University of Guilan with collaboration of Iranian Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 6, No. 3, 2020, pages: 55-67

Effects of different levels of dietary butyric acid on some growth performance, immunity and digestive enzymes activity of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus* Houttuyn, 1782)

Gholamreza Badzohreh*[1,2], Shirin Zarei[3], Reza Davoodi[1,2], Mahmoud Nafisi Bahabadi[1,2], Farzad Salehi[1,2], Vahid Morshedi[4], Ebrahim Sotudeh[1,2]

1- Department of Fisheries and Aquaculture, Agricultural and Natural Resources College, Persian Gulf University, Bushehr, Iran; 2- Department of Fisheries, Faculty of Nano and Bioscience and Technology, Persian Gulf University, Bushehr, Bushehr, Iran; 3- Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, Persian Gulf University, Bushehr, Bushehr, Iran; 4- Department of Fisheries and Biology, Persian Gulf Research Institute, Persian Gulf University, Bushehr, Iran

Received 4 May 2020 Accepted 17 September 2020

KEYWORDS

Butyrate

Organic acid

Yellowfin seabream

Enzyme

Non-specific immunity

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the effects of different dietary levels of butyric acid on growth performance, immunity and digestive enzyme activities in yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) (8.59 ± 0.33 g) at the period of 60 days. After 2-week adaptation, 120 fish with a density of 10 fish/tank in a completely randomized design were distributed to 12 tanks. Fish were fed with 4 levels of butyric acid including zero (control), 2.5 (T_1), 5 (T_2) and 10 g/kg (T_3) of diet 2 times per day. The results showed that different levels of butyric acid in diet had significant effects on growth performance and nutritional indices compared to the control ($p<0.05$). However, protein productive value of T_1 and control exhibited no significant difference ($p>0.05$). The food conversion ratio in control group was significantly higher than in the other treatments ($p<0.05$). Nonspecific immune responses, lysozyme activity and ACH50 in T_3 were also significantly higher than in the other treatments ($p<0.05$). Protease activity in T_3 and also amylase in T_2 and T_3 were significantly increased compared to the control ($p<0.05$), whereas lipase activity did not exhibit any significant difference ($p>0.05$). In conclusion, butyric acid, especially at the level of 10 g/kg of diet, displayed positive effects on the growth, immune indices and enzyme activities in yellowfin seabream.

*Corresponding author: badzohre@pgu.ac.ir

دانشگاه گیلان با مشارکت انجمن آبزی‌پروری ایران

تغذیه آبزیان

سال ششم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۹، صفحات ۶۷-۵۵

"مقاله پژوهشی"

تأثیر سطوح مختلف اسید بوتیریک در جیره غذایی بر برخی عملکرد رشد، ایمنی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus* Houttuyn, 1782)

غلامرضا بادزهره[1،2*]، شیرین زارعی[3]، رضا داوودی[1،2]، محمود نفیسی بهابادی[1،2]، فرزاد صالحی[1،2]، وحید مرشدی[4]، ابراهیم ستوده[1،2]

۱- گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، بوشهر؛ ۲- گروه شیلات، دانشکده علوم و فناوری نانو و زیستی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، بوشهر؛ ۳- گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، بوشهر؛ ۴- پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، بوشهر

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۶/۲۷

چکیده

این مطالعه به منظور ارزیابی تأثیر سطوح مختلف اسید بوتیریک جیره غذایی بر عملکرد رشد، ایمنی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی بچه ماهیان شانک زرد باله (۰/۳۳ ± ۸/۵۹ گرم) در مدت ۶۰ روز انجام شد. پس از دو هفته سازگاری، ماهیان در ۱۲ حوضچه با تراکم ۱۰ قطعه در هر مخزن در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و تکرار ذخیره‌سازی شدند. ماهیان با چهار سطح از اسید بوتیریک شامل صفر (گروه شاهد)، ۲/۵ (T_1)، ۵ (T_2) و ۱۰ (T_3) گرم در هر کیلوگرم جیره دو بار در روز تغذیه شدند. نتایج نشان داد که سطوح مختلف اسید بوتیریک جیره غذایی در مقایسه با شاهد تأثیر معنی‌داری بر عملکرد رشد و شاخص‌های تغذیه دارد ($p<0/05$). با وجود این، شاخص ارزش تولید پروتئین در ماهیان تغذیه شده در سطح ۲/۵ g/kg اسید بوتیریک (T_1) با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار نشان نداد ($p>0/05$). کارایی غذا در ماهیان تغذیه شده با تگروه شاهد به طور معنی‌دار نسبت به دیگر تیمارهای آزمایشی بالاتر بود ($p<0/05$). شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی، فعالیت لایزوزیم و عامل کمپلمان در تیمار T_3 به صورت معنی‌داری بالاتر از دیگر تیمارها بود ($p<0/05$). فعالیت آنزیم پروتئاز در تیمار T_3 و آمیلاز در تیمارهای T_2 و T_3 در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشت ($p<0/05$)، در حالی که فعالیت آنزیم لیپاز اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($p>0/05$). در مجموع، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که غنی‌سازی جیره‌های غذایی با اسید بوتیریک به‌خصوص در سطح ۱۰ g/kg تأثیر مثبت بر شاخص‌های رشد، ایمنی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی شانک زرد باله دارد.

کلمات کلیدی

بوتیرات

اسیدهای آلی

شانک زرد باله

آنزیم

ایمنی غیراختصاصی

نویسنده مسئول: badzohre@pgu.ac.ir

مقدمه

یکی از اولین راهکارهای دفاعی آبزی‌پروران در مواجهه با بیماری‌های باکتریایی، مصرف آنتی‌بیوتیک‌هاست. به دلیل خطر بروز پدیده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌های بیماری‌زا، سازمان‌های جهانی نظارت بر بهداشت و تغذیه، استفاده بی رویه و نادرست از این ترکیبات را در پرورش آبزیان مضر می‌دانند و خواستار محدودیت و حتی ممنوعیت مصرف آنها هستند (Lückstädt, 2008). اسیدهای آلی جزء افزودنی‌های غذایی هستند که ظرفیت خوبی برای جایگزینی با آنتی‌بیوتیک‌ها دارند (De Schryver et al. 2010). این ترکیبات به دلیل اثرات ضدباکتریایی خود، در صنعت مواد غذایی و تغذیه دام‌ها، سال‌ها استفاده، و اثرات ضد باکتریایی آنها ثابت شده است (Guilloteau et al. 2010).

در آبزیان ترکیبات مختلفی از اسیدهای آلی ارزیابی شده‌اند که یکی از این ترکیبات، اسید بوتیریک است. در دستگاه گوارش جانداران عالی و انسان، اسیدهای آلی کوتاه زنجیر از جمله اسید بوتیریک از تخمیر باکتریایی مواد گیاهی غیرقابل هضم و فیبر تولید می‌شود. سهم تولید اسید بوتیریک در دستگاه گوارش جانداران نسبت به دیگر اسیدهای آلی پایین‌تر (۱۵٪) است، اما این ترکیب به خاطر داشتن اثر ضدسرطانی، تأمین انرژی یاخته‌های کلون، حفظ سلامتی لایه پوششی روده، تقویت ایمنی و حذف عوامل آسیب‌رسان، نقش ویژه‌ای در سلامتی موجود دارد (Guilloteau et al. 2010). به طور کلی در آبزیان اسیدهای آلی با کاهش اسیدیته دستگاه گوارش و افزایش قابلیت هضم و جذب پروتئین و فسفر، بهبود قابلیت تبادلی یاخته‌های روده، افزایش جذب مواد معـدنی، حـذف باکتری‌های آسیب‌رسان و افزایش جمعیت باکتری-های مفید دستگاه گوارش می‌توانند عملکرد رشد و تغذیه را افزایش دهند (Hossein et al. 2007; Lückstädt, 2008). استفاده توأم پلی‌بتا هیدروکسی بـوتیرات و باکتری-های تجزیه‌کننده این ترکیب در جیره غذایی بچه ماهی سیبری (۱۱ گرمی) مشخص کرد که اسیدیته انتهای روده بچه‌ماهیان با مصرف این دو ترکیب کاهش یافته و محیط روده برای رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک مناسب شده است (Najdegerami et al. 2012). Liu و همکاران (۲۰۱۴) تأثیر مصرف توأم بوتیرات سدیم و روغن اکسید شده سویا در کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) مشخص کردند که استفاده از بوتیرات سدیم اثرات بد روغن اکسید شده سویا را بر دیواره روده کاهش داده و باعث بازسازی یاخته‌های پوششی روده می‌شود. در این مطالعه، غلظت ۱/۵ و ۳٪ اسید بوتیریک در جیره غذایی ماهی کپور معمولی، تراکم پرزهای روده را به طور معنی‌دار افزایش داد. در مطالعه De Schryver و همکاران (۲۰۱۰) مشخص شد که افزودن پلی هیدوکسی بوتیرات به روش افشانه روی جیره غذایی ماهی سی‌باس اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) تأثیر معنی‌داری بر میزان رشد و جمعیت باکتریایی دستگاه گوارش دارد. در بررسی تأثیر سوخت و سازی اسید بوتیریک در ماهی‌های دریایی نیز مشخص شد که افزودن اسید بوتیریک در سطح ۰/۳٪ به جیره غذایی ماهی سیم دریایی (*Sparus aurata*) با تأثیر مثبت روی جمعیت باکتریایی و سوخت و ساز یاخته‌های پوششی روده، جذب مواد مغذی و خصوصاً اسیدهای آمینه را بالا برده و باعث افزایش رشد و بهبود کارایی غذا می‌شود (Robels et al. 2013). مطالعه بر روی تأثیر درصدهای مختلف پتاسیم دی فورمات، اسید سیتریک و کلسیم لاکتات در بچه ماهی شوریده قرمز (*Sciaenops ocellatus*) نشان داد که این ترکیبات می‌توانند فعالیت آنزیم‌های گوارشی ترشح یافته از لوزالمعده و روده را افزایش داده و به طور معنی‌دار عملکرد رشد را بهبود بخشند (Castilo et al. 2014). در مطالعات دیگر، اسید آلی تجاری (Activate DA) و پتاسیم دی‌فورمات به‌ترتیب در گربه‌ماهی زرد (*Pelteobagrus fulvidraco*) و هیبرید تیلاپیای نیل (*O. aureus* × *Oreochromis niloticus*) در عملکرد شاخص‌های رشد تغییری ایجاد نکرد که برخلاف نتایج مطالعات ذکر شده قبلی بود (Zhou et al. 2009; Zhu et al. 2014). مطالعه دیگر روی تاثیر ۰/۵ و ۱ درصد سیترات سدیم بر شاخص‌های رشد و فعالیت آنزیمی بچه ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*) نشان داد که عملکرد رشد و فعالیت آنزیم پروتئاز بهبود یافته، اما فعالیت آنزیمی آمیلاز و لیپاز افزایش معنی-داری نداشته است (ستوده و همکاران، ۱۳۹۸).

ماهی شانک زرد باله از خانواده شانک ماهیان (Sparidae) هرمافرودیت (پیش نر) بوده که در آب‌های کم عمق و ساحلی

خلیج فارس، سواحل اقیانوس هند، سواحل شمال ژاپن و سواحل جنوب استرالیا و شرق آفریقا دیده می‌شود (Tsui et al. 2016). این ماهی جزو ماهیان دریایی خوش خوراک محسوب شده و از نظر صیادی و تکثیر و پرورش از اهمیت زیادی در جنوب کشور برخوردار است (طرفی موزان‌زاده و همکاران، ۱۳۹۵). با وجود تأثیرات مفید اسیدهای آلی با ساختار گلیسریدی در آبزیان، تاکنون تأثیر این نوع ترکیب بر ماهی شانک زرد باله مطالعه نشده است. لذا هدف از این مطالعه بررسی تأثیر ترکیب اسید بوتیریک بر عملکرد رشد، ایمنی و فعالیت آنزیمی ماهی شانک زرد باله بود.

مواد و روش‌ها

ماهی و شرایط پرورش

این مطالعه در بخش تحقیقات آبزیان پژوهشکده دانشگاه خلیج فارس انجام شد. اسید بوتیریک تجاری مورد استفاده در این مطالعه با نام تجارتی C4® دارای ساختار گلیسریدی بوده و برای غنی‌سازی جیره غذایی دام‌ها و آبزیان معرفی شده است. این ترکیب از نمایندگی شرکت Silco در ایران (سینا دام) تهیه شد. این محصول از مخلوط شکل منو، دی و تری گلیسرید اسیدهای چرب کوتاه زنجیره تشکیل شده که ۶۵٪ آن را منوبوتیرات تشکیل می‌دهد.

در این آزمایش از ۱۲ مخزن پلی‌اتیلنی ۳۰۰ لیتری مدور استفاده شد. حجم آب مخازن در مدت ۶۰ روز آزمایش ۲۰۰ لیتر بود. هر مخزن با یک سنگ هوا به صورت جداگانه، هوادهی شد. مخازن در محیط سرپوشیده قرار داشتند و به صورت کاملاً تصادفی چیدمان آنها انجام شد. از دوره نوری طبیعی با ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در این مطالعه استفاده شد. منبع آب سالن پرورش از آب دریا تأمین شد که پس از ته‌نشین شدن مواد زائد، آب از فیلتر شنی و سپس از UV عبور کرده و از طریق پمپ وارد ایستگاه و در نهایت در مخازن توزیع شد.

برای سازگاری با شرایط پرورش، ابتدا ۱۲۰ قطعه بچه‌ماهی با میانگین ۰/۳۳ ± ۸/۵۹ گرم به مدت دو هفته با استفاده از غذای تجاری تغذیه و سپس، در یک طرح کاملاً تصادفی بین ۱۲ مخزن پلی‌اتیلن در قالب ۴ تیمار و سه تکرار توزیع شدند (۱۰ قطعه بچه ماهی به ازای هر مخزن). شاخص‌های کیفی آب شامل درجه حرارت، شوری، pH و اکسیژن محلول به صورت روزانه اندازه‌گیری شد. در طول دوره آزمایش میانگین دما ۲۸-۲۷ درجه سانتی‌گراد، میانگین شوری آب ۴۰ گرم در لیتر، pH ۷/۹۷-۸/۱ و اکسیژن محلول ۸۰-۷۰ درصد حالت اشباع بود.

ساخت جیره‌های غذایی و تیمارها

در این مطالعه، از غذای تجاری شرکت کیمیاگران تغذیه، (شهرکرد) برای تغذیه ماهی شانک زرد باله استفاده شد (جدول ۱). سطوح مختلف اسید بوتیریک تجاری C4® صفر (شاهد)، T_1: ۲/۵، T_2: ۵ و T_3: ۱۰ گرم به ازای هر کیلوگرم غذای تجاری اضافه شدند. برای افزودن اسید بوتیریک تجاری به جیره‌های غذایی این اسید آلی ابتدا در ۱۰۰ میلی لیتر کلروفرم حل، و سپس به روی تمامی جیره‌ها و همچنین، جیره شاهد افشانه شد. برای اطمینان از خارج شدن کلروفرم از غذاهای تجاری، تمامی جیره‌ها به مدت ۸ ساعت در معرض هوا قرار گرفتند (Najdegerami et al. 2012). برای جلوگیری از هدررفت و خارج شدن اسید بوتیریک از جیره-های غذایی، تمامی آنها، از جمله جیره شاهد، با ژلاتین (غلظت ۳٪) پوشش‌دار شدند. غذادهی به صورت دستی و تا حد سیری در دو نوبت در ساعات ۸ صبح و ۱۶ بعدازظهر انجام شد. برای محاسبه غذای خورده نشده، یک ساعت بعد از غذادهی، مقدار غذای خورده نشده با سیفون جمع آوری، و پس از خشک کردن در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، توزین (توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم) می‌شد. میزان تعویض روزانه آب در مخازن نیز ۲۰ تا ۲۵٪ بود.

برای زیست‌سنجی و نمونه‌گیری از ماهیان مورد مطالعه در پایان دوره آزمایش (۶۰ روز)، نمونه‌برداری انجام شد. برای نمونه‌برداری، ابتدا ماهیان ۲۴ ساعت قطع غذا شدند. سپس، به صورت تصادفی از هر تکرار به تعداد کافی ماهی انتخاب، و پس از بیهوشی با محلول ۲- فنوکسی اتانول (۲۰۰ ppm)، محاسبه شاخص‌هایی مانند افزایش وزن بدن، کارایی غذا (feed conversion ratio)، ارزش تولید پروتئین (protein productive value)، بازماندگی و ضریب چاقی

با روابط زیر انجام شد. سنجش شیمیایی لاشه و غذای تجاری نیز با استفاده از روش (AOAC, 2005) انجام شد.

افزایش وزن بدن (گرم) = میانگین وزن اولیه بدن (گرم) – میانگین وزن نهایی بدن (گرم)
کارایی غذا (گرم) = مقدار غذای خورده شده (گرم) / افزایش وزن زیتوده (گرم)
ارزش تولیدپروتئین (٪) = ۱۰۰× (پروتئین خورده شده (گرم) / افرایش پروتئین بدن (گرم))
بازماندگی (٪) = ۱۰۰ × (تعداد ماهی در ابتدای دور پرورش/ تعداد ماهی در انتهای دوره پرورش)
ضریب چاقی = ۱۰۰ × (طول کل بدن بر حسب سانتیمتر به توان ۳ / میانگین وزن به گرم)

جدول ۱ ترکیب شیمیایی غذای مورد استفاده در آزمایش حاضر (شرکت کیمیاگران تغذیه، شهرکرد، ایران).

ترکیبات	پروتئین	چربی	فیبر	فسفر	خاکستر	حداکثر رطوبت
درصد تقریبی	۵۲	۱۰	۳	۲	۱۲	۱۰

سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی

برای سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی در پایان آزمایش و پس از بیهوشی ماهیان، دستگاه گوارش بچه‌ماهیان شانک زردباله در کنار ظرف حاوی یخ جداسازی و تا زمان سنجش فعالیت آنزیم‌ها در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای استخراج عصاره آنزیمی، روده ماهی‌ها در دمای اتاق از انجماد خارج، سپس با بافر تریس اسیدی Tris-HCl ۱۰۰ میلی مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و تریتون X-100 ۰/۱٪ با نسبت وزنی یک گرم نمونه در برابر ۹ میلی لیتر بافر، همگن شدند. pH بافر روی ۷/۸ تنظیم شد. سوسپانسیون به‌دست آماده در سانتریفیوژ (Cambi 514R, South Korea) با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت (Chakrabarti et al. 2011) و سوپرناتانت (مایع رویی) جمع‌آوری‌شده تا اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. فعالیت آنزیمی پروتئاز کل بر اساس تجزیه کازئین به‌عنوان سوبسترا و با استفاده از روش Walter و همکاران (۱۹۸۴) اندازه‌گیری شد. برای تعیین فعالیت آنزیم آمیلاز از نشاسته به عنوان سوبسترا استفاده شد. نشاسته تحت اثر آنزیم تجزیه شده و تولید مالتوز کرد که از طریق رنگ‌سنجی و تغییر شدت رنگ در مجاورت معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید قابل سنجش است. جذب نوری محلول استاندارد مالتوز و عصاره آنزیمی در ۵۴۰ نانومتر بود (Bernfeld, 1955; Worthington, 1991). فعالیت آنزیم لیپاز در بچه‌ماهیان شانک زرد باله نیز با اندازه‌گیری میزان اسیدهای چرب آزاد شده بر اساس تجزیه آنزیمی تری-گلیسریدها در حضور روغن زیتون و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. امولسیون تحت اثر آنزیم تجزیه و تبدیل به اسید چرب می‌شد که با تغییر pH از حالت اسیدی به قلیائی قابل سنجش بود (Borlongan, 1990). میزان پروتئین تمامی نمونه‌ها نیز با روش برادفورد و با استفاده از غلظت‌های مختلف آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد سنجیده شد (Bradford, 1976).

فعالیت لایزوزیم

اندازه‌گیری لایزوزیم بر مبنای تجزیه باکتری گرم مثبت (*Micrococcus lysodeilcticus*) حساس به لایزوزیم اندازه‌گیری شد (Esteban et al. 2001). به‌طور خلاصه، ۲۵ میکرولیتر از نمونه سرم و ۱۷۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به کووت اضافه شدند و اجازه داده شد تا این واکنش به مدت یک ساعت در دمای اتاق $25\ ^{\circ}C$ صورت گیرد. آنگاه جذب نوری با استفاده از اسپکتروفتومتر در صفر و سه دقیقه و در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد.

فعالیت عامل کمپلمان ACH50

فعالیت عامل کمپلمان سرم بر اساس تجزیه (همولیز) گلبول-های قرمز خرگوش اندازه‌گیری شد. حجم سرمی که باعث

ترسیب ۵۰٪ گلبول قرمز شود، مبنای تعیین فعالیت مسیر فرعی کمپلمان سرم بود (Yano, 1992).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (version 18) انجام شد. برای اطمینان از نرمال بودن داده‌های گردآوری شده، از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف استفاده شد. تفاوت‌های احتمالی بین تیمارها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها نیز از آزمون دانکن (Duncan) با سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده شد.

نتایج

جدول ۲ شاخص‌های رشد و تغذیه بچه ماهیان شانک زرد باله تغذیه شده با جیره‌های غنی شده با اسید بوتیریک را نشان می‌دهد. در این مطالعه، غنی‌سازی جیره‌ها با اسید بوتیریک تأثیر معنی‌داری بر عملکرد رشد و تغذیه بچه‌ماهیان شانک زردباله داشت. میانگین وزن نهایی ماهیان در تیمارهای T_2 و T_3 به ترتیب با ۰/۳۱ ± ۱۷/۳ و ۰/۱۲ ± ۱۶/۶۶ گرم به‌طور معنی‌دار بیش از جیره شاهد و T_1 بود ($p<0/05$) و کمترین میزان این شاخص با ۰/۶۳ ± ۱۴/۳۳ گرم در جیره شاهد مشاهده شد. شاخص کارایی غذا در تمامی تیمارهای غنی‌شده با اسید بوتیریک به‌طور معنی‌دار بالاتر از تیمار شاهد بود ($p<0/05$)، اما در بین تیمارهای غنی شده با اسید بوتیریک اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$). ارزش تولید پروتئین و افزایش وزن در تیمار T_3 و T_2 به‌طور معنی‌دار بالاتر از گروه شاهد و تیمار T_1 بود و کمترین میزان ارزش تولید پروتئین و افزایش وزن به ترتیب با ۱/۶۴ ± ۲۵/۲ و ۰/۱۸ ± ۵/۳۶ در گروه شاهد مشاهده شد. شاخص وضعیت و میزان بازماندگی نیز بین تیمارها اختلاف معنی‌دار نشان نداد ($p>0/05$).

جدول ۲ عملکرد رشد و تغذیه بچه‌ماهی شانک زردباله تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی در پایان ۶۰ روز (میانگین ± SE).

شاخص‌ها	تیمارها			
	شاهد	T_1	T_2	T_3
وزن نهایی (گرم)	۱۴/۳۳ ± ۰/۶۳^{a}	۱۵/۷ ± ۰/۱۱^{ab}	۱۷/۳۳ ± ۰/۳۱^{b}	۱۶/۶۶ ± ۰/۱۲^{b}
کارایی غذا (گرم/گرم)	۲/۲۹ ± ۰/۱۸^{a}	۱/۷۷ ± ۰/۰۷^{b}	۱/۵۳ ± ۰/۲۰^{b}	۱/۱۸۳ ± ۰/۰۳^{b}
افزایش وزن (گرم)	۵/۳۶ ± ۰/۱۸^{a}	۶/۷۳ ± ۰/۹^{ab}	۸/۱۶ ±۰/۲۹^{b}	۷/۶۳ ± ۰/۳۷^{b}
ارزش تولید پروتئین (٪)	۲۵/۲ ± ۱/۶۴^{a}	۳۰/۱ ± ۲/۰۴^{a}	۴۳/۵۴ ± ۳/۹۴^{b}	۴۹/۷۴ ± ۲/۶۴^{b}
شاخص وضعیت	۲/۰۱	۲/۱	۲/۲۱	۲/۱۱
درصد بازماندگی	۱۰۰	۱۰۰	۹۸	۱۰۰

اعداد (میانگین ± خطای استاندارد) با حروف انگلیسی غیرمشابه در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است ($p<0/05$).

نتایج مربوط به شاخص‌های ایمنی سرم نیز در جدول ۳ نمایش داده شده است. میزان لایزوزیم سرم خون بچه‌ماهیان شانک زردباله بین تیمار شاهد و تیمارهای غنی شده با اسید بوتیریک اختلاف معنی‌دار نشان داد ($p<0/05$). کمترین میزان لایزوزیم با ۱/۳۴ ± ۵۱/۱ (واحد در میلی‌لیتر در دقیقه) در گروه شاهد مشاهده شد. در بین تیمارهای غنی شده با اسید بوتیریک، روند افزایش سطح لایزوزیم سرم دیده شد. این در حالی بود که تیمار T3 با ۱/۰۵ ± ۸۵/۴ (U/mL/min) بیشترین سطح لایزوزیم را در بین تیمارهای مورد مطالعه داشت ($p<0/05$). فعالیت عامل کمپلمان سرم در تیمارهای مورد مطالعه نیز اختلاف معنی‌دار نشان داد. میزان فعالیت عامل کمپلمان با افزایش سطوح اسید بوتیریک جیره با افزایش معنی‌دار همراه بود ($p<0/05$). بیشترین میزان فعالیت کمپلمان در جیره T3 با ۲/۴۵ ± ۱۰۰ (U/mL) مشاهده شد که با دیگر تیمارهای مورد مطالعه اختلاف معنی‌دار داشت ($p<0/05$). کمترین میزان فعالیت

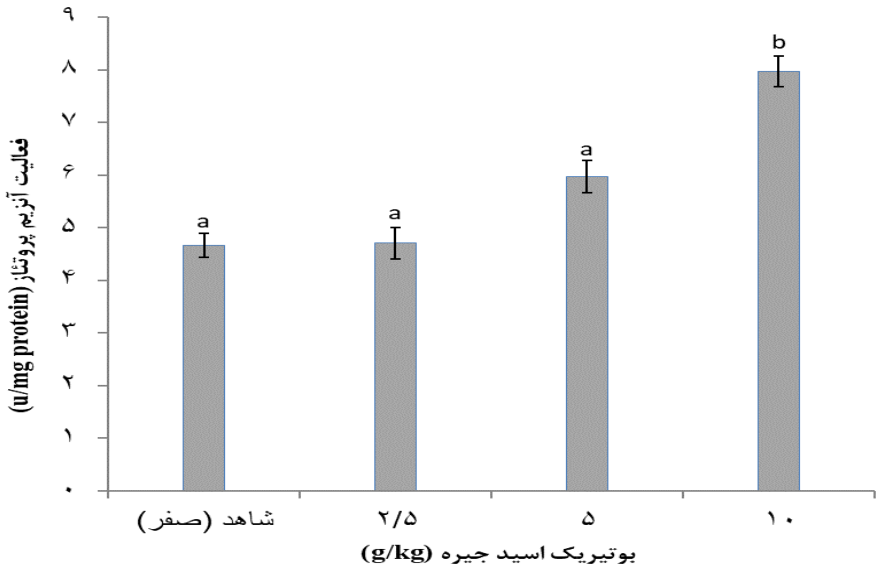
عامل کمپلمان نیز در گروه شاهد مشاهده شد و بین گروه شاهد و اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$).

جدول شماره ۳ مقایسه برخی شاخص‌های ایمنی سرم بچه ماهیان شانک زرد باله در پایان دوره (میانگین ± SE).

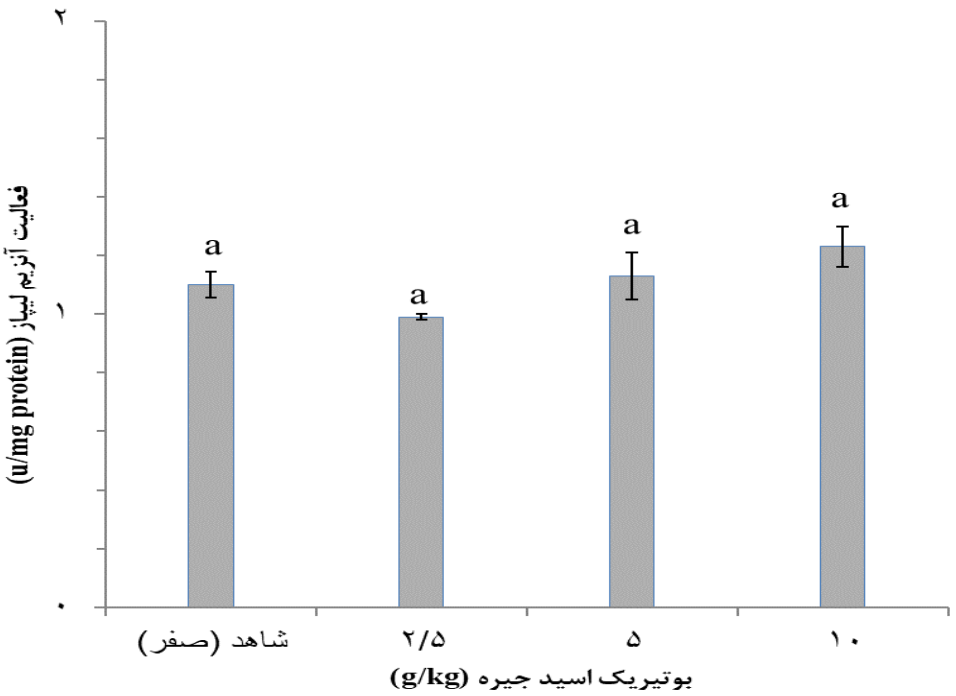
شاخص‌ها	تیمارها			
	شاهد	T_1	T_2	T_3
لایزوزیم (U/mL/min)	۵۱/۱ ± ۱/۳۴^{a}	۶۲/۸ ± ۱/۱۴^{b}	۶۷ ± ۲/۰۳^{b}	۸۵/۴ ± ۱/۰۵^{c}
فعالیت عامل کمپلمان (U/mL)	۳۸/۱ ± ۱/۱۱^{a}	۴۲/۱ ± ۱/۰۴^{a}	۷۵/۹ ± ۲/۱۵ ^{b}	۱۰۰ ± ۲/۴۵^{b}

اعداد (میانگین ± خطای استاندارد) با حروف انگلیسی غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$).

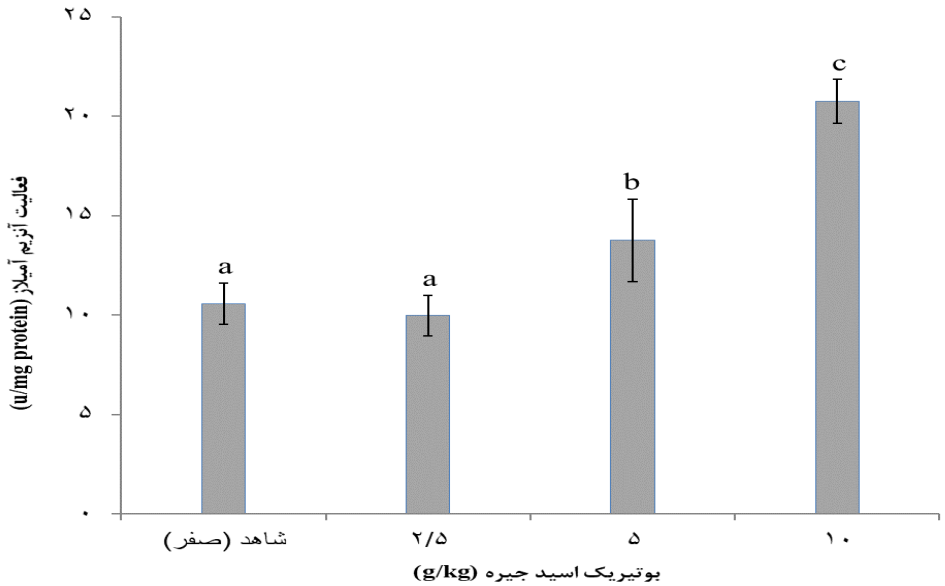
نتایج مربوط به ارزیابی فعالیت آنزیم‌های گوارشی بچه-ماهیان شانک زردباله در شکل‌های ۱ تا ۳ نمایش داده شده است. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد غنی‌سازی جیره‌ها با اسید بوتیریک تأثیر معنی‌دار بر فعالیت آنزیم‌های پروتئاز و آمیلاز دستگاه گوارش این ماهیان دارد ($p<۰/۰۵$). این در حالی است که فعالیت آنزیم لیپاز در بین تمامی تیمارهای مورد بررسی، اختلاف معنی‌دار نشان نداد ($p>۰/۰۵$). بیشترین فعالیت آنزیم پروتئاز و آمیلاز در تیمار غنی‌شده با ۱٪ اسید بوتیریک مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). فعالیت آنزیم پروتئاز در گروه شاهد و تیمارهای T1 و T2 اختلاف معنی‌دار نشان نداد ($p>۰/۰۵$).



شکل ۱ فعالیت آنزیم پروتئاز روده ماهی شانک زرد باله تغذیه شده با سطوح مختلف اسید بوتیریک بعد از ۶۰ روز پرورش. حروف کوچک غیرمشترک بیانگر اختلاف معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$؛ $n=۳$).



شکل ۲ فعالیت آنزیم لیپاز روده ماهی شانک زرد باله تغذیه شده با سطوح مختلف اسید بوتیریک بعد از ۶۰ روز پرورش. حروف کوچک غیر مشترک بیانگر اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵؛ n=۳).



شکل ۳ فعالیت آنزیم آمیلاز روده ماهی شانک زرد باله تغذیه شده با سطوح مختلف اسید بوتیریک بعد از ۶۰ روز پرورش. حروف کوچک غیرمشترک بیانگر اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵؛ n=۳).

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد استفاده از اسید بوتیریک در جیره غذایی بچه‌ماهی شانک زردباله موجب افزایش عملکرد رشد و تغذیه می‌شود. مطالعات تأثیر اسید بوتیریک در جیره غذایی آبزیان نشان می‌دهد که این ترکیب می‌تواند شاخص‌های رشد را در آبزیان افزایش دهد (Sukor et al. 2016; Chow et al. 2017; Omosowone et al. 2018). این در حالی است که مطالعه بر روی تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و ماهی هامور (*Epinephelus lanceolatus*) نشان می‌دهد که استفاده از اسید بوتیریک تأثیری بر عملکرد رشد ندارد (Najdegerami et al. 2012; Lin et al. 2017). در آبزیان اسیدهای آلی با افزایش جذب مواد معدنی، به‌خصوص فسفر، افزایش جذب اسیدهای آمینه، اصلاح میکروبیوتای روده و بهبود فعالیت آنزیمی دستگاه گوارش، باعث افزایش رشد می‌شوند (Baruha et al. 2007; Hossein et al. 2007; Ng et al. 2009,). در هم‌سویی با مطالعه حاضر، ترکیب اسید بوتیریک در جیره غذایی ماهی سیم سیاه دریایی (*Acanthopagrus schlegelii*) و سیم دریایی (*Sparus aurata*) شاخص‌های رشد را به‌طور معنی‌دار افزایش داد (Volatiana et al. 2019). بررسی تأثیر کمی استفاده از اسیدهای آلی بر رشد آبزیان نشان می‌دهد که بهبود شاخص‌های رشد متأثر از این ترکیبات، بستگی به گونه و سن آبزی، نوع ترکیب اسید آلی و دوز مصرفی آن، مدت استفاده و غیره خواهد داشت (Wing-Keong and Chik-Boon, 2017).

در سال‌های اخیر به دلیل شیوع بیماری‌های مختلف و محدودیت‌های موجود در استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، بر روی کاربرد ترکیبات جایگزین آنها در جهت تقویت دستگاه ایمنی آبزیان، بیش از گذشته مطالعه شده است. در این راستا، مطالعه حاضر نیز ظرفیت اسید بوتیریک را به عنوان یک ترکیب جایگزین آنتی بیوتیک در ماهی شانک زرد باله بررسی کرده است. مطالعات انجام شده بر روی اثرات اسیدهای آلی بر ایمنی انسان، دام‌ها و آبزیان نشان می‌دهد که این ترکیبات از جمله اسید بوتیریک می‌توانند دستگاه ایمنی را تقویت کنند (Guilloteau et al. 2010; Anuta et al. 2011). مطالعات انجام شده روی تأثیر اسید سیتریک بر دستگاه ایمنی ماهی کپور هندی (*Labeo rohita*) و اسید بوتیریک بر دورگه گربه ماهی آفریقایی × گربه ماهی سر گنده (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*) نشان می‌دهد که این ترکیبات می توانند پروتئین‌های سرم (آلبومین و گلوبولین) و شاخص‌های خونی (هموگلوبین، هماتوکریت و مونوسیت‌ها) را به‌طور معنی‌دار افزایش دهند و دستگاه ایمنی آبزی را تقویت کند (Baruh et al. 2009; Chow et al. 2017). دستگاه ایمنی هومورال و ترکیبات مؤثر در آن مانند لایزوزیم و عامل کمپلمان یکی از سدهای دفاعی بسیار قدرتمند آبزیان در برابر عوامل بیماری‌زاست. لایزوزیم می‌تواند با حذف باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی و مثبت، مقاومت آبزیان را در برابر بیماری‌ها افزایش دهد و از تلفات آنها جلوگیری کند. عامل کمپلمان نیز با روش مشابه می‌تواند با باکتری‌های بیماری‌زا مقابله کند. در مطالعه حاضر، سطوح اسید بوتیریک، میزان لایزوزیم و عامل کمپلمان سرم بچه‌ماهیان شانک زردباله را افزایش داده است. مکانیسم‌های متفاوتی از نحوه تأثیر اسیدهای آلی بر تقویت دستگاه ایمنی آبزیان، همچون افزایش بیان ژن ایمنی لایه ترشحی روده، افزایش سطح اینترلوکین بتای روده، افزایش سطح پروتئین خون و اصلاح میکروبیوتای روده گزارش شده است (Abu-Elela. et al 2015; Safari et al. 2016; Dawood et al. 2019). در مطالعه حاضر، بهبود شاخص‌های ایمنی ممکن است ناشی از این موارد باشد، اما این موضوع نیاز به بررسی بیشتر دارد.

میزان فعالیت آنزیمی در ماهی‌ها تحت تأثیر گونه، عادت غذایی، ترکیب شیمیایی غذا، ژنتیک، ریخت‌شناسی روده و غیره تغییر خواهد کرد (Bairagi et al. 2002). در این مطالعه، فعالیت آنزیم پروتئاز و آمیلاز در تیمار ۱٪ اسید بوتیریک (T3) به طور معنی‌دار بیش از دیگر تیمارها بود. این در حالی است که فعالیت آنزیم لیپاز اختلاف معنی‌داری را در بین تیمارهای مورد مطالعه نشان نداد. مطالعه بر روی کاربرد اسیدهای آلی در جیره غذایی آبزیان، نشان می‌دهد که این ترکیبات به عنوان یک افزودنی غذایی می‌توانند فعالیت آنزیمی را در آبزیان افزایش دهند (Castilo et al. 2014). افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی، نقش مهمی در هضم و

جذب غذا و افزایش رشد آبزیان دارد. به نظر می‌رسد که یکی از دلایل بهبود عملکرد رشد ماهی شانک زردباله در این مطالعه، به خاطر این موضوع باشد. در مطالعه مشابه، Sotudeh و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که افزودن نمک‌های اسیدهای آلی (پروپیونات و استات سدیم) به جیره غذایی ماهی شانک زردباله، فعالیت آنزیم‌های پپسین، تریپسین و لیپاز را به‌طور معنی‌دار افزایش می‌دهد. این در حالی بود که فعالیت آنزیم آمیلاز در تیمارهای مورد مطالعه تغییر معنی‌داری نشان نداد. در مطالعه دیگر، افزودن اسید بوتیریک به جیره غذایی سیم سیاه دریایی، فعالیت آنزیم پروتئاز را افزایش داد، اما فعالیت آنزیم‌های لیپاز و آمیلاز را تغییری نداد (Volatiana et al. 2019). مکانیسم اثر اسیدهای آلی در تغییر فعالیت آنزیم‌های گوارشی در آبزیان می‌تواند ناشی از اثرات مستقیم و یا غیرمستقیم آنها باشد. یکی از اثرات غیرمستقیم و مفید اسیدهای آلی کمک به تغییر جمعیت باکتری‌های دستگاه گوارش است. به‌طور کلی، میکربیوتای بومی دستگاه گوارش آبزیان نقش بسیار مهمی در حفظ سلامتی و رشد آبزیان داشته و تحت تأثیر عوامل مختلف، مانند تغذیه، ژنتیک، محیط و غیره تغییر می‌کند (Nayak, 2010). یکی از مهم‌ترین گروه از باکتری‌های دستگاه گوارش آبزیان که اثرات مفیدی بر سلامت و رشد آبزیان دارند، باکتری‌های اسید لاکتیک هستند. اسیدهای آلی به‌واسطه قدرت اسیدی خود می‌توانند اسیدیته دستگاه گوارش آبزیان را کاهش دهند. به این ترتیب، آنها می‌توانند ضمن حذف باکتری‌های آسیب‌زای دستگاه گوارش، بستر مناسب برای رشد باکتری‌های اسید لاکتیک را نیز فراهم کنند (Denev et al. 2009). این گروه از باکتری‌ها در صورت استقرار پایدار در روده می‌توانند از مکانیسم‌های مختلفی همچون تولید آنزیم‌های گوارشی خاص خود به هضم و جذب مواد غذایی کمک مضاعف کرده و عملکرد رشد آبزیان را افزایش دهند (Hassan et al. 2014). برخی دیگر از مطالعات نشان داده است که اسیدهای آلی با کاهش pH محیط دستگاه گوارش، می‌توانند قدرت ترشحی روده و لوزالمعده را تحریک کرده و تولید آنزیم‌های گوارشی را افزایش دهند (Castilo et al. 2014). تحریک تبدیل پپسینوژن به پپسین، افزایش یاخته‌های ترشحی روده و تأثیر افزایشی بر فعالیت لوزالمعده، از دیگر اثرات مفید این ترکیبات است (Volatiana et al. 2019; Sotudeh et al. 2020).

به طور کلی، نتیجه مطالعه حاضر نشان داد که اسید بوتیریک قادر است عملکرد رشد ماهی شانک زردباله را افزایش دهد. استفاده از ۰/۱٪ از این ترکیب، تأثیر افزایشی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی پروتئاز و آمیلاز و افزایش شاخص‌های ایمنی ماهی شانک زردباله دارد و می‌توان از آن به عنوان یک ترکیب افزودنی در جیره غذایی این ماهی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه خلیج فارس بوشهر برای حمایت مالی از این پژوهش تشکر می‌گردد.

منابع

ستوده، ا.، دهقانی، م.، سقایی، س.، اسماعیلی، ا.، احمدی، ا. ۱۳۹۸. شاخص‌های رشد، وضعیت آنتی‌اکسیدانی و جمعیت لاکتوباسیلوس‌های روده بچه ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus* Houttuyn, 1782) تغذیه شده با جیره‌های حاوی سیترات سدیم. تغذیه آبزیان ۲: ۱۵-۱.

طرفی موزن‌زاده، م.، پقه، ا.، ذبایح نجف آبادی، م.، غفله مرمضی، ج.، حسینی، س.، مهرجویان، ش.، اصولی، ر.، سقاوی، ح.، منعم، ج. ۱۳۹۵. درصد غذادهی بهینه در دوره نرسری ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*). مجله علمی شیلات ایران ۲۷: ۱۶۹-۱۶۵.

Abu Elala, N.M., and Ragaa, N.M. 2015. Eubiotic effect of a dietary acidifier (potassium diformate) on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. Journal of Advanced Research 6: 621-629.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. Official Methods of Analysis (16th edn). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA, USA, 771 p.

Anuta, J.D., Buentello, A., Patnaik, S., Lawrence, A. L., Mustafa, A., Hume, M.E., Kemp, M. C. 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: 834-844.

Bairagi, A., Ghosh, K., Sen, S.K., Ray, A.K. 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. Aquaculture International 10: 109-121.

Baruah, K., Sahu, N.P., Pal, A.K., Jain, K.K., Debnath, D., Mukherjee, S.C. 2007. Dietary microbial phytase and citric acid synergistically enhances nutrient digestibility and growth performance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles at sub-optimal protein level. Aquaculture Research 38: 109-120.

Bernfeld, P. 1955. Amylases α and β. In: Colowick, P., Kaplan, N.O. (Eds.), Methods in Enzymology. Academic Press, New York, 1: 149-157.

Borlongan, I.G. 1990. Studies on the digestive lipases of milkfish, *Chanos chanos*. Aquaculture 89: 315-325.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

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

Chakrabarti, R., Rathore, R. M. 2009. Ontogenic changes in the digestive enzyme patterns and characterization of proteases in Indian major carp *Cirrhinus mrigala*. Aquaculture Nutrition 16: 569-581.

Chow, E.P.Y., Liong, K.H., Schoeters, E. 2017. Dietary encapsulated butyric Acid (Butipearl [TM]) and microemulsified carotenoids (Quantum GLO [TM] Y) on the growth, immune parameters and their synergistic effect on pigmentation of hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* x *Clarias gariepinus*). Fisheries and Aquaculture Journal 8: 1-7.

Da Silva, B.C., Vieira, F.N., Mourino, J.L.P., Bolivar, N., Seiffert, W.Q. 2015. Butyrate and propionate improve the growth performance of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Research 47: 612-623.

Dawood, M.A.O., Eweedah, N.M., Elbialy, Z.I., Abdelhamid, A.I. 2020. Dietary sodium butyrate ameliorated the blood stress biomarkers, heat shock proteins, and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to heat stress. Journal of Thermal Biology 88: 102500.

Denev, S., Staykov, Y., Moutafchieva, R., Beev, G. 2009. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. International Aquatic Research 1: 1-29.

De Schryver, P., Sinha, A.K., Kunwar, P.S., Baruah, K., Verstraete, W., Boon, N., De Boeck, G., Bossier, P. 2010. Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Applied Microbiology and Biotechnology 86: 1535-1541.

Erlanger, B., Kokowsky, N., Cohen, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archives of Biochemistry and Biophysics 95: 271-278.

Esteban, M., Cuesta, A., Ortuno, J., Meseguer, J. 2001. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata L.*) innate immune system, Fish and Shellfish Immunology 11: 303-315.

Guilloteau, P., Martin, L., Eeckhaut, V., Ducatelle, R., Zabielski, R. 2010. From the gut to the peripheral tissues: The multiple effects of butyrate. Nutrition Research Reviews 23: 366-384.

Hossain, M.A., Pandey, A., Satoh, S. 2007. Effect of organic acids on growth and phosphorus utilization in red sea bream *Pagrus major*. Fisheries Science 73: 1309-1317.

Hassan, M., Wafa, M., Soltan, M., Goda, A. Mogheth, N. 2014. Effect of dietary organic salts on growth, nutrient digestibility, mineral absorption and some biochemical indices of Nile tilapia; *Oreochromis niloticus* L. fingerlings. World Applied Sciences Journal 29: 47-55.

Lin, Y.H., Cheng, M.Y. 2017. Effects of dietary organic acid supplementation on the growth, nutrient digestibility and intestinal histology of the giant grouper *Epinephelus lanceolatus* fed a diet with soybean meal. Aquaculture 469: 106-111.

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

Lückstädt, C. 2008. The use of acidifiers in fish nutrition. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources 3: 1-8.

Merrifield, D.L., Bradley, G., Baker, R.T.M., Dimitroglou, A., Davies, S.J. 2010. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. Aquaculture Nutrition 16: 504-510.

Najdegerami, E.H., Tran, T.N., Defoirdt, T., Marzorati, M., Sorgeloos, P., Boon, N., Bossier, P. 2012. Effects of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) on Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) fingerlings performance and its gastrointestinal tract microbial community. FEMS Microbiology Ecology 79: 25-33.

Nayak, S.K. 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. Fish and Shellfish Immunology 29: 2-14.

Ng, W.K., Koh, C.B., Sudesh, K. 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.

Omosowone, O.O., Dada, A. A., Adeparusi, E.O. 2018. Comparison of dietary butyric acid supplementation effect on growth performance and body composition of *Clarias gariepinus* and *Oreochromis niloticus* fingerlings. Iranian Journal of Fisheries Sciences 17: 403-412.

Robles, R., Lozano, A. B., Sevilla, A., Márquez, L., Nuez-Ortín, W., Moyano, F. J. 2013. Effect of partially protected butyrate used as feed additive on growth and intestinal metabolism in sea bream (*Sparus aurata*). Fish Physiology and Biochemistry 39: 1567-1580.

Safari, R., Hoseinifar, S.H. Kavandi, M. 2016. Modulation of antioxidant defence and immune response in zebra fish (*Danio rerio*) using dietary sodium propionate. Fish Physiology and Biochemistry 42: 1733-1739.

Sukor, S.A., Taher, S., Ehteshamei, F., Arshad, A., Ng, W.K., Romano, N. 2016. Effects of different dietary organic acids on the survival, growth, and hepatopancreatic histopathology of the Blue Swimmer Crab *Portunus pelagicus*. Journal of Shellfish 35: 555-561.

Tsui, W.C., Chen, J.C., Cheng, S.Y. 2016. Changes in sublethal effects and lead accumulation in *Acanthopagrus latus* under various lead concentrations and salinities. Journal of Marine Science and Technology (Taiwan) 23: 1026-1031.

Volatiana, J.A., Sagada, G., Xu, B.Y., Zhang, J.Z., Ng, W.K., Shao, Q.J. 2019. Effects of butyrate glycerides supplementation in high soybean meal diet on growth performance, intestinal morphology and antioxidative status of juvenile black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*. Aquaculture Nutrition 26: 15-25.

Walter, H.E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer, H.U. Ed. Methods of Enzymatic Analysis, vol. V. Verlag Chemie, Weinheim, 270-277.

Wang, Y.B., Li, J.R., Lin, J. 2008. Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. Aquaculture 281: 1-4.

Wing-Keong, N.G, Chik-Boon, K. 2017. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. Reviews in Aquaculture 9: 342-368.

Worthingtone, C.C. 1991. Enzyme manual related biochemical, 3rd edn. Freehold. New Jersy, 38-42.

Yano, T. 1992. Assay of hemolytic complement activity, in: Stolen J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Hattari, S.C., Rowley, A.F. (Eds.), Techniques in Fish Immunology. SOS Publications, New Jersey, 131-141.

Zhou, Z., Liu, Y., He, S., Shi, P., Gao, X., Yao, B., Ringø, E. 2009. Effects of dietary potassium diformate (KDF) on growth performance, feed conversion and intestinal bacterial community of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂). Aquaculture 291: 89-94.

Zhu, Y., Qiu, X., Ding, Q., Duan, M., Wang, C. 2014. Combined effects of dietary phytase and organic acid on growth and phosphorus utilization of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. Aquaculture 430: 1-8.