

اثرات سیترات سدیم جیره بر عملکرد رشد، ترکیبات شیمیایی بدن و فعالیت آنزیم‌های گوارشی بچه ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*)

ابراهیم ستوده*، سینا سقایی، میلاد دهقانی

گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران.

*نویسنده مسئول: e.sotoudeh@pgu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۹/۲/۲۰

تاریخ دریافت: ۹۸/۵/۳

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی تاثیر سیترات سدیم جیره بر عملکرد رشد، ترکیبات شیمیایی بدن و فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*) تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقدار اندک پودر ماهی انجام شد. بچه ماهیان با میانگین وزن اولیه $6/5 \pm 0/2$ گرم در سه گروه با تعداد ۱۰ قطعه بچه ماهی در هر تکرار تقسیم شده و به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. گروه‌های آزمایشی شامل گروه شاهد، جیره حاوی ۵ گرم بر کیلوگرم سیترات سدیم (SC5) و جیره حاوی ۱۰ گرم بر کیلوگرم سیترات سدیم (SC10) بودند. در پایان آزمایش، شاخص‌های عملکرد رشد مثل میانگین وزن نهایی، درصد افزایش وزن و ضریب رشد ویژه بچه ماهیان تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی سیترات سدیم به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد بالاتر بود ($P < 0/05$). میزان پروتئین خام و چربی خام لاشه بچه ماهیان گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۵ گرم در کیلوگرم سیترات سدیم نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی اندکی بالاتر بود، با این حال نتایج نشان داد این تفاوت معنی‌دار نیست ($P > 0/05$). فعالیت ویژه پروتئاز کل ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی سیترات سدیم (۵ و ۱۰ گرم بر کیلوگرم جیره) به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد بالاتر بود ($P < 0/05$). فعالیت آنزیم‌های گوارشی لیپاز و آمیلاز در بین گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($P > 0/05$). در مجموع نتایج نشان داد که افزودن ۵ گرم سیترات سدیم در جیره باعث بهبود رشد و افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی در بچه ماهی شانک زرد باله می‌شود.

واژگان کلیدی: نمک اسید آلی، رشد، مکمل غذایی، پروتئین گیاهی، فعالیت آنزیمی.

مقدمه

رشد سریع آبزی پروری مدرن به عوامل متعددی وابسته است که مهم‌ترین آن‌ها استفاده بیشتر از خوراک‌های فرموله شده و افزایش تراکم سیستم‌های پرورشی است (Tal et al., 2009). خوراک‌های آبزیان از مجموعه وسیعی از مواد تشکیل می‌شوند که نیازهای تغذیه‌ای حیوانات را برای انجام عملکردهای طبیعی فیزیولوژیکی از جمله حفظ سیستم ایمنی، رشد و تکثیر برطرف می‌سازند. برای اطمینان از مصرف، هضم، جذب و انتقال مواد مغذی به سلول‌ها، طیف وسیعی از مواد افزودنی غیرمغذی در خوراک آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرد. مواد افزودنی خوراکی به ترکیبات یا مواد اولیه غیر تغذیه‌ای به‌کار رفته در فرمولاسیون‌ها خوراک اطلاق می‌شود که بر خواص فیزیکی یا شیمیایی خوراک یا بر عملکرد و کیفیت حیوانات آبزی تاثیر می‌گذارد (Barrows, 2000). خصوصیات شیمیایی این مواد افزودنی

خوراکی بسیار متنوع است و استفاده از آن‌ها در فرمولاسیون خوراک تجاری برای گونه‌های آبزی به طرز چشمگیری متفاوت است. افزودنی‌هایی که بر کیفیت خوراک‌های تجاری تاثیر می‌گذارند شامل پلت چسبان‌ها، نگهدارنده‌ها (مانند ترکیبات ضد میکروبی و آنتی اکسیدان‌ها) و محرک‌های تغذیه‌ای هستند (NRC, 2011). این گروه از مواد افزودنی برای دستیابی و حفظ خواص فیزیکی و شیمیایی مطلوب خوراک استفاده می‌شوند. دیگر مواد افزودنی که می‌توانند به‌طور مستقیم بر عملکرد حیوانات آبزی یا کیفیت محصول تاثیر بگذارد، شامل پروبیوتیک‌ها، پری بیوتیک‌ها، اسیدهای آلی و عصاره‌های گیاهی یا حیوانی هستند (Dawood et al., 2015; Ng and Koh, 2016).

اسیدهای آلی اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه، اسیدهای چرب فرار یا اسیدهای کربوکسیلیک ضعیف، شامل فرمیک، سیتریک، بنزویک و لاکتیک

اثرات ضد میکروبی اسیدهای آلی در برخی از آزمایش‌ها مشخص شده است. به طوری که کاربرد خوراکی اسیدهای آلی در این مطالعات باعث کاهش مرگ و میر ماهیان در معرض باکتری‌های بیماری‌زا گردیده است.

ماهی شانک زرد باله *Acanthopagrus latus* به خانواده شانک ماهیان تعلق دارد. این ماهی از گونه‌های ساحلی محسوب می‌شود و معمولاً در آب-های کم عمق ساحلی زندگی می‌کند (Bromage and Robert, 2001). این گونه یکی که از ماهیان شکارچی متوسط می‌باشد و از نظر اقتصادی یک غذای مهم برای کشورهای مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری غرب اقیانوس هند و همچنین خلیج فارس می‌باشد، یکی از گونه‌های اقتصادی و پرطرفدار در سواحل ایران و کشورهای حاشیه خلیج فارس و دریای عمان محسوب می‌گردد. از طرفی این گونه تحمل بالایی نسبت به تغییرات شوری دارد و دارای رشد مناسبی بوده و بسته به شرایط فیزیوشیمیایی آب بین یک تا یک و نیم سال به اندازه بازاری می‌رسد. این ماهی را می‌توان در استخرهای خاکی، پن‌ها و قفس‌های دریایی با تراکم بالا قابل پرورش بوده و به راحتی به شرایط تکثیر در مراکز تکثیر و غذای دستی عادت می‌کند. از این‌رو مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات نمک اسید آلی سیترات سدیم جیره بر عملکرد رشد، ترکیبات شیمیایی بدن و فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی شانک زردباله به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

ماهی و شرایط پرورش: این تحقیق در سالن آبزیان دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج فارس انجام شد. برای این کار ۲۰۰ قطعه بچه ماهی شانک زرد باله با وزن اولیه و تقریبی $6/5 \pm 0/2$ گرم از بندر امام خمینی تامین و تا شروع آزمایش در تانک-های فایبرگلاس ۲۰۰ لیتری به مدت دو هفته نگهداری شدند. پس از پایان دوره سازگاری، بچه ماهیان در ۹ تانک با تراکم ۱۰ قطعه بچه ماهی در ۶۰ لیتر در قالب طرح کاملاً تصادفی توزیع شدند. غذادهی ماهیان روزانه به صورت دستی در دو نوبت با فاصله زمانی مناسب (۱۰:۰۰ و ۱۶:۰۰) و در حد سیری ماهیان انجام شد. در هر روز قبل از اولین

اسیدها هستند (Bai et al., 2015; Elala and Ragaa, 2015; Ng and Koh, 2016). از دهه‌ها قبل اسیدهای آلی به دلیل خواص ضد میکروبی‌شان به عنوان ماده نگهدارنده خوراک در غذای دام و همچنین توانایی آن‌ها در افزایش رشد، بهره‌وری مواد مغذی و مقاومت موجودات آبی در برابر بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Ng and Koh, 2016). در دستگاه گوارش موجودات آبی، اسیدهای آلی با نفوذ در دیواره سلولی و آزاد کردن پروتون در سیتوپلاسم مانع رشد باکتری‌های گرم منفی می‌شوند (Bai et al., 2015). از این‌رو، باکتری‌ها برای حفظ تعادل اسیدیته درون سلولی مقدار زیادی آدنوزین تری فسفات (ATP) جهت دفع پروتون‌ها مصرف می‌کنند، بنابراین انرژی سلولی کاهش می‌یابد و منجر به مرگ باکتری می‌شود (Defoirdt et al., 2009). همچنین اسیدهای آلی و نمک‌هایشان می‌توانند نقش‌های تغذیه‌ای داشته باشند؛ آن‌ها در چندین مسیر متابولیک تولید انرژی شرکت دارند، از جمله برای تولید آدنوزین تری فسفات (ATP) در چرخه اسید سیتریک یا چرخه کربوکسیلیک اسید (da Silva et al., 2013).

تاکنون تحقیقات اندکی در مورد استفاده از اسیدهای آلی در غذای آبزیان منتشر شده است (Ng and Koh, 2016). به تازگی مطالعات زیادی در زمینه مشخص کردن اثرات اسیدهای آلی و نمک-هایشان در رژیم غذایی بر عملکرد رشد، کارایی مواد مغذی و مقاومت در برابر بیماری در چندین گونه ماهی پرورشی مهم تجاری مانند قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*)، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و تیلپیا (*Oreochromis niloticus*) انجام شده است (Ringø, 1991; Gislason et al., 1994; Vielma et al., 1999; Safari et al., 2017; Yilmaz, 2019). علیرغم نتایج متناقض این تحقیقات، به نظر می‌رسد که اسیدهای آلی و یا نمک‌هایشان پتانسیل خوبی به-عنوان مکمل غذایی برای بهبود عملکرد رشد، مصرف غذا، هضم مواد مغذی، مقاومت در برابر بیماری و همچنین تغییر جمعیت میکروارگانیسم‌های روده حیوانات آبی دارند (Lim et al., 2010). همچنین

جدول ۱ - ترکیبات مورد استفاده برای ساخت جیره‌های آزمایشی (بر حسب درصد).

جیره های آزمایشی		شاهد	ترکیبات اولیه
SC10	SC5		
۱۷	۱۷	۱۷	پودر ماهی ^۱
۴۰/۲	۴۰/۲	۴۰/۲	پودر سویا ^۱
۲	۲	۲	آرد گندم
۱۶/۷	۱۶/۷	۱۶/۷	گلوتن ذرت
۹	۹	۹	گلوتن گندم
۱	۰/۵	۰	سیترات سدیم ^۲
۰	۰/۵	۱	سلولز
۷	۷	۷	روغن ماهی
۱	۱	۱	لسیتین سویا
۱	۱	۱	ماده معدنی
۱	۱	۱	مخلوط ویتامینی
۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	آنتی اکسیدان
۲	۲	۲	روغن سویا
۰/۵	۰/۵	۰/۵	متیونین
۰/۵	۰/۵	۰/۵	لیزین
۱	۱	۱	دی کلسیم فسفات
ترکیب شیمیایی (درصد وزن خشک)			
۴۸/۳۴	۴۸/۴۱	۴۸/۲۱	پروتئین خام
۱۲/۴۲	۱۲/۳۵	۱۲/۳۸	چربی
۹/۶۱	۹/۵۸	۹/۶۶	خاکستر
۱۰/۳	۱۰/۲	۱۰/۳	رطوبت
۱۹/۶۳	۱۹/۶۵	۱۹/۶۲	انرژی* (kJ/g)

^۱تهیه شده از کارخانه خوراک دام طیور و آبزیان ۲۱ بیضا، فارس.

^۲سیترات سدیم (Sigma 71497)، شرکت مرک، آلمان.

*انرژی (ناخالص) کل در هر گرم جیره از طریق حاصل ضرب مقدار انرژی موجود در هر گرم پروتئین (۲۳/۶ kJ)، چربی

(۳۹/۵ kJ) و کربوهیدرات (۱۷/۲ kJ) تعیین شد (NRC, 2011).

گلوتن گندم به‌عنوان منابع پروتئینی استفاده شدند. ابتدا جیره‌های آزمایشی با سطح پروتئین (۴۸ درصد) و چربی (۱۲ درصد) (Torfi Mozanzadeh *et al.*, 2017) یکسان با نرم‌افزار فرموله شده و سپس ترکیبات خشک و روغن‌ها براساس جدول ۱ توزین شدند. در ادامه مقدار کافی آب و به ترکیبات خشک اضافه شد و پلت‌های غذایی با اندازه مناسب تولید گردید. برای خشک کردن پلت‌های تولید شده از دستگاه خشک کن با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. بعد از خشک شدن، غذاها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

زیست‌سنجی و شاخص‌های رشد و تغذیه: در پایان آزمایش برای بررسی شاخص‌های رشد و تغذیه، غذاهای ماهیان به‌مدت ۲۴ ساعت قطع گردید. پس

وعده غذایی، آب تانک‌ها به میزان حداقل ۳۰ درصد سیفون و تعویض گردید. شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی آب شامل دما، اکسیژن و pH به صورت روزانه اندازه‌گیری شد. میانگین دمای آب 22 ± 0.5 ، میانگین شوری 10 ± 0.2 و میانگین pH 7.0 ± 0.5 ثبت شد. این آزمایش در یک مکان سرپوشیده و با شرایط دوره نوری طبیعی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی انجام شد.

طراحی آزمایش ساخت جیره‌ها: در این بررسی از ۳ تیمار غذایی با ۳ تکرار و سطوح افزودنی صفر (شاهد)، ۵ (SC5) و ۱۰ (SC10) گرم سیترات سدیم (Sodium citrate; Sigma 71497) در هر کیلوگرم جیره غذایی استفاده شد (Ng and Koh, 2016). پودر ماهی، سویا، آرد گندم و گلوتن ذرت و

ماهیان بر روی ظرف حاوی یخ جداسازی شد. بعد از جداسازی نمونه‌های روده تا زمان سنجش فعالیت آنزیم‌ها در ازت مایع نگهداری شدند. به‌منظور تهیه عصاره‌ی آنزیمی، نمونه‌ها با بافر Tris-HCl ۵۰ میلی مولار، CaCl_2 ۲۰ میلی مولار و KCl ۵۰ میلی مولار ($\text{pH}=8/5$) به نسبت ۱ به ۹ مخلوط و هم‌وزن شده و سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با 30000 g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت حاصل در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. فعالیت آنزیم گوارشی لپیز در بچه ماهیان شانک زرد باله براساس روش Iijima و همکاران (۱۹۹۸) و با استفاده از پارا-نیترترو فنیل مرستات به‌عنوان سوسترای اختصاصی سنجش شد. فعالیت آنزیمی پروتئاز کل براساس هیدرولیز کازئین به‌عنوان سوسترا و با استفاده از روش Walter (۱۹۸۴) اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه مخلوط واکنش آنزیمی (حاوی کازئین ۱ درصد، بافر Tris-HCl ۰/۱ مولار و نمونه آنزیمی) به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس واکنش آنزیمی با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید ۱۲ درصد متوقف و به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور 10000 rpm سانتریفیوژ و بعد از جداسازی بخش رویی میزان جذب نوری در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت شد. سنجش فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز براساس روش Bernfeld (۱۹۵۵) و با استفاده از نشاسته به‌عنوان سوستر صورت گرفت. پروتئین محلول کل توسط روش برادفورد (۱۹۷۶) با استفاده از غلظت‌های مختلف آلبومین سرم گاوی به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری گردید.

روش آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها: در پایان آزمایش نتایج شاخص‌های رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و ترکیبات شیمیایی بدن با استفاده از نرم‌افزار EXCEL 2013 جمع‌آوری شد. از نرم‌افزار آماری SPSS ۱۸ برای تحلیل نتایج استفاده شد. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov مورد ارزیابی قرار گرفت و از آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA برای مقایسه کلی داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون Tukey's با سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

از بیهوشی (۲ فنوکسی اتانول با غلظت ۲۰۰ ppm) وزن (ترازوی با دقت ۰/۱ گرم) و طول (با دقت ۱ میلی‌متر) تمام بچه ماهیان هر تانک ثبت و شاخص‌های رشد با استفاده از معادلات زیر محاسبه گردید (Esmaili et al., 2019).

ضریب تبدیل غذایی (FCR) = مقدار غذای خورده شده (گرم) / افزایش وزن بدن (گرم)

درصد افزایش وزن بدن (WG) = میانگین وزن ثانویه (گرم) - میانگین وزن اولیه (گرم) / میانگین وزن اولیه (گرم) $\times 100$

ضریب رشد ویژه (SGR) = $\left\{ \frac{\text{لگاریتم طبیعی میانگین وزن نهایی} - \text{لگاریتم طبیعی میانگین وزن اولیه}}{\text{روزهای پرورش}} \right\} \times 100$

شاخص وضعیت (CF) = وزن نهایی (گرم) $\times 100$ / (طول (سانتی‌متر))^۳

نرخ بازدهی پروتئین (PER) = وزن تر تولید شده (گرم) / پروتئین مصرفی (گرم) $\times 100$

بازماندگی (درصد) = (تعداد ماهی در شروع آزمایش / تعداد ماهی‌ها در انتهای آزمایش) $\times 100$

سنجش ترکیبات شیمیایی بدن: در پایان آزمایش ۳ قطعه بچه ماهی از هر تکرار به‌طور تصادفی انتخاب و تا زمان انجام آنالیزهای شیمیایی (درصد رطوبت، چربی، خاکستر و پروتئین) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آنالیزهای تقریبی جیره غذایی آزمایشی و لاشه با استفاده از روش‌های استاندارد AOAC (۲۰۰۰) و با ۳ تکرار انجام شد. میزان رطوبت به وسیله‌ی خشک کردن نمونه‌ها در آون (Memert, Germany) در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت تا رسیدن به وزن ثابت تعیین گردید. خاکستر به‌وسیله‌ی سوزاندن نمونه‌ها در کوره (Muffle furnace, Isuzu, Tokyo, Japan) در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ساعت محاسبه گردید. چربی خام نمونه‌ها با استخراج چربی به روش سوکسله و با استفاده از حلال اتر با رسیدن به نقطه جوش ۵۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد در استخراج کننده سوکسله اندازه‌گیری شد. میزان پروتئین خام با ضرب نیتروژن نمونه در ضریب ۶/۲۵ و به روش کج‌جدال تعیین شد.

سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی: در انتهای آزمایش و پس از بیهوشی، دستگاه گوارش بچه

جدول ۲ - عملکرد رشد و کارایی غذایی بچه ماهیان شانک زرد باله تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی پس از ۸ هفته غذاهای (میانگین \pm خطای استاندارد).

شاخص‌های رشد ^۱	تیمارها ^۲		
	شاهد	SC5	SC10
وزن اولیه (گرم)	۶/۵ \pm ۰/۲	۶/۵ \pm ۰/۲	۶/۵ \pm ۰/۲
وزن نهایی (گرم)	۱۱/۱۸ \pm ۰/۹ ^b	۱۳/۸۶ \pm ۰/۹۲ ^a	۱۳/۶۵ \pm ۰/۱۳ ^a
افزایش وزن (%)	۷۲/۰۹ \pm ۱۴/۰۹ ^a	۱۱۳/۳ \pm ۱۴/۲۹ ^a	۱۱۰/۱ \pm ۱۸/۸۲ ^a
ضریب رشد ویژه (% day ⁻¹)	۰/۸۵ \pm ۰/۱۳ ^b	۱/۱۸ \pm ۰/۱۰ ^a	۱/۱۵ \pm ۰/۱۴ ^a
ضریب تبدیل غذایی	۱/۸۴ \pm ۰/۱۵ ^a	۱/۵۱ \pm ۰/۰۶ ^b	۱/۶۲ \pm ۰/۱۴ ^{ab}
شاخص وضعیت	۱/۴۲ \pm ۰/۰۸ ^a	۱/۶۱ \pm ۰/۱۳ ^a	۱/۵۸ \pm ۰/۱۷ ^a
بازماندگی (%)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

^۱حروف انگلیسی غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

^۲SC5؛ ۵ گرم سیترات سدیم در کیلوگرم غذا، SC10؛ ۱۰ گرم سیترات سدیم در کیلوگرم جیره.

جدول ۳ - ترکیبات شیمیایی بدن بچه ماهی شانک زرد باله تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی پس از ۸ هفته غذاهای (میانگین \pm خطای استاندارد).

تیمار ^۲	ترکیبات بیوشیمیایی بدن ^۱		
	پروتئین	چربی	خاکستر
شاهد	۱۵/۰۶ \pm ۰/۹ ^a	۶/۰ \pm ۲۰/۴ ^a	۴/۱۵ \pm ۰/۴ ^a
SC5	۱۶/۵۶ \pm ۰/۴ ^a	۶/۷۰ \pm ۰/۳ ^a	۴/۱۳ \pm ۰/۳ ^a
SC10	۱۵/۸۲ \pm ۰/۱ ^a	۵/۸۰ \pm ۰/۲ ^a	۳/۸۲ \pm ۰/۳ ^a

^۱حروف انگلیسی غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

^۲SC5؛ ۵ گرم سیترات سدیم در کیلوگرم غذا، SC10؛ ۱۰ گرم سیترات سدیم در کیلوگرم جیره.

نتایج

ماهیان گروه‌های مختلف آزمایشی اختلاف معنی‌داری نشان ندادند ($P > 0.05$). همچنین میزان خاکستر و رطوبت بدن بچه‌ماهیان نیز در بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$).

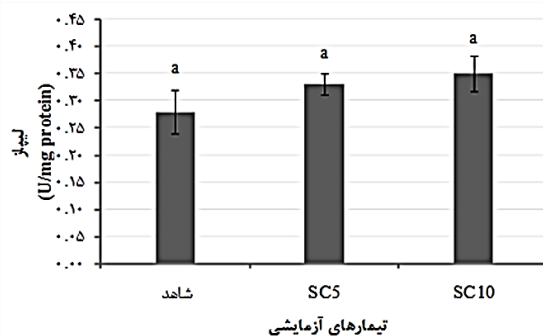
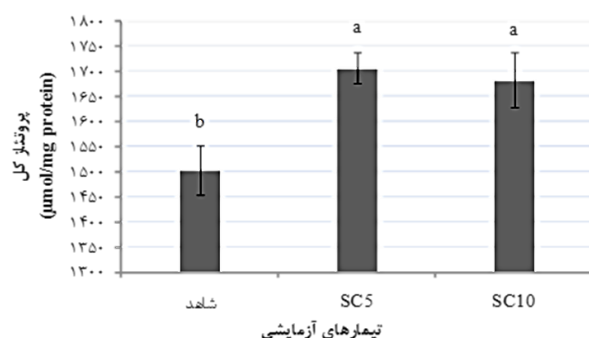
فعالیت آنزیم‌های گوارشی: فعالیت آنزیم‌های گوارشی پروتئاز کل، لیپاز و آمیلاز بچه ماهیان شانک زرد باله در شکل ۱ نمایش داده شده است. در پایان آزمایش فعالیت ویژه پروتئاز کل بچه ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی سیترات سدیم (۵ و ۱۰ گرم بر کیلوگرم جیره) به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد بالاتر بود ($P < 0.05$) و در بین دو گروه SC5 و SC10 اختلاف معنی‌داری یافت نشد. فعالیت آنزیم لیپاز و همچنین فعالیت آنزیم آمیلاز با افزایش سیترات سدیم جیره روند افزایشی داشت ولی این افزایش معنی‌دار نبود ($P > 0.05$) (شکل ۱).

بحث

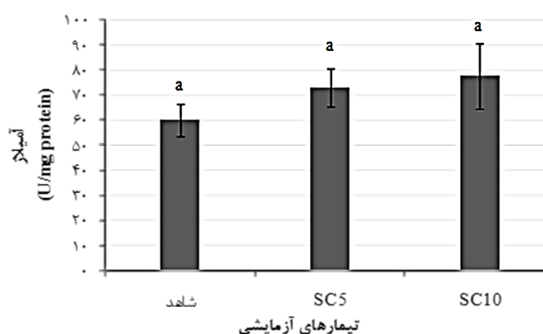
اسیدهای آلی و نمک‌های آن‌ها به‌عنوان افزودنی‌های خوراکی در افزایش عملکرد رشد، ایمنی و قابلیت هضم مواد مغذی در گونه‌های آبی مورد استفاده قرار

جدول ۲ شاخص‌های رشد و تغذیه بچه ماهیان شانک زرد باله تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی را در پایان آزمایش نشان می‌دهد. میانگین وزن نهایی، درصد افزایش وزن و ضریب رشد ویژه بچه ماهیان تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های سیترات سدیم به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد بالاتر بود ($P < 0.05$). ضریب تبدیل غذایی در بچه ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی مکمل سیترات سدیم نسبت به گروه شاهد نسبت کم‌تر به‌دست آمد، با این حال این کاهش فقط در گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۵ گرم در کیلوگرم سیترات سدیم (SC5) معنی‌دار بود ($P < 0.05$). شاخص وضعیت در بین گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($P > 0.05$). در طول آزمایش هیچ‌گونه مرگ و میری مشاهده نشد و درصد بازماندگی همه تیمارهای آزمایش ۱۰۰ درصد بود.

ترکیبات شیمیایی بدن: نتایج آنالیز شیمیایی لاشه بچه ماهیان شانک زرد باله در جدول ۳ آورده شده است. میزان پروتئین خام و چربی خام لاشه در



شکل ۱ - فعالیت آنزیم پروتئاز کل، لیپاز و آمیلاز روده بچه ماهی شانک زرد باله پس از ۸ هفته غذایی با جیره های آزمایشی مختلف (میانگین ± خطای استاندارد). حروف کوچک غیر مشترک بیانگر اختلاف معنی دار در فعالیت آنزیم می باشد ($P < 0.05$).



Liebert و همکاران (Morken *et al.*, 2011) نشان دادند هنگامی که ۰/۳ درصد دی فرمات سدیم به جیره غذایی تیلاپیای نیل انگشت قد (*Oreochromis niloticus*) اضافه شود، ضریب کارایی پروتئین و حفظ پروتئین به طور قابل توجهی بهبود پیدا می کند. در مقابل Ng و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که تغذیه ماهی تیلاپیای هیبرید قرمز با سطوح مختلف (۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ درصد) یک ترکیب اسید آلی تجاری (شش اسید ارگانیک، ۳۸ درصد کل اسید جذب شده بر روی یک حامل مبتنی بر اسید سیلیسیک) و ۰/۲ درصد دی فرمات پتاسیم تاثیر معنی داری بر رشد، کارایی غذا و هضم غذا نداشته است. با این وجود، روند بهبود نتایج در ماهیان تغذیه شده با جیره های غذایی حاوی اسید آلی مشاهده شد (Ng *et al.*, 2009).

در مطالعه ای بر روی ماهی قزل آلی رنگین کمان نشان داد که در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی مبتنی بر پودر ماهی حاوی ۱۰ میلی لیتر اسید فرمیک در کیلوگرم هضم ظاهری فسفر را به طور معنی داری افزایش می یابد (Vielma and Lall, 1997). علاوه بر این، مطالعات نشان داده اند که استفاده از ۰/۵ تا ۳ درصد اسید سیتریک باعث حفظ میزان نیتروژن (N) و فسفر (P) در ماهی سیم دریایی (*Pagrus major*) می شود (Hossain *et al.*, 2007; Sarker *et al.*, 2005, 2007).

می گیرند. بررسی ها نشان می دهد که اسیدهای آلی با کاهش pH محیط دستگاه گوارش و افزایش توانایی های گوارش و جذب مواد مغذی موجب بهبود رشد حیوانات می شوند (Lückstädt, 2007; Castillo *et al.*, 2014). در مطالعه حاضر افزودن نمک اسید آلی سیترات سدیم در جیره حاوی مقادیر بالای پروتئین گیاهی موجب بهبود شاخص های رشد و تغذیه ای بچه ماهی شانک زرد باله گردید. در مطالعه ای مشابه Liu و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند افزودن ۲ درصد مکمل بوتیرات سدیم در رژیم غذایی مبتنی بر پودر سویا با افزایش توانایی گوارش و جذب و بهبود مورفولوژی روده موجب افزایش عملکرد رشد و جلوگیری از آسیب های روده ای در بچه ماهی توربوت (*Scophthalmus maximus*) می شود. همچنین در این مطالعه بوتیرات سدیم جیره بیان ژن پروتئین های اتصال روده را که در تقویت عملکرد لایه مخاطی روده های نقش دارند افزایش و بیان ژن های پروتئین التهابی سیتوکین ($\text{TNF-}\alpha$) و ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) را کاهش داد (Liu *et al.*, 2019).

اثرات مثبت اسیدهای آلی بر هیدرولیز پروتئین و هضم جیره غذایی در چندین گونه مشخص شده است. افزودن ۱ درصد دی فرمات سدیم در جیره ماهی قزل آلی رنگین کمان موجب افزایش قابلیت هضم پروتئین، چربی ها و اسیدهای آمینه گردید

آنزیم‌های پانکراسی (تریپسین و لیپاز) و آنزیم‌های روده‌ای (لوسین آمینوپپتیداز و فسفاتاز) می‌شود و از این طریق عملکرد رشد این ماهی را بهبود می‌بخشد (Castillo et al., 2014). همچنین پلی‌هیدروکسی بوتیرات باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و میزان اسیدهای چرب کوتاه زنجیره در روده می‌گویی وانامی (*L. vannamei*) گردید (Duan et al., 2017). اخیراً در مطالعه‌ای Duan و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند، مکمل‌های غذایی سوکسینیک اسید باعث افزایش رشد و کاهش ضریب تبدیل غذایی و افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی شامل آمیلاز، لیپاز، تریپسین و پپسین در می‌گویی وانامی می‌گردد. در می‌گویی مونودن (*Penaeus monodon*) افزودن ۱ درصد سدیم بوتیرات موجب افزایش هضم ماده خشک، پروتئین خام و انرژی و منجر به بهبود افزایش وزن، میزان زنده ماندن و ضریب تبدیل خوراک گردید (Ng et al., 2015). مطالعات متعددی نشان می‌دهند که کاهش pH معده و روده کوچک توسط اسیدهای آلی باعث بهبود فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌شود و محیط را برای عوامل بیماری‌زا نامناسب می‌کند و موجب افزایش جمعیت باکتری‌های مفید مثل لاکتوباسیلوس‌ها می‌گردد (Lückstädt, 2008). علاوه بر این، بررسی‌ها نشان می‌دهد این باکتری‌های اسید لاکتیک فعالیت آنزیم‌های گوارشی را در ماهی افزایش می‌دهند (Askarian et al., 2011).

در این تحقیق مکمل سیترات سدیم موجب افزایش جزئی پروتئین خام گردید، هرچند این افزایش اختلاف معنی‌داری نداشت. سایر ترکیبات شیمیایی مانند میزان چربی، خاکستر و رطوبت لاشه نیز تغییرات معنی‌داری نشان ندادند. گزارش‌های متناقضی در زمینه اثرات اسیدهای آلی و نمک‌های آن‌ها بر ترکیبات شیمیایی بدن وجود دارد. به‌طور مثال مشابه نتایج این مطالعه ترکیبات شیمیایی بدن ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و گربه ماهی زرد (*Pelteobagrus fulvidraco*) تغذیه شده با جیره-های حاوی اسید سیتریک یا اسید لاکتیک و ترکیب اسید فوماریک، بنزوئیک و بوتانات اختلاف اندکی نشان دادند (Vielma et al., 1999; Zhu et al., 2014). در حالی‌که Reda و همکاران (۲۰۱۶)

مثبت اسیدهای آلی بر قابلیت هضم فسفر ناشی از حلالیت مواد معدنی استخوان یا پودر ماهی و همچنین اثر کلاته‌ای (Chelating) اسیدهای آلی است که باعث کاهش اثرات متقابل آنتاگونیست (Antagonistic) بین کلسیم و فسفر می‌شوند (Sarker et al., 2005). همچنین افزودن اسیدهای آلی به جیره می‌تواند اثر سینرژیک (Synergetic) با فعالیت آنزیم فیتاز نیز داشته باشد. Baruah و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند افزودن اسید سیتریک (۳۰ گرم در کیلوگرم) در جیره غذایی کپور هندی (*Labeo rohita*) موجب افزایش معنی‌دار قابلیت هضم فسفر می‌شود و اسید سیتریک با آزاد سازی مواد معدنی از ترکیب اسید فیتیک جیره مبتنی بر پودر سویا موجب افزایش رشد می‌گردد.

برخلاف نتایج مطالعه حاضر، جیره‌های حاوی سطوح مختلف سدیم سیترات باعث بهبود پایداری اکسیداتیو در تیلایپای هیبرید قرمز (*Oreochromis sp.*) شد، اما شاخص‌های رشد، وضعیت سلامتی، اسیدهای چرب زنجیره روده را کاهش داده و باعث بروز آسیب شدید کبدی گردید (Romano et al., 2019). به‌نظر می‌رسد اثرات سودمند افزودن اسیدهای آلی به جیره غذایی، نمک‌های آن‌ها و یا ترکیب آن‌ها بر عملکرد ماهی و میگو بسته به بسیاری از عوامل مانند گونه ماهی، اندازه و یا سن ماهی، نوع و سطح اسیدهای آلی، نمک‌ها یا ترکیب آن‌ها، ترکیب و محتوای تغذیه‌ای جیره‌های آزمایشی، ظرفیت بافری مواد تشکیل دهنده جیره غذایی، مدیریت پرورش و تغذیه و کیفیت آب متفاوت می‌باشد (Fefana, 2014).

توانایی ماهی برای هضم اجزای تشکیل دهنده غذا را می‌توان با تعیین مقدار فعالیت آنزیم‌های مهم گوارشی موجود در دستگاه گوارش آن بررسی کرد. در این آزمایش افزودن سیترات سدیم موجب بهبود فعالیت آنزیم‌های گوارشی و به‌ویژه فعالیت پروتئولیزی گردید که نشان می‌دهد این نمک اسید آلی می‌تواند با افزایش توانایی هضم کارایی مصرف خوراک عملکرد رشد بچه ماهی را بهبود بخشد. در مطالعه مشابهی بر ماهی *Sciaenops ocellatus*، مشخص شد افزودن لاکتات کلسیم، اسید سیتریک و دی فرمات پتاسیم موجب افزایش فعالیت پپسین،

- Bernfeld P. 1955. Amylases a and b: colorimetric assay method. In: Methods in Enzymology, Vol. 1. In: S.P. Colowich & N.O. Kaplan (ed.), Academic Press, New York, NY, USA. pp. 149-158.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Bromage N.R., Robert R.G. 2001. Broodstock management and egg and larval quality. Blackwell Science. 425 p.
- Castillo S., Rosales M., Pohlenz C., Gatlin D.M. 2014. Effects of organic acids on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*, *Aquaculture* 433, 6-12.
- da Silva B.C., do Nascimento Vieira F., Mourino J.L.P., Ferreira G.S., Seiffert W.Q. 2013. Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. *Aquaculture* 384, 104-110.
- Dawood M.A.O., Koshio S., Esteban M.Á. 2018. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture* 10, 950-974.
- Defoirdt T., Boon N., Sorgeloos P., Verstraete W., Bossier P. 2009. Short-chain fatty acids and poly-b-hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. *Biotechnology Advances* 27, 680-685.
- Duan Y., Wang Y., Zhang J., Sun Y., Wang J. 2018. Dietary effects of succinic acid on the growth, digestive enzymes, immune response and resistance to ammonia stress of *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunology* 78, 10-17.
- Elala N.M.A., Ragaa N.M. 2015. Eubiotic effect of a dietary acidifier (potassium diformate) on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. *Journal of Advanced Research* 6, 621-629.
- Esmaeili A., Sotoudeh E., Morshedi V., Bagheri D., Dorafshan S. 2019. Effects of dietary supplementation of bovine lactoferrin on antioxidant status, immune response and disease resistance of yellowfin sea bream (*Acanthopagrus latus*) against *Vibrio harveyi*. *Fish and shellfish Immunology* 93, 917-923.
- Fefana. 2014. Organic Acids in Animal Nutrition. European Association of Specialty Feed Ingredients and their Mixtures, Working Group Organic Acids, FEFANA, Brussels, Belgium. 97 p.
- Gislason G., Olsen R.E., Ringø E. 1994. Lack of growth-stimulating effect of lactate on Atlantic salmon, *Salmo salar* L. گزارش کردند که مکمل فرمیک اسید و پروپیونیک اسید موجب ابقای پروتئین و چربی در ماهی تیلاپیا می شود و آنها این افزایش را با نقش اسیدی فایرها در افزایش قابلیت هضم مواد مغذی مرتبط دانستند.
- ### نتیجه گیری
- با توجه به نتایج این آزمایش به نظر می رسد استفاده از میزان ۵ گرم در کیلوگرم نمک اسید آلی سیترات سدیم در جیره حاوی مقدار اندک پودر ماهی می تواند باعث افزایش رشد ماهی شانک زرد باله گردد. این افزایش می تواند در اثر بهبود فعالیت آنزیم های گوارشی (به ویژه فعالیت پروتئاز کل) و در نهایت قابلیت هضم مواد مغذی باشد.
- ### تشکر و قدردانی
- بدین وسیله از حمایت مالی دانشگاه خلیج فارس برای انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می گردد.
- ### منابع
- Askarian F., Kousha A., Salma W., Ringo E. 2011. The effect of lactic acid bacteria administration on growth, digestive enzyme activity and gut microbiota in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and beluga (*Huso huso*) fry. *Aquaculture Nutrition* 17, 488-497.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 2000. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists International, 17th edn. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg.
- Bai S.C., Katya K., Yun H. 2015. Additives in aquafeed: an over- view. In: A. Davis (ed.) Feed and Feeding Practices in Aquaculture, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. pp. 171-202.
- Barrows F.T. 2000. Feed additives. In: R.P. Stickney (ed.) Encyclopedia of Aquaculture, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ. pp. 335-340.
- Baruah K., Sahu N.P., Pal A.K., Jain K.K., Debnath D., Mukherjee S.C. 2007. Dietary microbial phytase and citric acid synergistically enhances nutrient digestibility and growth performance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles at sub-optimal protein level. *Aquaculture Research* 38, 109-120.

- Ng W.K., Chik-Boon K., Kumar S., 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.
- NRC (National Research Council) 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academies Press, Washington, DC.
- Reda R.M., Mahmoud R., Selim K.M., El-Araby I.E. 2016. Effects of dietary acidifiers on growth, hematology, immune response and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunology* 50, 255-262.
- Ringø E. 1991. Effects of dietary lactate and propionate on growth and digesta in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquaculture* 96, 321-333.
- Safari R., Hoseinifar S.H., Nejadmoghadam S., Khalili M. 2017. Non-specific immune parameters, immune, antioxidant and growth-related genes expression of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fed sodium propionate. *Aquaculture Research* 48, 4470-4478.
- Sarker M.S.A., Satoh S., Kiron V. 2007. Inclusion of citric acid and/or amino acid-chelated trace elements in alternate plant protein source diets affects growth and excretion of nitrogen and phosphorus in red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture* 262, 436-443.
- Sarker S.A., Satoh S., Kiron V. 2005. Supplementation of citric acid and amino acid-chelated trace element to develop environment-friendly feed for red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 248, 3-11.
- Silva B.C., Jesus G.F.A., Seiffert W.Q., Vieira F.N., Mourinho J.L.P., Jatobá A., Nolasco-Soria H. 2016. The effects of dietary supplementation with butyrate and polyhydroxybutyrate on the digestive capacity and intestinal morphology of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 49, 447-458.
- Tal Y., Schreier H.J., Sowers K.R., Stubblefield J.D., Place A.R., Zohar Y. 2009. Environmentally sustainable land-based marine aquaculture. *Aquaculture* 286, 28-35.
- Torfi Mozanzadeh M., Marammazi J.G., Yaghoubi M., Agh N., Pagheh E., Gisbert E. 2017. Macronutrient requirements of silvery-black porgy (*Sparidentex hasta*): a comparison with other farmed sparid *Aquaculture and Fisheries Management* 25, 861-862.
- Hossain M.A., Pandey A., Satoh S. 2007. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Science* 73, 1309-1317.
- Iijima N., Tanaka S., Ota Y. 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiology and Biochemistry* 18, 59-69.
- Liebert F., Mohamed K., Lückstädt C. 2010. Effects of diformates on growth and feed utilization of all male Nile Tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*) reared in tank culture. XIV International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, Qingdao, China, Book of Abstracts. 190 p.
- Lim C., Luckstadt C., Klesius P. 2010. Use of organic acids, salts in fish diets. *Global Aquaculture Advocate* 13, 45-46.
- Liu Y., Chen Z., Dai J., Yang P., Xu W., Ai Q., Zhang W., Zhang Y., Zhang Y., Mai K. 2019. Sodium butyrate supplementation in high-soybean meal diets for turbot (*Scophthalmus maximus* L.): Effects on inflammatory status, mucosal barriers and microbiota in the intestine. *Fish and Shellfish Immunology* 88, 65-75.
- Lückstädt C. 2007. Effect of organic acid containing additives in world-wide aquaculture-Sustainable production the non-antibiotic way. In C. Lückstädt (Ed.), Acidifiers in animal nutrition – A guide for feed preservation and acidification to promote animal performance (pp. 71-79). Nottingham: Nottingham University Press.
- Lückstädt C. 2008. The use of acidifiers in fish nutrition. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 3, 1-8.
- Morken T., Kraugerud O.F., Barrows F.T., Sørensen M., Storebakken T., Øverland M. 2011. Sodium diformate and extrusion temperature affect nutrient digestibility and physical quality of diets with fishmeal and barely protein concentrate for rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 317, 138-145.
- Ng W.K., Koh C.B. 2016. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. *Reviews in Aquaculture* 9, 342-368.
- Ng W.K., Koh C.B., Teoh C.Y., Romano N. 2015. Farm-raised tiger shrimp, *Penaeus monodon*, fed commercial feeds with added organic acids showed enhanced nutrient utilization, immune response and resistance to *Vibrio harveyi* challenge. *Aquaculture* 449, 69-77.

- species. *Fishes* 2(2), 5.
- Vielma J.R., Rouhonen 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.
- Vielma J., Lall S.P. 1997. Dietary formic acid enhances apparent digestibility of minerals in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Nutrition* 3, 265-268.
- Walter H.E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: H.U. Bergmeyer (Ed). *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. V. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 270-277.
- Yilmaz S. 2019. Effects of dietary caffeic acid supplement on antioxidant, immunological and liver gene expression responses, and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* to *Aeromonas veronii*. *Fish Shellfish Immunology* 86, 384-392.
- Zhu Y., Qiu X., Ding Q., Duan M., Wang C. 2014. Combined effects of dietary phytase and organic acid on growth and phosphorus utilization of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture* 430, 1-8.

Effects of dietary sodium citrate on growth performance, body composition and digestive enzymes activity of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) fingerling

Ebrahim Sotoudeh*, Sina Saghaei, Milad Dehghani

Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, Iran.

*Corresponding author: e.sotoudeh@pgu.ac.ir

Received: 2019/7/25

Accepted: 2020/4/9

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effects of supplementing organic acid salt on the growth performance, body composition and digestive enzymes activity of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) fingerling fed diets, including low fish meal. Fish with an initial mean weight of 6.5 ± 0.2 g were divided into a control and two treatments, with 10 fish in each replicate, and fed the following supplemented diets for 8 weeks: Control diet, 5 g/kg diet sodium citrate (SC5) and 10 g/kg diet sodium citrate (SC10). At the end of the experiment, the growth performance indices, including mean final weight, weight gain and specific growth rate of fingerlings fed diets containing sodium citrate were significantly higher than control ($P < 0.05$). The crude protein and crude fat of fish in the group fed diet containing 5 g/kg of sodium citrate was slightly higher than other groups, however, that these differences were not significant ($P > 0.05$). The specific activity of total protease in fish fed diets containing sodium citrate (5 and 10 g / kg diet) was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). The activity of lipase and amylase enzymes was also increasing by rising sodium citrate, but this increase was not significant ($P > 0.05$). These results indicated that 5 g/kg diet sodium citrate improved growth, enhanced digestive enzymes activity capacities of *A. latus* fingerling, and may be a potential feed additive for this fish.

Keywords: Organic acid salt, Growth, Dietary supplement, Plant protein, Digestive enzymes.