Archive of SID

اثرات به‌کارگیری سوربات پتاسیم در جیره بیان ژن‌های مرتبط با رشد در ماهی کپورمعمولی (*Cyprius carpio*)

- **نیلوفر ملایی‌قاسمی**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **علی شعبانی** *: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **رقیه صفری**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ١٣٩٧ تاریخ پذیرش: شهریور ١٣٩٧

چکیده

این تحقیق با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف نمک سوربات پتاسیم در جیره بر بیان ژن‌های مرتبط با رشد بچه‌ماهیان کپورمعمولی صورت پذیرفت. بدین‌منظور تعداد ١٦٨ قطعه ماهی کپور با میانگین وزنی ٢/٦±١٥/٢ گرم به‌مدت ٨ هفته، در چهار تیمار و سه تکرار با جیره‌های آزمایشی حاوی سطوح مختلف صفر (شاهد)، ٠/٥، ١ و ٢ درصد سوربات پتاسیم تغذیه شدند. در پایان دوره از کبد و مغز نمونه‌برداری، استخراج RNA انجام و برای سنتز cDNA از کیت SuPrime Script RTase استفاده شد. cDNA حاصله با استفاده از پرایمرهای ژن‌های مرتبط با رشد (IGF1 و GH) و ژن بتااکتین به‌عنوان ژن رفرنس در Real Time PCR استفاده شد. بیان هر دوژن در تیمارهای تغذیه شده نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت. اختلاف معنی‌داری در میزان بیان ژن GH در تیمارهای تغذیه شده با ١ و ٢ درصد نسبت به تیمار ٠/٥ درصد مشاهده شد (P<٠/٠٥). بیان ژن IGF-1 فقط در تیمار ١ درصد اختلاف معنی‌دار با تیمار ٠/٥ درصد نشان داد (P<٠/٠٥). نتایج نشان داد که بهترین عملکرد بیان ژن رشد مربوط به تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی ١ درصد سوربات پتاسیم می‌باشد و می‌تواند به‌عنوان محرک رشد در جیره غذایی آبزیان استفاده شود.

کلمات کلیدی: رشد، کپور معمولی، سوربات پتاسیم، بیان ژن

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: ali_shabany@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

افزایش جمعیت انسانی به‌ویژه در قرن حاضر، نیاز روز افزون به منابع پروتئینی به‌خصوص پروتئین حیوانی را طلب می‌کند. با توجه به محدودیت مکان‌های جغرافیایی جهت پرورش و هزینه‌های بالای تهیه خوراک، بی‌تردید جهت بهبود عملکرد ماهیان پرورشی، استفاده از محرک‌های رشد و ایمنی در جیره بسیار راهگشا می‌باشد که بدین منظور استفاده از پروبیوتیک‌ها و پربیوتیک‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و اسیدهای آلی و نمک‌های آلی به‌طور چشم‌گیری افزایش یافته است (Canibe و همکاران، ۲۰۰۳؛ Luckstadt، ۲۰۰۸؛ Ng و همکاران، ۲۰۱۱). اسیدهای آلی ترکیباتی هستند که دارای گروه کربوکسیلیک در ساختمان خود هستند از بین این ترکیبات آن‌هایی که بین ۱ تا ۷ کربن دارند دارای اثرات ضدمیکروبی می‌باشند (Eidelsburger، ۱۹۹۸). ساختار مولکولی کلی آن‌ها به‌صورت R-COOH می‌باشد که R گروه عامل تک والان را نشان می‌دهد. این اسیدها اسیدهای چرب زنجیره کوتاه، اسیدهای چرب فرار یا اسیدهای کربوکسیلیک هم نامیده می‌شوند. اسیدهای آلی از طریق تخمیر میکروبی کربوهیدرات‌ها توسط گونه‌های باکتریایی به طرق مختلف و در شرایط متفاوت تولید می‌شوند (Cummings و همکاران، ۱۹۸۷؛ Macfarlane و Macfarlane، ۲۰۰۳). اثرات مثبت استفاده از اسیدهای آلی، نمک‌های آن‌ها یا ترکیبات متعلق به آن‌ها در جیره آبزیان به جهت کنترل بیماری و بهبود عملکرد رشد در اثرات مثبت اسیدهای آلی (ازجمله اسیدهای چرب کوتاه زنجیره) بر رشد ماهیان در مطالعات مختلف ازجمله چارقطبی (*Salvelinus alpinus*) (Ringø، ۱۹۹۱)، سالمون آتلانتیک (*Salmo salar*) (Luckstadt، ۲۰۰۸؛ Ringo و همکاران، ۱۹۹۴)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (Pandey و Satoh، ۲۰۰۸)، فیل‌ماهی (*Huso huso*) (Khajepour و Hosseini، ۲۰۱۱)، هیبرید تیلاپیا (*Oreochromis niloticus* ♀×*O. aureus* ♂) (Ng و همکاران، ۲۰۰۹؛ Zouh و همکاران، ۲۰۰۹)، گربه ماهی (*Clarias gariepinus*) (Owen وهمکاران، ۲۰۰۶)، ماهی سیم (*Pagrus major*) (Hossein و همکاران، ۲۰۰۷) و روهو (*Labeo rohita*) (Baruah و همکاران ۲۰۰۷)، میگوی سفید (*Litopenaeus vannamei*) (Romano و همکاران، ۲۰۱۵) (*Oncorhynchus mykiss*)، ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) (Hoseinifar و همکاران، ۲۰۱۶) گزارش شده است. اما مطالعات در زمینه استفاده از اسیدهای آلی و نمک‌های آن‌ها در بیان ژن کم و تنها محدود به مطالعه Safari و همکاران (۲۰۱۶)، Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۶) و Safari و همکاران (۲۰۱۷) می‌باشد. نتایج این مطالعات نشان داد که کارایی رشد ماهیان را با استفاده از برخی اسیدهای آلی می‌توان بالا برد. از آن‌جاکه تاکنون مطالعه‌ای در زمینه اثرات به‌کارگیری سوربات پتاسیم در جیره بر بیان ژن‌های مرتبط با رشد در بچه‌ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) انجام نشده است مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر این محرک بر شاخص‌های رشد و بیان ژن‌های مرتبط با رشد (فاکتور رشد شبه انسولینی و هورمون رشد) در ماهی کپورمعمولی انجام شد.

مواد و روش‌ها

تیماربندی و نمونه‌برداری: تعداد ۱۶۸ قطعه ماهی کپورمعمولی با میانگین وزنی ۲/۶±۱۵/۲ گرم از کارگاه پرورش بخش خصوصی در ساری خریداری و به سالن آبزی‌پروری شهیدناصرفضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شد. پس از ۲ هفته سازگاری با شرایط جدید، ماهیان به تعداد ۱۴ قطعه و به‌صورت تصادفی (چهار تیمار و سه تکرار) در ۱۲ مخزن توزیع شدند. قبل از ذخیره‌سازی، مخزن‌ها به‌وسیله هیپوکلریت سدیم ضدعفونی و سپس با آب شست و شو داده شدند. جهت حفظ کیفیت آب هفته‌ای دوبار، دوسوم حجم آب مخازن پرورشی تعویض شده و مدفوع ماهی و باقی‌مانده غذا از طریق سیفون کردن از محیط خارج گردید. سوربات پتاسیم ($CH_3CH=CHCH=CHCOOK$) مورد استفاده در این آزمایش با خلوص ۹۹٪ از شرکت سیگما (آلمان) تهیه شد. تیمارهای غذایی شامل جیره‌های حاوی ۰ (گروه شاهد: جیره بدون سوربات پتاسیم)، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد در جیره بود (Safari و همکاران، ۲۰۱۷) و ماهیان مورد آزمایش به میزان ۴ ٪ وزن بدن روزانه ۲ بار تغذیه شدند. پس از محاسبه میزان مکمل غذایی مورد نیاز برای هر تیمار، مقدار محاسبه شده در محلول ژلاتین ۴٪ حل و به غذا اسپری شد (Hoseinifar و همکاران، ۲۰۱۶). جیره تهیه شده در معرض هوا در محیط خشک و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. در این آزمایش در طول دوره پرورش میانگین دمای آب ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد، pH ۰/۱۵±۷/۹ و میانگین اکسیژن ۰/۲±۷ میلی‌گرم در لیتر به‌ترتیب با دماسنج، pH متر و اکسیژن‌متر اندازه‌گیری شد.

نمونه برداری: در پایان دوره ۹ ماهی از هر تیمار (۳ ماهی از هر تکرار) نمونه‌برداری و با پودر گل میخک ۰/۵ گرم بر لیتر بی‌هوش و جهت سنجش بیان ژن‌های رشد از بافت کبد و مغز نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها بلافاصله در ازت مایع قرار داده و سپس تا شروع آزمایش به فریزر ۸۰- منتقل شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA: RNA کل از ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه بافت مغز (GH) و کبد (IGF1)، هموژن شده با ازت مایع با استفاده از کیت بیوزول و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Biozol-Bioflux-Bioer) استخراج شد. کیفیت RNA کل با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و مشاهده باندهای S ۱۸ و S ۲۸ مربوط به RNA

www.SID.ir

Archive of SID

ریبوزومی و کمیت RNA با استفاده از نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ ($OD_{۲۶۰/۲۸۰}$) نانومتر به‌دست آمده از دستگاه نانوفتومتر (IMPLEN-P100- آلمان) انجام گردید. سپس نمونه‌های RNA به غلظت ۵۰۰ نانوگرم در میکرولیتر با استفاده از آب دپس رقیق شدند. جهت حذف هرگونه باقی‌مانده DNA ژنومی در نمونه‌های RNA، تیمار DNase I انجام شد و سپس ساخت رشته اول cDNA با استفاده از کیت SuPrime Script RTase براساس روش پیشنهادی شرکت با استفاده از ۵ میکرولیتر از RNA (غلظت ۵۰۰ نانوگرم)، ۱میکرولیتر آغازگر الیگو dt (۱۸-۲۰ الیگونوکلئوتید) و ۵ میکرولیتر آب دپس انجام شد.بدین‌منظور تیوپ‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه‌سانتی‌گراد انکوباسیون شدند و سپس به‌سرعت روی یخ قرار گرفتند. ۴ میکرولیتر بافر ۵X آنزیم نسخه‌بردار معکوس، ۲ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار و ۲۰ واحد آنزیم RNase inhibitor و ۱/۵ میکرولیتر آب دپس به مخلوط بالا اضافه شد. تیوپ‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراددر انکوباتورقرارگرفت.بلافاصله ۲۰۰ واحد آنزیم نسخه‌بردار معکوس به هر تیوپ اضافه گردیدو به‌مدت ۱ ساعت‌دردمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، سپس تیوپ‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه‌سانتی‌گراد انکوبه‌گردید تا واکنش غیرفعال شود. به هر تیوپ ۳۸۰ میکرولیتر آب دپس اضافه شد و سپس cDNAهای سنتز شده تا شروع آزمایش‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

واکنش qPCR: واکنش qPCR بعد از بهینه‌سازی دما و مواد مصرفی، در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از آغازگرهای طراحی شده برای ژن‌های مورد بررسی و ژن رفرنس بتااکتین(جدول ۱) توسط کیت سایبر بیوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) در دستگاه iQ5 شرکت بایورد و با استفاده از نرم‌افزار بایورد iQ5 اپتیکال برای بافت‌های کبد و مغز در ۴ تکرار بیولوژیکی انجام شد. از آن‌جایی‌که در دمای ۵۸ درجه محصول غیراختصاصی و دایمر مشاهده نشد، این‌دما به‌عنوان‌دمای واکنش‌درنظرگرفته شد. به‌منظور اطمینان از بهینه بودن شرایط qPCR، سری غلظت‌های مختلف (۱، ۱/۲، ۱/۵، ۱/۱۰، ۱/۲۰ و ۱/۵۰) از نمونه‌های cDNA مخلوط از تیمارهای متفاوت از بافت‌های مذکور تهیه و با هر دو پرایمر هدف و رفرنس در ۳ تکرار تکثیر و کارایی (E) پرایمرهای مورد استفاده تخمین زده شد (جدول ۱)(Bustin و همکاران، ۲۰۰۹).

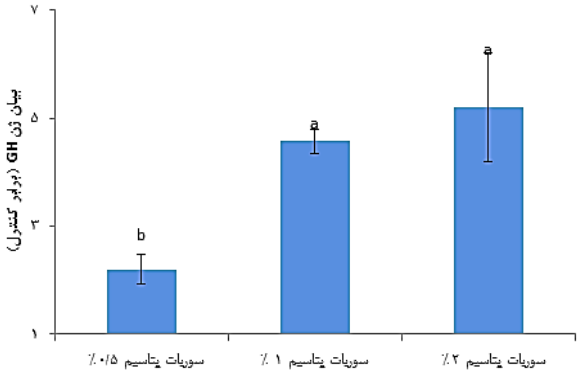
جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در بررسی بیان ژن رشد در ماهی کپورمعمولی (Safari و همکاران، ۲۰۱۷)

دمای اتصال (°C)	توالی (´۳-´۵)	نام پرایمر	کارایی پرایمر
۵۸	TCTTCGCATCTCTTTTCACC	GHqPCRF	٪۹۹
	AGTCGGCCAGCTTCTCA	GHPCRR	
۵۸	GGCATTGGTGTGATGTCTTT	IGF1qPCRF	٪۹۹
	CATATCCTGTCGGTTTGCTG	IGF1qPCRR	
۵۸	AGACATCAGGGTGTCATGGTTGGT	β- actin qPCRF	٪۹۹
	CTCAAACATGATCTGTGTCAT	β- actin qPCRF	

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های مربوط به بیان نسبی ژن با استفاده از فرمول $۲^{-\Delta\Delta ct}$ ($\Delta\Delta Ct$) برابر است با ΔCt ژن هدف منهای ΔCt کالیبراتور) آنالیز و سپس نرمال بودن دادها با استفاده از آزمون کولوموگروف اسمیرنوف تست شد. سپس توسط آنالیزواریانس یک‌طرفه در سطح اطمینان ۹۵ درصد آنالیز شدند. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای‌دانکن استفاده‌شد.نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶انجام شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ ترسیم شد.

نتایج

نتایج ارزیابی بیان ژن‌ها: ارزیابی بیان‌ژن GH درماهی‌کپور در تیمارهای حاوی سوربات پتاسیم افزایش معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) را نسبت به تیمار شاهد (تیمار ۲ درصد، ۵/۲ برابر، تیمار ۱ درصد، ۴/۵۷ برابروتیمار ۰/۵ درصد، ۲/۲ برابر شاهد) نشان داد. با افزایش دوز میزان بیان این ژن‌ها افزایش یافت که این افزایش در تیمارهای ۱و ۲ درصد نسبت به‌هم معنی‌دار نبود($P\geq۰/۰۵$)اما با تیمار ۰/۵درصد اختلاف معنی‌دار نشان داد ($P<۰/۰۵$). پیک مشاهده شده در منحنی ذوب آغازگر برای هر محصول، بیانگر وجود یک محصول ویژه و تکثیر اختصاصی است (شکل ۲).

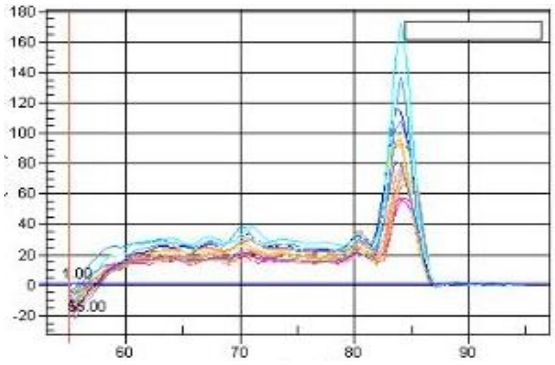


شکل ۱: تغییرات بیان نسبی ژن GH به بتا اکتین در ماهی کپور معمولی تغذیه‌شده با سطوح مختلف سوربات پتاسیم

حروف کوچک اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین تیمارها را نشان می‌دهد.

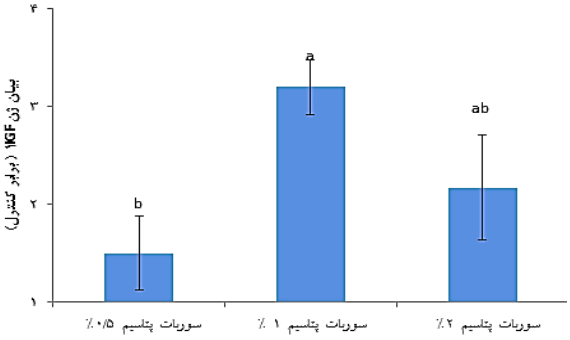
www.SID.ir

Archive of SID



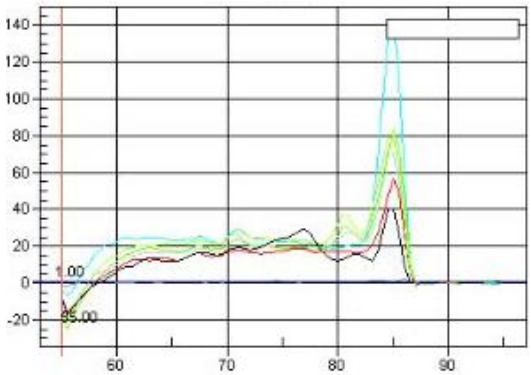
شکل ۲: منحنی ذوب ترسیم شده برای آغازگر GH

ارزیابی بیان ژن IGF1 در ماهی کپور در تیمارهای حاوی سوربات پتاسیم افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۵) را نسبت به تیمار شاهد (تیمار ۲ درصد، ۲/۱۷ برابر، تیمار ۱ درصد، ۳/۲ و تیمار ۰/۵ درصد، ۱/۵ برابر شاهد) نشان داد. تیمار حاوی ۱ درصد سوربات پتاسیم نسبت به تیمار ۰/۵ درصد افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). در تیمار حاوی ۲ درصد سوربات پتاسیم کاهش نشان داده شد که این میزان کاهش معنی‌دار نبود (P≥۰/۰۵). پیک مشاهده شده در منحنی ذوب آغازگر برای هر محصول، بیانگر وجود یک محصول ویژه و تکثیر اختصاصی است (شکل ۴).



شکل ۳: تغییرات بیان نسبی ژن IGF1 به بتاکتین در ماهی کپورمعمولی تغذیه‌شده با سطوح مختلف سوربات پتاسیم

حروف کوچک اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین تیمارها را نشان می‌دهد.



شکل ۴: منحنی ذوب ترسیم شده برای آغازگر IGF1

بحث

در بسیاری از مزارع پرورشی شرایط محیطی نامطلوب نظیر تغییرات در pH، پایین بودن اکسیژن محلول، نوسانات دمایی، افت کیفیت آب جهت پرورش و یا مشکلات مدیریتی شامل تغذیه ناکافی، تغذیه بیش از حد و تراکم خارج از استاندارد شرایط استرس‌زایی را بر ماهیان پرورشی تحمیل نموده که سبب پایین آمدن سطح ایمنی و کاهش رشد می‌گردد (Winton، ۲۰۰۱). بنابراین مطالعات به سمت اثرات تغذیه‌ای محرک‌های طبیعی رشد و ایمنی ازجمله پروبیوتیک، پری‌بیوتیک، گیاهان و عصاره‌های گیاهی، اسیدهای آلی و نمک‌های آن‌ها سوق پیدا کرده است (Romano و همکاران، ۲۰۱۵؛ Safari و همکاران، ۲۰۱۶؛ ۲۰۱۷). در بین این محرک‌ها، اسیدی فایرها یا نمک‌های اسیدهای آلی به‌عنوان جایگزینی مناسب معرفی شده‌اند (Eidelsburger، ۱۹۹۸). اسیدهای آلی می‌توانند بهره‌وری ماده مغذی را افزایش داده و مقاومت بیماری را در حیوانات دریایی بالا ببرند و موجب بهبود رشد گردند. با این وجود علی‌رغم افزایش در دسترس پذیری ماده مغذی ناشی از افزودن اسیدهای آلی در رژیم‌های غذایی آبزیان، نتایج متناقضی درخصوص اثرآن‌ها به‌عنوان محرک رشد در دسترس می‌باشد که براساس گونه آبزی و دوز اسیدهای آلی به‌کار رفته متفاوت است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن مکمل غذایی نمک سوربات پتاسیم به رژیم غذایی ماهی کپور معمولی سبب افزایش بیان ژن هورمون رشد و فاکتور رشد شبه انسولین شد. به‌طوری‌که براساس نتایج به‌دست آمده اختلاف معنی‌داری در میزان بیان ژن GH در تیمارهای تغذیه‌شده با ۱ و ۲ درصد نسبت به دو تیمار شاهد و ۰/۵ درصد مشاهده شد (P<۰/۰۵). بیان ژن IGF-1 فقط تیمارهای ۰/۵ و ۱ درصد اختلاف معنی‌دار با یکدیگر نشان دادند (P<۰/۰۵). بهبود کارایی رشد با استفاده از اسیدهای آلی در هیبرید تیلاپیا (Ramil و همکاران، ۲۰۰۵)، میگوی وانامی (Silva و همکاران، ۲۰۱۶)، کپور معمولی (Liu و همکاران، ۲۰۱۴)، سی‌بریم (Robles و همکاران، ۲۰۱۳)، سالمون اقیانوس اطلس (Gislason و همکاران، ۱۹۹۶) گزارش شده است. Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۶) افزایش بیان ژن‌های رشد (IGF1 و GH) در ماهی گورخری تغذیه شده با جیره حاوی نمک پروپیونات سدیم را گزارش نمودند. Safari و همکاران (۲۰۱۷) نیز طی مطالعه‌ای اعلام نمودند استفاده از نمک سدیم پروپیونات در جیره ماهی کپور معمولی باعث افزایش بیان ژن‌های مرتبط با رشد (IGF1 و GH) در تمام تیمارهای پروپیونات سدیم نسبت به گروه شاهد شد. براساس این مطالعات اسیدهای آلی می‌توانند به‌طرق مختلف ازجمله کاهش PH محتویات روده، کاهش pH معده و عملکرد بهتر پپسین، کاهش باکتری‌های مضر و توازن فلور میکروبی روده (Luckstadt،

www.SID.ir

Archive of SID

۲۰۰۸).، افزایش قابلیت هضم مواد معدنی (Koh و همکاران، ۲۰۱۶)، افزایش رشد ویژه، قابلیت هضم پروتئین و کاهش ضریب تبدیل غذایی (Khajepour و Hosseini، ۲۰۱۲) بر عملکرد رشد اثر گذارند. علاوه بر این اسیدهای آلی با کاهش pH غذا از رشد فلور میکروبی در غذا جلوگیری کرده و موجب کاهش جذب ارگانیسم‌های پاتوژن احتمالی و متابولیت‌های سمی آن‌ها از طریق غذا در جانوران پرورشی می‌شوند (Freitag، ۲۰۰۷).در تضاد با مطالعه‌حاضر Katoh و همکاران (۱۹۹۹) اثرات سرکوب‌کننده پروپیونات و بوتیرات بر هورمون رشد (GH) مورد بررسی در هیپوفیز بز را گزارش نمودند. هم‌چنین در مطالعه سلیمانی ایرایی و همکاران (۱۳۹۱) اختلاف معنی‌داری در عملکرد نهایی رشد بین تیمارهای آزمایشی تغذیه‌شده با اسیدهای آلی و تیمار شاهد مشاهده نشد که با نتایج مطالعه حاضر مغایرت داشت. به‌نظر می‌رسد عدم‌تاثیراین اسیدهای آلی و نمک‌هایشان روی کارایی رشد در ماهیان به عواملی هم‌چون گونه ماهیان، اندازه و سن ماهیان، نوع و سطوح اسیدهای آلی و نمک‌هایشان و یا ترکیب آن‌ها مرتبط باشد (Lim و همکاران، ۲۰۰۰).

با توجه به نتایج به‌دست آمده از این پژوهش و مطالعات گذشته می‌توان‌اثرات مثبت استفاده ازاسیدهای آلی در تغذیه ماهیان پرورشی بر کارایی‌رشد ماهیان را مشاهده نمود که این نتایج می‌تواند به افزایش بهره‌وری اقتصادی در پرورش تجاری ماهیان کمک شایانی نماید.

منابع

۱. **سیلمانی ایرایی، م.؛ سجادی، م.م.؛ فرحی، ا.؛ کریم‌زاده، ص.و کرامت‌امیرکلاتی، ع.، ۱۳۹۱**. اثرات سطوح مختلف مکمل‌های اسیدهای آلی بر کارایی رشد، ترکیبات لاشه و شاخص‌های خونی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhyncgus mykiss*). مجله بهره‌برداری و پرورش آبزیان. جلد ۱، شماره ۳، صفحات ۱۰ تا ۲۰.

۲. **Baruah, K.; Sahu, N P.; Pal, A.K., Jain, K.K., Debnath, D. and Mukherjee, S.C., 2007**a. 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. Vol. 38, pp: 109-120.

۳. **Baruah, K.; Sahu, N.P.; Pal, A.K., Debnath, D.; Yengkokpam, S. and Mukherjee, S.C., 2007b**. Interactions of dietary microbial phytase, citric acid and crude protein level on mineral utilization by rohu (*Labeo rohita* (Hamilton)), juveniles. World Aquaculture Society. Vol. 38, pp: 238-249.

۴. **Bustin, S.A.; Bens, V.; Garson, J.A.; Hellemans, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M.W.; Shipley, G.L.; Vandesompele, J. and Wittwer, C.T., 2009**. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical Chemistry. Vol. 55, No. 4, pp: 611-622.

۵. **Canibe, N.; Ricarde, M.E. and Jensen, B.B., 2003**. An overview of the effect of organic acid on gut flora and gut health. Danish Institute of Agricultura Sciences, Research Centure Foulum, Denmark. 14 p.

۶. **Cummings, J.H.; Pomare, E.W.; Branch, W.J., Naylor, C.P.E. and Macfarlane, G.T., 1987**. Shrt cgain fatty acids in human large intestine, potal, hepatic, and venous blood. Gut. Vol. 28, pp: 1221-1227.

۷. **Eidelsgurger, U., 1998**. Feeding short-chain organic acids to pigs. In: Garnsworthy, P.C., Wiseman, J. (Eds). Recent Advances in Animal Nutrition. Nottingham University press, Noyyingham. pp: 93-106.

۸. **Freitag, M., 2007.** Organic acids and salts promote performance and health in animal husbandry. In: Luckstadt, C., editor. Acidifiers in Animal Nutrition – A Guide for Feed Preservation and Acidification to Promote Animal Performance. 1st ed, Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp: 1-11.

۹. **Gislason, G.; Olsen, R.E. and Ringo, E., 1994**. Lack of growth-stimulating effect of lctate on Atlantic salmon, L. Aquaculture and Fisheries Management. Vol. 25, pp: 861-862.

۱۰. **Hossain, M.A.; Pandey, A. and Satoh, S., 2007**. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in red sea bream Pagrus major. Fisheries Science. Vol. 73, pp:1309-1317.

۱۱. **Hoseinifar, S.H. and Romano, N., 2017.** Comparing the effects of different dietary organic acids on the growth, intestinal short-chain fatty acids, and liver histopathology of red hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) and potential use of these as preservatives. Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 11, pp: 1-13.

۱۲. **Khajepour, F. and Hosseini, S.A., 2012.** Citric acid improves growth performance and phosphorus digestibility in Beluga (*Huso huso*) fed diets where soybean meal partly replaced fish meal. Animal Feed Science and Technology. Vol.171, pp: 68-73.

۱۳. **Katoh, K.; Ohata, Y. and Ishiwata, H., 1999.** Suppressing effects of short-chain fatty acids on growth hormone (GH) relesing hormone- induced GH release in isplated anterior pituitary cells of goals. Domestic animal Endocrinology. Vol. 17, No. 1, pp: 85-93.

۱۴. **Koh, C.B.; Romano, N.; Siti-Zahrah, A. and Ng, W.K., 2016.** Effects of a dietary organic acids blend and oxytetracycline on the growth, nutrient utilization and total cultivable gut microbiota of the red hybrid tilapia, Oreochromis sp., and resistance to Strepto coccus agalactiae. Aquaculture Research. Vol. 47, pp: 357-369.

۱۵. **Lim, C.; Klesius, P.H.; Li, M.H. and Robinson, E.H., 2000**. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to Edwardsiella ictaluri challenge. Aquaculture. Vol. 185, pp: 313-327.

۱۶. **Liu, W.; Yang Y.; Zhang, J.; Gatlin, D.M.; Ringo, E. and Zhou, Z., 2014**. Effects of dietary microencapsulated sodium butyrate on growth. Intestinal mucosal morphology, immune responde and adhesive bacteria in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) pre-fed with or without oxidized oil. British Journal of Nutrition. Vol. 112, pp: 15-29.

۱۷. **Luckstadt, C., 2008.** The use of acidifiers in fish nutrition. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science. Nutrition and Natural Resources. Vol. 44, pp: 1-8.

۱۸. **Macfarlane, S. and Macfarlane, G.T., 2003**. Regulation of short-chain fatty acid production. Proceeding of Nutritional Society. Vol. 62, pp: 67-72.

۱۹. **Ng, W.K.; Koh, C.B.; Sudesh, K. and Siti-Zahrah, A., 2009.** Effects of dietary organic acids on growth, nutrient digestibility and gut microflora of red hybrid tilapia,

www.SID.ir

Archive of SID

(*Oreochromis sp*) and subsequent survival during a challenge test with (*Streptococcus agalactiae)*. Aquaculture Research. Vol. 40, pp: 1490-1500.

۲۰. **Ng, W.K. and Koh, C.B., 2011.** Application of organic acid in aquafeeds: impacts on fish growth C (ed). Standards for Acidifiers principles for the Use of Organic Acids in Animal Nutrotion. Proceeding of the Ist International Acidifier summit. Nottingham University press, Nottingham. pp: 46-58.

۲۱. **Owen, M.A.G.; Waines, P.; Bradley, G. and Davies, S., 2006**. The effect of dietary supplementation of sodium butyrate on the growth and microflora of (*Clarias gariepinus*) (Burchell 1822). Abstract from the12 th International Symposium Fish Nutrition and Feeding. Biarritz, France.

۲۲. **Pandey, A. and Satoh, S., 2008.** Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fisheries Science. Vol. 74, pp: 867-874.

۲۳. **Ramli, N.; Heindl, U. and Sunanto, S., 2005.** Efect of potassium diformate on growth performance of tilapia challenged with Vibrio anguillarum. Abstract, World Aquaculture, Bali, Indonesia.

۲۴. **Ringo, E., 1991.** Effects of dietary lactate and propionate on growth and digesta in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L). Aquaculture. Vol. 96, pp: 321-333.

۲۵. **Ringo, E.; Olsen, R.E. and Castell, J.D., 1994.** Effect of dietary lactate on growth and chemical composition of Arctic charr *Salvelinus alpinus*. Jornal of the Word Aqucalture Society. Vol. 25, pp: 483-486.

۲۶. **Robels, R.; Lozano, A.B.; Sevilla, A.; Marquez, L.; Nuez Ortin, W. and Moyano, F.J., 2013.** Effectvof partially protected buturate used as feed additive on growth and intestinal metabolism in sea bream (*Sparus aurata*). Fish physiology and Biochemistry. Vol. 39, pp: 1567-1580.

۲۷. **Roe, A.J.; McLaggan, D.; Davidson, I.O.; Byrne, C. and Brooth, I.R., 1998.** Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by week acids. Journal of Bacteriology. Vol. 180, pp: 77-72.

۲۸. **Romano, N.; Koh, C.B. and Ng, W.K., 2015.** Dietary microencapsulated organic acids blend enhances growth, phosphorus utilization, immune response, hepatopancreatic integrity and resistance against *Vibrio harveyi* in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. Vol. 435, pp: 228-236.

۲۹. **Safari, R.; Hoseinifar, S.H.; Nejadmoghadam, S.H. and Jafar, A., 2008.** Transciptomic study of mucosal immune, antioxidant and growth related genes and non-specific immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed dietary Ferula (*Ferula assafoetida*). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 55, pp: 242-248.

۳۰. **Safari, R.; Hoseinifar, S.H.; Nejadmoghadam, S.H. and Khalil, M., 2017.** Non-specific immune parameters, immune, antioxidantand growth-related genes expression of common carp (*Cyprinus carpio*) fed sodium propionate. Aquaculture Research. Vol. 5, pp: 1-9.

۳۱. **Safari, A.R.; Hoseinifar, S.H. and Kavandi, M., 2016.** Modulation of antioxidant defense and immune response in zebra fish (*Danio rerio*) using dietary sodium propionate. Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 10, pp: 10-20.

۳۲. **Silva, B.C.; Vieria, F.N.; Mourino, J.L.P.; Blivar, N. and Seiffert, W.Q., 2016.** Butyrate and prppionate improve the growth performance of *Litopenaeus vannamei.* Aquacalture Research. Vol. 47, pp: 612-620.

۳۳. **Winton, J.R., 2001**. Fosh health management. In: Wedemeyer, G., 2001. Fish hatchery management 2nd edition. Bethesda, M.D, American Fisheries Society. Vol. 10, pp: 559-639.

www.SID.ir