13 (1) 247-258, Spring 2021

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Comparative Study of Different Levels of Sodium Di-formate (NDF) and Formic Acidifiers on Nutrition, Growth and Activity of Digestive Enzymes in beluga (*Huso huso*)

Arash Jedi Mostafalou [1], Masoud Hedayati Fard*[1], Mojtaba Keshavarz Divkolaie [1], Takavar Mohamadyan [2]

[1] Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Ghaemshahr Branch, Islamic Azad University, Ghaemshahr, Iran

[2] Deputy of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine. Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Key Words

Acidifiers
Growth
Nutrition
Intestinal Enzymes
Huso huso

Abstract

Introduction: Recently, the use of Acidifier (a group of organic acids) has been increased in aquaculture. The purpose of this study is to evaluate the effects of Acidifier (sodium diformate and Formic acid) on the growth performance, nutrition indices, and Digestive enzymes activity of the juvenile *Huso huso*.

Materials & Methods: A total of 420 juvenile *Huso huso* (30.55 ± 1.72 g) was randomly divided into seven experimental treatments (Three replicates each). All groups were fed with the experimental diet for 60 days. The Bioassay conducted on the first day and after 30 and 60 days and then growth parameters were investigated. The experimental diets contain 0.05, 0.1 and 0.15 % sodium diformate (NDF) and 0.05, 0.1 and 0.15 % Formic acid (Formi). diet control was without any acidifier.

Result: Results show that all growth and Intestinal enzymes (trypsin, chymotrypsin and alkaline phosphatase) are affected by acidifier and in these two parameters groups that fed 0.1 % supplemented food by NDF and citric acid compared to the control group. The best FCR and SGR observed in the groups fed with 0.1 % supplemented food by NDF(0.5±00), (5.3±0.005) ($P<0.05$) at day 30 respectively. Although the best FCR and SGR observed in the groups fed with 0/1 % supplemented food by Formic acid (0.81±0.001), (2.7±0.005) ($P<0.05$) at day 60 respectively. Intestinal enzymes (trypsin, chymotrypsin and alkaline phosphatase) are affected by acidifier. The highest activity of trypsin and chymotrypsin was significant in groups 0.1 % supplemented food by NDF ($P<0.05$) in the first 30 days. Alkaline phosphatase activity increased with increasing acidifier diets in groups, but this increase was not significant compared to the control ($p>0.05$). It can be concluded that the addition of 0.1% of NDF to beluga diets improves growth parameters and decreases FCR, increases digestive enzyme activity.

Conclusion: Moreover, these results indicated that 0.1 % of NDF and citric acid in the diet could be a useful food supplement preferably at 30 days and can be used to improve the growth parameters in juvenile *Huso huso.*

* Corresponding Author's email: persiafish@gmail.com
Received: 1 February 2020; Reviewed: 25 April 2020; Revised: 21 May 2020; Accepted: 5 June 2020
(DOI): 10.22034/aej.2020.133636

مقاله پژوهشی

بررسی مقایسه‌ای سطوح متفاوت اسیدی‌فایرهای سدیم دی‌فرمات (NDF) و فورمی (Formic) بر کارایی رشد، تغذیه و فعالیت آنزیم‌های گوارشی در فیل‌ماهی (*Huso huso*)

آرش جدی‌مصطفی‌لو[1]، مسعود هدایتی‌فرد[1]*، مجتبی کشاورزدیوکلایی[1]، تکاور محمدیان[2]

[1] گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد قائم شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم شهر، ایران

[2] گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

کلمات کلیدی

اسیدی فایرها
رشد
تغذیه
آنزیم‌های گوارشی
فیل‌ماهی

چکیده

مقدمه: اخیراً استفاده از محرک‌های رشد مثل اسیدی‌فایرها (گروهی از اسیدهای آلی) در آبزی‌پروری افزایش یافته است. این مطالعه با هدف بررسی اثر سطوح مختلف اسیدی‌فایر سدیم دی‌فرمات (NDF) و اسید فرمی (فورمیک) بر پارامترهای رشد، تغذیه و آنزیم‌های گوارشی در بچه فیل‌ماهیان (*Huso huso*) انجام شد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۴۲۰ قطعه بچه‌ماهی فیل‌ماهی با میانگین وزن ۱/۷۲± ۳۰/۵۵ گرم تهیه و به‌طور تصادفی در قالب هفت گروه با سه تکرار (هر تکرار ۲۰ عدد ماهی) تقسیم به‌مدت ۶۰ روز با جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند. گروه‌های ۱، ۲ و ۳ به‌ترتیب حاوی ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۱۵ درصد سدیم دی‌فرمات (NDF) و گروه‌های ٤، ٥ و ٦ حاوی مقادیر ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۱۵ درصد اسیدفرمی (فرمیک) در جیره غذایی بودند. جیره گروه شاهد بدون اسیدی‌فایر بود.

نتایج: نتایج نشان داد اکثریت پارامترهای رشد (BWI %، CF، SGR، FCR، FER، PER) و آنزیم گوارشی در گروه‌ها تغذیه شده با اسیدی‌فایر نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند ($p<0/05$). به‌طوری‌که کم‌ترین ضریب تبدیل غذایی (FCR) (۰/۰±۰/۵) و بیش‌ترین ضریب رشد ویژه (۰/۰۰۵±۵/۳) در گروه ۰/۱ درصد سدیم دی‌فرمات در روز ۳۰ اما کم‌ترین ضریب تبدیل غذایی (FCR) (۰/۰۰۱±۰/۸۱) و بیش‌ترین ضریب رشد ویژه (۰/۰۰۱±۲/۷۷) در گروه ۰/۱ درصد اسیدفرمیک در روز ٦٠ مشاهده شد ($p<0/05$). هر دو آنزیم مورد بررسی (تریپسین، کیموتریپسین) تحت تاثیر اسیدی‌فایر قرار گرفتند به‌طوری‌که بیش‌ترین فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین در گروه ۰/۱ درصد سدیم دی‌فرمات در ۳۰ روز اول بود ($p<0/05$). فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در تیمارهای اسیدی‌فایر افزایش نسبی داشت ولی این افزایش در تیمارهای سدیم دی‌فرمات نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود ($p>0/05$) اما در روز ۳۰ میزان این آنزیم در گروه‌های اسیدفرمیک بیش‌تر بود.

نتیجه‌گیری و بحث: به‌طورکلی می‌توان بیان کرد افزودن ترکیبی اسیدی‌فایر سدیم دی‌فرمات (NDF) به‌میزان ۰/۱ درصد به جیره غذایی فیل‌ماهی ترجیحاً در مدت ۳۰ روز باعث بهبود پارامترهای رشد و کاهش ضریب تبدیل غذایی (FCR)، افزایش سطح آنزیم گوارشی می‌شود که نهایتاً شاخص سلامت این ماهی را بهبود می‌بخشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: persiafish@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۲ بهمن ۱۳۹۸؛ تاریخ داوری: ٦ اردیبهشت ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۱ خرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ١٦ خرداد ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/aej.2021.133636

مقدمه

پرورش‌متراکم به‌سرعت در جهان گسترش یافته است و به‌عنوان یک صنعت درآمدزا با تولید بالا شناخته شده است (Lim و همکاران ۲۰۱۵). آنتی‌بیوتیک‌ها در گذشته به‌عنوان محرک‌های رشد در غذای حیوانات استفاده می‌شدند. استفاده از این مواد در غذا، امکان توسعه و افزایش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و حضور باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیکی در ماهی، حیوانات و انسان را افزایش می‌داد. استفاده از آنتی‌بیوتیک به‌همراه غذا به‌عنوان محرک‌رشددر سال ۲۰۰۶در اتحادیه اروپا ممنوع شد. بنابراین برای جایگزینی آن گزینه‌های پیشنهادی زیادی ارائه شد.محققان، محصولات‌متنوعی‌از اسیدهای‌آلی/ نمک‌های آن‌ها، عصاره‌های گیاهی، محرک‌های ایمنی، آنزیم‌ها، پربیوتیک و پروبیوتیک‌ها را به‌عنوان محرک‌رشد و جایگزین آنتی‌بیوتیک و محرک رشد پیشنهاد نمودند. در میان این افزودنی‌های خوراکی، استفاده از اسیدهای آلی یا نمک‌های آن‌ها (یا ترکیب آن‌ها) در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است. اسیدهای آلی، ترکیباتی هستند که صفات اسیدی ضعیفی دارند و طول زنجیره کربنی آن‌ها کم‌تر از ۷ کربن است که در انتهای زنجیره آن‌ها یک یا تعداد بیش‌تری گروه‌های کربوکسیل وجود دارد (Luckstod، ۲۰۰۸). اسیدهای آلی به‌عنوان بهبود دهنده رشد و سلامتی در حیوانات گوشتی و پرندگان از طریق بهبود عملکرد دستگاه گوارش و متابولیسم انرژی، افزایش دسترسی مواد غذایی و جلوگیری از عوامل بیماری‌زا، مورد توجه و استفاده قرار گرفته‌اند. اسیدهای آلی معمول شامل: اسیداستیک و اسیدبوتریک،اسیدسیتریک،اسیدفرمیک،اسیدمالیک، اسید پروپیونیک، واسیدسوربیک است(Hoseinifar و همکاران ۲۰۱۵).سدیم دی‌فرمات به‌نظر می‌رسد اثرات وسیعی بر کارایی رشد و تغذیه از طریق اصلاح در بهبود تمایز، تکثیر و عملکرد بافت‌های دستگاه گوارش در حیوانات سالم و بیمار دارد.در مطالعات‌موجودات زنده، سدیم دی‌فرمات به‌جای شکل اسید آن غالباً استفاده می‌شود چرا که هم جامد است هم پایدارتر و بوی کم‌تری دارد. هرچند در گذشته مطالعات متعددی در زمینه استفاده از اسیدهای آلی،به‌خصوص بوتریک اسید درماهی انجام شده است (Ebrahimi و همکاران ۲۰۱۷). فیل‌ماهی گونه بومی دریای خزر است که به‌دلیل سازگاری راحت با شرایط پرورشی، مقاوم بودن به تغییرات محیطی سرعت رشد بالا و خاویاردهی با کیفیت به‌عنوان گونه مهم قابل پرورش در دنیا و حتی در ایران مطرح است. در روند پرورش این گونه اثر مثبت استفاده از پروبیوتیک‌ها به اثبات رسیده است ولی تا به حال از روش‌های افزایش کارایی تأثیر اسیدی‌فایرها در این ماهیان در داخل یا حتی خارج کشور استفاده نشده است، لذا با توجه به اهمیت پرورش فیل‌ماهی در ایران و جهان و این‌که تاکنون در ایران از غذاهای‌تجاری‌خارجی‌و بعضاً داخلی جهت رشد آن استفاده شده است لذا معرفی جیره مناسب داخلی به همراه مکمل برای این ماهی‌بسیار حائز اهمیت می‌باشد.باتوجه به یافته‌های موجود، اطلاعات مناسبی مبنی بر تاثیر مقایسه‌ای اسیدی‌فایر سدیم دی‌فرمات (NDF) و اسیدی فایر فورمی (Formic) بر فاکتورهای رشد و فعالیت آنزیم گوارشی در فیل‌ماهی وجود ندارد لذا مطالعه حاضر با هدف تعیین اثرات این دو اسیدی‌فایر در جیره بر عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های گوراشی در بچه‌ماهی فیل‌ماهی انجام شده است.

مواد و روش‌ها

طراحی‌آزمایش: دوره غذادهی به‌مدت ۶۰ روز در مرکز بازسازی ذخایر شهیدرجایی واقع در استان مازندران، شهرستان ساری ، بخش گلما در تیر ماه سال ۱۳۹۷ انجام شد. تعداد ۴۲۰ قطعه بچه فیل‌ماهی با میانگین وزن ۰/۷۲±۳۰/۵۵ گرم از همین مرکز تهیه و بعد از طی شدن مرحله سازش‌یابی به‌مدت یک هفته ماهی‌ها، به‌طور تصادفی در ۲۱ مخزن در هفت گروه و سه تکرار، هر تکرار ۲۰عدد ماهی به‌صورت آزمایشی تقسیم و به‌ترتیب زیر تیماربندی شدند (Castillo و همکاران ۲۰۱۴): تیمار اول: تغذیه شده با خوراک حاوی ۰/۵ گرم اسیدی‌فایر فورمی(فرمیک) در کیلوگرم خوراک، تیمار دوم: تغذیه شده با خوراک حاوی ۱ گرم اسیدی‌فایر فورمی (فرمیک) در کیلوگرم خوراک، تیمار سوم:تغذیه شده با خوراک حاوی ۱/۵گرم اسیدی‌فایر فورمی (فرمیک) درکیلوگرم خوراک،تیمارچهارم: تغذیه شده با خوراک حاوی ۰/۵ گرم اسیدی‌فایردی‌فرمات‌سدیم NDFدرکیلوگرم‌خوراک،تیمارپنجم:تغذیه شده با خوراک حاوی ۱ گرم اسیدی‌فایر دی‌فرمات سدیم NDF در کیلوگرم‌خوراک،تیمارششم:تغذیه‌شده‌باخوراک‌حاوی۱/۵گرم اسیدی فایر دی‌فرمات سدیم NDF در کیلوگرم خوراک، تیمار هفتم (شاهد): تغذیه شده با خوراک فاقد اسیدی‌فایر (غذای اصلی کوپنز آلمان)

تهیه جیره غذایی: جهت اسیدی‌فایر و افزودن آن‌ها به غذای ماهیان‌ازروش‌توصیه‌شده‌توسط Ng و همکاران(۲۰۱۷) و Hoseinifar وهمکاران(۲۰۱۶)استفاده‌گردید.به‌طورخلاصه‌هرکدام به‌طور جداگانه به غذا اضافه شدند. اسیدی‌فایر با غلظت‌های موردنظر تیمارها توزین وسپس‌درسرم‌فیزیولوژی‌حل‌و به‌همراه ژلاتین به‌خوراک اضافه گردید.

زیست‌سنجی ماهیان: به‌منظور ارزیابی میزان رشد ماهیان گروه‌های مختلف در ابتدا و انتها و در طول دوره ۶۰ روزه پرورش، نسبت به اندازه‌گیری وزن ماهیان با ترازوی دیجیتال اقدام گردید. تغذیه ماهیان در تیمار شاهد و تیمارهای آزمایشی به‌میزان ۳ درصد وزن توده زنده آن‌ها محاسبه و روزانه در سه نوبت در ساعات ۸، ۱۴ و ۲۰ به آن‌ها داده شد. جهت تعیین توده زنده هر یک از تیمارها، هر ۱۵ روز یک‌بار ۱۰۰ درصد ماهیان هر تکرار با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم توزین و طول کل آن‌ها با تخته زیست‌سنجی با دقت ۱

میلی‌متر اندازه‌گیری‌شد.قبل از انجام زیست‌سنجی،بچه‌ماهیان به‌مدت ۲۴ ساعت گرسنه نگه‌داشته شدند. غذای استفاده شده در این تحقیق غذای کنسانتره کوپنز آلمان مخصوص ماهیان خاویاری از روز صفر تا ۳۰ با سایز (FFS۲) و از روز ۳۰ تا روز ۶۰ با (GFS۱) استفاده گردید.

بررسی شاخص‌های رشد: در روزهای ۳۰ و ۶۰ آزمایش با استفاده از ماده بی‌هوشی ۲-فنوکسی اتانول (۰/۳ میلی‌لیتر در لیتر) تمامی ماهیان بی‌هوش شدند. پس از توزین و زیست‌سنجی ماهیان با ترازوی‌دیجیتال(با دقت ۰/۰۱) و خط‌کش مدرج حرفه‌ای،شاخص‌های رشد مورد ارزیابی قرار گرفت.

ضریب رشد ویژه (SGR)(Bagenal، ۱۹۷۸):

۱۰۰× (دوره پرورش به روز/ وزن اولیه - وزن نهایی LN)

ضریب تبدیل غذایی (FCR)(Bagenal، ۱۹۷۸):

میزان کل وزن تر کسب شده (گرم)/ میزان غذای دریافت شده (گرم)

میزان کارایی پروتئین (PER)(Tacon و Akiyama، ۱۹۷۷):

میزان وزن تر کسب شده (گرم)/ میزان کل پروتئین دریافت شده

فاکتور وضعیت (CF)(Bagenal، ۱۹۷۸):

۱۰۰× [(طول کل ماهی سانتی‌متر) L3 / (وزن ماهی گرم) W]

میزان رشد روزانه (DWG)(Bagenal، ۱۹۷۸):

میانگین وزن نهایی(گرم)- میانگین وزن اولیه(گرم)/تعدادروزهای آزمایش

درصدمیزان بقاء: ۱۰۰×(تعداد ماهیان اولیه/تعداد ماهیان زنده مانده)

میزان رشد نسبی (RGR)(Mohammadian و همکاران ۲۰۱۷):

۱۰۰× {وزن نهایی (گرم) – وزن اولیه (گرم) / وزن اولیه (گرم)}

انجام مراحل نمونه‌گیری از دستگاه گوارشی: نمونه‌گیری از دستگاه گوارش ماهیان، (یک سانتی‌متر بعد از زوائد باب المعدی) در روز صفر (شروع آزمایش)، ۳۰ و ۶۰ انجام شد. ۳ قطعه از ماهیان از هر تکرار را با استفاده از روش آسان‌کشی قطع نخاع کرده و سریعاً در مجاورت یخ قرار داده تا با به حداقل رساندن تغییر فعالیت آنزیمی، کالبدگشایی آن‌ها صورت گیرد. سپس بلافاصله در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد (تانک ازت مایع) نگه‌داری شدند Kuzmina و همکاران (۲۰۱۰). نمونه‌های فریز شده، سریعاً پس از خارج کردن از تانک ازت مایع توسط ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین گردید و قبل از آب شدن کامل یخ آن، به‌داخل ظرف مخصوص هموژن گذاشته شدند. سپس به نسبت ۱ به ۹ (وزنی- حجمی) محلول بافر هموژن برای سنجش آنزیم‌های پانکراسی(تریپسین،کیموتریپسین،آلفا-آمیلاز و لیپاز)، ۱۰۰ Tris-Hcl، ۰/۱ EDTA، ۰/۱٪ Triton 100X در pH=۷/۸ ترکیب گردید سپس نمونه‌ها توسط هموژنایزر الکتریکی (Heidolph instrument, German) هموژن شدند.

تهیه عصاره آنزیمی: نمونه‌های هموژن شده از درون ظروف کوچک شیشه‌ای به‌داخل اپندورف‌ها ریخته شده و سپس داخل سانتریوفوژ یخچال‌دار قرار داده شدند و در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریو فوژ (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه ، به‌مدت ۱۰ دقیقه) گردیدند. در نهایت از مایع رویی حاصله (عصاره آنزیمی) برای سنجش آنزیمی استفاده شد (Rungruangsak-Torrissen و همکاران ۲۰۰۲).

استخراج آنزیم روده‌ای: برای استخراج آنزیم روده‌ای آلکالین فسفاتاز از بافر سرد مانیتول ۵۰ mM، بافرTris-HCl mM ۲ در pH=۷ به نسبت ۱:۳۰ وزنی- حجمی استفاده گردید و به‌مدت ۱ دقیقه در ۱۰۰۰۰rpm سانتریو فوژ شد (Mohammadian و همکاران ۲۰۱۷). پس از هموژن کردن نمونه‌ها در بافر فوق، کلرید کلسیم ۰/۱ M به هموژن اضافه شده و ۱۰ دقیقه در ۹۰۰۰ دور سانتریو فوژ شده و مایع رویی حاصله جهت سنجش آنزیم‌ها استفاده گردید. برای تعیین فعالیت آنزیم ترپسین، از سوبسترای N- بنزوئیل-L- آرژنین اتیل استر (BAEE) استفاده گردید. BAEE تحت تأثیر آنزیم تجزیه و به N - بنزوئیل-L- آرژنین تبدیل می‌شود. نتایج در طول موج ۲۵۳ نانومتر قرائت نوری صورت گرفت (Erlanger و همکاران ۱۹۵۱). ابتدا ۱۸۰ میکرولیتر از محلول سوبسترای BAEE با ۵۷۰۱ µ از اسیدکلریدریک ۱ mM مخلوط و سپس برای هم‌دمایی در دمای ۲۵ °c قرار گرفتند. بعد نمونه به میزان ۳۰۱ µ از نمونه رقیق شده اضافه گردید و به‌مدت ۵ دقیقه قرائت نوری توسط اسپکتروفتومتر (یونیکو مدل 2802 UV) در طول موج ۲۵۳ نانومتر انجام شد. برای تعیین فعالیت آلفا- آمیلاز از نشاسته به‌عنوان سوبسترا استفاده گردید. نشاسته تحت اثر آنزیم تجزیه شده و تولید مالتوز می‌نماید که از طریق رنگ‌سنجی و تغییر شدت رنگ در معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید قابل‌سنجش می‌باشد. ابتدا ۲۵۰۱ µ از عصاره آنزیمی رقیق شده با آب مقطر سرد به لوله آزمایشی و ۲۵۰۱ µ آب مقطر نیز به لوله دیگری به‌عنوان شاهد وارد شد. سپس عمل انکوباسیون به‌مدت ۴-۳ دقیقه در ۲۵ °c انجام شد تا به دمای تعادل برسند. سپس ۲۵۰۱ µ از نشاسته ۱٪ به لوله‌ها اضافه گردید و عمل انکوباسیون دقیقاً به‌مدت ۳ دقیقه انجام شد. بعد از ۳ دقیقه، ۲۵۰۱ µ از معرف رنگی دی نیترو سالیسیلیک اسید به لوله‌ها اضافه گردید و به‌مدت ۱۵ دقیقه لوله‌ها از حمام خارج شده و در دمای اتاق خنک شدند. سپس ۲/۵ ml آب مقطر به لوله‌ها اضافه گردید و محتویات لوله‌ها به‌خوبی مخلوط شده و قرائت نوری در ۵۴۰ نانومتر انجام گرفت. سپس قرائت نوری انجام شده در منحنی استاندارد مالتوز قرار گرفته و میزان مالتوز رهاسازی شده تحت اثر آنزیم بر روی سوبسترا (نشاسته) به‌دست آمد. واحد فعالیت آلفا- آمیلاز، بر حسب میکرومول مالتوز آزاد شده تحت اثر آنزیم در دقیقه به‌ازای میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد Bernfeld (۱۹۵۵). برای سنجش آنزیم لیپاز از روشWorthington (۱۹۹۱) استفاده گردید. در این روش از امولسیون روغن‌زیتون به‌عنوان سوبسترا استفاده گردید.بدین‌منظور روغن زیتون

آزمایشگاهی (Fluka) تهیه گردید. برای سنجش این آنزیم از بافر ۰/۸ M Tris-Hcl، محلول هیدروکسیدسدیم ۵۰ mM و معرف تیمول فتالئین ۰/۰۹٪ استفاده شد. جهت سنجش آنزیم آلکالین فسفاتاز از کیت زیست‌شیمی (Ref: ۱۰-۵۰۳) استفاده شد. ۵ قسمت از بافر بیکربنات را با یک شود. پس از این زمان ml ۵ محلول یک گرم در لیتر سود به آن اضافه می‌شود تا واکنش متوقف شود. میزان جذب در nm ۴۰۵ اندازه‌گیری شد. قسمت محلول معرف Para-nitrophenyl phosphate M ۰/۱ مخلوط کرده و ۵ دقیقه در بن ماری ^{o}c ۳۷ قرار داده شد تا هم‌دمایی صورت گیرد. میزان ml ۰/۵ از این مخلوط را با µl ۲۰ محلول آنزیمی استخراج شده مخلوط کرده و ۱۵ دقیقه در دمای ^{o}c ۳۷ قرار داده‌شد تا انکوبه شاهد نیز مانند نمونه بالا آماده‌سازی شد با این تفاوت که محلول آنزیمی پس از افزودن محلول سود به لوله آزمایش اضافه شد.

تجزیه و تحلیل آماری: برای آنالیز اطلاعات از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد و تاثیر اسیدی‌فایرهای مختلف بر عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی مورد بررسی بین ۷ تیمار توسط آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) یک و دو طرفه با ضریب اطمینان ۹۵٪ مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از آزمون تکمیلی دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵٪ استفاده شد. هم‌چنین ترسیم نمودار در فضای نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۰) انجام گرفت.

نتایج

نتایج تاثیر اسیدی فایرها بر فاکتورهای رشد فیل‌ماهی:

ضریب رشد ویژه (جداول ۱و ۲) با گذر زمان آزمایش در تمام تیمارها (حتی گروه شاهد) کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). بین تیمارهای آزمایشی در روز ۳۰ بالاترین مقدار این پارامتر در تیمار سدیم دی فرمات ۰/۱ (۵/۳±۰/۰۰۵ درصد/روز) و کم‌ترین مقدار این پارامتر در تیمار اسیدفرمیک ۰/۱ (۹۳/۰۰۱±۴/۰درصد/روز) بود. بین تیمارهای آزمایشی در روز ۶۰ بالاترین مقدار این پارامتر در تیمار اسیدفرمیک ۰/۱ (۷۷/۰۰۳±۲/۰ درصد/روز) و کم‌ترین مقدار این پارامتر در تیمار سدیم دی‌فرمات ۰/۰۵ (۳۸/۰۰۵±۲/۰درصد/روز) بود. ضریب تبدیل غذایی با گذر زمان آزمایش در تمام تیمارها (حتی گروه شاهد) افزایش داشت. در بین تیمارها، در روز ۳۰، تیمار سدیم دی‌فرمات ۰/۱٪ کم‌ترین مقدار را داشته (۵/۰۱±۰/۰) و با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵) و بالاترین مقدار این پارامتر در تیمار اسیدفرمیک ۰/۱٪ (۵۹/۰۱±۰/۰) اندازه‌گیری شد. بین تیمارهای آزمایشی در روز ۶۰ بالاترین مقدار این پارامتر در تیمار سدیم دی‌فرمات ۰/۰۵٪ (۹۵/۰۰۱±۰/۰) و کم‌ترین مقدار این پارامتر در تیمار اسیدفرمیک ۰/۱٪ (۸۱/۰۰۱±۰/۰) بود و با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵) اما گروه اسیدفرمیک ۰/۱۵٪ با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت (P>۰/۰۵). بازدهی پروتئین با گذر زمان آزمایش در تمام تیمارها (حتی گروه شاهد) کاهش داشت. بازده پروتئین بین تمامی تیمارها، اسیدفرمیک ۰/۰۵٪ با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار نشان نداد (P>۰/۰۵). بالاترین مقدار این پارامتر در تیمار سدیم دی‌فرمات ۰/۱٪ (۷/۰۰۳±۳/۰درصد) و کم‌ترین مقدار این پارامتر در تیمار اسیدفرمیک ۰/۱٪ (۱۳/۰۰۱±۳/۰) بود. بین تیمارهای آزمایشی در روز ۶۰ بالاترین مقدار این پارامتر در تیمار اسیدفرمیک ۰/۱٪ (۳۸/۰۰۵±۲/۰) و کم‌ترین مقدار این پارامتر در تیمار سدیم دی‌فرمات ۰/۰۵٪ (۰۲/۰۰۳±۲/۰) بود و با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵) اما گروه اسیدفرمیک ۰/۱۵٪ با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت (P>۰/۰۵). نسبت بازده غذایی در طی دوره آزمایش در تمام تیمارها (حتی گروه شاهد) کاهش داشت. این پارامتر در بازه ۳۰ روزه بین اکثر تیمارها و گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵) اما تیمارهای فرمیک اسید ۰/۰۵٪ و اسیدفرمیک ۰/۱۵٪ با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار نداشتند (P>۰/۰۵). تیمار سدیم دی‌فرمات ۰/۱٪ (۶۶/۱۶±۱۹۹/۰) بیش‌ترین مقدار را در این پارامتر و تیمار اسیدفرمیک ۰/۱٪ (۱۲/۱±۱۶۹/۰) کم‌ترین مقدار را داشت. بین تیمارهای آزمایشی در روز ۶۰ بالاترین مقدار این پارامتر در تیمار اسیدفرمیک ۰/۱ (۰۰/۲۷±۱۲۴/۰) و کم‌ترین مقدار در تیمار سدیم دی‌فرمات ۰/۰۵٪ (۲۶/۱۸±۱۰۵/۰) بود و با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵). فاکتور وضعیت در طی دوره آزمایش در تمام تیمارها (حتی گروه شاهد) کاهش داشت. این پارامتر در طی ۳۰ روز بین تمام تیمارها و گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). بیش‌ترین مقدار این فاکتور در تیمار سدیم دی‌فرمات ۰/۱٪ (۴۷/۰۳±۱/۰) و کم‌ترین مقدار این فاکتور در تیمار اسیدفرمیک ۰/۱٪ (۱۸/۰۲±۱/۰) دیده شد. بین تیمارهای آزمایشی در روز ۶۰ بالاترین مقدار این پارامتر در شاهد (۰/۰۰۴±۰/۹۵) و کم‌ترین مقدار در تیمار سدیم دی فرمات ۰/۰۵٪ (۸۵/۰۰۹±۰/۰) بود و با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵). در طی دوره آزمایش در تمام تیمارها (حتی گروه شاهد) افزایش داشت به‌طوری‌که این پارامتر در طی ۳۰ روز بین تمام تیمارها و گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵) و بیش‌ترین مقدار این پارامتر در تیمار سدیم دی‌فرمات ۰/۱٪ (۰/۰۳±۷۹/۶۳) کم‌ترین مقدار در تیمار اسیدفرمیک ۰/۱٪ (۰/۰۱±۷۷/۲۰) بود. در طی ۶۰ روز نیز بین تمام تیمارها و گروه شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۵) و بیش‌ترین مقدار این پارامتر در تیمار اسید فرمیک ۰/۱٪ (۰/۲۲±۱۲۹/۸۴) کم‌ترین مقدار در تیمار سدیم دی فرمات ۰/۰۵٪ (۰/۳۳±۱۰۴/۰۲) بود. رشد روزانه در طی دوره آزمایش در تمام تیمارها (حتی گروه شاهد) افزایش داشت به‌طوری‌که این

پارامتر در طی ۳۰ روز بین تمام تیمارها و گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵) و بیش‌ترین مقدار این پارامتر در تیمار سدیم دی فرمات ۰/۱٪ (۴/۰±۴۵/۰۰۳) و کم‌ترین مقدار در اسیدفرمیک ۰/۱٪ (۳/۵۹±۰/۰۰۲) بود. این پارامتر در طی ۶۰ روز بین تمام تیمارها به‌جز تیمار اسیدفرمیک ۰/۱۵٪ با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵) و بیش‌ترین مقدار این پارامتر در تیمار سدیم دی‌فرمات ۰/۱٪ (۶/۲۰±۰/۰۱) و کم‌ترین مقدار در تیمار سدیم دیفرمات ۰/۰۵٪ (۵/۰±۳۶/۰۰۹) بود.

جدول ۱: شاخص‌های رشد در گروه‌های مختلف تغذیه شده با اسیدی فایرها و شاهد (انحراف معیار ± میانگین)(۳تکرار) در ۳۰ روز

تیمارها	وزن اولیه	وزن نهایی	فاکتور وضعیت	نرخ رشد ویژه	ضریب تبدیل غذایی	ضریب تبدیل غذایی	ضریب رشد ویژه	میزان رشد نسبی	نسبت بازده غذایی
تیمار۱	۸/۳۱	۴۸/۱۵۴	۰/۳۸±۰/۰۳^{a}	۵/۲۷±۰/۰۱^{b}	۰/۵۰±۰/۰۰۰^{d}	۳/۶۱±۰/۰۰۷^{b}	۴/۰۷±۰/۰۰۸^{b}	۷۹/۴۱±۰/۰۶^{b}	۱۹۴/۹۰±۰/۴۲^{b}
تیمار۲	۱/۳۴	۴۷/۱۶۷	۱/۴۷±۰/۰۳^{a}	۵/۳۰±۰/۰۰۰۵^{a}	۰/۵۰±۰/۰۰^{d}	۳/۷۰±۰,۰۰۳^{a}	۴/۴۵±۰/۰۰۳^{a}	۷۹/۶۳±۰/۰۳	۱۹۹/۶۶±۰/۱۶^{a}
تیمار۳	۲/۳۲	۴۴/۱۴۴	۱/۲۸±۰/۰۳^{b}	۵/۰۰±۰/۰۱^{e}	۰/۵۸±۰/۰۰۱^{b}	۳/۲۱±۰/۰۰۵^{d}	۳/۷۴±۰/۰۰۶^{c}	۷۷/۶۹±۰/۰۷^{e}	۱۷۳/۰۹±۰/۳^{d}
تیمار۴	۳۱/۱	۱۵/۱۴۱	۱/۲۶±۰/۰۱^{cb}	۵/۰۴±۰/۰۰۸^{d}	۰/۵۷±۰/۰۰^{d}	۳/۲۱±۰/۰۰۱^{c}	۳/۶۷±۰/۰۰۲^{e}	۷۷/۹۸±۰/۰۵^{d}	۱۷۴/۲۵±۰/۰۹^{c}
تیمار۵	۸/۳۱	۴۴/۱۳۹	۱/۱۸±۰/۰۲^{c}	۴/۹۸±۰/۰۰۱^{d}	۰/۵۹±۰/۰۰^{d}	۳/۱۳±۰/۰۰۱^{e}	۳/۵۹±۰/۰۰۲	۷۷/۲۰±۰/۰۱^{f}	۱۶۹/۱۲±۰/۱^{e}
تیمار۶	۳/۳۱	۳۳/۱۴۳	۱/۲۲±۰/۰۳^{cb}	۵/۰۷±۰/۰۱^{d}	۰/۵۷±۰/۰۰۱^{c}	۳/۲۱±۰/۰۰۶^{c}	۳/۷۴±۰/۰۰۷^{c}	۷۸/۱۸±۰/۰۱۲	۱۷۴/۲۵±۰/۳^{c}
شاهد	۶/۳۰	۸۲/۱۴۱	۱/۲۹±۰/۰۲^{b}	۵/۱۲±۰/۰۱^{c}	۰/۵۷±۰/۰۰۱^{c}	۳/۲۱±۰/۰۰^{c}	۳/۷۱±۰/۰۰۶^{d}	۷۸/۴۵±۰/۰۹	۱۷۴/۱۶±۰/۲۹^{c}

حروف غیرهمنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

جدول ۲: شاخص‌های رشددر گروه‌های مختلف تغذیه شده با اسیدی فایرها و شاهد (انحراف معیار ± میانگین)(۳تکرار) در ۶۰ روز

تیمارها	وزن اولیه	وزن نهایی	فاکتور وضعیت	نرخ رشد ویژه	ضریب تبدیل غذایی	ضریب تبدیل غذایی	ضریب رشد ویژه	میزان رشد نسبی	نسبت بازده غذایی
تیمار۱	۱۵۴/۱	۳۱۵/۱۷	۰/۸۵±۰/۰۰۹^{d}	۲/۳۸±۰/۰۰۵^{g}	۰/۹۵±۰/۰۰۱^{a}	۲/۰۲±۰/۰۰۳^{f}	۵/۳۶±۰/۰۰۹^{f}	۱۰۴/۰۲±۰/۳۳	۱۰۵/۲۶±۰/۱۸
تیمار۲	۱۶۷/۶	۳۵۳/۶۰	۰/۹۱±۰/۰۰۸^{b}	۲/۴۹±۰/۰۰۶	۰/۸۵±۰/۰۰۲^{d}	۲/۲۶±۰/۰۰۶	۶/۲۰±۰/۰۱^{d}	۱۱۱/۰۳±۰/۴۲	۱۱۷/۴۵±۰/۳۲^{d}
تیمار۳	۱۴۴/۴	۳۲۲/۶۱	۰/۹۲±۰/۰۱^{b}	۲/۶۸±۰/۰۰۲^{b}	۰/۸۴±۰/۰۰۱^{e}	۲/۲۸±۰/۰۰۳^{b}	۵/۴۹±۰/۰۱^{c}	۱۲۳/۳۰±۰/۱۳^{b}	۱۱۸/۵۱±۰/۲۰^{b}
تیمار۴	۱۴۱/۰	۳۱۲/۶۸	۰/۹۲±۰/۰۰۱^{b}	۲/۶۵±۰/۰۰۲^{c}	۰/۸۸±۰/۰۰۱^{c}	۲/۱۹±۰/۰۰۳^{d}	۵/۷۱±۰/۰۰۰۹^{d}	۱۲۱/۶۹±۰/۱۸^{c}	۱۱۳/۷۷±۰/۱۹^{b}
تیمار۵	۱۳۹/۴	۳۲۰/۴۸	۰/۹۲±۰/۰۱^{b}	۲/۷۷±۰/۰۰۳^{a}	۰/۸۱±۰/۰۰۱^{f}	۲/۳۸±۰/۰۰۵^{a}	۶/۰۳±۰/۰۱^{b}	۱۲۹/۴۸±۰/۲۲	۱۲۴±۰/۲۷^{a}
تیمار۶	۱۴۳/۳	۳۰۷/۶۰	۰/۸۹±۰/۰۰۶^{c}	۲/۵۵±۰/۰۰۹^{e}	۰/۹۰±۰/۰۰۴^{b}	۲/۱۴±۰/۰۰۱^{e}	۵/۴۸±۰/۰۲^{e}	۱۱۴/۷۹±۰/۶۰	۱۱۱/۳۲±۰/۵۶^{e}
شاهد	۱۴۱/۸	۳۰۶/۶۳	۰/۹۵±۰/۰۰۴^{a}	۲/۵۷±۰/۰۰۵^{d}	۰/۹۰±۰/۰۰۲^{b}	۲/۱۴±۰/۰۰۶^{e}	۵/۴۹±۰/۰۱^{e}	۱۱۶/۲۱±۰/۳۳	۱۱۱/۲۶±۰/۳۱^{e}

حروف غیرهمنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

نتایج تأثیر اسیدی فایر بر آنزیم های گوارشی فیل ماهی

بررسی فعالیت آنزیم پروتئاز: میزان فعالیت آنزیم پروتئاز در روز صفر بین تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵) و پس از گذشت ۳۰ روز در تمام تیمارها افزایش معنی‌داری نسبت به روز صفر مشاهده شد (P<۰/۰۵). در روز ۶۰ آزمایش نسبت به روز ۳۰، به‌جز تیمارهای سدیم دی‌فرمات ۰/۰۵٪ و سدیم دی‌فرمات ۰/۱٪ کاهش معنی‌داری را نشان دادند (P<۰/۰۵). در روز ۳۰ هیچ‌کدام از تیمارهای آزمایشی با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵) به طوری‌که بالاترین مقدار این پارامتر در تیمار سدیم دی‌فرمات ۰/۱۵٪ و کم‌ترین مقدار این پارامتر در تیمار اسیدفرمیک ۰/۰۵٪ مشاهده شد. در روز ۶۰ تنها تیمارهای سدیم دی‌فرمات ۰/۰۵٪ و سدیم دی فرمات ۰/۱٪ با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵) به طوری که بالاترین مقدار این پارامتر در تیمار سدیم دی‌فرمات ۰/۰۵٪ و کم‌ترین مقدار آن در تیمار سدیم دی‌فرمات ۰/۱۵٪ مشاهده شد (شکل ۱) .

بررسی فعالیت آنزیم کیموتریپسین: میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین در روز صفر بین تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵) و پس از گذشت ۳۰ روز در تمام تیمارها به‌جز تیمار شاهد افزایش معنی‌داری نسبت به روز صفر مشاهده شد (P<۰/۰۵). در روز ۶۰ آزمایش نسبت به‌روز ۳۰، به‌جز تیمارهای سدیم‌دی‌فرمات ۰/۰۵٪، سدیم دی‌فرمات ۰/۱٪ و سدیم دی‌فرمات ۰/۱۵٪ کاهش معنی‌داری را نشان دادند (P<۰/۰۵) درحالی‌که تیمارهای اسیدفرمیک ۰/۰۵٪ و اسیدفرمیک ۰/۱٪ افزایش معنی‌داری را نشان دادند (P<۰/۰۵) و تیمارهای اسیدفرمیک ۰/۱۵٪ و شاهداختلاف معنی‌داری نشان ندادند

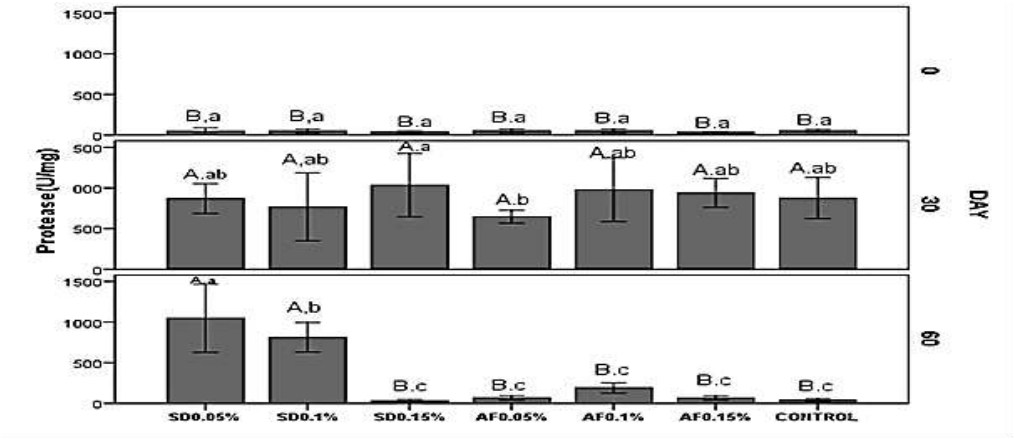
(P>۰/۰۵). در روز ۳۰ تیمارهای سدیم دی‌فرمات ۰/۰۵٪، سدیم دی فرمات ۰/۱٪ و اسیدفرمیک ۰/۱۵٪ با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند(P<۰/۰۵)به‌طوری‌که بالاترین‌مقدار این‌پارامتر در تیمار سدیم دی‌فرمات ۰/۰۵٪ و کم‌ترین مقدار این پارامتر در تیمار شاهد مشاهده شد. در روز ۶۰ تنها تیمار سدیم دی‌فرمات ۰/۱۵٪ با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت(P>۰/۰۵) به‌طوری‌که بالاترین مقدار این پارامتر در تیمار سدیم دی‌فرمات ۰/۰۵٪ و کم‌ترین مقدار آن در تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۲).

بررسی فعالیت آنزیم تریپسین: میزان فعالیت آنزیم تریپسین در روز صفر بین تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵) و پس از گذشت ۳۰ روز در تمام تیمارها به‌جز تیمار شاهد افزایش معنی‌داری نسبت به روز صفر مشاهده شد (P<۰/۰۵). در روز ۶۰ آزمایش نسبت به‌روز ۳۰، تمام تیمارها افزایش داشتند که تنها تیمارهای اسیدفرمیک ۰/۱٪،اسیدفرمیک ۰/۱۵٪وسدیم‌دی‌فرمات ۰/۰۵٪ اختلاف‌معنی‌داری را نشان دادند(P<۰/۰۵).درروز ۳۰ تمام‌تیمارها با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵) به‌طوری‌که بالاترین مقدار این پارامتر در تیمار سدیم دی‌فرمات ۰/۱۵٪ و کم‌ترین مقدار این پارامتر در تیمار شاهد مشاهده شد. در روز ۶۰ نیز تمام تیمارها با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند(P<۰/۰۵)به‌طوری‌که بالاترین مقدار این پارامتر در تیمار اسیدفرمیک ۰/۱٪ و کم‌ترین مقدار آن‌در‌تیمار‌شاهدمشاهده شد (شکل ۳).

بررسی‌فعالیت‌آنزیم آلفاآمیلاز: میزان فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز در روز صفر بین تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت(P>۰/۰۵) اما پس از گذشت ۳۰ روز تنها در تیمارهای سدیم دی‌فرمات ۰/۱٪ و سدیم دی‌فرمات ۰/۱۵٪ کاهش معنی‌داری نسبت به روز صفر مشاهده شد (P<۰/۰۵). در روز ۶۰ آزمایش نسبت به روز ۳۰، تمام تیمارها به‌جز سدیم دی‌فرمات ۰/۰۵٪ و شاهد افزایش معنی‌داری را نشان دادند (P<۰/۰۵). در روز ۳۰ میزان فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز تنها در تیمار سدیم دی‌فرمات ۰/۱٪ با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵) به‌طوری‌که بالاترین مقدار این پارامتر در تیمار سدیم دی فرمات ۰/۱۵٪ و کم‌ترین مقدار این پارامتر در تیمار سدیم دی‌فرمات ۰/۱٪ مشاهده‌شد.در روز ۶۰ تنهاتیمارهای اسیدفرمیک ۰/۰۵٪، اسید فرمیک ۰/۱٪ و اسیدفرمیک ۰/۱۵٪ با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند(P<۰/۰۵)به‌طوری‌که بالاترین مقدار این پارامتر در تیمار اسید فرمیک ۰/۱٪ وکم‌ترین‌مقدار آن در تیمار شاهد مشاهده شد(شکل ۴).

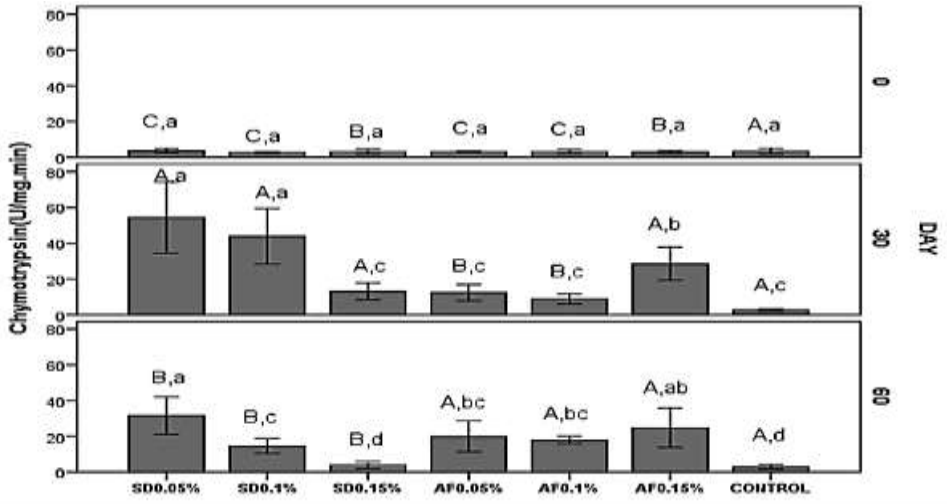
بررسی فعالیت آنزیم لیپاز: میزان فعالیت آنزیم لیپاز در روز صفر بین تیمارها اختلاف‌معنی‌داری نداشت(P>۰/۰۵)و پس‌از گذشت ۳۰ روز نیز در هیچ‌کدام از تیمارها افزایش معنی‌داری نسبت به روز صفر مشاهده نشد (P>۰/۰۵). در روز ۶۰ آزمایش نسبت به روز ۳۰، تنها تیمارهای اسیدفرمیک ۰/۰۵٪، اسیدفرمیک ۰/۱٪ و اسیدفرمیک ۰/۱۵٪ افزایش معنی‌داری را نشان دادند (P<۰/۰۵). در روز ۳۰ هیچ کدام از تیمارهای آزمایشی با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵) به‌طوری‌که بالاترین مقدار این پارامتر در تیمار سدیم دی فرمات ۰/۱۵٪ وکم‌ترین مقدار این پارامتر در تیمار اسیدفرمیک ۰/۰۵٪ مشاهده شد. در روز ۶۰ تنها تیمارهای اسیدفرمیک ۰/۱٪ و اسید فرمیک ۰/۱۵٪ با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵) به‌طوری‌که بالاترین مقدار این پارامتر در تیمار اسیدفرمیک ۰/۱٪ و کم‌ترین مقدار آن در تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۵).

بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز: میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در روز صفر بین تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). اما میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز پس از گذشت ۳۰ روز در تمام تیمارها به‌جز تیمارهای سدیم دی‌فرمات ۰/۱٪ و شاهد افزایش معنی‌داری داشت(P<۰/۰۵). در روز ۶۰ آزمایش نسبت به روز ۳۰، تیمارهای اسیدفرمیک ۰/۰۵٪ ، اسیدفرمیک ۰/۱٪ ، اسیدفرمیک ۰/۱۵٪ وسدیم‌دی‌فرمات ۰/۰۵٪کاهش‌معنی‌داری‌داشتند (P<۰/۰۵). در روز ۳۰ میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز تیمارهای اسیدفرمیک ۰/۰۵٪، اسیدفرمیک ۰/۱٪ و اسیدفرمیک ۰/۱۵٪با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵) به‌طوری‌که بالاترین مقدار این پارامتر در تیمار شاهد مشاهده شد. در روز ۶۰ تنها تیمارهای اسیدفرمیک ۰/۱۵٪ و سدیم دی‌فرمات ۰/۱۵٪ با تیمارشاهد اختلاف‌معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵) به‌طوری‌که بالاترین‌مقدار این پارامتر در تیمارسدیم‌دی‌فرمات ۰/۱۵٪ و کم‌ترین مقدار آن در تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۶).



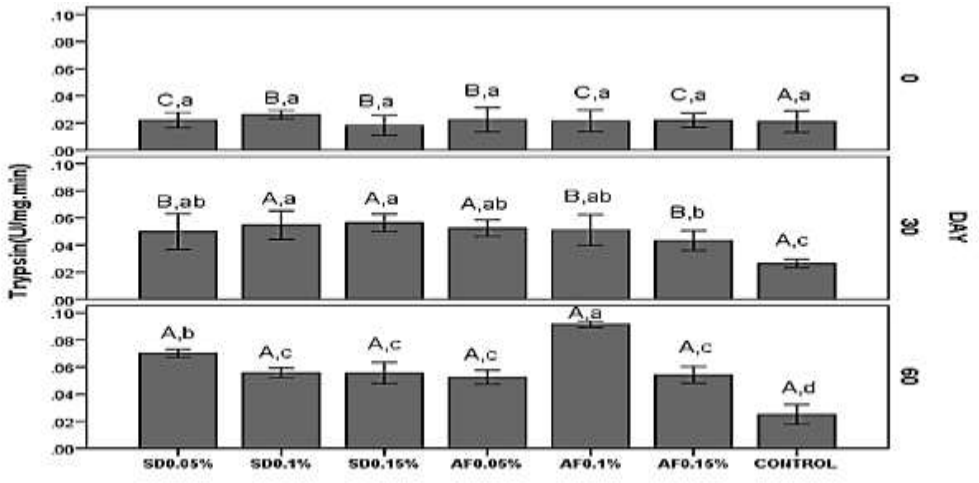
شکل ۱: مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های پروتئاز روده تحت تأثیر مکمل‌های غذایی اسیدی‌فایرها در فیل‌ماهی

حروف کوچک لاتین غیرهمنام روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر سطر، و حروف بزرگ لاتین غیرهمنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون می‌باشد.



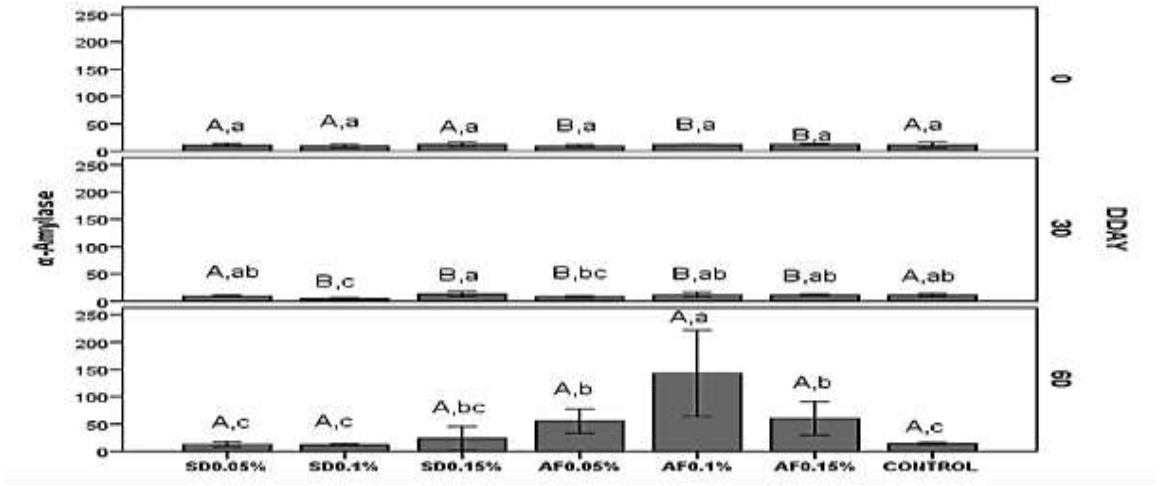
شکل ۲: مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های کیموتریپسین روده تحت تأثیر مکمل‌های غذایی اسیدی‌فایرها در فیل‌ماهی

حروف کوچک لاتین غیرهمنام روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر سطر، و حروف بزرگ لاتین غیرهمنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون می‌باشد.



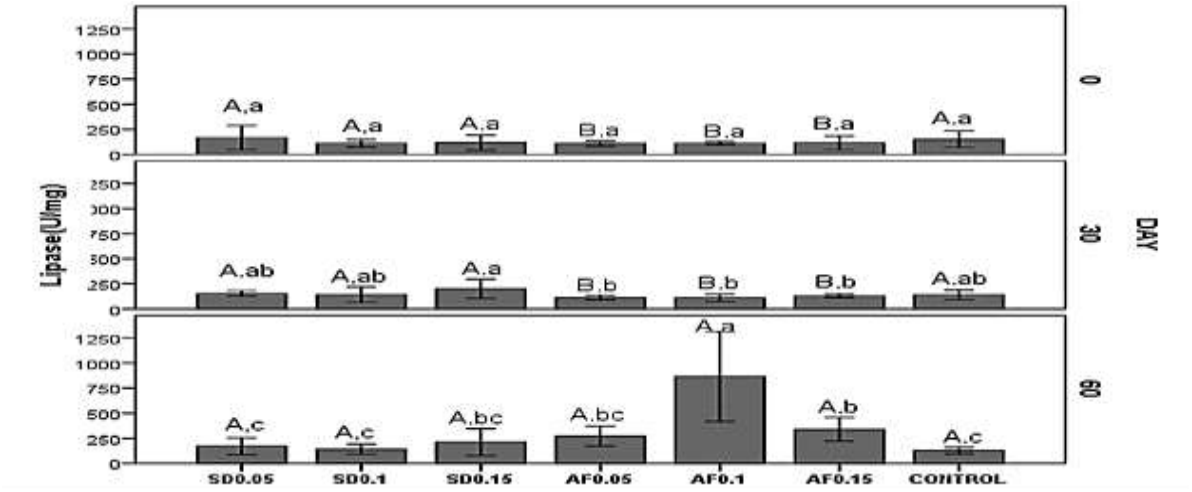
شکل۳: مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های تریپسین روده تحت تأثیر مکمل‌های غذایی اسیدی‌فایرها در فیل‌ماهی

حروف کوچک لاتین غیرهمنام روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر سطر، و حروف بزرگ لاتین غیرهمنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون می‌باشد.



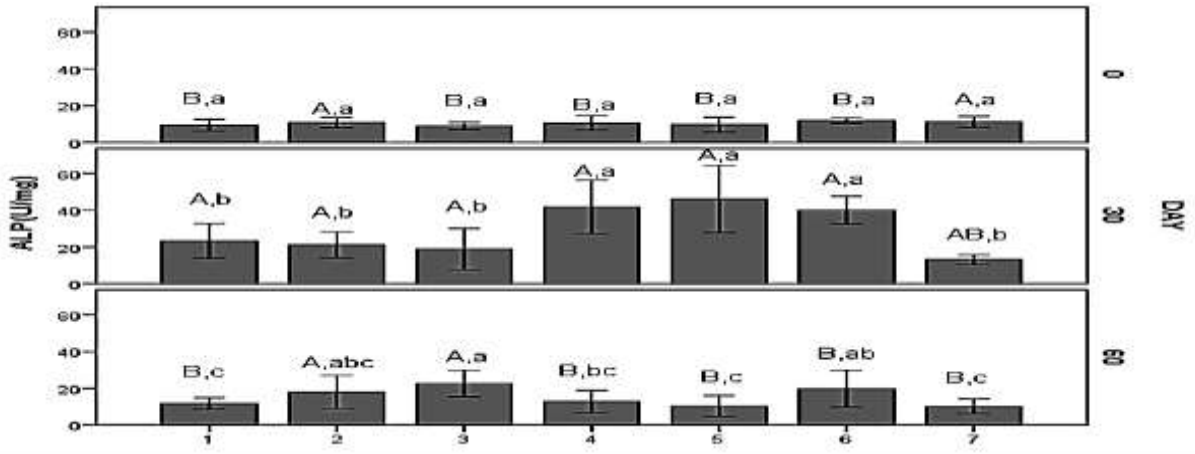
شکل ۴: مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز روده تحت تأثیر مکمل‌های غذایی اسیدی‌فایرها در بچه فیل‌ماهی

حروف کوچک لاتین غیرهمنام روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر سطر، و حروف بزرگ لاتین غیرهمنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون می‌باشد.



شکل ۵: مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های لیپاز روده تحت تأثیر مکمل‌های غذایی اسیدی‌فایرها در بچه فیل‌ماهی

حروف کوچک لاتین غیرهمنام روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر سطر، و حروف بزرگ لاتین غیرهمنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون می‌باشد.



شکل ۶: مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز روده تحت تأثیر مکمل‌های غذایی اسیدی‌فایرها در فیل‌ماهی

حروف کوچک لاتین غیرهمنام روی انحراف معیار نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر سطر، و حروف بزرگ لاتین غیرهمنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون می‌باشد.

بحث

در مطالعه حاضر، اثرات مقایسه‌ای سدیم‌دی‌فرمات و اسیدی‌فایر فورمی در غلظت‌های مختلف در بچه‌ماهی فیل‌ماهی مورد بررسی قرار گرفت که به‌صورت هم‌زمان اثرات عملکرد تغذیه، رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی نیز اندازه‌گیری شد. استفاده از اسیدهای آلی به‌همراه خوراک دارای اثرات مثبت در تولید و رشد حیوانات می‌باشد.

غذای آبزیان، به‌خصوص گونه‌های گوشت‌خوار مانند فیل‌ماهی به‌طور عمده از مواد غذایی گران‌قیمت مانند پودر ماهی و روغن ماهی تشکیل شده که دلیل عمده افزایش قیمت غذا می‌باشد (Hardy، ۲۰۰۰). کاربردهای اسیدها و نمک‌های آن‌ها در صنعت، بیش‌تر برای محافظت و نگه‌داری مواد غذایی است. پژوهش‌های انجام شده نشان داد، استفاده از اسیدسیتریک به‌عنوان ماده جاذب در جیره غذایی فیل ماهیان جوان باعث افزایش و بهبود پارامترهای رشد و تغذیه‌ای شده است (Sudagar و همکاران، ۲۰۱۰). احتمالاً اسیدی‌فایر در افزایش انتقال اسیدهای چرب نامناسب به میتوکندری و وارد کردن به چرخه کربس و استفاده از آن‌ها برای تامین انرژی نقش داشته باشد، به‌طوری که از سوزاندن پروتئین به‌عنوان ماده انرژی‌زا جلوگیری می‌کند. Khajepoor و همکاران (۱۳۸۹) و Hassan و همکاران (۲۰۱۴) بیان کردنداسیدهای آلی باعث‌کاهش FCR در تغذیه ماهی (*O. niloticus*) و بهبود شاخص‌های ارزیابی رشد می‌شود که با نتایج این پژوهش هم‌خوانی دارد. پژوهشگران بیان کردند که افزودن ۳ گرم در کیلو گرم سدیم دی‌فرمات (NDF) به جیره‌غذایی ماهی تیلاپیا باعث بهبود رشد و بهتر شدن راندمان غذایی می‌گردد (Liebert و همکاران، ۲۰۱۰). در پژوهشی دیگر استفاده از سدیم دی‌فرمات (NDF) در جیره، قابلیت هضم مواد مغذی، اسیدهای آمینه و کیفیت فیزیکی پروتئین جو در جیره‌قزل‌آلای رنگین‌کمان‌را بهبودبخشیده است(Morkenو همکاران، ۱۳۸۹). در حال حاضر، در بین اسیدهای آلی، سدیم دی‌فرمات و نمک‌های آن‌ها به‌عنوان یک‌مکمل در غذای‌آبزیان بیش‌تر موردمطالعه قرار گرفته است تا به‌طور بالقوه رشد و مصرف مواد غذایی در ماهی را بهبود بخشد (Romano و همکاران، ۲۰۱۶). Zhu و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که افزودن (۲ یا ۴ گرم در کیلوگرم) اسید آلی به جیره غذایی مبتنی بر پروتئین گیاهی در گربه‌ماهی سرزرد (*Pelteobagrus fulvidraco*) باعث بهبود عملکرد رشد و افزایش قابل توجه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود. این نتایج نشان می‌دهدکه اسید چرب حاصل از سدیم دی‌فرمات به‌عنوان ماده محلول در چربی می‌تواند به سرعت جذب و به‌عنوان منبع انرژی برای سلول‌های پوششی روده به‌کار رود. ظرفیت هضم و جذب برای رشد ماهیان از اهمیت بالایی برخوردار است. فعالیت آنزیم‌های گوارشی نقش مهمی در تحریک و شروع فرآیندهای مرتبط با رشد موجودات زنده دارند (Zamani و همکاران، ۱۳۸۹؛ Imani و همکاران، ۱۳۸۸) که میزان فعالیت آن‌ها به مرحله زندگی،میزان غذا، ترکیب شیمیایی و نیازهای تغذیه‌ای آبزیان بستگی دارد (Ahmadnia و همکاران، ۲۰۱۲). ارزیابی سطح فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌تواند به‌عنوان شاخصی مناسب جهت مقایسه ضریب رشد ماهی، پذیرش غذا و هم‌چنین ظرفیت گوارشی، مورد استفاده قرار گیرد (Mohamadyan و همکاران، ۱۳۹۲). Li و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که فعالیت آنزیم‌های دیابتی اسیدپروتئاز و آمیلاز در ماهی تیلاپیای هیبریدی تغذیه شده با ۱٪ اسیدسیتریک افزایش می‌یابد. اولین مطالعه از اثر اسیدهای آلی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی توسط Castillo و همکاران (۲۰۱۴) گزارش شد آن‌ها بیان کردند فعالیت آنزیم پپسین،آنزیم‌های پانکراس (تریپسین و لیپاز) و آنزیم‌های روده‌ای (لوسین-آمینوپپتیداز و فسفاتاز) با افزودن اسیدهای آلی در رژیم غذایی ماهی دریایی سرخ (*Sciaenops ocellatus*) افزایش می‌یابد. هم‌چنین طی پژوهشی که بر روی تاثیر اسیدهای آلی بر جیره میگوی (*Litopenaeus vannamei*) انجام شده است بیان شد فعالیت تریپسین و کیموتریپسین در حضور غلظت‌های مختلف سدیم‌استات و پروپیونات در سیستم گوارشی افزایش می‌یابد آن‌ها نتیجه گرفتند اسیدها و نمک‌های آلی در رژیم غذایی فعالیت آنزیمی گوارشی و هضم پروتئین سویا را تغییر می‌دهند که با نتایج این پژوهش هم‌خوانی دارد (Silva و همکاران، ۲۰۱۵).

در این پژوهش آنزیم‌های گوارشی تریپسین و کیموتریپسین در روز ۳۰ آزمایش در همه گروهای اسیدی‌فایر به‌خصوص تیمار ۰/۱ درصد سدیم دی‌فرمات نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشته‌اند ($P<0/05$). اما در روز ۶۰ با کاهش فعالیت آنزیم‌های پروتئولایتکی در گروه‌های سدیم دی‌فرمات مواجهه شدیم ولی تیمارهای غذایی مکمل شده با اسیدی‌فایر اسیدفرمیک و به‌خصوص تیمار ۰/۱ درصد افزایش فعالیت نشان دادند که متناسب با روند نتایج عملکرد رشد ماهیان بود. ولی روند فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و پروتئاز متفاوت با آنزیم‌های دیگر تحت تاثیراسیدی‌فایرها بود ($P>0/05$) به‌طوری‌که فعالیت آنزیم‌آلکالین فسفاتاز در تیمارهای سدیم دی‌فرمات در روز ۳۰ آزمایش کاهش ولی تیمار اسیدفرمیک ۰/۱ درصد افزایش‌معنی‌داری را نشان داد اما در روز ۶۰ آزمایش تیمارهای سدیم دی‌فرمات افزایش فعالیت ولی تیمار اسیدفرمیک ۰/۱ درصد کاهش معنی‌داری را نشان دادند. اما روند پروتئاز کل تنها در روز ۶۰ آزمایش افزایش فعالیت این آنزیم در تیمارهای ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد سدیم دی‌فرمات دیده شد که احتمالاً مربوط به روند مثبت تاثیرگذاری این تیمارهای در کل روند رشد فیل‌ماهیان بود اما در تیمارهای اسیدفرمیک تغییری مشاهده نشد. روند فعالیت آنزیم‌های لیپاز و آلفا آمیلاز مشابه بود به‌طوری‌که تیمارهای سدیم دی‌فرمات در روز ۳۰ آزمایش تغییری نشان ندادند

ولی تیمار اسیدفرمیک ۰/۱ درصد، افزایش معنی‌داری را در فعالیت دو آنزیم نشان داد. پژوهش‌های انجام شده در رابطه با تاثیر اسیدی فایر بر روی آنزیم‌های گوارشی ماهیان بسیار محدود است. ولی با این حال نتایج این پژوهش با پژوهش‌های انجام شده هم‌خوانی دارد.

بیش‌تر پارامترهای رشد و برخی پارامترهای ایمنی در این پژوهش تحت تاثیر اسیدی‌فایرها قرار گرفتند، به‌طوری‌که نرخ رشد ویژه، درصد افزایش وزن، نسبت بازده پروتئین و فاکتور وضعیت (ضریب چاقی) در گروه ۲ با جیره حاوی ۰/۱ درصد سدیم دی‌فرمات افزایش معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها و گروه شاهد در ۳۰ روز نخست آزمایش داشته است ($P<0/05$). ضریب تبدیل غذایی نشان می‌دهد که چه مقدار از غذای مصرف شده صرف افزایش وزن ماهی شده است. مقدار ضریب تبدیل غذایی (FCR) در گروه ۲ نیز نسبت به سایر گروه‌ها و گروه شاهدکاهش معنی‌داری را نشان داد ($P<0/05$). نتایج حاصله با پژوهش‌های انجام شده در این زمینه هم‌خوانی دارد. لازم به ذکر است تمامی شاخص‌های رشد در طی ۳۰ روز دوم آزمایش نسبت به ۳۰ روز اول، کاهش نشان داده است که این وضعیت را می‌توان به دو دلیل نسبت داد. احتمالاً تغییر جیره مصرفی از پیش پرواری FFS۲ در ۳۰ روز اول به غذای پرواری GFS۱ با سایز بزرگ‌تر و متناسب با دهان ماهیان در ۳۰ روز دوم اشاره کرد، چرا که دارای ساختار متفاوت اجزای غذایی است و هم‌چنین به کاهش سرعت رشد و شاخص‌های تغذیه‌ای با افزایش سن و سایز ماهی در طول دوره زندگی، که معمولاً تا زمان بلوغ جنسی ادامه می‌یابد. ممکن است غذادهی به‌مدت طولانی با مقدار ۰/۱ درصد سدیم دی‌فرمات در جیره سبب کاهش نقش بهبوددهندگی اسیدی‌فایرها و کم کردن ضریب رشد ماهی‌ها در اثر تقابلات درونی با عملکردهای طبیعی فیزیولوژیک میکروبیوتای دستگاه گوارش ماهی گردد. اما در درازمدت تیمار ۰/۱ درصد اسیدفرمیک توانست باعث بهبود روند رشد در ماهیان تغذیه شده با این مکمل اسیدی‌فایری به‌مدت ۶۰ روز شود. بنابراین نتیجه می‌دهد که مقدار اسیدی‌فایر و نوع آن می‌توانند در عملکرد دستگاه گوارش ماهیان مختلف موثر باشند. این مساله می‌تواند در تایید مقایسه عملکرد کم‌ترین مقدار اسیدی‌فایر در جیره در این آزمایش (تیمار دوم و پنجم) با سایر تیمارها در نتیجه مقایسه داده‌های به‌دست آمده در روز ۶۰ نسبت به روز ۳۰ باشد.

با بهبود شرایط سیستم گوارشی و رشد نیز در سطح مطلوب‌تری فعالیت خواهد کرد. به‌طورکلی می‌توان نتیجه‌گیری کرد که افزودن سدیم دی‌فرمات ۰/۱٪ به‌مدت ۳۰ بهترین کارایی را دارد اما در صورت استفاده به‌مدت ۶۰ روز از کارایی مفید آن برای فیل‌ماهیان کاسته می‌شود. اما ۰/۱٪ اسیدفرمیک در ۳۰ روز دوم، کارایی بهتری نسبت به ۳۰ روز اول نشان داد که حاکی از موثر بودن دوره تجویز خوراکی بلندمدت است. اما درمقایسه با سایر مکمل‌های اسیدی‌فایری در جیره غذایی فیل‌ماهی می‌توان بیان نمود که در مجموع و در پایان ۶۰ روز غذادهی، افزودن سدیم دی‌فرمات ۰/۱٪ باعث بهبود فاکتورهای رشد و کاهش ضریب تبدیل غذایی شد.

منابع

۱. **ایمانی، ا.؛ یزدان‌پرست، ر.؛ فرهنگی، م.؛ بختیاری، م.؛ مجازی امیری، ب. و سلجوقی، ظ.ش.، ۱۳۸۸.** بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در طی دوره محرومیت غذایی و غذادهی مجدد. مجله علوم دریایی ایران. دوره ۸، شماره‌های ۳ و ۴، صفحات ۲۴ تا ۳۳.

۲. **خواجه‌پور، ف.، ۱۳۸۹.** تاثیر جایگزینی بخشی از پودر ماهی با آرد سویا و اسیداستیک بر عملکرد رشد، بقا و ترکیب لاشه فیل‌ماهی جوان (*Huso huso*). پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۷۱ صفحه.

۳. **زمانی، ع.؛ حاجی‌مرادلو، ع.؛ مدنی، ر.؛ فرهنگی، م. ویلکی، ا.، ۱۳۸۶.** اندازه‌گیری و مقایسه سطح فعالیت برخی آنزیم‌های گوارشی در لارو ماهی آزاد دریای خزر و ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مرحله شروع تغذیه خارجی. مجله علمی شیلات ایران. دوره ۱۶، شماره ۳، صفحات ۷۳ تا ۸۰.

۴. **محمدیان، ت.، ۱۳۹۲.** ارزیابی توان پروبیوتیکی و تحریک کنندگی ایمنی برخی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از روده ماهی شیربت (*Barbus grypus*). پایان‌نامه دکتری. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز. ۸۰ صفحه.

5. **Ahmadnia, H.R.; Motlag, H.R.; Farhangi, M.; Rafiee, Gh. and Noori, F., 2012.** Modulating gut microbiota and digestive enzyme activities of Artemia urmiana by administration of different levels of *(Bacillus subtilisand*) and *(Bacillus licheniformis*). Aquaculture International. Vol. 20, No. 4, pp: 693-705.

6. **Castillo, A.; Sanchez, C.; Dominguez, J.; Kaattari, S.L. and Villena, A.J., 1993**. Ontogeny of IgM and IgM-bearing cells in (*rainbow trout*). Developmental and Comparative Immunology. Vol. 17, No. 5, pp: 419-424.

fish chyme with exposure in fresh and brackish water. Biology Bulletin. Vol. 37, No. 6, pp: 605-611.

15. **Li, W.F.; Feng, J.; Xu, Z.R. and Yang, C.M., 2004**. Effects of non-starch polysacarides enzymes on pancreatic and small intestinal digestive enzyme activities in piglet fed diets containing high amounts of barley. World Journal of Gastroenterology. Vol. 10, No. 6, pp: 856-890.

16. **Liebert, F.; Mohamed, K. and 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.

17. **Lim, C.; Lückstädt, C.; Webster, C.D. and Kesius, P., 2015.** Organic acids and their salts (chapter 15) In: Lee, C.S.; Lim, C.; Gatlin, D.M. and Webster, C.D., (Eds.), Dietary Nutrients, Additives and Fish Health. Wiley-Blackwell. pp: 305-315.

18. **Luckstadt, C., 2008.** The use of acidifiers in fish nutrition. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources. Vol. 3, pp: 1-8.

19. **Mohammadian, T.; Alishahi, M.; Tabandeh, M.; Ghorbanpoor, M. and Gharibi, D., 2017.** Effect of Lactobacillus plantarum and Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus on growth performance, gut microbial flora and digestive enzymes activities in *Tor grypus* (Karaman, 1971). Iranian Journal of Fisheries Sciences. Vol. 16, No. 1, pp: 296-317.

20. **Morken, T.; Kraugerud, O.F.; Barrows, F.T.; Sorensen, M.; Storebakken, T. and Overland, M., 2011.** Sodium diformate and extrusion temperature affect nutrient digestibility and physical quality of diets with fish meal and barley protein concentrate for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. Vol. 317, pp :138-145.

21. **Ng, W.K.; Koh, C.H.; Teoh, C.Y. and Romano, N., 2015.** Farm-raised tiger shrimp (*Penaeus monodon*) fed commercial

7. **Castillo, S.; Rosales, M.; Pohlenz, M. and Gatlin, D.M., 2014**. Effects of organic acids on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). Aquaculture. Vol. 433, pp: 6-12.

8. **Ebrahimi, M.; Daeman, N.H.; Chong, C.M.; Karami, A.; Kumar, V.; 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. 43, No. 4, pp:1195-1207.

9. **Erlanger, B.F.; Kokowsky, N. and Cohen, W., 1961**. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archives of Biochemistry and Biophysics. Vol. 95, No. 2, pp: 271-278.

10. **Hardy, R.W., 2000.** New developments in aquatic feed ingredient, and potential of enzyme supplements. A vances en Nutricion Aquicola *V. memorias*, *V. Simposium* Internacional de nutricion Acuicola. 19-22 Noviembre Merdia, Yucatan, Mexico. pp: 216-227.

11. **Hassaan, M.S.; Wafa, M.A.; Soltan, M.A.; Goda, A.S. and Mogheth, N.M.A., 2014.** Effect of Dietary Organic Salts on Growth, Nutrient Digestibility, Mineral Absorption and Some Biochemical Indices of Nile Tilapia; *Oreochromis niloticus* L. Fingerlings. World Applied Sciences Journal Vol. 29, No. 1, pp: 47-55.

12. **Hoseinifar, S.H.; Sun, Y.Z. and Caipang, C.M., 2017.** Short chain fatty acids as feed supplements for sustainable aquaculture: an updated view. Aquaculture Research. Vol. 48, No. 2, pp:1380-1391.

13. **Hoseinifar, S.H.; Esteban, M.Á.; Cuesta, A. and Sun, Z., 2015.** Prebiotics and fish immune response: a review of current knowledge and future perspectives. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture. Vol. 23, pp: 315-328.

14. **Kuzmina, V.V.; Shekovtsova, N. and Bolobonina, V., 2010.** Activity dynamics of proteinases and glycosidases of

feeds with added organic acids showed enhanced nutrient utilization. Aquaculture Resources. Vol. 449, pp: 69-77.

22. **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.

23. **Rungruangsak, T.K.; Rustad, A.; Sunde, J.; Eiane, S.A.; Jensen, H.B.; Opstvedt, J.; Nygård, E.; Samuelsen, T.A.; Mundheim, H. and Luzzana, U., 2002.** In vitro digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. Journal of the Science of Food and Agriculture. Vol. 82, No. 6, pp: 644-654.

24. **Silva, B.C.; Nolasco, S.H.; Magallón Barajas, F.; Civera Cerecedo, R.; Casillas Hernández, R. and Seiffert, W., 2015.** Improved digestion and initial performance of white leg shrimp using organic salt supplements. Aquac.Nutr. Vol. 22, No. 5, pp: 997-1005.

25. **Zhu, Y.; Qiu, X.; Ding, Q.; Duan, M. and Wang, C., 2014.** Combined effects of dietary phytase and organic acid on growth and phosphorus utilization of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Aquaculture. Vol. 430, pp: 1-8.