

Research Article

Comparative effect of butyric acid alone and with endogenous quorum quencher bacteria on biochemical parameters of *Acanthopagrus arabicus*Simak Salehipour Bavarsad¹, Takavar Mohammadian^{2,3*}, Preeta Kochanian¹, Vahid Yavari¹, Mansour Torfi mozan zadeh⁴¹ Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran² Department of Livestock, Poultry and Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran³ Member of Excellence Center of Warm Water Fish Health, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran⁴ Aquaculture Research Center-South of Iran, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Ahvaz, Iran Iran

Key Words

Probiotics
Quorum quencher bacteria
Butyric acid
Acanthopagrus arabicus
Biochemical parameters

Abstract

Introduction: Considering the significance of *Acanthopagrus arabicus* in Iran, characterized by its carnivorous nature and robust digestive system adapted for high-protein diets, there culture a necessity for the use of dietary supplements such as acidifier probiotics. This study was undertaken to investigate the impact of administering quorum quencher probiotics independently and in conjunction with the acidifier butyric acid on the alterations in biochemical parameters in *A. arabicus*.**Materials & Methods:** A total of 360 fish fry, with an average weight of 15 ± 3.2 gr, were randomly assigned to eight experimental treatments, each repeated three times. Over a period of 60 days, all fish groups were fed with the experimental diet. The treatments included: 1. Treatment A: Food with 0.5% butyric acid per Kg. 2. Treatment B: *Bacillus cereus* with quorum quenching properties (cfu g-1 10^8) per kg of ration. 3. Treatment C: *B. thuringiensis* with quorum quenching properties (10^8 cfu g-1) per Kg of diet (B). 4. Treatment D: *B. cereus* and *B. thuringiensis* with quorum quenching properties (10^8 cfu g-1) per Kg of diet (C). 5. Treatment E: *B. cereus* with quorum quenching property (10^8 cfu g-1) along with 0.5% butyric acid per Kg of food. 6. Treatment F: *B. thuringiensis* with quorum quenching properties (10^8 cfu g-1) along with 0.5% butyric acid per Kg of food. 7. Treatment G: *B. cereus* and *B. thuringiensis* with quorum quenching properties (10^8 cfu g-1) along with 0.5% butyric acid per Kg of food. 8. Control Treatment H: Food without acidifying probiotics. The control group received daily commercial food with 42% protein, including 100% fish meal.**Results:** The consumption of diets containing a combination of B1 and B2 probiotics with butyric acid (Treatment G) and the group fed with the combination of probiotic B1 with butyric acid (Treatment F) resulted in a significant increase in glucose, triglyceride, cholesterol, and creatine phosphokinase in fish serum. Additionally, protein levels in fish serum increased, particularly in treatments containing *Bacillus* B1, *Bacillus* B2, and butyric acid alone, and the combination of both probiotics (Treatment D) compared to the control group. A substantial increase in albumin was observed in groups containing the combination of B1 and B2 bacilli along with butyric acid (Treatment D) and groups B and E. Moreover, the calcium content in the blood serum of fish fed with probiotic compound B2 (Treatment C) was higher than other treatments, especially the control group (H).**Conclusion:** In summary, the combination of probiotics with butyric acid, along with the combination of B1 and B2 probiotics, has led to significant improvements in glucose, protein, albumin, cholesterol, triglyceride, calcium, and creatine phosphokinase enzyme activity.

Article info

* Corresponding Author's email:
t.mohammadian@scu.ac.ir

Received: 22 October 2024

Reviewed: 23 November 2024

Revised: 26 January 2025

Accepted: 27 February 2025

مقاله علمی - پژوهشی

اثر مقایسه‌ای بوتیریک اسید به تنهای و همراه با باکتری‌های کووروم کوئینچر درون‌زاد بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی ماهی شانک زرد باله

سیامک صالحی پور باور صاد^۱، تکاور محمدیان^{۲*}، پریتا کوچنین^۱، وحید یآوری^۱، منصور طرفی موزان زاده^۴

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

^۲ گروه بهداشت دام، طیور و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۳ عضو قطب بهداشت و بیماری‌های ماهیان گرمابی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۴ پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران

چکیده

کلمات کلیدی

مقدمه: با توجه به اهمیت ماهی شانک زرد باله در ایران و این مهم که این ماهی گوشت خوار، دستگاه گوارش قوی و متناسب با غذایی با پروتئین بالا است، نیاز استفاده از مکمل غذایی مانند اسیدیفایر پروبیوتیک‌ها حس می‌شود. این مطالعه با هدف تعیین اثر تجویز پروبیوتیک‌های کووروم کوئینچر به تنهایی و در ترکیب با اسیدیفایر بوتیریک اسید بر تغییرات فراسنجه‌های بیوشیمیایی در بچه ماهیان شانک زرد باله (*Acanthopagrus arabicus*) انجام شد.

مواد و روش‌ها: ۳۶۰ بچه ماهی شانک زرد باله با وزن $105 \pm 3/2$ گرم به طور تصادفی در ۸ تیمار آزمایشی قرار گرفتند. هر تیمار ۳ بار تکرار شد. تمام گروه‌ها به مدت ۶۰ روز با جیره آزمایشی تغذیه شدند. جیره‌های آزمایشی برای هر تیمار به شرح زیر بود: تیمار اول تغذیه شده با خوراک حاوی ۰/۵ درصد اسیدبوتیریک در کیلو گرم جیره (A). تیمار دوم: تغذیه شده *Bacillus cereus* واجد خاصیت کوئوروم کوئینچینگ به میزان 10^8 cfu g⁻¹ در کیلو گرم جیره (B). تیمار سوم: تغذیه شده *B. thuringiensis* واجد خاصیت کوئوروم کوئینچینگ به میزان 10^8 cfu g⁻¹ در کیلو گرم جیره (C). تیمار چهارم: تغذیه شده با *Bacillus cereus* و *B. thuringiensis* به میزان 10^8 cfu g⁻¹ در کیلو گرم جیره (D). تیمار پنجم: تغذیه شده *Bacillus cereus* به میزان 10^8 cfu g⁻¹ به همراه ۰/۵ درصد اسیدبوتیریک در کیلو گرم جیره (E). تیمار ششم: تغذیه شده *B. thuringiensis* به میزان 10^8 cfu g⁻¹ به همراه ۰/۵ درصد اسیدبوتیریک در کیلو گرم جیره (F). تیمار هفتم: تغذیه شده *Bacillus cereus* و *B. thuringiensis* به میزان 10^8 cfu g⁻¹ به همراه ۰/۵ درصد اسیدبوتیریک در کیلو گرم جیره (G). تیمار هشتم: تغذیه شده با جیره فاقد اسیدیفایر و پروبیوتیک (H). گروه شاهد به غذای تجاری روزانه حاوی ۴۲ درصد پروتئین، شامل ۱۰۰ درصد پودر ماهی تغذیه شدند.

نتایج: در این تحقیق، مصرف جیره حاوی ترکیب پروبیوتیک‌های B1 و B2 به همراه بوتیریک اسید (تیمار G) و گروه تغذیه شده به ترکیب پروبیوتیک B1 به همراه بوتیریک اسید (تیمار F) باعث افزایش معنی دار گلوکز، تری گلیسرید، کلسترول و کراتین فسفو کیناز در سرم ماهیان شده است. هم چنین، مقدار پروتئین در سرم ماهیان افزایش یافته، به ویژه در تیمارهای حاوی باسیلوس B1، باسیلوس B2 و بوتیریک اسید به تنهایی و ترکیب هر دو پروبیوتیک (تیمار D) نسبت به گروه شاهد. افزایش معنی دار آلبومین در گروه‌های حاوی ترکیب باسیلوس‌های B1 و B2 به همراه بوتیریک اسید (تیمار D) و گروه‌های B و E نیز مشاهده شده است ($P \leq 0/05$). هم چنین، میزان کلسیم در سرم خون ماهیان تغذیه شده با ترکیب پروبیوتیک B2 (تیمار C) نسبت به سایر تیمارها، به ویژه گروه شاهد (تیمار H)، بیش تر بوده است.

بحث و نتیجه گیری: به طور کلی، ترکیب پروبیوتیک‌ها با بوتیریک اسید و ترکیب پروبیوتیک‌های B1 و B2 بهبودهای قابل توجهی در شاخص‌های گلوکز، پروتئین، آلبومین، کلسترول، تری گلیسرید، کلسیم و فعالیت آنزیم کراتین فسفو کیناز ایجاد کرده است.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول:

t.mohammadian@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱ آبان ۱۴۰۳

تاریخ داوری: ۳ آذر ۱۴۰۳

تاریخ اصلاح: ۷ بهمن ۱۴۰۳

تاریخ پذیرش: ۹ اسفند ۱۴۰۳

مقدمه

پرورش آبزیان به عنوان یکی از فعالیت های مهم تولیدی در بسیاری از کشورهای جهان محسوب می شود. چراکه با توجه به افزایش روز افزون جمعیت جهان، این صنعت سهم به سزایی در تامین نیازهای غذایی مردم را به عهده دارد. در این ارتباط کمبود منابع آب شیرین سبب شده که پرورش ماهیان دریایی به یکی از شاخه های بسیار مهم و در حال گسترش در صنعت آبزی پروری تبدیل شود. در سال ۲۰۲۰ تولید جهانی کل آبزیان ۱۷۸ میلیون تن بود که نسبت به سال ۲۰۱۸ کاهش جزئی یافت، از این مقدار تولید در سال ۲۰۲۰ مقدار ۸۸ میلیون تن معادل ۴۹ درصد مربوط به آبزی پروری است که ۳۳/۶ میلیون تن مربوط به پرورش آبزیان دریایی و ۵۴/۷۸ میلیون تن مربوط به پرورش آبزیان در آب های سرزمینی است (۲۷). ماهی شانک زردباله (*Acanthopargus arabicus*) یک گونه دریایی می باشد که دارای اهمیت اقتصادی بالا و از بازارپسندی خوبی برخوردار است. این گونه از خانواده شانک ماهیان، با نام انگلیسی Yellowfin seabream می باشد (۶۰). این ماهی گونه ای ساحلی که در آب های کم عمق سکونت می کند، هم از لحاظ صیادی و هم آبزی پروری بسیار اهمیت بالایی دارد، پراکنش این گونه در آسیای شرقی، چین، تایوان، ژاپن و خلیج فارس است. این گونه به دلیل بومی بودن و مهم تر از آن دارا بودن کیفیت گوشت آن، تمایل به پرورش این ماهی از برنامه های مهم سازمان شیلات ایران است اما این ماهی دارای اندیس های پایین رشدی در مقایسه با سایر رقبا (باس دریایی آسیایی و صیبتی) است. لذا استفاده از مکمل های رشدی می تواند در بالا بردن عملکرد رشدی این ماهی در محیط های پرورشی راهگشا باشد. یکی از اهداف مهم پرورش آبزیان، کاهش ضریب تبدیل غذایی و بهبود کیفیت غذا، تقویت بنیه دفاعی و افزایش رشد آبزیان است. رشد شامل تغییر فزاینده در اندازه، وزن و یا تغییر در محتوای انرژی بدن ماهی است و مهم ترین هدف آبزی پروری محسوب می شود. رشد در بسیاری از جنبه های اساسی نظیر زیست شناسی ماهیان، مدیریت و حفاظت ذخایر ماهیان دخیل است. استفاده از مواد ضد عفونی کننده و ضد میکروبی موفقیت کمی در جلوگیری یا معالجه بیماری های آبزیان داشته است. علاوه بر این نگرانی درباره رشد ماهیان در زمان استفاده از آنتی بیوتیک ها وجود دارد. هم چنین استفاده زیاد از آنتی بیوتیک ها موجب ظهور مقاومت باکتریایی و مقاومت ژنی باکتری ها در برابر آنتی بیوتیک ها و ایجاد مقاومت دارویی در ماهیان می شود (۲۸). استفاده از اسیدهای آلی به عنوان محرک رشد اخیراً مورد توجه قرار گرفته است. اسیدهای آلی ترکیباتی هستند که به طور گسترده در گیاهان و حیوانات وجود داشته و طی فرآیند تخمیر میکروبی تولید می شوند. اسیدهای آلی با حفظ pH مناسب دستگاه

گوارش سبب بهبود اثر آنزیم ها بر مواد غذایی و فراهم شدن مواد غذایی بیش تری برای حیوانات پرورشی می شوند که نتیجه آن کاهش مواد غذایی جذب نشده برای رشد باکتری ها است (۵۷). با توجه به محدودیت سطوح مستعد پرورش و هزینه های بالای تهیه خوراک، بی تردید جهت بهبود عملکرد ماهیان پرورشی، استفاده از محرک های رشد در جیره بسیار راهگشا می باشد. با توجه به این که یکی از اهداف آبزی پروری، کاهش ضریب تبدیل غذایی و استفاده از غذاهایی با کیفیت بالا و قیمت مناسب است، استفاده از محرک های رشد هم چون پروبیوتیک ها، آنتی بیوتیک ها و اسیدهای آلی و غیره به طور چشمگیری افزایش یافته است. استفاده از داروهای پادزیست مانند آنتی بیوتیک ها مشکلات زیادی از جمله مقاوم شدن عوامل بیماری زا، مسائل زیست محیطی و غیره را به دنبال دارد (۴۱). اسیدهای آلی ترکیباتی هستند که بین ۱ تا ۷ اتم کربن دارند و به طور گسترده در گیاهان و حیوانات وجود دارند. اسید بوتیریک با فرمول $C_4H_8O_2$ به عنوان یک اسید چرب کوتاه زنجیره با کاربرد فراوان در صنایع شیمیایی، مواد غذایی و دارویی، در حال حاضر عمدتاً از طریق اکسایش سنتز بوتیرالدهید از پروپیلن تولید می شود (۴۰، ۴۵، ۶۳). در شرایط بی هوازی، اسید بوتیریک یک متابولیت رایج است که توسط باکتری هایی از گونه *Clostridium* مانند: *C. thermobutyricum*، *C. populeti*، *C. butyricum* و *Clostridium tyrobutyricum* که یک باکتری شناخته شده با خصوصیات گرم مثبت، اسپوردار و بی هوازی اجباری است و از مؤثرترین میکروارگانیسم ها برای تولید صنعتی اسید بوتیریک از کربوهیدرات های مختلف می باشد (۴۳، ۴۵). مزایای اقتصادی این افزودنی ها کاهش هزینه خوراک و کاهش طول دوره پرورش و سن عرضه به بازار است. هم چنین مشخص شده است که آنیون های اسیدی با عناصر کلسیم، فسفر، منیزیم و روی ترکیب شده و باعث افزایش قابلیت جذب این عناصر می گردند (۱۷). طی دوره تغذیه فشرده، مانند زمانی که ماهیان در سنین پایین تری می باشند یا زمانی که غذا دارای سطح پروتئینی زیادی است، غلظت اسید هیدروکلریک در معده کاهش می یابد. این کاهش تاثیر منفی بر فعالیت پپسین و آنزیم های ترشحی پانکراس دارد و باعث اختلال در هضم غذا می شود. اضافه کردن اسیدی فایر در غذا این مشکل را بهبود بخشیده و با فعال سازی آنزیم های پروتئولیتیک، به هضم غذا کمک می کند. از سویی دیگر مقدار جذب مواد مغذی مانند کلسیم و هم چنین انرژی را افزایش داده و باعث شلاته شدن مواد معدنی و در نتیجه افزایش جذب کلسیم، فسفر و ویتامین ها می شوند. مطالعات متعددی نشان داده اند که استفاده از مکمل های اسیدی فایری می توانند باعث بهبود فاکتورهای سلامت در ماهیان دریایی شوند (۴، ۱۰، ۳۹، ۵۴). تغییرات در آب استخرهای پرورشی و افزایش متابولیت هایی هم چون نیترات و مواد آلی نیز

با ویژگی‌های پروبیوتیکی عملکرد بهتری دارند. هم چنین مطالعات نشان می‌دهند که پروبیوتیک‌های مستخرج از لوله گوارش میزبان، مقاومت بیش‌تری نسبت به تغییرات اسیدیته در لوله گوارش در مقایسه با پروبیوتیک‌های تجاری دارند (۶، ۵۵). به دلیل کمبود اطلاعات موجود در خصوص تأثیرات به تنهایی و یا ترکیب اسیدبوتریک و پروبیوتیک‌های جدا شده از آبزیان در تغذیه ماهی و با توجه به اهمیت پرورش ماهیان دریایی در ایران و جهان، این مطالعه به بررسی تغییرات فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم ماهی شانک زرد باله تحت تأثیر این مکمل‌ها جهت بهبود سلامت این ماهیان پرداخته است.

مواد و روش‌ها

تهیه باکتری‌های باسیلوسی با توان پروبیوتیکی: باکتری‌های با توان پروبیوتیکی مورد استفاده در این تحقیق، شامل باکتری‌های باسیلوس گونه‌های *Bacillus cereus* و *B. thuringiensis* واجد خاصیت کوئوروم کوئچینگ می‌باشد که در مطالعات پیشین، توسط Mohammadian و همکاران، از ماهی باس دریایی آسیایی جداسازی شده بود (۴۷).

شرایط نگهداری: تعداد ۳۶۰ قطعه ماهی شانک زرد باله با وزن متوسط حدود ۱۵ گرم از مرکز تکثیر ماهیان دریایی واقع در استان بوشهر تهیه و پس از سازگاری در کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان دریایی در شهر بندر امام خمینی برای این آزمایشات مورد استفاده قرار گرفتند. پس از همدما سازی با آب سالن در تانک ۴۰۰۰ لیتری قرار گرفتند. ماهیان به‌طور تصادفی به ۸ گروه تقسیم شدند و پس از معاینات بالینی و اطمینان از سلامت آن‌ها به مدت ۲ هفته قبل از شروع آزمایش جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاهی و محیط پرورشی نگه‌داری شدند و در طول این مدت غذایی با جیره غذایی گروه شاهد انجام شد. برای گروه‌ها شرایط کنترل شده آزمایشگاهی به صورت یکسان مهیا شد. در این مدت بچه ماهیان به وسیله غذای کنسانتره (پلت خشک) مخصوص سی‌باس (ساخته شده توسط شرکت تعاونی تولیدی بیضاء استان فارس) در سه مرحله و در ساعت‌های ۸، ۱۴ و ۱۹ تا حد سیری و متناسب با درجه حرارت تغذیه شدند. دمای ثابت آب 26 ± 2 درجه سانتی‌گراد همراه با تهویه مناسب و $8-8/4$ pH به مدت ۶۳ روز نگه‌داری شدند و فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب برای تمامی گروه‌ها یکسان بود. در طول مدت نگه‌داری و آزمایش، آب مخزن‌ها به میزان ۲۰ درصد حجم آب هر دو روز یک بار از ناحیه کف آکواریوم سیفون و تعویض می‌شد تا مواد دفعی آن‌ها خارج شود (۱۷). جهت اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب از دستگاه کالریمتر هک (مدل ۸۹، شرکت هک، آمریکا) و pH متر (مدل ۷۸۱، شرکت متروهم، سوئیس) استفاده شد.

می‌تواند تأثیر منفی بر شرایط محیطی استخرهای پرورش ماهی داشته باشد. در نتیجه چنین تغییراتی کاهش عملکرد و افزایش تلفات در فارم‌های آبزیان مشاهده می‌شود. پروبیوتیک‌ها مکمل‌هایی بدون هیچ گونه عارضه جانبی برای پیشگیری از چنین مشکلاتی هستند که تأثیراتشان به کرات در آبزیان ثابت شده است. پروبیوتیک‌های واجد پتانسیل کوئوروم کوئچینگ، باید دارای یک استراتژی دوگانه منحصر به فرد برای کنترل عوامل بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و هم چنین حمایت میزبان در جهت مثبت شود (۱۲). در زمینه رقابت برای چسبیدن به محل‌های اتصال، باید بیان داشت که حضور پروبیوتیک در مخاط روده می‌تواند تأثیر منفی بر روی اتصال سایر باکتری‌ها از قبیل باکتری‌های بیماری‌زا شود. این رقابت می‌تواند به صورت رقابت برای تصاحب مکان، دسترسی به منابع انرژی بیش‌تر و یا ترکیبی از هر دو باشد (۸). مولکول‌های سیگنال اصلی مورد استفاده توسط باکتری‌های گرم منفی آسپیل هموسرین لاکتون‌ها (AHLs) هستند و با توجه به نقش این سیگنال‌ها در تنظیم بیان حدت، مهار سیستم درک حد نصاب به عنوان یک استراتژی جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها در کنترل عفونت‌های میکروبی (و هم چنین عفونت‌های میکروبی مقاوم به آنتی‌بیوتیک) بدون ممانعت از رشد آن‌ها در آبی‌پروری مطرح شده است (۱۵، ۲۰، ۲۱). هم چنین با توجه به این که مهار سیستم درک حد نصاب موجب فشار انتخابی نمی‌شود، مقاومت عوامل بیماری‌زا به این سیستم نامحتمل است (۲۱). برخی از باکتری‌ها توانایی استفاده از مولکول‌های AHL را به عنوان منبع کربن و نیتروژن دارا هستند و می‌توانند به عنوان مهارکننده عملکردهای تنظیمی سیستم درک حد نصاب در باکتری‌های بیماری‌زا به کار روند (۵۹). آنالیز مکانیسم‌های تولیدکننده و تخریب‌کننده AHLs در فلور میکروبی روده به نحوه عفونت ماهی توسط عوامل بیماری‌زا و شناخت ارتباط بین باکتری‌های روده کمک می‌کند (۴۸). با توجه به استفاده روزافزون گونه‌های پروبیوتیکی و با توجه به این که مهار مولکول‌های حد نصاب مانند لاکتون‌های N-آسپیل هموسرین که توسط باکتری‌های گرم منفی تولید می‌شود، موجب محافظت آبزیان از عفونت می‌شود، گونه‌های مهارکننده سیستم درک حد نصاب دارای توان پروبیوتیکی می‌توانند به عنوان سویه‌های جدید کنترل زیستی در آبی‌پروری محسوب شوند. فاکتورهای بیوشیمیایی خون به عنوان اولین تغییرات قابل اندازه‌گیری می‌توانند اطلاعات زیادی در رابطه با وضعیت سلامت آبزیان، اثر مواد سمی، ارزیابی اثرات مواد مغذی و مکمل‌های تغذیه‌ای و دارویی در اختیار محققین قرار دهند. به طور سنتی تحقیقات آبی‌پروری بر روی پروبیوتیک‌های (به خصوص لاکتوباسیل‌ها و گونه‌های مختلف باسیلوس‌ها) مستخرج از منابع غیر آبی نظیر شیر و پنیر صورت گرفته است، اما اخیراً مطالعات پیشنهاد نموده‌اند استفاده از باکتری‌های موجود در بدن خود میزبان

تیمارهای غذایی برای گروه‌های مختلف از لحاظ میزان پروتئین و انرژی یکسان بودند (میانگین پروتئین خام 42 ± 2 درصد) و بر اساس نیازمندی ماهی گوشت خوار دریایی در محدوده وزنی حاضر اندازه‌گیری شد.

نمونه برداری: به منظور ارزیابی اثر اسیدبوتریک و پروبیوتیک‌های درون زاد به تنهایی و در ترکیب با هم، در ۶۰ روز پس از تغذیه با جیره‌های آزمایشی از هر تیمار ۹ قطعه ماهی (۳ قطعه ماهی از هر تکرار) خونگیری و جداسازی سرم صورت گرفت. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی خون: اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی سرم با استفاده از کیت‌های تهیه شده از شرکت پارس آزمون و با دستگاه اتوالایزر بیوشیمیایی مدل BT-۱۵۰۰ (ساخت ایتالیا) صورت گرفت.

گلوکز: اندازه‌گیری گلوکز پلاسما براساس روش آنزیمی گلوکز اکسیداز با کیت پارس آزمون صورت گرفت. در این روش، گلوکز موجود در نمونه پلاسما توسط آنزیم اختصاصی گلوکز اکسیداز به گلوکونیک اسید و آب اکسیژنه تبدیل می‌شود. آب اکسیژنه نیز به‌روش تریندر سنجش می‌شود. در واکنش تریندر، آب اکسیژنه با یک فنل و آمینو آنتی پیرن (AAP) و در حضور آنزیم پراکسیداز تشکیل محصول قرمز رنگی به نام کینونیمین می‌دهد که در طول موج ۵۱۰ نانومتر رنگ سنجی شده و برحسب میزان جذب نوری OD و سطح گلوکز استاندارد و بر اساس فرمول ارائه شده در کاتالوگ محاسبه گردید.

کلسترول: کلسترول براساس روش آنزیمی CHO-PAP صورت گرفت. در این روش، ابتدا استرهای کلسترول توسط آنزیم کلسترول استراز به کلسترول آزاد هیدرولیز می‌شوند. سپس کلسترول در حضور اکسیژن مولکولی اکسید و آب اکسیژنه تولید می‌گردد. سپس آب اکسیژنه به روش تریندر سنجش می‌شود. در واکنش تریندر، آب اکسیژنه با یک فنل و آمینوآنتی پیرن (AAP) و در حضور آنزیم پراکسیداز تشکیل محصول قرمز رنگی به نام کینونیمین می‌دهد که در طول موج ۵۱۰ نانومتر رنگ سنجی و برحسب میزان جذب نوری OD و سطح کلسترول استاندارد و براساس فرمول ارائه شده در کاتالوگ کیت پارس آزمون محاسبه شد.

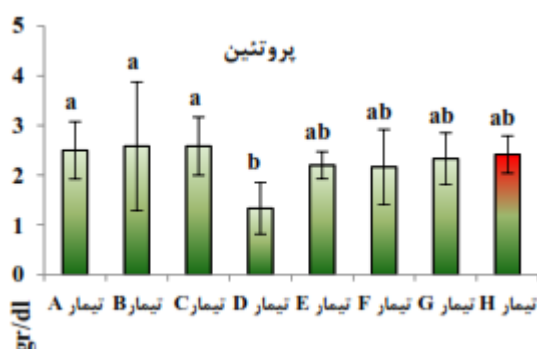
کلسیم: کلسیم به روش مستقیم کلریمتریک با ارتوکروزل فتالین اندازه‌گیری شد. اساس این روش به این صورت است که یون کلسیم در محیط قلیایی، با ارتوکروزل فتالین، کمپلکس ارغوانی رنگ ایجاد می‌کند که شدت آن متناسب با مقدار کلسیم است.

اندازه‌گیری پروتئین تام و آلبومین پلاسما: غلظت ایموگلوبولین کل براساس روش شرح داده شده توسط Nayak و همکاران، اندازه‌گیری شد (۳۸). به‌طور خلاصه ابتدا پروتئین تام و آلبومین پلاسما با استفاده

گروه‌های مورد مطالعه: بچه‌ماهی‌ها به‌صورت کاملاً تصادفی به ۸ تیمار در سه تکرار به‌طور جداگانه تقسیم، به‌طوری که هر تکرار شامل ۱۵ قطعه بچه‌ماهی شانک زرد باله با وزن $15 \pm 3/2$ گرم باشد. تیمار اول: تغذیه شده با خوراک حاوی ۰/۵ درصد اسید بوتیریک در کیلوگرم خوراک (A). تیمار دوم: تغذیه شده *Bacillus cereus* واجد خاصیت کوئوروم کوئنچینگ به‌میزان 10^8 cfu g^{-1} در کیلوگرم جیره (Probiotic). تیمار سوم: تغذیه شده *B. thuringiensis* واجد خاصیت کوئوروم کوئنچینگ به‌میزان 10^8 cfu g^{-1} در کیلوگرم جیره (C). تیمار چهارم: تغذیه شده *Bacillus cereus* و *B. thuringiensis* واجد خاصیت کوئوروم کوئنچینگ به‌میزان 10^8 cfu g^{-1} در کیلوگرم جیره (D). تیمار پنجم: تغذیه شده *Bacillus cereus* واجد خاصیت کوئوروم کوئنچینگ به‌میزان 10^8 cfu g^{-1} به‌همراه ۰/۵ درصد اسیدبوتیریک در کیلوگرم خوراک (E). تیمار ششم: تغذیه شده *B. thuringiensis* واجد خاصیت کوئوروم کوئنچینگ به‌میزان 10^8 cfu g^{-1} به‌همراه ۰/۵ درصد اسیدبوتیریک در کیلوگرم خوراک (F). تیمار هفتم: تغذیه شده *Bacillus cereus* و *B. thuringiensis* واجد خاصیت کوئوروم کوئنچینگ به‌میزان 10^8 cfu g^{-1} به‌همراه ۰/۵ درصد اسیدبوتیریک در کیلوگرم خوراک (G). تیمار هاشم: تغذیه شده با خوراک فاقد اسیدیفایر و پروبیوتیک (H). طول دوره تحقیق بدون احتساب دو هفته سازگاری، ۶۰ روز بود و در روزهای ۰ و پایان دوره آزمایش ماهی‌ها بیومتری شده و فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم‌ماهی در پایان آزمایش محاسبه گردید.

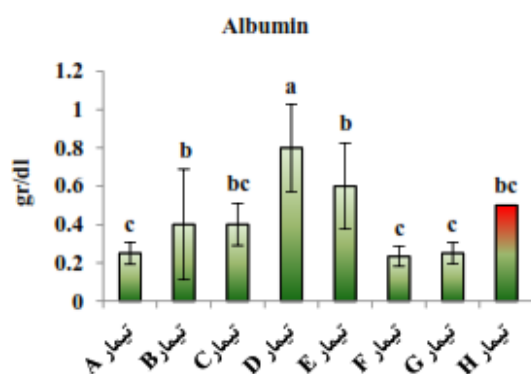
آماده‌سازی غذا: مواد خشک غذا با استاندارد یکی از کارخانجات غذاسازی و غلظت‌های مختلف باکتری و اسیدیفایر با نسبت‌های از پیش تعیین شده جهت گروه‌های آزمایشی مطابق با دستورالعمل استاندارد مخلوط شدند. به‌منظور ارزیابی اثر پروبیوتیک‌های انتخاب شده به تنهایی و همراه با اسیدبوتیریک بر تغییرات بیوشیمیایی ماهی شانک زرد باله، باکتری (های) منتخب به‌غذای ماهیان افزوده می‌شود. به‌طور خلاصه هر یک از باکتری‌ها با تلقیح سویه مورد نظر به محیط مایع MRS به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه انکوبه شده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ می‌شوند. پس از سانتریفوژ و جداسازی، باکتری‌ها دو بار با PBS استریل شستشو شدند و با استفاده از لوله‌های مک‌فارلند غلظت مناسب آن‌ها تنظیم گردید. جهت اطمینان از تعداد باکتری‌های زنده موجود در غذا، نمونه‌برداری و شمارش باکتریایی غذای حاصل انجام شد (۴۴). ضمناً مواد خشک غذا با نسبت از پیش تعیین شده اسیدیفایر و پروبیوتیک جهت گروه‌های آزمایشی مطابق با دستورالعمل استاندارد مخلوط شدند و تا زمان استفاده در یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری می‌شوند.

پروتئین: در شکل ۲ مقادیر پروتئین در سرم ماهیان تغذیه شده با غذای حاوی ترکیب باسیلوس B1 به تنهایی (تیمار C) و گروه باسیلوس B2 به تنهایی (تیمار B) و بوتیریک اسید به تنهایی (تیمار A) بیش‌تر از سایر تیمارهای غذایی به خصوص گروه کنترل (تیمار H) بوده است ($P \leq 0.05$). البته در تیمار تغذیه شده با ترکیب هر دو پروبیوتیک (تیمار D) نیز مقادیر پروتئین تا حدودی قابل توجه بوده است ($P \leq 0.05$).



شکل ۲: نمودار میزان فراسنجه پروتئین کل در تیمارهای مختلف شانک زرد باله

آلبومین: در شکل ۳ مقادیر آلبومین در سرم ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ترکیب باسیلوس‌های B1 و B2 (تیمار D) بیش‌تر از سایر تیمارهای غذایی به خصوص گروه کنترل (تیمار H) بوده است ($P \leq 0.05$). هم‌چنین در تیمارهای گروه ۲ (تیمار B) که جیره حاوی پروبیوتیک B2 به تنهایی و گروه ۶ (تیمار E) با جیره دارای پروبیوتیک B1 و بوتیریک اسید بوده نسبتاً میزان آلبومین بیش‌تر از سایر تیمارهای غذایی به خصوص گروه کنترل (تیمار H) بوده است ($P \leq 0.05$).



شکل ۳: نمودار میزان فراسنجه آلبومین کل در تیمارهای مختلف شانک زرد باله

کلسترول: در شکل ۴ میزان کلسترول در سرم ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ترکیب هر دو پروبیوتیک با اسیدبوتیریک (تیمار G) و گروه ترکیب پروبیوتیک B1 به همراه بوتیریک اسید (تیمار F)

از کیت شرکت پارس آزمون و دستگاه اتوآنالایزر مدل Eurolyser ساخت کشور اتریش اندازه‌گیری شد.

تری‌گلیسرید: اندازه‌گیری تری‌گلیسرید سرم با استفاده از کیت‌های تهیه شده از شرکت پارس آزمون و با دستگاه اتوآنالایزر بیوشیمیایی مدل BT-1500 (ساخت ایتالیا) صورت گرفت.

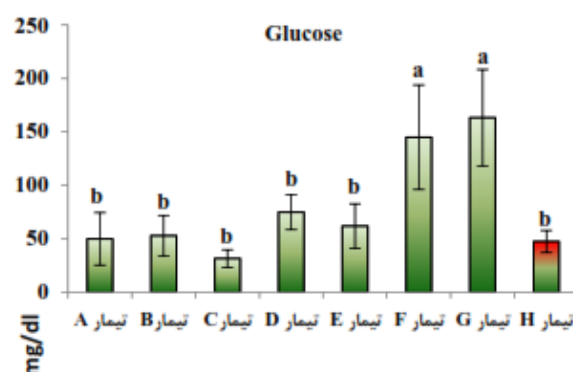
کراتین فسفوکیناز: اندازه‌گیری کراتین فسفوکیناز سرم با استفاده از کیت‌های تهیه شده از شرکت پارس آزمون و با دستگاه اتوآنالایزر بیوشیمیایی مدل BT-1500 (ساخت ایتالیا) صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری: برای انجام آنالیزهای آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل استفاده شد. قبل از انجام آزمون آنالیز واریانس، نرمال بودن داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک و یکنواختی واریانس با آزمون لون بررسی شد. برای آنالیز واریانس داده‌های نرمال از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) استفاده گردید. برای مقایسه میانگین تیمارهای مختلف از آزمون توکی استفاده شد. حداقل سطح معنی‌دار بودن آزمون‌ها $p \geq 0.05$ در نظر گرفته شد. تمام داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف از معیار گزارش شد و ارزیابی‌ها در ۳ تکرار صورت گرفت.

نتایج

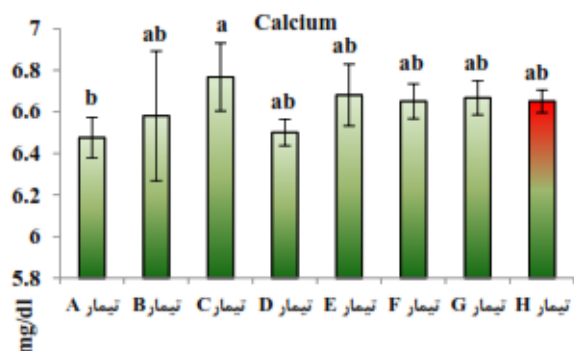
فاکتورهای بیوشیمیایی سرم

گلوکز: در شکل ۱ میزان گلوکز در سرم ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ترکیب هر دو پروبیوتیک B1 و B2 به همراه بوتیریک اسید (تیمار G) و هم‌چنین گروه تغذیه شده با غذای حاوی ترکیب پروبیوتیک B1 به همراه بوتیریک اسید (تیمار F) بیش‌ترین میزان را نسبت به سایر تیمارهای غذایی به خصوص گروه کنترل (تیمار H) داشته است ($P \leq 0.05$).

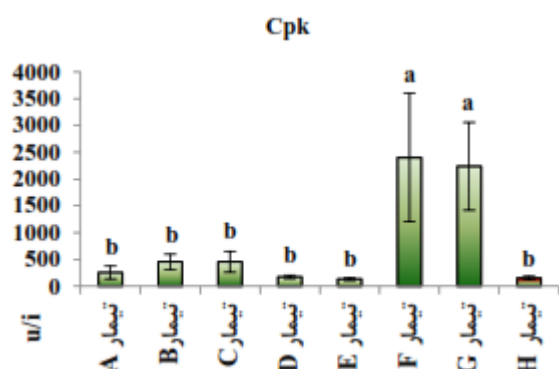


شکل ۱: نمودار میزان فراسنجه گلوکز در تیمارهای مختلف شانک زرد باله

شده با ترکیب پروبیوتیک‌های B1 و بوتیریک اسید (تیمار F) نسبت به سایر تیمارهای غذایی به خصوص گروه کنترل (تیمار H) بیش تر بوده است ($P \leq 0.05$).



شکل ۶: نمودار میزان فراسنجه کلسیم کل در تیمارهای مختلف شانک زرد باله

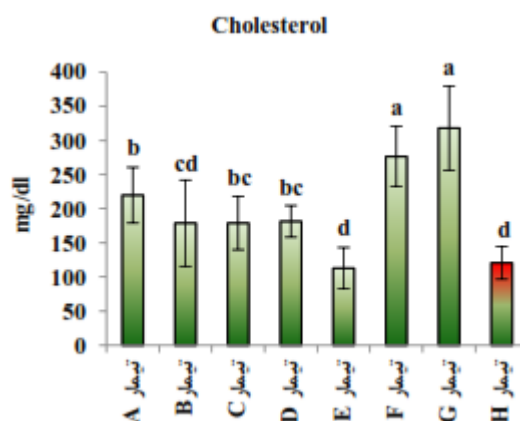


شکل ۷: نمودار میزان فراسنجه کراتین فسفوکیناز کل در تیمارهای مختلف شانک زرد باله

بحث

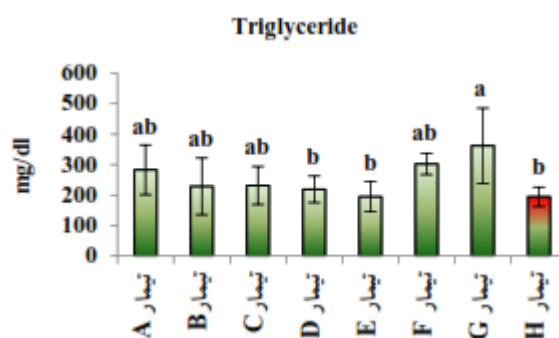
با توجه به اهمیت ماهیان دریایی در جهان، تولیدکنندگان خوراک‌های تجاری در تلاشند جیره غذایی اختصاصی برای این ماهیان پرورشی با اثر بخشی مثبت، بیابند. استفاده از افزودنی‌های طبیعی در خوراک مانند اسیدی‌فایرها یا سایر اسیدهای آلی و پروبیوتیک‌ها در این صنعت در حال افزایش است. ماهی شانک زرد باله گوشت‌خوار بوده و از جیره‌های غذایی با پروتئین بالا تغذیه می‌کند. با توجه به این که تمایل به تولید این ماهی در کشور زیاد است و با تولید داخلی آن از خروج ارز جلوگیری و به چرخه اقتصاد کمک می‌شود. تعیین سطح گلوکز سرم به طور کلی به عنوان پارامترهای قابل اعتماد در ارزیابی استرس ناشی از عوامل مختلف استرس‌زا عمل می‌کنند (۱۶). افزایش این پارامتر درخصوص مواجهه آبی با استرس‌های مختلف

بیش تر از سایر تیمارهای غذایی به خصوص گروه کنترل (تیمار H) بوده است ($P \leq 0.05$). البته در تیمار A که جیره آن‌ها حاوی ترکیب بوتیریک اسید به تنهایی بود مقادیر کلسترول تا حدودی نسبت به سایر گروه‌های به خصوص گروه کنترل (تیمار H) بیش تر بوده است ($P \leq 0.05$).



شکل ۴: نمودار میزان فراسنجه کلسترول کل در تیمارهای مختلف شانک زرد باله

تری گلیسرید: در شکل ۵ میزان تری گلیسرید در سرم ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ترکیب هر دو باسیلوس و بوتیریک اسید بود (تیمار G) بیش تر از سایر تیمارهای غذایی به خصوص گروه کنترل (تیمار H) بوده است ($P \leq 0.05$).



شکل ۵: نمودار میزان فراسنجه تری گلیسرید کل در تیمارهای مختلف شانک زرد باله

کلسیم: در شکل ۶ میزان کلسیم در سرم خون ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک B2 (تیمار C) بیش تر از سایر تیمارهای غذایی به خصوص گروه کنترل (تیمار H) بوده است ($P \leq 0.05$). کراتین فسفوکیناز (CPK): در شکل ۷ فعالیت آنزیم کراتین فسفو کیناز در سرم ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی گروه ترکیب پروبیوتیک‌ها B1 و B2 به همراه بوتیریک اسید (تیمار G) و همچنین تیمار تغذیه

از جمله دستکاری سخت (۱۳)، حمل و نقل بی احتیاطانه (۹)، تراکم جمعیت (۱۹)، کاهش اکسیژن (۵۰) و عفونت‌ها (۵۳) گزارش شده است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میزان گلوکز در تیمارهای ۶ و ۷ نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی‌داری داشتند. پاسخ ثانویه به استرس بر متابولیسم انرژی، تغییر در مقدار گلوکز و لاکتات است (۶۱). افزایش گلوکز خون در حیواناتی که در شرایط استرس قرار بگیرند، معمول است و یکی از اثرات اصلی ترشح کاتکولامین‌ها و هورمون‌های کورتیکواستروئیدی است. احتمالاً در تیمارهای تغذیه‌کننده با بوتریک اسید به همراه پروبیوتیک (تیمار ۶ و ۷) با کاهش فعالیت آنزیم گلوکز ۶-فسفاتاز در کبد، کاهش شکست گلیکوژن کبدی و سنتز گلوکز از پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه خارج کبدی مواجه شدیم. اما کاهش گلوکز خون در گروه شاهد و سایر تیمارها ممکن است نشان دهنده عدم اختلال متابولیسم کربوهیدرات به واسطه افزایش تجزیه گلیکوژن کبدی باشد که احتمالاً توسط هورمون‌های آدرنوکورتیکو تروپیک و گلوکاگون و کاهش فعالیت انسولین صورت می‌گیرد. با این حال با توجه به کمبود اطلاعات و تحقیقات کافی در زمینه اثرات نمک اسیدهای آلی بر فاکتورهای بیوشیمیایی خون مانند گلوکز تحقیقات بیشتری را در آینده می‌طلبد. برخلاف یافته‌های مطالعه حاضر Yilmaz و همکاران، افزایش معنی‌داری را در میزان گلوکز ماهیان تغذیه شده با اسید آلی به تنهایی نسبت به گروه شاهد مشاهده کردند (۶۶). دلیل این تفاوت را می‌توان آن به نوع اسید آلی، میزان غلظت استفاده شده و یا به تفاوت دستگاه گوارش ماهیان مورد بررسی، ارتباط داد. آنالیز بیوشیمیایی خون اطلاعات مهمی را در ارتباط با ارزیابی سلامت ماهی و مدیریت ماهیان پرورشی به ما می‌دهد. وضعیت تغذیه‌ای، استرس‌های محیطی، بیماری و حتی پاسخ‌های ایمنولوژیکی می‌تواند با اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی سرم مورد بررسی قرار گیرد (۳۴). هم‌سو با نتایج مطالعه حاضر Mohammadian و همکاران، با اضافه کردن پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پنتوسوس به جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بیان کردند که کاهش معنی‌داری در میزان گلوکز تیمار تغذیه شده با این پروبیوتیک مشاهده گردید، در حالی که تغذیه ماهیان با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلنتاروم باعث افزایش معنی‌دار گلوکز نسبت به سایر تیمارها شد (۴۷) که در تضاد با نتیجه مطالعه حاضر بود. این موضوع می‌تواند بیان‌کننده رابطه متقابل بین سویه‌های پروبیوتیکی با میزبان باشد. مطالعات متعددی بیان کردند که استفاده از پروبیوتیک‌ها به خصوص لاکتوباسیل‌ها و *Bifidobacterium* spp. سبب کاهش سطح گلوکز خون می‌شود (۷، ۱۸، ۲۳، ۲۹). هم چنین گزارش شده است که گلوکز خون ماهیان دارای تفاوت‌های زیادی بین گونه‌های مختلف و حتی بین افراد یک گونه است. کلاسترول مهم‌ترین استروئید موجود در بافت‌های حیوانی است. کلاسترولی که

همراه با مواد غذایی وارد بدن شود به سهولت جذب می‌شود و میزان کلاسترول جذب شده از طریق دستگاه گوارش ارتباط مستقیم با میزان کلاسترول غذای مصرفی دارد که البته این ارتباط گاهی مستقیم نمی‌باشد (۳). کلاسترولی که از اجزای تشکیل‌دهنده غشای سلولی، لایه بیرونی لیپوپروتئین پلاسما و پیش‌ماده ساخت هورمون‌های استروئیدی است که یا در سلول‌ها سنتز می‌شود و یا از طریق مواد غذایی جذب می‌گردد (۳۵). در مطالعه حاضر میزان کلاسترول در تیمار دارای مکمل اسیدیفایر به همراه ترکیب پروبیوتیک‌ها بیش‌ترین مقدار را دارا بود و تمام تیمارهای پروبیوتیک به تنهایی افزایش معنی‌داری با گروه کنترل نشان دادند. اما در تیمار ۶ نیز کاهش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها نشان داد. افزایش و کاهش کلاسترول خون در ماهی‌های تحت تیمار اسیدیفایر به همراه پروبیوتیک (۶، ۷) ممکن است مربوط به تأثیرات منفی یا مثبت پروبیوتیک‌های ضد درک حد نصاب بر سنتز، جذب و متابولیسم کلاسترول باشد. تأثیر عملکرد اسیدیفایرها ممکن است به صورت غیرمستقیم (افزایش باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک) بر فعالیت آنزیم HMG CoA ردوکتاز نسبت داده شود که نقش مهمی در بیوسنتز کلاسترول دارد که در این زمینه بایستی تحقیقات بیش‌تری صورت گیرد. وجود اسیدهای چرب کوتاه زنجیره حاصل از تخمیر کربوهیدرات‌ها نیز ممکن است متعاقباً موجب کاهش مقادیر سیستمیک لیپیدهای خونی از طریق مهار سنتز کلاسترول کبدی و یا انتشار مجدد کلاسترول از پلاسما به کبد گردد و در افزایش کلاسترول در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه کنترل، مؤثر باشد (۲۴، ۴۹). باکتری‌های پروبیوتیک به‌ویژه باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک می‌توانند در جذب مستقیم کلاسترول در روده از طریق عدم اتصال نمک‌های صفراوی دخالت کنند (۵۱). Mohammadian و همکاران، بیان کردند که افزودن پروبیوتیک به جیره غذایی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان سبب کاهش معنی‌دار این پارامتر در تیمارهای مختلف با گروه کنترل می‌شود (۴۷). برخلاف نتایج تحقیق حاضر، Ye و همکاران، با افزودن پروبیوتیک باسیلوس و پروبیوتیک مانان الیگوساکارید به جیره کفشک ماهی ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*)، مشاهده کردند که سطوح مختلف پروبیوتیک و پروبیوتیک تأثیری بر میزان کلاسترول ندارد اما سبب ایجاد اختلاف معنی‌دار در میزان تری‌گلیسیرید گردید (۶۵). پروتئین یکی از مهم‌ترین پارامترهای خون است که در شناخت مکانیسم بیولوژی و وضعیت سلامت ماهی تحت استرس‌های محیطی مفید است. بیش‌ترین ماده حل‌شده در پلاسما شامل آلبومین‌ها و گلوبولین‌ها (IgM) هستند. استفاده از گلوبولین، آلبومین و پروتئین کل در سرم خون ماهیان می‌تواند به عنوان شاخصی جهت ارزیابی پاسخ‌های ایمنی در ماهی و بررسی اختلال کبد و کلیه مورد استفاده قرار گیرد (۳۲). در پژوهش حاضر، ماهیان تغذیه شده با رژیم غذایی حاوی ۲

باکتری کوروم کوئنچر در ترکیب باهم (تیمار ۴)، دارای پایین ترین میزان پروتئین و بالاترین میزان آلبومین کل سرم نسبت به سایر تیمارها بود اما در ماهیان تغذیه شده با رژیم غذایی حاوی ۰/۵ درصد بوتریک اسید به تنهایی و در ترکیب با پروبیوتیک، آلبومین کل سرم پایین تری نسبت به سایر تیمارها داشته که با مقدار اندازه گیری شده پروتئین در سایر گروه ها نسبت عکس داشت. هم سو با نتایج مطالعه حاضر Wiegertjes و همکاران، بیان کردند که افزودن پروبیوتیک های لاکتوباسیلوس کازئی و بولگاریکوس سبب افزایش میزان پروتئین کل می شود (۶۴). در همین راستا، مشاهده شده است که مکمل های غذایی حاوی اسیدی فایری مختلف مانند اسید مالیک (۳۳) و سدیم دی فرمات (۶۲) پروتئین و آلبومین کل سرم را به ترتیب در ماهی تیلاپیا نیل و باس دریایی اروپایی افزایش داده است. برخلاف نتایج مطالعه حاضر، جیره های غذایی حاوی مکمل های سدیم دی فرمات، اسیدهای هیومیک یا سیتریک تأثیری بر پروتئین کل سرم، آلبومین و گلوبولین در ماهی قزل آلا رنگین کمان (۶۷)، ماهی کپور معمولی (۴۲) و کفشک ماهی (Turbot) (۱۷) نداشت. در مطالعه Mohammadian و همکاران (۴۷) و Saei و همکاران (۵۷) اثر باسیلوس های پروبیوتیکی و BioAcid Ultra بر روی بچه ماهی باس دریایی آسیایی و قزل آلا رنگین کمان را به ترتیب بررسی کردند که نتایج نشان داد که این پروبیوتیک ها و اسیدی فایر هیچ تأثیری بر پروتئین کل سرم، ندارند که احتمالاً دلیل این اختلاف را می توان به تفاوت پروبیوتیک و نحوه تجویز و نوع اسیدی فایر مورد بررسی نسبت داد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ماهیان تغذیه شده با جیره ۰/۵ درصد بوتریک اسید به تنهایی، غلظت سرمی کلسیم پایین تری نسبت به سایر تیمارها و گروه کنترل داشتند. اما در تیمارهای بوتریک اسید به همراه پروبیوتیک و پروبیوتیک به تنهایی (تیمار ۳) نسبت به تیمار بوتریک اسید به تنهایی (تیمار ۱) افزایش مقدار کلسیم پلاسما مشاهده شد. نتایج چندین مطالعه نشان داد که حلالیت و قابلیت هضم مواد معدنی با کاهش pH معده افزایش می یابد که این امر نیز باعث افزایش فعالیت آنزیم های گوارشی و اصلاح میکروفلور روده می شود (۲۵، ۲۷، ۵۸). ریزمغذی هایی نظیر کلسیم به عنوان کوفاکتور در ساختار برخی آنزیم ها و هم چنین در ساختار واحدهای ماکرومولکول ها و ترکیبات موجود در مایعات بدن استفاده می شوند. براساس مطالعه انجام شده توسط Ahire و همکاران بر روی جذب ریزمغذی ها در ماهی کاراس طلایی، استفاده از پروبیوتیک ها باعث افزایش جذب آن ها در روده می شود (۵). هم چنین پروبیوتیک ها باعث افزایش عمق کریپت ها در روده و هم چنین مستحکم تر شدن بافت پوششی روده می شوند، در نتیجه باعث افزایش جذب کلسیم می گردند. از سوی دیگر، پروبیوتیک ها باعث افزایش تولید ویتامین های B۱۲، B۶ و K۶ می شوند و به جذب املاح معدنی مانند آهن و کلسیم

کمک می کنند. در مطالعه حاضر در تیمار تغذیه شده پروبیوتیک باسیلوس سرئوس به تنهایی (تیمار ۳) بیش ترین مقدار کلسیم مشاهده شده که می تواند نشان گر تأثیر نوع پروبیوتیک بر مقدار کلسیم باشد. در مطالعه Mohammadian و همکاران، تأثیر مثبت تغذیه ماهی قزل آلا رنگین کمان با پروبیوتیک های درون زاد بر میزان کلسیم مشاهده شده است (۴۷) که در هم راستا با نتایج مطالعه حاضر بود. شاخص تری گلیسیرید جهت ارزیابی متابولیسم چربی در ماهیان استخوانی استفاده می شوند و میزان آن ها، سوخت و ساز در کبد را نشان می دهد. قسمت عمده ساخت تری گلیسیرید در کبد بوده و قسمت کمی از آن در سلول های بافت چربی انجام می شود. تری گلیسیرید در بدن عمدتاً انرژی فرآیندهای مختلف متابولیک را تأمین می کند. در مطالعه حاضر کم ترین میزان تری گلیسیرید در انتهای دوره در گروه کنترل مشاهده گردید و اختلاف معنی داری را با تیمار تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیک ها و بوتریک اسید نشان داد. Hosseini و همکاران، هیچ گونه اختلاف معنی داری را در سطح کلسترول و تری گلیسیرید مشاهده نکردند (۲) که در تضاد با نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر بود. Mohammadian و همکاران نیز بیان کردند که افزودن پروبیوتیک به جیره غذایی ماهیان قزل آلا رنگین کمان سبب کاهش معنی دار این پارامتر در تیمارهای مختلف با گروه کنترل می شود (۴۷). Ye و همکاران، با افزودن پروبیوتیک باسیلوس و پریوتیک مانان الیگوساکارید به جیره کفشک ماهی ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*)، مشاهده کردند که سطوح مختلف پروبیوتیک و پریوتیک سبب ایجاد اختلاف معنی دار در میزان تری گلیسیرید گردید (۶۵). Cpk اغلب به عنوان بیومارکر پراکسیداسیون پروتئین که به دلیل تعامل ROS با پروتئین ها است، شناخته می شود (۴۵) دنا توره شدن پروتئین ها و آنزیم های عملکردی می تواند بسیاری از فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژی سلولی را مختل کند. لذا استفاده از پروبیوتیک ها می تواند از اکسیداسیون لیپیدی به دلیل مواجهه با انواع استرس های محیطی و تغذیه ای جلوگیری کند. Jeon و همکاران، گزارش کردند که خواص آنتی اکسیدانی در صورت استفاده به صورت ترکیبی با سایر مواد مثل ویتامین ها کارآمدتر است و می تواند به طور مؤثر اکسیداسیون لیپید را به عنوان مانعی در برابر نفوذ اکسیژن کاهش دهد (۳۶). در ماهی کپور معمولی که با رژیم غذایی همراه با کیتوزان و ویتامین C تغذیه شده بود، افزایش اثربخشی سیستم دفاع آنتی اکسیدانی ماهیانی را که در معرض آب آلوده با کلرید کادمیوم قرار گرفتند با سنجش میزان آلانین آمینوترانسفراز، ALT، CPK و فعالیت کاتالاز گزارش کردند (۱۱) در تحقیق حاضر تمامی مقادیر محاسبه شده برای Cpk در تیمار ترکیب ۲ پروبیوتیک کوروم کوئنچر و بوتریک اسید (تیمار ۷) از مقدار محاسبه شده برای سایر گروه ها بیش تر بود. بنابراین می توان نتیجه گرفت که

- (*Carassius auratus*). Probiotics and antimicrobial proteins. 11(2): 559-568. doi: 10.1007/s12602.018.9428.5
6. **Ahmadifar, E., Moghadam, M.S., Dawood, M.A. and Hoseinifar, S.H., 2019.** *Lactobacillus fermentum* and/or ferulic acid improved the immune responses, antioxidative defence and resistance against *Aeromonas hydrophila* in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. Fish & shellfish immunology. 94: 916-923. doi: 10.1016/j.fsi.2019.10.019
7. **Al-Dohail, M.A., Hashim, R. and Aliyu-Paiko, M., 2011.** Evaluating the use of *Lactobacillus acidophilus* as a biocontrol agent against common pathogenic bacteria and the effects on the haematology parameters and histopathology in African catfish *Clarias gariepinus* juveniles. Aquaculture Research. 42(2): 196-209. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02606.x
8. **Ansari, R., Gul, B., Khan, D.J. and Weber, M.A., 2007.** Potential of halophytes as source of edible oil. Journal of Environment Environments. 68(2): 315-321. (In Persian)
9. **Barton, B.A., Schreck, C.B. and Barton, L.D., 1987.** Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. Diseases of aquatic organisms. 2(3): 173-185.
10. **Bhatt, S., Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L. and Hay, S.I., 2013.** The global distribution and burden of dengue. Nature. 496(7446): 504-507. doi: 10.1038/nature12060
11. **Banaee, M., Mehrpak, M., Hagi, B.B.N. and Noori, A., 2015.** Amelioration of cadmium-induced changes in biochemical parameters of the muscle of Common Carp (*Cyprinus carpio*) by Vitamin C and Chitosan. International Journal of Aquatic Biology. 3(6): 362-371.
12. **Boopathi, S., 2017.** Stigmatellin Y-An anti-biofilm compound from *Bacillus subtilis* BR4 possibly interferes in PQS-PqsR mediated quorum sensing system in *Pseudomonas aeruginosa*. Bioorganic & medicinal chemistry letters. 27(10): 2113-2118. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.03.074
13. **Carmichael, G.J., Wedemeyer, G.A., McCraren, J.P. and Millard, J.L., 1983.** Physiological effects of handling and hauling stress on smallmouth bass. The Progressive Fish-Culturist. 45(2): 110-113. https://doi.org/10.1577/1548-8659
14. **Cheng, P., Ji, B., Gao, L., Zhang, W., Wang, J. and Liu, T., 2013.** The growth, lipid and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* with attached cultivation. Bioresource technology. 138: 95-100. doi: 10.1016/j.biortech.2013.03.150
15. **Chu, W., Liu, Y., Hu, Y., Zhang, J., Zhong, L. and Chi, S., 2020.** Sodium butyrate supplementation in high soybean meal diets for juvenile rice field eel

استفاده از پروبیوتیک‌ها به همراه اسیدیفایر می‌تواند باعث افزایش مقدار Cpk شوند (۴۷). باتوجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که تغذیه با مخلوط پروبیوتیک‌ها و اسیدبوتریک نسبت به تغذیه با پروبیوتیک‌ها و اسید بوتریک به صورت مجزا تاثیر بهتری برروی عمده فاکتورهای بیوشیمیایی خون دارد و می‌توان با تجویز مخلوط اسیدی‌فایرو پروبیوتیک نسبت به ترکیب مجزای هرکدام از این‌ها، نتیجه بهتری را نیز کسب کرد.

تشکر و قدردانی

این کار با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز (شماره قرارداد پژوهانه: SCU.V1401.299) و قطب علمی ماهیان گرمابی، دانشگاه شهید چمران اهواز تأمین شد. نویسندگان این تحقیق از دستورالعمل‌های دانشگاهی تبعیت کردند و آزمایش‌ها بر اساس دستورالعمل اخلاقی حیوانات آزمایشگاهی انجام پذیرفت.

منابع

1. **Mohammadian, T., Momeni, H., Mesbah, M., Tabandeh, M.R. and Khosravi, M., 2020.** Effect of different levels of dietary acidifier "sodium diformate" on the innate immune system and expression of growth and immunological related genes in *Salmo trutta caspius*. Aquaculture Nutrition. 26(6): 2074-2085. https://doi.org/10.1111/anu.13148
2. **Hosseini, S.A., Alishahi, M., Rastiannasab, A., Salahi Ardakani, M.M. and Mohammadpour, M., 2023.** The effect of bivalent vaccine, streptococcus/yersiniosis on some of the blood and Immunologic factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Animal Environment. 15(1): 213-220. (In Persian) doi: 10.22034/AEJ.2021.268851.2451
3. **Alishahi, M., Gholami, S. and Feli, F., 2021.** Antiparasitic effects of *Lawsonia inermis*, *Satureja khuzestanica* and *Citrullus colocynthis* on fish parasite: *Ichthyophthirius multifiliis*. Journal of Animal Environment. 13(4): 185-192. (In Persian) doi: 10.22034/AEJ.2021.261673.2427
4. **Aalamifar, H., 2020.** Dietary butyric acid improved growth, digestive enzyme activities and humoral immune parameters in Barramundi (*Lates calcarifer*). Aquaculture Nutrition. 26(1): 156-164. https://doi.org/10.1111/anu.12977
5. **Ahire, J.J., Mokashe, N.U. and Chaudhari, B.L., 2019.** Effect of dietary probiotic *Lactobacillus helveticus* on growth performance, antioxidant levels, and absorption of essential trace elements in goldfish

- Cardiology. 91(4): 485-488. doi: 10.1016/s0002-9149(02)03256-3
25. **Edwards 3rd, H.M., Fernandez, S.R. and Baker, D.H., 1999.** Maintenance lysine requirement and efficiency of using lysine for accretion of whole-body lysine and protein in young chicks. *Poultry Science*. 78(10): 1412-1417. doi: 10.1093/ps/78.10.1412
 26. **El-Fattah, A., El-Sanhoury, S.A., El-Mednay, M.H. and Abdel-Azeem, N.M., 2008).** Thyroid activity, some blood constituents, organs morphology and performance of broiler chicks fed supplemental organic acids. *Int. J. Poult. Sci.* 7(3): 215-222. doi: 10.3923/ijps.2008.215.222
 27. **Boyd, C.E., Aaron, A., McNevin, K. and Robert, P.D., 2022.** The contribution of fisheries and aquaculture to the global protein supply. *Food security*. 14(3): 805-827. doi: 10.1007/s12571-021-01246-9
 28. **Tacon, A.G.J., 2006.** Use of fishery resources as feed inputs to aquaculture development: trends and policy implications. No. 1018. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
 29. **Falcinelli, S., Rodiles, A., Hatef, A., Picchietti, S., Cossignani, L., Merrifield, D.L. and Carnevali, O., 2018.** Influence of probiotics administration on gut microbiota core: a review on the effects on appetite control, glucose, and lipid metabolism. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 52: S50-S56. doi: 10.1097/MCG.0000000000001064
 30. **Fayolle, F., Rémy, M. and Ballerini, D., 1990.** Effect of controlled substrate feeding on butyric acid production by *Clostridium tyrobutyricum*. *Journal of industrial microbiology*. 6: 179-183. doi: 10.1007/BF01577693
 31. **Fu, F., Sun, F., Lu, X., Song, T., Ding, J., Gao, R. and Pei, C., 2019.** A novel potential biomarker on Y263 site in human serum albumin poisoned by six nerve agents. *Journal of Chromatography B*. 1104: 168-175. doi: 10.1016/j.jchromb.2018.11.011
 32. **Ghose, C., Kalsy, A., Sheikh, A., Rollenhagen, J., John, M., Young, J. and Ryan, E.T., 2007.** Transcutaneous immunization with *Clostridium difficile* toxoid A induces systemic and mucosal immune responses and toxin A-neutralizing antibodies in mice. *Infection and immunity*. 75(6): 2826-2832. doi: 10.1128/IAI.00127-07
 33. **Hassaan, M.S., Mohammady, E.Y., Adnan, A.M., Abd Elnabi, H.E., Ayman, M.F., Soltan, M.A. and El-Haroun, E.R., 2020.** Effect of dietary protease at different levels of malic acid on growth, digestive enzymes and haemato-immunological responses of Nile tilapia, fed fish meal free diets. *Aquaculture*. 522: 735124. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735124>
 34. **Hossain, M.S., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Sony, N.M., Dawood, M.A. and Fujieda, T., 2016.** (*Monopterus albus*): Effects on growth, immune response and intestinal health. *Aquaculture*. 88: 65-75. doi: 10.1016/j.fsi.2019.02.064
 16. **Costas, B., Aragão, C., Dias, J., Afonso, A. and Conceição, L.E., 2013.** Interactive effects of a high quality protein diet and high stocking density on the stress response and some innate immune parameters of Senegalese sole *Solea senegalensis*. *Fish Physiology and Biochemistry*. 39(5): 1141-1151. doi: 10.1007/s10695-013-9770-1
 17. **Dai, J., Li, Y., Yang, P., Liu, Y., Chen, Z., Ou, W. and Mai, K., 2018.** Citric acid as a functional supplement in diets for juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L.: Effects on phosphorus discharge, growth performance, and intestinal health. *Aquaculture*. 495: 643-653. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.004>
 18. **Das, A., Paul, T., Ghosh, P., Halder, S.K., Das Mohapatra, P.K., Pati, B.R. and Mondal, K.C., 2015.** Kinetic study of a glucose tolerant β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* ABK9 entrapped into alginate beads. *Waste and Biomass Valorization*. 6: 53-61. doi: 10.1007/s12649-014-9329-0
 19. **Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P. and Verstraete, W., 2004.** Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture*. 240(1-4): 69-88. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.06.031
 20. **Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W. and Bossier, P., 2007.** Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in biotechnology*. 25(10): 472-479. doi: 10.1016/j.tibtech.2007.08.001
 21. **Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W. and Bossier, P., 2008.** Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from in vivo work. *The ISME journal*. 2(1): 19-26. doi: 10.1038/ismej.2007.92
 22. **De las Heras, V., Martos-Sitcha, J.A., Yúfera, M., Mancera, J.M. and Martínez-Rodríguez, G., 2015.** Influence of stocking density on growth, metabolism and stress of thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*) juveniles. *Aquaculture*. 448: 29-37. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.05.033
 23. **Di Cagno, R., De Angelis, M., Limitone, A., Minervini, F., Carnevali, P., Corsetti, A. and Gobbetti, M., 2006.** Glucan and fructan production by sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(26): 9873-9881. doi: 10.1021/jf061393
 24. **Djoussé, L., Rothman, K.J., Cupples, L.A., Levy, D. and Ellison, R.C., 2003.** Effect of serum albumin and bilirubin on the risk of myocardial infarction (the Framingham Offspring Study). *American Journal of*

- Technology. 38(3-4): 521-528. doi: 10.1016/j.enzmietec.2005.07.008
44. **Liu, C.L., Wang, Y.J., Zeng, R.C., Zhang, X.M., Huang, W.J. and Chu, P.K., 2010.** In vitro corrosion degradation behaviour of Mg-Ca alloy in the presence of albumin. *Corrosion Science*. 52(10): 3341-3347. doi: 10.1016/j.corsci.2010.06.003
 45. **Liu, J., Yang, T., Wang, D.W., Lu, G.Q., Zhao, D. and Qiao, S.Z., 2013.** A facile soft-template synthesis of mesoporous polymeric and carbonaceous nanospheres. *Nature communications*. 4(1):2798. doi: 10.1038/ncomms3798
 46. **Mohammadian, T., Monjezi, N., Peyghan, R. and Mohammadian, B., 2022.** Effects of dietary probiotic supplements on growth, digestive enzymes activity, intestinal histomorphology and innate immunity of common carp (*Cyprinus carpio*): a field study. *Aquaculture*. 549(4): 737787. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737787
 47. **Mohammadian, T., Ghanei-Motlagh, R., Jalali, M., Nasirpour, M., Mohtashamipour, H., Osroush, E. and Nejad, A.J.,** Accepted Author Version of the Manuscript: Protective effects of non-encapsulated and microencapsulated *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to lead (Pb) via diet. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 12(2): 375-388. doi: 10.1007/s12602-019-09544-7
 48. **Morohoshi, T., Ebata, A., Nakazawa, S., Kato, N. and Ikeda, T., 2005.** N-acyl homoserine lactone-producing or-degrading bacteria isolated from the intestinal microbial flora of ayu fish (*Plecoglossus altivelis*). *Microbes and environments*. 20(4): 264-268. doi: 10.1264/jisme.20.264
 49. **Navidmehr, J., Zibaei, S., Salehmoghadam, M. and Fahimi Moghaddam, F., 2011.** Study on possibility of using dry milk as cholesterol source instead of horse serum for cultivation of *Ureaplasma urealyticum*. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 4(4): 21-29. (In Persian)
 50. **Ni, J., Wang, G., Yang, J., Gao, D., Chen, J., Gao, L. and Li, Y., 2014.** Carbon nanotube-wired and oxygen deficient MoO₃ nanobelts with enhanced lithium-storage capability. *Journal of Power Sources*. 247: 90-94. https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2013.08.068
 51. **Ooi, L.G. and Liong, M.T., 2010.** Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *International journal of molecular sciences*. 11(6): 2499-2522. doi: 10.3390/ijms11062499
 52. **Partanen, K.H. and Zdzislaw, M., 1999.** Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutrition research reviews*. 12(1): 117-145. doi: 10.1079/095442299108728884
 - Efficacy of nucleotide related products on growth, blood chemistry, oxidative stress and growth factor gene expression of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*. 464(3): 8-16. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.06.004
 35. **Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A., Merrifield, D.L., Amiri, B.M., Yelghi, S. and Bastami, K.D., 2011.** The study of some haematological and serum biochemical parameters of juvenile beluga (*Huso huso*) fed oligofructose. *Fish physiology and biochemistry*. 37(1): 91-96. doi: 10.1007/s10695-010-9420-9
 36. **Jeon, S.M., Bok, S.H., Jang, M.K., Kim, Y.H., Nam, K.T., Jeong, T.S. and Choi, M.S., 2002.** Comparison of antioxidant effects of naringin and probucol in cholesterol-fed rabbits. *Clinica Chimica Acta*. 317(1-2): 181-190. doi: 10.1016/s0009-8981(01)00778-1
 37. **Kavitha, P. and Rao, J.V., 2008.** Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, *Gambusia affinis*. *Environmental toxicology and pharmacology*. 26(2): 192-198. doi: 10.1016/j.etap.2008.03.010
 38. **Keck, R., Nayak, N., Lerner, L., Raju, S., Ma, S., Schreitmuller, T. and Jones, A., 2008.** Characterization of a complex glycoprotein whose variable metabolic clearance in humans is dependent on terminal N-acetylglucosamine content. *Biologicals*. 36(1): 49-60. doi: 10.1016/j.biologicals.2007.05.004
 39. **Khosravi, M., Sotoudeh, G., Amini, M., Raisi, F., Mansoori, A. and Hosseinzadeh, M., 2020.** The relationship between dietary patterns and depression mediated by serum levels of Folate and vitamin B12. *BMC psychiatry*. 20: 1-8. doi: 10.1186/s12888-020-2455-2
 40. **Krasňan, V., Stloukal, R., Rosenberg, M. and Rebroš, M., 2016.** Immobilization of cells and enzymes to LentiKats®. *Applied microbiology and biotechnology*. 100(6): 2535-2553. doi: 10.1007/s00253-016-7283-4
 41. **Knudsen, K.E.B., Serena, A., Canibe, N. and Juntunen, K.S., 2003.** New insight into butyrate metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*. 62(1): 81-86. doi: 10.1079/PNS2002212
 42. **Krome, C., Schuele, F., Jauncey, K. and Focken, U., 2018.** Influence of a sodium formate/formic acid mixture on growth of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) fed different fishmeal replacement levels of detoxified *Jatropha curcas* kernel meal in practical, mixed diets. *Journal of Applied Aquaculture*. 30(2): 137-156. doi: 10.1080/10454438.2017.1412845
 43. **Liu, X., Zhu, Y. and Yang, S.T., 2006.** Butyric acid and hydrogen production by *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 and mutants. *Enzyme and Microbial*

- seabass (*Dicentrarchus labrax*)? Effect on growth performance and health status. The Egyptian Journal of Aquatic Research. 43(3): 229-234. doi: 10.1016/j.ejar.2017.09.005
63. **Wei, H. and Erkang, W., 2013.** Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes. Chemical Society Reviews. 42(14): 6060-6093. <https://doi.org/10.1039/C3CS35486E>
 64. **Wiegertjes, G.F., Stet, R.M., Parmentier, H.K. and van Muiswinkel, W.B., 1996.** Immunogenetics of disease resistance in fish: a comparative approach. Developmental & Comparative Immunology. 20(6): 365-381. doi: 10.1016/s0145-305x(96)00032-8
 65. **Ye, J. and DeBose-Boyd, R.A., 2011.** Regulation of cholesterol and fatty acid synthesis. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 3(7): a004754. doi: 10.1101/cshperspect.a004754
 66. **Yilmaz, S., Ergün, S. and Yigit, M., 2018.** Effects of dietary Farmarin® XP supplement on immunological responses and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 496: 211-220. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.07.024
 67. **Zigová, J., 1999.** Butyric acid production by *Clostridium butyricum* with integrated extraction and pertraction. Process Biochemistry. 34(8): 835-843. doi: 10.1016/S0032-9592(99)00007-2
 53. **Prabu, D.L., Sahu, N.P., Pal, A.K., Dasgupta, S. and Narendra, A., 2016.** Immunomodulation and interferon gamma gene expression in sutchi cat fish, *Pangasianodon hypophthalmus*: effect of dietary fucoidan rich seaweed extract (FRSE) on pre and post challenge period. Aquaculture research. 47(1): 199-218. doi: 10.1111/are.12482
 54. **Reyshari, A., 2019.** Effects of sodium diformate on growth performance, gut microflora, digestive enzymes and innate immunological parameters of Asian sea bass (*Lates calcarifer*) juveniles. Aquaculture Nutrition. 25(5): 1135-1144. doi: 10.1111/anu.12929
 55. **Ringø, E., Hoseinifar, S.H., Ghosh, K., Doan, H.V., Beck, B.R. and Song, S.K., 2018.** Lactic acid bacteria in finfish-An update. Frontiers in microbiology. 9: 1818. doi: 10.3389/fmicb.2018.01818
 56. **Saei, M.M., Beiranvand, K., Taei, H.M. and Nekoubin, H., 2016.** Effects of different levels of BioAcid Ultra on growth performance, survival, hematological and biochemical parameters of fingerlings rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Aquaculture Research and Development. 7(455): 1-5. doi: 10.4172/2155-9546.1000455
 57. **Stangl, G.I., Ulrich, E. and Manfred, K., 1998.** Nickel deficiency alters nickel flux in rat everted intestinal sacs. Biological trace element research. 61: 253-262. doi: 10.1093/jn/126.10.2466
 58. **Swiatkiewicz, S. and Arczewska-Wlosek, A., 2012.** Prebiotic fructans and organic acids as feed additives improving mineral availability. World's Poultry Science Journal. 68(2): 269-279. doi: 10.1017/S0043933912000323
 59. **Tinh, N.T.N., Asanka Gunasekara, R.A.Y.S., Boon, N., Dierckens, K., Sorgeloos, P. and Bossier, P., 2007.** N-acyl homoserine lactone-degrading microbial enrichment cultures isolated from *Penaeus vannamei* shrimp gut and their probiotic properties in *Brachionus plicatilis* cultures. FEMS microbiology ecology. 62(1): 45-53. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00378.x
 60. **Vahabnezhad, A. and Taghavimotlagh, S.A., 2017.** Growth pattern and reproductive biology of *Acanthopagrus latus* from the Persian Gulf. Journal of Survey in Fisheries Sciences. 4(1)18-28. doi: 10.18331/SFS2017.4.1.3
 61. **Van Waarde, A., Van Dijk, P., Van Den Thillart, G., Verhagen, M., Erkelens, C., Bonga, S.W. and Lugtenburg, J., 1990.** 31P-NMR studies on acid-base balance and energy metabolism of acid-exposed fish. Journal of experimental biology. 154(1): 223-236. doi: 10.1242/jeb.154.1.223
 62. **Wassef, E.A., Abdel-Momen, S.A.G., Saleh, N.E.S., Al-Zayat, A.M. and Ashry, A.M., 2017.** Is sodium diformate a beneficial feed supplement for European