14(2) 169-176, Summer 2022

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

Original Research Paper

Effect of different levels of folic acid on growth performance and blood indexes of Beluga fingerling (*Huso huso* Linnaeus 1758)

Ataollah YeganehKari [1], Hadi Ershadlangeroudi [1*], Alireza Valipour [2], Soheil Alinejad [3]

[1] *Department of fisheries, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran*
[2] *Inland Waters Aquaculture Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agriculture Research Education and Organization (AREEO), Bandar Anzali, Iran*
[3] *Department of Fisheries and Aquatic, Institute of Agricultural Education and Extension, Agriculture Research Education and Organization (AREEO), Tehran, Iran*

Key Words
Folic acid
Blood serum
Growth function
Immunity index
Beluga
Huso huso

Abstract

Introduction: Folic acid plays an essential role in promoting aquatic immune.

Materials & Methods: In order to investigate the effect of folic acid diet on growth performance, carcass composition, blood parameters of 270 beluga fingerling with an average weight of 5-8 g with different levels of folic acid, including: 0.6 (as a control), 2.68, 3.72 and 4.84 mg/kg with three replications for 56 days were considered. The effect of experimental treatments on growth performance and immune indices was investigated.

Results: Results showed that the effect of treatments on feed conversion, specific growth rate, feed efficiency and weight gain was significant ($P<0.05$). Different levels of folic acid also made a significant difference in the number of white blood cells ($P<0.05$); So that the lowest value in the control treatment was 4.62 mg/kg and the highest was 6.75 mg/kg in the fourth treatment. There was a significant difference in the number of lymphocytes between the experimental groups, but no significant difference was observed in the number of neutrophils. After carcass analysis, as expected, increasing dietary folic acid level caused a significant increase in the percentage of crude protein in the carcass. So that the highest percentage of crude protein in the third treatment was 2.13 mg/kg. Moisture, fat and ash carcass indices were not significantly affected by experimental treatments.

Conclusion: The results of this experiment showed that by increasing the amount of folic acid by 3.72 mg/kg, the fish will show better resistance in terms of immune and growth performance.

* Corresponding Author's email: ershad5353@gmail.com
Received: 5 April 2021; Reviewed: 8 May 2021; Revised: 11 July 2021; Accepted: 14 August 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.295613.2586

مقاله پژوهشی

بررسی اثر سطوح مختلف اسید فولیک بر عملکرد رشد، ترکیب لاشه و شاخص‌های خونی بچه فیل‌ماهیان انگشت‌قد (*Huso huso* Linnaeus 1758)

عطاالله یگانه‌کاری[۱]، هادی ارشاد لنگرودی[۱*]، علیرضا ولی‌پور[۲]، سهیل علی‌نژاد[۳]

[۱] گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

[۲] پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرانزلی، ایران

[۳] گروه تخصصی شیلات و آبزیان، موسسه آموزش و ترویج کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

کلمات کلیدی

اسید فولیک
سرم خون
عملکرد رشد
شاخص ایمنی
فیل‌ماهی

چکیده

مقدمه: اسید فولیک نقش اساسی در ارتقاء ایمنی آبزیان ایفا می‌کند.

مواد و روش‌ها: به‌منظور بررسی اثر رژیم غذایی اسید فولیک بر عملکرد رشد، ترکیبات لاشه ، پارامترهای خونی از ۲۷۰ عدد بچه فیل‌ماهی (*Huso huso*) انگشت‌قد با میانگین وزنی ۸-۵ گرم با سطوح مختلف اسید فولیک شامل: ۰/٦ میلی‌گرم در کیلوگرم (تیمار شاهد ۱)، ۲/٦۸ میلی‌گرم در کیلوگرم (تیمار ۲)، ۳/۷۲ میلی‌گرم در کیلوگرم (تیمار ۳) و ٤/۸٤ میلی‌گرم در کیلوگرم (تیمار ٤)، با سه تکرار به مدت٥٦ روز استفاده شد. اثر تیمارهای آزمایشی برعملکرد رشد و شاخص‌های ایمنی بررسی گردید.

نتایج: نتایج نشان داد، اثر تیمارهای آزمایشی بر ضریب تبدیل خوراک، نرخ رشد ویژه، بازده خوراک و افزایش وزن معنی‌داری بود ($P<۰/۰۵$). سطوح مختلف اسیدفولیک بر تعداد گلبول‌های سفید نیز اختلاف معنی‌داری ایجاد نمود($P<۰/۰۵$)، به‌طوری‌که کم‌ترین مقدار آن در تیمار شاهد به‌میزان $٤/٦۲\times۱۰^{۳}mm^{-۳}$ و بیش‌ترین آن به میزان $٦/۷٥\times۱۰^{۳}mm^{-۳}$ در تیمار چهارم مشاهده شد. تعداد لنفوسیت‌ها در بین گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌دار داشت ($P<۰/۰۵$) ولی اختلاف معنی‌داری در تعداد نوتروفیل‌ها دیده نشد ($P>۰/۰۵$). پس از آنالیز لاشه، همان‌طورکه انتظار می‌رفت افزایش سطح اسیدفولیک جیره سبب افزایش معنی‌دار درصد پروتیین خام در لاشه گردید ($P<۰/۰۵$). به‌طوری‌که بیش‌ترین مقدار درصد پروتیین خام در تیمار سوم به‌میزان ۲/۱۳ مشهود بود. شاخص‌های رطوب، چربی و خاکستر لاشه به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند.

بحث و نتیجه‌گیری: یافته‌های این آزمایش نشان داد که با افزایش میزان اسیدفولیک به‌میزان ۳/۷۲ میلی‌گرم در کیلوگرم درجیره، ماهی‌ها مقاومت بهتری از نظر ایمنی و عملکرد رشد از خود نشان خواهند داد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: ershad5353@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱٦ فروردین ۱٤۰۰؛ تاریخ داوری: ۱۸ اردیبهشت ۱٤۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۲۰ تیر ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۲۳ مرداد ۱٤۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.295613.2586

مقدمه

فیل‌ماهی (*Huso huso*) یکی از گونه‌های مهم تجاری ماهیان خاویاری دریای خزر و گونه اصلی پرورشی تاس‌ماهیان در ایران است که جمعیت آن‌ها همانند سایر گونه‌های ماهیان خاویاری به‌دلایل مختلف زیستی و انسانی به‌شدت در حال کاهش است (۱). این ماهی به‌دلیل رشد سریع، تراکم‌پذیری، مقاومت بالا در برابر تغییرات فیزیکی و شیمیایی آب، تغذیه به‌روش همه‌چیزخواری و امکان تکثیر در شرایط پرورشی یکی از گونه‌های مهم با استعداد پرورش در مزارع پرورش به‌منظور تولید خاویار و یا تولید گوشت می‌باشد (۲). تغذیه پرهزینه‌ترین بخش اجرایی در پرورش آبزیان محسوب می‌شود، یافتن ترکیبات غذایی جایگزین و ارزان قیمت به توسعه آبزی‌پروری به‌میزان زیاد کمک می‌کند (۳). چالش عمده در آبزی‌پروری تجاری، بهبود جیره‌های غذایی فرموله شده برای بهینه سازی رشد و ارتقاء سلامت ماهی‌ها می‌باشد (۴). کارایی تغذیه و رشد در ماهیان ازجمله مهم‌ترین عوامل اقتصادی است که قابلیت تولید تجاری آن‌ها را تعیین می‌کند (۲). غذا و غذادهی از مهم‌ترین فاکتورهای موثر بر رشد، ضریب تبدیل غذا در پرورش متراکم می‌باشد (۵). یافتن راه کارهایی به‌منظور تهیه و تامین غذای مناسب و ارزان قیمت می‌تواند نقش مهمی در کاهش هزینه‌ها داشته باشد (۶). خون ابزار مهمی در بررسی وضعیت فیزیولوژیکی یک موجود زنده می‌باشد (۷)، اخیراً استفاده از محرک‌های رشد مثل در آبزی‌پروری افزایش یافته است (۸). اسیدفولیک برای شکل‌گیری طبیعی گلبول‌های قرمز خون ضروری است. هم‌چنین در مکانیزم‌های انتقال تک‌کربنه مانند اسیدهای امینه و بیوسنتز پورین‌ها و پیریمیدن‌ها دخیل است. اسیدفولیک یک نقش اساسی در ارتقاء ظرفیت ایمنی و آنتی‌اکسیدانی و مقاومت در برابر عفونت‌های باکتریایی حیوانات آبزی ایفا می‌کند (۹). Jamalzad Falah و همکاران با بررسی تاثیر ویتامین B9 (اسید فولیک) بر عملکرد رشد و ایمونوفیزیولوژی بچه تاس‌ماهی سیبری نشان دادند که استفاده از اسیدفولیک می‌تواند به‌طور قابل توجهی بر عملکرد رشد، محتوای پروتئین خام، پارامترهای خون، وضعیت آنتی‌اکسیدان و پاسخ‌های ایمنی ماهیان خاویاری سیبری را پیشرفت دهد (۱۰). دلسوزخاکی و همکاران با بررسی اثرات پروبیوتیک باکتوسل و اسید فولیک برفاکتورهای خونی و ایمنی بچه ماهی شیپ نشان دادند که افزودن ۴ میلی‌گرم اسیدفولیک با ۳۰۰ گرم پروبیوتیک در هر تن غذا می‌تواند در بهبود روند رشد و کارایی غذا نقش مثبتی را ایفا نماید (۱۱)، نادری و همکاران با بررسی تاثیر متقابل ویتامین C و اسیدفولیک بر فاکتورهای خونی و ایمنی بچه‌ماهی شیپ مشخص نمودند که افزایش سطح ویتامین اسیدفولیک و سطح ثابت ویتامین C در جیره غذایی بر روی شاخص‌های خونی بدن ماهیان شیپ پرورشی تاثیرگذار است و سطح ویتامین C به تنهایی باعث افزایش شاخص‌های ایمنی اندازه‌گیری شده می‌باشد (۱۲). با توجه به اهمیت پرورش ماهیان خاویاری در راستای تولید گوشت و خاویار بررسی اثر سطوح مختلف اسید فولیک بر عملکرد رشد، آنالیز لاشه و برخی شاخص‌های خونی سفید بچه فیل‌ماهیان انگشت‌قد از اهمیت ویژه‌ای در توسعه تولید آبزیان برخوردار می‌باشد. این تحقیق برای بررسی اثر سطوح مختلف اسید فولیک بر عملکرد رشد و شاخص‌های ایمنی بچه فیل‌ماهیان انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در مزرعه خاویار طلایی جفتان با طول جغرافیایی (″۱۷ ′۷۵ °۴۹) و عرض جغرافیایی (″۵۵ ′۸۳ °۳۴) در استان مرکزی شهرستان تفرش در سال ۱۳۹۹ انجام گردید. در این تحقیق تعداد ۲۷۰ عدد بچه فیل‌ماهی با متوسط وزن اولیه ۶/۵۸±۰/۱۶ در چهار تیمار و سه تکرار با استفاده از چهار سطح اسیدفولیک مکمل در مقادیر شاهد (۰/۶ میلی‌گرم/کیلوگرم) که به‌طور طبیعی در جیره پایه وجود داشت، تیمار اول (۲/۶۸ میلی‌گرم/کیلوگرم)، تیمار دوم (۳/۷۲ میلی‌گرم/کیلوگرم) و تیمار سوم (۴/۸۴ میلی‌گرم/کیلوگرم) فرموله به‌مدت ۵۶ روز پرورش یافتند (۱۰). ماهیان به‌مدت دو هفته جهت سازگاری نگه‌داری و سپس به ۱۲ مخزن ۲۰۰ لیتری یکسان به تعداد ۲۰ عدد در هر مخزن، در یک محیط سرپوشیده با سیستم جریان مستقیم آب از رودخانه و چاه با دبی ۶/۵±۰/۲ لیتر در دقیقه رهاسازی شدند. کلیه حوضچه‌ها به‌طور جداگانه مجهز به ورودی، خروجی و هوادهی دائم برای حفظ اکسیژن آب در نزدیکی سطح اشباع بودند. ارتفاع آب در کلیه حوضچه‌ها به‌طور مساوی معادل ۳۰±۱ سانتی‌متر درنظر گرفته شد. طی دوره سازگاری ماهیان به‌منظور تخلیه اسید فولیک احتمالی با رژیم غذایی قبلی، با غذای دستی که فاقد مکمل ویتامینی اسیدفولیک بود غذادهی شدند. قبل از ذخیره‌سازی، مخازن با پرمنگنات پتاسیم به‌میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر ضدعفونی شدند. ماهیان سه بار در روز با جیره‌های آزمایشی به‌میزان ۳-۲ درصد وزن توده زنده هر مخزن در ساعت‌های ۲۳، ۱۵، ۷ تغذیه گردیدند. جهت تعیین توده‌زنده، هر ۱۵ روز یک‌بار تمام ماهیان با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم وزن و با خط‌کش زیست‌سنجی با دقت ۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شدند و مشخصات آن‌ها ثبت گردید. ۲۴ ساعت قبل از زیست‌سنجی، قطع غذادهی انجام شد (۱۰). برای ساخت غذا طبق جدول ۱ ابتدا ترکیبات جیره به‌صورت کاملاً آسیاب شده در آمده و ۲۰ دقیقه در دستگاه میکسر مخلوط شدند و در دمای ۲۰- نگه‌داری شدند. اسیدفولیک مورد استفاده در جیره ساخت شرکت Dae jung chemical از کشور کره‌جنوبی با خلوص ۹۶ درصد بود. میزان خوراک

مصرفی روزانه در هر مخزن به‌طور روزانه ثبت می‌گردید. غذا با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم توزیع و در سطح آب توزیع گشت. مدفوع و مواد باقی‌مانده هرروز از مخازن تخلیه شدند. درجه حرارت، اکسیژن محلول، pH، غلظت دی‌اکسیدکربن، قلیاییت، سختی کل، آمونیاک و طول دوره نوری در این آزمایش به‌عنوان متغیرهای شاهد ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی درنظر گرفته شد و حداقل دوبار در طول شبانه‌روز اندازه‌گیری و ثبت گردید (۲).

جدول۱: اجزاء مواد خوراکی جیره‌های آزمایشی

اجزاء مواد خوراکی	جیره‌های آزمایشی			
	اول	دوم	سوم	چهارم
(الف) پودر ماهی کیلکا (درصد)	۵۶	۵۶	۵۶	۵۶
(ب) آرد گندم (درصد)	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹
(ج) آرد سویا (درصد)	۷	۷	۷	۷
(د) گلوتن ذرت (درصد)	۴	۴	۴	۴
(ه) روغن ماهی (درصد)	۴	۴	۴	۴
(ج) روغن سویا (درصد)	۴	۴	۴	۴
سلولز (درصد)	۳	۳	۳	۳
(ز) مخلوط ویتامین (درصد)	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
(ط) مخلوط مواد معدنی (درصد)	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
(ی) اسیدفولیک (میلی‌گرم/کیلو گرم)	۰	۲/۵	۳/۵	۴/۵

الف) کارخانه پودر گیل، بندرانزلی، ایران. ب) شرکت آرد طلایی، تهران، ایران. ج) شرکت صنایع بهپاک، بهشهر، ایران. د) شرکت مهشاد یزد، یزد، ایران. ه) روغن تصفیه شده کیلکا *Clupeonella cultriventris*، کارخانه روغن خزر، بندرانزلی، ایران. ز) ترکیب در مخلوط: ویتامین A: ۱۴۰/۰۰۰ IU، ویتامین D_3: ۴۰۰/۰۰۰ IU، ویتامین K_3: ۲ گرم، ویتامین E: ۴۰ گرم، ویتامین B_1: ۶ گرم، ویتامین B_2: ۸ گرم، اسید پانتوتنیک: ۳۵ گرم، نیاسین: ۱۲ گرم، ویتامین B_6: ۴ گرم، ویتامین B_{12}: ۸ گرم، ویتامین C: ۶۰ گرم، اینوزیتول: ۲۰ گرم، بیوتین: ۲۴۰ گرم (همه اجزا با α-سلولز تا یک کیلوگرم رقیق شدند). ط) ترکیب در مخلوط: آهن: ۴۵۰۰ میلی‌گرم، مس: ۵۰۰ میلی‌گرم، کبالت: ۵۰ میلی‌گرم، منیزیوم: ۵۰۰۰ میلی‌گرم، سلنیوم: ۵۰ میلی‌گرم، روی: ۶۰۰۰ میلی‌گرم، ید: ۱۵۰ میلی‌گرم، کولین کلراید: ۱۵۰۰۰۰ میلی‌گرم. (همه اجزا با α-سلولز تا یک کیلوگرم رقیق شدند). ی) اسیدفولیک مکمل (Dae jung Chemical Co.Korea)

پس از اتمام تغذیه آزمایشی، به‌مدت ۲۴ ساعت کلیه ماهیان قطع غذا گردیدند، با پودر گل میخک به‌میزان (۳۰۰ میلی‌گرم/لیتر) بی‌هوش گردیدند (۱۳)، وزن و طول ماهیان با ترازوی دیجیتال با دقت ۱ گرم هم‌چنین محاسبه افزایش وزن بدن، میانگین رشدروزانه، ضریب رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی، براساس Merrifield و همکاران محاسبه شد (۱۴)(جدول ۳). ۶ قطعه ماهی از هر حوضچه به‌طور تصادفی برای گرفتن نمونه خون از ساقه دمی با استفاده از سرنگ ۵ میلی‌لیتری پلاستیکی انتخاب شدند، نمونه خون‌های گرفته شده از ماهیان در هر تکرار به دو بخش جداگانه تقسیم شده، یک بخش (۰/۵ میلی‌لیتر) به یک لوله هپارینه منتقل شد و تا زمان بررسی‌های خون‌شناسی در جعبه حاوی یخ نگه‌داری گردید، بخش دیگر (۱/۵ میلی‌لیتر) به‌مدت ۲۵ دقیقه در دمای محیط باقی ماند تا لخته شده و با استفاده از سانتریفیوژ سیگما به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد (3–30k, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Germany). نمونه‌های سرم پس از این‌که در نیتروژن مایع منجمد شدند برای بررسی‌های بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردیدند. مقادیر رطوبت، پروتئین خام، چربی خام و خاکستر در جیره‌های آزمایشی ماهی مطابق با مراحل استاندارد AOAC تعیین گردیدند (۱۵)(جدول ۲).

جدول۲: ترکیبات تقریبی جیره‌های آزمایشی

ترکیب تقریبی مواد مغذی	جیره‌های آزمایشی			
	اول	دوم	سوم	چهارم
رطوبت (درصد)	۳/۵۰	۳/۶۰	۳/۵۵	۳/۵۰
پروتئین (درصد)	۴۷/۶۵	۴۷/۸۴	۴۷/۳۸	۴۷/۳۶
چربی (درصد)	۱۶/۵۲	۱۶/۳۹	۱۶/۴۱	۱۶/۲۶
خاکستر (درصد)	۱۰/۰۵	۱۰/۱۰	۱۰/۱۰	۱۰
اسیدفولیک (میلی گرم/کیلوگرم)	۰/۶	۲/۶۸	۳/۷۲	۴/۸۴

(وزن اولیه ماهی- وزن نهایی ماهی)=افزایش وزن ماهی ماهی

$$WG = (W_f - W_i)\ (g)$$

وزن اولیه ماهی/100*(وزن اولیه ماهی-وزن نهایی ماهی)= درصد افزایش وزن بدن

$$BWI = (W_f - W_i)*100/\ W_i\ \ (\%\ day^{-1})$$

(زی‌توده اولیه ماهی- زی‌توده نهایی ماهی)/(غذای داده شده به ماهی به گرم) = ضریب تبدیل غذایی

$$FCR = Fi/(\ W_f - W_i)\ \ (Feed\ intake)\ (g)$$

(طول کل ماهی/100*(g) وزن کل ماهی = ضریب چاقی

$$CF = W*100/L^3\ (g)$$

(طول مدت پرورش) /100* (لگاریتم وزن اولیه ماهی-لگاریتم وزن نهایی ماهی)= شاخص رشد ویژه

$$SGR = (Ln\ W_f - Ln\ W_i)\ *100\ /\ T\ \ (\%\ day^{-1})$$

شمارش گلبول‌های قرمز: شمارش گلبول‌های قرمز به‌روش دستی و با استفاده از لام هموسیتومتر نئوبار صورت گرفت. برای این کار و برای رقیق‌نمودن نمونه از محلول رقیق‌کننده هایم استفاده شد. برای شمارش گلبول‌های قرمز تا درجه ۰/۵ پیپت ملانژور قرمز خون کشیده و سپس تا درجه ۱۰۱ با محلول هایم رقیق شد (نسبت رقت ۱ به ۲۰۰) و سپس نمونه رقیق‌شده به لام هموسیتومتر نئوبار منتقل و پس از ۵ دقیقه بعد از ته‌نشین‌شدن گلبول‌های قرمز، با بزرگ‌نمایی ۴۰ در پنج مربع متوسط ۱۶ تایی از مربع بزرگ مرکزی شمارش و تعداد سلول‌های شمارش شده در عدد ۱۰۰۰۰ ضرب گردید. بدین ترتیب تعداد گلبول‌های قرمز در هر میلی‌متر مکعب خون تعیین شد (۱۶).

شاخص‌های گلبولی: شامل حجم متوسط گلبولی (MCV)، میزان متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) و غلظت هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) با استفاده از فرمول‌های استاندارد موجود محاسبه شد (۱۶).

MCV = تعداد گلبول‌های قرمز (ppm/m3)/۱۰ × هماتوکریت (٪)

MCH = تعداد گلبول‌های قرمز (ppm/m3)/۱۰ × هموگلوبین (g/dl)

MCHC = ۱۰۰ × هماتوکریت (٪)/ هموگلوبین (g/dl)

میزان هموگلوبین: سنجش هموگلوبین برحسب گرم بر دسی‌لیتر، با استفاده از روش سیانومت هموگلوبین و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل 2100-VIS (Unico, USA) با طول موج ۵۴۰ نانومتر انجام شد. سپس از یک منحنی استاندارد و رابطه زیر برای تعیین هموگلوبین استفاده شد (۱۶):

غلظت استاندارد × (OD استاندارد ÷ OD نمونه) Hb (g/dL)

سنجش هماتوکریت: اندازه‌گیری هماتوکریت با استفاده از لوله‌های میکروهماتوکریت انجام شد. نمونه خون توسط میکروسانتریفوژ Hettich (آلمان) با دور rpm ۷۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و هماتوکریت توسط خط‌کش مخصوص خوانده شد.

شمارش گلبول‌های سفید: شمارش گلبول‌های سفید توسط ملانژورهای گلبول سفید و محلول رقیق‌کننده Rees توسط لام نئوبار صورت گرفت. برای این‌کار نمونه خون به نسبت ۱ به ۲۰ با محلول رقیق‌کننده رقیق شده و پس از انتقال به لام نئوبار تعداد گلبول‌های سفید در ۴ مربع بزرگ اطراف علامت+شمارش و سپس تعداد گلبول‌های سفید در میلی‌متر مکعب خون با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۱۶).

تعداد گلبول‌های سفید در میلی‌متر مکعب خون= (تعداد کل گلبول‌های سفید شمارش شده در ۴ مربع بزرگ) ×۵۰

تشخیص تفریقی گلبول‌های سفید: جهت تهیه گسترش خونی یک قطره خون را به‌وسیله لوله هماتوکریت در یک سانتی‌متر گوشه سمت راست لام ریخته و سپس با یک لام دیگر با زاویه ۳۰ تا ۴۵ درجه و با حرکت یکنواخت و ملایم قطره خون را به طرف چپ انتشار داده بدین‌ترتیب گسترش خونی تشکیل می‌گردد. گسترش را به‌مدت ۵ دقیقه در جریان هوا قرار داده تا خشک شد. مرحله بعد، تثبیت با متانول ۹۶ درصد به‌مدت ۳ تا ۵ دقیقه بود. درصد فراوانی هر گروه از گلبول‌های سفید (نوتروفیل، ائوزینوفیل، لنفوسیت و مونوسیت) با دو تکرار برای هر نمونه انجام شد. پس از خشک شدن لام‌ها در جریان هوا، از محلول ۱۰٪ گیمسا جهت رنگ‌آمیزی استفاده کرده و لام‌ها داخل گیمسا (ساخت شرکت Merck آلمان) به‌مدت ۳۰ تا ۳۵ دقیقه قرار گرفت. سپس لام‌ها را با آب مقطر شسته و در برابر جریان هوا قرار داده تا خشک شدند. در نهایت لام‌ها را زیر میکروسکوپ (عدسی ۴۰) گذاشته و به شمارش انواع گلبول‌های سفید نظیر لنفوسیت‌ها، ائوزینوفیل‌ها، نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها به‌روش زیگزاگ با استفاده از دستگاه شمارنده دستی انجام شد (۱۷).

آنالیز لاشه: ۵ قطعه ماهی به‌طور تصادفی از هر مخزن انتخاب و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد برای تعیین ترکیب کل بدن منجمد گردیدند. جهت تعیین مقادیر پروتئین، چربی، رطوبت، خاکستر، ماده خشک از روش (۱۵) استفاده گردید. نمونه‌ها (ماهی کامل) پس از چرخ کردن آماده آنالیز گردیدند. جهت تعیین رطوبت از انکوباتور با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت، خاکستر از آون با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد، چربی از سوکسله و پروتئین از کجلدال FOSS مدل ۲۳۰۰ استفاده به‌عمل آمد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS ۱۹، به‌روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون Tukey، جهت مقایسه میانگین‌ها انجام شد. اختلاف بین میانگین‌ها در تیمارهای مختلف با سطح اطمینان ($P<۰/۰۵$) تعیین گردید.

نتایج

جدول ۳ عملکرد رشد بچه فیل‌ماهیان را نشان می‌دهد. استفاده از سطوح مختلف اسیدفولیک بر ضریب تبدیل خوراک اختلاف معنی‌داری را ایجاد نمود ($P<۰/۰۵$)، به‌طوری‌که بیش‌ترین آن در تیمار شاهد ۱/۶۰ و کم‌ترین آن در تیمار سوم ۱/۳۳ بود. مقادیر نرخ رشد ویژه، بازده خوراک و افزایش وزن در بین تیمارهای آزمایشی اختلاف آماری را نشان داد ($P<۰/۰۵$). کم‌ترین این مقادیر در تیمار شاهد مشاهده گردید. به‌کارگیری سطوح مختلف اسیدفولیک بر مقادیر فاکتور وضعیت گروه‌های آزمایشی اثر معنی‌داری داشت که بیش‌ترین آن در تیمار شاهد با ۰/۶۱ مشاهده گردید. درصد بقا در بین تیمارهای آزمایشی تقریباً مشابه بود (جدول ۳). جدول ۴ شاخص‌های ایمنی خون بچه فیل‌ماهیان را نشان می‌دهد. سطوح مختلف اسیدفولیک بر تعداد گلبول‌های سفید اختلاف معنی‌داری ایجاد نمود به‌طوری‌که کم‌ترین مقدار آن در تیمار شاهد به‌میزان ($۴/۶۲(\times 10^3\,mm^{-3})$) و بیش‌ترین آن به‌میزان ($۶/۷۵(\times 10^3\,mm^{-3})$) در تیمار سوم مشاهده شد. درصد لنفوسیت‌ها در بین گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌دار داشت ($P<۰/۰۵$)؛ به‌طوری که افزایش سطح اسیدفولیک جیره سبب ایجاد روند افزایشی در این شاخص شد. هم‌چنین درصد نوتروفیل تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت که بیش‌ترین آن در تیمار شاهد مشاهده گردید ولی گروه‌های آزمایشی در درصد مونوسیت‌ها اختلاف معنی‌دار ایجاد نکرد ($P>۰/۰۵$).

جدول ۳: عملکرد رشد بچه فیل‌ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف اسیدفولیک به‌مدت ۵۶ روز

شاخص‌های رشد	جیره‌های آزمایشی			
	شاهد	اول	دوم	سوم
(%) FCR	۱/۶۰ ± ۰/۰۶[a]	۱/۵۲ ± ۰/۰۷[ab]	۱/۳۵ ± ۰/۰۲[b]	۱/۳۳ ± ۰/۰۱[b]
(% d−1) SGR	۱/۳۳± ۰/۱۵[b]	۲/۱۲ ± ۰/۰۹[a]	۲/۰۶ ± ۰/۰۸[a]	۲/۱۰ ± ۰/۰۷[a]
(%) FE	۰/۳۷ ± ۰/۰۳[b]	۰/۵۹ ±۰/۰۲[a]	۰/۵۶ ± ۲/۰۲[a]	۰/۵۷ ± ۰/۰۱[a]
(%) WG	۱۱ ± ۱/۴۵[b]	۱۹/۱۷ ± ۱/۵۷[a]	۱۷/۷۱ ± ۱/۹۶[a]	۱۸/۰۴ ± ۱/۶۳[a]
(g cm−3) CF	۰/۶۱ ± ۰/۰۳[a]	۰/۵۱ ± ۰/۰۱[a]	۰/۳۵ ± ۰/۰۴[b]	۰/۳۱ ± ۰/۰۲[b]
درصد بقا (%)	۹۹	۱۰۰	۱۰۰	۹۸

[a]مقادیر به صورت میانگین± انحراف معیار با سه تکرار با ۲۷ ماهی در هر حوضچه. تفاوت‌های معنی‌دار ستون با حروف متفاوت براساس آزمون توکی مشخص شده‌اند (P<۰/۰۵)

جدول۴: شاخص‌های ایمنی خون بچه فیل‌ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف اسیدفولیک به‌مدت ۵۶ روز

شاخص‌های خونی	جیره‌های آزمایشی اسید فولیک (میلی‌گرم/کیلوگرم)				P-value
	شاهد	اول	دوم	سوم	
گلبول سفید ($\times 10^3$ mm−3)	۴/۶۲ ± ۰/۵۰[b]	۶/۵۰ ± ۰/۲۵[a]	۶/۳۹ ± ۰/۲۷[a]	۶/۷۵ ± ۰/۲۲[a]	<۰/۰۰۰۱
لنفوسیت (٪)	۶۷ ± ۱/۲۲[c]	۷۲/۷۵[b] ± ۰/۸۵	۷۵ ± ۰/۴۱[b]	۸۴/۷۵[a] ± ۰/۴۷	<۰/۰۰۰۱
مونوسیت (٪)	۳/۲۵ ± ۰/۲۵[a]	۳ ± ۰/۴۰[a]	۳/۵۰ ± ۰/۲۹[a]	۴ ± ۰/۴۱[a]	۰/۲۶
نوتروفیل (٪)	۲۰ ± ۰/۴۱[a]	۱۹ ± ۰/۴۰[a]	۱۱/۷۵[c] ± ۰/۴۸	۱۴/۵۰[b] ± ۰/۶۴	<۰/۰۰۰۱
مقدار هموگلوبین (g/dL)	۵/۱۷ ± ۰/۰۷[c]	۵/۸۵ ± ۰/۰۶[b]	۵/۲۷ ± ۰/ ۰۹ [c]	۷/۵۰ ± ۰/۰۴[a]	<۰/۰۰۰۱
هماتوکریت (%)	۲۵/۷۵ ± ۰/۶۳[c]	۳۰ ± ۰/۴۱[b]	۲۵/۷۳ ± ۰/۴۸ [c]	۳۸ ± ۰/۴۰[a]	<۰/۰۰۰۱
حجم متوسط گلبول قرمز (fl)	۳۸۴/۵۰± ۱/۱۹[b]	۳۸۲ ± ۱/۰۸[b]	۴۰۶/۷۵ ±۱/۴۸[a]	۴۰۶/۲۵ ±۱/۴۰[a]	<۰/۰۰۰۱
مقدار متوسط وزن هموگلوبین در یک گلبول قرمز (pg)	۷۷/۵۰±۰/۶۴[b]	۷۵/۵۰ ± ۰/۲۹[c]	۸۶ ± ۰/۴۱[a]	۷۹ ± ۰/۴۰[b]	<۰/۰۰۰۱
غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (g/dL)	۲۰/۶۰± ۰/۱۵[b]	۱۹/۷۰ ± ۰/۰۴[c]	۲۱/۲۷ ± ۰/۱۲[a]	۱۹/۷۲ ± ۰/۰۹[c]	<۰/۰۰۰۱

[a]مقادیر به صورت میانگین± انحراف معیار با سه تکرار با ۲۷ ماهی در هر حوضچه. تفاوت‌های معنی‌دار ستون با حروف متفاوت براساس آزمون توکی مشخص شده‌اند (P<۰/۰۵)

جدول ۵ آنالیز لاشه بچه فیل‌ماهیان را پس از خونگیری نشان می‌دهد. همان‌طورکه انتظار می‌رفت افزایش سطح اسیدفولیک جیره سبب افزایش معنی‌دار درصد پروتیین خام در لاشه گردید (P<۰/۰۵). به‌طوری‌که بیش‌ترین مقدار درصد پروتیین خام در تیمار دوم به‌میزان ۲/۱۳ قابل مشاهده است. شاخص‌های رطوبت، چربی و خاکستر لاشه به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند.

جدول ۵: آنالیز لاشه بچه فیل‌ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف اسیدفولیک به‌مدت ۵۶ روز

پارامترهای خونی	جیره‌های آزمایشی اسیدفولیک (میلی‌گرم/کیلوگرم)				P-value
	شاهد	اول	دوم	سوم	
رطوبت (g kg−1 wet weight)	۸۰/۶۵ ± ۰/۰۶	۸۰/۳۵ ± ۰/۰۲	۸۰/۶۰ ± ۰/۰۳	۸۰/۵۰ ± ۰/۰۴	۰/۱
پروتیین خام (g kg−1 wet weight)	۱۱/۴۳ ± ۰/۴۹[b]	۱۳/۰۴[a] ± ۰/۴۰	۱۳/۲۰ ± ۰/۲۰[a]	۱۲/۵۴ ± ۰/۶[ab]	۰/۰۲
چربی (g kg−1 wet weight)	۰/۷۳ ± ۰/۰۱	۰/۷۶ ± ۰/۰۴	۰/۷۴ ± ۰/۰۱	۰/۷۴ ± ۰/۰۲	۰/۳۶
خاکستر (g kg−1 wet weight)	۲/۷۵ ± ۰/۰۶	۲/۶۲ ± ۰/۰۱	۲/۶۳ ± ۰/۰۳	۲/۷۰ ± ۰/۰۴	۰/۱۵

بحث

با توجه به محدودیت اماکن جغرافیایی، پرورش و هزینه‌های بالای تهیه خوراک، جهت بهبود عملکرد ماهیان پرورشی استفاده از ویتامین‌ها بسیار راهگشا می باشند. از جمله مشکلات پرورش ماهیان خاویاری، تکنولوژی فرمولاسیون جیره غذایی می‌باشد، زیرا بیش از ۵۰ درصد هزینه‌های پرورش به غذا اختصاص دارد (۱۸). با توجه به سازگاری کم ماهیان خاویاری به غذای دستی، تهیه غذای مناسب، باعث‌صرفه اقتصادی در امر پرورش، بهبود شاخص‌های رشد و کاهش آلودگی(۱۹)و بقای ماهیان خاویاری(۲۰)می‌شود.مطالعه‌حاضر نشان

داد که عملکرد رشد بچه فیل‌ماهیان انگشت‌قد به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر غلظت اسیدفولیک در جیره غذایی می‌باشد، بالاترین میزان نرخ رشدویژه و افزایش‌وزن در ماهیان تغذیه شده با اسیدفولیک به‌میزان ۲/۷۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم جیره بوده است (P<۰/۰۵). علاوه بر این یافته‌های موجود نشان می‌دهد که ضریب تبدیل غذایی روندی مخالف و متضاد از نرخ رشد ویژه برخوردار است، یافته‌های این پژوهش در مطالعات صورت گرفته در سیم پوزه باریک (۲۱) و هامور (۹) و تاس ماهی سیبری (۱۰) دیده شده است. کمبود اسیدفولیک در موجودات با کم‌خونی مگالوبلاستیک و بی‌اشتهایی نمود پیدا کرده که منجر به کاهش رشد می‌گردد (۲۲). اسیدفولیک می‌تواند در بیوسنتز پورین و پیرمیدین که در تشکیل و بلوغ گلبول‌های قرمز تازه شکل یافته و بالغ همراهی کرده و شرکت کند (۲۳). Jamalzad Falah و همکاران بیان کردند که با مصرف اسیدفولیک مکمل در رژیم غذایی، تعداد گلبول‌های قرمز به‌میزان قابل توجهی افزایش یافته (۱۰)، بدین معنی که اسیدفولیک نقش مهمی در فرآیند تولید گلبول‌های قرمز خون در تاس‌ماهیان سیبری ایفا می‌کند (۲۴). Yan و همکاران احتیاجات غذایی مایوزیتول را در تاس‌ماهی هیبرید (*Acipenser baerii* ♀ × A. *schrenckii* ♂) بررسی نمودند و نتایج نشان داد که با افزایش میزان مایوزیتول مقدار وزن (WG) نیز افزایش معنی‌داری داشت (۲۵) هرچند با افزایش بیش از حد مایوزیتول شاهد افزایش وزن معنی‌دار نبودیم. شاخص رشد ویژه نیز نتایج مشابهی را نشان داد. ضریب تبدیل غذایی، نرخ بازماندگی، شاخص‌های هماتوسوماتیک، ضریب چاقی اختلاف معنی‌داری را با افزایش میزان مایوزیتول نشان نداد. هم‌چنین مقادیر مایوزیتول اثری بر خاکستر، کل بدن، پروتیین خام عضله نشان نداد و این درحالی بود که مقادیر مایوزیتول بر روی عضله، چربی کل بدن و رطوبت تاثیر معنی‌دار گذاشته بود. اگرچه ضروری بودن نیازمندی به ویتامین‌های گوناگون B در گونه‌های مختلف پرورشی مشخص شده است، اما کماکان کمبود اطلاعات در مورد گونه‌های مختلف ماهیان خاویاری وجود دارد. براساس نتایج این تحقیق، استفاده از سطوح مختلف اسیدفولیک برضریب تبدیل خوراک اختلاف معنی داری را ایجاد نمود، به‌طوری‌که بیش‌ترین آن در تیمار شاهد ۱/۶۰ و کم‌ترین آن در تیمار سوم ۱/۳۳ بود. مقادیر نرخ رشد ویژه، بازده خوراک و افزایش وزن در بین تیمارهای آزمایشی اختلاف آماری را نشان داد. کم‌ترین این مقادیر در تیمار شاهد مشاهده گردید. به‌کارگیری سطوح مختلف اسیدفولیک بر مقادیر فاکتور وضعیت گروه‌های آزمایشی اثر معنی‌داری داشت که بیش‌ترین آن در تیمار شاهد با ۰/۶۱ مشاهده گردید که این مقدار بیش‌تر از حداقل میزان گزارش شده است، نتایج Cowey و Woodward برای قزل‌آلای رنگین‌کمان جوان ۰/۴-۰/۳ میلی‌گرم/کیلوگرم (۲۶)، Shiau و Huang برای هیبرید تیلاپیای جوان (*Oreochromis niloticus*) ۰/۸ میلی‌گرم/کیلوگرم (۲۷)، Lin و همکاران برای ماهی هامور جوان (*Epinephelus coioides*) ۰/۸ میلی‌گرم/کیلوگرم (۹) Sesay و همکاران برای بچه‌ماهیان انگشت‌قد سیم پوزه باریک (*Blicca bjoerkna*) ۰/۶۸ میلی‌گرم/کیلوگرم (۲۱) بود. اما مشابه موارد گزارش شده برای سایر گونه‌های آبزی مانند نتایج نادری و همکاران برای بچه تاس‌ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) ۵/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم (۱۲)، Esmaeili و Khara برای قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) ۲/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم (۲۸) و دلسوزخاکی و همکاران برای بچه تاس‌ماهی شیپ ۴ میلی‌گرم/کیلوگرم (۱۱) می‌باشد. در بسیاری از موارد دلیل اصلی این اختلاف در گونه‌های متعدد مشخص نشده است، اما این نکته در تحقیقات اخیر به‌اثبات رسیده است که میکروبیوتای روده ممکن است در بیوسنتز دنوو اسیدفولیک از گوانوزین تری‌فسفات در دستگاه گوارش میزبان به دی هیدروفولات نقش داشته باشد (۲۹). از این‌رو مقدار بیش‌تر نیازمندی اسیدفولیک در فیل‌ماهی ممکن است به جوامع میکروبی دستگاه گوارش در گونه‌های مختلف و به‌ویژه در ماهیان غضروفی و استخوانی (تاس‌ماهیان) مربوط باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که سطوح مختلف اسیدفولیک بر تعداد گلبول‌های سفید اختلاف معنی داری ایجاد نمود به‌طوری‌که کم‌ترین مقدار آن در تیمار شاهد و بیش‌ترین آن به در تیمار چهارم مشاهده شد. تعداد لنفوسیت‌ها در بین گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌دار داشت، به‌طوری‌که افزایش سطح اسیدفولیک جیره سبب ایجاد روند افزایشی در این شاخص شد. هم‌چنین تعداد نوتروفیل تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت که بیش‌ترین آن در تیمار شاهد مشاهده گردید ولی گروه‌های آزمایشی در تعداد مونوسیت‌ها اختلاف معنی‌دار ایجاد نکرد. نادری و همکاران، با بررسی تاثیر متقابل ویتامین C و اسیدفولیک بر فاکتورهای رشد بچه‌ماهی شیپ نشان دادند که مناسب‌ترین سطح پیشنهادی اسیدفولیک در محدوده وزنی و دمایی مورد آزمایش ۵/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین است (۳۰). نادری و همکاران بیان نمودند که افزایش سطح اسیدفولیک و سطح ثابت ویتامین C در جیره غذایی بر روی شاخص‌های خونی بدن ماهیان شیپ پرورشی تاثیرگذار بوده است (۱۲). نادری و همکاران ثابت کردند که مقادیر اسیدفولیک و ویتامین C بر فراسنجه‌های رشد بچه‌ماهیان شیپ تاثیرگذار است (۳۰) که با اطلاعات به‌دست آمده در این تحقیق نیز مشابهت دارد. مطالعات Jamalzad Falah و همکاران نشان داد که میزان اسیدفولیک ماهیچه و کبد جیره در مقادیر برابر یا بیش‌تر از ۳/۵۹ و ۴/۸۲ میلی‌گرم/کیلوگرم اسید فولیک به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است (۱۰). مقدار گلبول‌های قرمز و گلبول‌های سفید، هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد لنفوسیت‌ها همگی و تفاوت معنی‌دار آماری را با سطح اسید

فولیک رژیم غذایی وجود دارد، درصورتی‌که مقدار نوتروفیل‌ها به‌طور قابل توجهی با افزایش میزان اسیدفولیک جیره کاهش یافته‌است، نتایج این پژوهش با یافته‌های این تحقیق هم‌خوانی دارد. علی‌رغم ناکافی بودن منابع، ارزیابی اسیدفولیک مکمل در تجزیه و تحلیل خونی ماهیان پرورشی، به‌طورکلی پذیرفته شده است که اسیدفولیک برای سنتز DNA و RNA ضروری بوده و برای ساخت سلول‌های جدید مورد نیاز است (۳۱). در مطالعه حاضر، بچه فیل‌ماهیان تغذیه شده با رژیم غذایی حاوی اسیدفولیک، به‌طور معنی‌داری مقادیر گلبول‌های سفید بالاتری در مقایسه در مقایسه با رژیم پایه داشتند، که توانایی بالاتر آن‌ها را در برابر فشارهای اکسیداتیو و پاسخ‌های التهابی که معمولاً در سیستم‌های متراکم آبزی‌پروری رخ می‌دهد را نشان می‌دهد. با این‌حال Barros و همکاران، تفاوت معنی‌داری در مقادیر گلبول‌های سفید در تیلاپیاهای نیل انگشت‌قد تغذیه شده با جیره حاوی سطوح بالاتر اسیدفولیک مکمل را گزارش نکردند (۲۳)، این تناقض در یافته‌ها ممکن است ناشی از توانایی متفاوت فلور باکتریایی ماهیان در سنتز اسیدفولیک در حدی باشد که نیازمندی‌های فیزئولوژیک را برآورده سازد. پژوهش حاضر نشان داد که اسیدفولیک می‌تواند به‌طور معنی داری برعملکرد رشد، ترکیبات لاشه و پارامترهای خون‌شناسی را در بچه فیل‌ماهیان انگشت‌قد بهبود بخشد، هم‌چنین افزایش میزان اسید فولیک به‌میزان ۳/۷۲ میلی‌گرم در کیلوگرم در جیره، ماهی‌ها مقاومت بهتری از نظر ایمنی و عملکرد رشد از خود نشان دادند، پیشنهاد می‌شود که ویتامین اسیدفولیک در دوزهای بالاتر، در مراحل و سنین مختلف رشد، بر روی مولدین (رشد، کیفیت و کمیت تخمک و اسپرم و هم‌آوری) در فیل‌ماهی مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از پژوهشگر گرامی شهریار تقی‌پورکوه‌بنه جهت پیشبرد اهداف علمی این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را دارد.

منابع

1. **Kenari, A.A., Regenstein, J.M., Hosseini, S.V., Rezaei, M., Tahergorabi, R., Nazari, R.M. and Kaboli, S.A., 2009**. Amino acid and fatty acid composition of cultured Beluga (*Huso huso*) of different ages. Journal of Aquatic Food Product Technology. 18(3): 245-265.
2. **Mohseni, M., Ozorio, R., Pourkazemi, M. and Bai, S., 2008.** Effect of dietary L-Carnitine supplements on growth and body composition in Beluga sturgeon (*Huso huso*) juveniles. Journal of applied ichthyology. 24(6): 646-649.
3. **Mohammadnejad Shamushki, M. and Mazini, M., 2012.** The effect of probiotic baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on the growth and survival of sea bream (*Rutilus rutilus caspicus*). Journal of Aquaculture Development. 6(1): 103-111. (In Persian)
4. **Oliva-Teles, A., 2012.** Nutrition and health of aquaculture fish. Journal of fish diseases. 35(2): 83-108.
5. **Shahkar, A., Khara, H. and Sudagar, M., 2017.** The effect of feeding frequency on the growth rate and survival rate of *Rutilus frisii kutum* larvae. Journal of Biological Sciences. Lahijan branch. 2(3): 41-49. (In Persian)
6. **Galkanda-Arachchige, H.S., Wilson, A.E. and Davis, D.A., 2020.** Success of fishmeal replacement through poultry by-product meal in aquaculture feed formulations: a meta-analysis. Reviews in Aquaculture. 12(3): 1624-1636.
7. **Safari, R., Khani, F. and Haghipoor, M., 2016.** Comparison of some plasma and serum Biochemical parameters in Great sturgeon (*Huso huso*), Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*). Journal of Animal Environmental. 7(4): 193-200. (In Persian)
8. **Jedi Mostafalou, A., Hedayati Fard, M., Keshavarz Divkolaie, M. and Mohamadyan, T., 2021.** 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*). Journal of Animal Environmental. 13(1): 247-258. (In Persian)
9. **Lin, Y.H., Lin, H.Y. and Shiau, S.Y., 2011.** Dietary folic acid requirment of grouper, *Epinephelus malabaricus*, and its effects on non-specific immune responses. Aquaculture. 317: 133-137.
10. **Jamalzad Falah, F., Rajabi Islami, H. and Shamsaie Mehrgan, M., 2020.** Dietary folic acid improved growth performance, immuno-physiological response and antioxidant status of fingerling Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* (Brandt 1896). Aquaculture Rep. 17:100391. 10.1016/j.aqrep.2020.100391.
11. **Delsoz Khaki, N., Khara, H., Mohseni, M. and Shenavar Masoleh, A., 2013.** Effects of *Bactocell* Probiotic (*Pediococcus acidilactici*) and Folic Acidon Immune System on Ship Sturgeon Fingerling. Journal of Animal Physiology and Development. 6(4): 1-13. (In Persian)
12. **Naderi, M., Khara, H. and Yazdani Sadati, M., 2016.** Effects Dietary Vitamin C and Folic Acid on Growth Performance, Hematological and Immunological Parameters of Juvenile Barbel Sturgeon *Acipenser nudiventris*. Journal of Animal Physiology and Development. 10(1): 67-77. (In Persian)
13. **Falahatkar, B., Akhavan, S.R., Poursaeid, S. and Hasirbaf, E., 2014.** Use of sex steroid profiles and hematological indices to identify perinucleolus and migratory gonadal stages of captive Siberian sturgeon *Acipenser baerii* (Brandt, 1869) females. Journal of applied Ichthyology. 30(6): 1578-1584.
14. **Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S.J., Baker, R.T., Bøgwald, J. and Ringø, E., 2010.** The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. Aquaculture. 302(1): 1-18.
15. **AOAC. 2000.** Official methods of analysis of official Analytical chemists.
16. **Rad, A.E., Alishahi, M., Ghorbanpour, M. and Zarei, M., 2014.** The effects of oral administration of extracted chitosan from white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on hematological and growth indices in common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Veterinary Research. 69: 4.
17. **Kazemi, R., Pour Dehghani, M., Yousefi Jourdehi, A., Yarmohammadi, M. and Nasri Tejan, M., 2018.** Physiology of the circulatory system of aquatic animals and

applied techniques of fish hematology. Bazargan Publications. 194 p. (In Persian)

18. **Falahatkar, b., 2013.** Aquatic nutrition and ration writing. Publications of the Institute of Applied Scientific Higher Education, Jihad Agriculture, Tehran. 334 p. (In Persian)
19. **Bronzi, P., Rosenthal, H., Arati, G. and Williot, P., 1999**. A brief overview on the status and prospects of sturgeon farming in western and central Europe. J. Appl. Ichthyol. 15: 224-227.
20. **Yasemi, M., Poursaeid, S., Shakoorian, M. and Falahatkar, B., 2011.** Rearing of great sturgeon, *Huso huso*, at early stage of growth in earthen ponds. Journal of Applied Ichthyology. 27(2): 576-580.
21. **Sesay, D.F., Tsion, H.M., Zhou, Q., Ren, M., Xie, J., Liu, B., Chen, C. and Pan, L., 2016.** Effects of dietary folic acid on the growth, digestive enzyme activity, and immune response and antioxidant enzyme activity of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fingerling. Aquaculture. 452: 142-150.
22. **NRC. 2011.** National Research Council. Nutrient requirements of fish and shrimp. Washington, DC.
23. **Barros, M.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Pezzato, L.E., Falcon, D.R. and Guimaraes, I.G., 2009.** Haematological response and growth performance of Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) fed diet containing Folic Acid. Aquaculture research. 40(8): 859-903.
24. **Seunghyung, L., Ozan, S., Silas, S.O., James, H. and Fadel, G., 2017.** Development of growth rate, body lipid, moisture, and energy models for white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) fed at various feeding rates. Animal Nutrition Market. 3(1): 46-60.
25. **Yan, L., Jinping, W., Xihua, Ch., Zhipeng, Ch. and Jiali, J., 2020.** Dietary myo-inositol requirements of juvenile hybrid sturgeon (*Acipenser baerii* ♀ × *A. schrenckii* ♂). Aquaculture research. 51(3): 1143-1150.
26. **Cowey, C.B. and Woodward, B., 1993.** The dietary requirement of young rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) for folic acid. Journal of nutrition. 123(9): 1594-1600.
27. **Shiau, S.Y. and Huang, S.Y., 2011.** Dietary folic acid requirement for maximal growth of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus×O. aureus*. Fisheries Science. 67: 655-659.
28. **Esmaeili, B. and Khara, H., 2014.** Growth performance, hematology and immunological parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed with diets containing different levels of vitamin E and folic acid. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 13(4): 931-943.
29. **Maynard, C., Cummins, I., Green, J. and Weinkove, D., 2018.** A bacterial route for folic acidsupplementation. BMC Biology. 16(1): 1-10.
30. **Naderi, M., Nezami, Sh., Yazdani sadati, M.A., and Khara, H., 2013.** Interaction effect of Vitamin C and Folic Acid on growth factor in Ship (*Acipenser nudiventris*) Fingerlings, Aquatic animals &Fisheries magazine. 4(15): 54-57. (In Persian)
31. **Scully, C., 2014.** 8 - haematology. In: Scully, C. (Ed.), Scully's Medical Problems in Dentistry, seventh edition. Churchill Livingstone, Oxford. 212-275.