تأثیر سطوح مختلف استات سدیم جیره بر کارآیی رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده ماهی طلایی (*Carassius auratus*)

- **عاطفه رستم‌زاده:** گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران
- **حمید علاف‌نویریان*:** 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، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۷

چکیده

در این تحقیق، تأثیر سطوح مختلف استات سدیم جیره بر رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده ماهی طلایی (*Carassius auratus*) مورد مطالعه قرار گرفت. به این منظور ۱۲۰ قطعه ماهی طلایی با وزن متوسط ۱/۲۹±۱۴/۲۴ گرم در ٤ تیمار و ۳ تکرار تقسیم شدند. تیمارها شامل غلظت‌های متفاوتی از نمک استات سدیم با مقادیر صفر (شاهد)، ۲/۵، ۵ و ۱۰ گرم به‌ازای هر کیلوگرم غذا بود. ماهی‌ها روزانه ۳ بار در حد سیری و به‌مدت ۷۵ روز غذادهی شدند. هر دو هفته یک‌بار زیست‌سنجی انجام شد و در پایان دوره آزمایش در هر تیمار از ٦ ماهی جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های پروتئاز و لیپاز نمونه‌برداری شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد ماهیان تغذیه شده با ۵ گرم نمک استات سدیم در هر کیلوگرم غذا، دارای بیش‌ترین وزن نهایی بودند، به‌طوری‌که اختلاف معنی‌دار آماری بین این تیمار در مقایسه با سایر تیمارها وجود داشت (P<۰/۰۵) اما تفاوت معنی‌دار آماری در دیگر شاخص‌های رشد اندازه‌گیری شده بین تیمار شاهد و تیمارهای تغذیه شده با نمک استات سدیم مشاهده نشد (P>۰/۰۵). از لحاظ میزان فعالیت آنزیم‌های لیپاز و پروتئاز نیز بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). نتایج آزمایش کنونی نشان داد که استفاده از ۵ گرم بر کیلوگرم نمک استات سدیم در جیره غذایی ماهی طلایی می‌تواند باعث افزایش رشد این ماهی شده ولی تأثیری بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده ندارد.

کلمات کلیدی: نمک‌های ارگانیک، آنزیم گوارشی، شاخص‌های رشد، ماهی طلایی (*Carassius auratus*)

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Hamidnavi1397@gmail.com

مقدمه

در جهان حدود ۵۳۰۰ گونه آب شیرین و ۱۸۰۰ گونه آب شور از آبزیان به‌عنوان گونه زینتی در صنعت آبزیان زینتی مورد داد و ستد قرار می‌گیرند که این علاقه و توجه به‌دلیل خصوصیاتی چون رنگ‌های زیبا و متنوع و خصوصیات رفتاری ویژه و ویژگی‌های مورفولوژیک جذاب می‌باشد (Whittington و Chong، ۲۰۰۷). نگه‌داری و پرورش ماهیان زینتی از دیرباز در بسیاری از نقاط جهان متداول بوده که از نیمه قرن نوزدهم به‌دلیل افزایش تقاضای ماهیان زینتی به نگه‌داری این ماهیان اقدام شده است (مقدسی و همکاران، ۱۳۸۹). امروزه با توجه به اهمیت محصولات شیلاتی در سلامت بشر و افزایش روزافزون تقاضا برای مصرف آن، لزوم پیشبرد مطالعات به سمت ارائه راهکارهای عملی جهت بهره‌برداری حداکثری از منابع و امکانات موجود، بیش از پیش نمایان می‌گردد. به‌منظور دستیابی به حداکثر بازدهی در صنعت آبزی‌پروری، تأمین بهینه مواد مغذی ضروری است. اهمیت اقتصادی ماهیان زینتی باعث تمایل روزافزونی به تکثیر و پرورش مصنوعی این ماهیان شده است، به‌همین دلیل بررسی عوامل موثر بر رشد، بقا و ایمنی این نوع ماهیان ضروری به‌نظر می‌رسد (Hoseinifar و همکاران، ۲۰۱۵). ماهی طلایی (*Carassius auratus*) در شمار یکی از محبوب‌ترین ماهیان زینتی جهان بوده و دارای ارزش اقتصادی بالا در تجارت ماهیان زینتی است که به‌علت شکل بدن و باله، اندازه و رنگدانه‌های پوست به یکی از مهم‌ترین ماهیان زینتی در جهان تبدیل گردیده است (Gouveia و همکاران، ۲۰۰۳). هم‌چنین گونه بسیار مناسبی جهت مطالعات تولیدمثلی، مطالعه فیزیولوژی غدد داخلی، سلولی، ایمنی شناسی، سم‌شناسی و مولکولی می‌باشد، زیرا از اندازه مناسبی جهت تحقیقات آزمایشگاهی برخوردار بوده و هم‌چنین در محیط‌های آزمایشگاهی به‌راحتی قادر به رسیدن به بلوغ و تولیدمثل می‌باشد. در واقع از این گونه به‌عنوان گونه مدل جهت تحقیق در خصوص کپور ماهیان استفاده می شود (Kobayashi و Munakata، ۲۰۱۰). از ژانویه ۲۰۰۶، اتحادیه اروپا استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها را در فرآورده های دامی ممنوع اعلام کرد. این امر به این دلیل است که با وجود تمامی اثرات مثبت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده بی‌رویه از این افزودنی‌ها در جیره غذایی، از طریق ایجاد مقاومت در گونه‌های مختلف باکتریایی و هم‌چنین ایجاد بقایای آنتی‌بیوتیکی در لاشه حیوانات و انتقال آن به انسان، مانع از درمان بسیاری از بیماری‌ها می‌شوند، بنابراین می‌توانند اثرات مخرب و زیان‌آوری داشته باشند (Lückstädt، ۲۰۰۶). با توجه به این اثرات تمایل فزاینده‌ای برای استفاده از جایگزین‌های آنتی‌بیوتیک که بتوانند علاوه بر مهار عوامل بیماری‌زا، به‌عنوان عامل افزایش‌دهنده رشد عمل کنند، شکل گرفته است (Lim و همکاران، ۲۰۱۵). افزایش روزمره تقاضا برای غذاهای ایمن و تولید محصولات آبزی‌پروری دوست‌دار محیط زیست موجب گردیده که اسیدی فایرها که اسیدها و نمک‌های آلی طبیعی هستند، به‌عنوان افزودنی‌های غذایی حیوانات مورد توجه عمومی قرار گیرند (Naela و Nermeen، ۲۰۱۴). مطالعاتی که‌روی ماهیان سردآبی و گونه‌های گرمسیری انجام شده نشان می‌دهد که دامنه وسیعی از اسیدهای آلی و نمک‌های آن‌ها و یا ترکیب آن‌ها می‌تواند موجب بهبود رشد، بهبود مصرف غذا و افزایش مقاومت به بیماری‌ها در ماهیان گردد (Hoseinifar و همکاران، ۲۰۱۶). اثر انواع اسیدهای آلی بر عملکرد رشد گونه‌های مختلف ماهی مورد بررسی قرار گرفته است که این یافته‌ها نشان می‌دهد، نمک اسیدهای آلی یا مخلوطی از آن‌ها می‌تواند سبب بهبود رشد و مصرف خوراک در برخی از گونه‌های ماهی شود (Tabrizi و همکاران، ۲۰۱۲؛ Hossain و همکاران، ۲۰۰۷؛ Baruah و همکاران، ۲۰۰۵). عواملی مانند گونه و سن فیزیولوژیک ماهی (Gislason و همکاران، ۱۹۹۴)، نوع و سطح اسیدهای آلی (DeWet، ۲۰۰۵؛ Ringø و همکاران، ۱۹۹۴)، ترکیب جیره غذایی (Sarker و همکاران، ۲۰۰۷؛ Owen و همکاران، ۲۰۰۶) و شرایط پرورش (Ramli و همکاران، ۲۰۰۵) ممکن است بر اثرگذاری اسیدهای آلی بر رشد آبزیان تأثیر داشته باشند. Ringø و همکاران (۱۹۹۴)، با افزودن ۱٪ نمک سدیم لاکتات به جیره ماهی چار قطب شمال (*Salvelinus alpinus*) افزایش قابل توجهی را در رشد این ماهی مشاهده کردند درحالی‌که با اضافه کردن همین مقدار سدیم لاکتات به جیره ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) افزایشی در میزان رشد ماهی مشاهده نشد (Gislason و همکاران، ۱۹۹۴). Baruah و همکاران (۲۰۰۵) مشاهده کردند که با اضافه کردن ۳٪ اسیدسیتریک به جیره ماهی کپور هندی (*Labeo rohita*) pH جیره کاهش می‌یابد و با تغذیه ماهیان از این جیره، pH روده و به‌تبع آن میزان هضم روده‌ای در این ماهیان کاهش می‌یابد. استات، آنیون استیک اسید است و در مقایسه با سایر اسیدهای چرب کوتاه زنجیره توجه کم‌تری به آن شده است. در صنایع غذایی از نمک‌های سدیم اسیدهای آلی با وزن مولکولی کم مانند لاکتیک، استیک و سیتریک به‌منظور کنترل رشد میکروبی، بهبود خواص حسی و افزایش مدت زمان ماندگاری مواد غذایی مانند گوشت قرمز (Sallam و Samejima، ۲۰۰۴) و ماهی (Boskou و Debever، ۲۰۰۰) استفاده می‌شود. Da Silva و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که اضافه کردن نمک‌های استات به جیره غذایی میگوهای وانامی (*Litopenaeus vannamei*) مقاومت این میگوها را در برابر گونه‌های بیماری‌زای ویبریو افزایش می‌دهد. هم‌چنین Da Silva و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که اضافه کردن نمک‌های سدیم استات و سدیم پروپیونات به جیره غذایی میگوهای وانامی فعالیت تریپسین و کیموتریپسین را افزایش می‌دهد، بنابراین نمک‌های ارگانیک

در جیره غذایی باعث تغییر در فعالیت آنزیمی گوارشی می‌شوند هم‌چنین برای سلامت حیوانات آبزی مفید بوده و عملکرد رشد را بهبود می‌بخشند. با این‌حال مطالعات معدودی در رابطه با اثر استات سدیم جیره بر روی عملکرد رشد و دستگاه گوارش آبزیان صورت گرفته است. لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر نمک استات سدیم بر میزان رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده ماهی طلایی است.

مواد و روش‌ها

ماهی و شرایط پرورش: این تحقیق از بهمن ماه تا فروردین ماه ۱۳۹۷ درکارگاه پرورش ماهیان زینتی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان واقع در صومعه‌سرا به‌مدت ۷۵ روز انجام شد. ۱۲۰ قطعه ماهی طلایی سالم با وزن متوسط ۱/۲۹±۱۴/۲۴ گرم به‌صورت تصادفی بعد از یک هفته سازگاری با شرایط پرورش و تغذیه با غذای پایه (غذای تجاری ماهی طلایی) در ۱۲ آکواریوم با حجم آبگیری ۷۰ لیتر در ۴ گروه و ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۱۰ قطعه ماهی تقسیم‌بندی شدند. پارامترهای کیفی آب شامل دمای آب، اکسیژن محلول و pH، به‌ترتیب ۰/۱±۲۱/۲ درجه سانتی‌گراد، ۰/۱±۶/۱ میلی‌گرم بر لیتر و ۰/۱±۷/۲ بود.

آماده‌سازی جیره غذایی: نمک استات سدیم از شرکت Merck (دارمشتات، آلمان) خریداری شد و به‌میزان صفر (شاهد)، ۲/۵، ۵ و ۱۰ گرم به‌ازای هر کیلوگرم جیره غذایی ماهی طلایی اضافه گردید. در هر تیمار، مقدار محاسبه شده نمک استات سدیم برای دست‌یابی به دوزهای مورد نظر، ابتدا با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و سپس به‌صورت جداگانه بر روی غذاها (پروتئین ۳۷-۳۵٪، چربی ۸-۶٪، فیبر ۳-۲٪ و خاکستر ۱۰-۸٪) شرکت فرادانه (شهرکرد، ایران) با اندازه ۲ میلی‌متر اسپری گردید و به‌مدت ۳ ساعت در آون خشک‌نموده و به‌منظور محافظت غذاها و جلوگیری ازرها شدن استات سدیم و ورود آن‌ها به محیط آب ابتدا محلول ۱۰ درصد ژلاتین گاوی در آب مقطر تهیه شده و به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد سپس آنگاه محلول ژلاتین به‌صورت یکنواخت بر روی جیره‌ها اسپری و در پایان‌غذاها به‌مدت ۳ ساعت در آون‌خشک شدند (Ramsden، ۲۰۰۹). ماهیان روزانه در سه نوبت (ساعت‌های ۸:۰۰ ، ۱۳:۰۰ و ۱۸:۰۰) و در حد سیری با غذاهای آماده شده تغذیه شدند.

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد و تغذیه: جهت بررسی تأثیر نمک استات سدیم در غذای ماهیان طلایی بر رشد، در روزهای ۱۴، ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۷۵ شاخص‌های رشد و تغذیه ازجمله وزن کسب شده (WG)، درصد افزایش وزن (BWI)، شاخص وضعیت (CF)، نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب‌تبدیل غذایی (FCR) و نرخ بقا (SR) براساس فرمول‌های زیر موردمحاسبه و سنجش قرارگرفت. بدین صورت که پس از گرسنه نگه داشتن ۲۴ ساعته ماهیان، میزان وزن و طول آن‌ها به‌ترتیب با دقت ۰/۱ گرم و ۱ میلی‌متر به‌صورت انفرادی اندازه‌گیری شد. ماهیان قبل اززیست‌سنجی با پودرگل میخک به‌مقدار ۱۵۰ ppm بی‌هوش شدند (Perdikaris و همکاران، ۲۰۱۰).

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

BWI (%) =

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

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

SGR (% / day) =

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

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

SR (٪) =

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

سنجش آنزیم‌های گوارشی روده: در انتهای آزمایش به‌منظور سنجش آنزیم‌های گوارشی نمونه‌برداری از ماهیان انجام شد و از هر تکرار ۲ عدد ماهی بعد از اعمال ۴۸ ساعت گرسنگی برداشت و با استفاده از روش آسان‌کشی قطع نخاع کشته شده و سریعاً بر روی یخ روده ماهی خارج شد و در ویال اپندورف ذخیره و طبق روش Caho و همکاران (۱۹۹۹) در تانک ازت مایع تا زمان آنالیز قرار گرفت. برای سنجش آنزیم‌های لیپاز و پروتئاز ابتدا نمونه‌های منجمدشده، سریعاً توزین گردیده و قبل از ذوب شدن کامل، به نسبت ۱ به ۹ (وزنی/ حجمی) با بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار pH = ۷/۸ مخلوط و در حضور یخ عمل یکنواخت سازی با هموژنایزر الکتریکی (D-500, Germany) صورت گرفت (Rungruangsak-Torrissen و همکاران، ۲۰۰۲؛ Caho و همکاران، ۱۹۹۹).سپس جداسازی مایع‌رویی از سوسپانسیون حاصله جهت سنجش آنزیمی انجام گرفت (Perez- Jemenez و همکاران، ۲۰۰۷). جهت سنجش آنزیم پروتئاز ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سوبسترا (آزوکائین ۱/۵٪ در ۵۰ میلی مولار بافر Tris-HCl در pH =۷/۵) اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد. سپس‌واکنش با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر trichloroacetic acid ۲۰ درصد متوقف شد. مخلوط واکنش بعد از هم‌زدن کامل به‌مدت ۵ دقیقه با دور ۶۵۰۰ سانتریفوژ شد (Haard و Garcia-Carreno، ۱۹۹۳). برای سنجش آنزیم لیپاز، ۵ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سوبسترا (۰/۵۳ میلی‌مولاز p-nitrophenyle myristate، ۰/۲۵ میلی‌مولار از ۲-methoxy ethanol، ۵ میلی‌مولار از sodium cholate و ۰/۲۵ مولار Tris-HCl در pH=۹) اضافه و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد. سپس واکنش با افزودن ۰/۷ میلی‌لیتر از محلول acetone/n-heptane متوقف شد. مخلوط واکنش بعد از هم‌زدن کامل به‌مدت ۲ دقیقه با دور ۶۰۸۰ و در دمای

۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد و میزان جذب لایه زیرین در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت گردید (Iijima، ۱۹۹۸).

روش آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Version 18, IBM, Armonk, NY, USA) انجام شد. نرمال بودن داده‌ها با آزمون Kolmogorov-Smirnov و همگنی واریانس‌ها با آزمون Levene مورد بررسی قرار گرفت. سپس وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین داده‌ها با آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و با استفاده از آزمون Duncan ارزیابی شد. سطح معنی‌دار بودن در این بررسی P< ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

اثرات سطوح مختلف نمک استات سدیم بر شاخص‌های رشد ماهی‌طلایی بعد از ۷۵ روز پرورش در جدول ۱ ارائه شده است. ماهیان تغذیه شده با ۵ گرم نمک استات سدیم به ازای هر کیلوگرم غذا، دارای بیش‌ترین وزن نهایی بودند، به‌طوری‌که اختلاف معنی‌دار آماری بین این‌شاخص در مقایسه با تیمار شاهد و تیمار ۱۰ گرم نمک استات سدیم به‌ازای هر کیلوگرم غذا وجود داشت (P<۰/۰۵) (جدول۱) (شکل ۱). بیش‌ترین مقدار شاخص‌های رشد ماهیان ازجمله طول نهایی، WG، BWI، SGR، CF و کم‌ترین مقدار FCR در تیمار تغذیه شده با ۵ گرم نمک استات سدیم به‌ازای هر کیلوگرم غذا مشاهده شد. با این‌حال،اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارهای‌مختلف مشاهده نشد (P>۰/۰۵)(جدول ۱). هم‌چنین اختلاف معنی‌دار آماری در میزان بازماندگی بین تیمارهای مختلف تغذیه شده با نمک استات سدیم و تیمار شاهد وجود نداشت (P>۰/۰۵) (جدول ۱). اثرات سطوح مختلف نمک استات‌سدیم برفعالیت آنزیم‌های گوارشی روده ماهی طلایی بعد از ۷۵ روز پرورش در جدول ۲ ارائه شده است. بیش‌ترین مقدار فعالیت پروتئاز ولیپاز در تیمار تغذیه‌شده با ۱۰ گرم‌نمک‌استات‌سدیم به‌ازای هر کیلوگرم غذای پایه مشاهده شد. با این‌حال، اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارهای مختلف وجود نداشت (P>۰/۰۵) (جدول ۲).

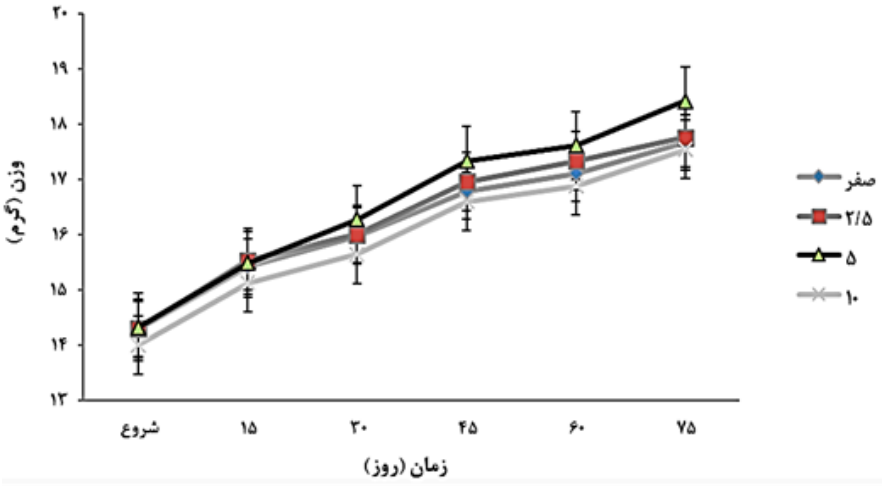
جدول ۱: اثر سطوح مختلف نمک استات سدیم جیره بر شاخص‌های رشد ماهی طلایی (*C. auratus*) پس از ۷۵ روز آزمایش (میانگین ± خطای استاندارد، n= ۳)

شاخص‌های رشد	میزان نمک استات سدیم (گرم/کیلوگرم)			
	صفر	۲/۵	۵	۱۰
وزن اولیه (گرم)	۱۴/۲۹ ± ۰/۰۸ ^{a}	۱۴/۳۱ ± ۰/۱۰ ^{a}	۱۴/۳۳ ± ۰/۱۴^{a}	۱۴/۰۱ ± ۰/۳۱ ^{a}
وزن نهایی (گرم)	۱۷/۶۷ ± ۰/۲۱^{a}	۱۷/۷۶ ± ۰/۴۵^{ab}	۱۸/۴۲ ± ۰/۴۲^{b}	۱۷/۵۴ ± ۰/۲۹^{a}
طول اولیه (سانتی‌متر)	۹/۸۳ ± ۰/۰۶^{a}	۹/۷۳ ± ۰/۱۲^{a}	۹/۸۰ ± ۰/۱۰^{a}	۹/۸۷ ± ۰/۱۲^{a}
طول نهایی (سانتی‌متر)	۱۰/۴۰ ± ۰/۳۰ ^{a}	۱۰/۴۰ ± ۰/۱۷^{a}	۱۰/۴۷ ± ۰/۱۵^{a}	۱۰/۳۳ ± ۰/۱۵^{a}
وزن کسب شده (گرم)	۳۳/۸ ± ۲/۶۵^{a}	۳۴/۵۰ ± ۳/۵۱ ^{a}	۴۰/۸۷ ± ۴/۱۲^{a}	۳۵/۳۰ ± ۵/۰۷^{a}
افزایش وزن بدن (%)	۲۳۶/۵۳ ± ۱۹/۶۵^{a}	۲۴۰/۹۳ ± ۲۲/۹۱^{a}	۲۸۵/۲۲ ± ۲۹/۱۰^{a}	۲۵۲/۵۷ ± ۴۱/۳۳^{a}
نرخ رشد ویژه (%/day)	۲۱/۳۸ ± ۱/۶۰^{a}	۲۱/۷۴ ± ۱/۸۷^{a}	۲۵/۲۶ ± ۲/۲۷^{a}	۲۲/۶۵ ± ۳/۳۳^{a}
شاخص وضعیت	۱/۵۸ ± ۰/۱۴^{a}	۱/۵۸ ± ۰/۱۰^{a}	۱/۶۱ ± ۰/۰۵^{a}	۱/۵۹ ± ۰/۰۷^{a}
ضریب تبدیل غذایی	۳/۱۸ ± ۰/۱۸^{a}	۳/۱۷ ± ۰/۳۴^{a}	۲/۸۰ ± ۰/۱۶^{a}	۳/۰۵ ± ۰/۳۵^{a}
بازماندگی (%)	۱۰۰^{a}	۱۰۰^{a}	۱۰۰^{a}	۱۰۰^{a}

وجود حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۵٪ می‌باشد.

جدول ۲: اثر سطوح مختلف نمک استات سدیم جیره بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده ماهی طلایی (*C. auratus*) پس از ۷۵ روز آزمایش (میانگین ± خطای استاندارد، n=۳)

آنزیم ها	میزان نمک استات سدیم (گرم/کیلوگرم)			
	صفر	۲/۵	۵	۱۰
پروتئاز (Unit/mg protein)	۶/۹۲ ± ۱/۱۸	۶/۴۳ ± ۱/۵۶	۵/۶۳ ± ۱/۳۴	۷/۱۹ ± ۰/۷۸
لیپاز (Unit/mg protein)	۲/۳۰ ± ۰/۴۹	۱/۹۴ ± ۰/۶۱	۱/۸۲ ± ۰/۵۵	۲/۳۶ ± ۰/۴۸



شکل ۱: نمودار روند رشد ماهیان طلایی (*C. auratus*) تغذیه شده با سطوح مختلف نمک استات سدیم پس از ۷۵ روز آزمایش (میانگین±خطای استاندارد، n=۳)

بحث

در این تحقیق، تأثیر دریافت خوراکی نمک استات سدیم بر شاخص‌های رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده ماهی طلایی مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست آمده تفاوت معنی‌داری در وزن نهایی تیمار ۵ گرم نمک استات سدیم در هر کیلوگرم غذا در مقایسه با سایر تیمارها مشاهده شد اما تفاوت معنی‌داری در بین تیمارهای مختلف نمک استات سدیم از نظر طول نهایی، وزن کسب شده، افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه، شاخص وضعیت، ضریب تبدیل غذایی و بازماندگی در طول دوره و پس از ۷۵ روز پرورش مشاهده نشد. در مقایسه نتایج تحقیق حاضر با سایر مطالعات، Ringø (۱۹۹۱) با افزودن ۱٪ لاکتات سدیم به جیره ماهی چار قطبی، افزایش رشد و با افزودن همین میزان پروپیونات سدیم به جیره، کاهش رشد را مشاهده کرد که دلیل احتمالی آن را کاهش هضم چربی و پروتئین جیره بیان نمود. هم‌چنین محتویات شیمیایی معده در ماهیان تغذیه شده با پروپیونات سدیم بالا بود. این مطالعه نشان داد تغذیه ماهی با لاکتات سدیم از بروز اسهال در ماهی جلوگیری می‌کند. از سوی دیگر، da Correa Silva و همکاران (۲۰۱۴) طی مطالعه‌ای میزان ۰/۵، ۱ و ۲٪ سدیم پروپیونات و سدیم بوتیرات به جیره میگوی وانامی اضافه کردند. تمامی تیمارهای حاوی این نمک‌های اسیدآلی افزایش رشد را نشان دادند. در غلظت ۲٪ میزان کارآیی غذا، کارآیی پروتئین، بازماندگی و بازده بیش‌ترین میزان بود. بنابراین نتیجه‌گیری شد که بوتیرات و پروپیونات میکروبیوتای روده میگوی وانامی را تعدیل کرده و موجب رشد بهتر آن می‌شوند. Nermeen and Naela (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای به بررسی تأثیر پتاسیم دیفورمات (KDF) بر رشد ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) پرداختند. چهار جیره شامل صفر (تیمار شاهد)، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳٪ حاوی سطوح مختلف KDF به‌مدت ۶۰ روز به ماهیان با وزن اولیه ۶/۱۵±۵۳/۴۹ گرم داده شد. در پایان دوره آزمایش ماهیان تغذیه‌شده با مقادیر ۰/۲ و ۰/۳٪ بهبود معنی‌داری را در میزان جذب غذا، افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل غذا، نسبت راندمان پروتئین، همراه با بهبود قابلیت هضم پروتئین نشان دادند. Reda و همکاران (۲۰۱۶) دریافتند که به‌کار بردن فرمیک اسید، پروپیونیک اسید و کلسیم پروپیونات در جیره غذایی ماهی تیلاپیای نیل سبب بهبود شاخص‌های رشد، پروتئین و چربی لاشه، فاکتورهای خونی و ایمنی در این ماهی می‌شود. Liu و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای به بررسی تأثیر سدیم بوتیرات میکروکپسوله بر رشد ماهی کپور پرورشی پرداختند. جیره‌های حاوی سطوح مختلف سدیم بوتیرات شامل صفر و ۰/۳٪ به ماهیان داده شد. در پایان دوره آزمایش ماهیان تیمار شده افزایش وزن و کاهش ضریب تبدیل غذایی نشان دادند. Sherif and Doaa (۲۰۱۳) به بررسی تأثیر اسیدی فایرها که ترکیبی از اسیدهای آلی و سولفات مس (اسید فرمیک ۴۷/۱٪، اسید فسفر ۲۳/۰٪، اسید سیتریک ۵/۸٪، اسیداستیک ۱۰/۱٪ و سولفات مس ۱/۱٪) بر ماهی تیلاپیای نیل پرداختند. سطوح مختلف (۰، ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) اسیدی فایر بر رشد، مصرف غذا و برخی از شاخص‌های خونی بچه‌ماهیان تیلاپیای نیل و نیز مقاومت به باکتری *Vibrio anguillarum* بررسی شد. نتایج نشان داد میزان پروتئین سرم خون به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. میزان تلفات در ماهیان تغذیه شده با اسیدی فایرها که به‌مدت ۲۰ روز روزانه با باکتری *V. anguillarum*

با غلظت 10^5 CFU مواجه شده بودند کاهش یافت. از این بررسی می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از مکمل‌های اسیدی فایر می‌تواند ضمن بهبود رشد در این ماهی موجب افزایش مقاومت آن به هنگام مواجه با این باکتری شود. Romano و همکاران (۲۰۱۵) مخلوط اسیدهای آلی به‌صورت میکروکپسول در درصدهای صفر، ۱، ۲ و ۴٪ را به جیره میگوی وانامی اضافه کردند. نتایج نشان داد میگوهای تغذیه شده با سطح ۲٪ مخلوط اسیدهای آلی رشد بیش‌تری داشته‌اند، قابلیت هضم در این تیمار بیش‌تر بود، هم‌چنین تیمار حاوی ۱٪ و ۲٪ بازماندگی بیش‌تری نسبت به تیمار شاهد و ۴٪ نشان دادند. Silva و همکاران(۲۰۱۶) به‌منظور ارزیابی اثرات سطوح مختلف سدیم بوتیرات روی میگوی وانامی در مجموع ۷ تیمار غذایی مختلف را مورد بررسی قرار دادند. جیره شاهد فاقد هر نوع مکمل غذایی و جیره‌های آزمایشی حاوی نمک بوتیرات در غلظت‌های صفر، ۵، ۱۰ و۲۰٪ بودند. کلیه تیمارهایی که در آن‌ها از بوتیرات استفاده شده بود افزایش وزن بیش‌تری در مقایسه با تیمار شاهد نشان دادند و رشد و بازده تغذیه افزایش یافت. Ng و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی اثر اسیدهای آلی بر ماهی تیلاپیای هیبریدی سرخ (*Oreochromis* sp.) دریافتند که با وجود این که رویکردی افزایشی در تیمارهای حاوی اسیدهای آلی وجود داشت ولی تفاوت معنی‌دار آماری در رشد، مصرف غذا و قابلیت هضم مواد غذایی بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد. از دلایل مغایرت در پاسخ رشد در گونه‌های مختلف، می‌توان به وزن اولیه گونه، فیلوژنی، اختصاصات سیستم گوارشی، دوز مورد استفاده نمک، ترکیبات جیره و اثرات متقابل آن‌ها و شرایط پرورش شامل دما، نور، سیستم نگه‌داری و پارامترهای کمی و کیفی آب اشاره کرد (Ergun و Erdem، ۲۰۰۰). از دلایل احتمالی افزایش رشد در مطالعه حاضر را می‌توان به کاهش pH روده که مانع رشد باکتری‌های گرم منفی و موجب کاهش جذب ارگانیسم‌های پاتوژن احتمالی و متابولیت‌های سمی آن‌ها از طریق غذا در جانوران پرورشی می شود، نسبت داد. مطالعه آنزیم‌های گوارشی یک گام ضروری به سوی پی بردن به مکانیسم گوارش ماهی می‌باشد و نقش مهمی در هضم مواد غذایی بر عهده داشته و آگاهی از سطح فعالیت آن‌ها می‌تواند در پی بردن به قدرت هضمی ماهیان موثر باشد. از طرف دیگر، تغییرات غذا و مکمل‌های غذایی می‌تواند بر تولید آنزیم‌های گوارشی موثر باشد (Sunde و همکاران، ۲۰۰۱). در مطالعه حاضر نتایج حاصل از استفاده نمک استات سدیم بر فعالیت آنزیم‌های پروتئاز و لیپاز نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در تیمارهای تغذیه شده با نمک استات سدیم و تیمار شاهد است. بر خلاف نتایج حاضر، Da Silva و همکاران (۲۰۱۵) تأثیر جیره‌های غذایی حاوی نمک‌های سدیم (فرمیت، استات، لاکتات، پروپیونات، بوتیرات، فومارات، سوکسینات و سیترات) بر روی فعالیت‌های تریپسین و کیموتریپسین میگوی وانامی را مورد بررسی قرار دادند. فعالیت تریپسین و کیموتریپسین میگو در جیره حاوی استات و پروپیونات افزایش یافت و در جیره حاوی لاکتات و سیترات کاهش یافت. Castillo و همکاران (۲۰۱۴) تأثیر جیره‌های غذایی حاوی لاکتات سدیم، سیتریک اسید و پتاسیم دیفورمات بر روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی شوریده (*Sciaenops ocellatus*) را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که pH دستگاه گوارش جیره‌های حاوی اسیدهای آلی در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت و فعالیت آنزیم‌های پپسین، تریپسین، لیپاز، لوسین آمینو پپتیداز و فسفاتاز با افزودن اسیدهای آلی افزایش یافت و موجب افزایش رشد شدند. Nandeesha و همکاران (۲۰۰۰) دریافتند که افزودن نمک کلرید سدیم به جیره ماهی کپورمعمولی باعث افزایش آنزیم‌های گوارشی در تیمارهای تغذیه شده با این نمک می‌شوند. Thaela و همکاران(۱۹۹۸)اثر اسیدلاکتیک بر آنزیم‌های گوارشی خوک را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان‌داد با کاهش pH، ترشح آنزیم‌های گوارشی و هضم پروتئین افزایش یافت. عوامل زیادی بر نتایج متضاد به‌دست آمده از تحقیقات مختلف موثر می‌باشند که می‌توان به مواردی مانند وضعیت روده، روش تغذیه، ساختار سوبسترا و ریتم‌های فیزیولوژیکی اشاره کرد(Lopez-Vasquez و همکاران، ۲۰۰۹). با توجه به نبود تفاوت معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های گوارشی در تحقیق حاضر، دلایل احتمالی این مسأله را می‌توان به پایین بودن سطوح انتخابی استات سدیم جیره و سن فیزیولوژیک ماهی نسبت داد. به‌طورکلی از مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که افزودن استات سدیم در جیره غذایی ماهی طلایی می‌تواند سبب بهبود شاخص‌های رشد شود اما تأثیر معنی‌داری بر روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی طلایی ندارد. هم‌چنین، لازم است تا بررسی‌های تکمیلی برای مطالعه تأثیر استفاده از مقادیر دیگری از استات سدیم در جیره غذایی این ماهی و سایر ماهیان پرورشی در دوره‌های مختلف رشد و فاکتورهای ایمنی آن‌ها صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از تمامی کسانی که در مراحل انجام پژوهش حاضر همکاری و مساعدت نمودند، به‌ویژه مهندسین گرامی محمد محمدی، سمیرا صدیقی و سمیرا مرادی کمال تشکر را دارد.

منابع

۱. **مقدسی، ب.؛ منوچهری، ح. و اهدایی، م.، ۱۳۸۹.** بررسی امکان رنگ‌آمیزی مصنوعی ماهیان گرین ترور (*Aequidens rivulatus*) از طریق تزریق. مجله بیولوژی دریا. سال ۲، شماره ۱، صفحات ۵۷ تا۶۴.

۲. **Baruah, K.; Pal, A.K.; Sahu, N.P.; Jain, K.K.; Mukherjee, S.C. and Debnath, D., 2005.** Dietary protein level, microbial phytase, citric acid and their interactions on bone mineralization of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles. Aquaculture Research. Vol. 36, pp: 803-812.

۳. **Boskou, G. and Debevere, J., 2000.** Shelf life extension of cod fillets with an acetate buffer spray prior to packaging under modified atmosphere. Food Additives and Contaminants. Vol. 17, pp: 17-25.

۴. **Cahu, C.; Zambonino Infante, J.; Quazuguel, P. and Le Gall, M., 1999.** Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. Aquaculture. Vol. 171, pp: 109-119.

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

۶. **Correa da Silva, B.; Nascimento Vieira, F.; Pedreira Mouri, L.; Bolivar, N. and Quadros Seiffert, W., 2014.** Butyrate and propionate improve the growth performance of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Research. Vol. 35, pp: 1-12.

۷. **Da Silva, B.C.; do Nascimento Vieira, F.; Mouriño, J.L.P.; Ferreira, G.S. and Seiffert, W.Q., 2013.** Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. Aquaculture. Vol. 384, pp: 104-110.

۸. **De Wet, L., 2005.** Organic acids as performance enhancers. Aqua Feeds: Formulation and Beyond. Vol. 2, pp: 12-14.

۹. **Ergun, S. and Erdem, M., 2000.** Effect of natural and synthetic carotenoid sources on pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Turk. J. Vet. Anim. Sci. Vol. 24, pp: 391-402.

۱۰. **Garcia-Carreno, F.L. and Haard, N.F., 1993.** Characterization of proteinase classes in *Langostilla pleuroncodes* planipes and Crayfish *Pacifastacus astacus* extracts. Journal of Food Biochemistry. Vol. 17, pp: 97-113.

۱۱. **Gislason, G.; Olsen, R. and Ringø, E., 1994.** Lack of growth-stimulating effect of lactate on Atlantic Salmon, *Salmo salar* L. Aquaculture Research. Vol. 25, pp: 861-862.

۱۲. **Gouveia, L.; Rema, P.; Pereira, O. and Empis, J., 2003.** Colouring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass. Aquaculture Nutrition. Vol. 9, pp: 123–129.

۱۳. **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.

۱۴. **Hoseinifar, S.H.; Roosta, Z.; Hajimoradloo, A. and Vakili, F., 2015.** The effects of *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). Fish & Shellfish Immunology. Vol. 42, No. 2, pp: 533-538.

۱۵. **Hoseinifar, S.H.; Sun, Y.Z. and Caipang, C.M., 2016.** Short chain fatty acids as feed supplements for sustainable aquaculture: an updated view. Aquaculture Research. Vol. 48, pp: 1380-1391.

۱۶. **Iijima, N.; Tanaka, S. and Ota, Y., 1998.** Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream (*Pagrus major*). Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 18, pp: 59-69.

۱۷. **Lim, C.; Lückstädt, C.; Webster, C.D. 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.

۱۸. **Lopez-Vasquez, K.; Castro-Perez, C.A. and Val, A.L., 2009.** Digestive enzymes of eight Amazonian teleosts with different feeding habits. Journal of Fish Biology. Vol. 74, pp: 1620-1628.

۱۹. **Lückstädt, C., 2006.** Acidifiers in aquaculture prove beneficial, Feed Mix. Vol. 14, pp: 11-12.

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

۲۱. **Nandeesha, M.C.; Gangadhar, B.; Keshavanath, P. and Varghese, T.J., 2000.** Effect of dietary sodium chloride supplementation on growth, biochemical composition and digestive enzyme activity of young *Cyprinus carpio* (Linn.) and *Cirrhinus mrigala* (Ham.). Journal of Aquaculture in the Tropics. Vol. 15, No. 2, pp: 135-144.

۲۲. **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.

۲۳. **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, *Oreochromis sp*., and subsequent survival during a challenge test with *Streptococcus agalactiae*. Aquaculture Research. Vol. 40, No. 13, pp: 1490-1500.

۲۴. **Owen, M.; 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). Proceedings of the XII International Symposium on Fish Nutrition and Feeding. Biarritz, France. 147 p.

۲۵. **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 and goldfish (*Carassius auratus*). Acta Veterinaria Brno. Vol. 79, pp: 481-490.

۲۶. **Pérez-Jiménez, A.; Guedes, M.J.; Morales, A.E. and Oliva-Teles, A., 2007.** Metabolic responses to short starvation and refeeding in (*Dicentrarchus labrax*): Effect of dietary composition. Aquaculture. Vol. 265, pp: 325-335.

۲۷. **Ramsden, S.R.; Smit, T.J.; Shaw, B.J. and Handy, R.D., 2009.** Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): No effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. Ecotoxicology. Vol. 18, pp: 939-951.

۲۸. **Ramli, N.; Heindl, U. and Sunanto, S., 2005.** Effect of potassium-diformate on growth performance of tilapia challenged with *Vibrio anguillarum*. In World Aquaculture Society Conference. Bali, Indonesia. January 2005.

۲۹. **Reda, R.M.; Mahmoud, R.; Selim, K.M. and El-Araby, I.E., 2016.** Effects of dietary acidifiers on growth, hematology, immune response and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish & Shellfish Immunology. Vol. 50, pp: 255-262.

۳۰. **Ringø, E.; Olsen, R.E. and Castell, J.D., 1994.** Effect of dietary lactate on growth and chemical composition of Arctic charr *Salvelinus alpinus*. Journal of the World Aquaculture Society. Vol. 25, pp: 483-486.

۳۱. **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.

۳۲. **Rungruangsak-Torrissen, K.; Moss, R.; Andersen, L.; Berg, A. and Waagbo, R., 2006.** Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar L*). Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 32, pp: 7-23.

۳۳. **Rungruangsak-Torrissen, 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, pp: 644-654.

۳۴. **Sallam, K.H.I. and Samejima, K., 2004.** Microbiological and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/ LWT-Food Science and Technology. Vol. 37, pp: 865-871.

۳۵. **Sarker, M.S.A.; Satoh, S. and Kiron, V., 2007.** Inclusion of citric acid and/or amino acid-chelated trace elements in alternate plant protein source diets affects growth and excretion of nitrogen and phosphorus in red sea bream *Pagrus major*. Aquaculture. Vol. 262, pp: 436-443.

۳۶. **Sherif, A.H. and Doaa, M.G., 2013.** Studies on the effect of acidifier on cultured *Oreochromis niloticus* fish. Journal of the Arabian Aquaculture Society. Vol. 8, pp: 229-236.

۳۷. **Silva, B.C.; Nolasco-Soria, H.; Magallon-Barajas, F.; Civera-Cerecedo, R.; Casillas-Hernandez, R. and Seiffert, W., 2015.** Improved digestion and initial performance of whiteleg shrimp using organic salt supplements. Aquaculture Nutrition. Vol. 385, pp: 202-301.

۳۸. **Sunde, J.; Taranger, G. and Rungruangsak-Torrissen, K., 2001.** Digestive protease activities and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar L*). Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 25, pp: 335-345.

۳۹. **Tabrizi, J.M.; Barzeghar, A.; Farzampour, S.; Mirzaii, H. and Safarmashaei, S., 2012.** Study of the effect of prebiotic (*Saccharomyces cerevisiae*) and acidifier on growth parameters in grower's rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Annals of Biological Research. Vol. 3, pp: 2053-2057.

۴۰. **Thaela, M.J.; Jensen, M.S.; Pierzynowski, S.G.; Jakob, S. and Jensen, B.B., 1998.** Effect of lactic acid supplementation on pancreatic secretion in pigs after weaning. Journal of Animal and Feed Sciences. Vol. 7, pp: 181-183.

۴۱. **Whittington, R. and Chong, R., 2007.** Global trade in ornamental fish from an Australian perspective: the case for revised import risk analysis and management strategies. Preventive Veterinary Medicine. Vol. 81, No. 1, pp: 92-116.