

اثر اسیدی فایر سدیم دی فرمات (NDF) و سیتریک اسید بر پارامترهای رشد، خونی و ایمنی بچه ماهی قزل آلائی رنگین (*Oncorhynchus mykiss*)

محمدجواد محمدی^۱، ابراهیم رجب زاده قطرمی^{۲*}، مهدی سلطانی^۳، علیرضا قائدی^۴، مجتبی علیشاهی^۵

*Rajabzadeh48@gmail.com

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

۲- گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان

تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران

۴- گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۹۷

تاریخ پذیرش: خرداد ۹۸

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی اثر سطوح مختلف اسیدی فایر سدیم دی فرمات (NDF) و سیتریک اسید بر پارامترهای رشد، تغذیه، ایمنی و خونی (RBC, MCV, HCT, MCHC, HB, WBC) بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) انجام شده است. تعداد ۶۳۰ بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان با میانگین وزن $16/55 \pm 0/72$ گرم تهیه و به طور تصادفی در قالب هفت گروه با سه تکرار (هر تکرار ۳۰ عدد ماهی) تقسیم به مدت ۶۰ روز با جیره های آزمایشی تغذیه شدند. گروههای ۱، ۲ و ۳ به ترتیب حاوی ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ درصد اسیدی فایر سدیم دی فرمات (NDF) و گروههای ۴، ۵ و ۶ حاوی ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ درصد ترکیبی اسیدی فایرهای سدیم دی فرمات (NDF) (به میزان ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ درصد) و اسید سیتریک (به میزان ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ درصد) به نسبت برابر در جیره غذایی بودند. جیره گروه کنترل بدون اسیدی فایر بود. نتایج نشان داد اکثریت پارامترهای رشد (PER, FER, FCR, SGR, CF, BWI %) و خونی در گروه ها تغذیه شده با اسیدی فایر نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی داری داشتند ($P < 0.05$). کمترین ضریب تبدیل غذایی (FCR) با میزان $1 \pm 0/2$ در گروه ۴ (۰/۲ درصد ترکیبی سدیم دی فرمات (NDF) و اسید سیتریک) و بیشترین آن در گروه شاهد $1/39 \pm 0/17$ بود ($P < 0.05$). بیشترین میزان پارامترهای خونی (RBC, MCHC, HCT, HB) در گروه ۵ بدون اختلاف معنی دار با گروه ۴ ($P > 0.05$) و اختلاف معنی دار با گروه شاهد بود ($P < 0.05$). تعداد گلبولهای سفید تحت تاثیر اسیدی فایرها قرار نگرفتند و اختلاف معنی داری با گروه شاهد نداشتند ($P > 0.05$). پارامترهای ایمنی نشان داد پارامترهای پروتئین کل، IgM، سرم، قدرت باکتری کشی سرم در گروه ۴ با تاثیر مثبت استفاده اسیدی فایر در خوراک نسبت به گروه شاهد قرار گرفته اند ($P < 0.05$). افزودن ترکیبی اسیدی فایر سدیم دی فرمات (NDF) و سیتریک اسید به میزان ۰/۲ درصد (گروه ۴) به جیره غذایی بچه ماهیان قزل آلائی رنگین کمان سبب بهبود پارامترهای رشد و ایمنی می گردد و تاثیر مثبتی بر کاهش ضریب تبدیل غذایی (FCR) دارد.

لغات کلیدی: اسیدی فایر، قزل آلائی رنگین کمان، پارامترهای رشد، پارامترهای ایمنی، پارامترهای خونی

*نویسنده مسئول

مقدمه

صنعت پرورش ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) طی دو دهه اخیر در کشور رشد زیادی داشته است. در حال حاضر، قزل آلائی رنگین کمان تنها گونه ماهی سردآبی پرورشی کشور است که از اهمیت بسیار زیادی در سیاست‌گذاری‌ها و برنامه‌ریزی‌های پژوهشی و اجرایی کشور برخوردار است. یکی از راهکارهای کاهش هزینه استفاده از مکمل‌های تغذیه‌ای جهت کاهش ضریب تبدیل غذایی^۱ (FCR) است. نتایج مطالعات علمی نشان داده که کارایی تغذیه، درصد غذادهی، درجه حرارت آب و اندازه ماهی از جمله عواملی هستند که قابلیت تولید تجاری و اقتصادی ماهیان را تعیین می‌کنند (Deng et al., 2005). به منظور افزایش تولید و فراهم آوردن سوددهی بیشتر، ارزیابی اقتصادی تغذیه و تعیین نیازهای غذایی ماهیان بسیار ضروری می‌باشد. در ارتباط با تقاضای جهانی برای مواد غذایی سالم انسانی و تولید محصولات سازگار با محیط زیست و همچنین افزایش نگرانی در مورد باقیمانده‌های دارویی و امکان ایجاد سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها، اتحادیه اروپا در سال ۱۹۹۹ طی یک تصمیم پیشگیرانه، استفاده از چهار آنتی بیوتیک خوراکی رایج را ممنوع اعلام کرد (Huyghebaert, 2003). استفاده از محرک‌های رشد مثل اسیدی فایرها^۲ (ترکیبات حاوی اسیدهای آلی) به طور چشمگیری افزایش یافته است. استفاده از مواد اسیدی کننده در جیره غذایی ماهی و میگو می‌تواند روشی مؤثر جهت دستیابی به تولید سالم، با صرفه اقتصادی و پایدار باشد (Luckstadt, 2007). اسیدی فایرها ترکیباتی از اسیدهای آلی هستند که ۷-۱۰ اتم کربن دارند و به طور گسترده در گیاهان و بافت حیوانات وجود دارند. مطالعات انجام شده بر گونه‌های مختلف نشان می‌دهد که طیف زیادی از اسیدهای آلی به همراه نمک آنها یا مواد افزودنی می‌توانند رشد، مصرف غذا و مقاومت در برابر بیماری را در ماهی بهبود بخشند (Luckstadt, 2008a). در بین مکمل‌های غذایی، اسیدهای آلی جایگزین مناسبی معرفی شدند (Ceylan and Ciftci, 2002). بیشتر اسیدهای آلی تجاری که در صنعت مواد غذایی و خوراک استفاده می‌شود، به طور مصنوعی تهیه می‌شود (Wing-Keong and Chik-Boon, 2016). اسیدهای آلی شامل اسید فرمیک، اسید استیک، پروپیونیک و اسید سیتریک از اسیدهای آلی متداولی هستند

که در جیره غذایی آبزیان استفاده شده‌اند (Wing-Keong and Chik-Boon, 2016) همچنین این اسیدها ترکیب شده با نمک‌ها [پتاسیم (K)، سدیم (Na)، کلسیم (Ca) و ...]. به عنوان جایگزینی برای بهبود عملکرد و سلامت دام‌ها استفاده گردیدند (Lim et al., 2010). نمک پتاسیم دی فرمات (KDF^۳) در ماهیان خون گرم و خون سرد و اسید فرمیک به عنوان اولین ماده محرک رشد غیر آنتی بیوتیک توسط اتحادیه اروپا تصویب و معرفی گردیدند (Zhou et al., 2009). در پژوهشی که Luckstadt و همکاران (۲۰۰۴) بر رشد جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با اسیدی فایرها داشتند گزارش نمودند که مخلوط مناسبی از اسیدهای ارگانیک T تاثیر بسزایی در رشد جوجه‌های گوشتی دارد بدون آنکه از هر گونه آنتی بیوتیک به عنوان محرک رشد استفاده شود. همچنین Luckstadt (۲۰۰۸a) در پژوهشی مרוوری تاثیر اسیدی فایرها بر وزن‌گیری، ضریب تبدیل خوراک و مقاومت در برابر بیماریها را در انواع ماهیان سردآبی و گرمابی مورد بررسی قرار داده است. با توجه به ممنوعیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در پرورش آبزیان در اتحادیه اروپا، اسیدی فایرها جایگزین مناسبی برای آنتی بیوتیک‌ها می‌باشند. سدیم دی فرمات (NDF) یک مولکول جدید ترکیبی از اسید فرمیک (HCOOH) و فرمات سدیم (HCOONa) است و به نام Formi NDF شناخته می‌شود. اسید فرمیک pH محیط گوارش را بشدت کاهش می‌دهد و یک ترکیب ضد باکتریایی قوی می‌باشد در حالیکه اسید سیتریک یک ترکیب ضد قارچ بشمار می‌آید. بر این اساس مخلوط حاصل ترکیبی خواهد بود که pH محیط گوارشی را کاهش می‌دهد و اجازه رشد به باکتریها و قارچهای پاتوژن نخواهد داد (Celik et al., 2003). سدیم دی فرمات بر باکتری‌های پاتوژن از جمله سالمونلا که در طول دستگاه گوارش قرار می‌گیرد، مؤثر است (Luckstadt and Theobald, 2009). مطالعات کمی در رابطه با استفاده سدیم دی فرمات (NDF) در آبزیان وجود دارد (Wing-Keong and Chik-Boon, 2016) ولی مطالعات زیادی در رابطه با سایر اسیدهای آلی در آبزیان وجود دارد که نتایج متفاوتی بیان کردند. برخی از پژوهشگران بیان کردند که استفاده از اسیدهای آلی می‌تواند سبب افزایش رشد و تحریک ایمنی در آبزیان شود و برخی عدم تاثیر اسیدهای آلی بر رشد و ایمنی را گزارش کردند. جافرنوده و همکاران (۱۳۹۴) بیان کردند که افزودن

¹. Food conversion ratio

². Acidifiers

³. Potassium diformate

ذکر است، جیره غذایی همه گروهها شامل غذای تجاری FFT2 با اسیدی فایرها بوده است (Castillo et al., 2014).
 گروه ۱ (۰/۲٪ سدیم دی فرمات)
 گروه ۲ (۰/۴٪ سدیم دی فرمات)
 گروه ۳ (۰/۶٪ سدیم دی فرمات)
 گروه ۴ (۰/۱٪ سدیم دی فرمات و ۰/۱٪ سیتریک اسید)
 گروه ۵ (۰/۲٪ سدیم دی فرمات و ۰/۲٪ سیتریک اسید)
 گروه ۶ (۰/۳٪ سدیم دی فرمات و ۰/۳٪ سیتریک اسید)
 گروه ۷ کنترل (شاهد): غذای تجاری FFT2 بدون اسیدی فایر
 به منظور سازش پذیری ماهیان، کلیه گروهها یک هفته با غذای گروه کنترل تغذیه شدند و در طول این مدت ماهیان از نظر سلامتی بررسی شدند. عوامل فیزیکی و شیمیایی آب به صورت روزانه کنترل می گردید. غذاهای ماهیان در سه نوبت ساعات ۷، ۱۳ و ۱۹ به میزان ۲ درصد وزن بدن در روز انجام شد (طبق دستورالعمل کارخانه تولید جیره غذایی).

خوراک و شرایط آب

جیره ماهیان مورد آزمون از غذای کسترو^۱ مخصوص قزل آلائی رنگین کمان FFT2 تولید شده در کارخانه خوراک آبزیان قیدرپاتیرا شهرکرد بوده است. برای تهیه و آماده سازی جیره اسیدی فایرهای مورد نیاز از شرکت مهدامین خریداری و به آزمایشگاه کارخانه انتقال داده شد. اسیدی فایرها سدیم دی فرمات و سیتریک اسید بدون تغییر فرمولاسیون به مواد خشک اولیه جیره اضافه و بعد از مخلوط کردن مواد اولیه وارد خط تولید کارخانه شد. برای گروه کنترل از غذای تجاری FFT2 بدون اسیدی فایر استفاده شد. تأمین آب از طریق چشمه با میانگین دمای ثابت ۱۲/۵ درجه سانتی گراد، اکسیژن 7 ± 0.5 میلی گرم در لیتر و سختی 27 ± 250 میلی گرم در لیتر و میزان pH برابر با 7.8 ± 0.3 بود و تعویض آب مخازن (جریان آب) به صورت ثقلی به میزان ۰/۳ لیتر در ثانیه انجام شد.

پارامترهای مورد بررسی

برای بررسی پارامترهای رشد، در ابتدا و انتهای دوره زیست سنجی ماهیان انجام شد و برای پارامترهای خونی و ایمنی، در انتهای دوره، نمونه گیری خونی انجام شد. برای آزمایشهای خون شناسی و ایمنی شناسی از هر تکرار به صورت تصادفی تعداد ۶ و در مجموع از هر گروه ۱۸ عدد ماهی پس از بیهوشی

ترکیب ۰/۵ درصد پتاسیم سوربات و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی (*Lactobacillus casei*) به جیره غذایی بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان تأثیرات مثبتی بر رشد دارد. مطالعات انجام شده بر اسید بایوترونیک (یکی از اسیدهای آلی) در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در سطح ۸ گرم در کیلو گرم می تواند بر شاخص های رشد و پارامترهای خونی و ایمنی ماهی کپور معمولی تأثیرگذار باشد (اصغرزاده، ۱۳۹۴). حدیدی و طاعتی (۱۳۹۵) اظهار نمودند که مکمل اسیدی فایر بایوترونیک در سطح ۸ گرم در کیلوگرم در تقویت کارایی تغذیه و نیز بهبود برخی از شاخص های خونی و ایمنی بچه ماهیان اسکار تأثیر جزئی داشته است. افزودن ۳ گرم در کیلوگرم سدیم دی فرمات (NDF) به جیره غذایی ماهی تیلپیا سبب بهبود رشد و بهتر شدن راندمان غذایی می شود (Liebert et al., 2010). همچنین استفاده از سدیم دی فرمات (NDF) در جیره، قابلیت هضم مواد مغذی، اسیدهای آمینه و کیفیت فیزیکی پروتئین غله جو را در جیره قزل آلائی رنگین کمان بهبود می بخشد (Morken et al., 2011). سدیم دی فرمات (NDF) سبب کاهش بار باکتریایی بیماریزا و همچنین بهبود میکروفلور روده در جوجه های گوشتی می شود. بهترین درجه مصرفی آن در جوجه های گوشتی ۳-۱ کیلوگرم در تن است (Luckstadt et al., 2014). با توجه به اثرات مفید پروبیوتیک ها و اسیدهای آلی در صنعت آبزی پروری (Wing-Keong et al., 2009; Romano et al., 2015)، این پژوهش با هدف بررسی اثرات سینرژیستی نمک اسیدهای آلی سدیم دی فرمات (NDF) و اسید سیتریک در جیره غذایی و تأثیر آن بر پارامترهای رشد، تغذیه و برخی از پارامترهای خونی بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان انجام شد.

مواد و روش ها

طراحی تحقیق

این پژوهش به مدت ۶۰ روز در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری واقع در ۲۵ کیلومتری جنوب شهر یاسوج انجام شد. بچه ماهیان قزل آلائی رنگین کمان با میانگین وزن $16/55 \pm 0/72$ گرم تهیه شده از این مرکز، بعد از سازگاری به طور تصادفی در ۲۱ تانک در قالب هفت گروه شامل گروه ۱ (۰/۲٪ سدیم دی فرمات) و ... تقسیم شدند (Castillo et al., 2014). هر گروه از سه تکرار تشکیل شده و در هر تکرار ۳۰ عدد ماهی ریخته شد. شایان

¹ Extruded

پارامترهای ایمنی

برای اندازه گیری میزان فعالیت لایزوزیم سرم از روش آگارز لیزوپلیت توصیه شده توسط Roed و همکاران (۱۹۹۳) استفاده شد. برای اندازه گیری قدرت باکتری کشی نمونه‌های سرم از روش توصیه شده توسط Kajita و همکاران (۱۹۹۰) استفاده شد و نتایج به صورت متوسط تعداد باکتری شمارش شده در هر سه تکرار برای هر نمونه گزارش گردید. میزان آلبومین با استفاده از روش BCG^۷ و با استفاده از کیت های تشخیصی شرکت زیست شیمی محاسبه شد (Durgawale et al., 2005). پروتئین کل سرم بر اساس روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) و با استفاده از کیت استاندارد تخمین پروتئین شرکت زیست شیمی محاسبه گردید. میزان پروتئین کل با کیت تخمین پروتئین استاندارد تعیین گردید. سپس میزان گلوبولین سرم با کم کردن میزان پروتئین بدست آمده ثانویه (که تقریباً تماماً آلبومین است) از پروتئین کل سرم محاسبه گردید (Lowry et al., 1951).

آنالیز آماری

برای آنالیز آماری نتایج داده ها از نرم افزار SPSS و از روش آنالیز واریانس یکطرفه ANOVA و تست تکمیلی دانکن در سطح معنی داری ($P < 0.05$) استفاده شد. کلیه داده ها بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش گردیدند.

نتایج

نتایج مربوط به پارامترهای رشد گروه های مختلف نشان می دهد (جدول ۱) که درصد افزایش وزن، ضریب رشد ویژه، فاکتور وضعیت، نسبت بازده غذایی و پروتئین در گروه ۴ افزایش معنی داری نسبت به گروه شاهد داشته است ($P < 0.05$) اما با سایر گروه ها فاقد اختلاف معنی دار بوده است ($P < 0.05$). کمترین ضریب تبدیل غذایی (FCR) در گروه ۴ حاوی ۰/۱٪ سدیم دی فرمات و ۰/۱٪ سیتریک اسید بوده که نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی داری داشته است ($P < 0.05$). پارامترهای HSI و بازماندگی در کل گروهها فاقد اختلاف معنی دار ($P > 0.05$) بودند. نتایج پارامتر خونی نشان داد که برخی از این پارامترهای تحت تاثیر اسیدی فایرها قرار گرفتند (جدول ۲).

با پودر گل میخک با غلظت ۲۰۰ ppm (مهرابی، ۱۳۷۸) بوسيله سرنگ ۵ سی سی و سر سوزن ۲۱ آغشته به هپارین از طریق ورید ساقه دمی خونگیری انجام گردید.

پارامترهای رشد

پارامترهای رشد شامل درصد افزایش وزن (BWI)^۱ (Hung et al., 2008)، فاکتور وضعیت (CF)^۲، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، ضریب رشد ویژه (SGR)^۳ (Bagenal, 1978)، نسبت بازده پروتئین (PER)^۴ و نسبت بازده غذایی (FER)^۵، (Tacon and Akiyama, 1997) محاسبه گردیدند. همچنین درصد بازماندگی و شاخص کبدی (HIS)^۶ طبق فرمول های ذیل مورد ارزیابی قرار گرفت:

Survival rate = (تعداد ماهیان در انتهای دوره آزمایش) / (تعداد ماهیان در ابتدای دوره آزمایش) × 100 (Mazurkiewicz et al., 2008)

HSI = (Biswas, 1993) × ۱۰۰ (وزن بدن / وزن کبد)

پارامترهای خون شناسی

هماتوکریت (PCV) به روش معمول با استفاده از لوله های میکروهماتوکریت و سانتریفوژ نمونه صورت گرفت (Fox et al., 1997). هموگلوبین به روش استاندارد سیانومت - هموگلوبین انجام شد و میزان هموگلوبین بر حسب گرم در دسی لیتر محاسبه گردید (Goldenfarb et al., 1971). شمارش کلی گلبول های قرمز (TRBC) ماهی به روش دستی و با استفاده از لام هماسیتومتر نتوبار صورت گرفت. تعداد گلبول های قرمز در میلی لیتر مکعب خون محاسبه شد (Ellis, 1990). شمارش افتراقی گلبولهای سفید شامل لنفوسیت، نوتروفیل، مونوسیت و ائوزینوفیل نیز انجام شد (Feldman et al., 2000). اندیس های گلبولی حجم متوسط گلبولی (MCV %)، متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH g/dl) و متوسط غلظت هموگلوبین گلبول های قرمز (MCHC g/dl) نیز محاسبه گردید (Hu et al., 2005).

² Body Weight Increase

³ Condition factor

⁴ Specific Growth Ratio

⁵ Protein Efficiency Ratio

⁶ Food Efficiency Ratio

⁷ Hepato somatic index

⁷ Bromocresol green method

جدول ۱: پارامترهای رشد در گروه‌های مختلف (میانگین $\pm$ انحراف معیار) در ماهی قزل آلا با جیره‌های حاوی اسیدی فایرTable 1: Growth parameters in different groups (mean $\pm$ SD) in *Oncorhynchus mykiss* with acidic diets.

پارامترهای رشد	گروه ۱	گروه ۲	گروه ۳	گروه ۴	گروه ۵	گروه ۶	شاهد
% BWI	۱۴۴/۴ $\pm$ ۱۴/۰۷ ^{ab}	۱۵۸/۳۸ $\pm$ ۸ ^a	۱۳۷/۵۷ $\pm$ ۱۰/۶۵ ^{ab}	۱۶۹/۸۲ $\pm$ ۳۳/۵۸ ^a	۱۴۹/۵۲ $\pm$ ۲۱/۲ ^{ab}	۱۴۹/۵۷ $\pm$ ۱۸/۸۶ ^{ab}	۱۱۸/۸۶ $\pm$ ۱۲/۷۷ ^b
CF	۱/۰۸ $\pm$ ۰/۰ ^b	۱/۱ $\pm$ ۰/۰۷ ^{ab}	۱/۱۷ $\pm$ ۰/۰۴ ^a	۱/۱ $\pm$ ۰/۰۶ ^{ab}	۱/۱۱ $\pm$ ۰/۰۲ ^{ab}	۱/۱۳ $\pm$ ۰/۰۱ ^{ab}	۱/۱۷ $\pm$ ۰/۰۱ ^a
SGR	۱/۴۸ $\pm$ ۰/۰۹ ^{ab}	۱/۵۸ $\pm$ ۰/۰۵ ^{ab}	۱/۴۴ $\pm$ ۰/۰۷ ^{ab}	۱/۶۴ $\pm$ ۰/۰۳ ^a	۱/۵۱ $\pm$ ۰/۰۴ ^{ab}	۱/۵۱ $\pm$ ۰/۰۲ ^{ab}	۱/۳ $\pm$ ۰/۰۹ ^b
FCR	۱/۱۸ $\pm$ ۰/۰۶ ^{ab}	۱/۰۷ $\pm$ ۰/۰۲ ^{ab}	۱/۲ $\pm$ ۰/۰۷ ^{ab}	۱ $\pm$ ۰/۰۳ ^b	۱/۰۹ $\pm$ ۰/۰۹ ^{ab}	۱/۱۱ $\pm$ ۰/۰۴ ^{ab}	۱/۳۹ $\pm$ ۰/۱۷ ^a
FER	۰/۸۴ $\pm$ ۰/۰۴ ^{ab}	۰/۹۳ $\pm$ ۰/۰۱ ^{ab}	۰/۸۳ $\pm$ ۰/۰۵ ^{ab}	۱/۰۲ $\pm$ ۰/۰۲ ^a	۰/۹۱ $\pm$ ۰/۰۸ ^{ab}	۰/۹ $\pm$ ۰/۰۱۳ ^{ab}	۰/۷۲ $\pm$ ۰/۰۸ ^b
PER	۲/۱۲ $\pm$ ۰/۱۲ ^{ab}	۲/۳۲ $\pm$ ۰/۰۴ ^{ab}	۲/۰۷ $\pm$ ۰/۱۲ ^{ab}	۲/۵۵ $\pm$ ۰/۵۳ ^a	۲/۲۸ $\pm$ ۰/۲۱ ^{ab}	۲/۲۶ $\pm$ ۰/۳۲ ^{ab}	۱/۸۱ $\pm$ ۰/۲۱ ^b
HSI	۲/۱۲ $\pm$ ۰/۵۹	۱/۷ $\pm$ ۰/۳۱	۱/۷ $\pm$ ۰/۳	۱/۵۴ $\pm$ ۰/۲	۱/۵۷ $\pm$ ۰/۱۸	۱/۶ $\pm$ ۰/۲۳	۱/۵۸ $\pm$ ۰/۳
بازماندگی %	۹۰ $\pm$ ۳/۳۳	۹۰/۴۴ $\pm$ ۵/۰۹	۹۰ $\pm$ ۶/۶۶	۹۱/۱۱ $\pm$ ۵/۰۹	۹۰/۵۵ $\pm$ ۳/۸۴	۸۸/۸۸ $\pm$ ۱/۹۲	۹۲/۲۲ $\pm$ ۶/۹۳

*حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح (P<۰/۰۵) است.

جدول ۲: پارامترهای خونی در گروه‌های مختلف (میانگین $\pm$ انحراف معیار) در ماهی قزل آلا با جیره‌های حاوی اسیدی فایرTable 2: Blood parameters in different groups (mean $\pm$ SD) in *Oncorhynchus mykiss* with acidic diets.

پارامترهای خونی	گروه ۱	گروه ۲	گروه ۳	گروه ۴	گروه ۵	گروه ۶	شاهد
گلبول قرمز (تعداد ۱۰ ^۶ سلول بر میلی‌متر مکعب)	۱/۴۳ $\pm$ ۰/۱۵ ^{ab}	۱/۵۹ $\pm$ ۰/۱۶ ^{ab}	۱/۶ $\pm$ ۰/۱۱ ^{ab}	۱/۶۲ $\pm$ ۰/۱۳ ^{ab}	۲ $\pm$ ۰/۴۱ ^a	۱/۶۵ $\pm$ ۰/۵۷ ^{ab}	۱/۴ $\pm$ ۰/۱ ^b
کل گلبولهای سفید (تعداد ۱۰ ^۶ سلول بر میلی‌متر مکعب)	۷/۵۱ $\pm$ ۱/۰۵	۷/۳۸ $\pm$ ۱/۱۶	۷/۴۶ $\pm$ ۱/۳۲	۷/۴۱ $\pm$ ۰/۶۲	۷/۴۴ $\pm$ ۰/۰۳	۷/۴۱ $\pm$ ۱/۰۵	۷/۴۸ $\pm$ ۱/۱۸
هموگلوبین (گرم بر دسی‌لیتر)	۹/۶۳ $\pm$ ۰/۲ ^{cd}	۹/۸۵ $\pm$ ۰/۷۳ ^{bcd}	۹/۲۸ $\pm$ ۰/۲۸ ^d	۱۰/۷۶ $\pm$ ۰/۵۶ ^b	۱۲ $\pm$ ۰/۲۵ ^a	۱۰/۳۶ $\pm$ ۰/۶۴ ^{bc}	۹/۱۸ $\pm$ ۰/۳۳ ^d
هماتوکریت %	۴۵/۳۳ $\pm$ ۲/۰۸ ^d	۵۰/۱۶ $\pm$ ۳/۱۲ ^{bcd}	۵۱/۳۳ $\pm$ ۲/۰۶ ^{bc}	۵۳/۶۶ $\pm$ ۲/۵ ^b	۵۶/۸۳ $\pm$ ۳/۳۷ ^{ab}	۵۰ $\pm$ ۳/۱۴ ^{dbc}	۴۷/۱۶ $\pm$ ۲/۷۸ ^{dc}
MCV(fl)	۳۱۸/۵۸ $\pm$ ۴۳/۹۵	۳۱۶/۹۹ $\pm$ ۳۷/۴۸	۳۲۲/۲۱ $\pm$ ۲۷/۵۶	۳۳۱/۳ $\pm$ ۲۰/۷۲	۲۹۷/۷ $\pm$ ۸۵/۸۷	۳۰۳/۰۳ $\pm$ ۷۴/۲۷	۳۲۸/۸۷ $\pm$ ۳۷
MCH(pg)	۶۷/۶۴ $\pm$ ۸/۴۲	۶۲/۵ $\pm$ ۵/۶۸	۵۸/۲۹ $\pm$ ۴/۹۸	۶۶/۶۶ $\pm$ ۷/۱۷	۶۴ $\pm$ ۱۹/۲۸	۷۰/۳ $\pm$ ۱۷/۷۷	۶۵/۹۴ $\pm$ ۶/۰۸
MCHC%	۲/۱۲۶ $\pm$ ۰/۶۱ ^b	۱۹/۶۶ $\pm$ ۱/۴۳ ^{ab}	۱۸/۱ $\pm$ ۰/۷۶ ^b	۲۰/۱ $\pm$ ۱/۴۸ ^{ab}	۲۱/۴۷ $\pm$ ۱/۰۶ ^a	۲۳/۲ $\pm$ ۱/۸۴ ^a	۱۹/۵۲ $\pm$ ۱/۲۷ ^{ab}

*حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح (P<۰/۰۵) است.

قرار نگرفتند و اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشتند (P>۰/۰۵). نتایج بررسی اسیدی فایرها بر پارامترهای ایمنی نشان داد (جدول ۴) که میزان پروتئین کل در گروه ۴ در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشته است (P<۰/۰۵) همچنین در همه گروه‌های تغذیه شده با اسیدی فایرها، میزان ایمنوگلوبولین^۱ (IgM) سرم نسبت به شاهد بالاتر و این افزایش اختلاف معنی‌داری بوده است (P<۰/۰۵).

بیشترین تعداد گلبولهای قرمز و هموگلوبین در گروه‌های تغذیه شده با غذای حاوی اسیدی فایر بوده است که با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری دارد (P<۰/۰۵). میزان هماتوکریت در گروه ۵ بیشترین مقدار را بدون اختلاف معنی‌دار (P>۰/۰۵) با گروه ۳ و ۴ و اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) با سایر گروه‌ها نشان داد. بالاترین میزان غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) در گروه ۶ بدون اختلاف معنی‌دار (P>۰/۰۵) با گروه ۴ و ۵ و اختلاف معنی‌دار را (P<۰/۰۵) با سایر گروه‌ها داشت. گلبولهای سفید (جدول ۳) تحت تاثیر این اسیدی فایرها

¹ Immunoglobulin

جدول ۳: میانگین انواع گلبولهای سفید در گروههای مختلف (میانگین $\pm$ انحراف معیار) در ماهی قزل آلا با جیره های حاوی اسیدی فایر
 Table 3: The mean of different types of white blood cells in different groups (mean $\pm$ SD) in *Oncorhynchus mykiss* with acidic diets.

گلبولهای سفید	گروه ۱	گروه ۲	گروه ۳	گروه ۴	گروه ۵	گروه ۶	شاهد
لنفوسیت %	۷۶/۷ $\pm$ ۳/۵۷	۷۶/۷۸ $\pm$ ۰/۹۶	۷۶/۵ $\pm$ ۱/۳۴	۷۶/۷۱ $\pm$ ۱/۳۴	۷۶/۵۵ $\pm$ ۱/۶۷	۷۵/۳۶ $\pm$ ۱/۶۳	۷۶/۳۷ $\pm$ ۱/۵۶
نوتروفیل %	۱۷/۹۳ $\pm$ ۰/۶۱ ^a	۱۷/۶ $\pm$ ۰/۳۶ ^{ab}	۱۷/۶۱ $\pm$ ۰/۳ ^{ab}	۱۷/۴۳ $\pm$ ۰/۳۲ ^{ab}	۱۷/۵۵ $\pm$ ۰/۲ ^{ab}	۱۷/۴۳ $\pm$ ۰/۲ ^{ab}	۱۷/۱۸ $\pm$ ۰/۹۴ ^b
مونوسیت %	۴/۱ $\pm$ ۰/۲	۴/۰۱ $\pm$ ۰/۳۷	۴/۰۱ $\pm$ ۰/۴	۳/۹۵ $\pm$ ۰/۲۴	۳/۹۵ $\pm$ ۰/۳۲	۳/۸ $\pm$ ۰/۲۳	۳/۹۶ $\pm$ ۰/۲۶
اِئوزینوفیل %	۰/۲ $\pm$ ۰/۱۱	۰/۲۵ $\pm$ ۰/۱۶	-	-	-	-	-

*حروف غیر همانم نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ($P < 0.05$) است.

جدول ۴: میانگین پارامترهای ایمنی در گروه های مختلف (میانگین $\pm$ انحراف معیار) در ماهی قزل آلا با جیره های حاوی اسیدی فایر
 Table 4: Mean of immune parameters in different groups (mean $\pm$ SD) in *Oncorhynchus mykiss* with acidic diets.

پارامترهای ایمنی	گروه ۱	گروه ۲	گروه ۳	گروه ۴	گروه ۵	گروه ۶	شاهد
لایزوزیم سرم (واحد در میلی لیتر)	۱۲۷/۷۷ $\pm$ ۱۶/۴۱	۱۲۲ $\pm$ ۱۲/۱۳	۱۳۱/۷۷ $\pm$ ۱۵/۴۹	۱۲۶/۴۴ $\pm$ ۹/۹۱	۱۲۱/۹۴ $\pm$ ۹/۷۹	۱۲۰/۵۵ $\pm$ ۵/۳۴	۱۲۱/۴۴ $\pm$ ۹/۷۶
پروتئین کل (گرم در دسی لیتر)	۴/۷۴ $\pm$ ۰/۳۹ ^a	۴/۴۰ $\pm$ ۱/۱۲ ^a	۳/۶۸ $\pm$ ۱/۳۲ ^{ab}	۵/۳۷ $\pm$ ۱/۳۲ ^a	۴/۶۶ $\pm$ ۱/۴۳ ^a	۴/۴۶ $\pm$ ۰/۹۱ ^a	۲/۱۶ $\pm$ ۰/۳۸ ^b
آلبومین (گرم در دسی لیتر)	۱/۶۹ $\pm$ ۰/۱۰	۱/۳۴ $\pm$ ۰/۳۹	۱/۴۹ $\pm$ ۰/۵۷	۲/۰۷ $\pm$ ۰/۶۵	۱/۷۳ $\pm$ ۰/۳۸	۱/۷۷ $\pm$ ۰/۵۸	۱/۷۰ $\pm$ ۰/۶۰
IgM سرم (گرم در دسی لیتر)	۳/۰۵ $\pm$ ۰/۴۲ ^a	۳/۰۱ $\pm$ ۰/۲۸ ^a	۲/۶۵ $\pm$ ۰/۶۲ ^a	۳/۲۹ $\pm$ ۰/۳۳ ^a	۲/۹۳ $\pm$ ۰/۱۷ ^a	۲/۶۸ $\pm$ ۰/۶۴ ^a	۰/۹۶ $\pm$ ۰/۳۷ ^b
قدرت باکتری کشی سرم (تعداد باکتری شمارش شده در میلی لیتر $\times 10^4$)	۵ $\pm$ ۰/۸۴ ^{ab}	۴/۳۲ $\pm$ ۱ ^{bc}	۴/۷۳ $\pm$ ۰/۹۱ ^{ab}	۴/۳۸ $\pm$ ۱/۲۶ ^{bc}	۳/۹ $\pm$ ۰/۷۱ ^{bc}	۳/۲۵ $\pm$ ۰/۵۷ ^c	۵/۶۱ $\pm$ ۲/۲۴ ^a

*حروف غیر همانم نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ($P < 0.05$) است.

بهترین قدرت باکتری کشی سرم در گروه ۵ مشاهده شد که با گروه شاهد اختلاف معنی داری داشته است ($P < 0.05$). با این وجود اختلاف معنی داری در میزان لایزوزیم و آلبومین سرم خون در بین گروه های مختلف مشاهده نشد ($P > 0.05$).

بحث و نتیجه گیری

اسیدها آلی مانند اسیدهای کربوکسیلیک که در واکنش تولید نمک می کنند، بیشتر برای محافظت و نگهداری مواد غذایی استفاده می شوند. اسیدهای آلی با حفظ pH مناسب دستگاه گوارش سبب بهبود اثر آنزیم ها بر مواد غذایی و جذب مواد غذایی بیشتر برای حیوانات پرورشی می شود که نتیجه آن کاهش مواد غذایی جذب نشده برای رشد باکتریهاست (Luckstadt, 2008b).

کربوکسیلیک که در واکنش تولید نمک می کنند، بیشتر برای عنوان مواد افزودنی خوراک حیوانات بیشتر مورد توجه متخصصین تغذیه قرار گرفته است. بیشتر پارامترهای رشد و برخی پارامترهای ایمنی در این پژوهش تحت تاثیر اسیدی فایرها قرار گرفتند بطوریکه نرخ رشد ویژه، درصد افزایش وزن، نسبت بازده پروتئین و فاکتور وضعیت (ضریب چاقی) در گروه ۴ با جیره حاوی ۰/۲ درصد ترکیبی اسیدی فایرها افزایش معنی داری نسبت به گروه شاهد داشته است ($P < 0.05$). ضریب تبدیل غذایی نشان می دهد که چه مقدار از غذای مصرف شده صرف افزایش وزن ماهی شده است (Bagenal, 1978). مقدار ضریب تبدیل غذایی (FCR) در گروه ۴ نیز نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$). استفاده از پروتئین کل، آلبومین و IgM سرم خون ماهیان می تواند به عنوان یک

غلظت اسیدهای آلی و همچنین شرایط پرورش از عوامل مختلفی هستند که اثر اسیدهای آلی را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Chik-Boon *et al.*, 2016). پارامترهای خونی ماهی تحت تأثیر مجموعه‌ای از فاکتورهای بیولوژیک (Benfey and Biron, 2000) تغذیه‌ای و محیطی (Luskova, 1998) قرار دارد و تأثیر جیره غذایی در پارامترهای خونی اهمیت ویژه‌ای دارد (Barnhart, 1969). تغییر پارامترهای خونی در فصول مختلف، تغذیه با جیره‌های غذایی مختلف و بروز انواع بیماری‌ها ثابت شده است (Keiffer, 2000). نتایج نشان از افزایش معنی‌دار ($P < 0.05$) تعداد گلبولهای قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین در گروه‌های ۴ و ۵ نسبت به گروه شاهد بود. بهبود شاخص‌های خونی و افزایش پارامترهای ایمنی در ماهیان بیمار شده با اسیدوفایر بخوبی نشان‌دهنده بهبود کیفیت ایمنی ماهی می‌باشد زیرا افزایش ایمونوگلوبولین‌ها ناشی از افزایش تعداد و فعالیت سلولهای دفاعی در بافتهای ایمنی ماهی است که مقاومت در برابر شرایط استرس را بویژه عفونت‌های میکروبی را افزایش می‌دهد (Luckstadt *et al.*, 2014). نتایج پژوهش توسط Omosowone و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که مقدار ۵ گرم در کیلوگرم اسید فرمیک سبب بهبود فاکتور خونی گربه ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) می‌شود که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد. علت افزایش هماتوکریت می‌تواند ناشی از کاهش حجم پلاسما، تورم گلبولهای قرمز و آزاد شدن بیشتر گلبولهای قرمز خون از بافتهای خون ساز باشد (Benfey and Biron, 2000) که در نتیجه موجب افزایش وزن و رشد در این گروه‌ها شده است. بهبود پارامترهای ایمنی و خونی در این پژوهش، موجب افزایش مقاومت بچه ماهیان در برابر عوامل بیماری‌زا، تحریکات محیطی و کاهش استرس‌ها گردیده است که می‌تواند انرژی ذخیره‌ای بدن ماهی را به سمت افزایش وزن سوق دهد و در نهایتاً سبب افزایش رشد، میزان بازماندگی و کاهش تلفات شود. پاسخ مثبت حاصل از ترکیب اسیدهای آلی را می‌توان به تغییر اسیدیته دستگاه گوارش مرتبط دانست که مانع از رشد میکروب‌های بیماری‌زای موجود در محتویات روده و باعث هضم مؤثر مواد مغذی جیره همچون پروتئین‌ها و افزایش انرژی می‌گردند. مکانیسم عملکرد اسیدهای آلی به این شکل است که یون هیدروژن (H^+) آزاد می‌کنند و موجب کاهش pH محیط می‌شود. برای ایجاد تعادل یونی داخل سلولی باکتری‌ها نیاز است یون‌های هیدروژن را به محیط بیرون سلولی دفع نمایند که با صرف انرژی است. از اینرو، انرژی کافی برای تکثیر خود را

نشانگر برای ارزیابی پاسخ‌های ایمنی مورد استفاده قرار گیرد (Korkea-aho *et al.*, 2011). همچنین قدرت باکتری‌کشی سرم نشان دهنده ایمنی همورال غیر اختصاصی ماهی می‌باشد و دفاع غیر اختصاصی سرم در برابر عفونت‌های باکتریایی را نمایان می‌سازد (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008). در پژوهش جاری اسیدی فایرها اثر تحریکی مثبتی بر سیستم ایمنی ماهیان داشته است. این تحریکات در پارامترهای ایمنی پروتئین کل، قدرت باکتری‌کشی و IgM سرم معنی‌دار بوده است. نتایج این پژوهش با پژوهش انجام شده در این زمینه همخوانی دارد. استفاده از اسید سیتریک به عنوان ماده جاذب در جیره غذایی فیل ماهیان جوان باعث افزایش و بهبود پارامترهای رشد و تغذیه‌ای شد (Sudagar *et al.*, 2010). افزودن ۳ گرم در کیلو گرم سدیم دی فرمات (NDF) به جیره غذایی ماهی تیلاپیا باعث بهبود رشد و بهتر شدن راندمان غذایی گردید (Liebert *et al.*, 2010). در پژوهشی با استفاده از سدیم دی فرمات (NDF) در جیره، قابلیت هضم مواد مغذی، اسیدهای آمینه و کیفیت فیزیکی پروتئین جو در جیره قزل‌آلای رنگین کمان را بهبود بخشید (Morken *et al.*, 2011). Zhu و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که افزودن ۲ یا ۴ گرم در کیلوگرم اسید آلی به جیره غذایی مبتنی بر پروتئین گیاهی در گربه ماهی زرد باعث بهبود عملکرد رشد و افزایش قابل توجه ظرفیت آنتی اکسیدانی می‌شود. Khaled (۲۰۱۵) بیان کرد که افزودن سدیم دی فرمات (NDF) به جیره غذایی ماهی تیلاپیا دارای اثرات مفید بالقوه در رشد و مصرف خوراک این ماهی دارد. گروهی از پژوهشگران گزارش کردند که ترکیبات اسیدهای آلی در جیره غذایی ماهی تیلاپیا توانایی تحریک رشد و خاصیت ضد میکروبی دارد. همچنین جایگزین مناسبی برای اکسی تتراساکلین می‌باشد (Chik-Boon *et al.*, 2016). Omosowone و همکاران (۲۰۱۸) با بررسی تأثیر اسید آلی بوتیریک اسید بر رژیم غذایی، عملکرد رشد و ترکیب بدن گربه ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) و تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus*) گزارش نمودند که گروه‌های تغذیه شده با اسید آلی سبب بهبود پروتئین لاشه آنها افزایش و بقاء آنها به طور (۱۰۰ درصد) نسبت به گروه کنترل بوده است و همچنین پارامترهای کیفیت آب گروه‌های تغذیه شده با اسید آلی در محدوده‌های قابل قبولی برای پرورش گربه ماهیان قرار داشت (Omosowone *et al.*, 2018). پژوهشگران در رابطه با سایر اسیدهای آلی در آبیان بیان کردند که گونه، سن، ترکیب جیره غذایی، نوع و

Abdel-Fattah و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که افزودن اسید سیتریک به میزان ۳-۱/۵ درصد باعث افزایش مصرف خوراک در جوجه‌های گوشتی می‌شود. علت این تفاوت می‌تواند به گونه مورد استفاده، نوع اسید مصرفی و ترکیب جیره ها مرتبط باشد. به طور کلی، غذای آبزیان بخصوص گونه‌های گوشتخوار مانند قزل آلائی رنگین کمان از مواد غذایی گران قیمت مانند پودر ماهی و روغن ماهی تشکیل شده است که دلیل عمده افزایش قیمت غذا می‌باشد. با توجه به نکات مذکور در این پژوهش، استفاده از مخلوط اسیدهای آلی به میزان ۰/۲٪ (۰/۱٪ سدیم دی فرمات و ۰/۱٪ سیتریک اسید به طور ترکیبی) می‌تواند به عنوان یک محرک رشد، ایمنی و کاهش دهنده ضریب تبدیل غذایی (FCR) ماهی قزل آلائی رنگین کمان مورد استفاده قرار گیرد و در نتیجه، سبب کاهش هزینه تولید شود.

تشکر و قدر دانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر انجام و نویسندگان از کلیه عزیزانی که در مراحل مختلف این پژوهش همکاری لازم را بعمل آوردند، آقایان دکتر Christian Lückstädt، دکتر اسماعیل کاظمی، مهندس جواد مهدی و دکتر ابوالحسن راستیان نسب سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

اصغرزاده، ص. ۱۳۹۴. تعیین عملکرد رشد، برخی از شاخص های خونی و واکنش های ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) تغذیه شده با اسیدی فایر بایوترونیک. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته مدیریت کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی- واحد رشت، ۹۲ صفحه.

جافرنوده، ع. توکمه چی، ا. نجدگرامی، ا. ح. حاجی مرادلو، ع. ح. نوری، ف. ۱۳۹۴. بررسی اثرات سینرژیستی اسید آلی پتاسیم سورات و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی (*Lactobacillus casei*) بر شاخص های رشد و خونی، ترکیب لاشه و فلور میکروبی روده در بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان. نشریه پژوهش های ماهی شناسی کاربردی. دوره چهارم، شماره اول، صفحه ۵۹-۷۴. URL: <http://jair.gonbad.ac.ir/article-fa.html>

از دست می دهند. همچنین اسیدهای آلی سبب تخریب DNA باکتری می شوند و در سنتز پروتئین باکتری اختلال ایجاد می‌نمایند (Celik et al., 2003). بیشتر پژوهشگران عملکرد مثبت جیره‌های حاوی اسیدهای آلی را به عواملی نظیر افزایش کارایی آنزیم های گوارشی (Kotzamanis et al., 2007) افزایش میزان هضم‌پذیری پروتئین و چربی (Christiansen and Luckstadt, 2008)، افزایش تجمع باکتریهای مفید در روده (Zhou et al., 2008) و افزایش میزان اتولیز مواد معدنی (Wing-Keong and Chik-Boon, 2016) نسبت داده‌اند. پژوهش‌های مشابه در سایر حیوانات نشان داده است که این مواد سبب کاهش بروز بیماری در جوجه‌ها می شوند (La Ragione and Woodward, 2003). از سویی، با اصلاح pH روده بوسیله اسیدهای آلی، حلالیت مواد مغذی، هضم و جذب ترکیب‌های خوراک نیز بهبود می‌یابد (Canibe et al., 2002). اسیدی شدن محیط روده سبب کاهش تکثیر میکروبی در ایلئوم روده می‌شود و در نتیجه، رقابت میکروفلور با میزبان در داخل دستگاه گوارش (بوسیله ترشحات پانکراس و اپیتلیوم دستگاه گوارش و ساییدگی و ریختن انتروسیت‌ها) کاهش می‌یابد (Dibner and Buttin, 2002) همچنین سایر مزایای اسیدی شدن محیط روده شامل بهبود فعالیت آنزیم‌های هضمی، فعالیت فیتاز میکروبی و افزایش ترشح پانکراسی است. این اثرات در نهایت سبب بهبود قابلیت هضم و ابقاء فسفر ترکیبی می‌شوند. احتمالاً مکانیسم سودمندی اسیدهای آلی بر عملکرد رشد و سیستم ایمنی، تحریک مستقیم تکثیر سلولی دستگاه گوارش است. زیرا اسیدهای آلی سبب افزایش موکوس‌های روده‌ای و همچنین افزایش ارتفاع پرزها در ژژنوم، سطح جذب و عمق کریپت‌ها و افزایش گاسترین می‌گردید (Dibner and Buttin, 2002). تغییر فلور باکتریایی روده باعث تحریک میانجی‌گرهای ایمنی از قبیل سایتوکینین‌ها، اینترلوکین‌ها و اینترفرون‌ها شده که این امر سبب تقویت و تحریک سیستم ایمنی می‌شود. Ebrahimnezhad و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که اسید سیتریک از طریق کاهش pH دستگاه گوارش منجر به کاهش سرعت عبور مواد مغذی از روده کوچک می‌شود. در نتیجه، زمان بیشتری جهت هضم مواد غذایی فراهم و جذب افزایش می‌یابد و نیاز حیوان مرتفع شده و خوراک کمتری مصرف می‌شود. Brenes و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که استفاده از اسید سیتریک منجر به کاهش مصرف خوراک می‌گردد که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد در حالیکه

- Canibe, N., Engberg, R.M. and Jensen B.B., 2002. An overview of the effect of organic acids on gut flora and gut health. Danish Institute of Agricultural Sciences, Research Centre Foulum, Denmark.
- Castillo, S., Rosales, M., Pohlenz, C. and Gatlin, D.M., 2014. Effects of organic acids on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*, 433, pp. 6-12. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.038>
- Celik, K., Ersoy, I.E., Uzatici, A. and Erturk, M., 2003. The using of organic acids in California turkey chicks and its effects on performance before pasturing. *International Journal of Poultry Science*, 2(6): 446 - 448. DOI: 10.3923/ijps.2003.446.448
- Ceylan, N. and Ciftci, I., 2002. The effects of some alternative feed additives for antibiotic growth promoters on the performance and gut microflora of broiler chicks. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27:727-733. <http://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/issues/vet-03-27-3/vet-27-3-33-0205-38.pdf>
- Chik-Boon, K., Nicholas, R., Abdullah, S.Z. and Wing-Keong, N., 2016. Effects of a dietary organic acids blend and oxytetracycline on the growth, nutrient utilization and total cultivable gut microbiota of the red hybrid tilapia, *Oreochromis sp.*, and resistance to *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture Research*, 47, pp. 357-369. <https://doi.org/10.1111/are.12492>
- Christiansen, R. and Luckstad, C., 2008. Effects of different dosages of potassium diformate in fishmeal on the performance of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Was Conference, Busan, Korea.
- Deng, D.F., Hemreb, G.I., Storebakkenc, T., Shiaud, S.Y. and Hung, S.S., 2005. حدیدی، س. طاعتی، ر. ۱۳۹۵. تأثیر سطوح مختلف مکمل اسیدی فایر بایوترونیک™ بر کارایی تغذیه و برخی از پارامترهای خونی و ایمنی ماهی اسکار تایگر (*Astronotus ocellatus*). مجله دامپزشکی ایران، دوره دوازدهم، شماره ۳. صفحه ۳۲-۴۱. <https://dx.doi.org/10.22055/ivj.2016.34438>
- مهرابی، ی. ۱۳۷۸. مطالعه مقدماتی اثر بیهوشی پودر گل میخک (*Syzygium aromaticum*) بر روی ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله پژوهش و سازندگی، ۴۲: ۱۶۰-۱۶۲. doi: 10.22092/vj.1998.112953
- Abdel-Fattah, S.A., EI-Sanhoury, M.H., EI-Mednay, N.M. and Abdul-Azeem F., 2008. Thyroid activity of broiler chicks fed supplemental organic acids. *International Poultry Science Journal*, 7: 215-222. DOI: 10.3923/ijps.2008.215.222
- Bagenal, T., 1978. Methods for assessment of fish production in fresh waters. Blackwell Science Inc. 384P.
- Barnhart, R.A., 1969. Effects of certain variables on hematological characteristics of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Transactions of the American Fisheries Society*, 98: 411-418. DOI:10.1577/1548-8659(1969)98[411:EOCVOH]2.0.CO;2
- Benfey, T.J., Biron, M., 2000. Acute stress in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*, 184: 167-176. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00314-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00314-2)
- Biswas, S.P., 1993. Manual of methods in fish biology. South Asian Publisher, New Delhi India, 142P.
- Brenes, A.A., Viveros, I., Arija, C., Centeno, M. and Bravo, C., 2003. The effect of citric acid and microbial phytase on mineral utilization in broiler chicks. *Animal Feed Science and Technology*, 110: 201-219. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00207-4](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00207-4)

- Utilization of diets with hydrolyzed potato starch, or glucose by juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*), as affected by Maillard reaction during feed processing. *Aquaculture*, 248: 103–109.
DOI:10.1016/j.aquaculture.2005.04.010
- Dibner, J.J. and Buttin, P., 2002.** Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. *Journal of Applied Poultry Research*, 11: 453–463.
<https://doi.org/10.1093/japr/11.4.453>
- Durgawale, P., Kanase, S., Shukla, P.S. and Sontakke, S., 2005.** Asensitive and economical modified method for estimation of cerebrospinal fluid proteins. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 20, 174–177. DOI:10.1007/BF02867422
- Ebrahimnezhad, Y., Maheri-Sis, N., Aghajanzadeh-Golshani, A., Ghiasi Galekandi, J., Sarikhan, M. and darvishi, A., 2012.** Effect of combination of citric acid and microbial phytase on the serum concentration and digestibility of some minerals in broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 10: 1819–1878. DOI:10.3923/ajas.2012.189.195
- Ellis, A.E., 1990.** Lysozyme assays. In: Stolen, J.S.; Fletcher, T.C.; Anderson, D.P.; Roberson, B.S.; van Muiswinkel, W.B. (eds.), *Techniques in fish immunology*. New Jersey. SOS Publications, pp. 101–113.
- Feldman, B.F., Zinkl, J.G. and Jian N.C., 2000.** Schalm's veterinary hematology. Lippincott Williams and Wilkins publication, Canada: 1120–1125.
- Fox, H.E., White, S.A., Koa, M.F. and Fernald, R.D., 1997.** Stress and dominance in a social fish. *Journal of Neuroscience*, 16(17): 6463–6469.
Doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-16-06463.1997
- Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, T. and Brosious E., 1971.** Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology*, 56: 35–39.
<https://doi.org/10.1093/ajcp/56.1.35>
- Hu, F., Hepburn, H.R., Li, Y., Chen, M., Radloff, S.E. and Daya, S., 2005.** Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 276–283. DOI:10.1016/j.jep.2005.02.044
- Huang, S.S., Fu, C.H.L., Higgs, D.A., Balfry, S.K., Schulte, P.M. and Brauner, C.J., 2008.** Effects of dietary canola oil level on growth performance, fatty acid composition and ion regulatory development of spring Chinook salmon par, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Aquaculture*, 274: 109–117. DOI:10.1016/j.aquaculture.2007.11.011
- Huyghebaert, G., 2003.** Replacement of the antibiotics in poultry. Eastern Nutrition Conference.
- Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S. and Kobayash, M., 1990.** The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathology*, 25:93–98. Doi: <https://doi.org/10.3147/jsfp.25.93>
- Keiffer, J.D., 2000.** Limits to exhaustive exercise in fish. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 126: 161–179.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J., Gibson, L., 2008.** Probiotics in aquaculture: The the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274: 1–14.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.019>
- Khaled, M., 2015.** Effect of organic acid salt supplementation on growth performance and feed utilization in practical diets of hybrid

- tilapia (♀ o. niloticus x ♂ o. aureus) fingerlings. *Egyptian Journal of Animal Production*, 52(1):81-88. <https://www.esap1961.org/reserachgenerator/uploads/1453317335.pdf>
- Korkea-aho, T.L., Heikkinen, J., Thompson, K.D., Wright, A. and Austin, B., 2011.** *Pseudomonas* sp. M174 inhibits the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied Microbiology*, 111: 266-277. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05044.x>
- Kotzamanis, Y.P., Gisbert, E., Gatesoupe, F.J., Zambonino Infante, J. and Cahu C., 2007.** Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Compa Bioch and Physi-Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 147: 205-14. DOI:10.1016/j.cbpa.2006.12.037
- La Ragione, R.M. and Woodward M.J., 2003.** Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens. *Veterinary Microbiology*, 94: 245-256. DOI:10.1016/s0378-1135(03)00077-4
- Liebert, F., Mohamed, K. and Lückstädt, C., 2010.** Effects of diformates on growth and feed utilization of all male Nile Tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*) reared in tank culture. XIV International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, Qingdao, China, Book of Abstracts.190P.
- Lim, C., Luckstadt, C. and Klesius, P.H., 2010.** Review: use of organic acids, salts in fish diets. *Global Aquacult Advocate*, 5: 45-6. <http://www.wfish.de/fulltext/GAA-2010.pdf>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farrand, A.L. and Randall R.J., 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275. <http://www.jbc.org/content/193/1/265.full.pdf>
- Luckstadt, C., 2007.** Effect of organic acid containing additives in worldwide aquaculture-Sustainable production the non-antibiotic way, pp. 71-77. In: *Acidifiers in Animal Nutrition-A Guide for Feed Preservation and Acidification to Promote Animal Performance*. Nottingham University Press, Nottingham.
- Luckstadt, C., 2008a.** The use of acidifiers in fish nutrition. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 3: 1-8. DOI:10.1079/PAVSNNR20083044
- Luckstadt, C., 2008b.** Effect of dietary potassium diformate on the growth and digestibility of Atlantic salmon *Salmo salar*. *Proceedings of the thirteenth International Symposium on Fish Nutrition and Feeding*, June 1-5, Florianopolis, Brazil. pp. 179.
- Luckstadt, C., Greiffenstein, N. and Dari, R., 2014.** Effect of dietary sodium diformate in broilers on the productivity index against a positive control. *Conference on International Research on Food Security, Natural Resource Management and Rural Development* organized by the Czech University of Life Sciences Prague.
- Luckstadt, C., Senkoylu, N., Akyurek, H. and Agma, A., 2004.** Acidifier- a modern alternative for anti- biotic free feeding in livestock production, with special focus on broiler production. *Veterinarija ir Zootechnika*, 27, 91-93. <https://vetzoo.lsmuni.lt/data/vols/2004/27/pdf/luckstadt.pdf>
- Luckstadt, C. and Theobald, P., 2009.** Effect of a formic acid-sodium formate premixture on *Salmonella*, *Campylobacter* and further gut microbiota in broilers. *Proceedings and*

- Abstracts of the 17th European Symposium on Poultry Nutrition: 246.
- Luskova, V., 1998.** Factors affecting haematological indices in free-living fish populations. *Acta Veterinaria Brno*, 67: 249-250.
<https://doi.org/10.2754/avb199867040249>
- Mazurkiewicz, J., Przybyl, A. and Golski, J., 2008.** Evaluation selected feeds differ ing in dietary lipids levels in feeding juveniles of Wells catfish (*Silurus glanis*). *ALEP*, 38, 91 - 96.
- Morken, T., Kraugerud, O.F., Barrows, F.T., Sorensen, M., Storebakke, T. and Overland, M., 2011.** Sodium diformate and extrusion temperature affect nutrient digestibility and physical quality of diets with fish meal and barley protein concentrate for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 317, 138-145.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.020>
- Omosowone, O., Adekunle Dada, A. and Eunice, A., 2014.** Effects of dietary supplementation of fumaric acid on growth performance of african catfish *clarias gariepinus* and *aeromonas sobria* challenge. *Croatian Journal of Fisheries*, 2015, 73, 13 – 19. <http://dx.doi.org/10.14798/73.1.782>
- Omosowone, O.O., Dada, A.A. and Adeparusi, E.O., 2018.** Comparison of dietary butyric acid supplementation effect on growth performance and body composition of *Clarias gariepinus* and *Oreochromis niloticus* fingerlings. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 7(2) 403-412. DOI:10.22092/IJFS.2018.115901.
- Roed, KH., Fjalestad, K.T. and Stromsheim, A., 1993.** Genetic variation in lysozyme activity and spontaneous haemolytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*; 114, 19-31.
[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90247-V](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90247-V)
- Romano, N., Koh, C.B. and Ng, W.K., 2015.** Dietary microencapsulated organic acids blend enhances growth, phosphorus utilization, immune response, hepatopancreatic integrity and resistance against *Vibrio harveyi* in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 435, 228-236.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.037>
- Sudagar, M., Hosseinpoor, Z. and Hosseini, A., 2010.** The use of citric acid as attractant in diet of grand sturgeon (*Huso huso*) fry and its effects on growing factors and survival rate. *AACL Bioflux*.3:311-316.
- Tacon, A.G.J. and Akiyama, D.M., 1997.** Feed ingredients. In: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (Eds.), *Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture*, vol. 6, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA: 411-472.
- Wing-Keong, N., Chik –Boon, C., Kumar, S. and Siti Zahrah, A., 2009.** Effects of dietary organic acids on growth, nutrient digestibility and gut microflora of red hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) and subsequent survival During a challenge test with (*Streptococcus agalactiae*). *Aquaculture Research*, 40, 1490-1500.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02249.x>
- Wing-Keong, N. and Chik-Boon, K., 2016.** The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals *Reviews in Aquaculture*, pp. 1-27.
<https://doi.org/10.1111/raq.12141>
- Zhou, Z., Liu, Y., Wang, P., He, S., Yao, B., Gao, X. and Wang, X., 2008.** The effects of dietary potassium diformate on growth performance, feed conversion and intestinal microbiota of hybrid tilapia. *Book of*

Abstracts XIII International Symposium Fish Nutrition and Feeding, June 1-5, Brazil, 193.

Zhou, Z., Liu, Y. He, S., Shi, P., Gao, X., Yao, B. and Ringo, E., 2009. Effects of dietary potassium diformate (KDF) on growth diformate (KDF) on growth performance, feed conversion and intestinal bacterial community of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*). *Aquaculture*, 291:89–94.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.043>

Zhu, Y., Qiu, X., Ding, Q., Duan, M. and Wang, C., 2014. Combined effects of dietary phytase and organic acid on growth and phosphorus utilization of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture*, 430: 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.023>

Effects of sodium diformate and citric acid on growth performance, immune and hematological parameters of the juvenile *Oncorhynchus mykiss*

Mohammadi M.J.¹; Rajabzadeh Ghatrami E.^{1*}; Soltani M.²; Ghaedi A.³; Alishahi M.⁴

*Rajabzadeh48@gmail.com

1-Department of Fishries, Faculty of Marine Natural Resources. Khorramshahr University of Marine Science and Technology. Khorramshahr.Iran

2-Department of Fish Diseases and Hygen. Faculty of veterinary. Tehran University. Tehran. Iran

3-Genetic and Breeding Research Centre for Cold Water Fishes (Shahid motahari Center), Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Yasuj, Iran.

4-Department of Fish Diseases and Hygen(Clinical Sciences). Faculty of veterinary. Shahid Chamran University. Ahvaz. Iran

Abstract

Recently use of Acidifier (group of organic acids) increased in aquaculture. The purpose of this study was to evaluate the effects of acidifier (sodium diformate and citric acid) on growth performance, nutrition indices, immune and hematological parameters of the juvenile *Oncorhynchus mykiss*. A total of 630 juvenile *Oncorhynchus mykiss* (16.55 ± 0.72) randomly divided into seven experimental treatments (Three replicates each). All groups fed with experimental diet for 60 days. Bioassay conducted in first day and after sixty days and then growth parameters were investigated. Eexperimental diets were contain 0.2, 0.4 and 0.6% sodium diformate (NDF) and 0.2, 0.4 and 0.6%, combination of NDF and citric acid with equal ratio. Diet control was without acidifier. Results showed that almost all growth and hematological parameters were increased in fed groups with 0.2% supplemented food with NDF and citric acid compare to the control group. The best FCR showed in the groups fed with 0.2% ($P < 0.05$). Although haematological parameters of fish in groups fed by 0.2, 0.4 and 0.6%, NDF and citric acid changed significantly after 60 days of feeding with experimental, no changed were observed in WBC value among the groups ($P > 0.05$). The results show that the immunological parameters including, total serum protein, immunoglobulin and bactericidal activity serum were affected significantly at Acidifier ($p < 0.05$) while Lysozyme activity serum and albumin was not affected ($P > 0.05$). The results of this study indicated that 0.2%, NDF and citric acid in the diet could be a useful food supplement and can be used to improve the growth parameters and immunity system in juvenile *Oncorhynchus mykiss*.

Keywords: Acidifier, *Oncorhynchus mykiss*, Growth performance, Immune parameters, Hematological parameters

*Corresponding author