample size for laboratory and statistical analysis, and to avoid unnecessary animal sacrifice (according to 4R policy).

Nutritional composition

The fillet samples (n=16/treatment) were taken for analyses from the large side muscle of fish body above the lateral line (*Musculus rectus dorsalis*). Fillets were transported on dry ice at -78°C and then stored at -20°C until analysed. Nutritional analyses were conducted at University of Molise (Italy).

Total cholesterol determination

Total cholesterol (TCH) was extracted from the meat samples using the method of Maraschiello et al. (1996) and then quantified using HPLC system. A Kontron HPLC (Kontron Instruments, Milan, Italy) model 535, equipped with a Kinetex $5\mu\text{C}18$ reverse-phase column ($150 \times 4.6 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$; Phenomenex, Torrance, CA), was used. The HPLC mobile phase consisted of acetonitrile and 2-propanol (55:45, vol/vol) at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 210 nm. The quantitation of muscle cholesterol content was based on the external standard method using a pure cholesterol standard (Sigma, St. Louis, MO).

Total lipid and fatty acid composition

Total lipids (TL) were extracted following the chloroform-methanol extraction procedure (Folch et al., 1957). Following lipid extraction, fatty acids (FA) were quantified as methyl esters (FAME) using a gas chromatograph GC Trace 2000 (ThermoQuest EC Instruments) equipped with a flame ionisation detector (260°C) and a fused silica capillary Column (Zebron ZB-88, Phenomenex, Torrance, CA, USA) with a $100 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.20 \mu\text{m}$ film thickness. Helium was used as carrier gas. The oven temperature program was 100°C for 5 min then increasing at $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ up to 240°C where it was maintained for 30 min. Results were expressed as percentage of the total FA identified. To assess the nutritional implications, the ratio of n-6 to n-3 FA (n-6/n-3) and the ratio of polyunsaturated FA (PUFA) to saturated FA (SFA) (P/S) were calculated. Moreover, the fat quality indexes (atherosclerotic index (AI) and thrombogenic index (TI)) were calculated, according to the formulas suggested by Ulbricht and Southgate (1991):

$$\text{AI} = [12:0 + (4 \times 14:0) + 16:0] / [\text{n-6 PUFA} + \text{n-3 PUFA} + \text{MUFA}];$$

$$\text{TI} = [14:0 + 16:0 + 18:0] / [(0.5 \times \text{MUFA}) + (0.5 \times \text{n-6 PUFA}) + (3 \times \text{n-3 PUFA}) + (\text{n-3 PUFA} / \text{n-6 PUFA})]$$

Histological analyses

Directly after euthanasia the samples of the dorsal rectus muscle (*Musculus rectus dorsalis*) were taken for histological analyses. Each sample was taken from individual fish, thus sample n of the samples represents n of the fish (n=16/treatment). Collected samples were frozen in liquid nitrogen at approximately -196°C until processed in a cryostat (Thermo Shandon/Thermo Fisher Scientific, UK). Histological analyses were conducted at the Bydgoszcz University of Science and Technology (Poland). The muscle was cut into $10 \mu\text{m}$ sections using a cryostat. The material

prepared in this way was subjected to HE (hematoxylin and eosin) staining to assess fibre diameter, fibre density and histopathological changes, red oil staining to determine intramuscular fat content, and NADH-TR (tetrazolium reductase) activity to distinguish muscle fibre types differing in enzymatic activity. Muscle tissue image recording was performed using a NIKON Ci-L microscope equipped with a NIKON DS-Fi3 camera and NIS ELEMENTS software, which was used to measure fibre diameter and fibre density, and to determine the extent of histopathological changes such as giant fibres and fibre necrosis with phagocytosis per 0.5 mm². Connective tissue hypertrophy was determined as follows: 0 – no hypertrophy, 1 + hypertrophy.

Statistical analyses

Statistical calculations were made using STATISTICA 13.1 software (Dell, Round Rock, TX, USA, 2018). Data were tested for normality by the Shapiro-Wilk test and for homogeneity of variances by use of the Levene's test. Growth parameters were calculated for each replicate (4 fish for pond, n=4). Four fish per pond were collected for chemical and histological analyses (16 fish for each treatment, n=16). The statistically significant difference (at $P \leq 0.05$) between treatments was checked using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple range tests.

Results

Nutritional composition

Total lipids (TL), total cholesterol (TCH) content and fatty acid (FA) composition are reported in Table 2. Meat samples from fish fed 1% of GOS (group B1) had higher ($P < 0.05$) TL content compared with the B2 group (2% of prebiotics) but not with respect to the C group ($P > 0.05$); similarly, no significant differences in fat content ($P > 0.05$) were found between C and B2 groups. TCH content determined in the present study (ranging from 42.02 to 45.83 mg/100 g) was not affected by prebiotic treatment ($P > 0.05$). In the present study, saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) percentages of the total lipid were not affected ($P > 0.05$) by prebiotic treatment. Dietary inclusion of 1% or 2% GOS significantly affected ($P < 0.05$) content of myristic (C14:0), palmitoleic (C16:1 n-7), stearic (C18:0), linoleic (C18:2 n-6), arachidonic (C20:4 n-6) and total n-6 fatty acids. Myristic acid (C14:0) was significantly lower in B1 and B2 groups ($P < 0.05$) compared to the control group. Furthermore, stearic acid (C18:0) was significantly lower in the B1 and the control groups than in the B2 group ($P < 0.05$). For individual MUFA values, palmitoleic acid (C16:1 n-7) was significantly higher ($P < 0.05$) in the meat of group B1 compared to those of the control and B2 groups, whereas for the individual PUFA acid, linoleic acid (C18:2 n-6) results were lower in the B1 and B2 groups compared with the control group ($P < 0.05$), and arachidonic acid (C20:4 n-6) was significantly higher ($P < 0.05$) in the B2 group compared to the B1 and control groups.

Table 2. Effect of GOS administration on total lipids and cholesterol contents, fatty acid composition (% of total fatty acids), and nutritional ratios in meat of common carp (*Cyprinus carpio*)

Items	Experimental groups			SEM	P-value
	C n=16	B1 n=16	B2 n=16		
Total lipids (g/100 g)	2.47 ab	3.21 a	2.23 b	0.17	0.046
Total cholesterol (mg/100 g)	42.02	45.83	44.55	0.78	0.127
Fatty acid					
C14:0	1.39 a	1.18 b	1.12 b	0.04	0.006
C16:0	20.19	20.87	20.42	0.16	0.220
C16:1n-7	6.21 b	6.57 a	5.94 b	0.11	0.034
C18:0	4.53 b	4.70 b	5.06 a	0.06	0.001
C18:1n-9	44.61	44.78	44.35	0.42	0.917
C18:2 n-6	14.02 a	12.93 b	12.92 b	0.14	0.001
C18:3 n-6	2.35	2.08	2.17	0.06	0.197
C20:1n-9	0.51	0.53	0.68	0.04	0.110
C20:4 n-6	1.50 b	1.78 b	2.15 a	0.13	0.045
C20:5 n-3	0.82	0.83	0.88	0.05	0.887
C22:5 n-3	0.73	0.53	0.63	0.05	0.287
C22:6 n-3	3.14	3.22	3.68	0.19	0.385
Partial sum					
ΣSFA	26.11	26.75	26.60	0.16	0.241
ΣMUFA	51.33	51.88	50.97	0.42	0.649
ΣPUFA	22.56	21.37	22.43	0.33	0.323
Total n-6	17.87 a	16.79 b	17.24 ab	0.18	0.043
Total n-3	4.59	4.57	5.19	0.26	0.563
Nutritional ratios					
n-3/n-6	0.26	0.27	0.30	0.01	0.562
n-6/n-3	3.89	3.67	3.32	0.19	0.338
PUFA/SFA	0.86	0.80	0.84	0.01	0.137
AI	0.35	0.35	0.34	0.00	0.143
TI	0.54	0.56	0.53	0.01	0.371

C – Control; B1 – 1% Bi²tos[®], B2 – 2% Bi²tos[®].

SEM – standard error mean.

a, b – values significantly differ at P<0.05 level.

Fish fed a diet of 1% of GOS reduced the content of total n-6 FA compared with the control group (P<0.05); the intermediate value was shown with 2% of GOS (P>0.05). A higher amount of n-6 FA in the control group owes itself to the precursor of the n-6 family, the linoleic acid, quantitatively the most concentrated n-6 PUFA. Significantly, no differences were found between the experimental groups for the total amount of n-3 long chain PUFA, as well as for indexes for human health n-3/n-6,

n-6/n-3 and PUFA/SFA ratios. In the present study, no statistically significant differences between the groups were found for AI and TI.

Taking into account the general FA profile, total MUFA were the most abundant FA (ranging from 50.97 to 51.88%), followed in descending order by SFA (ranging from 26.11 to 26.75%) and PUFA (ranging from 21.37 to 22.46%). Quantitatively, the oleic acid (C18:1 n-9) was the most concentrated fatty acid, followed by palmitic (C16:0), linoleic acid (C18:2 n-6) and palmitoleic acid (C16:1 n-7). Regarding the composition of the single PUFA n-3, docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 n-3) was the highest of the fatty acids.

Histological analyses

The results of muscle histological measurements are shown in Table 3.

Table 3. The effect of GOS on histological measurements of muscle fibres of common carp (*Cyprinus carpio*)

Items	C n=16	B1 n=16	B2 n=16	SEM	P-value
Fibre diameter (μm)	48.32	50.18	52.14	0.816	0.144
Muscle fibre density (fibres n/1.5 mm ²)	106.60	117.00	117.00	3.703	0.422
Muscle fibre type (%) αW	100	100	100	–	–
Normal fibres (%)	93.81 b	95.06 ab	96.31 a	0.004	0.021
Fibre atrophy (%)	3.23 a	2.73 ab	1.58 b	0.003	0.016
Fibre splitting (%)	2.96	2.22	2.11	0.002	0.208
Connective tissue hypertrophy (%)	80.00	54.00	38.00		

C – Control; B1 – 1% Bi²tos[®], B2 – 2% Bi²tos[®].

SEM – standard error mean.

a, b – values significantly differ at P<0.05 level.

Analyses showed muscle is characterised by a glycolytic metabolism, 100% white fibres – αW , because the activity of the oxygen enzyme (oxidoreductase) – tetrazolium reductase has not been shown (Figure 1 A). Red oil staining showed that intramuscular fat is distributed around the muscle fibres (Figure 1 B). Figure 1 C showed histopathological changes. It can be seen that as the concentration of GOS added to the feed increases, the percentage of normal fibres increases (P<0.05). The group of animals receiving 2% transgalacto-oligosaccharide was characterised by the highest percentage of normal fibres (96.31%) compared to the control group (93.81%). Statistical analyses showed a significantly lower percentage of atrophy fibres in the groups supplemented with prebiotic (P<0.05). The most favourable values were obtained in the research group supplemented with a 2% prebiotic (group B2 – 1.58%) compared to the control group (3.23%). Similar differences were noted for splitting, but statistical analyses did not confirm this. The microscopic image of the muscle showed no changes such as giant fibres or fibre necrosis with phagocytosis. Figure 1 D showed connective tissue. It was observed that as the prebiotic added was increased, the connective tissue hypertrophy decreased.

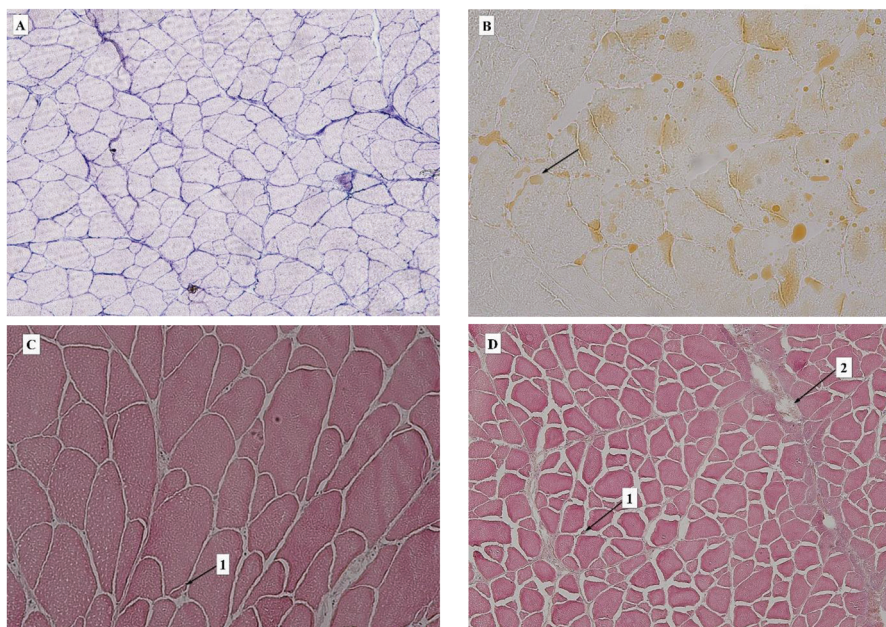


Figure 1. (A) Muscle fibre types: α W (glycolytic) NADH-TR (NADH-tetrazolium reductase) activity staining, magnification $\times 100$; (B) intramuscular fat (arrow), red oil staining, magnification $\times 200$; (C) fibre splitting – 1 (arrows), hematoxylin and eosin (HE) staining, magnification $\times 200$; (D) atrophy fibre – 1 (arrow), connective tissue overgrowth – 2 (arrow), hematoxylin and eosin (HE) stain, magnification $\times 100$

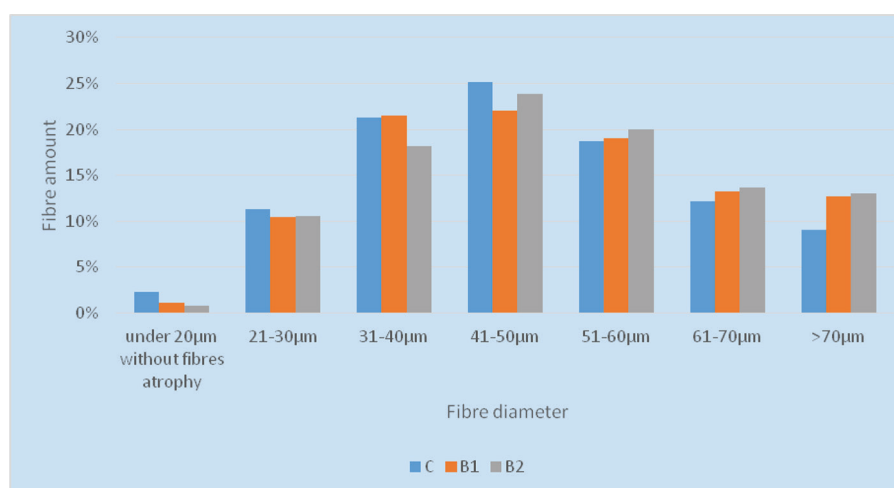


Figure 2. Cross sectional area of white muscles without fibres atrophy (C – Control; B1 – 1% Bi²tos[®], B2 – 2% Bi²tos[®])

Due to the presence of only white glycolytic fibres (Figure 1 A), the diameters of these fibres were analysed. In both the control group and the B1 group we observed the largest percentage share of white muscle fibre diameters in the range of 31–40 μm and 41–50 μm , respectively (Figure 2). On the other hand, increasing the prebiotic addition to 2% (group B2) resulted in an increase in thickness of white muscle fibres in the 51–60 μm and 41–50 μm range. In all three groups, the lowest percentage was white muscle fibres, which was in the range <20 μm (1–2%). However, the analyses showed no statistically significant differences in the discussed ranges.

Discussion

Nutritional composition

Lipids extracted from fatty fish meat, which includes common carp, are predominantly composed of triacylglycerols. As many results confirm, GOS is able to decrease serum triacylglycerol concentrations by enhancing lipoprotein catabolism. The triacylglycerol-lowering action of GOS is due to the inhibition of lipogenic enzymes, e.g., acetyl-CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS), malic enzyme (ME), ATP citrate lyase (ACLY), and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) (Guerreiro et al., 2017 a; Ulbricht and Southgate, 1991; Delzenne and Kok, 2001; Delzenne et al., 2002; Wang et al., 2016 a). As the analyses by Guerreiro et al. (2015) showed, lipogenic enzyme activities (FAS, ME and G6PD) were lower in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) that were fed diets including xylooligosaccharides (XOS, Qingdao, FTZ United International Inc., China) than in the other groups. The lipid-lowering effect of GOS may result from the inhibition of the expression of genes and proteins, including liver enzymes responsible for glucose metabolism, which reduces the accumulation of fat (Sun et al., 2017). In this study we confirmed that GOS supplementation did not affect the total lipid (TL) level in the meat of the analysed common carp. The highest TL level was determined in the B1 and the lowest in the B2 group, but neither B1 nor B2 groups were different from the control group. The same results were confirmed by Dimitroglou et al. (2010) for gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed with a diet supplemented with MOS. The absence of a lipid-lowering effect of GOS used in the present study may result from the fish adapting to the experimental diets. As Guerreiro et al. (2017 b) confirmed, it is possible that fish gut bacteria community and digestive enzymatic activity had to adapt to the dietary modification. Results of studies on the effect of prebiotics on animal health are often contradictory given that several factors may affect the fermentability of prebiotics. One of these factors is the type and dose of the prebiotic. The study of Biggs et al. (2007) demonstrated that excessively high prebiotic dose may have a negative impact on the gastrointestinal system and may delay the growth of animals. This could be related to the inability of gut bacteria to ferment the high amount of prebiotic provided in the diet. The opposite hypothesis is that GOS, as a prebiotic with a low degree of polymerisation (PD), at a dose of 1% and 2%, was too weak in relation to the enzymes responsible for lipid metabolism. Our fat results

are to the contrary to those of Munir et al. (2016), who found that GOS (Vivinal[®], Friesland Campina Domo, The Netherlands) reduced lipid amount (about 1.4%) compared with the control group of snakehead (*Channa striata*) fingerlings. In turn, Mansour et al. (2012) observed increased total lipid in giant sturgeon (*Huso huso*) fed with a diet supplemented with MOS (ActiveMOS[®], Biorigin, Lencois Paulista, São Paulo, Brazil), which may be beneficial from a consumer point of view, because intramuscular fat can have a positive effect on the juiciness and taste of meat.

Content of the cholesterol in the meat depends on the fish species (species feature) (Moreira et al., 2001), is not correlated with fat content (Piironen et al., 2002), and is affected by several factors, among them the PUFA content (Guillen et al., 2019; Kinsella, 1986). The total cholesterol (TCH) content determined in the present study was not affected by prebiotic treatment ($P > 0.05$). As numerous studies confirm, synthetically produced prebiotics may increase the production of acetate, propionate and butyrate (Jackson and Lovegrove, 2012). Analysis of the hipolipidemic properties of short-chain FOS in humans confirmed that propionate inhibits cholesterol synthesis by inhibiting both 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) synthase and HMG-CoA reductase (Bornet et al., 2002). *In vitro* studies of rat hepatocytes confirmed inhibition of cholesterol synthesis by prebiotics due to the impaired absorption of acetate by liver cells (Jackson and Lovegrove, 2012). To better understanding the effect of the prebiotic supplement on cholesterol homeostasis, it would be necessary to analyse the expression of genes involved in bile acid synthesis and the synthesis, esterification, and excretion of cholesterol. The desirability of such studies has been confirmed by Zhu et al. (Zhu et al., 2018), who analysed the expression of genes responsible for cholesterol metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a plant-based diet.

The fatty acid (FA) proportion of meat is considered an important index for meat quality. Fish fat is characterised by a significant amount of PUFA and is commonly recognised as the main source of n-3 FA. Fish meat is a rich source of a mixture of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), but the levels of these dietary nutrients vary appreciably among different fish species (Kris-Etherton et al., 2000; Steffens and Wirth, 2005). To our knowledge, there is very little information in the literature on the effect of prebiotics on the fatty acid profile in fish meat.

In the present study, we showed that GOS supplementation affected myristic (C14:0), palmitoleic (C16:1 n-7), stearic (C18:0), linoleic (C18:2 n-6), arachidonic (C20:4 n-6) and total n-6 FA percentages, but had no stimulating effect on other FA profiles. This confirms the hypothesis that diet supplementation with prebiotic may modify the expression of genes responsible for the expression of lipogenic enzymes. Studies of rats fed a mixture of inulin and oligofructose have shown that it caused a reduction in body weight gain and visceral fat, which may be significant in the regulation of fatty acid metabolism in the liver. An effective inhibitor of *de novo* fatty acid synthesis is propionate, a product of prebiotic metabolism (Sun et al., 2017; Demigné et al., 1995). The present study confirmed that GOS supplementation significantly reduced myristic acid in the B1 and B2 groups, and increased stearic acid in the B2 group compared to groups B1 and C. Myristic acid causes a significant increase in total cholesterol and LDL content in serum, therefore the obtained result

seems to be a beneficial effect of GOS supplementation (Table 4). Stearic acid, in contrast to other saturated fatty acids (such as lauric, myristic and palmitic acids), does not increase serum cholesterol, and therefore does not increase the risk of coronary heart disease. This is because stearic acid quickly turns into monounsaturated oleic acid (C18:1 n-9). Piccolo et al. (2013) reported that MOS diet (ECHOMOS; Mazzoleni Prodotti Zootecnici, Cologno al Serio, BG, Italy) seemed to improve the synthesis of some fatty acids such as C16:0, C18:0 and C18:1n-9 in the meat of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*).

From a physiological point of view, elongated and unsaturated fatty acid derivatives are more important than their parent fatty acids. These acids are arachidonic acid (AA) in the case of the n-6 series and eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in the case of the n-3 series (Steffens and Wirth, 2005). Freshwater fish thanks to their $\Delta 5$ and $\Delta 6$ desaturase systems are capable of elongation and desaturation of linoleic acid and α -linolenic acid, while the marine fish have a limited ability to synthesise long-chain polyunsaturated fatty acids from n-6 and n-3 series (Steffens and Wirth, 2007). Prebiotics produce changes in the global composition of the intestine flora and affect its growth and metabolic activities. This can increase the levels of long-chain PUFAs as bacteria have the enzymes necessary to elongate and desaturate fatty acids (Macfarlane et al., 2006). In our studies we confirmed significantly higher content of arachidonic acid in the B2 group compared to B1 and C groups (Table 2). This is probably a confirmation of desaturase and elongase activities. Kindt et al. (2018) confirmed that the gut microbiota promotes hepatic fatty acid desaturation and elongation in mice (Δ -9 desaturation of palmitate [C16:0] to palmitoleate [C16:1 n-7] and elongation of α -linolenic [C18:3 n-6] to dihomo- γ -linolenic acid [DGLA, C20:3 n-6]). The linoleic-lowering effect of GOS confirmed in our research is difficult to explain due to the lack of available data. Piccolo et al. (2012) showed no statistically significant differences in the content of this acid between groups treated with prebiotics (mannan oligosaccharide and inulin).

Some studies reported that prebiotics can alter lipid metabolism and improve the ratio of PUFA/SFA and n-3/n-6 in chicken meat (Velasco et al., 2010; Tavianello et al., 2018), which is beneficial to human health. In our study, we confirm no significant differences in terms of these ratios between GOS-treated and control groups. Despite the fact that 1% GOS supplementation resulted in a lower total n-6 FA content (the negative effect is marked in Table 4), the analyses confirmed the appropriate n-6/n-3 ratio. Similarly, no statistically significant differences were found for the atherogenic index (AI) and the thrombogenic index (TI), which is the criteria for evaluating the level and interrelation through which some fatty acids may have atherogenic or thrombogenic properties, respectively. Our results are in line with Piccolo et al. (2013), who confirmed no significant differences in AI and TI content between groups. AI and TI indexes express the proportion of selected saturated to unsaturated fatty acids, and are considered better indicators of atherogenicity and thrombogenicity than the PUFA/SFA ratio. It is assumed that the lower their value, the more beneficial the fatty acid profile in terms of health for the consumer (Ulbricht and Southgate, 1991).

Histological analyses

Individual muscle fibres are the basic unit of muscle tissue. Depending on the metabolic and structural properties, red and white fibres can be distinguished. White fibres have a rapid shrinkage rate but are prone to fatigue. Red fibres shrink more slowly with less force and are resistant to fatigue. In red fibres, the main metabolic pathway is aerobic change and anaerobic change in white fibres. Carp muscle masses are mainly made of white, glycolytic fibres. A fish that increases its body weight increases primarily the amount of white fibres, which can constitute about 90% of the total volume of muscle tissue. Analyses of the tested material showed a 100% predominance of white muscle fibres, which is close to the results obtained by Zimmerman and Lowery (1999), Weatherley and Gill (1989), and Karahmet et al. (2014). Due to the 100% content of white muscle fibres, the diameters of normal white muscle normal fibres were analysed and then assigned to appropriate classes. Karahmet et al. (2014) showed that the average diameter of muscle fibres in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is in the range 31–40 μm and 41–50 μm , whereas in brown trout (*Salmo trutta*) and alpine trout (*Salvelinus alpinus*) the average diameter is at intervals of 21–30 μm and 31–40 μm . These studies are in line with ours, in which the largest amount of muscle fibres was assigned to the class of muscle fibres with a diameter of 31–40 μm and 41–50 μm . In fish, we observe both hypertrophic and hyperplastic growth of muscle fibres. Hyperplastic growth is regulated mainly by the Myogenic Regulatory Factor myoD, for the proliferation of myoblasts. The expression of the myoD gene in muscle fibres is associated with intense proliferation of satellite cells associated with intense hyperplasia and the mechanisms of hypertrophy (Carani et al., 2013). Both hypertrophic and hyperplastic growth result in a large variety of muscle fibre diameters. The large variety of muscle fibre diameters that we also observe in our research gives the muscles a mosaic-like appearance. This is characteristic of fish meat, as demonstrated by Johnston et al. (1975) and Listrat et al. (2016). Priester et al. (2011) also showed that as the size of the black seabass (*Centropristis striata*) increased, the average diameter of the muscle cells increased proportionally from 36 μm to 280 μm . There were no statistically significant differences in the diameter and density of muscle fibres between the experimental groups. These results differ from those obtained by Rabah (2005) and Johnston et al. (1975). Johnston et al. (1975) stated that as the total number of white muscle fibres in the Atlantic salmon (*Salmo salar*) increased, their density also decreased. This study also showed a statistically significant reduction in the percentage of atrophy fibres (C – 3.23%; B2 – 1.58%). Atrophy fibres arise as a result of, e.g., aging and hereditary muscle disorders, but also of hypoxia, or deficiency of ingredients in the food ration, e.g., vitamin E or selenium (Hugh et al., 1976). Wang et al. (2016 b) demonstrated the effect of vitamin E deficiency on muscle myopathies as manifested by muscle atrophy. Moreover, hypoxic stress or an increased presence of copper may also contribute to the development of muscle fibre atrophy (Harper and Wolf, 2009; Maharajana et al., 2016). In muscles which we studied, the experimental factor reduced the number of atrophy fibres. The larger diameter of the muscle fibres was observed in the research groups, yet the higher fibre density per unit area is associated with the smaller thickness of the connective tissue. A smaller amount of connective tissue was observed

in the research groups. Hypertrophy of connective tissue can exert pressure on the surrounding blood vessels, which in turn can contribute to a decrease in blood supply to the fibres, and thus to degenerative changes.

In many fish, the number of muscle fibres increases throughout the life cycle (Sun et al., 2017). Therefore, GOS supplementation in the diet can promote the development of fish muscles and contribute to the improvement of meat quality, although the mechanism is still unknown (Table 4).

Table 4. Effect of GOS supplementation on lipid metabolism and meat microstructure of common carp (*Cyprinus carpio*) compared to the C group

Parameters*	B1	B2
Nutritional composition		
TL	±	±
C14:0	+	+
C16:1 n-7	+	±
C18:0	±	+
C18:2 n-6	-	-
C20:4 n-6	±	+
total n-6	-	±
Histological analyses		
normal fibres	±	+
fibre atrophy	±	+

*parameters for which statistically significant differences between treatment groups were found at $P < 0.05$. B1 – 1% Bi²tos[®], B2 – 2% Bi²tos[®]. Positive effect (+), negative effect (-) and neutral effect (±) of GOS compared to the control group.

Conclusions

The results of the present study revealed that prebiotics could be a potential dietary additive for farmed common carp. GOS had a positive effect on some muscle fatty acid profiles and stimulated conversion of fatty acids to their long-chain unsaturated derivatives in the case of the n-6 series (C20:4 n6). That there were no differences in the total cholesterol content between the experimental groups may indicate maintenance of the metabolic balance of this sterol due to the prebiotic used. The supplementation of feed with 2% GOS positively affected meat microstructure and slightly increased the percentage of normal fibres, while it slightly decreased the percentage both of split values and of fibre atrophy. Further research on the effects of prebiotics on lipid metabolism should be carried out because this topic is not fully explored, especially in the case of the fatty acid profile. Research on the effect of prebiotics on different species of fish on the basis of a comparative study will help identify the best prebiotic to change the intestinal microflora of the species.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Akhter N., Wu B., Memon A.M., Mohsin M. (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish Shellfish Immunol.*, 45: 733–741.
- Banerjee G., Ray A.K. (2017). Bacterial symbiosis in the fish gut and its role in health and metabolism. *Symbiosis*, 72: 1–11.
- Biggs P., Parsons C.M., Fahey G.C. (2007). The effects of several oligosaccharides on growth performance, nutrient digestibilities, and cecal microbial populations in young chicks. *Poultry Sci.*, 86: 2327–2336.
- Bogucka J., Miguel Ribeiro D., Da Costa R.P.R., Bednarczyk M. (2018). Effect of synbiotic dietary supplementation on histological and histopathological parameters of *Pectoralis major* muscle of broiler chickens. *Czech. J. Anim. Sci.*, 63: 263–271.
- Bornet F.R.J., Brouns F., Tashiro Y., Duvillier V. (2002). Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. *Dig. Liver Dis.*, 34: 6111–6120.
- Cao H., Yu R., Zhang Y., Hu B., Jian S., Wen Ch., 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.
- Carani F.R., Da Silva Duran B.O., Gutierrez De Paula T., Pereira Piedade W., Dal-Pai-Silva M. (2013). Morphology and expression of genes related to skeletal muscle growth in juveniles of pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimatidae, Teleostei). *Acta Sci., Anim. Sci.*, 35: 219–226.
- Dawood M.A.O., Koshio S. (2016). Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review. *Aquaculture*, 454: 243–251.
- Delzenne N.M., Kok N. (2001). Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73: 456S–458S.
- Delzenne N.M., Daubioul C., Neyrinck A., Lasa M., Taper H.S. (2002). Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: review of biochemical events and future prospects. *Brit. J. Nutr.*, 87: 255–259.
- De Silva S.S., Anderson T.A. (1995). Fish nutrition in aquaculture. Chapman & Hall, London, 319 pp.
- Demigné C., Morand C., Levrat M., Besson C., Moundras C., Rémésy C. (1995). Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *Brit. J. Nutr.*, 74: 209–219.
- Dimitroglou A., Merrifield D.L., Spring P., Sweetman J., Moate R., Davies S.J. (2010). Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 300: 182–188.
- Ebrahimi G., Ouraji H., Khalesi M., Sudagar M., Barari A., Zarei Dangesaraki M., Jani Khalili K. (2012). Effects of a prebiotic, Immunogen®, on feed utilization, body composition, immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in the common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus) fingerlings. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 96: 591–599.
- FAO (2020). Fisheries and Aquaculture, National Aquaculture Sector Overview – Poland.
- Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226: 497–509.
- Gibson G.R., Hutkins R., Sanders M.E., Prescott S.L., Reimer R.A., Salminen S.J., Scott K., Stanton C., Swanson K.S., Cani P.D., Verbeke K., Reid G. (2017). Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 14: 491.
- Godfray H.C.J., Beddington J.R., Crute I.R., Haddad L., Lawrence D., Muir J.F., Pretty J., Robinson S.R., Thomas S.M., Toulmin C. (2010). Food security: the challenge of feeding billion people. *Science*, 327: 812–818.
- Grisdale-Helland B., Helland S., Gatlin D. (2008). The effects of dietary supplementation

- with mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide or galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 283: 163–167.
- Guerreiro I., Oliva-Teles A., Enes P. (2015). Improved glucose and lipid metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed short-chain fructooligosaccharides and xylooligosaccharides. *Aquaculture*, 441: 57–63.
- Guerreiro I., Oliva-Teles A., Enes P. (2017 a). Prebiotics as functional ingredients: focus on Mediterranean fish aquaculture. *Rev. Aquacult.*, 10: 800–832.
- Guerreiro I., Serra C.R., Pousão-Ferreira P., Oliva-Teles A., Enes P. (2017 b). Prebiotics effect on growth performance, hepatic intermediary metabolism, gut microbiota and digestive enzymes of white sea bream (*Diplodus sargus*). *Aquacult. Nutr.*, 24: 153–163.
- Guillen J., Natale F., Carvalho N., Casey J., Hofherr J., Druon J.-N., Martinsohn J.T. (2019). Global seafood consumption footprint. *Ambio*, 48: 111–122.
- Harper C., Wolf J.C. (2009). Morphologic effects of the stress response in fish. *ILAR J.*, 50: 387–396.
- Hocquette J.F., Gondret F., Baez E., Medale F., Jurie C., Pethick D.W. (2010). Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control and identification of putative markers. *Animal*, 4: 303–319.
- Hoffmann L., Mazurkiewicz J., Florczyk K., Burchardt H. (2017). Using probiotic feed supplements in carp rearing. *Komunikaty Rybackie*, 2: 14–21.
- Hoffmann L., Rawski M., Nogales-Merida S., Mazurkiewicz J. (2020). Dietary inclusion of *Tenebrio molitor* meal in sea trout larvae rearing: Effects on fish growth performance, survival, condition, and GIT and liver enzymatic activity. *Ann. Anim. Sci.*, 20: 579–598.
- Horváth L., Tamás G., Seagrave C. (2002). *Carp and pond fish culture*, 2nd ed. Blackwell Science: Oxford, UK.
- Hoseinifar S.H., Ahmadi A., Raeisi M., Hoseini S.M., Khalili M., Behnam-pour N. (2016). Comparative study on immunomodulatory and growth enhancing effects of three prebiotics (galactooligosaccharide, fructooligosaccharide and inulin) in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquac. Res.*, 48: 3298–3307.
- Hugh A., Poston Gerald F., Combs Jr., Louis L. (1976). Vitamin E and selenium interrelations in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*): gross, histological and biochemical deficiency signs. *J. Nutr.*, 106: 892–904.
- Hussein M.S., Zaghlol A., Abd El Hakim N.F., El Nawsany M., Abo-State H.A. (2016). Effect of different growth promoters on growth performance, feed utilization and body composition of common carp (*Cyprinus carpio*). *J. Fish Aquat. Sci.*, 11: 370–377.
- Jackson K.G., Lovegrove J.A. (2012). Impact of probiotics, prebiotics and synbiotics on lipid metabolism in humans. *J. Nutr. Health Aging*, 1: 181–200.
- Johnston I.A., Ward P.S., Goldspink G. (1975). Studies on the swimming musculature of the rainbow trout I. Fibre types. *J. Fish Biol.*, 7: 451–458.
- Józefiak A., Nogales-Merida S., Rawski M., Kierończyk B., Mazurkiewicz J. (2019). Effects of insect diets on the gastrointestinal tract health and growth performance of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt, 1869). *BMC Vet. Res.*, 15: 348.
- Karahmet E., Viles A., Katica A., Mlaco N., Toroman A. (2014). Differences between white and red muscle fibres diameter in three salmon fish species. *Biotechnol. Anim. Husband.*, 30: 349–356.
- Kindt A., Liebisch G., Clavel T., Haller D., Hörmannspurger G., Yoon H., Kolmeder D., Sigruener A., Krautbauer S., Seeliger C., Ganzha A., Schweizer S., Morisset R., Strowig T., Daniel H., Helm D., Küster B., Krumsiecke J. (2018). The gut microbiota promotes hepatic fatty acid desaturation and elongation in mice. *Nat. Commun.*, 9: 3760.
- Kinsella J.E. (1986). Food component with potential benefits: the n-3 polyunsaturated fatty acids of fish oils. *Food Technol.*, 40: 89–97.
- Kris-Etherton P.M., Taylor D.S., Yu-Poth S., Huth P., Moriarty K., Fishell V., Hargrove R.L., Zhao G., Etherton T.D. (2000). Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71: 179–188.
- Kurdomanov A., Sirakov I., Stoyanova S., Velichkova K., Nedeva I., Staykov Y. (2019). The effect of diet supplemented with Proviotic® on growth, blood biochemical parameters

- and meat quality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultivated in recirculation system. *AACL Bioflux*, 12.
- Leaf A., Kang J.X., Xiao Y.F., Billman G.E. (2003). Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils. *Circulation*, 107: 263–264.
- Leary S., Underwood W., Anthony R., Cartner S. (2013). *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals*, 2013 Edition. AVMA, Schaumburg, IL, USA, pp. 67–73.
- Levitan E.B., Wolk A., Mittleman M.A. (2010). Fatty fish, marine ω -3 fatty acids and incidence of heart failure. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 64: 587–594.
- Listrat A., Bénédicte L., Louveau I., Astruc T., Bonnet M., Lefaucheur L., Picard B., Bugeon J. (2016). How muscle structure and composition influence meat and flesh quality. *Sci. World J.*, 14.
- Lockyer S., Stanner S. (2019). Prebiotics – an added benefit of some fibre types. *Nutr. Bull.*, 44: 74–91.
- Macfarlane S., Macfarlane G.T., Cummings J. (2006). Review article: Prebiotics in the gastrointestinal tract. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 24: 701–714.
- Maharajana A., Rufus Kitto M., Paruruckumania P.S., Ganapiriyaa V. (2016). Histopathology biomarker responses in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) exposed to copper. *JOBASZ*, 77: 21–30.
- Mansour M.R., Akrami R., Ghobadi S.H., Amani Denji K., Ezatrahimi N., Gharaei A. (2012). Effect of dietary mannan oligosaccharide (MOS) on growth performance, survival, body composition, and some hematological parameters in giant sturgeon juvenile (*Huso huso* Linnaeus, 1754). *Fish Physiol. Biochem.*, 38: 829–835.
- Maraschiello C., Diaz I., Garcia Regueiro J.A. (1996). Determination of cholesterol in fat and muscle of pig by HPLC and capillary gas chromatography with solvent venting injection. *J. High Resolut. Chromatogr.*, 19: 165–168.
- Markowiak P., Śliżewska K. (2018). The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathog.*, 10: 21.
- Mazurkiewicz J., Przybył A., Golski J. (2008). Usability of fermacto prebiotic in feeds for common carp (*Cyprinus carpio* L.) fry. *Nauka Przyr. Technol.*, 2: 3.
- Miyatake H. (1997). Carp (in Japanese). *Yoshoku*, 34: 108–111.
- Moreira A.B., Visentainer J.V., De Souza N.E., Matsushita M. (2001). Fatty acids profile and cholesterol contents of three Brazilian Brycon freshwater fishes. *J. Food Compos. Anal.*, 14: 565–574.
- Mousavi E., Mohammadiazarm H., Mousavi S.M., Ghatrami E.R. (2016). Effects of inulin, savory and onion powders in diet of juveniles carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus 1758) on gut microflora, immune response and blood biochemical parameters. *TrJFAS*, 16: 831–838.
- Munir M.B., Hashim R., Manaf M.S.A., Nor S.A.M. (2016). Dietary prebiotics and probiotics influence the growth performance, feed utilization, and body indices of snakehead (*Channa striata*) fingerlings. *Trop. Life Sci. Res.*, 27: 111–125.
- NRC (2011). *Nutrient Requirement of Fish and Shrimp*. Animal Nutrition Series. The National Academies Press, Washington, DC.
- Piccolo G., Centoducati G., Bovera F., Marrone R., Nizza A. (2013). Effects of mannan oligosaccharide and inulin on sharpnose seabream (*Diplodus puntazzo*) in the context of partial fish meal substitution by soybean meal. *Ital. J. Anim. Sci.*, 12: 133–138.
- Piironen V., Toivo J., Lampi A.M. (2002). New data for cholesterol contents in meat, fish, milk, eggs and their products consumed in Finland. *J. Food Compos. Anal.*, 15: 705–713.
- Pokusaeva K., Fitzgerald G.F., Sinderen D. (2011). Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes Nutr.*, 6: 285.
- Priester C., Lindsay C.M., Stephen T.K., Wade O.W., Richard M.D. (2011). Growth patterns and nuclear distribution in white muscle fibres from black sea bass, *Centropristis striata*: evidence for the influence of diffusion. *J. Exp. Biol.*, 214: 1230–1239.
- Puchała R., Pilarczyk M. (2007). The influence of nutrition on the chemical composition of carp meat (in Polish). *Inż. Rol.*, 5: 363–368.

- Rabah S. (2005). Light microscope study of *Oncorhynchus kisutch* muscle development. Egypt. J. Aquat. Res., 31: 1.
- Schmidt E.B., Arnesen H., de Caterina R., Rasmussen L.H., Kristensen S.D. (2005). Marine n-3 polyunsaturated fatty acids and coronary heart disease: Part I. Background, epidemiology, animal data, effects on risk factors and safety. Thromb. Res., 115: 163–170.
- Scholz-Ahrens K.E., Ade P., Marten B., Weber P., Timm W., Ail Y., Gluer C.C., Schrezenmeir J. (2007). Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. J. Nutr., 137: 838S–846S.
- Steffens W., Wirth M. (2005). Freshwater fish – an important source of n-3 polyunsaturated fatty acids: A review. Arch. Polish Fish., 13: 5–16.
- Steffens W., Wirth M. (2007). Influence of nutrition on the lipid quality of pond fish: common carp (*Cyprinus carpio*) and tench (*Tinca tinca*). Aquac. Int., 15: 313–319.
- Sun W., Li X., Xu H., Chen J., Xu X., Leng X. (2017). Effects of dietary geniposide on growth, flesh quality, and lipid metabolism of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. J. World Aquac. Soc., 48: 927–937.
- Takeuchi T., Satoh S., Kiron V. (2002). Common carp, *Cyprinus carpio*. In: Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture, C.D. Webster, C. Lim (eds). CABI Publishing, New York, 245–261.
- Talpur A.D., Munir M.B., Mary A., Hashim R. (2014). Dietary probiotics and prebiotics improved food acceptability, growth performance, hematology and immunological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in snakehead (*Channa striata*) fingerlings. Aquaculture, 426: 14–20.
- Tavaniello S., Maiorano G., Stadnicka K., Mucci R., Bogucka J., Bednarczyk M. (2018). Prebiotics offered to broiler chicken exert positive effect on meat quality traits irrespective of delivery route. Poultry Sci. J., 97: 2979–2987.
- Topic Popovic N., Strunjak-Perovic I., Coz-Rakovac R., Barisic J., Jadan M., Persin Berakovic A., Sauerborn Klobucar R. (2012). Tricaine methane-sulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia. J. Appl. Ichthyol., 28: 553–564.
- Tzortzis G., Goulas A.K., Gibson G.R. (2005). Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. Appl. Microbiol. Biotechnol., 68: 412–416.
- Ulbricht T.L.V., Southgate D.A.T. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. Lancet, 338: 985–992.
- Velasco S., Ortiz L.T., Alzueta C., Rebole A., Trevino J., Rodriguez M.L. (2010). Effect of inulin supplementation and dietary fat source on performance, blood serum metabolites, liver lipids, abdominal fat deposition, and tissue fatty acid composition in broiler chickens. Poultry Sci. J., 89: 1651–1662.
- Wang J., Zhang D., Sun Y., Wang S., Li P., Gatlin D.M., Zhang L. (2016 a). Effect of a dairy-yeast prebiotic (GroBiotic-A) on growth performance, body composition, antioxidant capacity and immune functions of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). Aquac. Res., 47: 398–408.
- Wang K., Wang E., Qin Z., Zhou Z., Geng Y., Chen D. (2016 b). Effects of dietary vitamin E deficiency on systematic pathological changes and oxidative stress in fish. Oncotarget, 20: 83869–83879.
- Wang R-F., An X-P., Wang Y., Qi J-W., Zhang J., Liu Y-H., Weng M-Q., Yang Y-P., Gao A-Q. (2020). Effects of polysaccharide from fermented wheat bran on growth performance, muscle composition, digestive enzyme activities and intestinal microbiota in juvenile common carp. Aquacult. Nutr., 26: 1–12.
- Weatherley A., Gill H. (1989). The role of muscle in determining growth and size in teleost fish. Experientia, 45: 875–878.
- Zhu T., Corraze G., Plagnes-Juan E., Quillet E., Dupont-Nivet M., Skiba-Cass S. (2018). Regulation of genes related to cholesterol metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a plant-based diet. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 314: R58–R70.
- Zimmerman A.M.A., Lowery M.S. (1999). Hyperplastic development and hypertrophic growth of muscle fibres in the white seabass (*Atractoscion nobilis*). J. Exp. Zool., 284: 299–308.

Ziolkowska E., Bogucka J., Dankowiakowska A., Rawski M., Mazurkiewicz J., Stanek M. (2020). Effects of a trans-galactooligosaccharide on biochemical blood parameters and intestine morphometric parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Animals*, 10: 723.

Received: 4 II 2021

Accepted: 22 IV 2021

6.2. OŚWIADCZENIE AUTORA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Z.16.2021.2022

Załącznik nr 3 do
Instrukcji drukowania, gromadzenia, rejestrowania
i udostępniania rozpraw doktorskich przez rady naukowe
dyscyplin (dyscyplin artystycznych) prowadzących
postępowanie w sprawie nadania stopnia naukowego doktora

Oświadczenie Autora rozprawy doktorskiej

mgr Ewa Aleksandra Ziółkowska

.....
(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko autora rozprawy doktorskiej)

Politechnika Bydgoska
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Katedra Fizjologii Zwierząt i Zoofizjoterapii
ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

.....
(miejsce pracy/afiliacja)

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionych artykułach naukowych stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej był następujący:

1. Ziółkowska, E., Bogucka, J., Dankowiakowska, A., Rawski, M., Mazurkiewicz, J., Stanek, M. Effects of a Trans-Galactooligosaccharide on Biochemical Blood Parameters and Intestine Morphometric Parameters of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Animals*, 2020, 10, 723. <https://doi.org/10.3390/ani10040723>, 100 pkt. MNiSW, IF 2.752

Współudział w opracowaniu koncepcji publikacji, pobieranie materiału badawczego, współudział w wykonaniu analiz laboratoryjnych, współudział w wykonaniu analiz statystycznych, współudział w interpretacji wyników, napisanie manuskryptu, korespondencja z redakcją i recenzentami, co stanowi 60% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

2. Ziółkowska, E., Bogucka, J., Mazurkiewicz, J., Rawski M., Różański S., Stanek M. Effects of a Trans-Galactooligosaccharide on Minerals Content of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Tissues. *Biological Trace Element Research*, 2021, 199, 4792-4804. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02600-w>, 70 pkt. MEiN, IF 3.738

Współudział w opracowaniu koncepcji publikacji, pobieranie materiału badawczego, współudział w wykonaniu analiz laboratoryjnych, współudział w wykonaniu analiz statystycznych, współudział w interpretacji wyników, współudział w napisaniu manuskryptu, korespondencja z redakcją i recenzentami, co stanowi 55% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

3. Ziótkowska, E., Bogucka, J., Rawski, M., Mazurkiewicz, J., Maiorano, G., Stanek, M. The first insights on trans-galactooligosaccharide effects on fatty acids profile and microstructure of muscle in common carp. *Annals of Animal Science*, 2022, 22, 1, 305-324. <https://doi.org/10.2478/aoas-2021-0030>, 140 pkt. MEiN, IF 2.090

Współudział w opracowaniu koncepcji publikacji, pobieranie materiału badawczego, współudział w wykonaniu analiz laboratoryjnych, współudział w wykonaniu analiz statystycznych, współudział w interpretacji wyników, napisanie manuskryptu, korespondencja z redakcją i recenzentami, co stanowi 60% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Bydgoszcz 08.01.2022

miejsowość, data



Podpis Autora rozprawy doktorskiej



Podpis promotora

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorских wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań - np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

6.3. OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH

Z.16.2021.2022

Załącznik nr 3 do
Instrukcji drukowania, gromadzenia, rejestrowania
i udostępniania rozpraw doktorskich przez rady naukowe
dyscyplin (dyscyplin artystycznych) prowadzących
postępowanie w sprawie nadania stopnia naukowego doktora

Oświadczenie Współautora

dr hab. inż. Magdalena Stanek, Prof. PBŚ

.....
(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko współautora)

Politechnika Bydgoska
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Katedra Fizjologii Zwierząt i Zoofizjoterapii
ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

.....
(miejsce pracy/afiliacja)

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionym/wymienionych artykule/artykułach naukowym/naukowych był następujący*:

1. Ziólkowska, E., Bogucka, J., Dankowiakowska, A., Rawski, M., Mazurkiewicz, J., Stanek, M. Effects of a Trans-Galactooligosaccharide on Biochemical Blood Parameters and Intestine Morphometric Parameters of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Animals*, 2020, 10, 723. <https://doi.org/10.3390/ani10040723>, 100 pkt. MNiSW, IF 2.752

Współudział w opracowaniu koncepcji manuskryptu, opracowanie metodologii w zakresie analiz biochemicznych krwi, współudział w wykonaniu analiz statystycznych wyników, nadzór merytoryczny wraz z dokonaniem korekt w manuskrypcie oraz opieka naukowa, co stanowi 10% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

2. Ziólkowska, E., Bogucka, J., Mazurkiewicz, J., Rawski M., Różański S., Stanek M. Effects of a Trans-Galactooligosaccharide on Minerals Content of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Tissues. *Biological Trace Element Research*, 2021, 199, 4792-4804. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02600-w>, 70 pkt. MEiN, IF 3.738

Współudział w opracowaniu koncepcji manuskryptu, współudział w opracowaniu metodologii w zakresie analiz składników mineralnych, współudział w wykonaniu analiz statystycznych wyników, nadzór merytoryczny wraz z dokonaniem korekt w manuskrypcie oraz opieka naukowa, co stanowi 15% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.


* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

3. Ziółkowska, E., Bogucka, J., Rawski, M., Mazurkiewicz, J., Maiorano, G., Stanek, M. The first insights on trans-galactooligosaccharide effects on fatty acids profile and microstructure of muscle in common carp. *Annals of Animal Science*, 2022, 22, 1, 305-324. <https://doi.org/10.2478/aoas-2021-0030>, 140 pkt. MEiN, IF 2.090

Współudział w opracowaniu metodologii w zakresie analiz profilu kwasów tłuszczowych, współudział w opracowaniu koncepcji publikacji, współudział w wykonaniu analiz statystycznych wyników, nadzór merytoryczny wraz z dokonaniem korekt w manuskrypcie oraz opieka naukowa, co stanowi 10% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej/wymienionych pracy/prac przez mgr Ewę Ziółkowską jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

08.02.2022 r.
.....
miejsowość, data


.....
Podpis współautora artykułu naukowego

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorских wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Oświadczenie Współautora

dr inż. Mateusz Rawski

.....
(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko współautora)

Uniwersytet Przyrodniczy
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Katedra Zoologii
Pracownia Rybactwa Śródlądowego i Akwakultury
ul. Wojska Polskiego 71c, 60-625 Poznań

.....
(miejsce pracy/afiliacja)

OŚWIADCZENIE

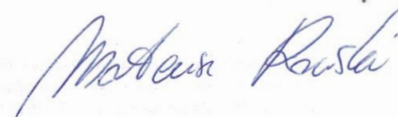
Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionym/wymienionych artykule/artykułach naukowym/naukowych był następujący*:

1. Ziółkowska, E., Bogucka, J., Dankowiakowska, A., Rawski, M., Mazurkiewicz, J., Stanek, M. Effects of a Trans-Galactooligosaccharide on Biochemical Blood Parameters and Intestine Morphometric Parameters of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Animals*, 2020, 10, 723. <https://doi.org/10.3390/ani10040723>, 100 pkt. MNiSW, IF 2.752

Opracowanie koncepcji badań, nadzór nad przeprowadzonymi badaniami, współudział w metodologii i pozyskaniu materiału do badań, współudział w interpretacji wyników oraz weryfikacja merytoryczna manuskryptu, co stanowi 10% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

2. Ziółkowska, E., Bogucka, J., Mazurkiewicz, J., Rawski M., Róžański S., Stanek M. Effects of a Trans-Galactooligosaccharide on Minerals Content of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Tissues. *Biological Trace Element Research*, 2021, 199, 4792-4804. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02600-w>, 70 pkt. MEiN, IF 3.738

Opracowanie koncepcji badań, nadzór nad przeprowadzonymi badaniami, współudział w metodologii i pozyskaniu materiału do badań, współudział w interpretacji wyników oraz weryfikacja merytoryczna manuskryptu, co stanowi 5% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.



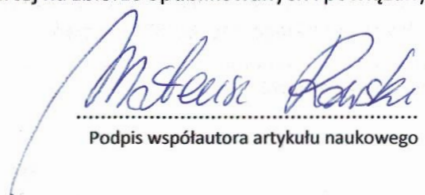
* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

3. Ziółkowska, E., Bogucka, J., Rawski, M., Mazurkiewicz, J., Maiorano, G., Stanek, M. The first insights on trans-galactooligosaccharide effects on fatty acids profile and microstructure of muscle in common carp. *Annals of Animal Science*, 2022, 22, 1, 305-324. <https://doi.org/10.2478/aoas-2021-0030>, 140 pkt. MEiN, IF 2.090

Opracowanie koncepcji badań, nadzór nad przeprowadzonymi badaniami, współudział w metodologii i pozyskaniu materiału do badań, współudział w interpretacji wyników oraz weryfikacja merytoryczna manuskryptu, co stanowi 10% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej/wymienionych pracy/prac przez mgr Ewę Ziółkowską jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Poznań 26.01.2022
miejsowość, data


Podpis współautora artykułu naukowego

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorских wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Oświadczenie Współautora

dr hab. inż. Joanna Bogucka, Prof. PBS

.....
(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko współautora)

Politechnika Bydgoska
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Katedra Fizjologii Zwierząt i Zoofizjoterapii
ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

.....
(miejsce pracy/afiliacja)

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionym/wymienionych artykule/artykułach naukowym/naukowych był następujący*:

1. Ziółkowska, E., Bogucka, J., Dankowiakowska, A., Rawski, M., Mazurkiewicz, J., Stanek, M. Effects of a Trans-Galactooligosaccharide on Biochemical Blood Parameters and Intestine Morphometric Parameters of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Animals* 2020, 10, 723. <https://doi.org/10.3390/ani10040723>, 100 pkt. MNiSW, IF 2.752

Współdział w opracowaniu metodologii w zakresie analiz histologicznych jelit, współdział w opracowaniu koncepcji publikacji, nadzór nad analizami histologicznymi, nadzór nad analizami statystycznymi oraz korekta manuskryptu, co stanowi 10% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

2. Ziółkowska, E., Bogucka, J., Mazurkiewicz, J., Rawski M., Różński Sz., Stanek M. Effects of a Trans-Galactooligosaccharide on Minerals Trace Element Research, 2021, 199, 4792-4804. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02600-w>, 70 pkt. MEiN, IF 3.738

Współdział w opracowaniu koncepcji publikacji oraz współdział w korekcie manuskryptu, co stanowi 10% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

3. Ziółkowska, E., Bogucka, J., Rawski, M., Mazurkiewicz, J., Maiorano, G., Stanek, M. The first insights on trans-galactooligosaccharide effects on fatty acids profile and microstructure of muscle in common carp. *Annals of Animal Science*, 2022, 22, 1, 305-324. <https://doi.org/10.2478/aoas-2021-0030>, 140 pkt. MEiN, IF 2.090

Opracowanie metodologii w zakresie analiz histologicznych mięśni, współdział w opracowaniu koncepcji publikacji, nadzór nad analizami histologicznymi, nadzór nad analizami statystycznymi oraz korekta manuskryptu, co stanowi 10% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej/wymienionych pracy/prac przez mgr Ewę Ziółkowską jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Bydgoszcz, 31.01.2022r.
.....
miejsowość, data

Bogucka
.....
Podpis współautora artykułu naukowego

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorских wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Oświadczenie Współautora

Prof. UPP dr hab. inż. Jan Mazurkiewicz

.....
(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko współautora)

Uniwersytet Przyrodniczy
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Katedra Zoologii
Pracownia Rybactwa Śródlądowego i Akwakultury
ul. Wojska Polskiego 71c, 60-625 Poznań

.....
(miejsce pracy/afiliacja)

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionym/wymienionych artykule/artykułach naukowym/naukowych był następujący*:

1. Ziółkowska, E., Bogucka, J., Dankowiakowska, A., Rawski, M., Mazurkiewicz, J., Stanek, M. Effects of a Trans-Galactooligosaccharide on Biochemical Blood Parameters and Intestine Morphometric Parameters of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Animals* 2020, 10, 723. <https://doi.org/10.3390/ani10040723>, 100 pkt. MNiSW, IF 2.752

Opracowanie koncepcji badań, nadzór nad przeprowadzonymi badaniami, współudział w metodologii i pozyskaniu materiału do badań, współudział w interpretacji wyników oraz weryfikacja merytoryczna manuskryptu, co stanowi 5% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

2. Ziółkowska, E., Bogucka, J., Mazurkiewicz, J., Rawski M., Różański S., Stanek M. Effects of a Trans-Galactooligosaccharide on Minerals Content of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Tissues. *Biological Trace Element Research*, 2021, 199, 4792-4804. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02600-w>, 70 pkt. MEiN, IF 3.738

Opracowanie koncepcji badań, nadzór nad przeprowadzonymi badaniami, współudział w metodologii i pozyskaniu materiału do badań, współudział w interpretacji wyników oraz weryfikacja merytoryczna manuskryptu, co stanowi 5% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorских wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

3. Ziółkowska, E., Bogucka, J., Rawski, M., Mazurkiewicz, J., Maiorano, G., Stanek, M. The first insights on trans-galactooligosaccharide effects on fatty acids profile and microstructure of muscle in common carp. *Annals of Animal Science*, 2022, 22, 1, 305-324. <https://doi.org/10.2478/aoas-2021-0030>, 140 pkt. MEiN, IF 2.090

Opracowanie koncepcji badań, nadzór nad przeprowadzonymi badaniami, współudział w metodologii i pozyskaniu materiału do badań, współudział w interpretacji wyników oraz weryfikacja merytoryczna manuskryptu, co stanowi 5% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej/wymienionych pracy/prac przez mgr Ewę Ziółkowską jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Dorota Ziółkowska, 26.01.2022
.....
miejscość, data

Jan Mazurkiewicz
.....
Podpis współautora artykułu naukowego

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorских wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Oświadczenie Współautora

dr hab. inż. Szymon Róžański, Prof. PBŚ

.....
(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko współautora)

Politechnika Bydgoska
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Laboratorium Badań Chemicznych i Analiz Instrumentalnych
ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

.....
(miejsce pracy/afiliacja)

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionym/wymienionych artykule/artykułach naukowym/naukowych był następujący*:

1. Ziółkowska, E., Bogucka, J., Mazurkiewicz, J., Rawski M., Róžański Sz., Stanek M. Effects of a Trans-Galactooligosaccharide on Minerals Content of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Tissues. Biological Trace Element Research, 2021, 199, 4792-4804. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02600-w>, 70 pkt. MEiN, IF 3.738

Nadzór nad wykonaniem analiz laboratoryjnych, współdział w interpretacji wyników oraz korekta języka angielskiego, co stanowi 10% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej/wymienionych pracy/prac przez mgr Ewę Ziółkowską jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Bydgoszcz, 01.02.2022 r.
.....
miejsowość, data

.....
Podpis współautora artykułu naukowego

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorских wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Oświadczenie Współautora

dr inż. Agata Dankowiakowska

.....
(tytuł zawodowy, imiona i nazwisko współautora)

Politechnika Bydgoska
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Katedra Fizjologii Zwierząt i Zoofizjoterapii
ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

.....
(miejsce pracy/afiliacja)

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionym/wymienionych artykule/artykułach naukowym/naukowych był następujący*:

1. Ziółkowska, E., Bogucka, J., Dankowiakowska, A., Rawski, M., Mazurkiewicz, J., Stanek, M. Effects of a Trans-Galactooligosaccharide on Biochemical Blood Parameters and Intestine Morphometric Parameters of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Animals* 2020, 10, 723. <https://doi.org/10.3390/ani10040723>, 100 pkt. MNiSW, IF 2.752

Współdział w pobieraniu materiału do badań, współdział w opracowaniu metodologii oraz nadzór nad analizami histologicznymi, co stanowi 5% indywidualnego udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej/wymienionych pracy/prac przez mgr Ewę Ziółkowską jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Bydgoszcz, 21.01.22
.....
miejsce, data

Agata Dankowiakowska
.....
Podpis współautora artykułu naukowego

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Co-author's Declaration

Prof. Giuseppe Maiorano

.....
(Professional title, name(s) and surname of the Co-author)

Department of Agricultural, Environmental and Food Sciences,
University of Molise,
Via F. De Sanctis snc, 86100 Campobasso, Italy

.....
(Workplace/affiliation)

DECLARATION

I declare that my author's contribution to the journal article/articles mentioned below was as follows*:

Ziółkowska, E., Bogucka, J., Rawski, M., Mazurkiewicz, J., Maiorano, G., Stanek, M. The first insights on trans-galactooligosaccharide effects on fatty acids profile and microstructure of muscle in common carp. *Annals of Animal Science*, 2022, 22, 1, 305-324. <https://doi.org/10.2478/aoas-2021-0030>, 140 pkt. MEiN, IF 2.090

Tasks completed as part of the article:

- a) performing chemical analyzes,
 - b) participation in the statistical analysis of the results;
- which constitutes 5% of individual participation in the preparation of the above-mentioned paper.

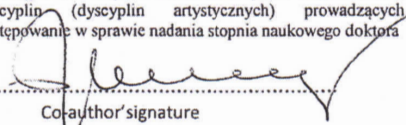
At the same time, I hereby agree to the submission of the above-mentioned paper by master Ewa Ziółkowska as part of the doctoral dissertation based on a collection of published and thematically related scientific papers.

* In the case of two- or multi-author papers, declarations of a candidate for the doctoral degree and co-authors are required, indicating their substantive contribution to the creation of each paper (e.g. the creator of the research hypothesis, the originator of the research, performance of specific research – e.g. carrying out particular experiments, developing and collecting questionnaires, etc., analysis of the results, preparation of the article manuscript and others). Identification of the contribution of a given author, including a candidate for the doctoral degree, should be precise enough to allow for an accurate assessment of his/her participation and role in the creation of each paper.

Z.16.2021.2022

Załącznik nr 3 do
Instrukcji drukowania, gromadzenia, rejestrowania
i udostępniania rozpraw doktorskich przez rady naukowe
dyscyplin (dyscyplin artystycznych) prowadzących
postępowanie w sprawie nadania stopnia naukowego doktora

Campobasso....21.01.2022...
Place, date


.....
Co-author's signature