**مقاله علمی – پژوهشی:**

# اثرات افزودن اسید بوتیریک و پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* جیره غذایی بر شاخص‌های رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی و آنتی‌اکسیدانی ماهی شانک زردباله عربی (*Acanthopagrus arabicus* Iwatsuki, 2013)

رحیم اصولی[۱]، پریتا کوچنین[۱]، منصور طرفی موزان‌زاده*[۲]، تکاور محمدیان[۳]، وحید یاوری[۱]

*Mansour.torfi@gmail.com

۱-گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

۲- پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران

۳- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۳

## چکیده

یک مطالعه ۷۰ روزه برای بررسی اثرات مکمل‌های غذایی اسید بوتیریک و پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* بر رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و آنتی‌اکسیدانی در ماهی زردباله عربی (*Acanthopagrus arabicus*) انجام شد. از اسید بوتیریک (BA) و پروبیوتیک *L. plantarum* برای طراحی شش خوراک آزمایشی به شرح ذیل استفاده شد: ۱-شاهد (جیره بدون مکمل)، ۲- نیم درصد اسید بوتیریک (BA 0.5) ، ۳-یک درصد اسید بوتیریک (BA 1.0)، ۴- پروبیوتیک ($CFU/g\ 1.6 \times 10^8$) ۵- نیم درصد اسید بوتیریک و پروبیوتیک (PRO+BA0.5)،۶- یک درصد اسید بوتیریک و پروبیوتیک (PRO+BA1.0). پانصد و چهل ماهی با وزن اولیه ۰/۱ ± ۲/۷ گرم در ۱۸ مخزن پلی اتیلن (۳۰۰ لیتر) توزیع شدند. ماهی‌ها با جیره‌های آزمایشی سه بار در روز تا حد سیری تغذیه شدند و مطمئن می شدند که هیچ خوراکی در کف مخازن باقی نمی ماند. دمای آب و شوری آب به‌ترتیب ۳۱/۳ درجه سانتی‌گراد و ۴۶ گرم در لیتر بود. ماهی‌های تغذیه شده با جیره‌های شاهد و پروبیوتیک نسبت به سایر گروه‌ها سرعت رشد و ضریب تبدیل غذایی بالاتری داشتند. ماهیان گروه PRO-BA1 طول کل بیشتری نسبت به سایر گروه‌ها داشتند. سطح گلوتاتیون در کبد ماهیان تغذیه شده با شاهد و PRO-BA0.5 بیشتر از سایر تیمارها بود. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در ماهیان تغذیه شده با جیره BA 1.0 کمتر از سایر تیمارها بود. فعالیت کاتالاز در ماهیان تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیک و بوتیریک اسید بیشتر از سایر گروه‌ها بود. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که گنجاندن بوتیریک اسید در رژیم غذایی به‌تنهایی ممکن است رشد را در *A. arabicus* کاهش دهد، اما استفاده از مخلوط پروبیوتیک و اسید بوتیریک در هر دو سطح ۰/۵ و ۱ درصد می‌تواند ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را در این گونه بهبود بخشد. به‌نظر می‌رسد، مقدار اسید بوتیریک مورد استفاده در این مطالعه بالاتر از مقادیر مذکور برای ماهیان گوشتخوار است.

**لغات کلیدی:** اسید بوتیریک، شاخص‌های رشد، شانک زردباله عربی، *Lactobacillus plantarum*

*نویسنده مسئول

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

## مقدمه

مکمل‌های تغذیه‌ای در آبزیان شامل طیف وسیعی از مواد می‌شود که نیازهای تغذیه‌ای ماهی را در جهت ایمنی‌سازی، رشد و تولید مثل بر طرف می‌کنند و برای هضم و جذب بهتر مواد غذایی در بدن آبزیان استفاده می‌شوند (Wang *et al.*, 2017; Dawood *et al.*, 2018). در بین مکمل‌های مورد استفاده در صنعت تغذیه آبزیان، پروبیوتیک‌ها و اسیدهای آلی در دو دهه گذشته نقش ویژه‌ای در بهبود رشد و سلامت آبزیان ایفاء نموده‌اند. در آبزی‌پروری، از پروبیوتیک‌ها در طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها استفاده شده و این مکمل‌ها از طریق بهبود رشد، کمک به هضم مواد غذایی، بهبود سلامت آبزیان و ارتقاء عملکرد سیستم ایمنی آبزیان سبب افزایش میزان تولید و کاهش تلفات می‌شوند، برای مثال، پروبیوتیک‌ها با افزایش فعالیت بیگانه‌خواری ماکروفاژها در آبزی، بالا بردن توان تولید آنتی‌بادی‌ها و رقابت برای محل اتصال گیرنده‌های سلولی با عوامل بیماری در روده سبب ارتقاء عملکرد سیستم ایمنی آبزی می‌شوند (Wuertz *et al.*, 2021). اسیدهای آلی دارای زنجیره کوتاه و نمک‌های آنها به عنوان اسیدی‌کننده شناخته می‌شوند و جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. اسیدهای آلی (اسید فرمیک، اسید لاکتیک و ...)، به عنوان نگهدارنده در مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. نتایج مطالعات مختلف بر آبزیان نشان داده است که کارایی رشد، قابلیت هضم مواد مغذی و سلامت روده را می‌توان با استفاده از برخی اسیدهای آلی و نمک‌های آنها بهبود بخشید (Tran *et al.*, 2020). در تغذیه جانوران، اسیدهای آلی اثرات خود را از طریق تاثیرگذاری بر غذا، دستگاه گوارش و متابولیسم جاندار اعمال می‌کنند (Hoseinifar *et al.*, 2017). برخی مطالعات نشان داده‌اند که باکتری‌های اسید لاکتیک روده به همراه اسیدهای آلی باعث تشکیل یک سد دفاعی می‌شوند که از چسبندگی و انتقال باکتری‌های بیماری‌زا به اپیتلیوم روده جلوگیری می‌کند (Sotoudeh *et al.*, 2020). در تحقیقی، اثر ترکیبی اسید پروپیونیک و باکتری *Bacillus subtilis* در ماهی باس دریایی آسیایی (*Lates calcarifer*) سبب بهبود عملکرد رشد وتغذیه، وضعیت آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های گوارشی این گونه شده است (Salehi *et al.*, 2022). در مطالعه Zarei و همکاران (۲۰۲۱) افزودن اسید بوتیریک تری‌گلیسیرید به میزان ۱ درصد در جیره غذایی ماهی شانک زرد باله سبب بهبود رشد، شاخص‌های ایمنی و افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون اس ترانسفراز در کبد این گونه شده است. همچنین Sotoudeh و همکاران (۲۰۲۰) گزارش نمودند که افزودن ۱ درصد پروپیونات سدیم یا مخلوط ۰/۵ درصد پروپیونات سدیم و ۰/۵ درصد استات سدیم سبب بهبود رشد و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کبد در ماهی شانک زردباله شده است. همچنین Ziaee Nejad *et al.* (2015) گزارش نمودند افزودن پروبیوتیک‌های *Lactobacillus plantarum* و *Bacillus subtilis* در دو تراکم $10^3$ و $10^6$ از طریق آب یا غنی‌سازی آرتمیا سبب افزایش رشد و بازماندگی لارو ماهی شانک زرد باله می‌شود.

ماهی شانک زردباله عربی (*Acanthopargus arabicus*) یک گونه آب شور آبهای کم عمق خلیج فارس و دریای عمان بوده که از ارزش اقتصادی بالا و بازارپسندی خوبی در میان مردم ساحل‌نشین برخوردار است. از ویژگی‌های این گونه، تکثیر طبیعی در شرایط اسارت، بازماندگی بالا در مرحله پرورش لاروی، سازگاری با سطح بالای پروتئین‌های گیاهی در جیره غذایی و قابلیت پرورش در استخرهای خاکی است (Sotoudeh *et al.*, 2020). عملکرد رشد بچه ماهی شانک زرد باله تغذیه شده با جیره‌های غذای غنی از پروتئین گیاهی همراه با استات سدیم و پروپیونات سدیم ارتقاء می‌یابد و با بهبود بهره‌وری خوراک پاسخ‌های ایمنی هومورال و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ماهی همراه است (Sangari *et al.*, 2021). Ziaee Nejad *et al.* (2015) گزارش نمودند که دو باکتری *Bacillus subtilis* و *Lactobacillus plantarum* در تراکم‌های به‌ترتیب $10^3$ و $10^6$ سلول در هر سی سی آب محیط پرورش، شاخص‌های رشد و بقاء ماهی شانک زرد باله را به طور معنی‌داری بهبود بخشیدند. با وجود این، تاکنون مطالعه‌ای در زمینه اثرات متقابل اسیدهای آلی و پروبیوتیک‌ها در جیره غذایی این گونه در کشور گزارش نشده است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات بوتیریک اسید و پروبیوتیک *L. plantarum*

جیره غذایی بر شاخص‌های رشد، تغذیه و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ماهی شانک زردباله عربی بود.

## مواد و روش‌ها

از جیره غذایی تجاری ۲۱ بیضا با میزان پروتئین ۴۴٪ و چربی ۱۵٪ با قطر ۲-۱ میلی‌متر به عنوان جیره پایه استفاده گردید. مکمل‌های غذایی شامل بوتیریک اسید و پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* برای تهیه جیره‌های آزمایشی به جیره غذایی پایه افزوده شد. جیره‌های آزمایشی شامل هفت جیره به‌ترتیب: ۱- جیره شاهد (فاقد اسید آلی و پروبیوتیک، CO)، ۲- جیره پروبیوتیک (پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به میزان ($1.6 \times 10^8$ CFU/ g) در کیلوگرم جیره، PRO)، ۳- جیره حاوی ۰/۵ درصد اسیدبوتیریک (BA 0.5) ۴- جیره حاوی ۱ درصد اسید بوتیریک (BA 1.0) ۵- جیره حاوی ۰/۵ درصد اسیدبوتیریک و پروبیوتیک *L. plantarum* به میزان ($1.6\times10^8$ CFU/ g) (PRO+BA 0.5)و ۶- جیره حاوی ۱ درصد اسید بوتیریک و پروبیوتیک *L. plantarum* به میزان ($1.6\times10^8$ CFU/ g) (PRO+ BA 1.0)، بود.

ابتدا جیره پایه پودر شده، سپس بوتیریک اسید، توزین شده و در آب مقطر، حل شده و به جیره پودر شده، اضافه شده و به مدت ۲۰ دقیقه مخلوط شده تا خمیر حاصل همگن شود. پلت‌های غذایی با استفاده از چرخ گوشت با مش ۳ میلی‌متر ساخته شده و در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت در مقابل پنکه خشک شدند. پس از خشک شدن، به آن پروبیوتیک به همراه ژلاتین افزوده شد. ابتدا پروبیوتیک محلول در سرم فیزیولوژی و سپس ژلاتین گاوی محلول یک درصد، بر جیره‌ها اسپری گردید. جیره‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق در زیر پنکه خشک شده و سپس در فریزر تا زمان مصرف نگهداری شد (Alamifar *et al.*, 2020).

کلیه مراحل عملی و اجرایی این تحقیق از اوایل شهریور لغایت اواسط آبان ماه ۱۴۰۰ به مدت ۷۰ روز در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) وابسته به پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور انجام شد. در این آزمایش، تیمارهای آزمایش شامل ۶ تیمار با ۳ تکرار بود. پیش از شروع تحقیق بچه ماهیان به مدت دو هفته با شرایط دوره تحقیق و تغذیه سازگار شدند. سپس ماهیان در ۱۸ تانک ۳۰۰ لیتری (۲۰۰ لیتر آبگیری) با تراکم ۳۰ قطعه ماهی در هر تانک به صورت کاملاً تصادفی توزیع شده و به مدت حداقل ۷۰ روز با تیمارهای مختلف در سه نوبت با فواصل زمانی ۹، ۱۲ و ۱۷ به صورت دستی در حد سیری، تغذیه شدند. هر سه روز یک‌بار، ۱۰۰ درصد آب مخزن تعویض گردید و سیفون مخازن به صورت روزانه انجام گرفت. دما، شوری و اکسیژن محلول در آب به‌ترتیب ۳/۵±۳۱/۰ درجه سانتی‌گراد،۰/۳±۴۶ گرم در لیتر ۲/۲±۶/۰ میلی‌گرم در لیتر بودند.

یک روز قبل از نمونه‌برداری، غذادهی قطع شد. اندازه‌گیری طول و وزن ماهیان درآغاز و انتهای دوره آزمایش صورت گرفت. به منظور اندازه‌گیری و پایش عوامل رشد و آنزیم‌های گوارشی و آنتی‌اکسیدانی، در انتهای تحقیق نمونه‌برداری صورت گرفت. برای نمونه‌برداری، نخست ماهیان با ماده شیمیایی فنوکسی اتانول ppm ۱۰۰ بیهوش گردیدند و سپس اندازه گیری طول و وزن انفرادی ماهیان انجام شد. سپس بافتهای روده و کبد جهت بررسی آنزیم‌های گوارشی و آنتی‌اکسیدانی جدا شدند. برای سنجش آنزیم‌ها، از هر مخزن ۶ قطعه ماهی نمونه‌برداری شده، سپس کبد و روده جدا شده و پس از انتقال به کرایوتیوب، به تانک ازت منتقل گردید.

در پایان دوره تغذیه، دستگاه گوارش (نمونه‌های روده) تا زمان سنجش فعالیت آنزیم‌ها، در ازت مایع نگهداری شدند و برای تهیه عصاره آنزیمی، نمونه‌ها با بافر ۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl، ۲۰ میلی‌مولا $CaCl_2$ و ۵۰ میلی‌مولار KCl (pH=۸/۵) به نسبت ۱ به ۹ مخلوط و یکنواخت شده و سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد با g ۳۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی به‌دست آمده در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز بر اساس روش Bessey و همکاران (۱۹۴۶) و با استفاده از از ماده پی نیتروفینیل فسفات به عنوان سوبسترا مورد ارزیابی قرار گرفت. فعالیت آنزیم گوارشی لیپاز با استفاده از پارا نیترو فنیل مریستات به عنوان سوبسترای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت (Lijima *et al.*, 1998). فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز بر اساس روش Bernfeld

(۱۹۵۵) و با استفاده از نشاسته به عنوان سوبسترا مورد ارزیابی قرار گرفت. پروتئین محلول کل بر اساس روش Bradford (۱۹۷۶) و با استفاده از غلظت‌های مختلف آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد. برای بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، یک گرم از نمونه‌های بافت کبد از هر تکرار از هر تیمار به‌وسیله ترازو وزن شده و در یک فالکن قرار داده شده و به آن بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار و EDTA 1 میلی‌مولار (۱ به ۵) اضافه گردید. نمونه‌ها با دستگاه هموژنایزر، در مجاورت یخ، یکنواخت گردید. برای جداسازی فاز مایع از باقی‌مانده‌ها، از سانتریفوژ با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. بعد از عمل سانتریفوژ، مایع رویی به‌وسیله سمپلر جدا شده و تا زمان سنجش در منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (Aebi, 1974)، سوپراکسید دیسموتاز (McCord and Fridovic, 1969) و محتوی گلوتاتیون (Beutler *et al*., 1963) در کبد با روش‌های استاندارد بررسی شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزارSPSS نسخه ۲۱ بررسی شد. نرمال بودن داده‌ها با آزمون Kolmogorov-Smirnov و همگن بودن داده‌ها با آزمون Leven انجام گرفت. جهت تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یکطرفه استفاده شده و اختلاف بین میانگین‌ها به‌وسیله آزمون چند دامنه دانکن بررسی شد. سطح معنی‌دار بودن در تمامی بررسی‌ها، ۰/۵ درصد در نظر گرفته شده و از نرم افزار Excel برای رسم نمودارها استفاده شد.

## نتایج

بازماندگی ماهیان تغذیه شده با جیره‌های غذایی مختلف بیش از ۹۰ درصد بود و اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مختلف وجود نداشت ($P>0.05$). وزن نهایی ماهیان تغذیه شده با جیره‌های شاهد و جیره حاوی پروبیوتیک در حدود یک گرم از ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی اسید بوتیریک یا مخلوط پروبیوتیک و اسید بوتیریک، بیشتر بود. ضریب رشد ویژه در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های شاهد و حاوی پروبیوتیک بیش از جیره‌های حاوی اسید بوتیریک بود و ضریب تبدیل غذایی در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های CO، PRO و PRO+BA 1.0 از سایر تیمارها اعداد کمتری داشت.

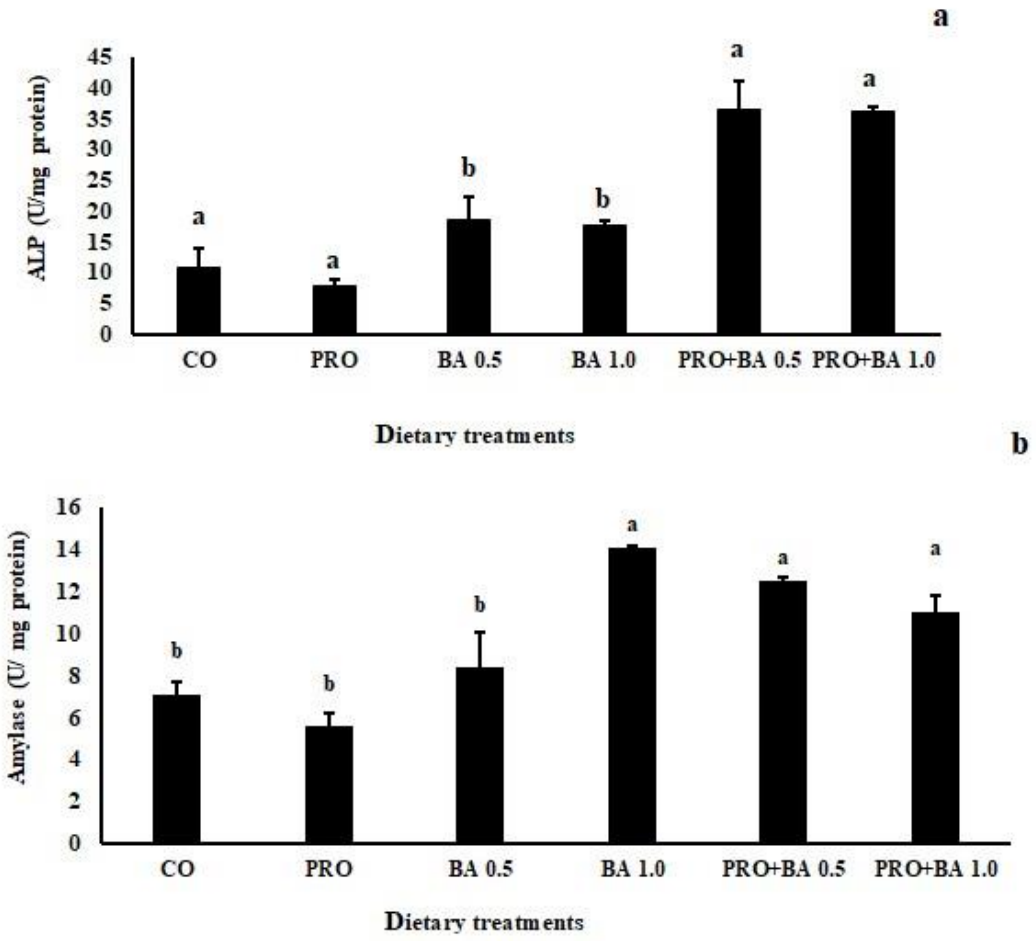
نتایج مطالعه حاضر نشان داد، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در روده ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی مخلوط پروبیوتیک و بوتیریک اسید (۰/۵ و ۱ درصد)، بیشتر از سایر تیمارهای غذایی بود ($P>0.05$). فعالیت آنزیم آمیلاز در روده ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۱ درصد بوتیریک اسید و جیره‌های حاوی مخلوط پروبیوتیک و بوتیریک اسید (۰/۵ و ۱ درصد)، بیشتر از سایر تیمار ها بود. فعالیت آنزیم لیپاز تحت تأثیر جیره‌های غذایی قرار نگرفت ($P>0.05$) (جدول ۱، شکل ۱).

**جدول ۱: اثرات تیمارهای غذایی بر عملکرد رشد و کارایی تغذیه ماهی *A. arabicus* تغذیه شده به مدت ۷۰ روز (حروف متفاوت در یک ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌هاست ($P<0.05$). (داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد بیان شدند.)**

**Table 1: Effects of dietary treatments on the growth performance and feed utilization of *A. arabicus* for 70 days (Different upper case letters indicate significant differences between dietary treatments ($P<0.05$). (means±SE, n=3)**

| Parameters | Dietary treatments | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Control | PRO | BA (0.5) | BA (1.0) | PRO+BA (0.5) | PRO+BA (0.1) |
| IBW (g)[1] | 2.7 ± 0.0 | 2.8 ± 0.0 | 2.7 ± 0.0 | 2.7 ± 0.0 | 2.7 ± 0.0 | 2.8 ± 0.0 |
| FBW (g)[2] | 11.7 ± 0.4$^{a}$ | 11.9 ± 0.4$^{a}$ | 10.3 ± 0.1$^{b}$ | 10.1 ± 0.1$^{b}$ | 10.9 ± 0.2$^{ab}$ | 10.9 ± 0.2$^{ab}$ |
| SGR (% IBW day$^{-1}$)[3] | 2.1 ± 0.0$^{a}$ | 2.1 ± 0.0$^{a}$ | 1.9 ± 0.0$^{b}$ | 1.9 ± 0.0$^{b}$ | 2.0 ± 0.0$^{ab}$ | 2.0 ± 0.0$^{ab}$ |
| Survival (%)[4] | 97.5 ± 1.5 | 95.0 ± 2.9 | 95.0 ± 2.9 | 97.5 ± 1.4 | 92.5 ± 1.4 | 100.0 ± 0.0 |
| FCR[5] | 1.5 ± 0.1$^{a}$ | 1.5 ± 0.1$^{a}$ | 1.7 ± 0.0$^{b}$ | 1.7 ± 0.1$^{b}$ | 1.6 ± 0.0$^{a}$ | 1.5 ± 0.0$^{a}$ |
| FI (g/fish)[6] | 13.1 ± 0.1$^{a}$ | 12.9 ± 0.4$^{a}$ | 12.6 ± 0.0$^{b}$ | 12.3 ± 0.3$^{b}$ | 13.2 ± 0.2$^{a}$ | 12.1 ± 0.0$^{b}$ |

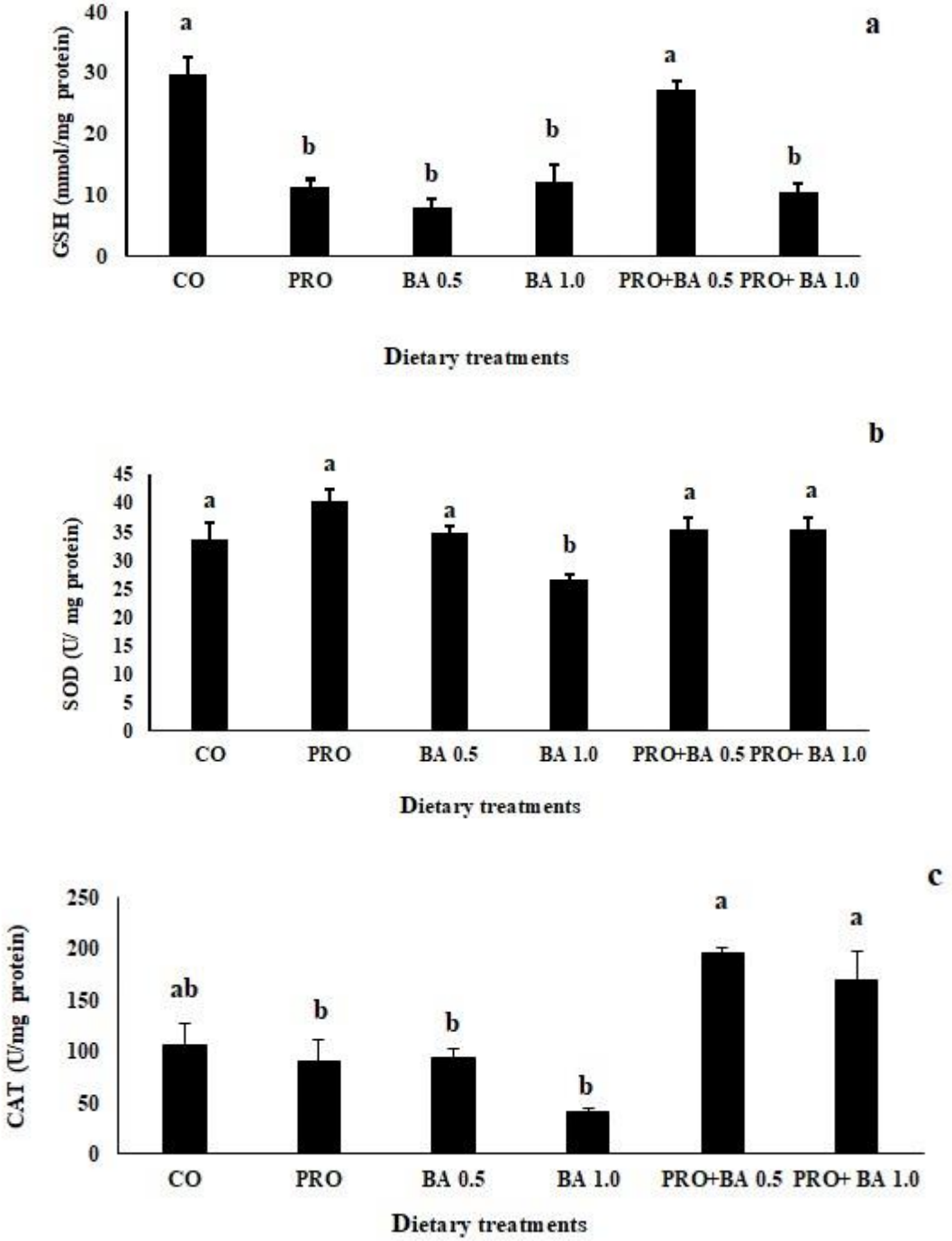
[1]IBW: Initial body weight; [2]FBW: Final body weight; [5]Specific growth rate (SGR, %/day) = 100 × [(ln FBW – ln IBW) / number of feeding days]; [4]Survival (%) = 100 × (final number of Fish / initial number of Fish).; [5]Feed conversion ratio (FCR) = total feed intake (g) / weight gain (g); [6]Feed Intake (FI) = total feed intake (g) / number of fish in each tank




**شکل ۱: اثرات تیمارهای غذایی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی آلکالین فسفاتاز (a)، آمیلاز (b) و لیپاز (c) در ماهی *A. arabicus* (حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌هاست ($P<0.05$). (داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد بیان شدند.)**

**Figure 1: Effects of dietary treatments on digestive enzymes, including alkaline phosphatase (a), amylase (b) and lipase (c) in *A. arabicus*. (Different upper case letters on the columns indicate significant differences between dietary treatments ($P<0.05$). (means±SE, n=3)**

میزان گلوتاتیون کبد در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های شاهد و جیره حاوی مخلوط پروبیوتیک و ۰/۵ درصد بوتیریک اسید بیش از سایر تیمارها بود ($P<0.05$). فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در کبد ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی بوتیریک اسید ۱ درصد کمتر از سایر تیمار ها بوده درحالی‌که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در ماهیان تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیک و بوتیریک اسید (۰/۵ و ۱ درصد)، از سایر تیمارها بیشتر است (شکل ۲).




**شکل ۲: اثرات تیمارهای غذایی بر محتوی گلوتاتیون (a)، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (b) و کاتالاز (c) در کبد ماهی *A. arabicus* (حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌هاست ($P<0.05$). (داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد بیان شدند.)**

**Figure 1:. Effects of dietary treatments on the liver glutathione (a) superoxide dismutase (b) and catalase (c) activity in *A. arabicus* (Different upper case letters on the columns indicate significant differences between dietary treatments ($P<0.05$). (means±SE, n=3)**

## بحث

در این تحقیق استفاده از پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* و اسید بوتیریک اثری بر افزایش وزن، وزن نهایی و نرخ رشد ویژه نسبت به گروه شاهد نداشت. همچنین در مطالعه حاضر افزودن اسید بوتیریک سبب کاهش اندک رشد در ماهی شانک زرد باله شد که با کاهش تغذیه ماهیان نسبت به ماهی‌های گروه شاهد همراه بود. به طور مشابهی افزودن ۰/۰۵ درصد بوتیریک اسید در جیره غذایی گربه ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) سبب کاهش رشد این گونه نسبت به جیره شاهد شد (Asriqah *et al.*, 2018). کاهش مصرف غذا در جیره‌های حاوی مکمل اسید آلی می‌تواند با کاهش pH غذا مربوط باشد که سبب کاهش تمایل ماهی به تغذیه شده است. برای مثال، در مطالعه‌ای رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با جیره غذایی حاوی CFU/g ۱۰^۸ و ۱۰^۷، باکتری *Pediococcus acidilactici* موثر نبوده است (Merrifield *et al.*, 2011). استفاده از پروبویتیک‌ها در ماهیان، اثرات متفاوتی وجود دارد. به‌نظر می‌رسد که این تفاوت‌ها ارتباطی، به نوع پروبیوتیک، مقدار آن، طول دوره آزمایش و شرایط فیزیولوژی ماهی داشته باشد. بر خلاف نتایج مطالعه حاضر، Rodriguez-Estrada و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه‌ای بر ماهی قزل‌آلای رنگین کمان نشان دادند که استفاده از ترکیب باکتری *Enterococcus faecalis* و اسید آلی دی هیدروکسی بوتیرات باعث افزایش معنی‌دار شاخص‌های رشد و تغذیه نسبت به سایر تیمارها شده است. فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و آمیلاز در روده ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی مخلوط پروبیوتیک و اسید بوتیریک (۰/۵ و ۱ درصد)، بیشتر از سایر تیمارهای غذایی بود. همچنین در تحقیقی، افزودن اسید پروپیونیک به میزان ۰/۵ درصد در جیره غذایی ماهی باس دریایی آسیایی (*Lates calcarifer*)، باعث بهبود فعالیت آنزیم‌های گوارشی لیپاز، پروتئاز و آلفا آمیلاز شده است (Salehi *et al.*, 2022). افزودن ۰/۵ درصد دی‌فرمات‌سدیم در جیره غذایی ماهی باس دریایی آسیایی جوان باعث بهتر شدن فعالیت آنزیم تریپسین شد، اما بر فعالیت آنزیم‌های تریپسین و آمیلاز موثر نبود (Reyshahri *et al.*, 2019). در تحقیقی بر ماهی شانک زرد باله استفاده از مخلوط اسیدهای آلی پروپیونیک و استیک یا پروپیونیک اسید به میزان ۱ درصد در جیره غذایی حاوی سطح بالای پروتئین‌های گیاهی، موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های پپسین، تریپسین و لیپاز شد (Sotoudeh *et al.*, 2020). در مطالعه‌ای دیگری، افزودن اسید بوتیریک به مقدار ۰/۵ درصد در جیره غذایی ماهی باس دریایی آسیایی موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی پروتئاز و لیپاز شد (Alamifar *et al.*, 2020). اسید بوتیریک یکی از مشتقات تخمیری کربوهیدرات‌ها به‌وسیله باکتری‌های بی‌هوازی است و نقش زیادی در سلامت روده دارد. در همین ارتباط، گزارش گردید که افزودن اسید بوتیریک به جیره غذایی ماهی سیم سر طلا باعث بهبود سلامت روده به دلیل افزایش جمعیت باکتری‌های لاکتیک اسید و کاهش تعداد باکتری‌های بیماری‌زا شده است (Rimoldi *et al.*, 2018). در مطالعه حاضر، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در ماهیان تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیک و اسید بوتیریک (۰/۵ و ۱ درصد)، بیش از سایر تیمارها بود. در این رابطه گزارش شده است که افزودن اسید پروپیونیک به میزان ۰/۵ و ۱/۰ درصد در جیره غذایی ماهی باس دریایی آسیایی باعث بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز و گلوتاتیون رداکتاز شد، ولی بر فعالیت کاتالاز اثری نداشت (Salehi *et al.*, 2022). بر خلاف نتیجه مطالعه حاضر، در ماهیان تیلاپیای نیل تغذیه شده با جیره‌های غذایی دارای اسید کافئیک، فعالیت کاتالاز سرم به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت (Yilmaz, 2019). افزودن پروبیوتیک *L. plantarum* در جیره غذایی ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*)، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش داد (Sun *et al.*, 2012). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عملکرد رشد بچه‌ماهی شانک زرد باله تغذیه شده با جیره‌های غذایی همراه با مکمل پروبیوتیک و اسید بوتیریک اثر مثبتی بر شاخص‌های رشد نداشته و مکمل بوتیریک اسید به‌تنهایی تا حدی منجر به کاهش رشد شده است. با وجود این، استفاده از مخلوط پروبیوتیک و بوتیریک اسید سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و آمیلاز شد. همچنین استفاده از مخلوط

پروبیوتیک و بوتیریک اسید سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و محتوی گلوتاتیون به‌خصوص در تیمار پروبیوتیک و ۰/۵٪ اسید بوتیریک شده است. بنابراین، در دوره پرورش، استفاده از مخلوط پروبیوتیک *L. plantarum* و ۰/۵ درصد اسید بوتیریک برای بهبود شاخص‌های سلامت بچه ماهی شانک زرد باله، توصیه می‌گردد.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان از پشتیبانی آقایان سالم رفاقت و مجید مقدسی زاده طی اجرای پروژه و نمونه برداری از ماهیان، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

## منابع

**Aebi, H., 1974.** Catalase. In: Bergmeyer, H.V., (Ed). *Methods in Enzymatic Analysis*, 2, pp. 674–684. Acadamic press Inc., New York, NY.

**Alamifar, H., Soltanian, S., Vazirzadeh, A., Akhlaghi M., Morshedi V., Gholamhosseini, A. and Torfi Mozanzadeh, M., 2020.** Dietary butyric acid improved growth, digestive enzyme activities and humoral immune parameters in Barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture Nutrition*, 26:56–164. https://doi.org/10.1111/anu.12977.

**Asriqah, L., Nugroho, R.A. and Aryani, R., 2018.** Effect of various organic acid supplementation diets on *Clarias gariepinus* BURCHELL, 1822: Evaluation of growth, survival and feed utilization. *F1000Research*, 7:1465. https://doi.org/10.12688/f1000research.15954.1.

**Bernfeld, P., 1955.** Amylases, alpha and beta. *Methods in Enzymology*, 1:149–158.

**Bessey, O.A., Lowry, O.H. and M.J. Brock., 1946.** Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimeters of serum. *Journal of Biological Chemistry*, 164:321–329.

**Beutler, E., Duron, O. and Kelly, B.M., 1963.** Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 61, pp. 882–890.

**Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

**Dawood, M.A., Koshio, S. and Esteban, M.Á., 2018.** Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 10:950–974. https://doi.org/10.1111/raq.12209

**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*, 18(1):59-69. https://doi.org/10.1023/A:1007725513389

**Hoseinifar, S.H., Sun, Y.Z., Caipang, C.M., 2017.** Short chain fatty acids as feed supplements for sustainable aquaculture: an updated review. *Aquaculture Research* 48: 1380–1391. https://doi.org/10.1111/are.13239.

**McCord, J.M. and Fridovich, I., 1969.** Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)," *Journal of Biological Chemistry*, 244:6049–6055.

**Merrifield, D.L., Bradley, G., Harper, G.M., Baker, R.T.M., Munn, C.B. and Davies, S.J., 2011.** Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*). *Aquaculture Nutrition*, 17:73-79. https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00712.x

**Reyshari, A., Mohammadiazarm, H., Mohammadian, T. and Mozanzadeh, M.T., 2019.** Effects of sodium diformate on growth performance, gut microflora, digestive enzymes and innate immunological parameters of Asian sea bass (*Lates calcarifer*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, 25:1135–1144. https://doi.org/10.1111/anu.12929.

**Rimoldi, S., Gliozheni, E., Ascione, C., Gini, E. and Terova, G., 2018.** Effect of a specific composition of short- and medium-chain fatty acid 1-monoglycerides on growth performances and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *PeerJ*, 6, e5355. https://doi.org/10.7717/peerj.5355

**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*." *Aquaculture Science*, 57:609-617.

**Salehi, M., Bagheri, D., Sotoudeh, E., Ghasemi A. and Mozanzadeh, M.T., 2022.** The combined effects ۵۹۳of propionic acid and a mixture of Bacillus spp. probiotic in a plant protein–rich diet on growth ۵۹۴ digestive enzyme activities, antioxidant capacity, and immune-related genes mRNA transcript abundance in *Lates calcarifer* fry. Probiotic Antimicrob Prot. https://doi.org/10.1007/s12602-021

**Sangari, M., Sotoudeh, E., Bagheri, D., Morammazi, S. and Mozanzadeh. M.T., 2021.** Growth, body composition, and hematology of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) given feeds supplemented with organic acid salts (sodium acetate and sodium propionate). *Aquaculture International*, 29:261–273. https://doi.org/10.1007/s10499-020-00625-x

**Sotoudeh, E., Sangari, M., Bagheri, D., Morammazi, S. and Torfi Mozanzadeh, M., 2020.** Dietary organic acid salts mitigate plant protein induced inflammatory response and improve humoral immunity, antioxidative status and digestive enzyme activities in yellowfin seabream, *Acanthopagrus latus*. *Aquaculture Nutrition*, 26:1669-1680. https://doi.org/10.1111/anu.13112

**Sun, Y.Z., Yang, H.L., Ma, R.L., Song, K. and Li, J.S., 2012.** Effect of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecium* on growth performance, digestive enzymes and immune

response of grouper *Epinephelus coioides*. *Aquaculture Nutrition*, 18:281-289. https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00894.x

**Tran, N.T., Li, Z., Wang, S., Zheng, H., Aweya, J.J., Wen, X. and Li, S., 2020.** Progress and perspectives of short-chain fatty acids in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 12:283–298. DOI:10.1111/raq.12317.

**Wang, W., Sun, J., Liu, C. and Xue, Z., 2017.** Application of immunostimulants in aquaculture: Current knowledge and future perspectives. *Aquaculture Research*, 48:1–23. DOI:10.1111/are.13161.

**Wuertz, S., Schroeder, A. and Wanka, K.M., 2021.** Probiotics in Fish Nutrition—Long-Standing Household Remedy or Native Nutraceuticals? Water 2021, 13, 1348. https://doi.org/10.3390/w13101348

**Yilmaz, S., 2019.** Effects of dietary caffeic acid supplement on antioxidant, immunological and liver gene expression responses, and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* to *Aeromonas veronii*. *Fish and Shellfish Immunology*, 86, 384-392. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.068

**Zarei, S., Badzohreh, G., Davoodi, R., Nafisi Bahabadi, M., Salehi, F., 2021.** Effects of dietary butyric acid glycerides on growth performance, haematoimmunological and antioxidant status of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) fingerlings. *Aquaculture Research*, 52, 5840–5848. https://doi.org/10.1111/are.15458.

**Ziaee Nejad, S.**, Rafiee, GH, Mirvaghefi, A., Farahmand, H., 2015. Evaluation of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* effects on growth, survival and gut microflora of Arabian yellowfin seabream larvae (*Acanthopagrus arabicus*) with different application methods. Fisheries (Iran natural resources), 68 (2):287-298.

# Effects of dietary butyric acid and probiotic (*Lactobacillus plantarum*) on growth performance, digestive and antioxidant activities of Arabian yellowfin seabream (*Acanthopagrus arabicus* Iwatsuki, 2013)

Oosooli R.[1]; Kochanian P.[1]; Torfi Mozanzadeh M.[2*]; Mohammadian T.[3]; Yavari V.[1]

*Mansour.torfi@gmail.com

1-Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Khouzestan, Iran
2- Aquaculture Research Center -South of Iran, Iranian Fisheries Science Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension organization (AREEO), Ahvaz, Iran
3-Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

## Abstract

A 70-day study was conducted to examine the effects of dietary butyric and probiotic (*Lactobacillus plantarum*) supplementation on growth, digestive and antioxidant enzymes activities in Arabian yellowfin seabream (*Acanthopagrus arabicus*). In this regards, butyric (BA) and *L. plantarum* were used to design six experimental feeds as follow: 1-control (diet without supplements), 2- probiotic ($1.6 \times 10^8$ CFU/g) 3- BA 0.5 (0.5% BA supplementation), 4- BA 1.0 (1% BA supplementation), 5- PRO+BA0.5 (probiotic+0.5% BA), 6- PRO-BA 1.0 (probiotic+1% BA). Five hundred and forty fish with initial weight of 2.7 ± 0.1 g were distributed among 18 polyethylene tanks (300 L). Fish were fed with the experimental diets three times a day up to visual satiation making sure no feed remain at the bottom of the tanks. Water temperature and salinity were 31.3 °C and 46 ppt, respectively. Fish fed control and probiotic diets had higher growth rate and feed efficiency than other groups. Fish in PRO-BA1% group had higher total length than other groups. Alkaline phosphatase and chymotrypsin activities in fish fed mixture of probiotic and BA was higher than the other treatments. Amylase activity in fish fed BA1%, PRO-BA0.5 and PRO-BA1% was higher than other groups ($P < 0.05$). Protease, trypsin and lipase activities did not affect by dietary treatments. Glutathione level in the liver of fish fed control and PRO-BA0.5% was higher than other treatments. Superoxide dismutase activity in fish fed BA1% diet was lower than the other treatments. Catalase activity in fish fed mixture of probiotic and BA was higher than other groups. The findings of the present study demonstrated that inclusion of dietary BA alone might marginally compromise growth in *A. arabicus* juveniles, but using a mixture of probiotic and BA in both 0.5 and 1% can improve digestive enzyme activity and antioxidant capacity in this species.

**Keywords:** Butyric acid, growth indices, Arabian yellowfin seabream, *Lactobacillus plantarum*

*Corresponding author