شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۷، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳
صفحات ۱۵۶-۱۴۷

تأثیر جیرهٔ غذایی حاوی اسید هیومیک بر عملکرد رشد و بافت‌شناسی روده ماهی سیامی جنگجو (*Betta splendens*)

مینا همت‌زاده[۱]، حمید محمدی آذرم[۲*]، سید احمد قاسمی[۳]، آناهیتا رضایی[۴]

۱. دانشجوی دکتری گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
۲. استاد گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
۳. دانشیار گروه زیست‌فناوری، پژوهشکدهٔ خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران
۴. استادگروه پاتوبیولوژی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۲۷

چکیده

اسید هیومیک نوعی مادهٔ آلی محلول است که در غلظت‌های متفاوت در اغلب اکوسیستم‌های آبی وجود دارد. علاوه بر حضور در آب، اسید هیومیک در زنجیرهٔ غذایی نیز وجود داشته و مستقیماً به مصرف آبزیان می‌رسد. در مطالعهٔ حاضر، تأثیر اسید هیومیک به شکل مکمل‌شده در غذا بر عملکرد رشد و بافت‌شناسی روده در جنس نر ماهی سیامی جنگجو (*Betta splendens*) مورد بررسی قرار گرفت. اسید هیومیک در مقادیر ۰ (گروه شاهد)، ۵، ۱۰ و ۱۵ g/kg feed به خوراک اضافه گردید. دورهٔ آزمایش تغذیه‌ای به‌مدت شش هفته به طول انجامید. طول و وزن ماهیان تیمارهای مختلف در انتهای آزمایش تفاوتی نداشت. هیچ تفاوت معنی‌داری در بین تیمارهای مختلف از نظر صفات رشد و کارآیی خوراک مشاهده نشد. ضریب چاقی به‌عنوان شاخص سلامت نیز در بین تیمارهای آزمایشی اختلافی نداشت. با این حال، بیشترین ارتفاع و ضخامت پرزها در ماهیان تغذیه شده با خوراک حاوی ۱۰ g/kg feed و ۱۵ مشاهده شد. از نظر عمق کریپت روده اختلافی میان گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد. نتایج مطالعهٔ حاضر نشان داد که افزودن اسید هیومیک به خوراک ماهی سیامی جنگجو اگرچه با توسعهٔ بافت روده همراه است، اما تأثیری بر عملکرد رشد و کارایی تغذیه‌ای آن ندارد.

واژگان کلیدی: اسید هیومیک، ماهیان زینتی، دستگاه گوارش، صفات رشد، بافت‌شناسی

* نویسنده مسئول: حمید محمدی آذرم
Email: azarmhamid@gmail.com

Journal of Fisheries
Vol. 77, No. 2, Summer 2024
pp. 147-156

The effect of a diet containing humic acid on the growth performance and intestinal histomorphology of the Siamese fighting fish (*Betta splendens*)

Mina Hemmatzadeh[1], Hamid Mohammadiazarm[2*], Seyed Ahmad Ghasemi[3], Anahita Rezaie[4]

1. PhD student, Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Khuzestan, Iran
2. Professor, Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Khuzestan, Iran
3. Associate Professor, Department of Biotechnology, Persian Gulf Research Institute, Persian Gulf University, Bushehr, Iran
4. Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Khuzestan, Iran

Received: 23-Feb-2024 **Accepted: 16-May-2024**

Abstract

Humic acid is a soluble organic substance in varying concentrations in most aquatic ecosystems. Humic acid is present in water and the food chain is directly consumed by aquatic animals. This study investigated the effects of a humic acid-enriched diet on growth performance and gut histology in male Siamese fighting fish (*Betta splendens*). To prepare the experimental diets, four amounts of humic acid were added to a basic diet: 0 [control], 5, 10, and 15 g kg^{-1} diet. The duration of the experiments was six weeks. The length and weight of the fish in the different treatments did not differ at the end of the experiment. No significant differences were found between treatments in growth traits and feed efficiency. The condition factor as a symbol of health also did not differ between the experimental treatments. However, the intestines of fish fed 10 and 15 g kg^{-1} humic acid had longer and thicker villi than those of control animals. No significant differences were found in the depth of the intestinal crypt between the treatments. The results of the present study show that adding humic acid to the diet of Siamese fighting fish is associated with the development of intestinal tissue, but has no significant effect on the growth performance of the fish.

Keywords: Humic substances, Ornamental fish, Gastrointestinal tract, Growth traits, Histology

* Corresponding author: Hamid Mohammadiazarm Email: azarmhamid@gmail.com

۱. مقدمه

اسید هیومیک از جمله ترکیبات آلی موجود در خاک و بوم‌سازگان‌های آبی طبیعی است که با تمامی ابعاد زندگی جانداران آبزی در ارتباط است (Steinberg *et al*., 2008). فعالیت‌های میکروبی منجر به تبدیل مواد آلی گیاهی و جانوری مرده به ترکیبات هیومیک می‌شوند (Steinberg *et al*., 2009). در واقع، اسید هیومیک متعلق به مواد هیومیکی است. در بوم‌سازگان‌های آب شیرین، مواد هیومیکی عموماً به سه شکل هیومین‌ها، اسیدهای فولویک و اسیدهای هیومیک تقسیم می‌شوند (McDonald *et al*., 2004). تفاوت این شکل‌ها بر مبنای میزان حلالیت در آب، وزن مولکولی، و تعداد اتم‌های اکسیژن و نیتروژن است (McDonald *et al*., 2004). مواد هیومیکی الکترولیت‌هایی با اسیدیته ضعیف بوده که مسئول رنگ قهوه‌ای تیره سیستم‌های آبی هستند (Weber *et al*., 2018). این ترکیبات حاوی گروه‌های عملکردی-واکنش‌دهندهٔ فراوان از قبیل فنول‌ها، هیدروکسیل-ها، کربوکسیل‌ها و کوئینون‌ها هستند (Steinberg *et al*., 2008). حضور این گروه‌های واکنش‌دهنده به این معنی است که اسید هیومیک قادر به ارائهٔ آثار مفید مختلف با عوامل زنده و غیر زنده است (Steinberg *et al*., 2009) که از این قبیل می‌توان به فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، کنترل استرس، تحریک سیستم ایمنی (Gao *et al*., 2017)، فعالیت‌های ضد التهابی و ویژگی‌های ضد میکروبی (Lumactud *et al*., 2022) اشاره کرد. به‌عنوان یک مکمل تغذیه‌ای، مواد هیومیکی در پرورش حیوانات اهلی به‌منظور افزایش نرخ رشد، بهبود کارایی خوراک، القای ایمنی، و کاهش احتمال بروز بیماری‌ها استفاده می‌شوند (Vucskits *et al*., 2010). مواد هیومیکی برای القای رشد در گیاهان و ماکیان استفاده شده‌اند (Arif *et al*., 2019). با این حال، آثار مکمل‌سازی خوراک با مواد هیومیکی در بخش آبزی‌پروری کمتر مد نظر بوده است. بسیاری از مطالعات موجود بر نتایج مثبت مواد هیومیکی در صنعت تولید ماکیان تمرکز داشته‌اند؛ و گزارش‌های موجود بر جانداران آبزی بسیار محدود است (Lieke *et al*., 2021; Zoheiri *et al*., 2023).

رودهٔ ماهیان نه تنها یک ارگان هضم و جذب مواد مغذی محسوب می‌شود بلکه نقش اساسی در سیستم ایمنی بازی می‌کند (Gao *et al*., 2017). ریخت‌شناسی روده و میکروارگانیسم‌های متنوع ساکن در دستگاه گوارش نقش مهمی در تنظیم و حفظ سلامت این اندام دارند. در ماهیان، افزایش ارتفاع پرزها، عمق کریپت‌ها و تراکم سلول‌های مخاطی با بهبود توانایی هضم و جذب روده همراه هستند (Torrecillas *et al*., 2019). پژوهش‌های مختلف پیشنهاد داده‌اند که ریخت‌شناسی روده و میکروارگانیسم‌های ساکن به تغییرات تغذیه‌ای حساس هستند (Yegani and Korver, 2008). مشخص شده است که مواد هیومیکی می‌توانند جمعیت باکتری‌های سودمند رودهٔ ماهیان را افزایش دهند و از این‌رو نقش مؤثری بر رشد این جانداران داشته باشند (Gao *et al*., 2017). با این حال، همچنان مطالعه‌ای بر اثرات اسید هیومیک بر ریخت‌شناسی روده ماهیان انجام نشده است.

ماهی سیامی جنگجو (*Betta splendens* Regan, 1910) یک ماهی کوچک (با طول کل حدود ۷ سانتی‌متر) آب شیرین از خانواده Osphronemidae (ماهیان لابیرنت‌دار) است. این گونه بومی کشور تایلند بوده و به‌دلیل سادگی تکثیر و پرورش و زیبایی خیره‌کنندهٔ خود به‌میزان قابل توجهی در بین علاقه‌مندان نگهداری از ماهیان آکواریومی محبوبیت دارد (Nur *et al*., 2022). ماهی سیامی جنگجو در سیستم‌های آبی کم‌عمق اسیدی، pH بین ۵/۲ تا ۶/۸، مملو از گیاهان آبزی ساکن است (Watson *et al*., 2019). جالب توجه آن که این ماهی در شرایط اسارت بهترین عملکرد را در آب‌های حاوی مواد هیومیکی دارد، که این امر با اضافه کردن عصاره-های گیاهی غنی از تانن و اسید هیومیک تأمین می‌شود (Lichak *et al*., 2022). ماهی سیامی جنگجو به‌عنوان یک گونهٔ مدل مطرح است که به‌طور گسترده در مطالعات آبزی-پروری (Thongprajukaew *et al*., 2011)، رفتارشناسی (Forsatkar *et al*., 2017)، سم‌شناسی (Forsatkar *et al*., 2014)، زیست عصب‌شناسی (Vu *et al*., 2020)، و ژنتیک (Zhang *et al*., 2022) استفاده می‌شود. با این حال، براساس دانش ما هنوز مطالعه‌ای در خصوص اثر اسید هیومیک بر جنبه‌های زیستی این گونه انجام نشده است.

در مطالعهٔ حاضر از اسید هیومیک به‌عنوان مکمل غذایی استفاده شد، تا اثر آن بر عملکرد رشد و بافت‌شناسی رودهٔ جنس نر ماهی سیامی جنگجو ارزیابی شود. با توجه به وجود طبیعی مواد هیومیکی در آب‌های محل حضور این گونه، انتظار می‌رود که ساختار ریخت‌شناسی روده تغییر کرده و در پی آن کارایی خوراک و در نتیجه عملکرد رشد ماهی بهبود یابد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. ماهی‌ها و تیمارهای آزمایش

جنس نر ماهی سیامی جنگجو در سن دو ماهگی از یک مرکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی خریداری شد. ماهیان به آزمایشگاه منتقل شده و به‌طور انفرادی در بطری‌های پلاستیکی کتابی ۶۰۰ میلی‌لیتر حاوی ۴۰۰ میلی‌لیتر آب کلرزدایی شده قرار داده شدند. میانگین (± انحراف معیار) طول استاندارد و وزن نمونه‌ها به‌ترتیب ۰/۲۴±۲/۹۴ سانتی‌متر و ۴۷/۳۸ ±۶۸۱/۹۵ میلی‌گرم بود. در مدت دو هفته تطابق با شرایط جدید، ماهیان روزانه دو مرتبه (۱۰ صبح و ۴ بعدظهر) با غذای گرانول تجاری (جیرهٔ پایه؛ بیومار؛ سایز ۰/۵میلی‌متر؛ حاوی ۳۵٪ پروتئین خام، ۱۲٪ چربی خام، ۱۰٪ خاکستر، و ۴٪ رطوبت) تغذیه شدند. شرایط نگهداری نیز شامل ۱۲ ساعت روشنایی به ۱۲ ساعت تاریکی، دمای آب ۱±۲۷ درجهٔ سانتی‌گراد بوده و سختی کل و pH نیز به‌ترتیب mg/l $CaCo_3$ ۹±۱۸۸ و ۷/۲-۷/۸ در نظر گرفته شد. آب بطری‌ها نیز به‌میزان ۵۰٪ سه روز در میان با آب تازه کلرزدایی شده تعویض شد.

پس از دورهٔ تطابق، ماهیان به‌صورت تصادفی در چهار تیمار تقسیم شدند (n= ۳۰). با آغاز آزمایش، ماهیان تیمارهای مختلف با غذای مکمل‌شده با مقادیر مختلف اسید هیومیک (صفر (گروه شاهد)، ۵، ۱۰ و ۱۵ g/kg feed) به‌مدت ۶ هفته تغذیه شدند. از گرید آزمایشگاهی اسید هیومیک (نمک سدیم اسید هیومیک؛ سیگما-آلدریچ؛ شمارهٔ کاتالوگ H16752) در آزمایش حاضر استفاده شد.

۲.۲. تهیهٔ غذا

از یکی از روش‌های استاندارد مکمل‌سازی غذا با یک مادهٔ مکمل (Forsatkar *et al*., 2018) برای تهیهٔ جیره‌های حاوی اسید هیومیک استفاده شد. به‌طور خلاصه، جیرهٔ پایه در ابتدا پودر شد. مقدار مورد نیاز اسید هیومیک به‌خوبی در آب مقطر حل شده و به غذای پودر شده اضافه گردید. خمیر حاصل به روی یک سینی استیل پخش شده، در دمای اتاق خشک گردید، و سپس به آرامی کوبیده شد. با استفاده از یک الک استیل، ذرات ۰/۵ میلی‌متر جداسازی شده و برای تغذیهٔ ماهیان استفاده شدند. جیرهٔ ماهیان تیمار شاهد نیز به همین روش ساخته شد، با این تفاوت که هیچ مقدار اسید هیومیک اضافه نگردید. جیره‌های تولید شده در بطری‌های تیره و در یخچال نگهداری شدند.

۳.۲. عملکرد رشد و بهره‌وری از خوراک

ماهیان هر تیمار در ابتدا و پایان آزمایش برای بررسی طول و وزن نمونه‌برداری شدند. با توجه به کوچکی اندازهٔ ماهی و به‌منظور تسهیل کار، ماهیان پس از خارج کردن از بطری در آب حاوی عصاره گل میخک (۵۰ mg/l) بیهوش شدند. ماهیان ابتدا وزن شده و سپس برای بررسی طول استاندارد عکس‌برداری شدند. عکس‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار ImageJ بررسی شدند. با استفاده از روابط زیر، خصوصیات رشد و کارآیی خوراک محاسبه گردید (Forsatkar *et al*., 2018):

وزن‌گیری (WG) = وزن نهایی – وزن اولیه

درصد افزایش وزن بدن (PBWI) = (WG × ۱۰۰) / وزن اولیه

نرخ رشد ویژه (SGR) = (لگاریتم وزن نهایی – لگاریتم وزن اولیه) × ۱۰۰ / مدت زمان

ضریب تبدیل غذایی (FCR) = مقدار غذای استفاده شده (mg) / مقدار وزن‌گیری (mg)

فاکتور وضعیت (K) = وزن نهایی / (طول نهایی^3) × ۱۰۰

درصد بقا = (تعداد باقیمانده / تعداد اولیه) × ۱۰۰

۴.۲. بافت‌شناسی روده

در انتهای دورهٔ غذادهی، تعداد ۳ ماهی از هر تیمار به‌طور تصادفی برای بررسی‌های بافت‌شناسی انتخاب شدند. ماهیان در غلظت بالای عصارهٔ میخک کشته شده و برای برداشت سیستم گوارش کالبدگشایی شدند. نمونه‌های روده در زیر لوپ به‌دقت جداسازی شده و بی‌درنگ در محلول فرمالین ۱۰٪ تثبیت شدند. سپس، نمونه‌ها در آب مقطر شسته شده و در محلول‌های متوالی اتانول آبگیری شدند. برای شفاف‌سازی، یافت‌ها در محلول زایلن قرار گرفته و در ادامه در پارافین قالب‌گیری شدند. برش‌هایی به ضخامت ۶ میکرومتر از بلوک-های پارافین تهیه گردیده و با روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی شدند (Merrifield *et al*., 2011). نمونه‌ها در پایان در زیر میکروسکوپ نوری بررسی و عکس‌برداری شدند. اندازه‌گیری طول و ضخامت پرزها و عمق کریپت در نمونه‌های بافت با استفاده از نرم‌افزار ImageJ صورت گرفت.

۵.۲. آنالیز آماری

نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov بررسی شد. همچنین، همگنی واریانس‌ها نیز با آزمون Levene سنجش گردید. تمامی داده‌ها همگن بوده و توزیع نرمال داشتند. داده‌های رشد با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) آنالیز شدند. مقایسهٔ میانگین‌ها نیز با آزمون Tukey's HSD صورت گرفت. نتایج به‌صورت میانگین±انحراف معیار ارائه شدند. تمامی آزمون‌های آماری توسط نرم‌افزار SPSS نسخهٔ ۲۲ در سطح معنی‌داری ۵ درصد صورت گرفت. رسم نمودار ها نیز از طریق نرم‌افزار Excel نسخهٔ ۲۰۱۳ انجام شد.

۳. نتایج

۱.۳. شاخص‌های رشد و بهره‌وری از غذا

در ابتدای انتخاب تصادفی ماهیان برای ایجاد تیمارهای آزمایشی هیچ اختلاف معنی‌داری در طول (۰/۷۱±۳/۳۴ سانتی‌متر) و وزن (۰/۸۰±۰/۹۵ میلی‌گرم) میان گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد. الگوی مشابهی از صفات رشد در انتهای آزمایش مشاهده شد (جدول ۱). مکمل‌سازی جیرهٔ پایه با اسید هیومیک در انتهای شش هفته دورهٔ غذادهی تفاوتی را در طول نهایی (P= ۰/۷۲؛ $F_{3,79}$= ۰/۴۴)، وزن نهایی (P= ۰/۶۷؛ $F_{3,79}$= ۰/۵۱)، وزن‌گیری (P= ۰/۵۷؛ $F_{3,79}$= ۰/۶۶)، درصد افزایش وزن بدن (P= ۰/۵۲؛ $F_{3,79}$ = ۰/۷۵)، نرخ رشد ویژه (P= ۰/۴۴؛ $F_{3,79}$= ۰/۸۹)، ضریب تبدیل غذایی (P= ۰/۵۷؛ $F_{3,39}$= ۰/۶۶) و ضریب چاقی (P= ۰/۸۴؛ $F_{3,79}$= ۰/۲۶) بین تیمارها موجب نگردید. همچنین، هیچ تلفاتی در کل دورهٔ آزمایشی مشاهده نشد.

۲.۳. بافت‌شناسی روده

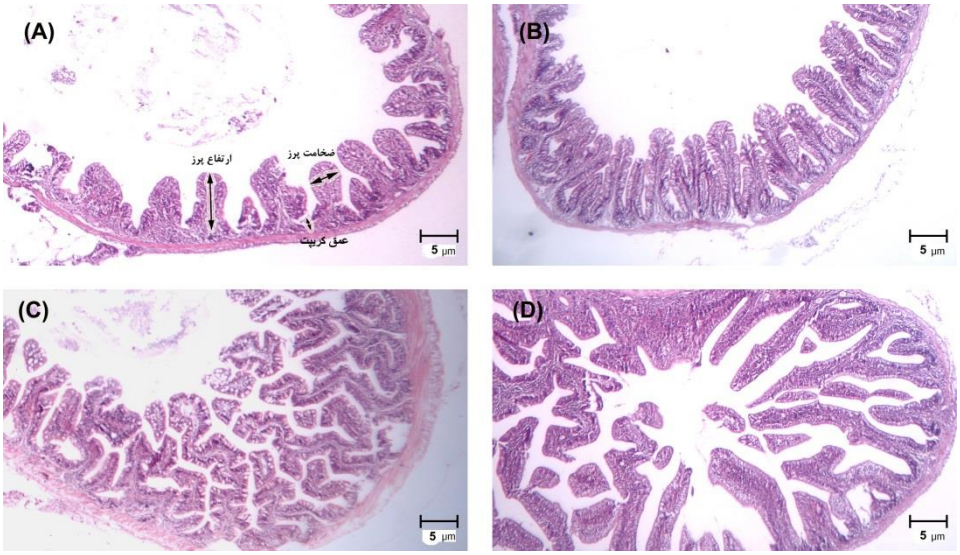
بررسی‌های میکروسکوپی بیانگر ریخت‌شناسی طبیعی و سالم رودهٔ ماهی سیامی جنگجو تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف اسید هیومیک بود (شکل ۱). نمونه‌های روده با بخش مخاطی سالم و چین‌های ویلی سازمان‌یافته و تعداد قابل ملاحظهٔ سلول‌های جامی تشخیص داده شدند. همچنین، حاشیهٔ نمونه‌های رودهٔ ماهیان در تمامی تیمارهای به حالت شانه‌ای بوده و ریزپرزها به‌صورت متراکم و سازمان‌یافته بودند (شکل ۱).

با اندازه‌گیری شاخص‌های بافت روده، تفاوت معنی‌دار آماری در ارتفاع پرزها بین نمونه‌های تیمارهای مختلف مشاهده شد (P<۰/۰۰۱؛ $F_{3,75}$= ۲۹/۰۷). مکمل‌سازی خوراک پایه با اسید هیومیک منجر به افزایش ارتفاع پرزها گردید؛ به این صورت که رودهٔ ماهیان تغذیه شده با غلظت‌های بالاتر اسید هیومیک (۱۰ g/kg و ۱۵) دارای پرزهایی با ارتفاع بیشتر نسبت به سایر تیمارها بود (شکل ۲). همچنین، ضخامت پرزها در تیمارهای اسید هیومیک بیشتر از ماهیان تیمار شاهد بود (P<۰/۰۵؛ $F_{3,75}$= ۳/۸۸). با این حال، تفاوتی در عمق کریپت نمونه‌ها در تیمارهای مختلف مشاهده نگردید (P=۰/۰۹؛ $F_{3,75}$= ۱/۶۹؛ شکل ۲).

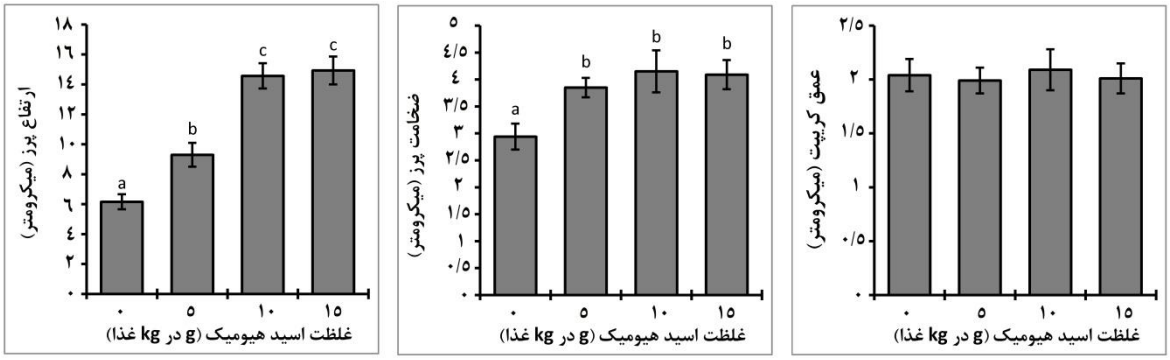
جدول ۱. عملکرد رشد و مصرف غذا در جنس نر ماهی *Betta splendens* به‌دنبال شش هفته تغذیه با جیرهٔ حاوی اسید هیومیک در غلظت‌های مختلف

شاخص	مقدار اسید هیومیک (g) اضافه شده در جیره غذایی (kg)			
	صفر	۵	۱۰	۱۵
وزن اولیه (میلی‌گرم)	۰/۹۶±۰/۱	۰/۹۵±۰/۰۷	۰/۹۵±۰/۰۸	۰/۹۴±۰/۰۸
وزن نهایی (میلی‌گرم)	۲/۳۹±۰/۴۳	۲/۳۶±۰/۳۲	۲/۵۰±۰/۲۹	۲/۴۲±۰/۴۰
طول اولیه (میلی‌متر)	۱۹/۱۸±۰/۹۲	۱۸/۹۰±۱/۲۵	۱۹/۲۶±۱/۵۹	۱۹/۱۱±۱/۲۰
طول نهایی (میلی‌متر)	۴۵/۴۳±۲/۶۸	۴۵/۴۵±۱/۷۵	۴۶/۰۳±۱/۹۵	۴۵/۹۸±۱/۹۷
وزن‌گیری (میلی‌گرم)	۱/۴۲±۰/۴۴	۱/۴۰±۰/۳۰	۱/۵۴±۰/۲۷	۱/۴۷±۰/۳۸
درصد افزایش وزن بدن (میلی‌گرم)	۱۴۹/۳±۵۱/۳	۱۴۶/۸±۳۰/۷	۱۶۴/۰±۳۲/۶	۱۵۶/۷±۴۱/۵
نرخ رشد ویژه	۱/۵۹±۰/۳۶	۱/۶۰±۰/۲۲	۱/۷۲±۰/۲۱	۱/۶۶±۰/۲۸
ضریب تبدیل خوراک	۲/۱۲±۰/۵۵	۲/۰۶±۰/۳۸	۱/۸۵±۰/۲۷	۲/۰۳±۰/۴۳
ضریب چاقی	۲/۵۵±۰/۴۱	۲/۵۱±۰/۲۷	۲/۵۶±۰/۲۱	۲/۴۸±۰/۲۷
زنده‌مانی	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

داده‌ها به‌صورت میانگین (± انحراف معیار) ارائه شده است.



شکل ۱. مقطع عرضی بافت رودۀ در جنس نر ماهی *Betta splendens* تغذیه شده با غذای حاوی مقادیر مختلف اسید هیومیک (A: تیمار کنترل؛ B: تیمار ۵ g/kg؛ C: ۱۰ g/kg؛ و D: ۱۵ g/kg).



شکل ۲. شاخص‌های اندازه‌گیری شده در بافت روده جنس نر ماهی *Betta splendens* تغذیه شده با غذای حاوی مقادیر مختلف اسید هیومیک. حروف لاتین غیر مشترک بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ است.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعۀ حاضر، مکمل‌سازی غذا با اسید هیومیک تأثیر معنی‌داری بر عملکرد رشد و مصرف غذا در جنس نر سیامی جنگجو نداشت؛ علی‌رغم اینکه در طول ۴۲ روز دورۀ تغذیه‌ای، وزن ماهیان حدود ۲/۵ برابر افزایش یافت. مواد هیومیکی می‌توانند با افزایش دسترسی زیستی، و قابلیت هضم و جذب مواد مغذی تأثیرات مفید بر عملکرد رشد گونه‌های آبزیان داشته باشند (Gao *et al*., 2017; Lieke *et al*., 2021; Rasidi *et al*., 2021; Zoheiri *et al*., 2023). با این حال، تناقض‌هایی نیز وجود دارد و عدم تأثیر این مواد بر رشد چندین گونه از ماهیان گزارش شده است (Yılmaz *et al*., 2018; Louvado *et al*., 2021; Oladipupo *et al*., 2023; Prokešová *et al*., 2021). برخی مطالعات نیز که به‌دنبال استفادۀ غذایی از اسید هیومیک بوند، تفاوت‌هایی در فعالیت آنزیم‌های گوارشی و اسیدیته دستگاه گوارش مشاهده کرده‌اند اما اختلافی در رشد ماهیان در پایان دوره گزارش نشده است (Yılmaz *et al*., 2018; Louvado *et al*., 2021). لازم به ذکر است که مواد هیومیکی در غلظت‌های بالا می‌توانند تعادل اسیدی-بازی سیستم گوارشی را مختل کرده

و حتی منجر به کاهش رشد شوند (Rasidi *et al*., 2021). چنین تناقض‌هایی در نتایج مطالعات مختلف را می‌توان به ترکیبات مختلف مواد هیومیکی، گونهٔ ماهی، سن آن، و غلظت‌های استفاده شده نسبت داد (Gao *et al*., 2022). علاوه بر استفاده از مواد هیومیکی به‌عنوان مکمل تغذیه‌ای، از این مواد به‌صورت محلول در محیط پرورشی با هدف تأثیر بر رشد ماهیان استفاده شده است. نتایج این مطالعات نیز با تناقض‌هایی همراه هستند. به‌عنوان مثال، آب غنی‌شده با اسید هیومیک (۱۰، ۲۵، و ۵۰ mg/l) در یک دورهٔ آزمایش ۴۰ روزه تأثیری بر رشد گونهٔ *Rhamdia quelen* نداشته است (Costa *et al*., 2016). از طرف دیگر، استفاده از اسید هیومیک (Meinelt *et al*., 2004) و اسید فولویک (Lieke *et al*., 2021) در آب با افزایش رشد گونه‌های *Xiphophorus helleri* و *Oncorhynchus mykiss* به‌ترتیب در یک دورهٔ ۲۱ هفته‌ای و ۲۸ روزه همراه بوده است. به‌طور کلی، و براساس نتایج مطالعات مختلف و آزمایش حاضر، مکمل‌سازی جیرهٔ غذایی یا آب پرورشی با اسید هیومیک می‌تواند اثرات مثبت، خنثی، یا منفی بر عملکرد رشد ماهیان داشته باشد؛ بنابراین، مطالعات عمیق‌تر در این راستا ضروری به‌نظر می‌رسد. با این حال، تنها در یک مطالعه ذکر شده است که برخلاف استفاده از مواد هیومیکی در آب، استفادهٔ غذایی از این مواد با معایبی همراه است که به‌دلیل رقابت غذایی، ماهیان مقادیر مختلفی از غذا و مادهٔ مکمل را دریافت کرده و در نتیجه اثرات دقیق نخواهد بود (Lieke *et al*., 2021).

در مطالعهٔ حاضر، ضریب چاقی ارزیابی شد تا شاخصی از سلامت ماهیان نیز در نظر گرفته شود. نتایج بیانگر عدم تأثیر اسید هیومیک تغذیه‌ای بر این شاخص بود. این امر نشان می‌دهد که اسید هیومیک نمی‌تواند وضعیت بدنی جنس نر ماهی سیامی جنگجو را بعد از یک دورهٔ ۴۲ روزه تغییر دهد. هم‌سو با نتایج پژوهش حاضر، استفاده از اسید فولویک در آب پرورشی ماهیان جوان *Onchorhynchus mykiss* نیز اثری بر ضریب چاقی نداشت (Lieke *et al*., 2021). همچنین، تغذیهٔ ماهیان جوان *Lates calcarifer* با غذای حاوی اسید فولویک نیز بر ضریب چاقی بی‌اثر بوده است (Zoheiri *et al*., 2023).

عوامل مختلف از قبیل ترکیبات تغذیه‌ای، استرس، و بیماری می‌توانند بر ریخت‌شناسی روده ماهیان مؤثر باشند. مورفولوژی روده بر فیزیولوژی و متابولیسم مواد مغذی تأثیر دارد (Kamali Najafabad *et al*., 2016). در مطالعهٔ حاضر، تغذیهٔ ماهی سیامی جنگجو در یک دورهٔ شش هفته‌ای با افزایش طول و ضخامت ویلی‌ها همراه بود. افزایش طول ویلی‌ها ارتباط مستقیمی با افزایش ناحیهٔ سطحی روده دارد که منجر به بهبود هضم و جذب مواد مغذی می‌شود (Adeoye *et al*., 2016). متأسفانه، تاکنون گزارشی از اثرات اسید هیومیک بر بافت‌شناسی دستگاه گوارش ماهیان منتشر نشده است بنابراین امکان مقایسهٔ نتایج مطالعهٔ حاضر مقدور نیست. با این حال، در تطابق با نتایج این پژوهش، تغییرات سیستم گوارش از قبیل افزایش طول پرزها، بیشتر شدن ضخامت پرزها، کاهش عمق کریپت، و تراکم سلول‌های گابلت در موش (Yasar *et al*., 2002) و مرغ‌های گوشتی (Aristimunha *et al*., 2020) گزارش شده است. آنچه از نتایج بافت‌شناسی روده ماهیان مشخص است این می‌باشد که طول و ضخامت ویلی‌ها در روده به‌دنبال مصرف غذای حاوی اسید هیومیک افزایش یافته و بنابراین سطح مفید روده نیز بیشتر می‌شود.

۵. نتیجه‌گیری نهایی

به‌طور خلاصه، نتایج این مطالعه نشان داد که جنس نر ماهی سیامی جنگجو قادر به مصرف اسید هیومیک مکمل‌شده در خوراک است. تغذیهٔ ماهیان با غلظت‌های مختلف اسید هیومیک اثری بر طول و وزن بدنی آن‌ها نداشت. ضریب تبدیل خوراک و ضریب چاقی نیز در ماهیان تیمار شاهد و تیمارهای تغذیه شده با اسید هیومیک تفاوتی نداشتند. از طرف دیگر، ریخت‌شناسی رودهٔ ماهیان از مقدار خوراکی اسید هیومیک اثر پذیرفته و بیشترین ارتفاع و ضخامت پرزها در ماهیان تغذیه شده با خوراک حاوی ۱۰ g/kg feed و ۱۵ مشاهده شد.

۶. تشکر و قدردانی

از مسئولین دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر به‌دلیل تأمین مالی این پروژه در قالب رسالهٔ دکتری تکثیر و پرورش آبزیان تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

References ۷. منابع

Adeoye, A., Jaramillo-Torres, A., Fox, S., Merrifield, D., Davies, S., 2016. Supplementation of formulated diets for tilapia (*Oreochromis niloticus*) with selected exogenous enzymes: Overall performance and effects on intestinal histology and microbiota. *Animal Feed Science and Technology* 100(215), 133-143. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2016.03.002

Arif, M., Alagawany, M., Abd El-Hack, M., Saeed, M., Arain, M., Elnesr, S., 2019. Humic acid as a feed additive in poultry diets: A review. *Iranian Journal of Veterinary Research* 20(3), 167-172.

Aristimunha, P.C., Mallheiros, R., Ferket, P.R., Cardinal, K.M., Moreira Filho, A.L.D.B., Santos, E., Cavalcante, D.T., Ribeiro, A.M.L., 2020. Effect of dietary organic acids and humic substance supplementation on performance, immune response and gut morphology of broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research* 29(1), 85-94. DOI: 10.3382/japr/pfz031

Costa, S.T.D., Sutili, F.J., Gressler, L.T., Loebens, L., Colpo, C.V., Lazzari, R., Baldisserotto, B., 2016. Growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to acidic pH at different humic acid levels. *Ciência Rural* 46(6), 1094-1099. DOI: 10.1590/0103-8478cr20151027

Forsatkar, M.N., Nematollahi, M.A., Amiri, B.M., Huang, W.-B., 2014. Fluoxetine inhibits aggressive behaviour during parental care in male fighting fish (*Betta splendens*, Regan). *Ecotoxicology* 23(9), 1794-1802. DOI: 10.1007/s10646-014-1345-0

Forsatkar, M.N., Nematollahi, M.A., Brown, C., 2017. Male Siamese fighting fish use gill flaring as the first display towards territorial intruders. *Journal of Ethology* 35(1), 51-59. DOI: 10.1007/s10164-016-0489-1

Forsatkar, M.N., Nematollahi, M.A., Rafiee, G., Farahmand, H., Lawrence, C., 2018. Effects of the prebiotic mannan-oligosaccharide on feed deprived zebrafish: Growth and reproduction. *Aquaculture Research* 49(8), 2822-2832. DOI: 10.1111/are.13745

Gao, X., Zhang, H., Xu, Y., Ni, Q., Zhang, Y., Tan, H., Gu, C., 2022. Effects of humic acid on the nitrogen utilization efficiency and microbial communities in aquaponic systems. *Aquaculture* 547, 737475. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.737475

Gao, Y., He, J., He, Z., Li, Z., Zhao, B., Mu, Y., Lee, J.-Y., Chu, Z., 2017. Effects of fulvic acid on growth performance and intestinal health of juvenile loach *Paramisgurnus dabryanus* (Sauvage). *Fish & Shellfish Immunology* 100(62), 47-56. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.01.008

Kamali Najafabad, M., Imanpoor, M.R., Taghizadeh, V., Alishahi, A., 2016. Effect of dietary chitosan on growth performance, hematological parameters, intestinal histology and stress resistance of Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum* Kamenskii, 1901) fingerlings. *Fish Physiology and Biochemistry* 42(1), 1063-1071. DOI: 10.1007/s10695-016-0197-3

Lichak, M. R., Barber, J. R., Kwon, Y. M., Francis, K. X., Bendesky, A., 2022. Care and use of Siamese fighting fish (*Betta Splendens*) for Research. *Comparative Medicine* 72(3), 169-180. DOI: 10.30802/AALAS-CM-22-000051

Lieke, T., Steinberg, C. E., Pan, B., Perminova, I. V., Meinelt, T., Knopf, K., Kloas, W., 2021. Phenol-rich fulvic acid as a water additive enhances growth, reduces stress, and stimulates the immune system of fish in aquaculture. *Scientific Reports* 11(1), 174-186. DOI: 10.1038/s41598-020-80449-0

Louvado, A., Cleary, D. F., Pereira, L. F., Coelho, F. J., Pousão-Ferreira, P., Ozório, R. O., Gomes, N. C., 2021. Humic substances modulate fish bacterial communities in a marine recirculating aquaculture system. *Aquaculture* 544, 737121. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.737121

Lumactud, R. A., Gorim, L. Y., Thilakarathna, M. S., 2022. Impacts of humic-based products on the microbial community structure and functions toward sustainable agriculture. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 6, 977121. DOI: 10.3389/fsufs.2022.977121

McDonald, S., Bishop, A.G., Prenzler, P.D., Robards, K., 2004. Analytical chemistry of freshwater humic substances. *Analytica Chimica Acta* 527(2), 105-124. DOI: 10.1016/j.aca.2004.10.011

Meinelt, T., Schreckenbach, K., Knopf, K., Wienke, A., Stüber, A., Steinberg, C. E., 2004. Humic substances affect physiological condition and sex ratio of swordtail (*Xiphophorus helleri* Heckel). *Aquatic Sciences* 66(2), 239-245. DOI: 10.1007/s00027-004-0706-9

Merrifield, D. L., Harper, G. M., Mustafa, S., Carnevali, O., Picchietti, S., Davies, S. J., 2011. Effect of dietary alginic acid on juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) intestinal microbial balance, intestinal histology and growth performance. *Cell and Tissue Research* 344(1), 135-146. DOI: 10.1007/s00441-010-1125-y

Nur, F. M., Batubara, A. S., Fadli, N., Rizal, S., Siti-Azizah, M. N., Muchlisin, Z. A., 2022. Elucidating species diversity of genus Betta from Aceh waters Indonesia using morphometric and genetic data. *Zoologischer Anzeiger* 296, 129-140. DOI: 10.1016/j.jcz.2021.12.004

Oladipupo, A. A., Kelly, A. M., Davis, D. A., Bruce, T. J., 2023. Investigation of dietary exogenous protease and humic substance on growth, disease resistance to *Flavobacterium covae* and immune responses in juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Journal of Fish Diseases* pp. 1-19. DOI: 10.1111/jfd.13835

Prokešová, M., Bušová, M., Zare, M., Tran, H. Q., Kučerová, E., Ivanova, A. P., Gebauer, T., Stejskal, V., 2021. Effect of humic substances as feed additive on the growth performance, antioxidant status, and health condition of african catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822). *Animals* 11(8), 2266. DOI: 10.3390/ani11082266

Rasidi, R., Jusadi, D., Setiawati, M., Yuhana, M., Zairin Jr, M., Sugama, K., 2021. Dietary Supplementation of humic acid in the Feed of juvenile asian seabass, *Lates calcarifer* to counteract possible negative effects of Cadmium Accumulation on Growth and Fish Well-being when Green Mussel (*Perna viridis*) is used as a Feed ingredient. *Aquaculture Research* 52(6), 2550-2568. DOI: 10.1111/are.15104

Steinberg, C., Timofeyev, M. A., Menzel, R., 2009. Dissolved humic substances—interactions with organisms, Academic Press Oxford: Oxford, UK.

Steinberg, C. E., Meinelt, T., Timofeyev, M. A., Bittner, M., Menzel, R., 2008. Humic substances: Part 2: Interactions with organisms. *Environmental Science and Pollution Research* 15(2), 128-135. DOI: 10.1065/espr2007.07.434

Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S., Somsueb, P., Rungruangsak-Torrissen, K., 2011. Effects of different modified diets on growth, digestive enzyme activities and muscle compositions in juvenile Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). *Aquaculture* 322(323), 1-9. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2011.10.006

Torrecillas, S., Terova, G., Makol, A., Serradell, A., Valdenegro, V., Gini, E., Izquierdo, M., Acosta, F., Montero, D., 2019. Dietary phytogenics and galactomannan oligosaccharides in low fish meal and fish oil-based diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: Effects on gut health and implications on in vivo gut bacterial translocation. *PLoS One* 14(9), e0222063. DOI: 10.1371/journal.pone.0222063

Vu, T.-D., Iwasaki, Y., Shigenobu, S., Maruko, A., Oshima, K., Iioka, E., Huang, C.-L., Abe, T., Tamaki, S., Lin, Y.-W., 2020. Behavioral and brain-transcriptomic synchronization between the two opponents of a fighting pair of the fish *Betta splendens*. *PLoS Genetics* 16(6), e1008831. DOI: 10.1371/journal.pgen.1008831

Vucskits, A., Hullár, I., Bersényi, A., Andrásofszky, E., Kulcsár, M., Szabó, J., 2010. Effect of fulvic and humic acids on performance, immune response and thyroid function in rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 94(6), 721-728. DOI: 10.1111/j.1439-0396.2010.01023.x

Watson, C. A., DiMaggio, M., Hill, J. E., Tuckett, Q. M., Yanong, R. P., 2019. Evolution, culture, and Care for *Betta splendens*: FA212, 3/2019. *Edis* 2019(2), 1-5. DOI: 10.32473/edis-fa212-2019

Weber, J., Chen, Y., Jamroz, E., Miano, T., 2018. Preface: humic substances in the environment. *Journal of Soils and Sediments* 18(8), 2665-2667. DOI: 10.1007/s11368-018-2052-x

Yasar, S., Gokcimen, A., Altuntas, I., Yonden, Z., Petekkaya, E., 2002. Performance and ileal histomorphology of rats treated with humic acid preparations. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 86(7-8), 257-264. DOI: 10.1046/j.1439-0396.2002.00383.x

Yegani, M., Korver, D., 2008. Factors affecting intestinal health in poultry. *Poultry Science* 87(10), 2052-2063. DOI: 10.3382/ps.2008-00091

Yılmaz, S., Ergun, S., Çelik, E. Ş., Yigit, M., 2018. Effects of dietary humic acid on growth performance, haemato-immunological and physiological responses and resistance of Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* to *Yersinia ruckeri*. *Aquaculture Research* 49(10), 3338-3349. DOI: 10.1111/are.13798

Zhang, W., Wang, H., Brandt, D. Y., Hu, B., Sheng, J., Wang, M., Luo, H., Li, Y., Guo, S., Sheng, B., 2022. The genetic architecture of phenotypic diversity in the betta fish (*Betta splendens*). *Science Advances* 8(38), eabm4955. DOI: 10.1126/sciadv.abm495

Zoheiri, F., Hoseinifar, S. H., Mozanzadeh, M. T., Ahangarzadeh, M., Lieke, T., Van Doan, H., 2023. Dietary fulvic acid increased growth, stress tolerance and disease resistance against *Vibrio harveyi* in Asian seabass (*Lates calcarifer*) juvenile. *Aquaculture Reports* 32, 101738. DOI: 10.1016/j.aqrep.2023.101738