



Original Research Paper

The synergistic effect of organic acid and *Lactobacillus plantarum* probiotic on intestinal microbial flora and morphometric indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with plant diets

Behrooz Atashbar Kangarloei ^{1*}, Reza Jalili ², Maryam Roohi ¹

¹Department of Ecology and Aquatic Stocks Management, Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran

²National Artemia Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agriculture Research Education and Organization, Urmia, Iran

Key Words

Plant sources
Organic acids
probiotics
intestinal microflora
Rainbow trout

Abstract

Introduction: To reduce food costs and the dependence of the aquaculture industry on the fish meal and fish oil, it is necessary to use other sources of protein and fat in the diet of aquatic animals. In this regard, plant protein sources can relatively or completely replace fish powder and oil in the diet of farmed aquatic animals. The digestive system contains a variety of microflora that play an essential role in the correctness of the actions and defence mechanism of the intestine. This study investigated the synergistic effects of organic acids and probiotic *Lactobacillus plantarum* in feeding with plant diet on the intestinal microbial flora and rainbow trout morphometry.

Materials & methods: 540 rainbow trout with an average weight of 15 ± 2 g was cultured for 12 weeks. Plant protein and fat sources were used to prepare diets along with different levels of combined organic acids (acetic acid 400 mg, lactic acid 90 mg and citric acid 10 mg per litre product of Acesol plus[®] company) and different levels of *Lactobacillus plantarum* probiotic.

Results: The results of the present study showed that adding 1 and 2% organic acid to plant diets significantly reduces the number of total bacteria, intestinal lactic acid bacteria, the length of villi and the number of goblet cells in the intestine of fishes.

In the case of simultaneous use of probiotic and organic acid, the number of total bacteria and lactic acid bacteria in the intestine increased significantly. Still, the indices of villus length and the number of goblet cells in the intestine of fish showed a significant decrease ($P < 0.05$). Also, the total number of bacteria, lactic acid bacteria, and the thickness of the intestinal muscle layer of colored trout increased significantly ($P < 0.05$) with the addition of *Lactobacillus plantarum* probiotic to plant diets.

Conclusion: The results of the present study indicate the negative effects of the use of organic acids on intestinal morphometric indices and the positive effects of the use of probiotic *Lactobacillus plantarum* along with 2% organic acid on the indices of the intestinal microbial flora of rainbow trout are fed with plant diets.

* Corresponding Author's email: b.atashbar@urmia.ac.ir

Received: 4 November 2024; Reviewed: 4 December 2024; Revised: 3 February 2025; Accepted: 6 March 2025

(DOI): [10.22034/AEJ.2024.442174.3100](https://doi.org/10.22034/AEJ.2024.442174.3100)

مقاله پژوهشی

اثر هم افزایی اسید آلی ترکیبی و پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* بر شاخص های فلور میکروبی و مورفومتری روده ماهیان قزل آلاي رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با جیره های گیاهی

بهروز آتشبارکنگرلویی^{*}، رضا جلیلی^۱، مریم روحی^۲

^۱ گروه اکولوژی و مدیریت ذخایر آبی، پژوهشکده آرتمیا و آبزی پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

^۲ مرکز تحقیقات آرتمیای کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران

چکیده

کلمات کلیدی

منابع گیاهی

اسید آلی

پروبیوتیک

مورفومتری روده

ماهی قزل آلاي رنگین کمان

مقدمه: در راستای کاهش هزینه های غذا و وابستگی صنعت آبزی پروری به پودر ماهی و روغن ماهی استفاده از سایر منابع پروتئینی و چربی در جیره غذایی آبزیان ضروری می نماید. در همین راستا منابع پروتئین گیاهی می توانند به صورت نسبی یا به طور کامل جایگزین پودر و روغن ماهی در جیره غذایی آبزیان پرورشی گردند. دستگاه گوارش، تنوعی از میکروفلور را در خود جای می دهد که نقش تعیین کننده ای در صحت اعمال و سازوکار دفاعی روده ایفا می کنند. در این مطالعه اثرات هم افزایی اسیدهای آلی و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*Lactobacillus plantarum*) در تغذیه با جیره های گیاهی بر فلور میکروبی و مورفومتری روده ماهی قزل آلاي رنگین کمان بررسی شد.

مواد و روش ها: تعداد ۵۴۰ قطعه ماهی قزل آلاي رنگین کمان با میانگین وزنی 15 ± 2 گرم به مدت ۱۲ هفته پرورش داده شدند. در تهیه جیره ها از منابع پروتئین و چربی گیاهی به همراه سطوح مختلف اسیدهای آلی ترکیبی (استیک اسید ۴۰۰ mg، لاکتیک اسید ۹۰ mg و اسیدسیتریک ۱۰ mg در ۱ لیتر) محصول شرکت Acesol plus[®] و سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم استفاده گردید. **نتایج:** نتایج مطالعه حاضر نشان داد افزودن ۱ و ۲ درصد اسید آلی به جیره های گیاهی سبب کاهش معنی دار تعداد کل باکتری ها، باکتری های اسیدلاکتیکی روده، طول پرزها و تعداد سلول های جامی روده ماهیان می گردد. در صورت استفاده هم زمان از پروبیوتیک و اسید آلی تعداد کل باکتری ها و باکتری های اسیدلاکتیکی روده به طور معنی داری افزایش یافت ولی شاخص های طول پرز و تعداد سلول های جامی روده ماهیان کاهش معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$). هم چنین تعداد کل باکتری، باکتری های اسید لاکتیکی و نیز ضخامت لایه عضلانی روده ماهیان قزل آلاي رنگین کمان با افزودن پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم به جیره های گیاهی بطور معنی داری افزایش یافت ($P < 0.05$).

بحث و نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر حاکی از اثرات منفی استفاده از اسیدهای آلی بر شاخص های مورفومتری روده و اثرات مثبت استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم به همراه ۲ درصد اسید آلی بر شاخص های فلور میکروبی روده ماهیان قزل آلاي رنگین کمان تغذیه شده با جیره های گیاهی می باشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: b.atashbar@urmia.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴ آبان ۱۴۰۳؛ تاریخ داوری: ۱۴ آذر ۱۴۰۳؛ تاریخ اصلاح: ۱۵ بهمن ۱۴۰۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۶ اسفند ۱۴۰۳

(DOI): 10.22034/AEJ.2024.442174.3100

مقدمه

صید و آبی پروری در قرن بیست و یکم نقش فزاینده‌ای در تامین امنیت غذایی جهان پیدا کرده است. افزایش این سهم در گرو تغییرات و دگرگونی در سیاست‌ها، مدیریت، نوآوری و سرمایه‌گذاری بیش‌تر برای دستیابی به پایداری عادلانه صید و آبی‌پروری در جهان است. مصرف ظاهری آبزیان در سطح جهان به‌طور متوسط سالیانه با ۳٪ رشد از سال ۱۹۶۱ تا ۲۰۱۹ همراه بوده است در همین راستا نرخ رشد سالانه جمعیت جهان ۱/۶ درصد در مدت مشابه را نشان می‌دهد (۱۰). لذا با توجه به کاهش نسبی صید از منابع دریایی، توسعه آبی‌پروری به یک اولویت اصلی در صنعت شیلات تبدیل شده است (۱۵). در این میان هر ماده‌ای با منشا حیوانی و یا گیاهی که بتواند پروتئین مورد نیاز آبزیان پرورشی را برآورده کند، می‌تواند جایگزین پودر ماهی شود. منابع پروتئین گیاهی می‌توانند به‌صورت نسبی یا کامل جایگزین پودر ماهی در جیره غذایی آبزیان پرورشی شوند، به شرطی که پروفایل اسیدهای آمینه آبی‌پروری مورد نظر را تامین کنند و سبب کاهش طعم و خوش خوراکی غذا نشوند. با وجود میزان نسبتاً بالای پروتئین در منابع پروتئینی گیاهی، مشکلاتی نظیر وجود مواد ضدتغذیه‌ای و هضم‌پذیری پایین را در مقایسه با پودر ماهی دارند (۱۴، ۳۲). اسید فایبیک، ساپونین و آنتی‌ژن‌ها از مهم‌ترین ترکیبات ضد تغذیه‌ای منابع گیاهی به‌شمار می‌روند که باعث ایجاد تغییرات بافتی و ریخت‌شناسی روده ماهیان مانند افزایش طول روده، کوتاه شدن پرزها و ریزپرزها در روده ماهیان می‌شوند (۱۴). هم‌چنین استفاده از پروتئین‌های گیاهی باعث کاهش سلول‌های اپیتلیال روده و کوتاه شدن پرزهای آن می‌شود و مکان اتصال باکتری‌ها به روده را کاهش می‌دهد. این امر در طولانی مدت منجر به کاهش بار باکتریایی روده می‌شود. دستگاه گوارش، گسترده‌وسیع و متنوعی از انواع میکروفلور را در خود جای می‌دهد که نقش تعیین‌کننده‌ای در صحت اعمال و مکانیسم دفاعی روده ایفا می‌کنند (۱۱، ۱۶). نتایج مطالعات پیشین نشان داده است که استفاده از سطوح بالای منابع مختلف پروتئین گیاهی علاوه بر تأثیر منفی بر رشد ماهیان، بر روی میکروفلور طبیعی روده تأثیر گذاشته و سبب کاهش بار باکتریایی روده ماهیان می‌گردد (۲۲، ۹). این امر می‌تواند باعث کاهش رشد و هم‌چنین احتمال ابتلا به عوامل بیماری‌زا در ماهیان را به سبب کاهش فلور میکروبی روده و به‌وجود آمدن شرایط استرس‌زا افزایش دهد (۱۲). در این خصوص استفاده‌ها چه بیش‌تر از داروهای ضد میکروبی (آنتی‌بیوتیک‌ها) مشکلاتی عمده‌ای ازجمله، مقاوم شدن عوامل بیماری‌زا (۷)، تغییر فلور میکروبی روده (که در سلامت میزبان نقش بالقوه‌ای دارند) به سمت یک فلور نامتعادل، آلودگی‌های زیست‌محیطی و افزایش هزینه‌های جاری تولید ماهی را

به‌همراه داشته است (۱۲). در همین راستا مطالعات درخصوص یافتن جایگزین‌های مناسب برای داروهای آنتی‌بیوتیکی در جیره‌های غذایی گیاهی بیش‌تر مورد توجه قرار گرفته است (۵). افزودنی‌های غذایی که باعث کاهش یا محدود شدن بار باکتری‌های بیماری‌زای روده و افزایش باکتری‌های مفید روده و بهبود عملکرد سیستم گوارش می‌گردند، به‌طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته‌اند. پروبیوتیک‌ها و اسیدهای آلی به‌علت جلوگیری از اسیدی شدن معده و مهار فعالیت باکتری‌های بیماری‌زا در دستگاه گوارش حیوانات، جایگزین بالقوه آنتی‌بیوتیک‌ها در جیره غذایی هستند (۳۱، ۲۸). استفاده از پروبیوتیک‌ها یک راهکار موثر است که می‌توانند از طریق سازوکارهایی نظیر بهبود تعادل میکروبی روده و دفاع طبیعی، علاوه بر افزایش تعداد باکتری‌های مفید در روده به غلبه بر باکتری‌های بیماری‌زا کمک کنند (۲۰، ۲۴). با اضافه کردن ریزمغذی‌های اسیدی به غذای ماهی جمعیت میکروبی روده به تعادل می‌رسد و باعث بهینه شدن pH سیستم گوارش می‌شود. این pH مناسب باعث از بین رفتن میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در دستگاه گوارش می‌شود و در صورت استفاده هم‌زمان از پروبیوتیک‌ها می‌تواند سبب افزایش باکتری‌های مفید و مقاوم در شرایط اسیدی مثل لاکتوباسیلوس‌ها گردد که با کمک به هضم غذا می‌توانند سبب جذب بهتر مواد غذایی گردند (۲، ۸). با توجه به نتایج مطالعات پیشین در خصوص آثار منفی استفاده از منابع گیاهی در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بر فلور میکروبی روده و شاخص‌های مورفومتری روده ماهیان، مطالعه حاضر با هدف کاهش اثرات منفی جیره مبتنی بر پروتئین گیاهی بر شاخص‌های مورفولوژی روده و بهبود میکروفلور روده و عملکرد جیره‌های گیاهی در تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* و ترکیب اسیدهای آلی انجام گردید.

مواد و روش‌ها

تعداد ۵۴۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی 15 ± 2 گرم پس از گذراندن یک هفته دوره سازگاری ابتدا با محلول ۴ درصد نمک ضدعفونی و پس از رقم‌بندی، به‌طور تصادفی در ۱۸ مخزن فایبرگلاس با حجم آبگیری ۲۵۰ لیتر با تراکم ۳۰ ماهی در هر تانک ذخیره‌سازی شدند. منابع پروتئین گیاهی جیره‌های آزمایشی با منبع اصلی گلوتن گندم به‌همراه گلوتن ذرت و کنجاله سویا بود که در به‌طور کامل جایگزین پودر ماهی شدند. روغن گیاهی مورد استفاده در این مطالعه نیز ترکیبی از روغن‌های گیاهی کلزا، بذر کتان و آفتابگردان بود که به‌طور کامل جایگزین روغن ماهی جیره شدند. بنابراین در تهیه جیره‌ها از منابع پروتئین و چربی گیاهی استفاده گردید (جدول ۱).

جدول ۱: ترکیب اجزای غذایی گروه‌های آزمایشی (درصد از کل

غذا)	
درصد	اجزاء غذایی
۱۰	گلوتن ذرت
۲۵	گلوتن گندم
۱۳	مخمر
۲	پودر خون
۱۲/۵	روغن گیاهی ^۱
۲۰	کنجاله سویا
۵	سبوس گندم
۲	لسیتین
۰/۵	کولین
۳	مکمل ویتامینی و معدنی ^۲
۱	بتائین
۱	ال - میتیونین
۱/۵	ال - لیزین
۳/۵	دی کلسیم فسفات

^۱ روغن گیاهی ترکیبی از روغن‌های بذر کتان (۳۰٪)، روغن آفتابگردان (۳۰٪) و روغن کانولا (۴۰٪) می‌باشد. ^۲ ترکیب مکمل ویتامینی و معدنی: ویتامین D3 ۴۰۰۰۰، فولیک اسید ۲۰۰۰، ویتامین B2 ۸۰۰۰، ویتامین c ۶۰۰۰، ویتامین A ۱۶۰۰۰۰، بیوتین ۱ mg، پیریدوکسین ۴۰۰۰، کولین کلراید ۱۲۰۰۰، ویتامین K3 ۲۰۰۰، ریبولوین ۸۰۰۰، نیاسین ۴۰۰۰، اینوزیتول ۲۰۰۰۰، ویتامین E ۴۰۰۰۰ و ویتامین B12 ۸۰۰۰ (۱ mg یا ۱ IU / kg غذا). سلنیوم ۲، منگنز ۱۵/۸، آهن ۲۶، روی ۱۲/۵، کبالت ۰/۴۸، مس ۴/۲ و ید ۱ (گرم/کیلوگرم غذا).

پس از انجام تجزیه تقریبی اجزای غذایی و تنظیم ترکیب جیره با کمک برنامه جیره نویسی WUFFDA اجزای غذایی با هم ترکیب و به کمک چرخ گوشت اقدام به ساخت پلت شد (۱۳). سپس پلت‌ها به مدت ۱۲-۶ ساعت در دمای ۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور خشک شدند. نگهداری غذاهای خشک شده در طول دوره آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (در یخچال) انجام شد. میزان چربی، پروتئین و انرژی جیره‌های آزمایشی یکسان و میزان غذادهی براساس درصد وزن بدن طبق جداول استاندارد و در ۲-۳ نوبت انجام گردید. در این مطالعه تاثیر نسبت‌های مختلف اسیدهای آلی ترکیبی (صفر، ۱ و ۲ درصد) به همراه ۲ سطح از پروبیوتیک (صفر و 5×10^7 CFU/g) در قالب طرح فاکتوریل به صورت 2×3 در ۶ گروه آزمایشی به مدت ۱۲ هفته مورد بررسی قرار گرفت. اسیدآلی ترکیبی مورد استفاده در این مطالعه با نام تجاری Acesol plus® (محصول شرکت Chemifarma، ایتالیا) با ترکیب ۴۰ گرم استیک اسید، ۹۰ گرم لاکتیک اسید و ۱۰ گرم اسیدسیتریک در یک لیتر بود. پروبیوتیک مورد استفاده در این تحقیق پروبیوتیک (PTCC 1058) *Lactobacillus plantarum*، یک سویه بومی، از خانواده لاکتوباسیلوس‌ها

(گرم مثبت) بود که پس از جدا سازی از روده ماهیان و گذشتن از مراحل مختلف آزمایشگاهی به صورت لیوفیلیزه تهیه گردید (۲۶). گروه‌های آزمایشی در مطالعه حاضر به شرح زیر بود: گروه آزمایشی ۱: جیره گیاهی؛ گروه آزمایشی ۲: جیره گیاهی + ۱٪ اسید آلی ترکیبی؛ گروه آزمایشی ۳: جیره گیاهی + ۲٪ اسیدآلی ترکیبی، گروه آزمایشی ۴: جیره گیاهی + 5×10^7 CFU/g پروبیوتیک *L. plantarum*؛ گروه آزمایشی ۵: جیره گیاهی + ۱٪ اسیدآلی ترکیبی + 5×10^7 CFU/g پروبیوتیک *L. plantarum*؛ گروه آزمایشی ۶: جیره گیاهی + ۲٪ اسید آلی ترکیبی + 5×10^7 CFU/g پروبیوتیک *L. plantarum*. جهت کشت پروبیوتیک از محیط کشت مایع MRS Broth استفاده گردید. پس از تلقیح باکتری‌ها و انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، سوسپانسیون باکتریایی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۶۰۰ نانومتر و با کمک لوله‌های آماده‌ی مک فارلن (McFARLAND STANDARD) با غلظت 5×10^7 CFU/g تنظیم و جهت انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفت (۲۶).

به منظور بررسی قابلیت تشکیل کلنی و تثبیت باکتری‌های اسیدلاکتیک در روده بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی در انتهای دوره نمونه برداری انجام گردید. در شرایط استریل پس از شکافتن ناحیه شکمی و جداسازی روده ماهیان، اقدام به تهیه هموژن با کمک هاون چینی استریل و با استفاده از محلول نمکی (۰/۸۷ w/v درصد) رقت‌های مختلف در دامنه 10^{-1} تا 10^{-8} تهیه گردید. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت‌های مورد نظر به پلیت‌های حاوی محیط کشت TSA جهت شمارش تعداد کل باکتری‌ها و محیط کشت ام-آر-اس (MRS: De Man, Rogosa and Sharpe) جهت شمارش باکتری‌های اسیدلاکتیک اضافه گردید (۱۶). (۱۷). انکوباسیون پلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در دمای اتاق و در شرایط هوازی انجام و شمارش تعداد باکتری‌ها در هر یک از نمونه‌ها براساس لگاریتم واحد کلنی (Colony-Forming Unite) Log CFU (تعداد کلنی×عکس ضریب رقیق‌سازی) انجام گردید (۲۵). به منظور بررسی تغییرات مورفولوژیکی روده باریک ماهیان در انتهای دوره پرورش ۶ عدد ماهی از هر تیمار به صورت تصادفی انتخاب و از بافت روده باریک و از محل یکسانی نمونه برداری انجام شد. فیکس کردن نمونه‌ها در محلول ۱۰ درصد فرمالین و سپس محلول اتانول ۷۰ درصد انجام شد. برش عرضی (۷-۵ میکرون) با استفاده از میکروتوم تهیه و رنگ آمیزی نمونه‌ها با هماتوکسیلین-انوزین انجام شد. مورفومتری شاخص‌های طول (ارتفاع) پرز، ضخامت لایه عضلانی و تعداد سلول‌های جامی، پس از تهیه تصاویر طبق روش‌های استاندارد صورت گرفت (۴). تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از روش آنالیز واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA) در محیط نرم افزار

SPSS (نسخه ۲۰) انجام گردید. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون مقایسه‌ای توکی در سطح ۹۵ ($P < 0/05$) درصد انجام و نتایج نهایی به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد گزارش شدند.

نتایج

نتایج بررسی اثرات سطوح مختلف اسیدآلی ترکیبی و پروبیوتیک جیره با آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که در شاخص‌های تعداد کل باکتری‌ها و باکتری‌های اسید لاکتیکی روده ماهیان تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی میزان اثر مستقل سطوح مختلف اسید آلی ترکیبی و پروبیوتیک و همچنین اثر متقابل اسید آلی و پروبیوتیک معنی دار بود ($P < 0/05$). نتایج نشان داد با افزایش میزان اسیدآلی جیره از صفر (گروه آزمایشی ۱) به ۱ و ۲ درصد (گروه‌های آزمایشی ۲ و ۳) میزان تعداد کل باکتری‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافت

($P < 0/05$). ولی این میزان در گروه‌های آزمایشی حاوی پروبیوتیک (گروه‌های آزمایشی ۵ و ۶) در مقایسه با گروه آزمایشی فاقد اسید آلی در جیره (گروه آزمایشی ۴) اختلاف معنی‌داری را ایجاد نکرد ($P > 0/05$) (جدول ۲). نتایج نشان داد میزان تعداد کل باکتری‌ها و باکتری‌های اسیدلاکتیکی روده ماهیان در گروه‌های حاوی پروبیوتیک به همراه سطوح مختلف اسید آلی در جیره (گروه‌های آزمایشی ۴، ۵ و ۶) در مقایسه با گروه‌های فاقد پروبیوتیک (گروه‌های آزمایشی ۱، ۲ و ۳) به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0/05$). بیش‌ترین میزان باکتری‌های اسیدلاکتیک در جیره‌های حاوی ۲ درصد اسیدآلی به همراه پروبیوتیک مشاهده گردید. نتایج نشان داد استفاده از اسیدآلی در جیره‌های فاقد پروبیوتیک می‌تواند باعث کاهش معنی‌دار ($P < 0/05$) تعداد کل باکتری‌ها و باکتری‌های اسیدلاکتیک روده ماهیان گردد.

جدول ۲: نتایج تعداد کل باکتری‌ها و باکتری‌های اسیدلاکتیکی (Log CFU/g) روده ماهیان در بین گروه‌های آزمایشی

گروه آزمایشی	اسید آلی	پروبیوتیک	کل باکتری‌ها	باکتری‌های اسیدلاکتیکی
۱	-	-	۵/۲۶ $\pm$ ۰/۰۶ ^c	۵/۱۱ $\pm$ ۰/۱۹ ^c
۲	٪۱	-	۴/۵۵ $\pm$ ۰/۰۷ ^d	۴/۵۵ $\pm$ ۰/۵۱ ^d
۳	٪۲	-	۴/۷۱ $\pm$ ۰/۰۶ ^d	۴/۷۶ $\pm$ ۰/۱۱ ^d
۴	-	CFU/g ۱۰ ^۷	۵/۶۴ $\pm$ ۰/۱۱ ^{ab}	۵/۶۷ $\pm$ ۰/۲۵ ^b
۵	٪۱	CFU/g ۱۰ ^۷	۵/۷۸ $\pm$ ۰/۰۶ ^a	۵/۷۹ $\pm$ ۰/۰۸ ^b
۶	٪۲	CFU/g ۱۰ ^۷	۵/۴۹ $\pm$ ۰/۰۳ ^b	۶/۵۸ $\pm$ ۰/۰۳ ^a
P-value				
اسید آلی			۰/۰۰	۰/۰۰
پروبیوتیک			۰/۰۰	۰/۰۰
اسید آلی * پروبیوتیک			۰/۰۰	۰/۰۰

* حروف انگلیسی غیریکسان در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین داده‌ها می‌باشد ($P < 0/05$).

* داده‌ها به صورت (انحراف معیار $\pm$ میانگین) بیان شده است.

نتایج شاخص طول پرزهای روده ماهیان حاکی از اختلاف معنی‌دار در اثر متقابل اسیدآلی و پروبیوتیک بود ($P < 0/05$) (جدول ۳). نتایج نشان داد با افزایش میزان اسیدآلی جیره از صفر به ۱ و ۲ درصد شاخص طول پرزهای روده ماهیان به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0/05$). هم‌چنین افزایش میزان اسید آلی جیره از ۱ به ۲ درصد تاثیر معنی‌داری در طول پرزهای روده ماهیان تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی در انتهای دوره پرورشی نداشت ($P > 0/05$) (جدول ۳). نتایج بررسی ضخامت لایه موکوسی روده ماهیان در انتهای دوره پرورشی نشان داد اثر مستقل سطوح مختلف پروبیوتیک و هم‌چنین اثر متقابل اسیدآلی و پروبیوتیک معنی‌دار بود ($P < 0/05$) ولی اثر

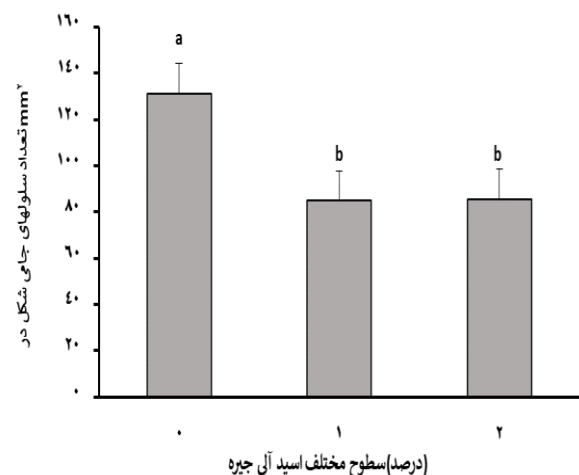
مستقل اسیدآلی معنی‌دار نبود ($P > 0/05$). نتایج حاکی از عدم اختلاف معنی‌دار شاخص ضخامت لایه موکوسی در گروه‌های مختلف آزمایشی با گروه شاهد (گروه آزمایشی ۱) بود ($P > 0/05$). نتایج تعداد سلول‌های جامی روده ماهیان در انتهای دوره پرورشی نشان داد اثر مستقل پروبیوتیک و هم‌چنین اثر متقابل اسیدآلی و پروبیوتیک معنی‌دار نبود ($P > 0/05$). ولی اثر مستقل سطوح مختلف اسید آلی معنی‌دار بود ($P < 0/05$). نتایج نشان داد با افزایش میزان اسیدآلی جیره از صفر به ۱ و ۲ درصد تعداد سلول‌های جامی روده ماهیان به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0/05$) (شکل ۱).

جدول ۳: نتایج شاخص‌های مورفومتری روده ماهیان تغذیه شده با جیره‌های مختلف آزمایشی

گروه آزمایشی	اسید آلی	پروبیوتیک	تعداد سلول‌های جامی در mm ² بافت روده	ضخامت لایه موکوسی (μm)	طول پرزهای روده (μm)
میانگین هر یک از گروه‌های آزمایشی					
۱	-	-	۱۳۸ ± ۳۴	۸۲/۵۴ ± ۱۲/۶ ^{ab}	۳۶۲/۳ ± ۱۹/۳ ^a
۲	%۱	-	۷۸ ± ۲۷	۷۵/۱۱ ± ۰/۵ ^{ab}	۲۲۷/۲ ± ۱۱/۱ ^c
۳	%۲	-	۶۲ ± ۱۷	۶۵/۴۶ ± ۴/۱ ^b	۲۴۰/۵ ± ۱۳/۸ ^c
۴	-	CFU/g ^{۱۰.۷}	۱۲۳ ± ۴۴	۷۲/۳۴ ± ۲/۳ ^{ab}	۳۵۹/۵ ± ۱۶/۲ ^a
۵	%۱	CFU/g ^{۱۰.۷}	۹۱ ± ۲۸	۹۲/۷۲ ± ۴/۴ ^a	۳۰۲/۲ ± ۸/۸ ^b
۶	%۲	CFU/g ^{۱۰.۷}	۱۰۹ ± ۳۳	۸۹/۶۷ ± ۱۷/۹ ^{ab}	۲۶۱/۱ ± ۲۴/۵ ^{bc}
P-value					
اسید آلی			۰/۰۴	۰/۴۱	۰/۰۰
پروبیوتیک			۰/۳۳	۰/۰۳	۰/۰۰
اسید آلی* پروبیوتیک			۰/۲۸	۰/۰۲	۰/۰۰

* حروف انگلیسی غیریکسان در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین داده‌ها می‌باشد ($P < 0.05$). * داده‌ها به صورت (انحراف معیار ± میانگین) بیان شده است.

استفاده از منابع پروتئین گیاهی در جیره غذایی ماهیان گوشت‌خوار می‌باشد. این تغییرات شامل کاهش رشد، تغییر ساختار روده، التهاب، کاهش هضم و جذب مواد مغذی و نیز افزایش ریسک مواجهه در برابر عوامل بیماری‌زا می‌باشد (۱۶). اثرات مستقیم این تغییرات به دلیل وجود مواد ضد تغذیه‌ای موجود در منابع گیاهی و اثرات غیر مستقیم اجزای غذایی که سبب تغییر ساختار و کارکرد فلور میکروبی روده می‌گردند، حاصل می‌شود (۲۳، ۲۷). تغییرات بافتی و مورفولوژیکی ناشی از وجود فاکتورهای ضد تغذیه‌ای منابع پروتئین گیاهی در ماهیان گوشت‌خوار باعث افزایش طول روده، کوتاه شدن پرزها و ریز پرزها، کاهش نفوذپذیری غشاء روده و کاهش سلول‌های اپیتلیال روده شده و امکان اتصال باکتری‌ها به روده را کاهش می‌دهد که این امر در طولانی مدت منجر به کاهش بار باکتریایی روده می‌شود (۳۱). در همین راستا نتایج Desai و همکاران، که به بررسی اثرات جایگزینی پروتئین‌های گیاهی سویا، کانولا و نخود بر تغییر فلور باکتریایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرداخته بودند حاکی از کاهش بار باکتریایی و تغییر میکروفلور روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از سطوح بالای منابع گیاهی در جیره غذایی این ماهیان بود. فلور باکتریایی روده ماهیان شامل انواع باکتری‌های هوازی، بی‌هوازی اختیاری و اجباری است (۱۹). نتایج مطالعات حاکی وجود شباهت جوامع باکتریایی جدا شده از آب، غذا و روده ماهیان است. در این بین باکتری‌های اسید لاکتیکی جزء جمعیت باکتریایی غالب روده ماهیان نمی‌باشد ولی حضور این باکتری‌های مفید در روده بسیاری از ماهیان به اثبات رسیده است (۱، ۲). در همین راستا تلاش برای تغییر جمعیت باکتریایی روده در جهت افزایش تعداد باکتری‌های



شکل ۱: میانگین اثر مستقل سطوح مختلف اسید آلی جیره در تعداد سلول‌های جامی روده ماهیان

بحث

جایگزینی کامل پودر ماهی و روغن ماهی با منابع پروتئین گیاهی در جیره غذایی آبزیان پرورشی به شرطی که میزان عناصر ضد مغذی منابع گیاهی کاهش یابد و نیاز اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب ضروری گونه آبی مورد نظر را تأمین نماید و سبب کاهش طعم و خوش خوراکی غذا نگردد امکان پذیر می‌باشد (۴، ۱۱). در مطالعه حاضر شدت تغذیه‌ای ماهیان از جیره‌های گیاهی در حد بسیار مطلوب بود که این نتیجه را می‌توان از کیفیت اجزای غذایی و فورمولاسیون مناسب جیره‌های غذایی دانست. بروز تغییرات آسیب شناسی مختلف و تغییرات کارکردی سلول‌های دیواره روده از مشکلات

اسیدلاکتیکی با استفاده از مکمل‌های پروبیوتیکی بعضاً منجر به تشکیل کلنی پایدار و غالبیت باکتری‌های اسیدلاکتیکی در فلور باکتریایی روده ماهیان نگردیده است (۲۹، ۳). اما برخی محققان گزارش کردند که استفاده از مکمل‌های پروبیوتیک و یا اسیدهای آلی می‌تواند امکان جایگزینی و تغییر میکروفلور روده ماهیان را به نفع باکتری‌های اسیدلاکتیکی افزایش دهد (۲۹). نتایج مطالعه حاضر حاکی از افزایش معنی‌دار تعداد کل باکتری‌ها و باکتری‌های اسیدلاکتیکی در گروه‌هایی که از پروبیوتیک استفاده کردند، بود و بیش‌ترین میزان باکتری‌های اسیدلاکتیکی مربوط به ماهیانی بود که در جیره غذایی خود از پروبیوتیک به همراه ۲ درصد اسید آلی استفاده کرده بودند. Merrifield و همکاران، از پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* در جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده و اثرات آن را بر فلور باکتریایی روده بررسی کردند. در مطالعه آن‌ها نیز پس از ۲ ماه تغذیه با پروبیوتیک، تعداد کل باکتری‌های فلور باکتریایی روده افزایش یافت. هم‌چنین تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در فلور باکتریایی روده در تیمار پروبیوتیک نیز افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد یافت که با نتایج این پژوهش هم‌خوانی دارد. به نظر می‌رسد استفاده از پروبیوتیک باعث افزایش باکتری‌های اسیدلاکتیک در روده ماهی شده و این باکتری‌ها با مکانیسم‌های مختلف از جمله تولید مواد ضد میکروبی (باکتریوسین‌ها و ..)، کاهش pH (از طریق تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیره) باعث کاهش باکتری‌های بیماری‌زا و غیر مفید و افزایش فضاهای اتصال برای تثبیت و تشکیل کلنی خود شده و به این طریق تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک افزایش می‌یابد (۶). نتایج مطالعه حاضر حاکی از کاهش میزان بار باکتریایی، باکتری‌های اسیدلاکتیکی، تعداد سلول‌های جامی و طول پرزهای روده با استفاده از ۱ و ۲ درصد اسید آلی ترکیبی در جیره ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بود. نتایج مطالعه Ng و همکاران، بر روی هیبرید تیلایپای تغذیه شده با مخلوط اسیدهای آلی نیز حاکی از کاهش معنی‌دار بار باکتریایی کل و باکتری‌های چسبیده به روده بود (۲۱). De Schryver و همکاران، گزارش کردند استفاده از ۱۰-۲٪ پلی‌بتا هیدروکسی بوتیرات در جیره می‌تواند سبب متعادل کردن بار باکتریایی باس‌دریایی اروپایی گردد. استفاده از اسیدآلی در جیره ماهیان به سبب کاهش pH، ایجاد فضای اتصال بیش‌تر (حذف باکتری‌های مضر)، ایجاد شرایط محیطی مناسب‌تر برای باکتری‌های اسیدلاکتیک (۳۰) و توسعه پرزهای روده‌ای می‌تواند میزان باکتری‌های اسیدلاکتیک در فلور باکتریایی را افزایش می‌دهد. بنابراین افزایش باکتری‌های اسیدلاکتیکی در گروه‌های آزمایشی حاوی اسیدآلی مطالعه حاضر می‌تواند تحت تأثیر عوامل اشاره شده باشد. متأسفانه مطالعات زیادی در خصوص استفاده از ترکیب پروبیوتیک و اسیدهای آلی در

جیره آبزیان وجود ندارد ولی با توجه به افزایش معنی‌دار تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در تیمارهای ترکیبی و به‌خصوص تیمار ۲ درصد اسید آلی و پروبیوتیک به نظر می‌رسد این اثر هم‌افزایی بین پروبیوتیک و اسیدآلی باعث افزایش قابل توجه باکتری‌های اسیدلاکتیک در روده ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان شده است، چرا که در تیمارهای مجزای اسید آلی و پروبیوتیک میزان باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود. تعداد سلول‌های جامی روده و اندازه پرزها نشان دهنده وضعیت فیزیولوژیکی روده و سلامت دستگاه گوارش است. در واقع افزایش طول پرزها می‌تواند نمایانگر افزایش سطح جذب در روده و به‌طور غیرمستقیم افزایش کارایی غذای مصرفی باشد (۹). Zhang و همکاران، افزایش طول ویلی‌ها را در ماهی سیم (*Megalobrama terminalis*) تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک *B. licheniformis* گزارش کردند و این افزایش را به افزایش تکثیر سلول‌های اپیتلیال روده توسط پروبیوتیک‌ها نسبت دادند (۳۳). بهبود کارایی تغذیه‌ای ماهیان، سطح جذب روده و مورفومتری پرزهای روده در گونه‌های مختلف توسط پروبیوتیک‌ها در مطالعات Rodriganez و همکاران (۲۸) و Merrifield و همکاران (۱۹) نیز مشاهده شده است. نتایج این مطالعه نشان داد استفاده از پروبیوتیک تأثیر معنی‌داری را در تعداد سلول‌های جامی و طول پرزها نداشت ولی باعث افزایش ضخامت لایه عضلانی گردید. شاخص‌های طول پرزها و تعداد سلول‌های جامی روده بیش‌تر تحت تأثیر استفاده از اسید آلی در جیره غذایی بود که سبب کاهش طول پرزها و تعداد سلول‌های جامی گردید که این نتایج می‌تواند به دلیل استفاده بیش از حد منابع گیاهی در جیره غذایی باشد. نتایج مطالعه حاضر حاکی از تأثیر مثبت استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم در افزایش میزان باکتری‌های اسیدلاکتیکی، بهبود فلور میکروبی روده و بهبود شاخص‌های مورفومتری روده ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های گیاهی بود. هم‌چنین افزودن سطوح مختلف اسید آلی به جیره‌های گیاهی سبب کاهش فلور میکروبی روده و تأثیر منفی بر مورفولوژی بافت روده ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان گردید. ولی در صورت استفاده هم‌زمان از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم، استفاده از مکمل اسیدآلی در جیره توانست با کاهش تعداد کل باکتری‌های روده، فرصت مناسبی برای جایگزینی باکتری‌های اسیدلاکتیکی روده و افزایش معنی‌دار این باکتری‌ها در روده باریک ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان را فراهم آورد.

تشکر و قدردانی

از مسئولین و کارشناسان محترم پژوهشکده آرمیا و آبی‌پروری دانشگاه ارومیه به دلیل حمایت مالی، امکانات آزمایشگاهی و مشارکت‌های

theutilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquac Res.* 38: 551-579.

13. **Hossaini, 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.* 73: 1309-1317.
14. **Jalili, R., Agh, N. and Noori, F., 2013.** Effects of replacing fish meal with vegetable protein sources on growth indices and activity of digestive enzymes of rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). *Journal of animal environment.* 5(1): 17-26. (In Persian)
15. **Jalili, R., Agh, N., Noori, F., Mohseni, M. and Emani, A., 2011.** Effects of replacing fish meal with plant protein on growth performance, feed utilization and muscle fatty acid profile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of animal environment.* 3(4): 33-42. (In Persian)
16. **Krogdahl, A., Roem, A. and Baeverfjord, G., 2010.** Effects of soybean saponin, raffinose and soybean alcohol extract on nutrient digestibilities, growth and intestinal morphology in Atlantic salmon. *European Aquaculture Society.* 23: 118-119.
17. **Mahious, A.S., Gatesoupe, F.J., Hervi, M., Metailler, R. and Ollevier, F., 2005.** Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning Turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture International.* 14: 219-229.
18. **Merrifield, D.L., Bernard, D., Bradley, G., Davies, S.J. and Baker, R.T.M., 2009.** Microbial community diversity associated with the intestinal mucosa of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research.* 40: 1064 -1072.
19. **Merrifield, D.L.A., Dimitroglou, A., Foey, S.J., Davies, R.T.M., Baker, J., Bogwald, M. and Ringo, E., 2011.** The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture.* 302: 1-18.
20. **Modesto, M., D'Aimmo, M., Stefanini, I., Trevisi, P., De Filippi, S., Casini, L., Mazzoni, M., Bosi, P. and Biavati, B., 2009.** A novel strategy to select Bifidobacterium strains and prebiotics as natural growth promoters in newly weaned pigs. *Livestock Science.* 122: 248-258.
21. **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.* 40: 1490-1500.
22. **Noori, F. and Jalili, R., 2014.** Total replacement of fish meal and large portion of fish oil by plant sources without decrease in growth performance and feed utilization in rainbow trout fingerlings (*Oncorhynchus mykiss*) diet. 6(3): 113-123.
23. **Olsen, R.E., Myklebust, R., Kryvi, H., Mayhew, T.M. and Ringo, E., 2001.** Damaging effect of dietary inulin on intestinal enterocytes in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture Research.* 32: 931-934.
24. **Patterson, J. and Burkholder, K., 2003.** Application of probiotics and prebiotics in poultry production. *Journal of Poultry Science.* 82: 627-631.
25. **Peter, H. and Sneath, A., 1986.** *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology.* 2: 1104-1154.
26. **Rahmati Andani, H.R., Tukmechi, A., Meshkini, S. and Ebrahimi, H., 2011.** The increase of resistance of Rainbow trout against *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia ruckeri* infection using *Lactobacillus* isolated

فکری و فنی سپاسگزاری می شود. هم چنین از آقای دکتر احمد ایمانی که در تامین بچه ماهی یاری کردند تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

1. **Anuta, J.D., Buentello, A., Patnaik, S., Lawrence, A.L., Mustafa, A., Hume, M.E. and Delbert, M.G., 2011.** Effect of Dietary Supplementation of Acidic Calcium Sulfate (VitoXal) on Growth, Survival, Immune Response and Gut Microbiota of the Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of the World Aquaculture Society.* 42(6): 834-844.
2. **Askarian, F., Kousha, A. and Ringo, E., 2009.** Isolation of lactic acid bacteria from the gastrointestinal tract of beluga (*Huso huso*) and Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). *Journal of Applied Ichthyology.* 25: 91-94.
3. **Askarian, F., Matinfar, A., Kousha, A., Bahmani, M., Khorshidi, K., Shenavar, A. and Ringo, E., 2008.** Diversity of lactic acid bacteria in the gastro intestinal tracts of reared Beluga (*Huso huso*) and Persian sturgeon (*Asipenser persicus*). *Journal of Fisheries and Aquatic Science.* 3(5): 302-311.
4. **Barrows, F., Gaylord, T.G., Stone, D.A.J. and Smith, C. E., 2007.** Effect of protein source and nutrient density on growth efficiency, histology and plasma amino acid concentration of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research.* 38: 1747-1758.
5. **Cao, Y., Xun, M., Ren, S. and Wang, J., 2022.** Effects of dietary organic acids and probiotics on laying performance, egg quality, serum antioxidants and expressions of reproductive genes of laying ducks in the late phase of production. *Poultry Science.* 101: 102-189.
6. **Cerezuela, R., Meseguer, J. and Esteban, M., 2011.** Current Knowledge in Synbiotic Use for Fish Aquaculture, A Review. *Journal of Aquaculture Research and Development.* 1: 1-7.
7. **Da Silva, B.C., Vieira, F.D.N., Mourino, J.L.P., Ferreira, G.S. and Seiffert, W.Q., 2013.** Salts of organic acid selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. *Aquaculture.* 384(387): 104-110.
8. **De Schryver, P., Sinha, A.K. and Kunwar, P.S., 2010.** Polyb-hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Applied Microbiology Biotechnology.* 86: 1535-1541.
9. **Desai, A.R., Links, M.G., Collins, S.A., Mansfield, G.S., Drew, M.D., Van Kessel, A.G. and Hill, J.E., 2012.** Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture.* 134: 350-353.
10. **FAO. 2022.** The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>.
11. **Francis, G., Makkar, H.P.S. and Becker, K., 2001.** Antinutritional factors present on plant-derived alternate fish feed ingredient and their effects in fish. *Aquaculture.* 199: 197-222.
12. **Gatlin, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G.S., Krogdahl, A., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E.J., Stone, D., Wilson, R. and Wurtele, E., 2007.** Expanding

- from the intestine of common carp (*Cyprinus caipio*). Journal of Veterinary Iran. 2: 26-35.
27. **Ringo, E., Olsen, R.E., Gifstad, T., Dalmo, R.A., Amlund, H. and Hemre, G.I., 2010.** Prebiotics in aquaculture: a review. Aquaculture Nutrition. 16: 117-136.
 28. **Rodriguez-Estrada, U., Satoh, S., Haga, Y., Fushimi, H. and Sweetman, J., 2009.** Effects of single and combined supplementation of *Enterococcus faecalis*, mannan oligosaccharide and polyhydroxybutyrate acid on growth performance and immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. AGRIS, Suisanzoshoku (Japan). 57(4): 609-617.
 29. **Rurangwa, E., Laranja, J.L., Van Houdt, R., Delaedt, Y., Geraylou, Z. and Van de Wiele, T., 2009.** Selected nondigestible carbohydrates and prebiotics support the growth of probiotic fish bacteria mono cultures in vitro. Journal of applied microbiology. 106: 932-940.
 30. **Vazquez, J.A., Gonzalez, M.P. and Murado, M.A., 2007.** Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. Aquaculture. 245: 149-161.
 31. **Yang, X., Xin, H.L., Yang, C.B. and Yang, X.J., 2018.** Impact of essential oils and organic acids on the growth performance, digestive, function and immunity of broiler chickens. Amino Acid Nutrition. 4: 388-393
 32. **Yesilayer, N. and Eralp, K.I., 2019.** Effect of partial replacement of dietary fish meal by soybean meal with betaine attractant supplementation on growth performance and fatty acid profiles of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture Research. 00: 1-9.
 33. **Zhang, C.N., Li, X.F., Xu, W.N., Jiang, G.Z., Lu, K.L., Wang, L.N. and Liu, W.B., 2013.** Combined effects of dietary fructooligosaccharide and *Bacillus licheniformis* on innate immunity, antioxidant capability and disease resistance of triangular bream (*Megalobrama terminalis*). Fish and Shellfish Immunology. 35(5): 1380-1386.