



University of Guilan

University of Guilan with collaboration of Iranian
Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 10, No. 3, 2024, pages: 17-32
DOI: 10.22124/janb.2024.27989.1253



RESEARCH PAPER

OPEN ACCESS

Effects of butyric acid and Protexin probiotic in the feeding of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*)

Rasool Zare, Abdolmohammad Abedian Kenari*

Department of Aquaculture, Faculty of Natural Resources and Marine, Tarbiat Modares University, Noor, Mazandaran, Iran

Received 25 June 2024

Revised 14 September 2024

Accepted 15 September 2024

KEYWORDS

Butyric acids
Beneficial
bacteria
Growth
Fish immune
Siberian
sturgeon

Introduction: Using antibiotics to combat microbes and as a growth-enhancing tool in aquaculture is a common trend. However, scientific knowledge and public concerns about the development of antibiotic resistance have led to a global reduction or prohibition of these compounds. Probiotics and organic acids are potential alternative compounds to antibiotics in aquaculture. Numerous studies have been conducted on using organic acids in poultry and livestock diets. However, there is limited information regarding the employment of these compounds in fish nutrition. Nowadays, various probiotics are used as dietary supplements in the aquaculture industry. However, combining organic acids and probiotics is a new idea that has not yet been studied.

Materials and Methods: In this experiment, the effects of butyric acid and probiotic supplements (Protexin) and their combination on the growth performance, body composition, intestinal microbiota, and immune responses (lysozyme and complement) in juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) were investigated. Therefore, 120 healthy fish with an average body weight of 54.85 ± 0.36 g were randomly divided into four experimental groups in three replications. The fish were fed with four diets as follows: control diet (C₁, without supplementation), diet containing 2% butyric acid (T₂), diet containing a combination of 2% butyric acid and 0.01% protoxin (T₃) and diet containing 0.01% protoxin (T₄). The fish were fed three times a day until satiation for 9 weeks.

Results and Discussion: The results showed that T₂ and T₄ improved the growth indices of Siberian sturgeon ($p < 0.05$). In control and T₂, the body fat contents decreased. The protein level significantly upraised in T₂ ($P < 0.05$). Adding organic acid to the fish diet dropped pH and elevated intestinal lactic acid bacteria ($P < 0.05$). Lysozyme and complement increased in T₂ and T₃ ($P < 0.05$).

Conclusion: In general, the results of this study showed that butyric acid alone had a positive effect on growth, intestinal microbiota, increasing lactic acid bacteria, and the immunity of Siberian sturgeon. Although its combination with protoxin was ineffective on the increasing growth, however, it improved the intestine-beneficial bacteria and fish immunity.

*Corresponding author: aabedian@modares.ac.ir





"مقاله پژوهشی"

اثر ترکیب اسید بوتیریک و پروبیوتیک پروتکسین بر عملکرد رشد، ترکیب بدن، میکروبیوتای روده و دستگاه ایمنی تاسماهی سبیری (*Acipenser baerii*)

رسول زارع، عبدالمحمد عابدیان کناری*

گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، مازندران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۲۵

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۶/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۰۵

کلمات کلیدی

چکیده

اسید بوتیریک

پروبیوتیک

پروتکسین

رشد

ایمنی

ترکیب بدن

تاسماهی سبیری

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای مقابله با میکروب‌ها و به‌عنوان ابزاری برای افزایش رشد در آبی‌پروری رایج است. با وجود این، دانسته‌های علمی و نگرانی‌های عمومی از ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به کاهش یا ممنوعیت جهانی استفاده از این ترکیبات شده است. پروبیوتیک‌ها و اسیدهای آلی به عنوان ترکیبات جایگزین بالقوه برای آنتی‌بیوتیک‌ها در آبی‌پروری مطرح هستند. امروزه انواع پروبیوتیک‌ها به‌عنوان مکمل غذایی در صنعت آبی‌پروری استفاده می‌شوند، اما استفاده توأم از اسیدهای آلی و پروبیوتیک‌ها ایده جدیدی است که تحقیقی روی آن انجام نشده است. در این آزمایش، عملکرد مکمل‌های اسید بوتیریک و پروبیوتیک (پروتکسین) و ترکیب این دو بر کارایی رشد، ترکیب بدن، میکروبیوتای روده و پاسخ‌های ایمنی (لایزوزیم و کمپلمان) بچه ماهی سبیری (*Acipenser baerii*) بررسی شد. از این رو، ۱۲۰ ماهی (۵۴/۸۵ ± ۰/۳۶ گرم) به‌طور تصادفی به چهار گروه آزمایشی با سه تکرار تقسیم شدند: تیمار شاهد (تغذیه با جیره ۱، بدون مکمل)، تیمار ۲: ۲٪ اسید بوتیریک، تیمار ۳: ترکیبی از ۲٪ اسید بوتیریک و ۰/۰۱٪ پروتکسین و تیمار ۴: ۰/۰۱٪ پروتکسین. ماهی‌ها به مدت ۹ هفته و سه بار در روز تا حد سیری تغذیه شدند. نتایج نشان داد که تیمارهای ۲ و ۴ موجب بهبود شاخص‌های رشد در تاسماهی سبیری شدند ($P < 0/05$). در تیمارهای شاهد و تیمار ۲، میزان چربی کاهش و در تیمار ۲، اسید بوتیریک میزان پروتئین لاشه به‌طور معنی‌دار افزایش یافت ($P < 0/05$). افزودن اسید آلی به جیره غذایی ماهی باعث کاهش pH و افزایش باکتری‌های اسید لاکتیک روده شد ($P < 0/05$). لایزوزیم و کمپلمان در تیمارهای ۲ و ۳ افزایش یافت ($P < 0/05$). به‌طور کلی، نتایج نشان داد که به‌کارگیری اسید بوتیریک به‌تنهایی اثر مثبت بر رشد، میکروبیوتای روده، افزایش باکتری‌های اسید لاکتیک و ایمنی ماهی سبیری داشت. ترکیب آن با پروتکسین اگرچه در افزایش رشد مؤثر نبود، اما موجب بهبود باکتری‌های مفید روده و ایمنی ماهی شد.

مقدمه

توسعه آبی پروری باعث افزایش امنیت غذایی، تأمین غذای با ارزش، ایجاد اشتغال و توسعه مناطق روستایی می‌شود (FAO, 2020). در سال‌های اخیر، به دلیل کمبود فضا و منابع آبی، توجه ویژه‌ای به افزایش تولید در واحد سطح شده است. تراکم بالای ماهیان در کارگاه‌های پرورشی محدودیت‌هایی را به همراه دارد که از مهم‌ترین آنها شیوع بیماری‌هاست (Matyar et al. 2004). به عبارتی، توسعه این صنعت به شدت تحت تأثیر بیماری‌های ناشی از عوامل بیماری‌زا قرار دارد که عامل اصلی بسیاری از زیان‌های اقتصادی در مزارع پرورشی هستند. از این‌رو، برای پیشگیری و کنترل بیماری‌های عفونی ناشی از باکتری‌ها، به‌طور گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود. استفاده مکرر از این ترکیبات، به‌خصوص برای درمان و افزایش رشد، آسیب‌های زیادی به محیط‌های آبی وارد کرده و مخاطراتی را برای سلامت موجودات و انسان ایجاد می‌کند. مصرف زیاد آنتی‌بیوتیک‌ها موجب ایجاد سویه‌های مقاوم به باکتری شده و در عین حال، باعث تجمع این ترکیبات در بافت ماهیان می‌شود. بنابراین، یافتن جایگزین‌های غیرآنتی‌بیوتیکی مؤثر، جهت کنترل بیماری‌های عفونی و تقویت رشد، برای ادامه حیات صنعت آبی پروری اهمیت ویژه‌ای دارد. از جمله این جایگزین‌ها، اسیدهای آلی مانند اسید بوتیریک هستند.

اسیدهای آلی که ترکیباتی با یک تا هفت اتم کربن‌اند، به‌طور گسترده در گیاهان و حیوانات یافت شده و از طریق تخمیر میکروبی تولید می‌شوند. این ترکیبات به‌عنوان افزودنی‌های نگه‌دارنده به خوراک اضافه می‌شوند و با کاهش pH از رشد ریزموجودات بیماری‌زا جلوگیری می‌کنند (Sarker et al. 2012). در مواقعی که جانور غذای زیادی دریافت می‌کند، یا جیره پروتئین بالایی دارد، میزان اسید هیدروکلریک در معده کاهش می‌یابد که این مسئله باعث کاهش فعالیت آنزیم پپسین و در نتیجه، کاهش هضم مواد غذایی می‌شود. اسیدی کردن جیره می‌تواند این مشکل را برطرف کرده و به هضم بهتر کمک کند (Partanen and Mroz, 1999).

مطالعات نشان داده‌اند که اسیدهای آلی تأثیر مثبتی بر هیدرولیز پروتئین دارند (Sarker et al. 2012). همچنین، افزودن اسید به جیره باعث کاهش pH روده و بهبود جذب

نیتروژن و افزایش هضم پروتئین می‌شود (Lückstädt et al. 2008). برخی اسیدهای آلی نیز اثرات ضدباکتریایی قوی در برابر پاتوژن‌های غذایی دارند و در حال حاضر برای کنترل این عوامل بیماری‌زا در خوراک دام استفاده می‌شوند (Kumar et al. 2017). اگرچه استفاده از اسیدهای آلی و نمک‌های آن‌ها در جیره دام و طیور به‌خوبی مطالعه شده، اما تحقیقات مربوط به آبزیان طی دهه اخیر شدت گرفته است. از دیگر جایگزین‌های آنتی‌بیوتیک‌ها در آبی پروری، پروبیوتیک‌ها هستند. پروبیوتیک‌ها، ترکیبی از ریزموجودات مفیدند که با بهبود تعادل میکروبی روده، به سلامت میزبان کمک می‌کنند (Merrifield et al. 2010). در آبی پروری، این ترکیبات با سازوکار مشابه حیوانات خشکی‌زی عمل می‌کنند، اما به دلیل پیچیدگی رابطه میان آبی و محیط، شرایط متفاوت است. پروبیوتیک‌ها از طریق آبشش و غذا وارد بدن شده و با تأثیر بر میکروفلور دستگاه گوارش، به بهبود سلامت و رشد ماهیان کمک می‌کنند (Ng et al. 2020; Ashouri et al. 2017). کارگاه‌های پرورشی متراکم به دلیل شرایط استرس‌زا، می‌توانند باعث کاهش رشد و تضعیف دستگاه ایمنی آبزیان شده و فرصت رشد باکتری‌های بیماری‌زا را افزایش دهند. به همین دلیل استفاده از پروبیوتیک‌ها برای تقویت دستگاه ایمنی آبزیان اهمیت پیدا کرده است. پروبیوتیک‌ها همچنین می‌توانند با افزایش جذب مواد غذایی، به عنوان محرک‌های رشد عمل کنند و ارزش غذایی جیره را بهبود بخشند (Merrifield et al. 2010; Alishahi et al. 2018; Dawood et al. 2019). با وجود اثرات مثبت پروبیوتیک‌ها و اسیدهای آلی در جیره غذایی دام و طیور، تحقیقات محدودی در زمینه اثرات آنها در آبزیان، به‌خصوص ماهیان خاویاری، انجام شده است (Vielma et al. 1999; Matani Bour et al. 2021; Khoshhava et al. 2018). از این‌رو، در این مطالعه، تأثیر اسید بوتیریک همراه با پروبیوتیک پروتکسین بر شاخص‌های رشد و سلامت تاسماهی سیبری بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

شرایط پرورش

استرپتوکوکوس سالیواریوس (*Streptococcus salivarius*) و سویه‌های قارچی شامل اسپرژیلوس اریزای (*Aspergillus oryzae*) و کاندیدا پینتولوپسی (*Candida pintolopesi*) بود. انتخاب دوز پروتکسین بر اساس پیشنهاد شرکت تولید کننده این پروبیوتیک و همچنین مطالعات قبلی انجام شده انتخاب شد (Firouzbaksh et al. 2011; Ahmed and Sadek, 2014). انتخاب دوز اسید بوتیریک (سیگما آلدریج، آلمان، pH = ۲/۵) بر اساس نتایج مثبت آزمون‌های قبلی انجام شد (Matani Bour et al. 2018; Khoshhava et al. 2021). چهار جیره غذایی آزمایشی به شرح زیر تهیه شد (جدول ۱):

جیره شاهد بدون افزودنی (تیمار ۱)، جیره شاهد همراه با اسید بوتیریک ۰/۲٪ (تیمار ۲)، جیره شاهد همراه با اسید بوتیریک ۰/۲٪ + پروتکسین ۰/۰۱٪ معادل 2×10^8 CFU/g (تیمار ۳)، جیره شاهد با پروتکسین ۰/۰۱٪ معادل CFU/g 2×10^8 (تیمار ۴).

تمام مواد تشکیل دهنده جیره‌های شاهد و آزمایش کاملاً مخلوط شده و سپس به صورت پلت طبق روش مرسوم (Matani Bour et al. 2018) تهیه شد. ماهی‌ها سه بار در روز (ساعت ۸:۰۰، ۱۵:۰۰ و ۲۱:۰۰) به مدت ۹ هفته تا حد سیری تغذیه شدند. هر تیمار غذایی در سه تکرار آزمایش شدند.

بررسی شاخص‌های رشد و تغذیه ماهی

در پایان آزمایش، ماهی‌های هر مخزن با عصاره گل میخک (۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۶۰-۴۰ ثانیه) بیهوش و به صورت جداگانه توزین شدند (Ashouri et al. 2018). وزن ماهی به ترتیب با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. ماهی‌ها قبل از بیهوشی برای اندازه‌گیری فراسنجه‌های خون (چهار ماهی در هر مخزن)، pH روده و فلور میکروبی (سه ماهی در هر مخزن) و ترکیب اسیدهای چرب (سه ماهی از هر تکرار) به مدت ۲۴ ساعت غذادهی نشدند. شاخص‌های رشد و تغذیه با استفاده از فرمول‌های زیر سنجش شد:

عملیات پرورش ماهی در انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری رشت اجرا شد. مخازن مورد استفاده در پرورش شامل ۱۲ عدد مخزن فایبرگلاس ۵۰۰ لیتری به ابعاد ۵۲ × ۱۰۲ × ۱۰۵ سانتی‌متر بود. این مخازن پرورشی مجهز به سازگان تخلیه آب مرکزی و هوادهی بودند. تمام مخازن در کنار هم در یک ردیف و در محیط سرپوشیده سوله تکثیر و پرورش با شرایط یکسان قرار گرفتند. دستگاه هوادهی و آب-رسانی و دیگر شرایط محیطی در تمام مخازن یکسان بود. برای سازگاری ماهیان به محیط جدید، آنها قبل از شروع آزمایش به مدت ۱۰ روز در این مخازن و در شرایط آزمایش قرار گرفتند. برای اینکه ماهیان به غذای مورد استفاده عادت کنند، طی این مدت، غذادهی تا حد سیری با غذای شاهد انجام شد. تعداد ۱۲۰ عدد بچه تاسماهی با میانگین وزن اولیه $0.36 \pm 0.054/85$ گرم (میانگین \pm SE) به طور تصادفی در ۱۲ مخزن فایبرگلاس (۱۰ ماهی در هر مخزن) حاوی ۴۰۰ لیتر آب توزیع شدند. مخازن به سازگان جریان مداوم آب متصل شده و مدفوع و مواد غذایی مصرف نشده هر روز از مخازن خارج می‌شد. دمای آب $19.82 \pm 2/71$ °C، اکسیژن محلول $11/11 \pm 1/04$ میلی‌گرم در لیتر و دوره نوری به دلیل اینکه مخازن در بیرون سالن بودند، به طور طبیعی بود. اندازه‌گیری و ثبت فراسنجه‌های فیزیوشیمیایی آب (دما، اکسیژن و pH) به طور روزانه انجام می‌شد.

تیمارها و جیره‌های غذایی

پروتکسین مورد استفاده در این آزمایش، ساخت شرکت Probiotics International Ltd به سفارش شرکت نیکوتک تهران بود که مخلوطی از ۷ سویه باکتریایی و ۲ سویه قارچی و مخمری است. گونه‌های باکتریایی شامل لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*Lactobacillus acidophilus*)، لاکتوباسیلوس دلبروکی (*Lactobacillus delbrueckii*)، پلانتاریوم (*Lactobacillus plantarum*)، لاکتوباسیلوس رامنوسوس (*Lactobacillus rhamnosus*)، بیفیدوم باکتریوم بیفیدوم (*Bifidobacterium bifidum*)، انتروکوکوس فاسیوم (*Enterococcus faecium*) و

جدول ۱ ترکیب و سنجش تقریبی جیره های آزمایشی (گرم در کیلوگرم)

Table 1 Composition and proximate analysis of experimental diets (g/kg)

	D1	D2	D3	D4
Fish meal	370	370	370	370
Soybean meal	320	320	320	320
Wheat flour	160	160	160	160
Fish oil	28.6	28.6	28.6	28.6
Soybean oil	28.6	28.6	28.6	28.6
Lecithin	5	5	5	5
Mono calcium phosphate	5	5	5	5
Mineral premix	20	20	20	20
Vitamin premix	20	20	20	20
Antifungal	2.5	2.5	2.5	2.5
Antioxidant	0.3	0.3	0.3	0.3
Filler	30	10	9.9	29.9
Butyric acid	0	20	20	0
Protexin	0	0	0.1	0.1
Binder	10	10	10	10
Proximate composition (% dry matter)				
Protein	43.60	43.33	43.53	43.49
Lipid	11.7	11.65	11.72	11.85
Ash	13.93	14.03	14.13	13.85
Moisture	7.77	7.95	7.91	7.84
NFE	22.93	22.81	22.94	22.97

ویتامین و مواد معدنی (میلی گرم یا گرم بر کیلوگرم جیره غذایی): ۱ کیلوگرم مکمل معدنی شامل: آهن (۲۰ گرم)، روی (۲۰ گرم)، سلنیوم (۴۰۰ میلی گرم)، کبالت (۲۰۰ میلی گرم)، مس (۲ گرم)، منگنز (۴۰ میلی گرم)، ید (۴۰۰ میلی گرم)، کلرید کولین (۶۰ گرم). پنج کیلوگرم مکمل ویتامین (۰/۵٪) شامل: ویتامین A، ۸/۰۰۰/۰۰۰ واحد بین المللی؛ D₃، ۲/۰۰۰/۰۰۰ واحد بین المللی؛ E، ۱۵۰ گرم؛ K₃، ۵۰ گرم؛ B₁، ۵۰ گرم؛ B₂، ۴۰ گرم؛ B₃، ۱۵۰ گرم؛ B₅، ۲۰۰ گرم؛ B₆، ۸۰ گرم؛ B₉، ۱۵ گرم؛ B₁₂، ۰/۰۵ گرم؛ C، ۵۰۰ گرم؛ بوتیلات هیدروکسی تولوئن (BHT)، ۱۰۰ گرم؛ اینوزیتول، ۵۰۰ گرم.

(وزن اولیه بدن / وزن اولیه - وزن نهایی بدن) × ۱۰۰ = افزایش وزن بدن (٪)

زمان / [لگاریتم نپیرین وزن اولیه - لگاریتم نپیرین وزن نهایی] × ۱۰۰ = نرخ رشد ویژه (درصد در روز)

وزن تر (گرم) / غذای خشک مصرفی (گرم) = ضریب تبدیل غذایی

(تعداد ماهی در ابتدای دوره / تعداد ماهی در پایان دوره) × ۱۰۰ = زنده ماننی ماهی (٪)

سنجیده شد. میزان خاکستر بافت بدن با سوزاندن نمونه‌ها در کوره در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت سنجش شدند.

شمارش تعداد کل باکتری‌ها و باکتری‌های اسید لاکتیک روده

ترکیب شیمیایی جیره‌های غذایی و بدن ماهی

سنجش شیمیایی غذا و بدن بر اساس روش استاندارد (AOAC, 1995) انجام شد. پروتئین خام با استفاده از سنجش نیتروژن ($N \times 6.25$) و به روش کلدال اندازه‌گیری شد. چربی خام به روش استخراج اتری با استفاده از دستگاه سوکسله سنجش شد. میزان رطوبت با استفاده از آون و حرارت تا دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت

اتاق، مقدار جذب قرائت شد. سپس، مقدار جذب را با منحنی استاندارد که از لایوزیم سفیده تخم مرغ مقایسه و مقدار لایوزیم نمونه مورد نظر براساس کدورت‌سنجی برحسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. میزان فعالیت کمپلمان بر اساس همولیز گلبول‌های قرمز خرگوش طبق روش Yano (۱۹۹۲) انجام شد.

آزمون آماری

طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی برنامه ریزی و اجرا شد. ابتدا نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون Kolmogorov-Smirnov ارزیابی شد. سپس تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) انجام شد. برای مقایسه میانگین شاخص‌های رشد و شیمیایی از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۵٪ استفاده شد. از نرم افزار SPSS برای آزمون آماری و Excel برای رسم نمودارها استفاده شد.

نتایج

عملکرد رشد

نتایج عملکرد رشد نشان داد که ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی مکمل سازی شده با اسید بوتیریک و جیره حاوی پروتکسین افزایش وزن، وزن نهایی و نرخ رشد ویژه نشان دادند (جدول ۲). ضریب تبدیل غذایی در تمام تیمارهایی که اسید آلی به صورت مجزا یا در ترکیب با پروتکسین استفاده شده بود، کاهش یافت ($P < 0.05$). فاکتور وضعیت در بین تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت. میزان تلفات در تمام تیمارها در طی دوره آزمایش صفر بود.

ترکیب بدن

نتایج نشان داد که پروتئین لاشه تاسماهی سبیری در تیمارهای تغذیه شده با اسید بوتیریک و بوتیریک با پروتکسین نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشت ($P < 0.05$ ؛ جدول ۳). افزودن اسید آلی باعث کاهش چربی لاشه شد ($P < 0.05$). کم‌ترین مقدار چربی در تیمارهای تغذیه شده با اسید بوتیریک و گروه شاهد بود. ماهیانی که از

برای انجام این آزمون ماهی‌ها با غوطه‌وری در عصاره گل میخک بیهوش و با ضربه به سر کشته شدند. برای از بین بردن باکتری‌ها و ریزموجودات ناخواسته، سطح بدن ماهی در محلول کلرید بنزالکونیوم ۰/۱٪ به مدت ۱ دقیقه قرار داده شد. سپس روده با رعایت کامل شرایط سترون، خارج، سپس شکافته، و محتویات آن برای اندازه‌گیری pH کنار گذاشته شد. بعد، روده سه بار با آب مقطر سترون شستشو، و به‌طور جداگانه در یک محلول PBS سترون همگن شد. سوسپانسیون حاصله به صورت پی در پی با 10^{-2} تا 10^{-8} محلول نمکی ۰/۸۵٪ NaCl رقیق شد. برای شمارش کل باکتری‌ها، ۰/۵ میلی‌لیتر از هر رقت بر روی پلیت حاوی تریپتیک سوی آگار (TSA، مرک) و برای شمارش باکتری‌های اسیدلاکتیک ۰/۵ میلی‌لیتر از هر رقت deMan MRS Rogosa Sharp (مرک) پخش شد. تمام پلیت‌ها به مدت ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند (Mahious et al. 2006). تعداد پرگنه‌ها به‌عنوان واحد پرگنه (CFU) در هر گرم روده شمارش و به‌صورت $\log \text{CFU/g}$ بیان شد.

سنجش فراسنجه‌های ایمنی خون

برای سنجش میزان لایوزیم سرم از روش Wuertz و همکاران (۲۰۰۶) استفاده شد. اساس این روش توانایی لایوزیم سرم در تخریب لایه پپتیدوگلیکان باکتری گرم مثبت میکروکوکوس لایزودکیتیکوس است. نمونه‌های خون جمع‌آوری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد لخته شده و در ۷۰۰۰ گرم به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سرم‌ها برای سنجش‌های لایوزیم و کمپلمان در دمای ۸۰- درجه سانتی-گراد جمع‌آوری شدند. سطح لایوزیم با استفاده از روش turbidimetric با استفاده از باکتری میکروکوکوس لایزودکیتیکوس و لایوزیم (Sigma-Aldrich) سفیده تخم‌مرغ اندازه‌گیری شد. ابتدا محلول PBS در لوله آزمایش ریخته و مقداری باکتری به آن اضافه و به آرامی تکان داده شد. سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول مزبور برداشته و در طول موج ۴۵۰ نانومتر در فتومتر قرائت شد. در مرحله بعد، مقدار ۱۵ میکرولیتر از سرم خون به آن اضافه، کمی به هم زده، و پس از نگهداری آن به مدت ۲۰ دقیقه در دمای

بوتیریک + پروتکسین و کم‌ترین آن در گروه شاهد و تیمار حاوی پروتکسین مشاهده شد ($P < 0.05$).

جیره غنی‌سازی شده با اسید بوتیریک و بوتیریک + پروتکسین و پروتکسین تغذیه کرده بودند، بیش‌ترین و ماهیان گروه شاهد کم‌ترین خاکستر لاشه را داشتند. بیشترین مقدار رطوبت در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی اسید بوتیریک و

جدول ۲ عملکرد رشد و بازماندگی تاسماهی سیبری تغذیه شده با جیره‌های مکمل سازی شده با بوتیریک اسید و پروبیوتیک پروتکسین پس از ۹ هفته

Table 2 Growth performance and survival of Siberian sturgeon fed diets supplemented with butyric acid and Protexin probiotic after 9 weeks

	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
Initial weight (g)	55.39 ± 0.20	54.79 ± 0.51	54.29 ± 0.47	54.43 ± 0.63
Final weight (g)	102.01 ± 1.26 ^c	160.60 ± 14.74 ^a	100.57 ± 3.64 ^c	119.57 ± 3.7 ^b
Weight gain (%)	84.16 ± 2.01 ^c	193.11 ± 6.80 ^a	85.25 ± 2.22 ^c	119.68 ± 3.02 ^b
SGR (%/day)	1.12 ± 0.01 ^c	1.56 ± 0.08 ^a	1.09 ± 0.03 ^c	1.26 ± 0.02 ^b
CF	0.27 ± 0.01	0.28 ± 0.0	0.26 ± 0.0	0.28 ± 0.0
FCR	2.37 ± 0.14 ^a	1.64 ± 0.04 ^b	1.99 ± 0.06 ^c	2.23 ± 0.06 ^a
Survival (%)	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0

اعداد (میانگین ± خطای استاندارد) در هر ردیف با حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی است ($P < 0.05$).
The numbers (mean ± SE) in each row with different letters indicate a significant difference between the experimental treatments ($P < 0.05$).

جدول ۳ ترکیب بدن تاسماهی سیبری تغذیه شده با جیره‌های غنی سازی شده با اسید بوتیریک و پروبیوتیک پروتکسین (برحسب درصد ماده خشک) پس از ۹ هفته

Table 3 Body composition of Siberian sturgeon fed diets supplemented with butyric acid and Protexin probiotic (% of dry matter) after 9 weeks

	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
Protein (%)	61.26 ± 0.08 ^c	73.16 ± 0.7 ^a	67.66 ± 2.14 ^b	57.66 ± 0.24 ^c
Lipid (%)	4.18 ± 0.19 ^b	3.01 ± 0.12 ^c	5.93 ± 0.14 ^a	6.08 ± 0.11 ^a
Ash (%)	5.28 ± 0.09 ^c	6.63 ± 0.2 ^a	5.95 ± 0.24 ^b	6.30 ± 0.16 ^{ab}
Moisture (%)	68.00 ± 1.15 ^c	77.33 ± 0.88 ^a	73.33 ± 0.88 ^b	67.00 ± 0.73 ^c

اعداد (میانگین ± خطای استاندارد) در هر ردیف با حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی است ($P < 0.05$).
The numbers (mean ± SE) in each row with different letters indicate a significant difference between the experimental treatments ($P < 0.05$).

تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک جداسازی شده از روده ماهیان تغذیه شده با اسید آلی و اسید آلی + پروتکسین در مقایسه با باقی تیمارها افزایش معنی‌دار نشان داد ($P < 0.05$).

شاخص‌های ایمنی

اثر غنی‌سازی جیره‌ها با اسید بوتیریک و پروتکسین بر شاخص‌های ایمنی تاسماهی سیبری در جدول ۵ آمده است.

باکتری‌های روده

نتایج نشان داد که غنی سازی جیره با اسید آلی به‌تنهایی و در ترکیب با پروتکسین باعث کاهش pH جیره و روده می‌شود (جدول ۴). کم‌ترین pH روده در تیمار تغذیه شده با اسید بوتیریک و بوتیریک + پروتکسین و بیش‌ترین آن در گروه شاهد مشاهده شد. تعداد کل باکتری‌های روده به غیر از تیمار پروتکسین در بقیه تفاوت معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$), اما

کمپلمان نسبت به باقی تیمارها شد ($P < 0.05$). کمترین میزان کمپلمان در خون ماهیانی بود که با گروه شاهد تغذیه شده بودند.

افزودن اسیدبوتیریک و اسیدبوتیریک + پروتکسین فعالیت لایزوزیم خون ماهی را به طور معنی دار افزایش داد ($P < 0.05$). کمترین میزان فعالیت لایزوزیم مربوط به گروه شاهد بود. همچنین، تغذیه با جیره غذایی حاوی اسید بوتیریک و اسیدبوتیریک + پروتکسین باعث افزایش معنی دار

جدول ۴ میزان pH و شمارش تعداد کل باکتری‌ها و باکتری‌های اسیدلاکتیک در روده تاسماهی سیبری تغذیه شده با جیره‌های غنی سازی شده با اسید بوتیریک و پروبیوتیک پروتکسین پس از ۹ هفته

Table 4 pH level and total bacteria and lactic acid bacteria in the intestine of Siberian sturgeon fed diets supplemented with butyric acid and Protexin probiotic after 9 weeks

	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
pH (diet)	5.64 ± 0.01 ^a	5.21 ± 0.01 ^b	5.21 ± 0.01 ^b	5.63 ± 0.02 ^a
pH (intestine)	7.65 ± 0.03 ^a	7.31 ± 0.06 ^c	7.25 ± 0.06 ^c	7.44 ± 0.08 ^{bc}
Total bacteria (log CFU/g)	9.30 ± 0.03 ^a	9.55 ± 2.90 ^a	9.46 ± 3.11 ^a	7.51 ± 2.16 ^b
LAB (log CFU/g)	5.71 ± 1.33 ^b	6.66 ± 1.87 ^a	6.50 ± 1.45 ^a	5.99 ± 0.431 ^b

اعداد (میانگین ± خطای استاندارد) در هر ردیف با حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای آزمایشی است ($P < 0.05$). The numbers (mean ± SE) in each row with different letters indicate a significant difference between the experimental treatments ($P < 0.05$).

جدول ۵ پاسخ‌های ایمنی تاسماهی سیبری تغذیه شده با جیره‌های مکمل سازی شده با اسید بوتیریک و پروتکسین پس از ۹ هفته

Table 5 Immune responses of Siberian sturgeon fed diets supplemented with butyric acid and Protexin probiotics after 9 weeks

	D1	D2	D3	D4
Lysozyme (U/mL)	28.16 ± 1.58 ^b	39.50 ± 0.28 ^a	42.53 ± 2.07 ^a	29.33 ± 1.01 ^b
Alternative complement (U/mL)	128.50 ± 3.6 ^c	137.16 ± 1.4 ^b	144.5 ± 4.44 ^a	129.66 ± 1.58 ^c

اعداد (میانگین ± خطای استاندارد) در هر ردیف با حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای آزمایشی است ($P < 0.05$). The numbers (mean ± SE) in each row with different letters indicate a significant difference between the experimental treatments ($P < 0.05$).

Labeo (Khajepour and Hosseini, 2012)
Pagrus major (Baruah et al. 2005) *rohita*
Oncorhynchus mykiss (Hossain et al. 2007)
 Matani bour) *Huso huso* (Tabrizi et al. 2012)
Oncorhynchus mykiss (et al. 2018)
 (Khoshhava et al. 2021) بهبود رشد را به همراه داشته است. با وجود این، در برخی تحقیقات انجام شده، استفاده از اسیدهای آلی و نمک‌های آنها در جیره ماهی‌های مختلف تأثیر مثبتی بر رشد نداشت. برای مثال، استفاده از لاکتات در

بحث

در تحقیق حاضر، جیره حاوی اسیدبوتیریک (به‌تنهایی) موجب بهبود معنی دار شاخص‌های رشد تاسماهی سیبری شد. افزایش رشد ماهی در تیمارهای آزمایشی را می‌توان به کاهش pH روده، افزایش باکتری‌های مفید روده، جلوگیری از رشد عوامل بیماری‌زا و همچنین هضم و جذب بهتر غذا نسبت داد (De Wet, 2005; Ng et al. 2017). مشابه با نتایج موجود، مطالعات گذشته نیز نشان داده‌اند که استفاده از اسیدهای آلی در جیره ماهی *Huso huso*

2017) باعث افزایش رشد ماهی نشد. به‌طور کلی تناقضات موجود در نتایج حاصل از استفاده از پروبیوتیک در جیره غذایی به عوامل متعددی از قبیل گونه، سن و اندازه ماهی، شیوه اجرای آزمایش، جیره غذایی، زمان مصرف پروبیوتیک و دوره غذادهی بستگی دارد (Fazio et al. 2013; Hai, 2015). به‌رغم افزایش باکتری‌های مفید روده و ایمنی ماهیان تغذیه شده با ترکیب اسید بوتیریک و پروتکسین، ولی ترکیب این دو موجب افزایش معنی دار رشد نسبت به گروه شاهد نشد که علت اصلی آن نیز مشخص نیست. به‌طور متفاوت، استفاده از ترکیب سدیم بوتیرات و پروتکسین در تیلاپیا (Ahmed and Sadek, 2014)، ترکیب اسیدمالیک و باسیلوس سوبتیلوس در ماهی تیلاپیا و ترکیب سوربات پتاسیم و پروبیوتیک *Lactobacillus casei* در قزل آلابی رنگین کمان (Hassaan et al. 2017) و ترکیب بتاگلوکان، مانان اولیگوساکارید و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانناروم به جیره ماهی آزاد خزر (Jami et al. 2019) و تاسماهی سبیری (Zare et al. 2021) باعث بهبود رشد نسبت به استفاده مجزای پروبیوتیک و اسید آلی شد. بررسی ترکیب بدن نشان داد که افزودن اسیدبوتیریک باعث بهبود میزان پروتئین لاشه تاسماهی سبیری شد. همچنین جیره غنی سازی شده با اسید بوتیریک باعث کاهش چربی لاشه شد. دلیل آن را می‌توان به کاهش pH دستگاه گوارش توسط یون‌های H^+ مربوط دانست که متعاقباً باعث افزایش هیدرولیز پروتئین‌ها (Freitag, 2007)، افزایش جذب مواد معدنی و همچنین بهبود مصرف و جذب مواد مغذی شده است (Sugiura et al. 2006; Pandey and Satoh, 2008). در برخی تحقیقات دیگر، نتایج به‌دست آمده با نتایج موجود اختلاف دارد. برای مثال، افزودن اسید مالیک به جیره غذایی تاسماهی سبیری (Alizadeh et al. 2018) و افزودن لاکتات و پروپینات به جیره چار قطبی *Salvelinus alpinus* (Ringø, 1991) تغییر مثبتی در ترکیب بدن ماهی ایجاد نکرد. همچنین، جیره غنی‌سازی شده با اسید مالیک باعث کاهش پروتئین و چربی، ولی افزایش خاکستر بدن در ماهی تیلاپیا شد (Hassaan et al. 2017). دلیل این اختلاف در نتایج را می‌توان به تفاوت در شرایط آزمایش، نوع و غلظت اسید آلی مورد استفاده، همچنین گونه، اندازه و

جیره *Salmo salar* (Gislason et al. 1994)، اسید بوتیریک در جیره *Oreochromis sp.* (Ng et al. 2009)، پلی‌هیدروکسی بوتیرات در جیره تاسماهی سبیری (Najdegerami et al. 2013)، اسید مالیک در جیره تاسماهی سبیری (Alizadeh et al. 2018) و سدیم دی‌فورمات در جیره *Salmo trutta caspius* (Kalantarian et al. 2020) که همگی نشان داده‌اند استفاده از اسیدهای آلی به‌تنهایی یا به‌همراه پروبیوتیک‌ها تأثیر مثبتی بر رشد نداشته‌اند. دلیل تناقضات در این نتایج را می‌توان به اختلاف در نوع و میزان اسید آلی استفاده شده در جیره، مدت استفاده از اسید آلی در تغذیه ماهی و گونه و سن ماهی مربوط دانست (Luckstadt, 2008). استفاده از پروتکسین در جیره غذایی موجب بهبود در رشد ماهی شد. افزودن پروتکسین به جیره برخی ماهیان از قبیل اسکار *Astronotus ocellatus* (Firouzbakhsh et al. 2011)، سی باس *Dicentrarchus labrax* (Gohary and Diab, 2014)، کپور معمولی *Cyprinus carpio* (Asadian et al. 2015) و تیلاپیای نیل *Oreochromis niloticus* (Ahmed and Sadek, 2014) باعث بهبود رشد شد. همچنین، افزودن دیگر انواع پروبیوتیک‌ها به جیره غذایی ماهیان مختلف مانند افزودن انتروکوکوس فاسیوم به جیره تیلاپیا (Wang et al. 2008) *Lactobacillus rhamnosus* به جیره غذایی قزل آلابی رنگین کمان (Hooshyar et al. 2020)، *Saccharomyces cerevisiae* به جیره تیلاپیا (Abdel- 2018) *Pediococcus acidilactici* به جیره *Aequidens rivulatus* (Tawwab et al. 2018)، لاکتوباسیلوس به جیره کپور *Lactobacillus plantarum* (Alishahi et al. 2018) و *Lactobacillus plantarum* به جیره تیلاپیا (Dawood et al. 2019) موجب افزایش رشد ماهی شد. در مقابل، Mahmoudi و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که استفاده از پروتکسین حتی در دوزهای متفاوت باعث بهبود رشد تاسماهی سبیری نمی‌شود. همچنین، افزودن پدیکوکوس اسیدی لاکتیکی به جیره *Lates calcalifer* (Ashouri et al. 2018) و باسیلوس سوبتیلیس به جیره تیلاپیا (Hassaan et al. 2018)

این اسید آلی و پروتکسین (به طور مجزا) با افزایش LAB همراه بود. به عبارتی، ترکیب این اسید آلی و پروتکسین باعث کاهش pH روده ماهیان نسبت به زمانی که از اسید آلی و پروتکسین به تنهایی استفاده کرده بودند، شد که نشان می‌دهد در این جیره‌ها اسیدهای آلی با ایجاد محیط اسیدی از رشد پاتوژن‌ها جلوگیری کرده و همچنین، باعث تحریک رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک ساکن روده و باکتری‌های پروبیوتیک موجود در پروتکسین شده که نهایتاً بهبود عملکرد پروبیوتیک را به همراه داشته است که این امر ممکن است باعث افزایش رشد ماهی شود (Ashouri et al. 2020). به‌طور مشابه، در مطالعات قبلی اثر هم‌افزایی استفاده توأم باسیلوس سوبتیلیس و اسیدمالیک در جیره تیلاپیا (Hassan et al. 2017)، استفاده توأم پدیکوکوس اسیدی لاکتیکی و سدیم آلزینات در جیره غذایی باس دریایی (Ashouri et al. 2020) در بهبود فلور میکروبی روده به اثبات رسیده است.

غنی‌سازی جیره تاسماهی سبیری با اسیدبوتیریک باعث افزایش لایزوزیم و کمپلمان سرم خون این ماهیان شد. لایزوزیم و کمپلمان نقش مهمی در ایمنی ذاتی موجود دارند (Akhter et al. 2015). لایزوزیم یک آنزیم هضم کننده موکوس با منشأ لوکوسیتی است که خاصیت دفاعی در برابر تهاجم میکروب‌ها دارد. این آنزیم به‌طور وسیع در طبیعت گسترش دارد و در ترشحات مختلف حیوانات مثل موکوس، بزاق، و بسیاری از بافت‌ها مثل خون و همچنین، در واکوئل‌های یاخته‌های گیاهی یافت می‌شود. لایزوزیم باعث شکسته شدن پیوند بتا ۱ به ۴ بین استیل مورامیک و ان استیل گلوکوزامین در دیواره یاخته‌ای (لایه پپتیدوگلیکان) باکتری‌های گرم مثبت می‌شود و به این وسیله از تهاجم این باکتری‌ها ممانعت به عمل می‌آورد. همچنین می‌تواند فعالیت مسیر فرعی بیگانه خوارها را برای از بین بردن باکتری‌های گرم منفی فعال کند (Saurabh and Sahoo, 2008). کمپلمان به‌علت عملکرد آن در فعال‌سازی یاخته‌های ایمنی، بیگانه خواری، کموتاکسیس، واکنش‌های التهابی و از بین بردن پاتوژن‌ها نقش اساسی در ایمنی ذاتی ماهی دارد (Boshra and Sunyer, 2006). فعالیت مسیر کمپلمان را می‌توان از طریق تعیین فعالیت لیزکنندگی سرم خون در پاسخ به

وضعیت فیزیولوژیک ماهی مربوط دانست (Osuigwe et al. 2005; Castillo et al. 2014). در تمامی جیره‌های ترکیب شده با اسید آلی (به‌تنهایی) کاهش pH جیره و روده و همچنین تغییر در تعداد کل باکتری‌های روده (TVB) و افزایش تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB) مشاهده شد. اسیدهای آلی در روده یون‌های هیدروژن تولید می‌کنند که باعث کاهش pH می‌شوند. اغلب باکتری‌های بیماری‌زا که به کاهش pH حساس هستند، در این محیط اسیدی از بین می‌روند یا رشدشان کاهش می‌یابد (Booth and Stratford, 2003). ولی تعداد باکتری‌های مفید مقاوم به اسید از قبیل لاکتوباسیل‌ها افزایش می‌یابد (Luckstadt, 2008). یافته‌های حاضر همسو با نتایج Salou و همکاران (۱۹۹۱)، Back و همکاران (۲۰۰۹) و Khoshhava و همکاران (۲۰۲۱) بود که نشان دادند استفاده از اسیدهای آلی در جیره ماهی باعث بهبود جمعیت میکروبی روده می‌شود. به‌طور کلی پذیرفته شده است که اثر ضد میکروبی اسیدهای آلی، به‌دلیل توانایی آنها در عبور از غشای نیمه نفوذ پذیر باکتری‌ها و رهاسازی یون‌های هیدروژن در سیتوپلاسم باکتری است (Booth and Stratford, 2003). افزودن پروتکسین تأثیر معنی‌داری بر pH جیره نداشت. با وجود این، در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی پروتکسین شاهد کاهش pH روده و TVB و افزایش (اندک) LAB بودیم. کاهش pH روده ممکن است به‌دلیل تولید اسیدهای آلی توسط پروبیوتیک‌های موجود در پروتکسین و به‌دنبال آن تولید یون H^+ باشد که در تحقیقات قبلی نیز به اثبات رسیده است (Ma et al. 2009). تغییر مثبت در فلور میکروبی روده ماهیان این تیمار را می‌توان با توجه به مطالعات قبلی توجیه کرد. مطالعات انجام شده (Macey and Coyne, 2006; Merrifield et al. 2010; Korkea-Aho et al. 2009) نشان داده است که پروبیوتیک‌ها در فرآیند رقابت با پاتوژن‌ها مکان‌های اتصال دستگاه گوارش را اشغال کرده و اجازه رشد به پاتوژن‌ها نمی‌دهند. بنابراین، احتمالاً به‌دلیل ذکر شده شاهد افزایش باکتری‌های اسیدلاکتیک نسبت به گروه شاهد بودیم. روده ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی ترکیب اسید بوتیریک و پروتکسین نیز موجب کاهش میزان pH شدند. این کاهش pH نسبت به تیمارهای تغذیه شده با

متفاوت در تیمارهای مختلف در تحقیق موجود می‌تواند ناشی از تفاوت در گونه و اندازه ماهی، میزان و نوع اسید آلی و پروبیوتیک مورد استفاده باشد (Luckstadt, 2008).

نتیجه‌گیری کلی

نتیجه حاصل از این تحقیق نشان داد افزودن اسید بوتیریک و پروتکسین به تنهایی موجب افزایش رشد، افزایش باکتری‌های اسید لاکتیک روده تاسماهی سبیری می‌شود، اما در جیره ترکیبی اسید بوتیریک با پروتکسین اثر هم‌افزایی در رشد حاصل نشد. با وجود این، در افزایش باکتری‌های مفید روده مؤثر بودند. جیره حاوی اسید بوتیریک و اسید بوتیریک + پروتکسین موجب افزایش پروتئین و کاهش چربی لاشه شد. ایمنی تاسماهی سبیری نیز تحت تأثیر اسید بوتیریک و اسید بوتیریک-پروتکسین قرار گرفت. به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت به‌کارگیری اسید بوتیریک (۲٪) و پروتکسین (۰.۱٪ معادل $10^8 \times 2$ CFU/g) به تنهایی اثر مثبت بر رشد و تغذیه ماهی داشتند. اگرچه استفاده توأم اسید بوتیریک و پروتکسین روی رشد اثر معنی‌داری نداشت، ولی موجب بهبود باکتری‌های مفید روده و ایمنی ماهیان شد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از دانشگاه تربیت مدرس به جهت پشتیبانی مالی و از زحمات پرسنل انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری رشت برای کمک در انجام کارهای کارگاهی و به جهت تأمین بچه ماهی کمال تشکر و سپاسگزاری به عمل می‌آید.

منابع

Abdel-Tawwab, M., Adeshina, I., Jenyo-Oni, A., Ajani, E.K., Emikp, B.O. 2018. Growth, physiological, antioxidants, and immune response of African catfish, *Clarias gariepinus* (B.), to dietary clove basil, *Ocimum gratissimum*, leaf extract and its susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *Fish and*

Shellfish Immunology 78: 346-354. doi: 10.1016/j.fsi.2018.04.057

Ali et al. 2011. افزایش لایزوزیم و کمپلمان در ماهیانی که از جیره غذایی حاوی اسیدبوتیریک استفاده کرده بودند، نشان‌دهنده اثربخشی این اسیدهای آلی در تحریک پاسخ‌های ایمنی غیر اختصاصی است. مشابه یافته‌های موجود، بهبود فعالیت لایزوزیم یا پروتئین‌های محافظتی دیگر در میگوی پاسبید *Litopenaeus vannamei* و ماهی آزاد اطلس *Salmo salar* گزارش شده است که با جیره غذایی غنی‌سازی شده با اسیدهای آلی و نمک‌های آن تغذیه شده بودند (Engstad et al. 1992; Jorgensen et al. 1993; Su et al. 2014). جیره غذایی همراه با پروتکسین (به‌تنهایی) افزایش معنی‌داری در فعالیت لایزوزیم و کمپلمان ایجاد نکرد (افزایش جزئی نشان داد). در ناهمسویی با نتیجه موجود، ترکیب پروبیوتیک‌ها در جیره غذایی ماهی توانسته است پاسخ‌های ایمنی غیر اختصاصی را در باس دریایی (Ashouri et al. 2018; El-Gohary and Diab, 2014)، تیلاپیا (Ferguson et al. 2010) و قزل‌آلای رنگین کمان (Hooshyar et al. 2020) افزایش دهد، در حالی که افزودن پروبیوتیک مورد استفاده (پروتکسین) به جیره غذایی تیلاپیای نیل هیچ تغییری در فعالیت لایزوزیم و کمپلمان ایجاد نکرد. ترکیب اسید بوتیریک + پروتکسین باعث افزایش سطح لایزوزیم و کمپلمان سرم خون نسبت به افزودن اسید بوتیریک و پروتکسین به تنهایی شد. نتایج حاصل از تحقیقات پیشین اثر هم‌افزایی استفاده توأم اسید اسکوربیک و لاکتوباسیلوس رامنوسوس در قزل‌آلا (تکمه چی و همکاران، ۱۳۹۶)، پروتکسین و اسید بوتیریک در تیلاپیای نیل (Ahmed and Sadek, 2014) و سدیم دی‌فورمات و پروبیوتیک بیواکوا در جیره ماهی آزاد خزر (Kalantarian et al. 2020) را نشان می‌دهد. وجود نتایج

Shellfish Immunology 78: 346-354. doi: 10.1016/j.fsi.2018.04.057

Ahmed, H.A., Sadek, K.M. 2014. Impact of dietary supplementation of sodium butyrate and/or protexin on the growth performance, some blood parameters, and immune response of *Oreochromis*

- Niloticus*. International Journal of Agricultural Researches 3: 985-991.
- Alishahi, M., Tulaby Dezfuly, Z., Mohammadian, T., Mesbah, M. 2018. Effects of two probiotics, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus bulgaricus* on growth performance and intestinal lactic acid bacteria of *Cyprinus Carpio*. Iranian Journal of Veterinary Medicine 12: 207-218. doi: 10.22059/ijvm.2018.235444.1004816
- Alizadeh, H., Ouraji, H., Falahatkar, B., Efatpanah, I. 2018. Effect of dietary Malic acid on growth performance and body composition of juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt, 1869). Iranian Scientific Fisheries Journal 27: 1-12. doi: 10.22092/ISFJ.2019.118318
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis of the Association Official Analytical Chemists, In: Cunnill, PA., ed. 16th ed. Arlington, USA: AOAC International.
- Asadian, M., Shahsavani, D., Kazerani, H.R. 2015. Growth promoting effects of a multi-strain probiotic on common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. Iran Journal of Veterinary Sciences and Technology 7: 63-74. doi: 10.22067/veterinary.v7i2.44554
- Ashouri, G., Soofiani, N.M., Hoseinifar, S. H., Jalali, S.A.H., Morshedie, V., Valinassab, T., Bagheri, D., Doanh, H.V., Mozanzadeh, M.T. 2018. Combined effects of dietary low molecular weight sodium alginate and *Pediococcus acidilactici* on growth performance, haematological and innate immune responses of Asian sea bass (*Lates calcarifer*) juveniles. Fish and Shellfish Immunology 79: 34-41. doi: 10.1016/j.fsi.2018.05.009
- Ashouri, G., Soofiani, N.M., Hoseinifar, S.H., Jalali, S.A.H., Morshedie, V., Valinassab, T., Bagheri, D., Doanh, H. V., Mozanzadeh, M.T., Carnevali, O. 2020. Influence of dietary sodium alginate and *Pediococcus acidilactici* on liver antioxidant status, intestinal lysozyme gene expression, histomorphology, microbiota, and digestive enzymes activity, in Asian sea bass (*Lates calcarifer*) juveniles. Aquaculture 518: 734638. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734638
- Baruah, K., Pal, A.K., Sahu, N.P., Jain K.K., Mukherjee, S.C., Debnath, D. 2005. Dietary protein level, microbial phytase, citric acid and their interactions on bone mineralization of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles. Aquaculture Research 36: 803-812. doi: 10.1111/j.1365-2109.2005.01290.x
- Castillo, S., Rosales, M., Pohlenz, C., Gatlin III, D.M. 2014. Effects of organic acids on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. Aquaculture 433: 6-12. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.05.038
- Dawood, M.A.O., Magouz, F.I., Salem, M.F.I., AbdelDaim, H.A. 2019. Modulation of digestive enzyme activity, blood health, oxidative responses and growth related gene expression in GIFT by heat-killed *Lactobacillus plantarum* (L-137). Aquaculture 505: 127-136. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.02.053
- De Wet, L. 2005. Organic acids as performance enhancers. Aqua Feeds: Formulation and Beyond 2: 12-14.
- El-Gohary, M.S., Diab, A.M. 2014. Some studies on the effect of protexin on immune status of cultured Seabass fingerlings. Alexandria Journal of Veterinary Sciences 41: 109-119. doi: 10.5455/ajvs.153599
- Fazio, F., Marafioti, S., Arfuso, F., Piccione, G., Faggio, C. 2013. Influence of different salinity on haematological and biochemical parameters of the widely cultured mullet *Mugil cephalus*. Marine and Freshwater Behaviour and

- Physiology 46: 211-218. doi: 10.1080/10236244.2013.817728
- Firouzbakhsh, F., Noori, F., Khalesi, M.K., Jani-Khalili, K. 2011. Effects of a probiotic, protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. Fish Physiology and Biochemistry 37: 833-842. doi: 10.1007/s10695-011-9481-4
- Gislason, G., Olsen, R.E., Ringø, E. 1994. Lack of growth-stimulating effect of lactate on Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Aquaculture and Fisheries Management 25: 861-862. doi: 10.1111/j.1365-2109.1994.tb00750.x
- Hai, N.V. 2015. The use of probiotics in aquaculture. Applied Microbiology 119: 917-93. doi: 10.1111/jam.12886
- Hassaan, M.S., Soltan, M.A., Jarmołowicz, 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 1-11. doi: 10.1111/anu.12536.
- Hooshyar, Y., Abedian Kenari, A., Paknejad, H., Gandomi, H. 2020. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 on different parameters related to health status of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the protection against *Yersinia ruckeri*. Probiotics and Antimicrobial Proteins 12: 1370-1384. doi: 10.1007/s12602-020-09645-8
- Hossain, M.A., Pandey, A., Satoh, S. 2007. Effects of organic acids on growth and phosphorus in red sea bream *Pagrus major*. Fisheries Sciences 73: 1309-1317. doi: 10.1111/j.1444-2906.2007.01469.x
- Jafarnodeh, A., Tukmechi, A., Najd Grami, E.H., Hajimoradlo, A.M., Noori, F. 2020. Study of synergistic effects of potassium-sorbate and *Lactobacillus casei* on the activity of digestive enzymes, intestinal histomorphology and resistance against pathogenic bacteria (*Yersinia ruckeri*) in rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Applied Ichthyological Research 8: 51-59. doi: 10.29252/jair.8.2.51
- Jami, M.J., Abedian Kenari, A., Paknejad, H., Mohseni, M. 2019. Effects of dietary b-glucan, mannan oligosaccharide, *Lactobacillus plantarum* and their combinations on growth performance, immunity and immune related gene expression of Caspian trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877). Fish and Shellfish Immunology 91: 202-208. doi: 10.1016/j.fsi.2019.05.024
- Kalantarian, S.H., Mirzargar, S.S., Rahmati-Holasoo, H., Sadeghinezh, D.J., Mohammadian, T. 2020. Effects of oral administration of acidifier and probiotic on growth performance, digestive enzymes activities and intestinal histomorphology in *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877). Iranian Journal of Fisheries Sciences 19: 1532-1555. doi: 10.22092/ijfs.2019.119077
- 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 Sciences and Technology 171: 68-73. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2011.10.001
- Khoshhava, M.B., Abedian Kenari, A., Mirzakhani, M.K. 2021. The effects of concurrent of citric acid and soybean based diets on growth performance, body composition, haemobiochemical indices, digestibility and fatty acid profile in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture Nutrition 27: 1671-1682. doi: 10.1111/anu.13306
- Kumar, P., Jain, K.K., Sardar, P., Sahu, N. P., Gupta, S. 2017. Dietary supplementation of acidifier: effect on growth performance and haemato-biochemical parameters in the diet of *Cirrhinus*

- mrigala* juvenile. *Aquaculture International* 25: 2101-2116. doi: 10.1007/s10499-017-0176-4
- Luckstadt, C. 2008. The Use of Acidifiers in Fish Nutrition. *CABI Reviews* 3: 1-8. doi: 10.1079/PAVSNR20083044
- Ma, C., Cho, Y., Oh, K.H. 2009. Removal of pathogenic bacteria and nitrogen by *Lactobacillus* spp. JK8 and JK-11. *Aquaculture* 287: 266-270. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.10.061
- Mahious, A.S., Gatesoupe, F.J., Hervi, M., Metailler, R., Ollevier, F. 2006. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture International* 14: 219-229. doi: 10.1007/s10499-005-9003-4
- Mahmoudi, K., Zamini, A.A., Yazdsni, M.A., Kazemi, R., Jalilipour, J. 2012. Effect of protexin probiotic product on some growth parameters and body composition of the cultured Siberian (*Acipenser baeri*). *Fisheries* 5: 39-48.
- Matani Bour, H.A., Esmaili, M., Abedian Kenari, A. 2018. Growth performance, muscle and liver composition, blood traits, digestibility and gut bacteria of beluga (*Huso huso*) juvenile fed different levels of soybean meal and lactic acid. *Aquaculture Nutrition* 24: 1361-1368. doi: 10.1111/anu.12673
- Matyar, F., Dincers, S., Kaya, A., Colak, O. 2004. Prevalence and resistance to antibiotics in Gram negative bacteria isolated from retail fish in Turkey. *Annals of Microbiology* 54: 151-160.
- Merrifield, D.L., Bradley, G., Baker, R.T.M., Davies, S.J. 2010. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria post antibiotic treatment. *Aquaculture Nutrition* 16: 496-503. doi: 10.1111/j.1365-2095.2009.00688.x
- Najdegerami, E.H., Baruah, K., Shiri, A., Rekecki, A., Broeck, W.V.D., Sorgeloos, P., Boon, N., Bossier, P., De Schryver, P. 2013. Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) larvae fed Artemia nauplii enriched with poly-b-hydroxybutyrate (PHB): effect on growth performance, body composition, digestive enzymes, gut microbial community, gut histology and stress tests. *Aquaculture Research* 46: 801-812. doi: 10.1111/are.12231
- Neissi, G., Rafiee, M., Nematollahi, M., Safari, O. 2013. The effect of *Pediococcus acidilactici* bacteria used as probiotic supplement on the growth and non-specific immune responses of green terror, *Aequidens rivulatus*. *Fish and Shellfish Immunology* 35: 1976-1980. doi: 10.1016/j.fsi.2013.09.036
- Ng, W.K., Koh, C.B., Sudesh, K., Siti-Zahrah, A. 2009. Effects of dietary organic acids on growth, nutrient digestibility and gut microflora of red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp., and subsequent survival during a challenge test with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture Research* 40: 1490-1500. doi: 10.1111/are.12492.
- Ng, W.K., Ling, L.C., Romano, N., Kua, B.C. 2017. Dietary short-chain organic acids enhanced resistance to bacterial infection and hepatopancreatic structural integrity of the giant freshwater pawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *International Aquaculture Research* 9: 293-302. doi: 10.1007/s40071-017-0177-y
- Ringø, E. 1991. Effects of dietary lactate and propionate on growth and digesta in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquaculture* 96: 321-333. doi: 10.1016/0044-8486(91)90161-Y
- Sugiura, S.H., Roy, P.K., Ferraris, R.P. 2006. Dietary acidification enhances phosphorus digestibility but decreases H⁺/K⁺ ATPase expression in rainbow

- trout. *Experimental Biology* 209: 3719-3728. doi: 10.1242/jeb.02436
- Tabrizi, J.M., 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.
- Van Dam, H. 2006. Organic acids and their salts. *Feed Mix* 14: 28-31.
- Vielma, J., Ruohonen, K., Lall, S.P. 1999. Supplemental citric acid and particle size of fish bone-meal influence the availability of minerals in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Nutrition* 5: 65-71. doi: 10.1046/j.1365-2095.1999.00092.x
- Wang, Y.B., Tian, Z.Q., Yao, J.T., Li, W.F. 2008. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture* 277: 203-207. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.03.007
- Wuertz, S., Lutz, I., Gessner, J., Loeschau, P., Hogans, B., Kirschbaum, F., Kloas, W. 2006. The influence of rearing density as environmental stressor on cortisol response of shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*). *Journal of Applied Ichthyology* 22: 269-273. doi: 10.1111/j.1439-0426.2007.00966.x
- Yano, T. 1992. Assays of Hemolytic Complement Activity. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Kaattari, S.L., Rowley, A.F. (Eds.). *Techniques in Fish Immunology*. S.O.S Publication, Fair Haven, NJ, 131-141.
- Zare, R., Abedian Kenari, A., Yazdani Sadati, M. 2021. Influence of dietary acetic acid, protexin (probiotic), and their combination on growth performance, intestinal microbiota, digestive enzymes, immunological parameters, and fatty acids composition in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869). *Aquaculture International* 29: 891-910. doi: 10.1007/s10499-021-00652-2