

Effect of sodium diformate and potassium diformate in the diet on some serum macro minerals, stomach pH, and bacterial population in the feces of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869)

Ashourpour, A.¹, Shamsaie Mehrjan, M.^{1*}, Rajabi Islami, H.¹, Shenavar Masouleh, A.R.², Mohseni, M.²

1- Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- International Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran

Received: 16 August 2023

Accepted: 7 November 2023

Abstract

Introduction: Organic acid salts, particularly potassium diformate (KDF) and sodium diformate (NDF), have emerged as promising dietary additives in aquaculture due to their acidifying, antimicrobial, and mineral-chelating properties. These compounds are known to lower gastric pH, inhibit the growth of harmful bacteria, promote beneficial gut microbiota, and enhance nutrient absorption. This study aimed to evaluate the effects of different levels of dietary KDF and NDF on some serum macrominerals, gastric pH, and fecal bacterial population in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*).

Materials and methods: A total of 315 Siberian sturgeon with an average initial weight of 17.85 ± 0.2 grams were distributed randomly in 21 fiberglass tanks and fed with seven experimental diets with three replications for eight weeks. Nutritional diets included the control group (without organic acid salt) and groups with 1.5, 3, and 5 grams of sodium diformate or potassium diformate per kilogram of diet. At the end of the trial, blood was collected to measure serum concentrations of sodium, potassium, calcium, and phosphorus. Stomach pH was measured two hours after feed withdrawal, and fecal samples were analyzed to determine the total viable count and lactic acid bacteria population using selective culture media.

Results and Discussion: The results showed that fish fed 5 g/kg of either sodium diformate or potassium diformate exhibited a significant increase in serum concentrations of sodium, potassium, calcium, and phosphorus compared to the control group ($p < 0.05$). Moreover, the number of lactic acid bacteria in feces was significantly higher in all treatment groups receiving sodium diformate or potassium diformate than in

the control ($p<0.05$). In contrast, stomach pH measured two hours after feed withdrawal and the total viable bacterial counts in feces exhibited a dose-dependent decrease in the treated groups compared to the control ($p<0.05$). These findings suggest that dietary supplementation with KDF or NDF, particularly at higher doses, enhances mineral absorption through reduced stomach pH and modulates intestinal microbial communities by increasing beneficial lactic acid bacteria and reducing pathogenic bacteria.

Conclusion: These findings indicate that dietary supplementation with sodium diformate or potassium diformate, particularly at 5 g/kg, can reduce stomach pH and enhance the absorption of macrominerals into the bloodstream. Furthermore, the increased fecal lactic acid bacteria and decreased excretion of harmful bacteria into the environment suggest that these organic acid salts may improve intestinal function and promote the development of environmentally sustainable diets for Siberian sturgeon.

Keywords: Sodium diformate, Potassium diformate, Serum macrominerals, Fecal bacterial population, Siberian sturgeon

* Corresponding Author: m.shamsaie@srbiau.ac.ir

"مقاله پژوهشی"

تأثیر سدیم دیفرمات و پتاسیم دیفرمات جیره روی برخی ماکرومینرال های سرم، pH معده و جمعیت باکتریایی مدفوع تاسماهی سیری (*Acipenser baerii*, (Brandt, 1869

عارف عاشورپور^۱، مهدی شمسانی مهرجان^{۱*}، هومن رجبی اسلامی^۱، علیرضا شناور ماسوله^۲، محمود محسنی^۲

۱- گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۸/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۵/۲۵

چکیده

مطالعه حاضر به منظور تعیین اثر سطوح مختلف سدیم دیفرمات و پتاسیم دیفرمات جیره روی برخی ماکرومینرال های سرم، pH معده و جمعیت باکتریایی مدفوع تاسماهی سیری (*Acipenser baerii*) انجام گرفت. تعداد ۳۱۵ عدد تاسماهی سیری با میانگین وزن اولیه $17/85 \pm 0/2$ گرم به صورت تصادفی در ۲۱ وان فایبرگلاسی پخش گردیدند و به مدت ۸ هفته با ۷ جیره آزمایشی با ۳ تکرار تغذیه شدند. جیره های تغذیه ای شامل گروه شاهد (بدون نمک اسید آلی) و گروه هایی دارای مقادیر ۱/۵، ۳ و ۵ گرم پتاسیم دیفرمات یا سدیم دیفرمات در کیلوگرم جیره بود. نتایج نشان داد که گروه های تغذیه شده با ۵ g/kg پتاسیم دیفرمات یا سدیم دیفرمات افزایش معنی داری در ماکرومینرال های اندازه گیری شده در سرم (سدیم، پتاسیم، کلسیم، فسفر) در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند ($p < 0/05$). تعداد باکتری های اسیدلاکتیک مدفوع در تمام تیمارهای تغذیه شده با پتاسیم دیفرمات یا سدیم دیفرمات افزایش معنی داری در مقایسه با گروه شاهد داشت ($p < 0/05$). در حالی که pH معده دو ساعت پس از قطع غذا و تعداد باکتری های زیست پذیر موجود در مدفوع روند کاهشی وابسته به دوز در تیمارهای آزمایشی، نسبت به گروه شاهد داشت ($p < 0/05$). نتایج نشان داد که پتاسیم دیفرمات یا سدیم دیفرمات به ویژه در سطح ۵ g/kg در جیره باعث کاهش pH معده و افزایش جذب ماکرومینرال ها به خون شد. همچنین با افزایش باکتری های اسید لاکتیک مدفوع و کاهش دفع باکتری های مضر به محیط زیست، احتمالاً می تواند عملکرد روده تاسماهی سیری و کارایی غذای سازگار با محیط زیست را ارتقا بخشد.

کلمات کلیدی: سدیم دیفرمات، پتاسیم دیفرمات، ماکرومینرال های سرم، جمعیت باکتریایی در مدفوع، تاسماهی سیری

مقدمه

امروزه پرورش تاسماهی سبیری به دلیل گوشت و خاویار گرانبها (Chebanov and Galich, 2018)، رشد سریع و سازگاری بالا با جیره های مصنوعی در حال گسترش است (Aidos et al., 2019). این گونه از سال ۱۹۸۰ به عنوان یک مدل بیولوژیکی برای آغاز مطالعات در مورد تغذیه مورد استفاده قرار گرفته است (Fontagné-Dicharry et al., 2018). بهبود آبی پروری تاسماهی سبیری منطقی ترین استراتژی جایگزین برای کاهش فشار ماهیگیری بر ذخایر طبیعی این گونه است (Bronzi et al., 2011). سطوح گنجاندن پودر ماهی در خوراک آبی پروری تجاری به دلیل قیمت بالای بازار و کاهش صید به طور قابل ملاحظه ای کاهش یافته است (Oliva-Teles et al., 2015). از طرفی کاهش محتوای پودر ماهی در رژیم های غذایی آبی پروری مدرن ممکن است بر pH ایده آل دستگاه گوارش، عملکرد آنزیم های گوارشی و جامعه باکتریایی روده تأثیر منفی بگذارد (Fabay et al., 2022). از سوی دیگر، پروتئین های گیاهی دارای فاکتورهای ضد تغذیه ای مانند اسید فیتیک هستند که یک چنگاله قوی است و با ایجاد کمپلکس پروتئین-مینرال-فایتات، زیست فراهمی مواد معدنی و پروتئین را کاهش می دهد (Akande et al., 2010). علاوه بر این، به علت تخلیه فسفر هضم نشده در آب، مشکلات زیست محیطی-آبی منجر به اوتریفیکاسیون در محیط های اطراف می شود (Selle et al., 2000). خوراک مصنوعی بیشترین هزینه تولید را به خود اختصاص داده و نقش اصلی را در آبی پروری متمرکز بازی می کند. بنابراین، بهبود کارایی خوراک آبیان می تواند گامی رو به جلو برای دستیابی به

پایداری آبی پروری باشد و در حال حاضر یک اولویت است (Mohammadian et al., 2020). در این راستا، اسیدهای آلی و نمک های آنها (عمدتا سدیم، پتاسیم، و کلسیم)، یکی از افزودنی های غذایی امن، سازگار با محیط زیست با اثرات مفید بی شمار در تغذیه آبی پروری به شمار می آیند که به طور گسترده در اهداف مختلف مورد استفاده قرار می گیرند (Ng and Koh, 2017). Castillo و همکاران (۲۰۱۴) اعلام کردند اسیدهای آلی و نمک های آنها اثرات مفیدی بر هضم مواد مغذی و جذب مواد معدنی، با کاهش pH در مسیر گوارشی از طریق رسوب یون H^+ دارند (Castillo et al., 2014; Jafar Nodeh et al., 2017; Roohi et al., 2024). ماکرومینرال هایی از قبیل فسفر و کلسیم، سدیم و پتاسیم عناصر معدنی هستند که به مقدار زیاد مورد نیازند. فسفر برای تشکیل و نگهداری استخوان، برای عملکرد بافت عضلانی و تشکیل پروتئین ضروری است. کلسیم به استخوان ها استحکام می بخشد و همچنین برای انتقال تکانه های عصبی و انقباض عضلانی مهم است. پتاسیم (اصلی ترین کاتیون درون سلولی) و سدیم (اصلی ترین کاتیون در مایع خارج سلولی)، اجزای اصلی برای حفظ فشار اسمزی و تعادل اسید-باز هستند (Webster, 2002). اسیدهای آلی ممکن است به عنوان یک عامل چنگاله عمل کرده و کاتیون های مختلف را در امتداد روده متصل کند (Pandey and Satoh, 2008) که می تواند به عنوان یک رویکرد امیدوارکننده برای غیرفعال کردن فاکتورهای ضد تغذیه ای و بهبود ارزش غذایی منابع پروتئینی گیاهی باشد (Khajepour and Hosseini, 2012b). محققانی اعلام کردند که اسیدهای آلی یا نمک های آنها باعث کاهش تعداد کل باکتری های

زیست پذیر و مضر در آبریان پرورشی و مدفوع آنها (از طریق انتشار در سیتوپلاسم باکتری ها) می شود، در حالی که تعداد باکتری های مفید و مقاوم به اسیدهای آلی مانند باکتری های اسید لاکتیک را افزایش می دهد (Ng *et al.*, 2009; Reyshari *et al.*, 2019; Yusefi *et al.*, 2022). پتاسیم دیفرمات و سدیم دیفرمات نمک های مزدوج اسید فرمیک می باشند که به دلیل بار بالای مواد موثره، خوردگی کم، سادگی کنترل آن ها در خوراک های اکستروود شده، به طور گسترده در آبرزی پروری مورد استفاده قرار می گیرند (Lückstädt and Kühlmann, 2011; Morken *et al.*, 2011, 2012) و به عنوان جایگزینی برای اسید فرمیک مورد توجه قرار گرفته اند (Ragaa and Korany, 2016). اثر ویژه آنها روی میکروفلور روده به عنوان روش اصلی عمل در نظر گرفته می شود (Chowdhury *et al.*, 2012; Lückstädt and Kühlmann, 2011). گزارش هایی اثر پتاسیم دیفرمات بر افزایش مینرال های سرم تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus*) (Hassaan *et al.*, 2021)، کاهش pH معده و افزایش تعداد باکتری های اسید لاکتیک موجود در روده تیلاپای نیل (Abu Elala and Ragaa, 2015)، و کاهش تعداد باکتری های زیست پذیر در مدفوع تیلاپای قرمز هیبرید (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) (Ng *et al.*, 2009) را نشان داده است. همچنین یافته های دیگر نشان دادند که سدیم دیفرمات باعث افزایش تعداد باکتری های اسید لاکتیک و کاهش تعداد باکتری های زیست پذیر موجود در روده ماهیان پرورشی می شود (Reyshari *et al.*, 2019; Yusefi *et al.*, 2022). اطلاعات مربوط بر تاثیرات اسیدهای آلی و نمک های آنها بر مینرال های سرم، pH معده و جمعیت باکتریایی در مدفوع ماهیان

بسیار محدود است. لذا هدف از این تحقیق، تعیین اثر سطوح مختلف سدیم دیفرمات و پتاسیم دیفرمات جیره روی ماکرومینرال های سرم (سدیم، پتاسیم، کلسیم، فسفر)، pH معده و جمعیت باکتریایی (تعداد باکتری های اسید لاکتیک و کل باکتری های زیست پذیر) در مدفوع تاسماهی سبیری می باشد.

مواد و روش ها

ماهی ها و شرایط پرورشی

این مطالعه در انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری واقع در رشت انجام شد. ابتدا تاسماهی سبیری جوان به مدت ۲ هفته با جیره شاهد برای سازگاری با شرایط پرورشی تغذیه شد. فرمولاسیون و ترکیب شیمیایی جیره شاهد در جدول ۱ ارائه شده است. سپس به طور تصادفی تعداد ۳۱۵ عدد تاسماهی سبیری با میانگین وزن اولیه $0.2 \pm 17/85$ گرم انتخاب و در ۲۱ وان فایبرگلاسی ($40 \times 50 \times 200$ سانتی متر و ۲۵۰ لیتر حجم آبگیری) با تراکم اولیه ۱۵ ماهی در هر مخزن رهاسازی گردیده و به مدت ۸ هفته با جیره های آزمایشی تغذیه شدند. این مطالعه شامل هفت تیمار با سه تکرار، شامل شش رژیم غذایی آزمایشی و یک رژیم غذایی شاهد بود. در طول ۵۶ روز، ماهی ها چهار بار در روز بر اساس ۲ درصد وزن بدن در ساعت های ۰۸:۰۰، ۱۳:۰۰، ۱۸:۰۰ و ۲۳:۰۰ در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، تغذیه شدند. وان ها به هواده مرکزی، یک عدد سنگ هوا، آب چاه همراه با مقدار کمی آب رودخانه سفید رود و هوادهی مداوم مجهز شدند. سرعت جریان آب (0.2 L/s) برای هر وان بود. فاکتورهای کیفی آب شامل دما ($1/2 \pm 18/2$ درجه سانتی گراد)، اکسیژن ($0.6 \pm 7/7$ میلی گرم

در لیتر)، pH (۷/۴ ± ۰/۲)، با دستگاه WTW multi (WTW multi 3410, Germany) و نیتريت (کمتر از ۰/۰۳ میلی گرم در لیتر) و آمونیاک (کمتر از ۰/۰۲ میلی گرم در لیتر) با دستگاه MARTINI مدل Mi 407 روزانه اندازه گیری و در محدوده طبیعی برای ماهیان خاویاری سبیری حفظ شد.

جدول ۱: ترکیب غذایی (گرم بر کیلوگرم غذا) و آنالیز تقریبی (گرم بر کیلوگرم ماده خشک) جیره شاهد در مطالعه حاضر

Table1: Formulation (g/kg) and proximate analysis (g/kg in dry matter) of experimental diets for *Acipenser baerii* in this study

Ingredients	Experimental diet	
	Control	Proximate analysis
Fishmeal ¹	465	Crude protein (CP) 46.49
Meat meal ²	55	Crude lipid (CL) 13.41
Wheat gluten ³	50	Crude fibre (CF) 1.02
Soybean meal ⁴	150	Ash 8.4
Wheat flour	190	Moisture 7.11
Molasses	25	NFE ⁸ 235.7
Fish oil (Caspian Sea sprat)	40	Gross energy 20.32 (MJ/kg) ⁹
Vitamin mixture ⁵	10	Phosphorus (P) 10.7
Mineral mixture ⁵	10	
α-Cellulose	5	
Potassium diformate ⁶	0	
Sodium diformate ⁶	0	

1- Fishmeal was obtained from Kilka (*Clupeonella* sp.) that includes 672.9 g/kg (CP), 200.2 g/kg (CL), and total volatile nitrogen 15.7 mg/100 g (Gill Poodr Co., Bandar Anzali, Iran).

2- Cattle slaughter waste contains 483.9 g/kg (CP) and 119.8 g/kg (CL) (Gilehdam Caspian Co., Rasht, Iran).

3- Wheat gluten meal contains 826.8 g/kg (CP) and 17.2 g/kg (CL) (Sanat Afarin Sanyar Co., Esfahan, Iran).

4- Soybean meal contains 413.8 g/kg (CP) and 25.6 g/kg (CL) (Behpak Industrial Co., Mazandaran, Iran).

5- Vitamin and mineral mixture detailed by (Banavreh *et al.*, 2019).

6- (ADDCON Nordic AS, Porsgrunn, Norway).

آماده سازی جیره های آزمایشی

در تهیه جیره های آزمایشی، یک جیره شاهد (با آنالیز تقریبی: ۴۶۴/۹ گرم پروتئین خام در کیلوگرم ماده خشک و ۲۰/۳۲ مگاژول انرژی ناخالص در کیلوگرم ماده خشک، توسط نرم افزار لیندو فرموله شد. شش جیره آزمایشی دیگر با سطوح افزایشی (۵ و ۳، ۱/۵ گرم پتاسیم دیفرمات (KDF) یا سدیم دیفرمات (NDF) در کیلوگرم جیره (با نام های KDF1.5, KDF3, KDF5, NDF1.5, NDF3, NDF5) تکمیل شد. دوزها بر اساس مطالعات قبلی (Abu Elala and Ragaa, 2015; Mohammadian *et al.*, 2023;

(Wassef *et al.*, 2017) و توصیه شرکت سازنده

انتخاب شد. سلولز در جیره شاهد با سطوح مختلف

ADDCON[®] KDF; C₂H₃O₄K) نروژ

(Nordic AS, Porsgrunn, پتاسیم دیفرمات و Formi[®]

(ADDCON Nordic NDF; C₂H₃O₄Na) نروژ

AS, Porsgrunn, سدیم دیفرمات جایگزین شد تا

جیره های ایزوکالری و ایزونیتروژن ساخته شود. ابتدا

مواد غذایی به طور کامل پودر و الک شدند (با مش

کوچکتر از ۰/۳ میلی متر) و با سدیم دیفرمات و پتاسیم

دیفرمات مخلوط شدند. سپس روغن ماهی کیلکا و

ملاس به آن اضافه شد. در نهایت آب مقطر ولرم به مخلوط اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه مخلوط شد تا خمیر سفت به دست آید (Hosseini Shekarabi *et al.*, 2021). خمیر توسط چرخ گوشت (الکتروکار EC-1، تهران، ایران) به رشته‌های اسپاگتی با قطر ۲-۳ میلی‌متر تبدیل شد. رشته‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در هوای آزاد خشک شدند تا رطوبت به زیر ۱۰ درصد برسد. رشته‌های خشک شده با دست خرد و الک گردیدند تا پلت‌هایی با اندازه تقریباً یکسان بدست آید و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در بسته بندی‌های مناسب نگهداری شدند.

اندازه گیری pH معده

پس از ۸ هفته دوره پرورشی و دو ساعت پس از صرف آخرین وعده غذایی ماهیان، سه ماهی از هر تکرار صید و با دوز بیش از حد پودر گل میخک آسان کشی شدند. معده پر آنها برداشته و باز شد. pH معده مستقیماً با استفاده از یک pH متر دیجیتال (pH سنج رومیزی HI 2211 ساخت شرکت آمریکایی Hanna Instruments تعیین شد (Abu Elala and Ragaa, 2015).

جمعیت باکتریایی مدفوع

سه روز قبل از نمونه‌برداری نهایی، نمونه‌های مدفوع تازه به صورت آسپتیک از هر مخزن جمع‌آوری شد و به لوله‌های استریل ۵۰ میلی‌لیتری فالكون انتقال یافت تا تعداد کل باکتری‌های زیست پذیر (TVC) و تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) نمونه‌ها اندازه‌گیری شود (Koh *et al.*, 2016). هر نمونه مدفوع وزن شد و در سرم فیزیولوژیکی (0.9% NaCl) استریل (۱ گرم

نمونه مدفوع در ۹ میلی لیتر آب فیزیولوژیکی) همگن گشت. سپس محلول همورنه با استفاده از همان سرم فیزیولوژیکی به صورت متوالی از 10^{-1} تا 10^{-8} رقیق شد. در ادامه، ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه رقیق شده در سه تکرار روی پلیت‌های حاوی محیط کشت De Man, Rogosa and Sharp agar (MRS)، Himedia، TSA، (هند) و تریپتیک سویا آگار (Himedia، هند) به ترتیب جهت اندازه‌گیری تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک و تعداد کل باکتری‌های زیست پذیر مدفوع پخش شد. پلیت‌ها به مدت دو روز در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در نهایت، نتایج به عنوان یک log CFU به ازای هر گرم مدفوع ماهی گزارش شد (Yusefi *et al.*, 2022).

ماکرومینرال‌های سرم

پس از ۸ هفته دوره پرورشی، ماهی‌ها به مدت ۲۴ ساعت قطع غذا شدند. سپس از هر تکرار سه ماهی به طور تصادفی صید و با عصاره گل میخک (۵۰ ml/L) بیهوش گردیدند. در ادامه با استفاده از سرنگ ۲ میلی لیتری و از طریق سیاهرگ ساقه دمی واقع در پشت باله مخرجی خونگیری انجام شد و به اپندورف‌های ۲ میلی لیتری انتقال یافت. خون موجود در اپندورف‌ها توسط سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و سپس سرم جدا شد و با سمپلر در اپندورف‌های جدید ریخته شد تا جهت اندازه‌گیری مواد معدنی موجود در سرم استفاده گردد (Svobodova *et al.*, 1991). سدیم، پتاسیم، کلسیم، و فسفر موجود در سرم با استفاده از دستگاه فتومتر بیوشیمی (ساخت ژاپن، Emra AE-600)، توسط کیت‌های تشخیصی آزمایشگاهی (پارس آزمون، ایران)

و براساس پروتکل‌های تشخیص کمی شرکت سازنده انجام گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج بر اساس (انحراف استاندارد $\pm$ میانگین) نشان داده شد. نرمال بودن داده‌ها با آزمون Shapiro-Wilk و همگن بودن واریانسها با آزمون Levene بررسی شد. به منظور مقایسه میانگین بین تیمارهای تغذیه ای از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. زمانی که اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد، جهت مقایسه میانگین تیمارهای آزمایشی با یکدیگر از آزمون Duncan در سطح اطمینان ۹۵٪ ($p < 0.05$) استفاده شد. از نرم افزار SPSS 26 جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها و از Excel ۲۰۱۰ جهت رسم نمودارها استفاده شد.

نتایج

pH معده

تغذیه با مکمل‌های سدیم دیفرمات و پتاسیم دیفرمات منجر به کاهش معنی‌دار pH معده دو ساعت بعد از قطع غذا نسبت به گروه شاهد شد ($p < 0.05$) که کمترین میزان ثبت شده در گروه‌های (4.44 ± 0.01) و (4.57 ± 0.02) KDF5 بود (شکل ۱).

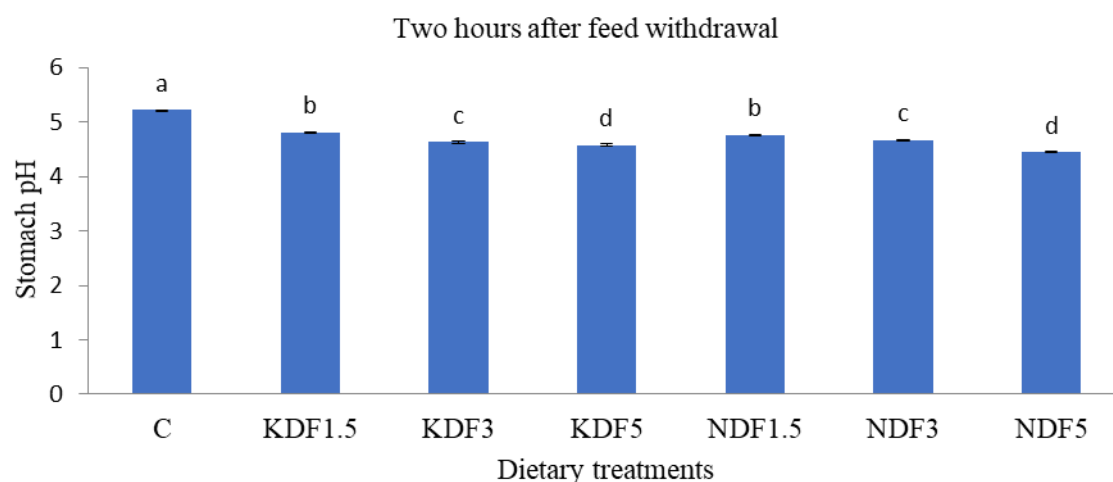
جمعیت باکتریایی

تعداد کل باکتری‌های زیست پذیر (TVC) موجود در مدفوع تاسماهی سبیری تغذیه شده با سدیم دیفرمات یا پتاسیم دیفرمات به طور قابل توجهی کمتر

از گروه شاهد به ویژه در سطح ۵ g/kg در جیره بود ($p < 0.05$) (شکل ۲). برعکس، تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) موجود در مدفوع در تیمارهای مکمل شده با سدیم دیفرمات یا پتاسیم دیفرمات افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت ($p < 0.05$) (شکل ۳)، در حالی که بیشترین افزایش در تیمارهای KDF3 (6.97 ± 0.08) و NDF5 (6.82 ± 0.09) رخ داد.

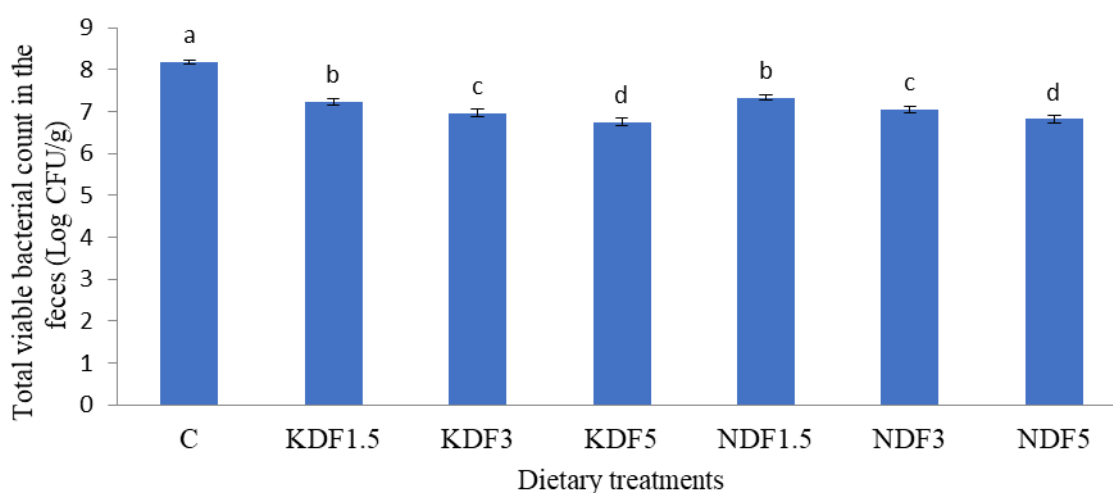
ماکرومینرال‌های موجود در سرم

براساس یافته‌های این تحقیق، مقادیر سطوح سرمی سدیم و پتاسیم در گروه‌های تغذیه شده با مقادیر مختلف سدیم دیفرمات یا پتاسیم دیفرمات افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد از خود نشان دادند ($p < 0.05$). افزایش سطوح سرمی پتاسیم در بین تیمارهای تغذیه شده با پتاسیم دیفرمات (خصوصاً در تیمار KDF5)، بیشترین اختلاف معنی‌دار آماری با شاهد را نشان داد، در حالی که بیشترین افزایش سطوح سرمی سدیم در گروه‌های KDF5 و NDF5 مشاهده شد ($p < 0.05$). علاوه بر این گنجاندن سدیم دیفرمات در رژیم غذایی منجر به افزایش معنی‌دار کلسیم و فسفر موجود در سرم نسبت به گروه شاهد به ویژه در گروه NDF5 شد ($p < 0.05$). در حالی که مکمل‌سازی پتاسیم دیفرمات فقط منجر به افزایش قابل توجه سطوح سرمی فسفر در گروه‌های KDF3 و KDF5 نسبت به گروه شاهد گردید ($p < 0.05$) و افزایش در سطوح سرمی کلسیم معنی‌دار نبود ($p > 0.05$) (جدول ۲).



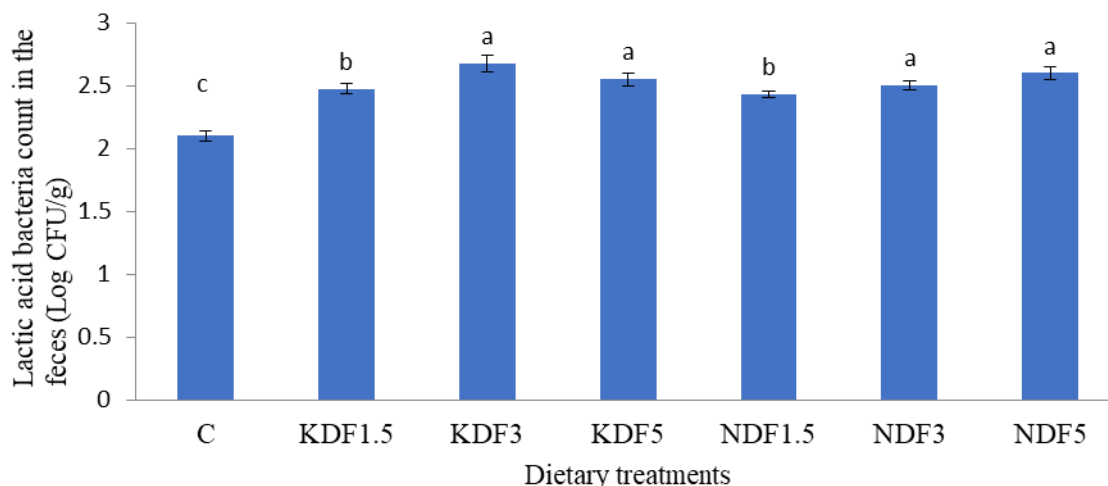
شکل ۱: pH معده ۲ ساعت بعد از قطع غذا در تاسماهیان سیبری تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف سدیم دیفرمات، پتاسیم دیفرمات، و بدون نمک اسید آلی به مدت ۸ هفته. مقادیر با حروف کوچک متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار آماری ($p < 0.05$) است.

Figure 1: Stomach pH two hours after feed withdrawal in Siberian sturgeon fed diets containing different levels of sodium diformate, potassium diformate, and the control diet (without organic acid salt) for 8 weeks. Values with different lowercase letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).



شکل ۲: تعداد کل باکتری‌های زیست پذیر موجود در مدفوع تاسماهیان سیبری تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف سدیم دیفرمات، پتاسیم دیفرمات و جیره شاهد در پایان ۸ هفته. مقادیر با حروف کوچک متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار آماری ($p < 0.05$) است.

Figure 2: Total viable bacterial count in the feces of Siberian sturgeon fed diets containing different levels of sodium diformate, potassium diformate, and the control diet at the end of the 8-week trial. Values with different lowercase letters indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).



شکل ۳: تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در مدفوع تاسماهیان سیبری تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف سدیم دیفرمات، پتاسیم دیفرمات و جیره شاهد در پایان ۸ هفته. مقادیر با حروف کوچک متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار آماری ($p < 0.05$) می‌باشد.

Figure 3: Lactic acid bacteria (LAB) count in the feces of Siberian sturgeon fed diets containing different levels of sodium diformate, potassium diformate, and the control diet at the end of the 8-week trial. Values with different lowercase letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

جدول ۲: سدیم، پتاسیم، کلسیم و فسفر موجود در سرم تاسماهیان سیبری تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف سدیم دیفرمات، پتاسیم دیفرمات و جیره شاهد در پایان ۸ هفته. مقادیر با حروف کوچک متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار آماری ($p < 0.05$) است.

Table 2: Serum concentrations of sodium, potassium, calcium, and phosphorus in Siberian sturgeon fed diets containing different levels of sodium diformate, potassium diformate, and the control diet at the end of the 8-week trial. Values with different lowercase letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

Parameters	Treatments						
	C (control)	KDF1.5	KDF3	KDF5	NDF1.5	NDF3	NDF5
Phosphorus (mg dL ⁻¹)	8.21 ± 0.01 ^d	8.40 ± 0.01 ^{cd}	8.72 ± 0.02 ^c	8.81 ± 0.01 ^{ab}	8.89 ± 0.02 ^{ab}	9.08 ± 0.03 ^a	9.31 ± 0.02 ^a
Calcium (mg dL ⁻¹)	12.38 ± 0.01 ^b	12.44 ± 0.01 ^b	12.51 ± 0.01 ^b	12.81 ± 0.01 ^{ab}	12.86 ± 0.01 ^{ab}	13.01 ± 0.02 ^a	13.39 ± 0.03 ^a
Sodium (mmol L ⁻¹)	108 ± 0.43 ^g	115.06 ± 0.36 ^f	119.06 ± 0.46 ^e	121 ± 0.52 ^a	123.07 ± 0.42 ^c	127.17 ± 0.48 ^b	130.2 ± 0.57 ^a
Potassium (mmol L ⁻¹)	2.38 ± 0.02 ^c	2.79 ± 0.02 ^a	2.83 ± 0.01 ^a	2.85 ± 0.02 ^a	2.67 ± 0.01 ^b	2.72 ± 0.01 ^b	2.75 ± 0.02 ^b

بحث

سرکوب سویه‌های بیماری‌زا و شرایط اسیدی مناسب

برای رشد باکتری‌های اسید لاکتیک است (Koh *et al.*, 2016).

pH مناسب و تعادل میکروبی در دستگاه گوارش آبزیان پرورشی، می‌تواند میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را مهار کند که برای رسیدن به تولید بالا ضروری است (Hassaan *et al.*, 2021). نتایج تحقیق ما نشان داد

استفاده از اسیدهای آلی و نمک‌های مرتبط با آنها در تغذیه آبزیان، به عنوان یک استراتژی برای افزایش بهره‌وری و عملکرد در اهداف تجاری، به خوبی مستند شده‌است (Kakavand *et al.*, 2021). مکانیزم اصلی اسیدهای آلی و نمک‌های آنها، کاهش pH مسیر گوارشی میزبان و در نتیجه عملکرد بهتر پپسین،

تیمارهای تغذیه شده با سدیم دیفرمات یا پتاسیم دیفرمات کاهش معنی داری را در pH معده دو ساعت پس از قطع غذا از خود نشان دادند. مشابه یافته‌های تحقیق ما Abu Elala و Ragaa در سال ۲۰۱۵ اعلام کردند که مکمل غذایی پتاسیم دیفرمات، pH معده ماهی تیلایا نیل را کاهش داد (Abu Elala and Ragaa, 2015). همچنین یافته‌های مشابهی در کاهش معنی دار pH معده پس از مصرف پتاسیم دیفرمات در تیلایای نیل (Hassaan et al., 2021; Tran-Ngoc et al., 2019)، اسید سیتریک در ماهی‌های توربوت جوان (*Scophthalmus maximus*) (Dai et al., 2018)، و قزل‌آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) (Li et al., 2017)، و اسید مالیک در تیلایای نیل مشاهده گردید (Hassaan et al., 2018). توانایی اسیدهای آلی برای کاهش pH معده به خواص تفکیک اسید و اسیدیت داخل مجرای گوارش بستگی دارد (Mroz et al., 2006). علاوه بر این آنیون اسید ممکن است به مانند عامل چنگاله عمل کرده و با مواد معدنی در کیموس تشکیل کمپلکس دهد و باعث بهبود فراهمی زیستی مواد معدنی به ویژه از منابع پروتئین گیاهی (مانند فسفر) شود (Fabay et al., 2022). همچنین، کاهش pH معده برای جلوگیری از عبور میکروب‌های بالقوه مضر به روده کوچک و تشکیل باکتری‌های همولیتیک انتروتوکسیژنیک در سطح پرزها مفید است (Partanen and Mroz, 1999).

پارامترهای بیوشیمیایی خون می‌تواند یک نمای کلی از وضعیت فعلی مواد مغذی در ماهی ارائه دهد (Yusefi et al., 2022). ماکرومینرال‌ها، عناصری اند که به مقدار زیاد مورد نیاز هستند (Webster, 2002). نتایج تحقیق حاضر تاثیر معنی دار مکمل‌های سدیم دیفرمات

و پتاسیم دیفرمات بر سطوح سرمی سدیم، پتاسیم، و فسفر تاسماهی سبیری نشان داد، در حالی که کلسیم فقط در NDF3 و NDF5 معنی دار بود. مشابه با یافته‌های این تحقیق Hassaan و همکاران (۲۰۲۱) بیان داشتند ۵ g/kg پتاسیم دیفرمات باعث افزایش فسفر سرم در تیلایای نیل انگشت قد گردید (Hassaan et al., 2021). همچنین، اسید سیتریک باعث افزایش معنی دار فسفر موجود در سرم در فیل ماهی پرورشی شد (Khajepour and Hosseini, 2012a) و ترکیب اسیدی فایرها باعث افزایش سطوح فسفر و کلسیم سرم مارماهی آمریکایی (*Anguilla rostrata*) (Zhang et al., 2022) و کلسیم سرم باس دریایی آسیایی (*Lates calcarifer*) پرورشی گردید (Mohtashemipour et al., 2023). برخلاف یافته‌های ما اعلام شد که غلظت-های سدیم، پتاسیم و کلسیم موجود در سرم تیلایای هیبرید قرمز افزایش معنی داری با مکمل سدیم فرمات نیافت (Ebrahimi et al., 2017) که علت احتمالی را می‌توان به نوع گونه پرورشی، شرایط پرورش، مقدار نمک اسیدآلی و ترکیب جیره آزمایشی دانست (Hoseinifar et al., 2017). محققان به برخی مکانسیم‌های عمل احتمالی اسیدهای آلی و نمک‌های آنها برای افزایش جذب مواد معدنی به خون خاطر نشان کرده اند. اسیدی فایرها می‌توانند به عنوان منبع انرژی برای توانبخشی و تکثیر سلول‌های اپیتلیال روده استفاده شوند که در نتیجه کارایی جذب مواد معدنی را در این بافت افزایش می‌دهد (Baruah et al., 2007; Liu et al., 2019). اثر اسیدهای آلی بر قابلیت دسترسی عناصر معدنی در پودر ماهی به نظر می‌رسد که عمدتاً ناشی از اثر اسیدی کردن است که مواد معدنی استخوان را در پودرماهی حل می‌کند (Pandey and Satoh, 2008).

اسیدهای آلی ممکن است مانع از کلونیزاسیون میکروب‌های مضر در روده شوند که در این صورت مواد غذایی فقط برای ماهی میزبان استفاده خواهد شد. Morken و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که سدیم دیفرمات باعث بهبود کیفیت فیزیکی پلت‌ها (افزایش دوام و انبساط پلت‌ها) شده که سبب دسترسی بیشتر مواد معدنی برای ماهی‌ها می‌گردد (Morken *et al.*, 2011). اسیدهای آلی به دلیل اینکه چنگاله قوی کلسیم و فسفر می‌باشد ممکن است این عناصر را از فیتات منابع غذایی گیاهی حذف کند و در اختیار ماهی قرار دهد (Khajepour and Hosseini, 2010). کاهش دفع و افزایش جذب فسفر، باعث کاهش بارگیری آن به محیط می‌شود (Sarker *et al.*, 2007) و به دلیل بهبود استفاده از مواد معدنی در نتیجه اسیدی شدن جیره، فرمولاسیون غذای آبریان سازگار با محیط زیست می‌تواند ارتقا یابد (Ng and Koh, 2017).

باکتری‌های اسیدلاکتیک، باکتری‌های گرم مثبتی هستند که به سرعت تکثیر شده و با تولید ترکیبات ضد میکروبی مفید مانند سموم باکتریایی (باکتریوسین‌ها)، اسیدهای آلی و حتی اکسیدان قوی مانند پراکسید هیدروژن از رشد پاتوژن‌ها جلوگیری می‌کنند (Gatesoupe, 2007). نتایج تحقیق ما نشان داد که تعداد کلونی باکتری‌های اسید لاکتیک مدفوع ماهیان تغذیه شده با سدیم دیفرمات یا پتاسیم دیفرمات به طور وابسته به دوز افزایش معنی‌دار و برعکس، تعداد کل باکتری‌های زیست‌پذیر موجود در مدفوع، به طور وابسته به دوز، کاهش معنی‌داری پیدا کرده بود. کارایی بازدارندگی نمک‌های اسیدهای آلی با افزایش مقدار سدیم دیفرمات یا پتاسیم دیفرمات موثرتر بود. این امر با این واقعیت توضیح داده می‌شود که سدیم دیفرمات و

پتاسیم دیفرمات تنها زمانی موثر هستند که به شکل تجزیه نشده به دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی نفوذ کنند. در ادامه، پروتون‌ها را آزاد کرده و pH داخل سلولی سیتوپلاسم باکتری را ناپایدار می‌کنند که منجر به مرگ باکتری می‌شوند. وقتی pH کم‌تر باشد، غلظت نمک‌های اسیدآلی در شکل تجزیه نشده بیشتر از شکل تجزیه شده می‌شود، در نتیجه بازده آن‌ها افزایش می‌یابد (Najdegerami *et al.*, 2012). با این حال، تعادل بین شکل‌های تجزیه شده و تجزیه نشده نمک اسیدآلی با توجه به مقدار هر نمک اسیدآلی نوسان می‌کند (da Silva *et al.*, 2013). مشابه با یافته‌های ما، مکمل پتاسیم دیفرمات یا ترکیب اسیدهای آلی در جیره، باعث کاهش تعداد باکتری‌های زیست‌پذیر مدفوع تیلاپیای قرمز هیبرید (*Oreochromis sp.*) شد (Koh *et al.*, 2016; Ng *et al.*, 2009). همچنین مطالعات قبلی نشان داد که اضافه کردن مالیک اسید به غذای تیلاپیای نیل (Soltan *et al.*, 2017) و سدیم پروپیونات به غذای باس دریایی اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) (Wassef *et al.*, 2020) به ترتیب باعث کاهش کل باکتری‌های زیست‌پذیر و کولیفرم مدفوع ماهیان شد. از طرفی گزارش شده است که گنجاندن پتاسیم دیفرمات در رژیم‌های غذایی مبتنی بر پروتئین گیاهی یک اثر یوبیوتیک بر رشد باکتری‌های اسید لاکتیک بومی در روده ماهی تیلاپیای نیل داشت (Abu Elala & Ragaa, 2015). علاوه بر این، (Reyshari *et al.*, 2019) به این نتیجه رسیدند که رژیم‌های غذایی غنی شده با سدیم دیفرمات منجر به اصلاح میکرو فلور روده باس دریایی آسیایی به دلیل تکثیر باکتری‌های اسید لاکتیک می‌شود. باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند چسبندگی و تهاجم پاتوژن‌ها به

اپیتلیوم روده را کاهش دهند، زیرا از مکان‌های چسبندگی متفاوتی استفاده می‌کنند که می‌توانند با پاتوژن‌ها در همین موضوع رقابت کنند (Bermudez- Brito *et al.*, 2012). نحوه عملکرد اسیدهای آلی در مجرای روده شامل دو مکانیسم احتمالی است: از یک طرف آنها سطح pH را در معده، به ویژه در روده قدامی، از طریق تحویل یون های H^+ کاهش می‌دهند و از طرف دیگر رشد باکتری‌های گرم منفی را از طریق تفکیک اسیدها و تولید آنیون‌ها در داخل سلول‌های باکتری مهار می‌کنند، در حالی که به نظر می‌رسد باکتری‌های اسیدلاکتیک مفید و مقاوم به اسید تحت تاثیر قرار نگرفته یا حتی ممکن است تعداد آنها افزایش یابد (Lückstädt, 2008). سدیم دیفرمات و پتاسیم دیفرمات به دلیل زیست تخریب‌پذیری خوب و خواص باکتریواستاتیک قوی از نظر زیست محیطی کارآمد و ایمن هستند (Suphoronski *et al.*, 2019). کاهش بار میکروبی مدفوع ماهیان پرورشی که با مکمل‌های سدیم دیفرمات و پتاسیم دیفرمات تغذیه می‌شوند، می‌تواند برای محیط زیست و پرورش ماهی تجاری با سیستم‌های گردش آب بسته مفید باشد. این یافته‌ها پتانسیل سدیم دیفرمات و پتاسیم دیفرمات را به عنوان مکمل‌های آبرزی دوستدار محیط زیست در شیوه‌های آبرزی پروری پایدار برجسته می‌کند. همچنین با افزایش باکتری‌های اسید لاکتیک مدفوع و کاهش دفع باکتری‌های مضر به محیط زیست، احتمالاً می‌تواند عملکرد روده تاسماهی سیری را بهبود بخشد.

نتیجه گیری

به کارگیری مکمل‌های سدیم دیفرمات و پتاسیم دیفرمات به ویژه در سطح ۵ g/kg در جیره تاسماهی

سیری باعث کاهش pH معده دو ساعت پس از قطع غذا، افزایش برخی از ماکرومینرال‌های سرم، افزایش باکتری‌های اسیدلاکتیک مدفوع و به طور همزمان کاهش کل باکتری‌های زیست پذیر در مدفوع شد. در نتیجه افزودن مکمل‌های سدیم دیفرمات یا پتاسیم دیفرمات در جیره، ممکن است پتانسیل استفاده بهینه از مواد معدنی جیره را داشته باشد، بار میکروبی وارد به آب را کاهش دهد و فرمولاسیون غذای آبرزیان سازگار با محیط زیست را ارتقا دهد. با این حال، برای دستیابی به نتایج قطعی‌تر در این زمینه، به مطالعات جامع‌تری نیاز است.

سپاسگزاری

در اینجا از محققین انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری رشت، برای کمک ارزشمندشان تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. 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(4), pp.621–629. DOI: 10.1016/j.jare.2014.02.008
2. Aidos, L., Vasconi, M., Abbate, F., Valente, L.M.P., Lanfranchi, M. and Di Giancamillo, A., 2019. Effects of stocking density on reared Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) larval growth, muscle development and fatty acids composition in a recirculating aquaculture system. *Aquaculture Research*, 50(2), pp.588–598. DOI: 10.1111/are.13936
3. Akande, K.E., Doma, U.D., Agu, H.O. and Adamu, H.M., 2010. Major Antinutrients Found in Plant Protein Sources: Their Effect on Nutrition.

- Antibiotic Growth Promoters. *Bangladesh Journal of Animal Science*, 37(2), pp.99–105. DOI: 10.3329/bjas.v37i2.9887
11. Da Silva, B.C., Vieira, F.N., Mouriño, J.L.P., Ferreira, G.S. and Seiffert, W.Q., 2013. Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. *Aquaculture*, 384–387, pp.104–110. DOI:10.1016/j.aquaculture.2012.12.017
 12. Dai, J., Li, Y., Yang, P., Liu, Y., Chen, Z., Ou, W., Ai, Q., Zhang, W., Zhang, Y. and Mai, K., 2018. Citric acid as a functional supplement in diets for juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L.: Effects on phosphorus discharge, growth performance, and intestinal health. *Aquaculture*, 495, pp.643–653. DOI:10.1016/j.aquaculture.2018.04.004
 13. Ebrahimi, M., Daeman, N.H., Chong, C.M., Karami, A., Kumar, V., Hoseinifar, S.H. and Romano, N., 2017. Comparing the effects of different dietary organic acids on the growth, intestinal short-chain fatty acids, and liver histopathology of red hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) and potential use of these as preservatives. *Fish Physiology and Biochemistry*, 43(4), pp.1195–1207. DOI: 10.1007/s10695-017-0365-0
 14. Fabay, R.V., Serrano, A.E., Alejos, M. S. and Fabay, J.V., 2022. Effects of dietary acidification and acid source on fish growth and feed efficiency (Review). In *World Academy of Sciences Journal*, 4(21), pp.1-15. DOI: 10.3892/wasj.2022.156
 15. Fontagné-Dicharry, S., Larroquet, L., Dias, K., Cluzeaud, M., Heraud, C. and Corlay, D., 2018. Effects of dietary oxidized fish oil supplementation on oxidative stress and antioxidant defense system in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 74, pp.43–51. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.12.039
 16. Gatesoupe, F.J., 2007. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: Natural occurrence and *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(8), pp.827–832. DOI: 10.3923/pjn.2010.827.832
 4. Banavreh, A., Soltani, M., Kamali, A., Yazdani-Sadati, M. A. and Shamsaie, M., 2019. Immuno-physiological and antioxidant responses of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) fed with different levels of olive pomace. *Fish Physiology and Biochemistry*, 45(4), pp.1419–1429. DOI: 10.1007/s10695-019-00649-y
 5. Baruah, K., Sahu, N.P., Pal, A.K., Jain, K.K., Debnath, D. and 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(2), pp.109–120. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2006.01624.x
 6. Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llrente, C. and Gil, A., 2012. Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(2), pp.160–174. DOI: 10.1159/000342079
 7. Bronzi, P., Rosenthal, H. and Gessner, J., 2011. Global sturgeon aquaculture production: an overview. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(2), pp.169–175. DOI: 10.1111/j.1439-0426.2011.01757.x
 8. Castillo, S., Rosales, M., Pohlenz, C. and Gatlin, D.M., 2014. Effects of organic acids on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*, 433, pp.6–12. DOI:10.1016/j.aquaculture.2014.05.038
 9. Chebanov, M. and Galich, E., 2018. Echography for Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*) Brood Stock Management. In *The Siberian Sturgeon (Acipenser baerii, Brandt, 1869). Farming*, 2, pp. 529–567. DOI: 10.1007/978-3-319-61676-6_24
 10. Chowdhury, R., Haque, M.N., Islam, K. M.S. and Khan, M.J., 2012. Potassium Difomate: A New Alternative To

- Development*, 11(1), pp.25-37. [In Persian]
22. Kakavand, M., Hosseini Shekarabi, S. P., Shamsaie Mehrgan, M. and Islami, H.R., 2021. Potassium diformate in the diet of sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*): Zootechnical performance, humoral and skin mucosal immune responses, growth-related gene expression and intestine morphology. *Aquaculture Nutrition*, 27(6), pp.2392–2404. DOI: 10.1111/anu.13371
 23. Khajepour, F. and Hosseini, S.A., 2012a. Calcium and phosphorus status in juvenile Beluga (*Huso huso*) fed citric acid-supplemented diets. *Aquaculture Research*, 43(3), pp.407–411. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2011.02843.x
 24. Khajepour, F. and Hosseini, S.A., 2012b. Citric acid improves growth performance and phosphorus digestibility in Beluga (*Huso huso*) fed diets where soybean meal partly replaced fish meal. *Animal Feed Science and Technology*, 171(1), pp.68–73. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2011.10.001
 25. Koh, C.B., Romano, N., Zahrah, A.S. and Ng, W.K., 2016. Effects of a dietary organic acids blend and oxytetracycline on the growth, nutrient utilization and total cultivable gut microbiota of the red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp., and resistance to *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture Research*, 47(2), pp.357–369. DOI: 10.1111/are.12492
 26. Li, X. Q., Cui, W.O. and Leng, X.J., 2017. Citric acid substituted the inclusion of inorganic phosphorus in diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*, 48(3), pp.1089–1098. DOI: 10.1111/are.12951
 27. Liu, Y., Chen, Z., Dai, J., Yang, P., Xu, W., Ai, Q., Zhang, W., Zhang, Y., Zhang, Y. and Mai, K., 2019. Sodium butyrate supplementation in high-soybean meal diets for turbot (*Scophthalmus maximus* L.): Effects on inflammatory status, mucosal barriers probiotic treatments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 14(1–3), pp.107–114. DOI: 10.1159/000106089
 17. Hassaan, M.S., Soltan, M.A., Jarmolowicz, S. and Abdo, H.S., 2018. Combined effects of dietary malic acid and *Bacillus subtilis* on growth, gut microbiota and blood parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition*, 24(1), pp.83–93. DOI: 10.1111/anu.12536
 18. Hassaan, M.S., El-Sayed, A.M. I., Mohammady, E.Y., Zaki, M.A.A., Elkhyat, M.M., Jarmolowicz, S. and El-Haroun, E.R., 2021. Eubiotic effect of a dietary potassium diformate (KDF) and probiotic (*Lactobacillus acidophilus*) on growth, hemato-biochemical indices, antioxidant status and intestinal functional topography of cultured Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed diet free fishmeal. *Aquaculture*, 533. pp.736147. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.736147
 19. Hoseinifar, S.H., Sun, Y.Z. and Caipang, C.M., 2017. Short-chain fatty acids as feed supplements for sustainable aquaculture: an updated view. In *Aquaculture Research*, 48(4), pp.1380–1391. DOI: 10.1111/are.13239
 20. Hosseini Shekarabi, S.P., Shamsaie Mehrgan, M. and Banavreh, A., 2021. Feasibility of superworm, *Zophobas morio*, meal as a partial fishmeal replacer in fingerling rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, diet: growth performance, amino acid profile, proteolytic enzymes activity and pigmentation. *Aquaculture Nutrition*, 27(4), pp.1077–1088. DOI: 10.1111/anu.13249
 21. Jafar Nodeh, A., Tukmechi, A., Najd Grami, E., Hajimoradlo, A. and Noori, F., 2017. Study of Synergistic Effect of Potassium- Sorbate and *Lactobacillus casei* on the Growth Performance, Hematological Parameters, Body Composition and Intestinal flora of Rainbow Trout Fry (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Aquaculture*

- barley protein concentrate for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 317(1–4), pp.138–145. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2011.04.020
34. Morken, T., Kraugerud, O.F., Sørensen, M., Storebakken, T., Hillestad, M., Christiansen, R. and Øverland, M., 2012. Effects of feed processing conditions and acid salts on nutrient digestibility and physical quality of soy-based diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture Nutrition*, 18(1), pp.21–34. DOI: 10.1111/j.1365-2095.2011.00872.x
35. Mroz, Z., Koopmans, S.J., Bannink, A., Partanen, K., Krasucki, W., Øverland, M. and Radcliffe, S., 2006. Chapter 4 Carboxylic acids as bioregulators and gut growth promoters in nonruminants. In *Biology of Growing Animals*, 4, pp.81–133. DOI: 10.1016/S1877-1823(09)70091-8
36. Najdegerami, E.H., Tran, T.N., Defoirdt, T., Marzorati, M., Sorgeloos, P., Boon, N. and 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(1), pp.25–33. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2011.01194.x
37. 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(13), pp.1490–1500. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2009.02249.x
38. Ng, W.K. and Koh, C.B., 2017. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. In *Reviews in Aquaculture*, 9(4), pp.342–368. DOI: 10.1111/raq.12141
39. Oliva-Teles, A., Enes, P. and Peres, H., 2015. Replacing fishmeal and fish oil in and microbiota in the intestine. *Fish and Shellfish Immunology*, 88, pp.65–75. DOI: 10.1016/j.fsi.2019.02.064
28. Lückstädt, C., 2008. The use of acidifiers in fish nutrition. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 3(044), pp.1–8. DOI: 10.1079/PAVSNNR20083044
29. Lückstädt, C. and Kühlmann, K.J., 2011. The use of diformates in tilapia-ways to improve performance sustainably. *InfoFish International*, 2, pp.22–25.
30. Mohammadian, T., Momeni, H., Mesbah, M., Tabandeh, M.R. and Khosravi, M., 2020. Effect of different levels of dietary acidifier “sodium diformate” on the innate immune system and expression of growth and immunological related genes in *Salmo trutta caspius*. *Aquaculture Nutrition*, 26(6), pp.2074–2085. DOI: 10.1111/anu.13148
31. Mohammadian, T., Momeni, H., Kazemi, M., Mesbah, M., Abedini, M., Zare, M., Khosravi, M. and Osroosh, E., 2023. Eubiotic Effect of a Dietary Bio-Aqua® and Sodium Diformate (NaDF) on *Salmo trutta caspius*: Innate Immune System, Biochemical Indices, Antioxidant Defense, and Expression of Immunological and Growth-Related Genes. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 15(5), pp.1342–1354. DOI: 10.1007/s12602-022-09965-x
32. Mohtashempour, H., Mohammadian, T., Mesbah, M., Rezaie, A. and Mozanzadeh, M.T., 2023. Acidifier supplementation in low-fish meal diets improved growth performance and health indices in Asian seabass (*Lates calcarifer*) juveniles. *Aquaculture Reports*, 29, pp.101502. DOI: 10.1016/j.aqrep.2023.101502
33. Morken, T., Kraugerud, O.F., Barrows, F.T., Sørensen, M., Storebakken, T. and Øverland, M., 2011. Sodium diformate and extrusion temperature affect nutrient digestibility and physical quality of diets with fish meal and

- 10.1016/j.aquaculture.2006.10.007
46. Selle, P.H., Ravindran, V., Caldwell, A. and Bryden, W.L., 2000. Phytate and phytase: consequences for protein utilisation. *Nutrition Research Reviews*, 13(2), pp.255–278. DOI: 10.1079/095442200108729098
47. Soltan, M.A., Hassaan, M.S. and Meshrf, R.N., 2017. Response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to diet acidification: Effect on growth performance and feed utilization. *Journal of Applied Aquaculture*, 29(3–4), pp.207–219. DOI: 10.1080/10454438.2017.1357063
48. Suphoronski, S.A., Chideroli, R.T., Facimoto, C.T., Mainardi, R.M., Souza, F.P., Lopera-Barrero, N.M., Jesus, G.F. A., Martins, M.L., Di Santis, G.W., de Oliveira, A., Gonçalves, G.S., Dari, R., Frouel, S. and Pereira, U.P., 2019. Effects of a phytogenic, alone and associated with potassium diformate, on tilapia growth, immunity, gut microbiome and resistance against francisellosis. *Scientific Reports*, 9(1), pp.6045. DOI: 10.1038/s41598-019-42480-8
49. Svobodova, Z., Pravda, D. and Plalackova, J., 1991. Unified methods of haematological examination of fish. In *Institute of fish culture and hydrobiology*. Research Institute of fish culture and hydrobiology. https://books.google.com/books?id=5_UWSwAACAAJ
50. Tran-Ngoc, K.T., Huynh, S.T., Sendão, J., Nguyen, T. H., Roem, A. J., Verreth, J.A. J. and Schrama, J.W., 2019. Environmental conditions alter the effect of organic acid salts on digestibility and intestinal morphology in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition*, 25(1), pp.134–144. DOI: 10.1111/anu.12837
51. Wassef, E.A., Abdel-Momen, S.A.G., El-Sayed Saleh, N., Al-Zayat, A.M. and Ashry, A.M., 2017. Is sodium diformate a beneficial feed supplement for European seabass (*Dicentrarchus labrax*)? Effect on growth performance industrial aquafeeds for carnivorous fish. In *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*, pp.203–233. DOI: 10.1016/B978-0-08-100506-4.00008-8
40. Pandey, A. and Satoh, S., 2008. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fisheries Science*, 74(4), pp.867–874. DOI: 10.1111/j.1444-2906.2008.01601.x
41. Partanen, K.H. and Mroz, Z., 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutrition Research Reviews*, 12(1), pp.117–145. DOI: 10.1079/095442299108728884
42. Ragaa, N.M. and Korany, R.M.S., 2016. Studying the effect of formic acid and potassium diformate on performance, immunity and gut health of broiler chickens. *Animal Nutrition*, 2(4), pp.296–302. DOI: 10.1016/j.aninu.2016.08.003
43. Reyshari, A., Mohammadi azarm, H., Mohammadian, T. and Torfi Mozanzadeh, M., 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(5), pp.1135–1144. DOI: 10.1111/anu.12929
44. Roohi, Z., Imanpour, M. and Safari, R., 2024. Evaluating effect of dietary administration of citric acid and lemon juice (*Citrus limon*) on growth performance, serum and mucus immune responses, related-genes expression of growth (GH, IGF-I) and immune (Lyz, IL-1) in common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Aquaculture Development*, 18(3), pp.78–95. DOI: 10.71901/jad-2024-1-748 [In Persian]
45. Sarker, M.S.A., Satoh, S. and Kiron, V., 2007. Inclusion of citric acid and/or amino acid-chelated trace elements in alternate plant protein source diets affects growth and excretion of nitrogen and phosphorus in red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture*, 262(2–4), pp.436–443. DOI:

- and health status. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 43(3), pp.229–234. DOI: 10.1016/j.ejar.2017.09.005
52. Wassef, E.A., Saleh, N.E., Abdel-Meguid, N.E., Barakat, K.M., Abdel-Mohsen, H.H. and El-bermawy, N.M., 2020. Sodium propionate as a dietary acidifier for European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fry: immune competence, gut microbiome, and intestinal histology benefits. *Aquaculture International*, 28(1), pp.95–111. DOI:0.1007/s10499-019-00446-7
53. Webster, C.D., 2002. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. CABI. 432 P. DOI:10.1079/9780851995199.0327
54. Yusefi, M., Mohammadi azarm, H. and Salati, A.P., 2022. Effects of dietary sodium diformate on growth performance, immunological and biochemical blood indices, antioxidant capacity, and thermal stress tolerance of juvenile common carp (*Cprinus carpio*). *Aquaculture Reports*, 22(2), pp.100963. DOI: 10.1016/j.aqrep.2021.100963
55. Zhang, M., Wu, X. and Zhai, S., 2022. Effect of Dietary Compound Acidifiers Supplementation on Growth Performance, Serum Biochemical Parameters, and Body Composition of Juvenile American Eel (*Anguilla rostrata*). *Fishes*, 7(4), pp.203. DOI: 10.3390/fishes7040203