Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics
Print ISSN: 2345-427X
Online ISSN: 2345-4288

انجمن علمی ماهیان زینتی ایران
Iranian Ornamental Fish Society (IOFS)

(OPEN ACCESS)

The effect of adding an organic acid blend to a diet containing cottonseed meal on hematological parameters, blood electrolytes, histopathology, and antioxidant activity in rainbow trout

Seyyed Morteza Hoseini[*1], Habibollah Kashiri[*2], Abbassali Aghaeimoghddam[3], Behrouz Gharavi[4]

1. Corresponding Author, Inland Waters Aquatics Resources Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Gorgan, Iran. E-mail: seyyedmorteza.hoseini@gmail.com
2. Corresponding Author, Cotton Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Gorgan, Iran. E-mail: h_kashiri@yahoo.com
3. Inland Waters Aquatics Resources Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Gorgan, Iran. E-mail: aghaeifishery@gmail.com
4. Inland Waters Aquatics Resources Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Gorgan, Iran. E-mail: behroozgharavy@yahoo.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 09.28.2024
Revised: 10.27.2024
Accepted: 12.25.2024

Keywords:
Antioxidant,
Blood,
Cottonseed,
Histopathology,
Rainbow trout

ABSTRACT

Background and Objectives: The aim of this study was to investigate the effect of adding cottonseed meal and a mixture of organic acids to the diet on hematological characteristics, blood electrolytes, histopathology, and antioxidant activity in the liver of rainbow trout.

Materials and Methods: To this, six treatments consisting of six diets with three replications were designed in a factorial design of 3 × 2. In this design, two levels of cottonseed meal (0% and 15%) and three levels of a mixture of organic acids (lactic acid, citric acid, and potassium sorbate in equal proportions) at 0%, 0.5%, and 1% were added to the diet. A total of 270 rainbow trout with an average weight of 14.0 ± 0.35 g were stocked in 18 aquaria containing 40 L water, with a density of 15 fish per aquarium. The above diets were provided to the fish for 8 weeks at a rate of 3 to 4% of their biomass daily. After 8 weeks of rearing, blood and liver samples were taken from all treatments.

Results: Cottonseed meal and organic acids had no significant effect on hematological parameters except for MCHC, where the addition of cottonseed meal to the diet reduced MCHC. Additionally, cottonseed meal and organic acids did not significantly affect plasma alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and calcium, hepatic superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, reduced glutathione and malondialdehyde, or liver histopathology. The addition of organic acids to the diet increased plasma phosphorus and iron levels, while adding cottonseed meal increased glutathione reductase activity in the liver.

Conclusion: The results of this study indicated that the addition of 15% cottonseed meal to the diet of rainbow trout fingerling has no negative

effects on liver histopathology or antioxidant status but does lead to hypochromic anemia. Furthermore, the addition of organic acids likely increased the bioavailability of phosphorus and iron in the diet. However, the long-term effects of anemia and the potential of organic acids to improve hematopoiesis and phosphorus retention in the body should be explored in future studies.

Cite this article: Hoseini, Seyyed Morteza, Kashiri, Habibollah, Aghaeimoghddam, Abbassali, Gharavi, Behrouz. 2026. The effect of adding an organic acid blend to a diet containing cottonseed meal on hematological parameters, blood electrolytes, histopathology, and antioxidant activity in rainbow trout. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 15 (1), 227-244.

© The Author(s).
Doi: 10.22069/japu.2024.22823.1907
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان
شاپا چاپی: ۲۳٤٥-٤۲۷X
شاپا آنلاین: ۲۳٤٥-٤۲۸۸

اثر افزودن مخلوط اسیدهای آلی به جیره غذایی حاوی کنجاله پنبه‌دانه بر شاخص‌های خون‌شناسی، الکترولیت‌های خون، هیستوپاتولوژی و آنتی‌اکسیدانی کبد در قزل‌آلای رنگین‌کمان

سید مرتضی حسینی*[۱]، حبیب‌اله کشیری*[۲]، عباسعلی آقایی مقدم[۳]، بهروز قره‌وی[٤]

۱. نویسنده مسئول، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آب‌های داخلی، گرگان، ایران. رایانامه: seyyedmorteza.hoseini@gmail.com
۲. نویسنده مسئول، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات پنبه کشور، گرگان، ایران. رایانامه: h_kashiri@yahoo.com
۳. سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آب‌های داخلی، گرگان، ایران. رایانامه: aghaeifishery@gmail.com
٤. سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آب‌های داخلی، گرگان، ایران. رایانامه: behroozgharavy@yahoo.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۳/۰۷/۰۷
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۳/۰۸/۰٦
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۳/۱۰/۰٥

واژه‌های کلیدی:
آنتی‌اکسیدان،
بافت‌شناسی،
پنبه‌دانه،
خون،
قزل‌آلای رنگین‌کمان

چکیده

سابقه و هدف: هدف از اجرای این پروژه بررسی اثر افزودن کنجاله پنبه‌دانه و مخلوط اسیدهای آلی به جیره غذایی بر شاخص‌های خون‌شناسی، الکترولیت‌های خون، هیستوپاتولوژی و آنتی‌اکسیدانی کبد در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود.

مواد و روش‌ها: به این منظور ٦ تیمار متشکل از ٦ جیره غذایی با ۳ تکرار در قالب یک طرح فاکتوریل ۳×۲ در نظر گرفته شد که در آن دو سطح کنجاله پنبه‌دانه شامل صفر و ۱٥ درصد و ۳ سطح مخلوط اسید آلی (مخلوط اسید لاکتیک، اسید سیتریک و سوربات پتاسیم به نسبت مساوی) صفر ۰/٥ و ۱ درصد به جیره غذایی اضافه شد. ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به تعداد ۲۷۰ قطعه و با میانگین وزنی ۰/۳٥ ± ۱٤/۰ گرم در ۱۸ آکواریوم حاوی ٤۰ لیتر آب و با تراکم ۱٥ ماهی در هر آکواریوم ذخیره‌سازی شد. جیره‌های غذایی فوق به مدت ۸ هفته و روزانه ۳ تا ٤ درصد بیومس در اختیار ماهی‌ها قرار گرفتند. پس از ۸ هفته پرورش، نمونه خون و کبد از همه تیمارها گرفته شد.

یافته‌ها: کنجاله پنبه‌دانه و اسیدهای آلی اثر معنی‌داری روی شاخص‌های خون‌شناسی به غیر از MCHC نداشتند. افزودن کنجاله پنبه‌دانه به جیره غذایی باعث کاهش MCHC شد. هم‌چنین، کنجاله پنبه‌دانه و اسیدهای آلی اثر معنی‌داری روی آلانین آمینوترنسفراز، آسپارتات آمینوترنسفراز و

کلسیم پلاسما، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پرکسیداز، گلوتاتیون احیائی و مالون دی آلدهید کبد و بافت‌شناسی کبد نداشتند. افزودن اسیدهای آلی به جیره غذایی باعث افزایش فسفر و آهن پلاسما و افزودن کنجاله پنبه‌دانه به جیره غذایی باعث افزایش فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز در کبد شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که افزودن ۱۵ درصد کنجاله پنبه‌دانه در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت قد اثر منفی بر بافت‌شناسی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی کبد ندارد ولی باعث کم‌خونی هیپوکرومیک می‌شود. هم‌چنین، افزودن اسیدهای آلی به جیره احتمالاً دسترسی فسفر و آهن جیره را افزایش داده است. با این‌حال، اثرات بلندمدت کم‌خونی و قابلیت اسید آلی برای بهبود خون‌سازی و تثبیت فسفر در بدن باید در مطالعات آتی بررسی شود.

استناد: حسینی، سید مرتضی، کشیری، حبیب‌اله، آقایی مقدم، عباسعلی، قره‌وی، بهروز (۱۴۰۵). اثر افزودن مخلوط اسیدهای آلی به جیره غذایی حاوی کنجاله پنبه‌دانه بر شاخص‌های خون‌شناسی، الکترولیت‌های خون، هیستوپاتولوژی و آنتی‌اکسیدانی کبد در قزل‌آلای رنگین‌کمان. *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۵ (۱)، ۲۴۴-۲۲۷.
Doi: 10.22069/japu.2024.22823.1907

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

تغذیه بیش‌ترین سهم در هزینه تمام شده تولید آبزیان را دارد و به همین دلیل، اطمینان از کیفیت و دسترسی به جیره‌های غذایی یکی از ارکان مهم در آبزی‌پروری موفق می‌باشد. یکی از اقلام اصلی جیره غذایی آبزیان، کنجاله سویا است که از قابلیت هضم و پروفیل اسید آمینه خوبی برخوردار است (۱). اما بخش زیادی از کنجاله سویا در کشور وارداتی است و با خروج ارز از کشور تامین می‌شود (لینک خبر https://tn.ai/3122660). بنابراین، توجه به منابع غذایی داخلی که بتوانند جایگزین بخشی از کنجاله سویا در جیره آبزیان شوند اهمیت بالایی دارد.

یکی از محصولات داخلی که می‌تواند در جیره غذایی آبزیان استفاده شود، کنجاله پنبه‌دانه است. تولید سالانه پنبه‌دانه در کشور متغیر است و در سال جاری حدود ۱۲۵ هزار تن بوده است (isna.ir/xdRqGN). کنجاله پنبه‌دانه بسته به روش فرآوری و روغن‌کشی می‌تواند بین ۲۵ تا ۵۰ درصد پروتئین داشته باشد و به همین دلیل با موفقیت در جیره غذایی گونه‌های مختلفی مانند تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) (۲)، گربه‌ماهی کانال (*Ictalurus punctatus*) (۳)، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (٤) و شورید قرمز (*Sciaenops ocellatus*) (۵) استفاده شده است. مطالعات انجام‌شده روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نشان داده است که افزودن کنجاله پنبه‌دانه بیش از ۱۰ درصد جیره غذایی می‌تواند اثرات منفی در مراحل آغازین زندگی ماهی داشته باشد (٦)؛ اگرچه در ماهیان مولد و پیش مولد می‌توان تا ۵۰ درصد کنجاله پنبه دانه در جیره استفاده نمود (۷، ۸، ۹). مطالعات نشان داده‌اند که وجود گوسیپول در کنجاله پنبه‌دانه باعث کاهش جذب آهن و بروز کم‌خونی در ماهی می‌شود (۷، ۹، ۱۰). هم‌چنین، افزودن کنجاله پنبه‌دانه به جیره ماهی باعث کاهش قابلیت هضم اسیدهای آمینه می‌شود (٦، ۱۱). بنابراین، یافتن راه‌حلی برای این مشکلات می‌تواند استفاده از کنجاله پنبه‌دانه در جیره آبزیان را تسهیل نماید.

افزودن اسیدهای آلی به جیره‌های مبتنی بر پروتئین گیاهی باعث بهبود عملکرد آن‌ها شده است (۱۲, ۱۳). هم‌چنین، اسیدهای آلی باعث افزایش دسترسی مواد معدنی جیره می‌شوند و ایمنی ماهی را تحریک می‌کنند (١٤، ۱۵، ١٦). برخی مطالعات هم‌چنین نشان داده‌اند که اسیدهای آلی می‌توانند باعث بهبود شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهی شوند (۱۲، ۱۷، ۱۸). بنابراین یکی از روش‌های بالقوه برای کاهش اثرات منفی کنجاله پنبه در جیره آبزیان می‌تواند افزودن اسیدهای آلی باشد. تاکنون پژوهش در این زمینه صورت نگرفته است؛ بنابراین این پژوهش به‌منظور بررسی اثر افزودن مخلوطی از اسیدهای آلی به جیره غذایی حاوی ۱۵ درصد کنجاله پنبه‌دانه بر شاخص‌های خون‌شناسی، مقدار الکترولیت‌های خون، شاخص‌های آنتی اکسیدانی و هیستوپاتولوژی کبد در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت‌قد انجام گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه جیره‌های غذایی: اسید لاکتیک مایع (خلوص ۸۵ درصد)، اسید سیتریک بدون آب (خلوص ۹۹ درصد) و سوربات پتاسیم (خلوص ۹۹ درصد) با گرید غذایی از بازار داخل خریداری شدند که از کشور چین وارد شده بودند. در این پژوهش ٦ تیمار آزمایشی متشکل از ٦ جیره غذایی در نظر گرفته شد که سه جیره آن بدون کنجاله پنبه‌دانه و حاوی ۲۵ درصد کنجاله سویا و مقادیر صفر، ۰/۵ و ۱ درصد مخلوط اسیدهای آلی (مقدار مساوی از اسید لاکتیک، اسید سیتریک و سوربات پتاسیم) بوده و سه جیره دیگر حاوی ۱۵ درصد کنجاله پنبه‌دانه و مقادیر صفر، ۰/۵ و ۱ درصد

مخلوط اسیدهای آلی بود (فاکتوریل ۲ × ۳). مقدار کنجاله پنبه بر اساس رفرنس‌های موجود انتخاب شد که نشان می‌دهند جیره غذایی حاوی ۱۰ درصد کنجاله پنبه‌دانه اثر معنی‌داری بر رشد ماهی قزل‌آلا ندارند ولی مقادیر بالاتر آن باعث کاهش رشد و قابلیت هضم می‌شوند (٦). هم‌چنین مقادیر اسیدهای آلی براساس مطالعات پیشین روی قزل‌آلای رنگین‌کمان انتخاب شدند (۱۷، ۱۹). پیش از فرمولاسیون جیره‌های غذایی، ترکیب شیمیایی کنجاله پنبه‌دانه، کنجاله سویا، پودر گوشت کشتارگاه طیور و پودر ماهی کیلکا تعیین گردید (جدول ۱). فرمولاسیون جیره‌های آزمایشی با استفاده از نرم‌افزار WUFFDA انجام شد و در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۱- ترکیب شیمیایی اقلام غذایی (درصد).

Table 1. Chemical composition of feed ingredients (%).

خاکستر خام Crude ash	فیبر خام Crude fiber	چربی خام Crude fat	پروتئین خام Crude protein	رطوبت Moisture	
3.5	13.4	27.2	33.2	7.9	کنجاله پنبه دانه Cottonseed oilcake
-	-	-	42.1	-	کنجاله سویا Soybean meal
-	-	22.9	59.1	-	پودر گوشت کشتارگاه طیور Poultry slaughterhouse meat meal
-	-	9.6	72.7	-	پودر ماهی Fish meal

جدول ۲- فرمولاسیون، ترکیب شیمیایی (درصد)، پروفیل اسید آمینه (درصد) و پروفیل اسید چرب (درصد از چربی جیره) جیره‌های غذایی.

Table 2. Formulation, chemical composition (%), amino acid profile (%), and fatty acid profile (% of dietary fat) of the experimental diets.

جیره کنجاله پنبه‌دانه Cottonseed oilcake diet	جیره شاهد Control diet		جیره کنجاله پنبه‌دانه Cottonseed oilcake diet	جیره شاهد Control diet	
1.4	1.5	ترئونین Threonine	23.5	23.4	آرد گندم Wheat meal
0.46	0.48	تریپتوفان Tryptophan	12	25	آرد کنجاله سویا Soybean meal
1.9	1.9	والین Valine	17.3	16.4	پودر ماهی کیلکا Kilka fish meal
		پروفایل اسید چرب Fatty acid profile	15	0	آرد کنجاله پنبه‌دانه Cottonseed oilcake meal
0.86	0.67	C14:0	25	25	پودر گوشت کشتارگاه طیور Poultry slaughterhouse meat meal
0.07	0.12	C14:1n5	3.5	5.5	روغن کلزا Canola oil
21.2	19.9	C16:0	1.7	2.8	روغن آفتابگردان Sunflower oil

ادامه جدول ۲-

Continue Table 2.

جیره کنجاله پنبه‌دانه Cottonseed oilcake diet	جیره شاهد Control diet		جیره کنجاله پنبه‌دانه Cottonseed oilcake diet	جیره شاهد Control diet	
2.4	2.5	C16:1n7	1	1	مکمل معدنی Mineral premix
5.9	6.8	C18:0	0.5	0.5	مکمل ویتامینی Mineral premix
31	34	C18:1n9	0.25	0.25	متیونین Methionine
0	1.5	C18:1n7	0.25	0.15	لیزین Lysine
32	26.7	C18:2n6*cis*			ترکیب شمیایی Chemical composition
1.6	2.4	C18:3n3	9.8	9.5	رطوبت Moisture
0.42	0.48	C20:0	41.7	41.4	پروتئین خام Crude protein
0.56	0.77	C20:1n9	17.9	17	چربی خام Crude fat
0.11	0.16	C20:2n6	7.0	7.7	خاکستر Crude ash
0.42	0.49	C20:4n6	4	3.2	فیبر خام Crude fiber
0.04	0	C20:3n3	0.72	0.66	فسفر کل Total phosphorous
0.63	0.65	C20:5n3			پروفایل اسید آمینه Amino acid profile
0.24	0.33	C22:0	2.9	2.8	آرژینین Arginine
0.09	0.31	C22:1n9	2.8	2.8	گلایسین Glycine
2.3	2.4	C22:6n3	2	2.1	سرین Serine
0.21	0.50	C24:0	1	1	هیستیدین Histidine
0	0	C24:1n9	1.5	1.6	ایزولوسین Isoleucine
28.8	26.7	مجموع اشباع ΣSaturated	2.2	2.4	لوسین Leucine
34.1	39.2	مجموع تک غیراشباع ΣMUFA	2.5	2.5	لیزین Lysine
32.5	27.4	مجموع n-6 Σn-6	1	1	متیونین Methionine
4.6	5.5	مجموع n-3 Σn-3	0.76	0.52	سیستئین Cystein
0.78	0.82	نسبت اشباع: غیراشباع چندگانه Saturated:PUFA	1.7	1.7	فنیل آلانین Phenylalanine
			0.94	1.1	تیروزین Tyrosine

به منظور تولید جیره‌های غذایی، ابتدا اقلام جیره با الک یک میلی‌متری الک شدند تا مواد درشت و زائد از آن‌ها خارج شود. سپس، پودر ماهی، پودر گوشت، آرد گندم، آرد کنجاله سویا و کنجاله پنبه‌دانه به مقدار لازم توزین شده و در یک تشت با هم به خوبی مخلوط شدند. در ادامه روغن کلزا و آفتابگردان به میزان مناسب توزین شده و به مخلوط قبلی اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه به خوبی مخلوط شدند. در انتها نیز سایر مواد جیره توزین شده و در ۳۵۰ میلی‌لیتر آب حل شده و به یک کیلوگرم مخلوط قبلی اضافه و به خوبی هم زده شدند. مخلوط اسیدهای آلی نیز در این مرحله با آب جایگزین و به مخلوط مواد جیره اضافه شد (مقدار صفر، ۵ و ۱۰ میلی‌لیتر از مقدار آب ذکر شده در بالا کسر و به جای آن مخلوط اسیدهای آلی افزوده شد). خمیر حاصله توسط چرخ گوشت با دای ۳ میلی‌متر به صورت رشته‌ای درآمد و روی ورق‌های روزنامه پهن شد. برای خشک کردن رشته‌ها، از وزش باد پنکه به مدت ۲۴-۴۸ ساعت استفاده شد. سپس رشته‌های خشک شده در اندازه‌های مناسب خرد شدند تا پلت‌های غذایی تهیه شوند.

آنالیز جیره‌های غذایی: آنالیز ترکیب شیمیایی جیره‌ها به روش AOAC (۲۰) انجام شد. به این منظور، نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد خشک شدند تا مقدار رطوبت به دست آید. برای اندازه‌گیری پروتئین نمونه‌ها از روش کلدال و محاسبه مقدار نیتروژن استفاده شد. مقدار نیتروژن به‌دست آمده در ضریب ۶/۲۵ ضرب شد تا مقدار پروتئین محاسبه شود. مقدار چربی جیره با استفاده از روش استخراج اتری و دستگاه سوکسله تعیین شد. در این روش از پترولیوم اتر به عنوان حلال استفاده شد. برای تعیین خاکستر، نمونه‌ها به مدت ۸ ساعت در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد سوزانده شدند.

برای تعیین پروفیل اسید آمینه از دستگاه HPLC مجهز به دتکتور فلوروسنت (مدل Agilent 1090 system, Palo Alto, CA, USA) استفاده شد. به این منظور ابتدا نمونه به‌مدت ۲۴ ساعت توسط اسید هیدروکلریک ۶ نرمال در دمای ۱۱۵ درجه سانتی‌گراد هضم گردید. سپس محلول حاصل توسط فیلتر سرسرنگی صاف شده و مراحل پروتئین‌زدایی (توسط تریک کلرواستیک اسید) و مشتق‌سازی (توسط OPA) انجام گردید. مقدار هر اسید آمینه با توجه به پیک استاندارد آن و زمان عبور از ستون (C18) تعیین گردید.

پروفیل اسیدهای چرب جیره‌های غذایی با استفاده از دستگاه GC-MS انجام شد. استخراج چربی با استفاده از مخلوط اتر- کلرفورم انجام شد. پس از متیلاسیون اسیدهای چرب، نمونه به دستگاه تزریق و مقدار هر یک از اسیدهای چرب بر اساس گراف استاندارد محاسبه شد.

پرورش ماهی و نمونه‌برداری: بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از یک مزرعه بخش خصوصی در شهرستان ساری تهیه شد که میانگین وزنی آن حدود ۱۱ گرم بود. تعداد ۳۰۰ قطعه ماهی به سالن آکواریوم مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آب‌های داخلی منتقل شد. ماهی‌ها ابتدا به مدت یک هفته در یک مخزن ۵۰۰ لیتری ذخیره‌سازی شدند و جیره غذایی شاهد دریافت نمودند تا با شرایط جدید سازگار شوند. سپس تعداد ۲۷۰ قطعه ماهی سالم و هم اندازه در آکواریوم‌ها توزیع شدند. در این پژوهش از ۱۸ آکواریوم ۴۵ لیتری با حجم آبگیری ۴۰ لیتر آب

استفاده شد و برای هر تیمارآزمایشی به طور تصادفی سه آکواریوم در نظر گرفته شد. در هر مخزن تعداد ۱۵ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن حدود ١٤ گرم ذخیره‌سازی شد. برای هر مخزن، یک سیستم تصفیه و گردش آب (شامل فیلتر فیزیکی، بستر باکتریایی و لامپ یو وی) طراحی شد به‌طوری‌که میزان تعویض آب روزانه ۳۰ درصد حجم آکواریوم‌ها بود. شستشوی فیلترهای نمدی آکواریوم‌ها و سیفون مواد زائد کف آکواریوم ها به صورت روزانه می‌شد. نظافت سطوح داخلی اکواریوم‌ها هفته‌ای یک بار انجام می‌شد. ماهی‌ها به مدت ۸ هفته با جیره‌های غذایی مختلف تغذیه شدند و نرخ غذادهی روزانه ٣-٤ درصد بود که در دو وعده در اختیار ماهی‌ها قرار می‌گرفت. در طول دوره، دما (۰/۸۸ ± ۱۲/۳ درجه سانتی‌گراد)، اکسیژن محلول (۰/٦٥ ± ۷/۳۳ میلی‌گرم در لیتر)، pH (۰/۲۸ ± ۷/۸۹)، آمونیاک غیریونیزه (۰/۰۰۱±۰/۰۲۳ میلی‌گرم در لیتر) و نیترات (۱/۷۷ ± ۱۵/۱ میلی‌گرم در لیتر) آب با استفاده از دستگاه Hach (HQ40D, Loveland, Colorado, USA) و Palintest (Model 7100, Palintest House, Kingsway, Team Valley, Gateshead, Tyne & Wear, NE11 0NS, United Kingdom) اندازه‌گیری شدند. در انتهای دوره پرورش سه ماهی از هر آکواریوم صید و در محلول میخک (۳ گرم در لیتر) بیهوش شدند (۲۱) و نمونه خون توسط سرنگ‌های هپارینه از پشت باله مخرجی ماهی گرفته شد و بخشی از ان به صورت تازه برای آزمایش‌های خون‌شناسی استفاده شد و بخش دیگر به‌منظور جداسازی پلاسما به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده (۵۰۰۰ دور در دقیقه) و نمونه‌های پلاسما تا زمان انجام آزمایشات در فریزر منجمد شدند. پس از خونگیری، ماهی‌ها با ضربه به سر و قطع نخاع آسان‌کشی شدند و حفره شکمی آن‌ها توسط قیچی باز شد. تکه‌ای از کبد ماهی جدا شده و در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد. تکه دیگری از کبد ماهی برای انجام تست‌های آنتی اکسیدانی در ازت مایع منجمد شد.

آزمایش‌های خون‌شناسی: پارامترهای خون‌شناسی شامل شمارش تعداد گلبول‌های قرمز و محاسبه اندیس‌های هماتولوژیک بر اساس روش (۲۲) انجام شد. بر این اساس برای رقیق‌سازی نمونه‌های خون از محلول دایس استفاده شد و شمارش گلبول‌ها زیر میکروسکوپ و با استفاده از لام نئوبار انجام گردید. هماتوکریت توسط میکروسانتریفیوژ و هموگلوبین توسط کیت تشخیص طبی زیست‌شیمی اندازه‌گیری شدند.

شاخص‌های بیوشیمیایی پلاسما: فعالیت آلانین آمینوترنسفراز و آسپارتات آمینوترنسفراز پلاسما با استفاده از کیت‌های تجاری زیست‌شیمی و اسپکتروفتومتر در طول موج ٣٤٠ نانومتر اندازه‌گیری شد. کلسیم، فسفر و آهن پلاسما با استفاده از کیت‌های بیوشیمیایی درمان فراز کاو و دستگاه میکروپلیت ریدر اندازه‌گیری شدند.

شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی کبد: نمونه‌های کبد در ۱ حجم بافر فسفات (pH 7) همگن شده و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند (۱۳۰۰۰ دور در دقیقه). سپس مایع رویی جدا و تا زمان اندازه‌گیری شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی در فریزر نگهداری شد. فعالیت سوپرکسید دیسموتاز، کاتالاز، و مقدار گلوتاتیون احیایی و مالون دی آلدهید توسط کیت‌های تجاری Zellbio آلمان اندازه‌گیری شدند. به‌منظور محاسبه فعالیت ویژه آنزیم‌های مذکور، پروتئین محلول

نمونه‌ها با استفاده از کیت میکروپروتئین شرکت زیست‌شیمی اندازه‌گیری شد.

تهیه مقاطع بافتی کبد: جهت انجام مراحل آبگیری و پارافینه کردن نمونه‌های فیکس شده کبد، از دستگاه تیشوپروسسور استفاده شد و نهایتاً نمونه‌ها در بلوک‌های پارافینی قرار گرفتند. سپس با استفاده از دستگاه میکروتوم، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون تهیه و پس از قرار گرفتن روی لام، با استفاده از رنگ ائوزین- هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شدند. از هر نمونه تعداد ۲ مقطع با فواصل ۲۰۰ میکرون تهیه گردید. در نهایت مقاطع بافتی تهیه شده جهت ارزیابی تغییرات بافتی در کبد استفاده شدند (۲۳).

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌ها در نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند. به این منظور ابتدا پراکنش نرمال و همگنی واریانس‌ها توسط آزمون‌های Shapiro-Wilk و Levene تأیید شد. سپس از آزمون two-way ANOVA و Duncan برای بررسی اثر استفاده از کنجاله پنبه‌دانه و اسیدهای آلی در جیره استفاده شد. بررسی اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ انجام و داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شدند.

نتایج

شاخص‌های خون‌شناسی در تیمارهای مختلف در جدول ۳ ارائه شده‌اند. افزودن کنجاله پنبه‌دانه و اسیدهای آلی اثر معنی‌داری بر تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین، MCV و MCH نداشت. اما مقدار MCHC در تیمارهای کنجاله پنبه‌دانه به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P=۰/۰۰۸).

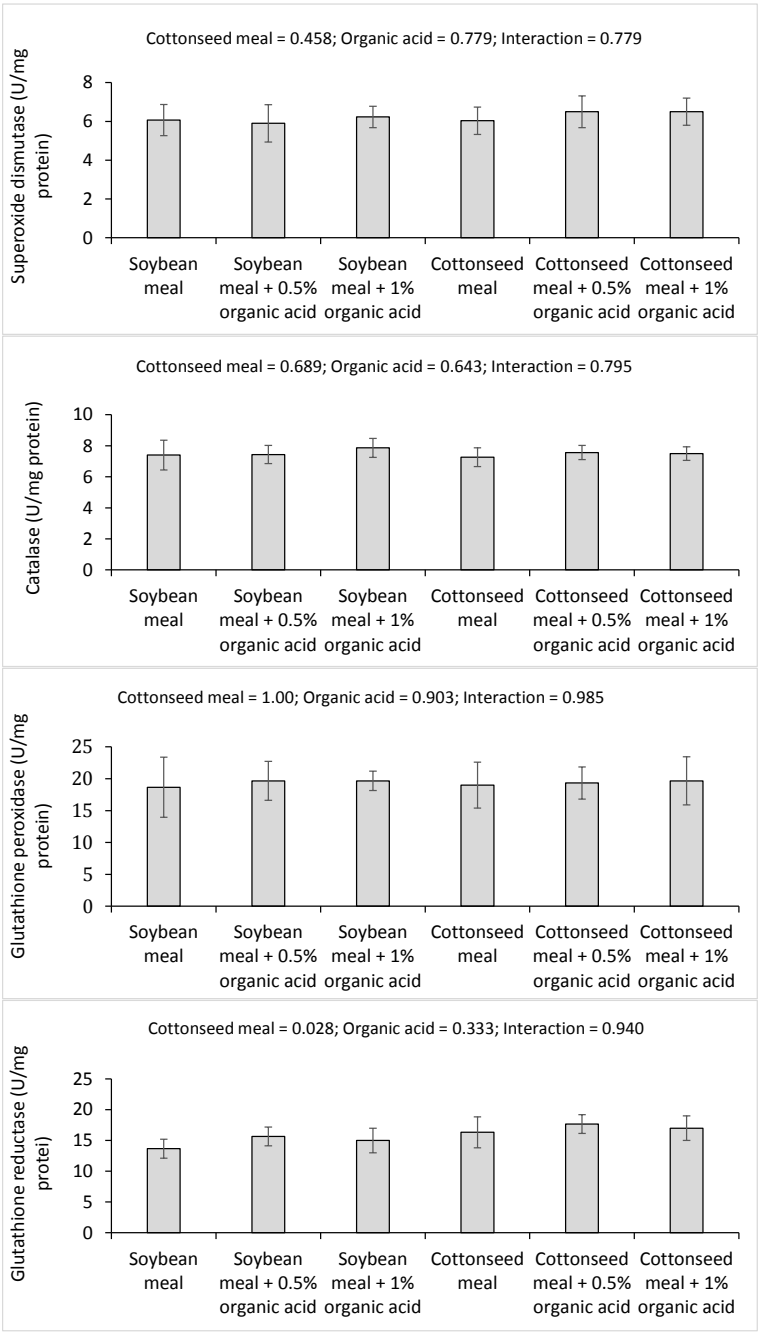
هم‌چنین، کنجاله پنبه‌دانه و اسیدهای آلی اثر معنی‌داری بر فعالیت آلانین آمینوترنسفراز و آسپارتات آمینوترنسفراز و غلظت کلسیم پلاسما نداشتند. کنجاله پنبه‌دانه اثر معنی‌داری بر غلظت فسفر و آهن پلاسما نداشت ولی اسیدهای آلی به‌طور معنی‌داری غلظت فسفر (P=۰/۰۴۸) و آهن (P=۰/۰۱۲) پلاسما را افزایش دادند (جدول ۳).

افزودن کنجاله پنبه‌دانه و اسیدهای آلی به جیره غذایی اثر معنی‌داری بر فعالیت سوپرکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پرکسیداز کبد ماهی نداشت (شکل ۱؛ P>۰/۰۵). اما کنجاله پنبه‌دانه باعث افزایش فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز کبد در ماهی‌ها شد (شکل ۲؛ P=۰/۰۲۸). محتوای گلوتاتیون احیائی و مالون دی آلدهید در کبد ماهی ها اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۲؛ P>۰/۰۵).

جدول ۳- شاخص‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی پلاسمای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از ۸ هفته پرورش با جیره‌های غذایی مختلف.

Table 3. Hematological and plasma biochemical parameters of rainbow trout after 8 weeks of rearing with different dietary treatments.

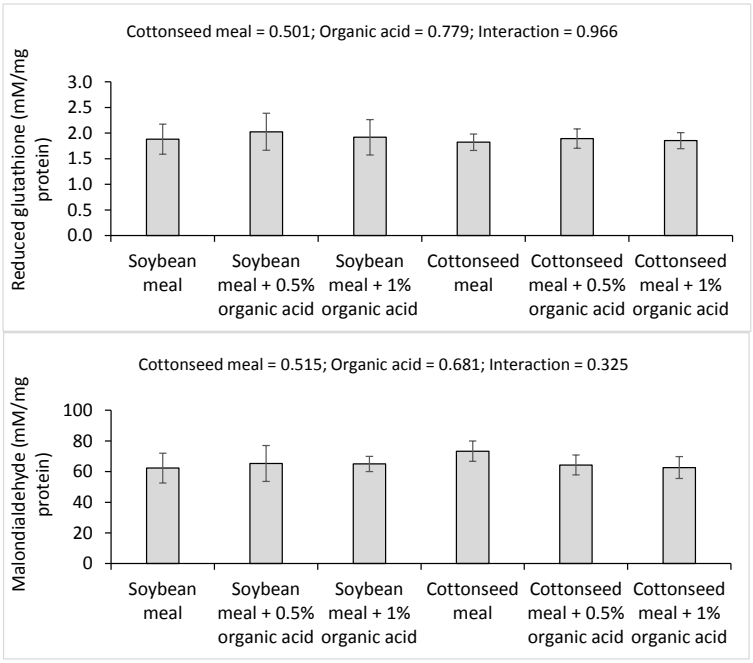
	تیمارهای آزمایشی Experimental treatments								P-value		
	سویا Soybean meal	سویا + اسید آلی (۰/۵ درصد) Soybean meal + organic acid (0.5%)	سویا + اسید آلی (۱ درصد) Soybean meal + organic acid (1%)	پنبه‌دانه Cottonseed meal	پنبه‌دانه + اسید آلی (۰/۵ درصد) Cottonseed meal + organic acid (0.5%)	پنبه‌دانه + اسید آلی (۱ درصد) Cottonseed meal + organic acid (1%)	پنبه‌دانه Cottonseed	اسید آلی Organic acid	برهمکنش Interaction
گلبول قرمز (میلیون سلول در میکرولیتر) Erythrocyte (million cell/µL)	1.42 ± 0.55	0.76 ± 0.28	0.81 ± 0.51	1.13 ± 0.44	0.82 ± 0.23	1.14 ± 0.26	0.876	0.147	0.443
هماتوکریت (درصد) Hematocrit (%)	34.9 ± 9.04	36.2 ± 5.46	32.3 ± 13.2	40.8 ± 3.51	39.2 ± 4.36	41.2 ± 4.96	0.124	0.926	0.797
هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر) Hemoglobin (g/dL)	6.00 ± 1.04	6.23 ± 0.55	5.67 ± 0.55	5.63 ± 0.67	5.57 ± 1.12	5.60 ± 0.75	0.357	0.847	0.818
MCV (فمتولیتر) MCV (fL)	266 ± 86.9	505 ± 147	434 ± 86.5	394 ± 134	506 ± 147	371 ± 62.1	0.960	0.064	0.376
MCH (پیکوگرم) MCH (pg)	46.7 ± 17.5	89.7 ± 33.6	85.7 ± 36.9	54.9 ± 20.4	70.3 ± 14.0	50.3 ± 7.87	0.202	0.149	0.328
MCHC (گرم در دسی‌لیتر) MCHC (g/dL)	17.4 ± 1.67	17.6 ± 3.74	18.9 ± 5.18	13.8 ± 0.55	14.1 ± 1.48	13.6 ± 0.23	0.008	0.928	0.829
آلانین آمینوترنسفراز (واحد/لیتر) Alanine aminotransferase (U/L)	15.7 ± 3.06	15.7 ± 1.53	15.3 ± 3.21	15.7 ± 3.79	16.0 ± 1.00	15.0 ± 2.65	1.000	0.908	0.978
آسپارتات آمینوترنسفراز (واحد/لیتر) Aspartate aminotransferase (U/L)	77.3 ± 23.5	75.3 ± 12.1	76.0 ± 19.1	69.0 ± 19.3	68.3 ± 19.5	67.0 ± 22.0	0.396	0.988	0.966
کلسیم (میلی‌گرم/دسی‌لیتر) Calcium (mg/dL)	7.33 ± 0.91	8.13 ± 0.68	7.97 ± 0.96	7.33 ± 0.51	7.67 ± 0.71	7.80 ± 0.72	0.568	0.373	0.867
فسفر (میلی‌گرم/دسی‌لیتر) Phosphorous (mg/dL)	9.50 ± 0.70	11.0 ± 1.29	11.6 ± 1.43	10.7 ± 0.85	12.5 ± 1.22	11.1 ± 1.10	0.098	0.048	0.522
آهن (میکروگرم/دسی‌لیتر) Iron (mg/dL)	460 ± 90.8	598 ± 111	613 ± 75.0	433 ± 95.6	601 ± 68.5	617 ± 92.8	0.876	0.012	0.943



شکل ۱- فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از ۸ هفته پرورش با جیره‌های غذایی مختلف.

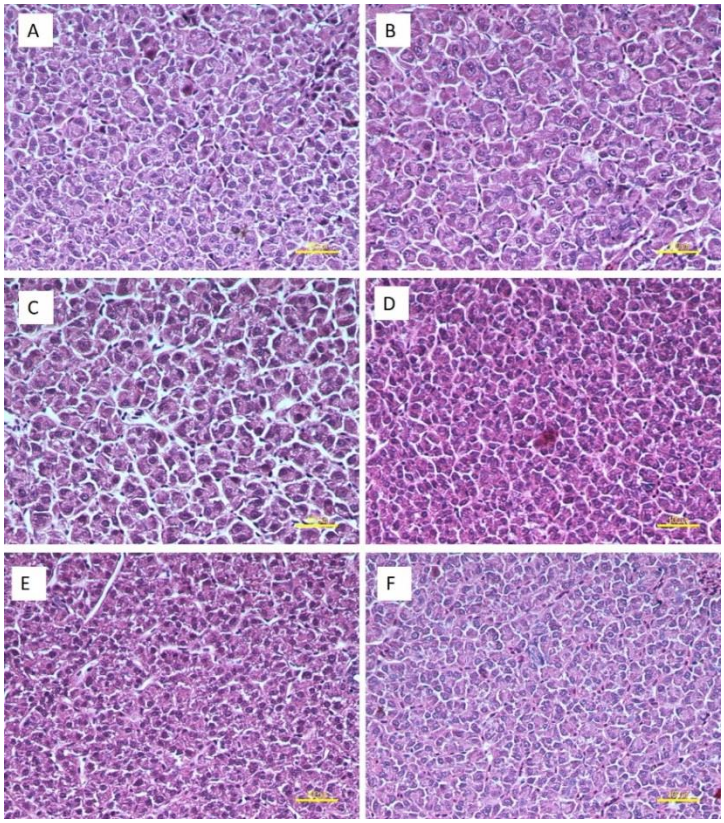
Figure 1. Hepatic antioxidant enzyme activities of rainbow trout after 8 weeks of rearing with different dietary treatments.

مقطع بافتی کبد ماهیان تیمارهای مختلف در شکل ۳ نشان داده شده‌اند. کبد ماهی در همه تیمارها سالم بود و عارضه پاتولوژیک خاصی در آن‌ها مشاهده نشد.



شکل ۲- محتوای گلوتاتیون احیائی و مالون دی آلدهید کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از ۸ هفته پرورش با جیره‌های غذایی مختلف.

Figure 2. Hepatic reduced glutathione and malondialdehyde contents of rainbow trout after 8 weeks of rearing with different dietary treatments.



شکل ۳- مقاطع بافتی کبد ماهی‌های تیمارهای سویا (A)، سویا + اسید آلی ۰/۵ درصد (B)، سویا + اسید آلی ۱ درصد (C)، پنبه‌دانه (D)، پنبه‌دانه + اسید آلی ۰/۵ درصد (E)، پنبه‌دانه + اسید آلی ۱ درصد (F).

Figure 3. Liver histological sections of fish from the soybean treatment (A), soybean + 0.5% organic acid (B), soybean + 1% organic acid (C), cottonseed (D), cottonseed + 0.5% organic acid (E), and cottonseed + 1% organic acid (F).

بحث

پارامترهای خون‌شناسی ابزار مهمی برای ارزیابی تغییرات فیزیولوژیک هستند و تغییرات کیفی و کمی در این پارامترها، دیدگاه مناسبی در خصوص سلامت ماهی ارائه می‌دهند (۲٤). با این‌حال، تفسیر پارامترهای خونی به دلیل تغییراتی که ناشی از عوامل داخلی و خارجی مانند جنس، اندازه، شرایط کشت و تأثیرات محیطی است، دشوار است. یکی از مشکلاتی که پس از تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۱-۱۵ گرمی) با کنجاله پنبه‌دانه (جیره حاوی ۱۵ درصد کنجاله پنبه‌دانه) مشاهده شده است، کاهش معنی‌دار هماتوکریت خون بوده است (۲۵). هم‌چنین، وقتی کنجاله پنبه‌دانه در سطح ۵۹ درصد به جیره غذایی مولدین نر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان اضافه شد، کاهش معنی‌دار هموگلوبین و هماتوکریت خون مشاهده شده است (۹). این علائم کم‌خونی می‌تواند به دلیل کاهش فراهمی آهن جیره باشد که منجر به ناپایداری گلبول‌های قرمز و کاهش سنتر هموگلوبین می‌شود (۲۵). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که کنجاله پنبه‌دانه در سطح ۱۵ درصد جیره باعث کاهش معنی دار MCHC می‌شود که نشانه کم‌خونی هیپوکرومیک به دلیل کمبود آهن و سنتر هموگلوبین است. افزودن مخلوط اسیدهای آلی به جیره اثر معنی‌داری در حل این مشکل نداشت اگرچه میزان آهن پلاسما را افزایش داد. اسیدهای آلی با کاهش pH محیط دستگاه گوارش باعث افزایش انحلال و دسترسی مواد معدنی می‌شوند. با این‌حال این اطلاعات برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تنها در مورد استفاده از اسید سیتریک در جیره غذایی در دسترس است. مثلا افزودن اسید سیتریک در سطح ۵ درصد به جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث افزایش دسترسی آهن جیره شده است (۲٦). افزودن ۰/٤ تا ۱/٦ درصد اسید سیتریک به جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث افزایش خطی مقدار آهن کل بدن شد (۲۷). ولی افزودن ۰/۵ تا ۲ درصد اسید لاکتیک به جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان اثر معنی‌داری بر شاخص‌های MCH و MCHC خون نداشت که می‌تواند نشان‌دهنده عدم تأثیر در دسترسی آهن جیره باشد (۱۷). بنابراین، بررسی میزان آهن کبد و فعالیت‌های مرتبط با خون‌سازی در مطالعات آتی می‌تواند دلیل عدم تأثیر اسیدهای آلی بر MCHC خون را مشخص نماید.

آنزیم‌های آنتی اکسیدانی نقش مهمی در حفاظت سلول‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو دارند. گلوتاتیون یک ملکول آنتی اکسیدانی است که ضمن داشتن نقش روبش رادیکال آزاد، به عنوان کو-فاکتور در عملکرد آنزیم گلوتاتیون پرکسیداز نقش دارد (۲۸). گلوتاتیون پرکسیداز مسئول خنثی‌سازی پرکسید هیدروژن و سایر هیدروپرکسیدها است و در خلال فعالیت این آنزیم گلوتاتیون اکسید می‌شود که این شکل از گلوتاتیون از نظر زیستی فعالیت ندارد (۲۹). گلوتاتیون ردوکتاز مسئول احیاء گلوتاتیون اکسید شده است (۳۰). زمانی که رادیکال‌های آزاد به اسیدهای چرب چندغیراشباع در غشای سلولی حمله می‌کند، منجر به پراکسیداسیون اسیدهای چرب می‌شود. این فرآیند محصولات جانبی متنوعی تولید می‌کند که یکی از مهم‌ترین آن‌ها مالون دی‌آلدهید است. سطوح بالای مالون دی آلدهید در بافت‌ها نشان‌دهنده وقوع استرس اکسیداتیو و آسیب قابل‌توجه به غشای سلولی است. بر اساس نتایج پژوهش‌های پیشین، افزودن کنجاله پنبه‌دانه به جیره غذایی ماهی‌ها نتایج متفاوتی داشته است. افزودن کنجاله پنبه‌دانه به جیره غذایی گربه‌ماهی اوزوری (*Pseudobagrus ussuriensis*) تا مقدار ۲۰ درصد جیره اثر معنی‌داری بر شاخص‌های

آنتی‌اکسیدانی کبد نداشته است ولی مقادیر بالاتر باعث کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و گلوتاتیون احیائی و افزایش مالون دی‌آلدهید کبد ماهی شده است (۳۱). افزودن ۱۶/۶ درصد کنجاله پنبه‌دانه به جیره غذایی ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*) منجر به کاهش مالون دی‌آلدهید و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کبد شد ولی افزودن ۴۹ درصد کنجاله تخم پنبه باعث افزایش این شاخص‌ها شد (۳۲). براساس نتایج این پژوهش، جایگزینی کنجاله پنبه‌دانه در سطح ۱۵ درصد اثر معنی‌داری روی سلامت کبد ماهی ندارد، زیرا علاوه‌بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی، نتایج ارزیابی‌های هیستوپاتولوژی نیز سلامت کبد ماهی‌ها در تیمارهای مختلف را تأیید کرد. هم‌چنین، افزودن مخلوط اسیدهای آلی به جیره های غذایی نیز اثر آنتی‌اکسیدانی در کبد ندارد. این نتایج با مطالعات قبل روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مطابقت ندارد. افزودن ۰/۵ تا ۲ درصد اسید لاکتیک به جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش مالون دی آلدهید پلاسمای خون شد (۱۷). هم‌چنین افزودن ۰/۲۵ تا ۱ درصد اسید مالیک به جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سرم خون شد ولی اثری بر میزان مالون دی آلدهید نداشت (۳۳). دلیل این تفاوت می تواند اختلاف در ترکیب و مقدار اسیدهای آلی مورد استفاده باشد.

منابع پروتئینی گیاهی حاوی مقدار زیادی فسفر به شکل فیتات هستند که برای ماهی قابل استفاده نیست (۱۰). اسیدهای آلی می‌توانند باعث کاهش pH دستگاه گوارش یا تغییر فلور میکروبی و افزایش فراهمی ریستی فسفر توسط میکروب‌ها شوند (۱۴). در این پژوهش نیز افرودن اسیدهای آلی به جیره غذایی باعث افزایش فسفر پلاسمای ماهی شد که با نتایج مطالعات قبلی همخوانی دارد. مثلاً افزودن اسید سیتریک به جیره غذایی فیل‌ماهی (*Huso huso*) باعث افزایش مقدار فسفر در عضله ماهی شد (۳۴). افزودن اسید سیتریک و اسید فرمیک به جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث افزایش قابلیت هضم فسفر و تثبیت آن در بدن ماهی شده است (۲۶، ۳۵). با این‌حال مطالعات بیش‌تری لازم است تا مشخص شود اثر افزایش فسفر پلاسما در نتیجه مصرف اسیدهای آلی روی رشد و استخوان سازی ماهی چگونه است.

در نهایت نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که افزودن ۱۵ درصد کنجاله پنبه‌دانه به جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت‌قد اثر منفی بر سلامت کبد ماهی ندارد. ولی کنجاله پنبه‌دانه باعث کاهش MCHC خون می‌شود که می‌تواند نشانه کم‌خونی هیپوکرومیک باشد؛ اگرچه اثرات بلندمدت آن باید در ماهی بررسی شود. افزودن اسیدهای آلی به جیره غذایی اگرچه باعث افزایش آهن پلاسما می‌شود ولی اثری بر MCHC ندارد. هم‌چنین، اسیدهای آلی باعث افزایش فسفر پلاسما می‌شوند که اثرات مثبت آن بر رشد و استخوان‌سازی ماهی در بلندمدت باید بررسی شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب یک پروژه پژوهشی مشترک بین مؤسسه تحقیقات پنبه کشور و مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آب‌های داخلی با شماره مصوب ۳-۷۷-۱۲۰۷-۰۱۳-۰۲۰۲۳۸ انجام شده است.

منابع

1. Macusi, E. D., Cayacay, M. A., Borazon, E. Q., Sales, A. C., Habib, A., Fadli, N., & Santos M. D. (2023). Protein fishmeal replacement in aquaculture: A systematic review and implications on growth and adoption viability. *Sustainability*, 15, 12500.
2. Hassaan, M. S., El-Sayed, A. I. M., Soltan, M. A., Iraqi, M. M., Goda, A. M., Davies, S. J., El-Haroun, E. R., & Ramadan, H. A. (2019). Partial dietary fish meal replacement with cotton seed meal and supplementation with exogenous protease alters growth, feed performance, hematological indices and associated gene expression markers (GH, IGF-I) for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 503, 282-92.
3. Robinson, E. H., & Li, M. H. (1994). Use of plant proteins in catfish feeds: Replacement of soybean meal with cottonseed meal and replacement of fish meal with soybean meal and cottonseed meal. *Journal of the World Aquaculture Society*, 25, 271-6.
4. Wang, X. F., Li, X. Q., Leng, X. J., Shan, L. L., Zhao, J. X., & Wang, Y. T. (2014). Effects of dietary cottonseed meal level on the growth, hematological indices, liver and gonad histology of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 428-429,79-87.
5. Wang, J., Clark, G., Ju, M., Castillo, S., & Gatlin, D. M. (2020). Effects of replacing menhaden fishmeal with cottonseed flour on growth performance, feed utilization and body composition of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 523,735217.
6. Cheng, Z. J., & Hardy, R. W. (2002). Apparent digestibility coefficients and nutritional value of cottonseed meal for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 212,361-72.
7. Blom, J., Lee, K., Rinchard, J., Dabrowski, K., & Ottobre, J. (2001). Reproductive efficiency and maternal-offspring transfer of gossypol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing cottonseed meal. *Journal of Animal Science*, 79, 1533-9.
8. Rinchard, J., Lee, K. J., Czesny, S., Ciereszko, A., & Dabrowski, K. (2003). Effect of feeding cottonseed meal-containing diets to broodstock rainbow trout and their impact on the growth of their progenies. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 227, 77-87.
9. Rinchard, J., Lee, K. J., Dabrowski, K., Ciereszko, A., Blom, J. H., & Ottobre, J. S. (2003). Influence of gossypol from dietary cottonseed meal on haematology, reproductive steroids and tissue gossypol enantiomer concentrations in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*, 9, 275-82.
10. Lim, S. J., & Lee, K. J. (2009). Partial replacement of fish meal by cottonseed meal and soybean meal with iron and phytase supplementation for parrot fish *Oplegnathus fasciatus*. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 290, 283-9.
11. Luo, L., Xue, M., Wu, X., Cai, X., Cao, H., & Liang, Y. (2006). Partial or total replacement of fishmeal by solvent-extracted cottonseed meal in diets for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*, 12, 418-24.
12. Sotoudeh, E., Sangari, M., Bagheri, D., Morammazi, S., & 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*, 26,1669-80.
13. Yamamoto, F. Y., Older, C. E., Hume, M. E., Hoffmann, A. R., & Gatlin, D. M. (2021). Effects of butyrate, propionate, and their combination in vitro, and the impacts of their supplementation in high-plant-protein diets to the

production performance, innate immune responses, and intestinal microbiota of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 545, 737225.

14. Taheri Mirghaed, A., Mirzargar, S. S., Ghelichpour, M., Moghaddam, A.A., El-Haroun, E., & Hoseini, S. M. (2023). Effects of dietary lactic acid supplementation on growth performance, hemato-immunological parameters, and calcium and phosphorus status of common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture Reports*, 29, 101499.
15. El-Sharkawy, E. A., El-Razek, I. M. A., Amer, A. A., Soliman, A. A., Shukry, M., Gewaily, M. S., Téllez-Isaías, G., Kari, Z. A., & Dawood, M. A. O. (2023). Effects of sodium butyrate on the growth performance, digestive enzyme activity, intestinal health, and immune responses of Thinlip Grey Mullet (*Liza ramada*) juveniles. *Aquaculture Reports*, 30, 101530.
16. Tian, L., Zhou, X. Q., Jiang, W. D., Liu, Y., Wu, P., Jiang, J., Kuang, S. Y., Tang, L., Tang, W. N., Zhang, Y. A., Xie, F., & Feng, L. (2017). Sodium butyrate improved intestinal immune function associated with NF-κB and p38MAPK signalling pathways in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & Shellfish Immunology*, 66, 548-63.
17. Hoseini, S. M., Rajabiesterabadi, H., Abbasi, M., Khosraviani, K., Hoseinifar, S. H., & Van Doan, H. (2022). Modulation of humoral immunological and antioxidant responses and gut bacterial community and gene expression in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by dietary lactic acid supplementation. *Fish & Shellfish Immunology*, 125, 26-34.
18. Yousefi, M., Hoseini, S. M., Kulikov, E. V., Kharlitskaya, E. V., Petukhov, N. V., & Khomenets N. G. (2024). Dietary propionate administration improves growth performance, hepatic lipid deposition, and intestinal activity of digestive enzymes, inflammation, bacterial population, and antioxidant capacity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 578, 740099.
19. Pandey, A., & Satoh, S. (2008). Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fisheries Science*, 74, 867-74.
20. AOAC. (2005). Official Methods of Analysis. 18th ed. Gaithersburg. MD, USA: AOAC International.
21. Hoseini, S. M., Hosseini, S., & Nodeh, A. (2011). Serum biochemical characteristics of Beluga, *Huso huso* (L.), in response to blood sampling after clove powder solution exposure. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37, 567-72.
22. Dacie J., & Lewis S. Practical hematology. London: Charchill and Livingston; 1996.
23. Hoseini, S. M., Khosraviani, K., Hosseinpour Delavar, F., Arghideh, M., Zavvar, F., Hoseinifar, S. H., Van Doan, H., Zabihi, E., & Reverter, M. (2022). Hepatic transcriptomic and histopathological responses of common carp, *Cyprinus carpio*, to copper and microplastic exposure. *Marine Pollution Bulletin*, 175, 113401.
24. Fazio, F. (2019). Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: A review. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 500, 237-42.
25. Lee, K. J., Dabrowski, K., Blom, J. H., Bai, S. C., & Stromberg, P. C. (2002). A mixture of cottonseed meal ,soybean meal and animal byproduct mixture as a fish meal substitute: growth and tissue gossypol enantiomer in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 86, 201-13.
26. Sugiura, S. H., Dong, F. M., & Hardy, R. W. (1998). Effects of dietary supplements on the availability of minerals in fish meal; preliminary observations. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 160, 283-303.

27. Vielma, J., Ruohonen, K., & Lall, S. P. (1999). Supplemental citric acid and particle size of fish bone-meal influence the availability of minerals in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Nutrition*, 5, 65-71.
28. Xie, S., Tian, L., Niu, J., Liang, G., & Liu, Y. (2017). Effect of N-acetyl cysteine and glycine supplementation on growth performance, glutathione synthesis, and antioxidative ability of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 43, 1011-20.
29. Pastore, A., Piemonte, F., Locatelli, M., Lo Russo, A., Gaeta, L. M., Tozzi, G., & Federici, G. (2001). Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. *Clinical Chemistry*, 47, 1467-9.
30. Galano, A., & Alvarez-Idaboy, J. R. (2011). Glutathione: mechanism and kinetics of its non-enzymatic defense action against free radicals. *RSC Advances*, 1, 1763-1771.
31. Bu, X., Lian, X., Wang, Y., Luo, C., Tao, S., Liao, Y., Yang, J., Chen, A., & Yang, Y. (2019). Dietary yeast culture modulates immune response related to TLR2-MyD88-NF-kβ signaling pathway, antioxidant capability and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* for Ussuri catfish (*Pseudobagrus ussuriensis*). *Fish & Shellfish Immunology*, 84, 711-8.
32. Zheng, Q., Wen, X., Han, C., Li, H., & Xie, X. (2012). Effect of replacing soybean meal with cottonseed meal on growth, hematology, antioxidant enzymes activity and expression for juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38, 1059-69.
33. Yousefi, M., Ghafarifarsani, H., Raissy, M., Yilmaz, S., Vatnikov, Y. A., & Kulikov, E. V. (2023). Effects of dietary malic acid supplementation on growth performance, antioxidant and immunological parameters, and intestinal gene expressions in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 563, 738864.
34. Khajepour, F., & Hosseini, S. A. (2012). Calcium and phosphorus status in juvenile Beluga (*Huso huso*) fed citric acid-supplemented diets. *Aquaculture Research*, 43, 407-11.
35. Vielma, J., & Lall, S. P. (1997). Dietary formic acid enhances apparent digestibility of minerals in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Nutrition*, 3, 265-268.