شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۲، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۸
صفحات ۴۳۶-۴۱۹

تأثیر سطوح مختلف اسید مالیک بر شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی و ایمنی بچه تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii* Brandt, 1869)

حدیثه علیزاده[۱]، حسین اورجی[۱]، بهرام فلاحتکار[۲*] ایرج عفت پناه[۳]

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم دام و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۲-استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران
۳-کارشناس ارشد مرکز بازسازی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی ماهیان دریایی شادروان دکتر یوسف‌پور، سیاهکل، ایران

تاریخ ارسال: ۱۳۹۸/۱۱/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۰۵

چکیده

در این آزمایش، تأثیر سطوح مختلف اسید مالیک (صفر، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ گرم در کیلوگرم جیره) بر شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی و ایمنی تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*) بررسی شد. بدین منظور، تعداد ۳۷۵ قطعه بچه ماهی با میانگین وزن اولیه ۰/۶۰ ± ۳۳/۷۲ گرم (میانگین ± خطای استاندارد) به طور تصادفی در حوضچه‌های بتونی گرد (با قطر ۱/۸۵ و عمق ۰/۲۵ متر) به تعداد ۲۵ عدد در هر کدام، در ۵ تیمار و با ۳ تکرار توزیع و به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. نتایج مربوط به خون‌شناسی نشان داد که از نظر تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، متوسط حجم گلبول قرمز ، متوسط هموگلوبین گلبول قرمز و متوسط غلظت هموگلوبین سلولی اختلاف معنی داری بین تیمارها وجود ندارد ($P>0/05$). در بررسی و مقایسه شاخص‌های بیوشیمیایی اختلاف معنی داری در مقدار گلوکز، پروتئین کل و گلوبولین در بین تیمارها مشاهده شد ($P<0/05$). کم‌ترین مقدار گلوکز، پروتئین کل و گلوبولین در تیمار ۷/۵ گرم در کیلوگرم مشاهده شد. در سایر شاخص ها شامل آلبومین، کلسترول، تری گلیسرید، آسپارتات آمینوترانسفراز ، آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد ($P>0/05$). نتایج شاخص‌های ایمنی نیز نشان داد که اختلاف معنی‌داری در تعداد گلبول‌های سفید و IgM بین تیمارها وجود نداشت ($P>0/05$). بیش‌ترین میزان ایمنوگلوبولین کل و لایزوزیم در تیمار ۲/۵ گرم در کیلوگرم مشاهده شد که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند ($P<0/05$). بر اساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه می‌توان اظهار نمود که اسید مالیک به‌کار رفته شده در این مطالعه در بهبود برخی از شاخص‌های خونی و ایمنی بچه تاسماهیان سیبری تأثیر جزئی داشته است

کلمات کلیدی: اسید مالیک، خون‌شناسی، بیوشیمیایی، ایمنی، تاسماهی سیبری.

* نویسنده مسئول: بهرام فلاحتکار
Email: falahatkar@guilan.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 72, No. 4, Winter, 2019
pp. 419-436

Effect of dietary malic acid on hematological, biochemical and immunological indices of juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt, 1869)

Hadiseh Alizade [1]., Hossein Ouraji [1] Bahram Flahatkar [1*], Iraj Efatpanah [3]

1- Department of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran

2- Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Guilan, Iran

3- Dr. Yousefpour Marine Fishes Restocking and Genetic Conservation Center, Siahkal, Iran

Received: 30-Feb-2020 **Accepted: 12-Mar-2020**

Abstract

In this experiment, the effect of different levels of malic acid (0.0, 2.5, 5, 7.5 and 10 g/kg diet) was evaluated on hematological, biochemical and immunological indices of juvenile Siberian sturgeon (Acipenser baerii). For this purpose, a total number of 375 fish (33.72 ± 0.60 g initial weight; mean ± S.E.) were randomly assigned to 15 circular concrete tanks (1.85 m diameter and 0.25 m depth). The fish were distributed in 5 treatments with 3 replicates and were fed during 8 weeks. The results of hematological showed that there was no significant difference among treatments in the number of red blood cells, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin and mean corpuscular hemoglobin concentration($P>0.05$). There was a significant difference in glucose, total protein and globulin levels among treatments ($P<0.05$). The lowest level of glucose, total protein and globulin were observed in treatment of 7.5 g/kg. There was no significant difference among treatments in other parameters including albumin, cholesterol, triglyceride, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase ($P>0.05$). The results of immune indices showed that there was no significant difference in white blood cell count and IgM ($P>0.05$). The highest amount of total immunoglobulin and lysozyme activity were observed in treatment of 2.5 g/kg which had a significant difference with control treatment ($P<0.05$). Based on the results obtained, it was concluded that the malic acid used in this study had a minor effect on improving some blood and immune indices of juvenile Siberian sturgeon.

Keywords: Malic acid, Hematology, Biochemistry, Immunology, Acipenser baerii

Corresponding author: Bahram Falahatkar Email: falahatkar@guilan.ac.ir

۱. مقدمه

از جمله مشکلات پرورش ماهیان خاویاری، تکنولوژی فرمولاسیون جیره‌های غذایی می‌باشد، چراکه بیش از ۵۰ درصد از هزینه های پرورش به غذا اختصاص دارد (Falahatkar, 2014). با توجه به سازگاری کم ماهیان خاویاری به غذای دستی، تهیه غذای مناسب سبب اقتصادی شدن امر پرورش، بهبود شاخص‌های رشد و کاهش آلودگی می‌شود (Bronzi *et al*., 1999).

تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*) یکی از انواع ماهیان خاویاری است که در سراسر جهان بیش‌تر جهت تولید گو شت و خاویار مورد ا ستفاده قرار می گیرد (Falahatkar, 2018). این ماهی از گو نه های با ارزش تجاری ا ست که از ا ستعداد قابل توجهی برای پرورش در شرایط محصور برخوردار ا ست (Williot *et al*., 2002). سریع‌الرشد بودن، کوتاه بودن دوره رسیدگی بلوغ جنسی، گستردگی و تنوع در رژیم غذایی باعث گردیده است که این گو نه به‌عنوان یکی از گو نه های اصلی در پرورش گوشتی ماهیان خاو یاری آب شیرین معرفی گردد (Falahatkar, 2018). تاسماهی سیبری نسبت به گونه‌هایی نظیر قزل‌آلا قادر به تحمل محدوده وسیع‌تری از تغییرات شاخص های کیفی آب و اکسیژن محلول نسبتا پایین، غلظت بالای آمونیاک و تراکم بالای ذخیره سازی است (Bronzi *et a*l., 1999).

ا ستفاده از محرک‌های ر شد آنتی‌بیوتیکی در جیره ماهی‌ها سبب بهبود افزایش وزن زنده، ضریب تبدیل غذایی و میزان بقا می‌گردد، ا ما نگرانی های عمومی در ارتباط با مقاوم شدن عوامل بیماری‌زا و مسائل زیست محیطی سبب ممنوعیت یا کاهش ا ستفاده از این مواد در سراسر جهان شده است. در بین مکمل‌های افزودنی، اسیدهای آلی جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها معرفی شده‌اند (Ceylan, 2002). مطالعات اولیه نشان داده ا ست که ا ضافه کردن ا سیدهای آلی به جیره سبب بهبود عملکرد موجود می‌شود (Kirchgessner *et al*., 1985, Hassan *et al*., 2017). این اسیدها عموماً در طی فرآیند تخمیر میکروبی تولید می‌شوند. امروزه توجه ویژه‌ای به کاربرد تجاری ا سیدهای آلی در جیره ماهیان و سایر جانوران در جهت کنترل بیماری‌ها و افزایش کارایی صورت پذیرفته است (Ng *et al*., 2015).

اسید مالیک از طریق کاهش pH غذا سبب جلوگیری از ر شد میکروب‌ها می شود و همچنین با پایین آوردن جذب ا حتمالی ارگانیزم‌های بیماری‌زا و متابولیت‌های سمی آنها توسط ماهی، به‌عنوان یک محافظ در برابر عواملی مانند قارچ‌ها، باکتری‌های مضر، مخمرها و غیره عمل می‌کند (Luckstadt, 2008). محققان عملکرد مثبت جیره‌های حاوی اسیدهای آلی را به عواملی نظیر افزایش کارایی آنزیم های گوارشی (Kotzamanis *et al*., 2007)، افزایش میزان هضم پذیری پروتئین و چربی (Luckstadt, 2008)، افزایش حلالیت عناصر معدنی، افزایش کلونی‌های باکتری‌های مفید در روده، بهبود شاخص‌های ر شد و پارامترهای خونی (Hassan *et al*., 2017) نسبت داده‌اند.

این مطالعه با هدف بررسی اثرات سطوح مختلف اسید مالیک در جیره غذایی بچه تاسماهی سیبری بر پارامترهای خونی، بیوشیمیایی و ایمنی شناسی و همچنین تعیین سطح مناسب مکمل اسید مالیک در جیره غذایی تاسماهیان سیبری انجام شد.

۲. مواد و روش

۱،۲. ماهی و شرایط پرورش

این پژوهش طی ماه‌های مهر تا آذر سال ۱۳۹۶ در مرکز بازسازی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی ماهیان دریایی شادروان دکتر یوسف‌پور در سیاهکل واقع در استان گیلان، طی مدت ۸ هفته انجام شد. بدین منظور، تعداد ۳۷۵ قطعه بچه تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*) با میانگین وزن اولیه ۰/۶۰ ± ۳۳/۷۲ گرم (میانگین ± خطای استاندارد) حاصل از مولدین پرورشی تکثیر شده در ابتدای سال در همین مرکز تهیه و به حوضچه‌های بتونی گرد (با قطر ۱/۸۵ و عمق ۰/۲۵ متر) انتقال یافتند و جهت سازگاری، به مدت دو هفته با غذای شاهد تغذیه شدند. پس از پایان مدت سازگاری، بچه ماهیان در ۱۵ حوضچه با شرایط بیان شده به تعداد ۲۵ قطعه با حجم آبگیری ۷۰۰ لیتر در قالب طرح کاملا تصادفی توزیع شدند. آب مورد نیاز از رودخانه خرارود تأمین گردید. در طی انجام پژوهش،

دبی آب ورودی به مخازن پرورشی به طور متوسط ۰/۹۵ ± ۸/۴۸ لیتر در دقیقه بود. پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب شامل دما، اکسیژن و pH به صورت روزانه اندازه‌گیری و ثبت شد. میانگین دمای آب ۲/۸۵ ± ۱۷/۰۷ درجه سانتی‌گراد، متوسط اکسیژن محلول ۰/۹۹ ± ۶/۰۳ میلی-گرم در لیتر و میانگین pH ۰/۰۴ ± ۷/۷ ثبت شد. لازم به ذکر است ماهیان در طی انجام آزمایش در شرایط دوره نوری طبیعی و در یک مکان سرپوشیده قرار داشتند
.

۲،۲. طراحی آزمایش و تغذیه

در این پژوهش از ۵ تیمار غذایی و برای هر تیمار ۳ تکرار با سطوح افزودنی صفر، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ گرم اسید مالیک در هر کیلوگرم جیره غذایی استفاده شد. بدین منظور هر سطح از اسید مالیک در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و روی یک کیلوگرم غذا اسپری شد و پس از خشک شدن جهت جلوگیری از آبشویی با ژلاتین ۰/۱ درصد پوشش داده شد (Yamamoto and Akiyama, 1995). خوراک پلت مورد نیاز از شرکت تولیدی پارس دانه سوادکوه (پروتئین ۴۲، چربی ۱۵، خاکستر ۵، رطوبت ۱۱ و فیبر ۴درصد) با برند Topfeed (سوادکوه، مازندران) و اسید مالیک مورد نیاز از شرکت شیمیایی پاسارگاد نوین (تهران، ایران) تهیه شد. غذادهی به ماهیان به‌صورت دستی و روزانه در چهار نوبت (ساعات ۳:۰۰، ۹:۰۰، ۱۵:۰۰ و ۲۱:۰۰) صورت گرفت. در هر روز قبل از اولین غذادهی، آب حوضچه‌ها به میزان ۵۰ درصد سیفون و تعویض شد تا فضولات خارج شود. در حین انجام این عمل مقدار غذای باقیمانده (تعداد گرانول‌ها) شمارش و پس از محاسبه از غذای داده شده کسر شد. پس از آبگیری حوضچه‌ها، جریان ورودی آب قطع شد تا غذا از دسترس ماهی خارج نشود و سپس غذادهی انجام شد. غذادهی بر اساس میزان اشتها بود. پس از اتمام غذادهی مجدداً جریان ورودی آب برقرار شد.

۳،۲. نمونه برداری و سنجش شاخص های خونی

در پایان دوره پرورش، به منظور بررسی عملکرد رشد و کارایی غذایی تیمارهای مختلف، شاخص‌های وزن به-دست آمده (Weight gain; WG) و ضریب تبدیل غذایی (Feed conversion ratio; FCR) اندازه‌گیری و از طریق رابطه‌های زیر محاسبه شدند (Falahatkar, 2013):

WG (g) =وزن اولیه (گرم) - وزن نهایی (گرم)

FCR = وزن تر به‌دســـت آمده (گرم) / مقدار غذای مصرفی (گرم)

به منظور سنجش شاخص های هماتولوژیک، تعداد ۴ قطعه ماهی از هر حوضچه (۱۲ عدد از هر تیمار)، به طور تصادفی صید گردید. خونگیری از سیاهرگ وریدی با استفاده از سرنگ هپارینه به میزان ۲ میلی‌لیتر انجام گرفت. مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر خون به داخل تیوپ‌های اپندروف جهت انجام مطالعات هماتولوژی و ۱/۵ میلی‌لیتر به لوله‌های آزمایش جهت تهیه پلاسما انتقال داده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۵ دقیقه با دور g ۱۵۰۰ سانتریفیوژ (یونیورسال، تهران، ایران) شدند و سپس پلاسما به ویال‌های ۱/۵ میلی لیتری منتقل و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) و تعداد گلبول‌های سفید (WBC) با استفاده از لام نئوبار به روش Houston (۱۹۹۰) اندازه گیری شد. میزان هماتوکریت به روش Řehulka (۲۰۰۴) و میزان هموگلوبین توسط دستگاه اسپکتوفتومتری و با روش سیانومت هموگلوبین سنجش شد (Klontz, 1994).

شاخص‌های خونی شامل متوسط حجم گلبول قرمز (Mean Corpuscular Volume; MCV)، متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (Mean Corpuscular Hemoglobin; MCH) و متوسط غلظت هموگلوبین سلولی (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration; MCHC) از طریق روابط زیر محاسبه شدند (Klontz, 1994):

MCV (fL) = [هماتوکریت (٪) / تعداد گلبول های قرمز بر حسب میلیون در میلی‌متر مکعب] × ۱۰

[تعداد گلبول های قرمز بر حسب میلیون در میلی‌متر

MCH (pg/cell) = [(g/dL) هموگلوبین / مکعب
MCHC (g/dL) = [(g/dL) هموگلوبین / (٪) هماتوکریت] × ۱۰۰

شمارش انواع گلبول‌های سفید به وسیله لام نئوبار و به روش زیگزاگ با استفاده از میکروسکوپ نوری و با عدسی ۱۰۰× و روغن امرسیون انجام شد (Řehulka, 2004؛Klontz, 1994). مقدار پروتئین کل بر مبنای روش رفراکتومتری با دستگاه رفراکتومتر (مدل Atago، توکیو، ژاپن) تعیین گردید (Campbell, 2015). آلبومین به روش فتومتریک (بروموکروزل سبز) با استفاده از کیت پارس آزمون (کرج، ایران) اندازه گیری شد (Duthei *et al*, 1985). از اختلاف پروتئین کل و آلبومین میزان گلوبولین به‌دست آمد (Kumar et al., 2011). مقدار گلوکز، کلسترول و تری گلیسرید با استفاده از روش رنگ سنجی (Colorimetric) و کیت تشخیصی (پارس آزمون، کرج، ایران) تعیین گردید (Morris and Davey, 2001). آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) به روش فتومتریک و با استفاده از کیت تشخیصی پارس آزمون (کرج، ایران) در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه گیری شدند (Thomas, 1998). آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) به روش فتومتریک و کیت تشخیصی پارس آزمون (کرج، ایران) و در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Fischbach et al., 1992). شاخص IgM به‌وسیله کیت الایزا و با روش پیشنهادی توسط Yamamoto و Yonemasu (۱۹۹۹) اندازه گیری شد. اندازه‌گیری فعالیت لایزوزیم پلاسما بر مبنای لیز باکتری گرم مثبت (*Micrococcus luteus*) طبق روش Clerton و همکاران (۲۰۰۱) صورت گرفت. مقدار ایمنوگلوبولین کل با روش بیوره (Biuret) شرح داده شده توسط Siwicki و Andersom (۱۹۹۳) و Amar و همکاران (۲۰۰۰) به‌دست آمد.

۴،۲. تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS (IBM SPSS Statistics V_{22}) استفاده شد. جهت کنترل نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov)، برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه دانکن (Duncan) با درصد خطای ۵ درصد استفاده شد.

۳. نتایج

۱،۳. میزان رشد و ضریب تبدیل غذایی

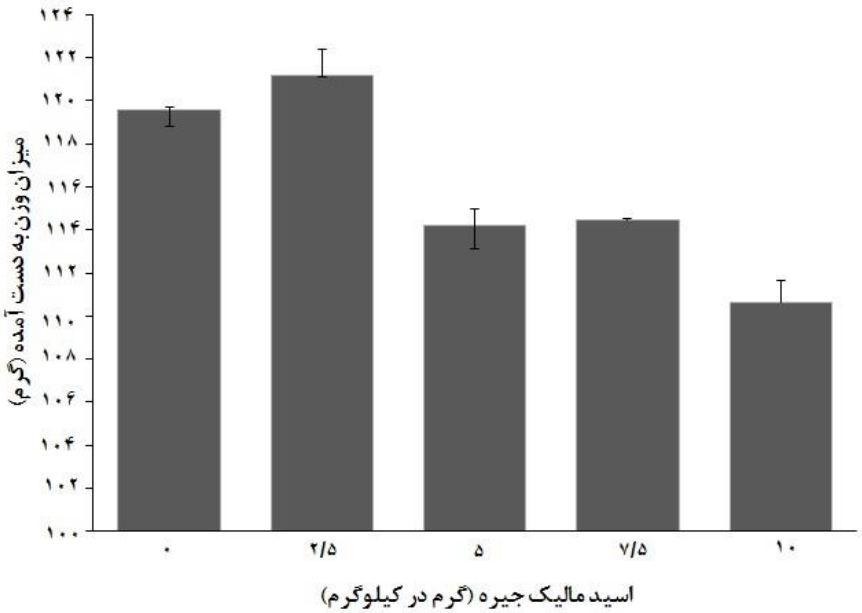
نتایج شاخص‌های رشد نشان داد که افزودن سطوح مختلف اسید مالیک به جیره غذایی بچه ماهیان تاثیر معنی داری بر میزان وزن به دست آمده و ضریب تبدیل غذایی نداشت (شکل‌های ۱ و ۲، P>۰/۰۵). به‌طور کلی، شاخص-های رشد و تغذیه‌ای حاکی از عدم تاثیر مثبت یا منفی وجود سطوح مختلف اسید مالیک در جیره غذایی بچه تاسماهیان سیبری بود.

۲،۳. شاخص های خون‌شناسی

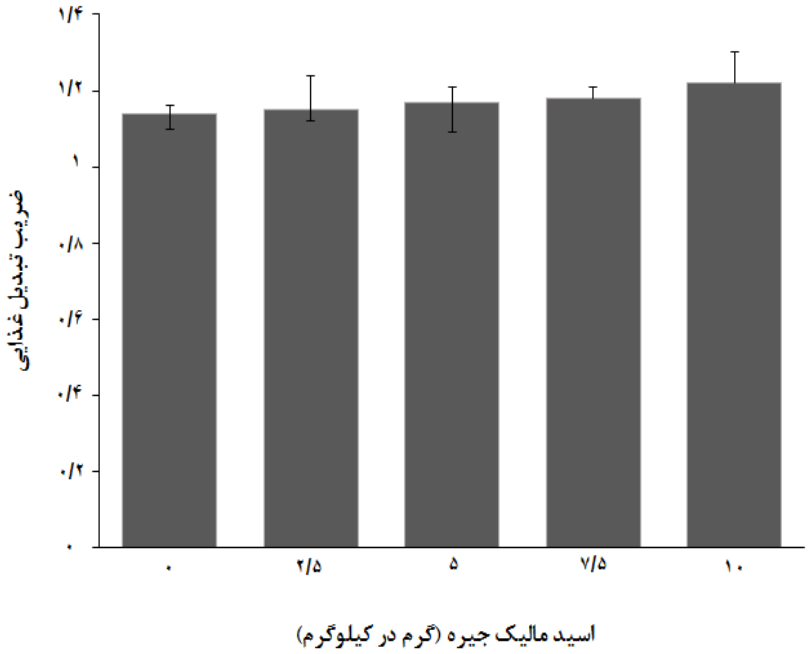
نتایج مربوط به شاخص های خون‌شناسی نشان داد که افزودن ا سید مالیک به غذا اختلاف معنی‌داری در بین تیمار ها ایجاد نمی‌کند (P>۰/۰۵، جدول ۱). بیش‌ترین مقدار گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، MCV، MCH و MCHC در تیمار ۱۰ گرم بر کیلوگرم اسید مالیک مشاهده گردید. کم‌ترین میزان گلبول‌های قرمز و MCH در تیمار شاهد، هموگلوبین و هماتوکریت در تیمار ۵، MCV در تیمار ۷/۵ و MCHC در تیمار ۲/۵ گرم بر کیلوگرم اسید مالیک مشاهده شد.

۳،۳. شاخص های بیوشیمیایی خون

نتایج مربوط به شاخص های بیوشیمیایی خون در جدول ۲ آورده شده است. این نتایج اختلاف معنی‌داری را در میزان گلوکز، پروتئین کل و گلوبولین در تیمار ۷/۵ گرم در کیلوگرم اسید مالیک با سایر تیمارها نشان داد (P<۰/۰۵). کم‌ترین مقدار گلوکز، پروتئین کل و گلوبولین در تیمار ۷/۵ مشاهده شد. در سایر شاخص ها شامل آلبومین، کلسترول، تری گلیسرید، AST، ALT و ALP اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد (P>۰/۰۵).



شکل ۱ - میزان وزن به‌دست آمده بچه تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*) تغذیه شده با سطوح مختلف اسید مالیک پس از ۸ هفته غذادهی (میانگین ± خطای استاندارد).



شکل ۲ -میزان ضریب تبدیل غذایی بچه تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*) تغذیه شده با سطوح مختلف اسید مالیک پس از ۸ هفته غذادهی (میانگین ± خطای استاندارد).

جدول ۱: شاخص های خون شناسی بچه تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*) تغذیه شده با سطوح مختلف اسید مالیک پس از ۸ هفته غذادهی (n= ۱۲؛ میانگین ± خطای استاندارد)

شاخص های خونی	سطوح مختلف اسید مالیک جیره (گرم/کیلوگرم)				
	صفر	۲/۵	۵	۷/۵	۱۰
تعداد گلبول های قرمز (×۱۰۳/mm۳)	۷۷۰ ± ۳۵	۷۷۲ ± ۱۸/۸۳	۷۴۳/۱۶ ± ۵۷/۷۸	۸۰۱/۶۶ ± ۵۰/۲۴	۸۱۰/۸۳ ± ۱۱/۵۰
هموگلوبین (g/dL)	۷/۱۵ ± ۰/۳۱	۷/۲ ± ۰/۱۷	۶/۷ ± ۰/۳۸	۷/۴۶ ± ۰/۴۴	۷/۶۳ ± ۰/۱۲
هماتوکریت (٪)	۲۹/۳۳ ± ۱/۲۰	۲۹/۶۶ ± ۰/۶۶	۲۷/۶۶ ± ۱/۵۶	۳۰/۵ ± ۱/۷۸	۳۱/۱۶ ± ۱/۳۰
MCV (fL)	۳۸۱ ± ۲/۳۸	۳۸۴ ± ۱/۵۰	۳۸۳/۳۳ ± ۱/۶۸	۳۸۰/۶۷ ± ۲/۹۲	۳۸۵ ± ۲/۵۵
MCH (pg/cell)	۹۲/۸۳± ۰/۴۴	۹۳ ± ۰/۴۴	۹۳/۶۶ ± ۰/۳۳	۹۳ ± ۰/۳۶	۹۴ ± ۰/۳۶
MCHC (g/dL)	۲۴/۳۶ ± ۰/۱۵	۲۴/۲۴ ± ۰/۷۵	۲۴/۴۶ ± ۰/۱۴	۲۴/۴۶ ± ۰/۱۴	۲۴/۴۸ ± ۰/۱۸

جدول ۲- شاخص های بیوشیمیایی بچه تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*) تغذیه شده با سطوح مختلف اسید مالیک پس از ۸ هفته غذادهی (n= ۱۲؛ میانگین ± خطای استاندارد)

شاخص های بیوشیمیایی	سطوح مختلف اسید مالیک جیره (گرم/کیلوگرم)				
	صفر	۲/۵	۵	۷/۵	۱۰
گلوکز (mg/dL)	۴۴/۱۶ ± ۱/۹۹^{ab}	۴۷ ± ۱/۶۵^{a}	۴۶/۱۶ ± ۱/۴۲^{a}	۴۰/۳۳ ± ۱/۴۹^{b}	۴۳ ± ۱/۵۰^{ab}
پروتئین کل (g/dL)	۴/۷ ± ۰/۰۸^{a}	۴/۵۶ ± ۰/۱۸^{ab}	۴/۵۸ ± ۰/۱۱^{ab}	۴/۲۶ ± ۰/۱۴^{b}	۴/۵۵ ± ۰/۸۰^{ab}
آلبومین (g/dL)	۱/۰۱ ± ۰/۵۷	۱/۲۰ ± ۰/۸۵	۱/۲۵ ± ۰/۰۶	۱/۰۴ ± ۰/۰۵	۱/۲۳ ± ۰/۱۳
گلوبولین (g/dL)	۳/۶۹ ± ۰/۱۱^{a}	۳/۳۵ ± ۰/۱۴^{ab}	۳/۳۲ ± ۰/۰۹^{ab}	۳/۲۱ ± ۰/۱۸^{b}	۳/۳۱ ± ۰/۱۲^{ab}
کلسترول (mg/dL)	۱۳۱/۱۶ ± ۳/۷۷	۱۲۶/۵ ± ۱۱/۸۸	۱۱۵/۶۶ ± ۳/۲۶	۱۰۹ ± ۷/۶۰	۱۰۹/۱۶ ± ۶/۷۴
تری‌گلیسرید (mg/dL)	۸۶۰/۶۶ ± ۲۴/۱۰	۸۹۳/۳۳ ± ۷۱	۸۲۳/۸۳ ± ۳۸/۸۲	۷۵۰/۵ ± ۲۳/۷۶	۸۲۸/۸۳ ± ۵۳/۸۹
AST (U/L)	۱۶۲/۵ ± ۱۰/۹۳	۱۶۱ ± ۱۲/۷۳	۱۴۴/۸۳ ± ۷/۲۴	۱۴۵/۶۶ ± ۱۰	۱۵۹/۵ ± ۸/۸۰
ALT (U/L)	۵/۵ ± ۰/۶۷	۵/۱۶ ± ۱/۰۴	۵/۳۳ ±۱/۰۲	۳/۶۶ ± ۰/۴۲	۳/۸۳ ± ۰/۷۰
ALP (U/L)	۶۴۱/۱۶ ± ۸۵/۸۰	۶۰۰/۳۳ ± ۱۰۲/۱۸	۵۷۷/۸۳ ± ۵۵/۲۴	۵۵۲/۸۳ ± ۷۷/۶۰	۵۱۴/۳۳ ± ۱۹/۶۶

-حروف انگلیسی غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنادار بین تیمارهای مختلف است ($P<0/05$).

جدول ۳- شاخص های ایمنی بچه تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*) تغذیه شده با سطوح مختلف اسید مالیک پس از ۸ هفته غذادهی (n =۱۲؛ میانگین ± خطای استاندارد)

شاخص های ایمنی	سطوح مختلف اسید مالیک جیره (گرم/کیلوگرم)				
	صفر	۲/۵	۵	۷/۵	۱۰
گلبول های سفید ($/mm^3$)	۵۴۸۳/۳۳ ± ۴۵۸	۵۳۳۳/۳۳ ± ۳۸۷	۵۱۶۶/۶۶ ± ۳۸۴	۴۹۱۶/۶۶ ± ۹۴	۵۲۰۰ ± ۲۴۳
لنفوسیت (٪)	۷۴ ± ۲/۲۶	۷۳ ± ۱/۴۶	۷۳/۸۳ ± ۱/۱۰	۷۶ ± ۱/۶۷	۷۴/۸۳ ± ۱/۵۷
نوتوفیل (٪)	۲۱/۳۳ ± ۱/۷۲	۲۱/۵ ± ۰/۹۵	۲۱ ± ۰/۸۵	۱۹/۱۶ ± ۱/۴۴	۲۰/۱۶ ± ۱/۱۹
مونوسیت (٪)	۴/۵ ± ۰/۵۶	۴/۸۳ ± ۰/۴۷	۴/۵ ± ۰/۴۲	۴ ± ۰/۳۶	۴/۵ ± ۰/۴۲
ائوزینوفیل (٪)	۰/۱۶ ± ۰/۱۶	۰/۶۶ ± ۰/۴۲	۰/۶۶ ± ۰/۳۳	۰/۸۳ ± ۰/۱۶	۰/۵۰ ± ۰/۲۲
لایزوزیم (u/mL/min)	۲۷/۳۳ ± ۱/۶۸ ^{ab}	۳۰ ± ۳/۱۴ ^{a}	۲۴ ± ۰/۹ ^{ab}	۲۹/۳۳ ± ۲/۳۴ ^{a}	۲۲/۳۳ ± ۱/۲۰ ^{b}
IgM (mg/dL)	۳۳/۵ ± ۰/۸۸	۳۹/۱۶ ± ۲/۹۴	۳۸/۶۶ ± ۱/۵۸	۳۳/۸۳ ± ۰/۶۰	۳۴/۶۶ ± ۲/۱۳
ایمنوگلوبولین کل (mg/mL)	۱۴/۸۶ ± ۰/۲۰ ^{b}	۲۰/۶۸ ± ۲/۵۰ ^{a}	۲۰ ± ۱/۱۹ ^{ab}	۱۵/۴۳ ± ۰/۹۴ ^{ab}	۱۷/۸۵ ± ۲/۴۲ ^{ab}

-حروف انگلیسی غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنادار بین تیمارهای مختلف است (P<۰/۰۵).

۴،۳. شاخص‌های ایمنی

نتایج اندازه‌گیری شاخص‌های ایمنی نشان داد افزودن سطوح مختلف اسید مالیک در جیره غذایی بچه تاسماهیان سیبری سبب اختلاف معنی‌داری در اکثر شاخص‌های ایمنی مورد بررسی نشد و تنها در میزان لایزوزیم و ایمنوگلوبولین کل اختلاف معنی‌دار دیده شد. بیش‌ترین میزان لایزوزیم و ایمنوگلوبولین کل در تیمار ۲/۵ گرم در کیلوگرم اسید مالیک دیده شد که اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد داشتند (P<۰/۰۵). در تعداد گلبول‌های سفید و درصد افتراقی این گلبول‌ها اختلاف معنی‌داری بین تیمارها دیده نشد (P>۰/۰۵). بیش‌ترین مقدار IgM در تیمار ۲/۵ گرم در کیلوگرم اسید مالیک مشاهده شد اما اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نداشت (جدول ۳؛ P>۰/۰۵).

۴. بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن سطوح مختلف اسید مالیک اثرات مثبت یا منفی بر عملکرد رشد و ضریب کارایی غذایی نداشت. عدم تاثیر اسید مالیک بر عملکرد رشد تاسماهی سیبری همسو با مطالعات مشابه در برخی گونه‌های دیگر است. تأثیر غیر معنی‌دار مکمل اسیدهای آلی (اسید فرمیک، اسید سیتریک، اسید مالیک، اسید ارتوفسفریک، اسید لاکتیک و اسید تارتاریک) بر عملکرد رشد هیبرید تیلاپیای قرمز (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*) (Ng *et al*., 2009)، مکمل اسیدهای آلی (اسید فرمیک، اسید سیتریک، اسید مالیک، اسید ارتوفسفریک، اسید لاکتیک و اسید تارتاریک) بر قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (Soleymani *et al*., 2005)، مکمل اسیدی فایر بایوترونیک بر ماهی اسکار تایگر (*Astronotus ocellatus*) (حدیدی و همکاران، ۲۰۱۶)، مخلوط چند اسید آلی بر میگوی ببری (*Penaeus monodon*) (Ng *et al*., 2015)، کلسیم فسفات بر قزل آلای رنگین کمان (Pandey and Satoh, 2009)، سدیم بوتیرات بر گربه ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) و مخلوط چند اسید آلی بر

کفشک زیتونی (*Paralichthys olivaceus*) (Katya *et al*., 2018) گزارش شده است. از طرفی، گزارشاتی نیز وجود دارد که نشان می‌دهند اسید لاکتیک و اسید پروپیونیک بر ماهی چار قطبی (*Salvelinus alpinus*)، اسید سیتریک و اسید لاکتیک بر قزل آلای رنگین کمان (Ringo *et al*., 1994)، اسید سیتریک در فیل ماهیان جوان (*Huso huso*) (Sudagar *et al*., 2010; Khajepour and Hosseini, 2012)، مکمل اسیدی فایر (اسید سیتریک، اسید لاکتیک و اسید استیک) بر قزل آلای رنگین کمان (Mortazavi Tabrizi *et al*., 2012) و اشکال مختلف پتاسیم بر ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) (Ramli *et al*., 2005) سبب بهبود عملکرد رشد شده‌اند. این محققین دلایل مختلفی از قبیل نقش اسیدهای آلی در کاهش بار میکروبی مضر غذای مصرفی، بهبود فرآیند هضم غذا، کاهش pH معده و عملکرد بهتر پپسین، کاهش باکتری‌های مضر روده از طریق کاهش pH و متعادل سازی فلور میکروبی روده (Luckstadt, 2008) برای افزایش کارایی رشد و تغذیه با استفاده از اسیدهای آلی عنوان کرده‌اند. همچنین، انرژی اسیدهای آلی می‌تواند به طور کامل در متابولیسم مورد مصرف قرار گرفته و سلول های اپیتلیال روده قادرند از این اسیدها به عنوان منابع انرژی استفاده کنند. از این طریق اسیدهای آلی باعث رشد بیش‌تر سلول‌های انتروسیت روده می گردند (Topping and Clifon, 2001) و با افزایش اندازه ریز پرزهای روده و افزایش سطح جذب، کارایی غذایی بیش‌تر می شود. به نظر می‌رسد علت اختلاف در نتایج به عواملی همچون گونه ماهیان، اندازه و سن ماهیان، نوع و سطوح اسیدهای آلی و نمک‌هایشان و یا ترکیب آن‌ها مربوط است. همچنین، ترکیبات جیره‌های آزمایشی، ظرفیت بافری مواد تشکیل دهنده جیره، مدیریت پرورش و تغذیه و کیفیت آب از دیگر عوامل موثر در کسب نتایج متفاوت می‌باشند (Lim *et al*., 2010). اعتقاد بر این است که تاثیر نهایی اسیدهای آلی وابسته به عوامل مختلف زیستی و غیر زیستی است (Ng *et al*., 2015). مشاهدات مطالعه حاضر در عملکرد رشد تاسماهی سیبری نیز می‌تواند تحت تاثیر این عوامل قرار گرفته باشد.

شاخص‌های خونی ماهیان به عوامل مختلفی از قبیل گونه، اندازه، سن، وضعیت فیزیولوژیک، شرایط محیطی، رژیم غذایی (کمیت و کیفیت غذا، مواد تشکیل دهنده جیره، منابع پروتئینی، ویتامین‌ها و محرک‌های رشد) بستگی دارند (Lim *et al*., 2010). آنالیز داده‌های مربوط به پارامترهای خون-شناسی در این مطالعه نشان داد که با افزودن سطوح مختلف اسید مالیک به غذا تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها دیده نمی‌شود. تعداد گلبول های قرمز در تیمارهای آزمایشی افزایش غیر معناداری نسبت به گروه شاهد داشت. این افزایش می‌تواند ناشی از اثر اسید مالیک بر محیط روده‌ای باشد، چرا که اسیدهای آلی و نمک‌های آن اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه (C1-C7) می‌باشند (Ng *et al*., 2015). تحقیقات انجام شده مشخص کرده است که ورود اسیدهای چرب کوتاه زنجیره به روده سبب افزایش جریان خون می‌شود (Cherbut *et al*., 1997)، اما این تاثیر بر تاسماهی سیبری در مطالعه حاضر مشاهده نشد. این نتایج همسو با مطالعات صورت گرفته توسط سلیمانی و همکاران (Soleymani *et al*., 2011; Acrami *et al*., 2007)، بر قزل آلای رنگین کمان، حدیدی و همکاران (Hadidi *et al*., 2017) روی بچه ماهیان اسکار و تایگر و حسینی فر و همکاران (Tiger; Hoseinifar *et al*., 2011) روی فیل ماهیان جوان است. میزان هموگلوبین و هماتوکریت تابعی از تغییرات گلبول قرمز است (Tiger ; Hoseinifar *et al*., 2011) و رابطه مستقیم با آن دارد (Klontz, 1994)، به نظر می‌رسد که در مطالعه حاضر سطوح مختلف اسید مالیک تأثیر منفی بر تولید گلبول‌های قرمز نداشته است. عدم تغییر

معنادار در مقادیر هموگلوبین و هماتوکریت می‌تواند نشان دهنده این باشد که تغییری در عملکرد متابولیک و نیاز اکسیژنی ماهیان رخ نداده است. شاخص MCV با وجود عدم اختلاف معنی‌دار یک روند افزایشی در بین تیمارهای ۲/۵، ۵ و ۱۰ گرم در کیلوگرم اسید مالیک نسبت به گروه شاهد را نشان داد. در مطالعه کنونی، شاخص‌های خونی شامل MCH و MCHC اختلاف معناداری بین تیمارها نشان نداد. این امر را می‌توان به عدم تغییر معنادار در مقادیر گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین نسبت داد.

بر اساس نتایج این مطالعه، اختلاف معنی‌داری در میزان گلوکز، پروتئین کل و گلوبولین بین تیمارها وجود داشت. در سایر شاخص ها شامل آلبومین، کلسترول، تری گلیسرید، AST، ALT و ALP اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد.

میزان گلوکز به‌عنوان شاخصی برای شرایط تغذیه‌ای و استرس در نظر گرفته می‌شود (Apun-Molina *et al*., 2015). بر اساس نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر، میزان گلوکز در تیمارهای مختلف با هم تفاوت معنی‌دار داشت. تاکنون مطالعه‌ای درباره اثر اسید مالیک بر میزان گلوکز موجودات آبزی صورت نگرفته است، اما Yamashita و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که استفاده از استات موجب کاهش گلوکز موجود در خون موش شد. همچنین استفاده خوراکی از سرکه سیب (به میزان ۰/۱۶ و ۱/۶ درصد) به مدت ۲۱ روز درکاهش سطح گلوکز خون موش‌های آلوده به بیماری دیابت نقش موثری داشت و موجب هایپرگلیسمیا شد (Iman *et al*., 2015). در میان پروتئین سرم، آلبومین و گلوبولین پروتئین‌های اصلی هستند که نقش مهمی در پاسخ ایمنی دارند. افزایش سطح پروتئین سرم، آلبومین و گلوبولین با افزایش پاسخ ایمنی ماهی ارتباط دارد (Wiegertjes *et al*., 1996). در مطالعه حاضر میزان پروتئین کل و گلوبولین در تیمار ۷/۵ گرم در کیلوگرم اسید مالیک نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت. مشابه این نتایج، در تحقیق Mohammadi Saei و همکاران (۲۰۱۶) که سطوح مختلف اسید آلی BioAcid Ultra را روی بچه ماهیان انگشت قد قزل آلای رنگین کمان بررسی کردند گزارش شده است. از طرفی، در مطالعه‌ای که روی فیل ماهیان صورت گرفته بود مشخص شد که گلوکز و پروتئین کل سرم تحت تاثیر اسید سیتریک قرار نگرفتند و بیان کردند اسیدی شدن باعث ایجاد تنش متابولیک نمی‌شود (Khajepour *et al*., 2011). همچنین، Baruah و همکاران (۲۰۰۹) افزایش قابل توجه پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین در بچه ماهیان روهو (*Labeo rohita*) که با ۳درصد اسید سیتریک و ۵۰۰ واحد در کیلوگرم فیتاز تغذیه شده بودند را گزارش نموده اند. دلیل مشخصی درباره اثر اسید مالیک روی پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین تاسماهی سیبری یا گونه‌های دیگر ماهیان وجود ندارد. با توجه به کاهش مصرف غذا در تیمار ۷/۵ گرم در کیلوگرم جیره می‌توان چنین بیان کرد که ماهی از ذخایر پروتئینی خود استفاده کرده و در نتیجه باعث کاهش میزان پروتئین خون شده است (Hagimoradi *et al*., 2008) . آنزیم‌های ALT، ALP و AST شاخص مهمی برای سلامت و عملکرد کبد هستند که از طریق عملکرد انتقال گروه آلفا-آمینو اسیدها به آلفا-کتواسیدها کنترل می‌شوند (Kumar *et al*., 2011).

Bitiren و همکاران (۲۰۰۴) بیان کردند که افزایش معنادار در فعالیت آنزیم‌های ALP، AST و ALT سرم به‌عنوان پاسخ اندام‌ها به عوامل استرس‌زا در نظر گرفته می‌شود. افزایش غلظت آنزیم‌های کبدی ناشی از ضایعات و آسیب‌هایی است که به این بافت وارد شده و یا همچنین می‌تواند در اثر توکسین-های تولیدی باکتری‌های مضر دستگاه گوارش ایجاد گردد. با کاهش pH توسط اسیدهای آلی در دستگاه گوارش، شرایط برای فعالیت باکتری‌های مضر کاهش

یافته و در نتیجه آسیب‌هایی که توسط این میکروارگانیسم‌ها و توکسین‌های حاصل از آن‌ها ایجاد می‌شود کاهش پیدا می‌یابد و سبب می‌شود تا میزان غلظت آنزیم‌های کبدی کاهش یابد (عابدینی و همکاران، ۱۳۹۰؛ Nourmohammadi *et al.*, 2013). داده‌های مطالعه حاضر نشان داد که رژیم غذایی حاوی اسید مالیک تاثیری بر ALP، AST و ALT بچه تاسماهیان سیبری ندارد. بنابراین می‌توان بیان نمود که ماهی می‌تواند اسید مالیک با سطوح ذکر شده در این مطالعه را بدون هیچ عارضه‌ای مورد مصرف قرار دهد. این نتایج با یافته‌های El-Kerdway (1996) همسو است. همچنین Mohammadi Saei و همکاران (۲۰۱۶) بیان کردند که افزودن سطوح ۰/۱ و ۰/۲ درصد اسید آلی (BioAcid Ultra) تاثیر معناداری بر فعالیت آنزیم-های کبدی در بچه ماهیان انگشت قد قزل آلای رنگین کمان نداشته است.

اسیدهای آلی و نمک‌های آن طی فرآیند تخمیر میکروبی تولید شده و بیشتر برای محافظت و نگهداری مواد غذایی استفاده می‌شوند. اسیدهای آلی با حفظ pH مناسب دستگاه گوارش سبب بهبود آنزیم‌ها بر مواد غذایی و فراهم شدن غذای بیش‌تر برای حیوانات پرورشی می‌شوند که نتیجه آن کاهش مواد غذایی جذب نشده برای رشد باکتری‌ها است (Eidelsburger, 1998). مطالعات انجام شده در تعداد گلبول‌های سفید نقش مهمی در فعالیت‌های فاگوسیتی و پاسخ ایمنی به مبارزات باکتریایی، ویروسی و انگلی دارد (Harikrishnan *et al.*, 2012; Aathi *et al.*, 2013). در تحقیق حاضر مشاهده شد که افزودن اسید مالیک با سطوح ذکر شده در تیمارهای آزمایشی در تعداد تعداد گلبول-های سفید و درصد افتراقی اختلاف معناداری نداشته است. همانند این نتایج، Mohammdi Saei و همکاران (۲۰۱۶) با افزودن ۰/۱ و ۰/۲ درصد اسید آلی BioAcid Ultra در جیره غذای بچه ماهیان انگشت قد قزل آلای رنگین کمان به دست آوردند. حدیدی و همکاران (Hadidi *et al.*, 2017) نیز در مطالعه‌ای روی ماهی اسکار تایگر بیان کردند که تعداد گلبول‌های سفید در گروه‌های تغذیه شده با مکمل اسیدی فایر بایوترونیک افزایشی را نسبت به گروه شاهد داشتند، لیکن این افزایش معنادار نبوده است. از طرفی سلیمانی ایرایی و همکاران (Soleymani Iraei *et al.*, 2012)، پی بردند که سطح ۰/۱ مکمل اسیدهای آلی شامل اسید فرمیک، اسید سیتریک، اسید مالیک، اسید ارتدرصدوقسفریک، اسید لاکتیک و اسید تارتاریک تعداد گلبول‌های سفید در بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان را به‌طور معناداری ارتقاء داده است. دلیل مغایرت در نتایج به دست آمده در این زمینه را می‌توان به نوع اسید آلی، مدت زمان استفاده از آن و همچنین گونه مورد مطالعه نسبت داد (Lim *et al.*, 2010).

در مطالعه حاضر مقدار لایزوزیم در تیمارهای حاوی اسید مالیک نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت. با توجه به نقش اسیدهای آلی در کاهش pH، می‌توان اظهار کرد که اسید مالیک از این طریق بر میزان و نیز قدرت ضد باکتریایی لایزوزیم بافت‌های مختلف تأثیر گذاشته و سبب افزایش لایزوزیم در تیمارهای حاوی اسید مالیک نسبت به تیمار شاهد (فاقد اسید مالیک) شد. در همین رابطه، حدیدی و همکاران (۱۳۹۱) افزایش غیر معناداری را در مقدار لایزوزیم بچه ماهیان اسکار تایگر تغذیه شده با سطوح مختلف اسیدی فایر بایوترونیک درمقایسه با تیمار شاهد مشاهده کردند. با توجه به افزایش میزان لایزوزیم در تیمارهای آزمایشی، به‌نظر می‌رسد اسید مالیک توانسته است در این خصوص اثر مثبتی بر بچه تاسماهیان سیبری داشته باشد. این مسأله بیانگر اثر مثبت این ماده غذایی بر سیستمایمنی غیر اختصاصی ماهی است که بسیار قابل توجه است و نیاز به توجه بیش‌تر در مطالعات تکمیلی آتی دارد.

بررسی حاضر نشان داد که میزان

ایمنوگلوبولین در بدن ماهی‌های تغذیه شده با سطوح مختلف اسید مالیک در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت. افزایش ایمنوگلوبولین کل احتمالا موید افزایش ایمنی غیر اختصاصی در ماهی تغذیه شده با اسید مالیک می‌باشد. اگرچه اظهار نظر قطعی در این زمینه نیازمند مطالعات بیش‌تری روی سایر گونه ماهیان است. نتایج شاخص های خون‌شناسی در این مطالعه نشان داد که افزودن اسید مالیک به غذای تاسماهی سیبری تأثیر منفی بر پارامترهای خونی و برخی پارامترهای بیوشیمیایی بچه تاسماهی سیبری ندارد. نتایج مربوط به پارامترهای ایمنی نشان داد که افزودن اسید مالیک سبب بهبود برخی پارامترهای ایمنی بچه تاسماهیان سیبری شده است. استفاده از انواع متنوع اسیدی فایرها یا طیف وسیعی از انواع اسیدهای آلی به منظور ارتقای شاخص‌های رشد و تغذیه نیاز به مطالعات بیشتری روی گونه‌های مختلف ماهیان دارد تا بتوان نتایج ضد و نقیض بیان شده را تفسیر نمود. با این حال، اختلاف موجود در نتایج تحقیقات مختلف را می‌توان به نوع گونه آبزی، اندازه، سن، طول دوره پرورش، شرایط محیطی، رفتارهای تغذیه‌ای، خصوصیات فیزیولوژیک گونه، نوع مواد اولیه به‌کار رفته در جیرع غذایی، کمیت و کیفیت آن‌ها، نوع اسیدی‌فایر، ترکیب انواع اسیدهای آلی و میزان سطح مورد استفاده ربط داد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری بی دریغ دوستان گرامی، آقایان دکتر راهداری، مهندس مکنت‌خواه، مهندس رازگردانی و تمامی کارکنان مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان دریایی شادروان دکتر یوسف-پور کمال تشکر را داریم.

۵. منابع

References

Aathi, K., Ramasubramanian, V., Uthayakumar, V., Munirasu, S., 2013. Effect of chitosan supplemented diet on survival, growth, hematological, biochemical and immunological responses if indian major carp *Labeo rohita*. *International Research Journal of Pharmacy* 4, 141-147.

Abediny, M., Shariatmadari, F., Karimi, M.A., 2011. Effect of medicinal plants, organic acid and antibiotic in barley diet on growth performance, immune response, blood factors and intestinal morphology of broiler chickens. *Journal of Animal Production* 13, 19-27.

Akrami, R., Ghelichi, A., Manuchehri, H., 2011. Effect of dietary inulin as prebiotic on growth performance and survival of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Marine Science and Technology Research* 3, 1-9.

Amar, E.C. 2000. Effects of ß-carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fisheries Science*, 66, 1068-1075.

Apun-Molina, J.P., Santamaria-Miranda, A., Luna-Gonzalez, A., Ibarra-Gamez, J.C., Medina-Alcanter, V., Racotta, I.S., 2015. Growth and metabolic responses of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* and Nile tilapia *Oreochromis niloticus* in polyculture fed with potential probiotic microorganisms on different schedules. *Latin American Journal of Aquatic Research* 43, 435-445.

Baruah, K., Pal, A.K., Sahu, N.P., Debnath, D., Yengokpam, S., Norouzitallab, P., Sorgeloos, P., 2009. Dietary crude protein, citric acid and microbial parameters of Rohu, *Labei rohita* juveniles. *Journal of the Word Aquaculture Society* 40, 824-831.

Bitiren, M., Karak, A.Z., Zerin, M., Aksoy, N., Musa, D., 2004. Effects of selenium on histopathological and enzymatic changes in experimental live injury of rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 56, 59-64.

Bronzi, P., Rosenthal, H., Arlati, G., Williot, P. 1999. A brief overview on the status and prospects of sturgeon farming in Western and Central Europe. *Journal of Applied Ichthyology* 15, 224-227.

Campbell, T. W., 2015. Exotic Animal Hematology and Cytology. John Wiley and Sons, USA, 424 p.

Ceylan, N., Ciftci, I. 2002. The effects of some alternative feed additives for antibiotic promoters on the performance and gut microflora of broiler chicks. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 27, 727-733.

Cherbut, C., Aube, A., Blottiere, H., Galmiche, J., 1997. Effect of short-chain fatty acids on gastrointestinal motility. *Scandinavian Journal of Gastroenterology Supplement* 222, 58-61.

Cletron, P., Troutaud, D.,Verlhac, V., Gabaudan, J., Deschaux, P., 2001. Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and head kindey leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 11, 1-13.

El-Kerdawy, D.M.A., 1996. Acidified feed for growing rabbits. *Egyptian Journal of Rabbit Science* 6, 143-156.

Falahatkar, B. 2014. Feeding and Feed Formulation in Aquatic Organism. Institute of Technical and Vocational Higher

Education, Tehran, 323 p.
Falahatkar, B., 2018. Nutritional requirements of the Siberian sturgeon: An updated synthesis. In: The Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869). Williot, P., Nonnotte, G., Vizziano-Cantonnet, D., Chebanov, M. (Eds.) *Biology. Springer, Cham*. 1, 207-228.
Hadidi, S., Taati, R., 2016. Effect of different levels of dietary Biotronic^{TM} as acidifier supplement of feed efficiency and some hematological and immune parameters of tiger Oscar (*Astronotus ocellatus*). *Iranian Journal of Veterinary Medicine* 12, 32-41.
Hajimoradi, M., Mahboubi, N.A., Alameh, S.K.A.D., 2008. Effects of starvation on plasma levels of cholesterol, glucose and protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Marine Science and Technology* 6, 3-4.
Harikrishnan, R., Kim, J., Balasundram, C., Heo, M., 2012. Immunomodulatory effects of chitin and chitosan enriched diets in *Epinephelus brineus* against *Vibrio alginolyticus* infection. *Aquaculture* 326, 46-52.
Hassan, M.S., Soltan, M.A., Jarmolowicz, S., Abdo, H.S., 2017. Combined effects of dietary malic acid and *Bacillus subtilis* on growth, gut microbiota and blood parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus). Aquaculture Nutrition* 24, 83-93.
Houston, A., 1990. Blood and circulation. In: Schreck, C.B., Moyle, P.B. (Eds.). Methods in Fish Biology. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland 335 p.
Iman, M., Moallem, S.A., Barahoyee, A., 2015. Effect of apple cider vinegar on blood glucose level in diebetic mice. *Pharmaceutical Sciences*, 20, 163-168.
Katya, K., Park, G., Bharadwaj, A., Browdy, C.L., Vazquez-Anon, M., Bai, S.C., 2018. Organic acids blend as a dietary antibiotic replacer in marine fish Olive floundere, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Research* 49, 2861-2868.
Khajepour, F., Hosseini, S.A., Hosseini, S.M., 2011. Study on some hematological and biochemical parameters of juvenile beluga (*Huso huso*) fed citric acid supplemented diet *Global Veterinaria*, 7, 361-364.
Khajepour, F., Hosseini, S.A., 2012. Citric acid improves growth performance and phosphorus digestibility in Beluga (*Huso huso*) fed diets where soybean meal partly replaced fish meal. *Animal Feed Science and Technology* 171, 68-73.
Khajepour, F., Hosseini, S.A., 2012. Calcium and phosphorus status in juvenile Beluga (*Huso huso*) fed citric acid-supplemented diets. *Aquaculture Research* 43, 407-411.
Kirchgessner, M., Roth, F.X. 1985. Organic acids as a feed additive in pig nutrition. *Pig News and Information. Nutrition Reviews* 43, 253-254.
Klontz, G. W., 1994. Fish Hematology. In: Techniques in Fish Immunology, Stolen, J. S., Flecher, A. F., Rowely, T. C., Zelikoff, S. L. and Smith, S. A. (Eds.). Vol. 2, SOS Publications, USA, 121-132.
Kotzamanis, Y.P., Gisber, E., Gatesoup, F.J., Zambonino Infant, J., Cahu, C., 2007. Effect of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzyme, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrachus labrax*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 147, 205-214.
Kumar, V.H., Makker, P.S., Devappa, R.K., Becke, K., 2011. Isolation of phytate from Jatropha curcaskernel meal and effects of isolated phytate on growth, digestive physiology and metabolic changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Food and Chemical Toxicology*, 49 2144-2156.
Lim, C., Klesius, P.H., Luckstadt, C., 2010. Effects of dietary levels of potassium diformate on growth, feed utilization and resistance to Streptococcus iniae of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Proceedings of the fourteenth International Symposium on Fish Nutrition and Feeding; 31 May-Jun, Qingdao, China, 320 p.
Luckstadt, C., 2008. The use of acidifiers in fish nutrition. Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, *Nutrition and Natural Resources* 3, 1-8.
Magnadottir, B., 2016. Innate immunity of fish. *Fish & Shellfish Immunology* 20, 137-151.
Mohammadi Saei, M., Beiranvand, K., Mansouri Taee, H., Nekoubin, H. 2016. Effects of different levels of BioAcid Ultra on growth performance, survival, hematological and biochemical parameters of fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research & Development* 7, 1-5.
Morris, M., Davey, F., 2001. Basic examination of blood. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* 20, 479-519.
Mortazavi Tabrizi, J., Barzeghar, A., Farzampour, S., Mirzaii, H., Safarmashaei, S., 2012. Study of the effect of prebiotic (*Saccharomyces cerevisiae*) and acidifier on growth parameters in grower's rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Annals of Biological Research* 3, 2053-2057.
Ng, W.K., Koh, C.B., Teoh, C.Y., Romano, N., 2015. Farm-raised tiger shrimp, *Penaeus monodon*, fed commercial feeds with added organic acids showed enhanced nutrient utilization, immune response and resistance to *Vibrio harveyi* challenge. *Aquaculture* 449, 69-77.
Nourmohammadi, R., Hosseini, S.M., Farhangfar, H., 2013. Effect of citric acid and microbial phytase on serum enzyme activities and plasma minerals retention in broiler chicks. *African Journal of Biotechnology* 10, 13640-13650.
Pandey, A., Satoh, S. 2008. Effects of organic acids and phosphorus utilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss. Fisheries Science* 74, 867-874.
Ramli, N., Hindl, U., Sunato, S., 2005. Effect of potassium diformate on growth performance of tilapia challenged with *Vibrio anguillarum*. World Aquaculture, Bali, Indonesia.
Řehulka, J., Adamec, V., 2004. Red blood cell indices for Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared in cage and raceway culture. *Acta Veterinaria Brno* 73, 105-114.
Ringo, E., Olsen, E.R., Castell, J.D., 1994. Effect of dietary lactate on growth and chemical composition of Arctic charr *Salvelinus alpinus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 25, 483-486.

Soleymani Iraei, M., Sajjadi, M.m., Keramat Amirkolaei, A., Farahi, A., Karimzade, S., 2012. Effects of different levels of organic acids om growth performance, body composition and hematological parameters of rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics* 1, 1-14.

Sudagar, M., Hosseinpoor, Z., 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.

Siwicki, A.K., Anderson, D.P., 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Pathology* 41, 125-139.

Thomas, L., 1998. Clinical laboratory Diagnostics. 1st ed. Frankfort: TH-Books Verlagsgesellschaft, 131-137.

Topping, D.L., Clifon, P.M. 2001. Short chain fatty acids and human colonic function. roles of resistant starch and non-starch polysaccharides. *Physiological Reviews* 81, 1031-1064.

Wiegertjes, G.F., Stet, R.J.M., Parmentier, H.K., Muiswinkle, W.B., 1996. Immunogenetic and disease resistance in fish: a comparative approach. *Developmental and Comparative Immunology* 20, 365-381.

Williot, P., Arlati, G., Chebanov, M., Gulyas, T., Kasimov, R., Kirschbaum, F., Patriche, N., Pavlovskaya, L. P., Poliakova, L. and Pourkazemi, M., 2002. Status and management of Eurasian sturgeon: An overview. *International Reviews of Hydrobiology* 87, 483-506.

Yamamoto, T., Akiyama, T., 1995. Effect of carboxymethylcellulos, alpha starch, and wheat gluten incorporated in diets as binders on growth, feed efficiency and digestive enzyme activity of fingerling Japanese flounder. *Fisheries Science* 61, 309-313.

Yamashita, H., Fujisawa, K., Ito, E., Idei, S., Kawaguchi, N., Kimoto, M., Heimori, M., Tsuji, H., 2007. Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate in type 2 diabetic otsuka long-evans Tokushima fatty (OLETF) rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 71, 1236-1243.

Yammamoto, T., Yonemasu, K., 1999. Multiple molecular forms of serum immunoglobulin M in a patient with Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clinica Chimica Acta* 289, 173-176.