اثر اسید مالیک جیره بر عملکرد رشد و هیستومورفولوژی بافت روده ماهی طلایی (*Carassius auratus*)

- **سمیرا صدیقی:** گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران
- **میرمسعود سجادی*:** گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران
- **سیدحسین حسینی‌فر:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۷

چکیده

در تحقیق حاضر تاثیر اسید مالیک جیره بر رشد و هیستومورفولوژی بافت روده ماهی طلایی (*Carassius auratus*) مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور ۱۲۰ عدد ماهی طلایی با میانگین وزن ۰/۰۹±۱٤/٦۲ (میانگین ± خطای استاندارد) گرم در ٤ تیمار و ۳ تکرار تقسیم شدند. تیمارها شامل غلظت‌های مختلفی از اسید مالیک با مقادیر صفر (شاهد)، ۲/۵، ۵ و ۱۰ گرم به‌ازای هر کیلوگرم غذا بود. غذادهی ماهی‌ها روزانه ۳ بار در حد سیری و به‌مدت ۸ هفته صورت گرفت. زیست‌سنجی ماهی‌ها هر دو هفته یک‌بار انجام شد و در پایان دوره آزمایش از هر تکرار ۳ ماهی جهت بررسی‌های هیستومورفولوژیکی بافت روده نمونه‌گیری شد. در نهایت از لحاظ وزن نهایی، درصد افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و شاخص وضعیت بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌دار آماری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). با بررسی بافت روده نیز تفاوت معنی‌دار آماری در طول پرزها، قطر بافت پوششی و هم‌چنین تعداد سلول‌های جامی شکل روده مشاهده نشد (P>۰/۰۵). نتایج پژوهش کنونی نشان داد که استفاده از اسید مالیک تاثیری بر عملکرد رشد و هیستومورفولوژی روده ماهی طلایی ندارد.

کلمات کلیدی: اسیدآلی، رشد، هیستومورفولوژی، کپور ماهیان

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: mmsajjadi@hotmail.com

مقدمه

امروزه یکی از عمده‌ترین معضلات در صنعت آبزی‌پروری تهیه جیره غذایی با کیفیت بالا جهت بهبود وضعیت رشد، افزایش سلامت و عملکرد سیستم ایمنی آبزیان است (اکرمی و همکاران، ۱۳۸۷). از جمله روش‌های موثر در تامین مواد مغذی لازم جهت رشد و افزایش سلامت موجودات آبزی استفاده از مکمل‌های غذایی است، که موجب بهبود سیستم ایمنی بدن می‌شوند (Sheikholeslami Amiri و همکاران، ۲۰۱۲). از آن‌جایی که استفاده درازمدت از آنتی‌بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری مشکلاتی ازجمله مقاوم‌شدن عوامل بیماری‌زا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها را به‌همراه دارد سبب شد که استفاده از آن‌ها محدود و یا ممنوع شود. این مورد محققان را به استفاده از موادی غیر از آنتی‌بیوتیک‌ها تشویق کرد (Carbone و Faggio، ۲۰۱۶). معمولاً سعی بر این است، موادی که به‌جای آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شوند، علاوه بر نقش مهارکنندگی عوامل میکروبی، به‌عنوان یک عامل افزایش‌دهنده رشد نیز عمل کنند (Lim و همکاران، ۲۰۱۵). از این‌رو اسیدهای آلی با توجه به اثرات مفیدی که در حفظ غذا دارند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار شدند (Sing و همکاران، ۲۰۱۴). برهمین اساس اسیدهای آلی به‌عنوان یک افزودنی ایمن و دوست‌دار محیط‌زیست برای استفاده در غذای آبزیان معرفی شدند (Naela و Nermeen، ۲۰۱۴). اسیدهای آلی، آلدهیدهای با وزن مولکولی کم هستند و یک تا چند گروه کربوکسیلی در ساختار آن‌ها به‌کار رفته است (Defoirdt و همکاران، ۲۰۰۹). از اولین فعالیت‌های ضدمیکروبی اسیدهای آلی آن است که باعث تغییر pH سیتوپلاسم سلولی باکتری‌ها می شوند و به‌دنبال آن باکتری‌های حساس از بین می‌روند و به این‌طریق سبب مهار رشد باکتری‌های مضر درون دستگاه گوارش موجود میزبان می‌شود (Booth و Stratford، ۲۰۰۳). اسیدهای آلی می‌توانند فعالیت‌های تغذیه‌ای نیز داشته باشند زیرا در مسیرهای مختلف تولید انرژی ازجمله تولید ATP در چرخه اسیدسیتریک و یا چرخه اسیدکربوکسیلیک ایفای نقش می‌کنند (Diebold و Eidelsburger، ۲۰۰۶). از طرفی دیگر نیز اسیدهای آلی به‌عنوان زیرساخت در متابولیسم‌های حد واسط مصرف می شوند (Shah و همکاران، ۲۰۱۵). در مطالعات مختلف اثرات تغذیه‌ای اسیدهای آلی در جیره غذایی ماهیان مورد بررسی قرار گرفته است و در گزارشات مختلفی بیان شده که این ترکیبات میزان رشد و مقاومت آبزی را در برابر عوامل بیماری‌زا افزایش می‌دهند (Baruah و همکاران، ۲۰۰۷a؛ Lückstädt، ۲۰۰۸؛ Ng و Koh، ۲۰۱۶). فرض بر این است که اسیدهای آلی از تخمیر میکروبی پربیوتیک‌ها حاصل شده‌اند و این امر اثر پربیوتیکی این مواد را بر روی عملکرد ایمنی و مقاومت ماهی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا را توجیه می‌کند (Hoseinifar و همکاران، ۲۰۱۶؛ Dawood و Koshio، ۲۰۱۶). با توجه به اهمیت اسیدهای آلی در تغذیه ماهی در چند سال اخیر تلاش‌های تحقیقاتی زیادی در رابطه با بررسی دقیق اثرات این مواد بر روی هضم غذا، عملکرد رشد و میکروب‌های روده گونه‌های مختلف آبزیان صورت گرفته است (Liu و همکاران، ۲۰۱۴؛ Ng و Koh، ۲۰۱۶). ثابت شده است که مقدار هضم فسفر در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰ میلی‌گرم در گیلوگرم اسید فرمیک به‌میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد (Vielma و Lall، ۱۹۹۷). به‌علاوه کاهش pH معده و افزایش فعالیت پپسین را به‌همراه داشته و هم‌چنین میزان هضم پروتئین را بالا برده و به نگه‌داری نیتروژن نیز کمک می‌کند، که این موارد می‌توانند به‌عنوان دلایل اصلی بهبود عملکرد رشد و بازده خوراک آبزیان درنظر گرفته شوند (Yufera و همکاران، ۲۰۱۲). استفاده از ۳۰ گرم در کیلوگرم اسید سیتریک در جیره موجب بهبود قابل ملاحظه عملکرد رشد و ضریب تبدیل غذایی شده و میزان در دسترس بودن فسفر را در ماهی نیز افزایش می‌دهد (Baruah و همکاران، ۲۰۰۷a). مطالعات نشان داده است که اسیدهای آلی میزان تولید اجزای میکروبی را در دیواره روده کاهش می‌دهند و از این طریق از آسیب رسیدن به روده می‌کاهند (Dehghani و Jahanian، ۲۰۱۲). ازجمله اسیدهای آلی می‌توان اسید پروپیونیک، اسید لاکتیک، اسید فرمیک، اسید بوتریک و اسید مالیک را نام برد (Lückstädt، ۲۰۰۸). اسیدمالیک یک دی‌کربوکسیلیک اسید چهار کربنه است که به‌طور طبیعی در بسیاری از اسیدهای آلی حاصل از میوه‌ها وجود دارد (برای اولین‌بار از سیب جدا شد) و به‌صورت تجاری سنتز می‌شود (Sniffen و همکاران، ۲۰۰۶). از اسید مالیک در تولید غذاهای تجاری به‌عنوان تنظیم کننده اسیدیته و هم‌چنین یک تقویت‌کننده عطر و طعم استفاده می‌شود و از آن‌جایی‌که این اسید آلی مانع از رشد باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا می‌شود، به‌عنوان کنترل‌کننده میکروبی نیز به‌کار می‌رود (Ricke، ۲۰۰۳). اسید مالیک سبب تحریک رشد و نمو باکتری‌های غیربیماری‌زا می‌شود (Salou و همکاران، ۱۹۹۱). ماهی طلایی (*Carassius auratus*، Linnaeus، ۱۷۵۸) از راسته کپورماهی شکلان و متعلق به خانواده کپورماهیان Cyprinidae می‌باشد. این ماهی ازجمله ماهیان پرطرفدار است و امروزه در سراسر دنیا پراکنش جهانی دارد (Roberts، ۲۰۰۱). ماهی طلایی جز اولین ماهیان آب شیرین محسوب می‌شود که در آکواریوم نگه‌داری می‌شود و سریع با شرایط محیط سازگار می‌شود. این ماهی همه‌چیزخوار بوده و از گیاهان آبزی و بی‌مهرگان تغذیه می‌کند. هم‌چنین این ماهی به‌عنوان یک‌مدل آزمایشگاهی مناسب جهت مطالعه تغذیه‌ای در مرحله لاروی و جوانی خانواده کپورماهیان محسوب می‌شود (Munakata و Kobayashi، ۲۰۱۰). شواهد زیادی در رابطه با اثرات مثبت اسیدهای آلی بر روی عملکرد رشد و سلامت ماهیان

مختلف وجود دارد که قابلیت استفاده از آن‌ها را به‌عنوان افزودنی مناسب درجیره آبزیان نشان می‌دهد. با این‌حال مطالعات معدودی در رابطه با اثر اسید مالیک جیره بر روی عملکرد رشد و دستگاه گوارش آبزیان‌صورت گرفته است.لذامطالعه‌حاضرباهدف بررسی اثرات استفاده ازسطوح مختلف اسیدمالیک جیره برعملکرد رشد و هیستومورفولوژی بافت روده ماهی طلایی انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

محل اجرا و شرایط آزمایش: این آزمایش در سال ۱۳۹۶، به مدت ۸ هفته در کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان زینتی دانشکده منابع طبیعی صومعه‌سرا،دانشگاه گیلان انجام پذیرفت.در این تحقیق ابتدا ۱۲۰ قطعه ماهی طلایی با میانگین وزنی (۱۴/۶۲±۰/۰۹) گرم از یک مرکز تکثیر و پرورش ماهی طلایی خصوصی واقع در شهرستان صومعه‌سرا تهیه‌شده و به‌مدت ۲ هفته با شرایط پرورش‌وباغذای پایه‌سازگار شدند. برای‌انجام‌این‌آزمایش از ۱۲ آکواریوم با حجم آبگیری ۷۰ لیتر استفاده شد که بچه‌ماهیان به تعداد ۱۰ عدد در هر آکواریوم قرار داده شدند. در طول دوره آزمایش هر یک آکواریوم‌ها با سنگ هوای جداگانه هوادهی شده و فضولات و باقی‌مانده‌های غذایی در کف هر روز سیفون شده و با آب تمیز ذخیره شده در آکواریوم‌های ذخیره آب مجدداً جایگزین شد. جهت کنترل دمای آب در آکواریوم‌ها در هر آکواریوم یک عدد بخاری قرار داده شد و دمای آب نیز هر روز صبح با استفاده از دماسنج اندازه‌گیری و ثبت شد. پارامترهای کیفی آب در طی دوره شامل، دمای آب، اکسیژن محلول و pH، به‌ترتیب ۲۱/۲±۰/۱ درجه سانتی‌گراد، ۶/۱±۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر و ۷/۲±۰/۱ اندازه‌گیری شدند.

جیره‌غذایی و تغذیه ماهیان: جیره‌غذایی مورد استفاده در این تحقیق‌جیره تجاری ماهی گلدفیش بود که از شرکت فرادانه (شهرکرد، ایران) با اندازه ۲ میلی‌متر تهیه‌گردیدکه ترکیبات آن شامل: ۳۷-۳۵٪ پروتئین، ۸-۶٪ چربی، ۸-۵٪ رطوبت، ۳-۲٪ فیبر، ۱۰-۸٪ رطوبت و ۱/۵-۱٪ فسفر بود. تحقیق حاضر با استفاده از طرح کاملاً تصادفی حاوی سطوح مختلف اسید مالیک تهیه شده از شرکت (Titrachem ایران)، شامل صفر (شاهد)، ۲/۵، ۵ و ۱۰ گرم در کیلوگرم غذا در قالب ۴ تیمار با ۳ تکرار طراحی شد. جهت آماده کردن غذا، اسیدمالیک در مقادیر ۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰ گرم به‌همراه ژلاتین‌در آب مقطر در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد حل شده و به یک کیلوگرم غذا اسپری شد و سپس سینی‌های حاوی غذا دردمای اتاق قرار داده‌شد تا خشک شوند. سپس غذاها در ظروف مناسب ریخته شده و در دمای اتاق نگه‌داری شد. بچه‌ماهیان گلدفیش‌درطول‌روز، در سه نوبت (۸:۰۰، ۱۳:۰۰ و ۱۸:۰۰) در حد سیری تغذیه شدند.

زیست‌سنجی ماهیان: زیست‌سنجی ماهیان هردو هفته یک‌بار انجام شد و به این منظور پس از گرسنه نگه‌داشتن ۲۴ ساعته ماهیان، میزان‌وزن و طول آن‌هابه‌ترتیب با دقت ۰/۱ گرم و ۱ میلی‌متر به‌صورت انفرادی اندازه‌گیری شد. ماهیان قبل از زیست‌سنجی، با استفاده از پودرگل میخک به‌مقدار ۱۵۰ پی‌پی‌ام بی‌هوش شدند (Perdikaris و همکاران، ۲۰۱۰).

اندازه‌گیری پارامترهای رشد و تغذیه: شاخص‌های زیستی و تغذیه‌ای ازجمله وزن کسب شده (WG)، درصد افزایش وزن (BWI)، شاخص وضعیت (CF)، نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR) و بقا (SR) مورد محاسبه و سنجش قرار گرفتند.

WG (گرم) = (گرم) وزن نهایی - (گرم) وزن اولیه

BWI (%) =

{میانگین وزن اولیه (گرم) - میانگین وزن ثانویه (گرم)}/میانگین وزن اولیه ×۱۰۰

CF = (گرم) وزن نهایی / (سانتی‌متر مکعب) طول × ۱۰۰

SGR (% / روز) =

{لگاریتم طبیعی وزن اولیه (گرم)-لگاریتم طبیعی وزن نهایی(گرم)}/تعداد روزهای پرورش ×۱۰۰

FCR = (گرم) غذای مصرف شده / (گرم) افزایش وزن × ۱۰۰

SR (٪) =

(تعداد ماهیان در ابتدای آزمایش / تعداد ماهیان در انتهای آزمایش) × ۱۰۰

بررسی بافت روده: به‌منظور تعیین اثرات اسیدمالیک مورد استفاده بر بافت روده ماهی‌ها، در پایان آزمایش از هر تیمار ۲ ماهی به‌طور تصادفی انتخاب شد. ماهی‌ها با استفاده از پودر گل میخک بی‌هوش‌شدند و سپس به‌وسیله تیغ اسکالپل تشریح شده و روده آن‌ها با دقت خارج شد. پس از تثبیت نمونه بافت ها در محلول بوئن، مراحل بافت‌شناسی (آبگیری، شفاف‌سازی و الکل‌گیری، پارافینه نمودن و قالب‌گیری، برش با دستگاه میکروتوم و چسبانیدن نمونه بر روی لام) انجام شد و به‌روش هماتوکسیلین ائوزین رنگ‌آمیزی گردید و پس از آن نمونه‌ها برای بررسی تغییرات هیستومورفولوژیک ویلی‌های روده، با استفاده از میکروسکوپ نوری (Olympus BX51, Tokyo, Japan) به آزمایشگاه انتقال داده شدند (Pryor و همکاران، ۲۰۰۳).

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از اندازه‌گیری شاخص‌های رشد، تغذیه و هیستومورفولوژی روده با استفاده ازنرم‌افزار SPSS (Version 18, IBM, Armonk, NY, USA) انجام شد. نرمال بودن‌داده‌ها با آزمون Kolmogorov-Smirnovوهمگنی‌داده‌هابا آزمون Levene مورد بررسی قرار گرفت. سپس وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری بین میانگین داده‌ها با آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای Tukey در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

فاکتورهای رشد: همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود اختلاف معنی‌داری در افزایش وزن، ضریب رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی، درصد افزایش وزن و فاکتور وضعیت بین گروه‌های مختلف آزمایش مشاهده نشد (P>۰/۰۵). ولی با این‌حال بیش‌ترین افزایش وزن بدن در تیمار با جیره حاوی ۱۰ گرم اسید مالیک و کم‌ترین آن در تیمار شاهد مشاهده شد. از طرف دیگر بیش‌ترین فاکتور وضعیت در تیمار شاهد و کم‌ترین آن در تیمار حاوی ۲/۵ گرم اسید مالیک به‌دست آمد. بیش‌ترین ضریب تبدیل غذایی در تیمار شاهد و کم‌ترین میزان آن در تیمار حاوی اسید مالیک به‌دست آمد. میزان بقا در تیمارهای مختلف ۱۰۰٪ بود. (جدول ۱).

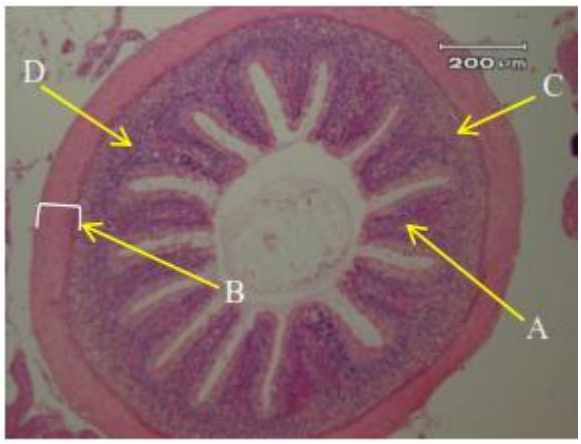
جدول ۱: مقایسه شاخص‌های رشد ماهی طلایی (*Carassius auratus*) تغذیه شده با سطوح مختلف اسید مالیک طی ۶۰ روز پرورش (میانگین ± خطای استاندارد، ۳ =n).

شاخص‌های رشد	اسید مالیک (گرم/کیلوگرم)			
	صفر	۲/۵	۵	۱۰
وزن اولیه (گرم)	۱۴/۵۹ ± ۰/۱۳	۱۴/۶۳ ± ۰/۱۰	۱۴/۶۲ ± ۰/۰۸	۱۴/۶۴ ± ۰/۱۱
وزن نهایی (گرم)	۱۸/۶۳ ± ۰/۸۹	۱۸/۴۵ ± ۰/۶۵	۱۸/۵۱ ± ۰/۳۲	۱۸/۶۹ ± ۰/۳۲
طول اولیه (سانتی‌متر)	۹/۲ ± ۰/۱۱	۹/۰۶ ± ۰/۱۸	۹/۱۶ ± ۰/۰۹	۹/۰۶ ± ۰/۲۸
طول ثانویه (سانتی‌متر)	۹/۶۱ ± ۰/۰۹	۹/۷۱ ± ۰/۰۷	۹/۶۶ ± ۰/۳۲	۹/۷۱ ± ۰/۲۸
وزن کسب شده (گرم)	۴/۴۰± ۱/۰۲	۳/۸۲ ± ۰/۵۴	۳/۸۹ ± ۰/۳۶	۴/۰۶ ± ۰/۳۸
افزایش وزن بدن (%)	۱۶/۹۱ ± ۱۱/۵۳	۲۶/۱۰ ± ۳/۵۳	۲۶/۶۰ ± ۵۷/۲۰	۲۷/۷۰ ± ۲/۵۷
فاکتور وضعیت	۲/۰۹ ± ۰/۰۵	۲/۰۲ ± ۰/۱۵	۲/۰۵ ± ۰/۰۵	۲/۰۴ ± ۰/۱۳
نرخ رشد ویژه (روز/%)	۰/۴۱ ± ۰/۰۹	۰/۳۹ ± ۰/۰۵	۰/۳۹ ± ۰/۰۳	۰/۴۱ ± ۰/۰۴
ضریب تبدیل غذایی	۲/۱۸ ± ۰/۴۰	۲/۰۹ ± ۰/۳۰	۱/۹۷ ± ۰/۲۱	۱/۸۸± ۰/۲۶
بقا	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

تاثیر مصرف اسیدمالیک بر بافت روده: برای بررسی میکروسکوپی برش‌های عرضی روده جهت اندازه‌گیری طول پرزها، از قسمت ماهیچه مخاطی روده تا انتهای طول پرز روده اقدام به اندازه‌گیری شد. نتایج بررسی‌ها نشان داد که اسیدمالیک افزوده شده به جیره ماهی طلایی تاثیر معنی‌داری بر روی طول پرزها، قطر پرزها و هم‌چنین قطر لایه عضلانی روده نداشته است (P>۰/۰۵). هم‌چنین در این تحقیق قطر انتروسیت‌ها اندازه‌گیری و تعداد سلول‌های جامی شکل نیز شمارش شد که پس از بررسی‌های نرم‌افزاری اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد، که نتایج حاصل در جدول ۲ نشان داده شده است. هم‌چنین تصاویر مربوط به برش عرضی روده و بخش‌های مختلف آن در شکل ۱ و شکل ۲ نشان داده شده است.

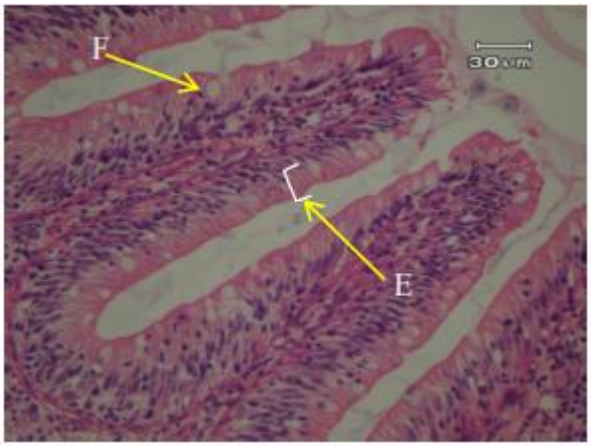
جدول ۲: اثر سطوح مختلف اسید مالیک جیره بر هیستومورفولوژی روده ماهی طلایی (*C. auratus*) پس از ۶۰ روز پرورش (میانگین ± خطای استاندارد، ۳=n)

شاخص‌های هیستومورفولوژیک روده	اسید مالیک (گرم/کیلوگرم)			
	صفر	۲/۵	۵	۱۰
طول پرز (میکرومتر)	۱۵۷/۶۳ ± ۱۹/۴	۲۲۲/۸۱ ± ۶۱/۱	۱۸۲/۴۰ ± ۵۴/۲	۲۲۱/۶۷ ± ۱۲/۲
قطر پرز (میکرومتر)	۱۴۱/۰۰ ± ۲۷/۵	۱۵۷/۲۱ ± ۶/۶	۱۳۰/۱۶ ± ۳۷/۸	۱۴۰/۸۴ ± ۵/۴
قطر لایه عضلانی (میکرومتر)	۳۴/۳۲ ± ۵۰/۰	۳۹/۹۴ ± ۱۸/۴	۳۶/۰۹ ± ۴۰/۰	۴۷/۶۱ ± ۰/۷
قطر انتروسیت (میکرومتر)	۹۱/۲۶ ± ۴/۳۰	۳۱/۶۱ ± ۸/۳	۳۰/۶۲ ± ۵/۲۰	۲۷/۷۷ ± ۵/۰
تعداد سلول های جامی شکل	۴/۶۷ ± ۰/۸۰	۹/۸۳ ± ۶/۳	۶۰/۰۰ ± ۴/۸۰	۷/۳۳ ± ۳/۰



شکل ۱: برش عرضی بافت روده ماهی طلایی

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگ‌نمایی (۱۰x)، در این نمونه قسمت‌های مختلف روده شامل: پرزهای روده (A)، لایه عضلانی پوششی (B)، لایه مخاطی (C) و لایه زیر مخاطی (D) قابل رویت است.



شکل ۲: برش عرضی بافت روده ماهی طلایی

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگ‌نمایی (۴۰x)، در این نمونه انتروسیت‌ها (E) و سلول‌های جامی شکل (F) مشخص شده است.

بحث

در این تحقیق اثر اسید مالیک بر شاخص‌های رشد و بافت روده ماهی طلایی مورد بررسی قرار گرفت. با بررسی نتایج حاصل از تحقیق کنونی، اختلاف معنی‌دار آماری در بین شاخص‌های رشد ماهیان تیمارهای مختلف طی ۶۰ روز مشاهده نشد. در مقایسه نتایج مطالعه حاضر با سایر مطالعات، Hassaan و همکاران (۲۰۱۶) اسید مالیک را به‌همراه پروبیوتیک *Basillus subtilis* به غذای ماهی تیلاپیای نیل اضافه کردند و نتایج نشان داد که میزان فاکتورهای رشد در ماهیان بهبود پیدا کرد که دلیل آن را از سوی اسید مالیک، کاهش pH معده و افزایش فعالیت پپسین و به‌دنبال آن کاهش pH روده و افزایش حلالیت مواد معدنی و جذب حلالیت مواد معدنی بیان کردند. از سوی دیگر، Chen و همکاران (۲۰۱۶) طی مطالعه‌ای مقادیر مختلف اسید مالیک شامل صفر (شاهد)، ۱، ۴، ۸، ۱۶ و ۳۲ گرم در هر کیلوگرم غذا را به غذای ماهی تیلاپیای نیل اضافه کردند و نتایج به‌دست آمده پس از ۸ هفته نشان داد که در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۸ گرم در کیلوگرم غذا میزان رشد و مصرف غذا افزایش پیدا کرد ولی در مقادیر بالاتر کاهش پیدا کرد. Hossain و همکاران (۲۰۰۷) اسید مالیک را به‌همراه ترکیبی از اسیدهای آلی شامل (۱٪ اسید سیتریک، ۱٪ اسید مالیک، ۱٪ اسید لاکتیک) به غذای ماهی سیم دریایی قرمز (*Pagrus major*) اضافه کردند که در پایان دوره بیش‌ترین میزان رشد در تیمار حاوی اسیدلاکتیک مشاهده شد و تیمارهای دیگر تفاوت معنی‌داری را باهم نداشتند هم‌چنین میزان جذب فسفر در تیمار حاوی اسیدمالیک کاهش پیدا کرد و بیش‌ترین جذب نیز در تیمار دارای اسید سیتریک صورت گرفت. Romano و همکاران (۲۰۱۵) از یک غذای حاوی ترکیبی از اسیدهای آلی شامل (اسید فرمیک، اسید لاکتیک،اسیدسیتریک و اسیدمالیک)برای تغذیه لارو(۳۶روزه) میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) استفاده کردند. نتیجه حاصل بیانگر آن بود که اگرچه عملکرد رشد در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۲٪ اسیدهای آلی بهبود پیدا کرد ولی اختلاف آماری معنی‌داری در بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نکردند. از طرفی مطالعات انجام شده درخصوص اثرات اسیدهای آلی بر روی عملکرد رشد ماهیان مختلف و سایر حیوانات نتایج متفاوتی را نشان می‌دهد. بررسی‌های صورت گرفته توسط Vielma و Lall (۱۹۹۷)نشان‌داد که‌استفاده از جیره‌های حاوی اسیدهای آلی میزان عملکرد رشد و قابلیت دسترسی به مواد معدنی را در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) افزایش می‌دهد. Sudagar و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند که افزودن ۵، ۱۰ و ۱۵ گرم در کیلوگرم اسیدسیتریک به جیره غذایی فیل‌ماهی (*Huso huso*) جوان باعث افزایش وزن نهایی، بهبود نرخ رشد ویژه، شاخص وضعیت و هم‌چنین کاهش ضریب تبدیل غذایی می‌شود. Ringo و همکاران (۱۹۹۴) به این نتیجه رسیدند که با اضافه کردن اسیدلاکتیک واسیدپروپیونیک به‌غذای ماهی چار شمالی (*Salvelinus alpinus*)، وزن ماهی در مقایسه با گروه شاهد افزایش می‌یابد. بررسی‌های صورت گرفته توسط Ng و همکاران (۲۰۱۵) که اثر چند اسیدآلی را بر روی رشد و ایمنی میگوی ببری (*Penaeus monodon*) را بررسی کردند نشان داد اختلاف معنی‌داری در عملکرد رشد تیمارهای مختلف ایجاد نمی‌کند. Koh و همکاران (۲۰۱۶) با اضافه کردن ترکیبی از اسیدهای آلی به غذای ماهی تیلاپیای نیل مشاهده کردند که میزان

رشد و کارایی مصرف غذا در تیمارهای تغذیه شده با اسیدهای آلی نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد. Zhu و همکاران (۲۰۱۴) اثر هم‌زمان یک اسیدآلی تجاری (DA فعال) به میزان (صفر، ۱ و ۲ درصد) و فیتاز به‌مقدار (صفر و ۰/۲ درصد) را به رژیم غذایی گربه ماهی زرد افزودند و بررسی پارامترهای رشد ماهیان نشان داد که استفاده از اسید آلی به تنهایی و هم‌چنین به همراه فیتاز موجب کاهش وزن کسب شده، ضریب رشد ویژه و افزایش ضریب تبدیل غذایی به‌طور معنی‌داری شد. Khajepour و Hosseini (۲۰۱۲) اثرات جایگزینی آرد ماهی با آرد سویا و اسید سیتریک در جیره غذایی فیل‌ماهی را بر روی پارامترهای رشد و کارایی مواد غذایی مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که رژیم غذایی حاوی ۳۰ گرم بر کیلوگرم سیتریک اسید به‌مدت ۸ هفته موجب بهبود عملکرد پارامترهای رشد شامل افزایش وزن کسب شده، ضریب رشد ویژه و کاهش ضریب تبدیل غذایی و هم‌چنین موجب افزایش هضم پذیری فسفر گردید. Sarker و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که استفاده از ۳ درصد مکمل اسیدسیتریک در جیره ماهی سیم دریایی قرمز (*Pagrus major*) به‌طور معنی‌داری باعث افزایش وزن و سرعت رشد ماهی می‌شود. Pandey و Satoh (۲۰۰۸) اثر جیره‌های مکمل حاوی ۱٪اسیدسیتریک،اسیدلاکتیک و متیونین هیدروکسی بر ضریب رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را مورد مطالعه قرار داد و نشان دادند که این میزان اسیدآلی موجب بهبود ضریب تبدیل غذایی شد، اما بر روی ضریب رشد ویژه و میزان فسفر بی‌تأثیر بود. هم‌چنین Gislason و همکاران (۱۹۹۶) با افزودن حدود ۱٪ اسیدلاکتیک به جیره غذای آزاد ماهی اطلس اثر معنی‌داری بر روی فاکتورهای رشد و تغذیه ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی اسید آلی در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نکردند. علت عدم دست یابی به اختلاف معنی‌دار در عمکرد رشد مطالعه کنونی را علاوه بر سطوح به‌کار برده شده اسیدمالیک می‌توان نوع گونه ماهی، وزن اولیه، سن، رژیم غذایی گونه ماهی، نوع دستگاه گوارشی و شرایط پرورش دانست که احتمالاً بتواند تناقض موجود در نتیجه مطالعه حاضر را توضیح دهد. دستگاه گوارش که اندامی پشتیبان است، برای افزایش بازده هضم و جذب مواد مغذی و فراهم نمودن نیاز اندام‌هایی ازجمله ماهیچه‌ها، در آغاز زندگی توسعه چشمگیری می‌یابد (Sell، ۱۹۹۱). بافت دیواره روده کوچک از قسمت‌های مختلفی تشکیل شده که داخلی‌ترین لایه آن بافت مخاطی می‌باشد. این لایه از پرزها تشکیل شده است. پرزهای روده از نظر شکل و اندازه به‌طور قابل توجهی در هر بخش روده متفاوت هستند (Hampson، ۱۹۸۶). مطالعه دستگاه گوارش آبزیان به دانش ما درباره نحوه گوارش غذا و هضم و جذب آن در بدن ماهیان کمک شایانی می‌کند و آگاهی از نوع فعالیت روده و لایه‌های سطحی آن می‌تواند در پی بردن به قدرت هضم دستگاه گوارش ماهیان موثر باشد. مطالعات نشان داده است که اسیدهای آلی بر هیستومورفولوژی و عملکرد بافت روده موثرند و انرژی لازم را برای عروق بافت پوششی مخاطی روده فراهم می‌کند (Windmueller و همکاران، ۱۹۷۸). هم‌چنین اسیدهای آلی مقدار جریان خون را در لایه پوششی مخاطی روده افزایش داده و از طرفی موجب ازدیاد سلول‌های پوششی می‌شود، که این امر سطح جذب مواد معدنی را در روده افزایش می‌دهد (Baruah و همکاران، ۲۰۰۷b). اسیدهای آلی از طریق انتقال غیرفعال جذب بافت پوششی روده می‌شوند و انرژی لازم را جهت بازسازی دوباره بافت روده و سلامت آن فراهم می‌کند (Vielma و Lall، ۱۹۹۷). نتایج به‌دست آمده از بررسی بافت روده ماهیان مطالعه حاضر اختلاف معنی‌داری را در طول پرزها، بافت پوششی عضلانی،انتروسیت‌ها و هم‌چنین تعداد سلول‌های جامی شکل نشان نداد. Liu و همکاران (۲۰۱۴) نمک سدیم بوتیرات را به غذای کپورمعمولی اضافه کردند و با بررسی‌های هیستومورفولوژیک بافت روده اختلاف معنی‌داری در طول پرزهای روده ماهیان تیمارهای مختلف مشاهده نکردند. Gao و همکاران (۲۰۱۱) نمک سدیم بوتیرات و فرمات را به غذای قزل‌آلای رنگین‌کمان افزودند و نتایج به‌دست آمده تغییرات قابل توجهی را در چین دیستال مخاط روده ماهی‌ها نشان نداد. Silva و همکاران (۲۰۱۶) ترکیب بوتیرات و پلی‌هیدروکسی بوتیرات را به جیره میگوی وانامی اضافه کردند و مشاهده کردند که در تیمارهای تغذیه شده با بوتیرات طول و قطر پرزهای روده میگو به میزان چشمگیری افزایش پیدا کرد واختلاف معنی‌داری در بین تیمارهای آزمایش مشاهده شد. علت احتمالی عدم مشاهده نتیجه مثبت در مطالعه کنونی را می‌توان به وضعیت روده، روش تغذیه، پایین بودن سطوح انتخابی مالیک اسید جیره و احتمالاً کوتاه بودن مدت زمان انجام تحقیق نسبت داد. به‌طورکلی از مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که استفاده‌از اسیدمالیک در جیره اثر معنی‌داری بر روی عملکرد رشد و بافت روده ماهی طلایی ندارد.لذا انجام مطالعات تکمیلی بر روی اسیدمالیک به تنهایی و یا ترکیب این اسید با اسیدهای آلی دیگر در جیره غذایی ماهی گلدفیش و یا سایر ماهیان پرورشی برای رسیدن به دوز بهینه،جهت بررسی اثرات آن‌ها بر روی شاخص‌های رشد و فاکتورهای خونی و ایمنی در دوره‌های مختلف پرورشی قابل پیشنهاد است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از تمامی کسانی که در انجام پروژه حاضر مساعدت و همکاری نمودند، به‌ویژه مهندس رضا عباسی، مهندس عاطفه رستم زاده و مهندس سمیرا مرادی کمال تشکر و قدردانی را دارد.

منابع

۱. **اکرمی، ر.؛ حاجی‌مرادلو، ع.؛ عابدیان‌کناری، ع؛ و علی‌محمدی، ا.، ۱۳۸۷.** اثرات سطوح متفاوت پروبیوتیک اینولین جیره غذایی بر شاخص‌های رشد، تغذیه، نرخ بازماندگی و ترکیب بدن فیل‌ماهیان (*Huso huso*) جوان پرورشی. مجله علمی پژوهشی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. شماره ۵، صفحات ۵۵ تا ۶۵.

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

۴. **Booth, I.R. and Stratford, M., 2003.** Acidulants and low pH, in: Russel, N.J., Gould, G.W. (Eds.), Food Preservatives. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. pp: 25-47.

۵. **Carbone, D. and Faggio, C., 2016.** Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants: Effects on immune system of *Sparus aurata and Dicentrarchus labra*x. Fish & Shellfish Immunology. Vol. 54, pp: 172-178.

۶. **da Silva, B.C.; Vieira, F.D.N.; Mourino, J.L.P.; Bolivar, N. and Seiffert, W.Q., 2016.** Butyrate and propionate improve the growth performance of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Research.Vol. 47, pp: 612-623.

۷. **Dawood, M.A.O. and Koshio, S., 2016.** Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture. Aquaculture. Vol. 454, pp: 243-251.

۸. **Defoirdt, T.Y.; Boon, N.Y.; Sorgeloos, P.Y.; Verstraete, W. and Bossier, P., 2009.** Short-chain fatty acids and poly bhydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. Biotechnology Advances. Vol. 27, pp: 680-685.

۹. **Dehghani, N. and Jahanian, R., 2012.** Effects of dietary organic acid supplementation on immune responses and some blood parameters of broilers fed diets with different protein levels. World's Poultry Science Journal, Supplement 1, Expanded Abstract-Poster Presentation. Book of Abstracts. WPC2012 Salvador, Bahia, Brazil. pp: 5-9.

۱۰. **Diebold, G. and Eidelsburger, U., 2006.** Acidification of diets as an alternative to antibiotic growth promoters. In: Antimicrobial Growth Promoters: Where do we go from here. Barug, D.; de Jong, L.; Kies, A.K. and Verstegen, M.W.S., (Eds.). Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands. pp: 311-327.

۱۱. **Gao, Y.L.; Storebakken, T.; Shearer, K.D.; Penn, M. and Overland, M., 2011.** Supplementation of fishmeal and plant protein-based diets for rainbow trout with a mixture of sodium formate and butyrate. Aquaculture. Vol. 311, pp: 233-240.

۱۲. **Gislason, G.; Olsen, R. and Hinge, E., 1996.** Comparative effects of dietary Na+-lactate on Arctic char, Salvelinus alpinus L., and Atlantic salmon, Salmo salar L. Aquaculture Research. Vol. 27, pp: 429-435.

۱۳. **Hampson, D.J., 1986.** Alteration in piglet small intestinal structure at weaning. Research in Veterinary Science. Vol. 40, pp: 39-40.

۱۴. **Hassaan, M.S.; Soltan, M.A.; Jarmołowicz, S.J. and Abdo, H.S., 2017.** Combined effects of dietary malic acid and *Bacillus subtilis* on growth, gut microbiota and blood parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture Nutrition.Vol. 00, pp: 1- 11.

۱۵. **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.

۱۶. **Jones, D.L., 1998.** Organic acids in the rhizospherea critical review. Plant and Soil. Vol. 205, pp: 25-44.

۱۷. **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.

۱۸. **Lim, C.; Lückstädt, C.; Webster, C. and Kesius, P., 2015.** Organic Acids and Their Salts. In: Dietary Nutrients, Additives, and Fish Health. Edited by Lee, C.S.; Lim, C.; Delbert, M. and Gatlin, D., Willy Blackwell. USA. pp: 305-319.

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

۲۰. **Lückstädt, 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.

۲۱. **Lim, C.; Lückstädt, C. and Klesius, P.H., 2010.** Review: Use of organic acids, salts in fish diets. Global Aquaculture Advocate. Vol. 5, pp: 45-46.

۲۲. **Munakata, A. and Kobayashi, M., 2010.** Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. General and Comparative Endocrinology. Vol. 165, pp: 456-468.

۲۳. **Nermeen, M.A. and Naela, M.R., 2014.** Eubiotic effect of a dietary acidifier (potassium diformate) on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. Journal of Advanced Research. Vol. 6, pp: 621-629.

۲۴. **Ng, W.K., 2015.** Recent advances in the understanding and mitigation of EMS/AHPND. Aquaculture Asia Pacific. Vol. 11, pp: 35-39.

۲۵. **Ng, W.K. and Koh C.B., 2016.** The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. Reviews in Aquaculture. Vol. 0, pp: 1-27.

۲۶. **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 the 12th International Symposium Fish Nutrition and Feeding, Biarritz, France.

۲۷. **Pandey, A. and Satoh, S., 2008.** Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Fisheries Science. V0l. 74, pp: 867-874.

۲۸. **Perdikaris, C.; Nathanailides, C.; Gouva, E.; Gabriel, U.U.; Bitchava, K.; Athanasopoulou, F. and Paschos, I., 2010.** Size-relative effectiveness of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) and goldfish (*Carassius auratus* Linnaeus, 1758). Acta Veterinaria Brno. Vol. 79, pp: 481-490.

۲۹. **Pryor, G.S.; Royes, J.B.; Chapman, F.A. and Miles, R.D., 2003.** Mannanoligosaccharides in fish nutrition: effects of dietary supplementation on growth and gastrointestinal

villi structure in Gulf of Mexico sturgeon. North American Journal of Aquaculture. Vol. 65, pp: 106-111.

۳۰. **Ricke, S.C., 2003.** Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. Poultry Science. Vol. 82, pp: 632-639.

۳۱. **Ringo, E. and Strom, E., 1994.** Microflora of arctic charr (*Salvelinus alpinus)*: Gastrointestinal microflora of free-living fish and effect of diet and salinity on intestinal microflora. Aquaculture and Fisheries Management. Vol. 25, pp: 623-629.

۳۲. **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.

۳۳. **Roberts, R.J., 2001.** Fish Pathology. 3rd Edition. W. B. Saunders, Philadelphia. pp: 208-375.

۳۴. **Sales, J. and Janssens, G.P.J., 2003.** Nutrient requirements of ornamental fish. Aquatic Living Resources. Vol. 16, pp: 533-540.

۳۵. **Salou, P.; Leroy, M.; Goma, G. and Pareilleux, A., 1991.** Influence of pH and malate-glucose ratio on the growth kinetics of *Leuconostoc oenos*. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 36, pp: 87-91.

۳۶. **Sarker, S. A.; Satoh, S. and 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. Vol. 248, pp: 3-11.

۳۷. **Sell, J.L.; Angel, C.R.; Piquer, F.J.; Mallarino, E.G. and Al-Batshan, H.A., 1991.** Development patterns of selected characteristics of the gastrointestinal tract of young turkey. Poultry Science. Vol. 70, pp: 1200- 1205.

۳۸. **Shah, S.Z.H.; Afzal, M.; Khan, S.Y.; Hussain, S.M. and Habib, R.Z., 2015.** prospects of using citric acid as fish feed supplement. prospects of using citric acid as fish feed supplement**.** International Journal of Agriculture and Biology. Vol. 17, pp: 1-8.

۳۹. **Sheikholeslami Amiri, M.; Yousefian, M.; Yavari, V.; Safari, R. and Ghiyasi, M., 2012**. Evaluation of inulin as prebiotic on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum, 1972) immunity characteristics and resistance to *streptococcus sp* infection. Iranian Journal of Biology. Vol. 24, pp: 303-312.

۴۰. **Silvaa, B.C.; Jesusc, G.F.A.; Seiffertb, W.Q.; Vieirab, F.N.; Mouriñob, J.L.P.; Jatobác, A. and Nolasco-Soriad, 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. Vol. 6, pp: 447-458.

۴۱. **Sing, K.W.; Kamarudin, M.S.; Wilson, J.J. and Azirun, M.S., 2014.** Evaluation of blowfly (*Chrysomya megacephala*) maggot meal as an effective, sustainable replacement for fishmeal in the diet of farmed juvenile red tilapia (*Oreochromis* sp.). Pakistan Veterinary Journal. Vol. 34, pp: 288-292.

۴۲. **Sniffen, C.; Ballard, C.; Carter, M.; Cotanch, K.; Dann, H.; Grant, R. and Martin, S.A., 2006.** Effects of malic acid on microbial efficiency and metabolism in continuous culture of rumen contents and on performance of mid-lactation dairy cows. Animal Feed Science and Technology. Vol. 127, pp: 13-31.

۴۳. **Sudagar, M.; Hosseinpoor, Z. and Hosseini, A., 2010.** The use of citric acid as attractant in diet of grand sturgeon (*Huso huso)* fry and its effects on growing factors and survival rate. AACL Bioflux. Vol. 3, pp: 311-316.

۴۴. **Vielma, J. and Lall, S., 1997.** Dietary formic acid enhances apparent digestibility of minerals in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Nutrition. Vol. 3, pp; 265-268.

۴۵. **Windmueller, H.G. and Spaeth, A.E., 1978.** Identification of ketone bodies and glutamine as the major respiratory fuels in vivo for postabsorptive rat small intestine. Journal of Biological Chemistry. Vol. 253, pp: 69-76.

۴۶. **Yufera, M.; Moyano, F.J.; Astola, A.; Pousao, F.P. and Martınez, R.G., 2012.** Acidic digestion in a teleost: postprandial and circadian pattern of gastric pH, pepsin activity, and pepsinogen and proton pump mRNAs expression. PLoS ONE. Vol. 7, pp: 1-9.

۴۷. **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.