

"مقاله پژوهشی"

اثر جایگزینی آرد ماهی با آکوپرو بر ساختار سلول‌های کبد و روده، شاخص‌های تغذیه و خون‌شناسی در قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت قد *Oncorhynchus mykiss*

علیرضا قائدی^{۱*}، شهرام دادگر^۱، محمود حافظیه^۱، داوود ضرغام^۲، منصور شریفیان^۱، رقیه محمودی^۲، طیبه باشتی^۱ و نرگس سلیمانی^۳

۱- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی،

یاسوج، ایران

۳- دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۵

چکیده

آکوپرو یک منبع پروتئین سویا است که بعد از طی فرآیند اکستروژن، غنی‌سازی شده و درصد پروتئین خام و همچنین قابلیت جذب آن به بالاترین حد ممکن می‌رسد. در این تحقیق اثر جایگزینی آرد ماهی با آکوپرو بر پارامترهای رشد، تغذیه، شاخص‌های خونی و بافت‌شناسی کبد و روده قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور پنج جیره غذایی با میزان پروتئین خام یکسان (۴۰٪) فرموله شدند و بطور همزمان از جیره اول تا پنجم میزان سهم آکوپرو از ۱۰٪ تا ۵۰٪ افزایش و جایگزین آرد ماهی گردید. تعداد ۵۴۰ قطعه قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن 18 ± 1 گرم در ۱۸ تانک فایبرگلاس ۲۵۰ لیتری (۳۰ قطعه در هر تانک) بطور تصادفی توزیع و پس از طی یک هفته دوره سازگاری، روند تغذیه ماهیان با جیره‌های آزمایشی آغاز گردید. بعد از ۸۰ روز، پارامترهای رشد، خون‌شناسی، بافت‌شناسی کبد و روده و آنزیم‌های کبدی مورد بررسی قرار گرفت تا اثر آکوپرو بر روی آنها مشخص شود. داده‌های مرتبط پارامترهای رشد شامل نرخ رشد ویژه، درصد افزایش وزن، ضریب تبدیل خوراک، شاخص وضعیت و درصد افزایش وزن بدن اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها نشان نداد ($p \geq 0.05$). تعداد گلبول‌های سفید در گروه ۵ بطور معنی‌داری ($p \leq 0.05$) بالاتر از سایر گروه‌ها بود. بیشترین میزان گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در تیمار دوم مشاهده شد. بیشترین میزان حجم متوسط گلبولی در گروه شاهد مشاهده گردید. میزان پروتئین تام خون در تیمار پنج کمتر از سایرین بود. آلبومین هیچگونه اختلافی در گروه‌ها نشان نداد و میزان چربی کل و گلوکز در گروه شاهد بالاتر از سایرین بود. AST و ALT در گروه پنج از سایرین بالاتر بود و ALP در گروه شاهد اما کلیه داده‌ها در دامنه استاندارد قرار داشت. در مطالعات بافت‌شناسی کبد و روده هیچگونه آسیب ناشی از آکوپرو و یا ترکیبات سویا مشاهده نگردید. به نظر می‌رسد جایگزینی آرد ماهی با آکوپرو به میزان ۵۰ درصد، نقش منفی در رشد و شاخص‌های خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ندارد و می‌توان در جیره‌های تجاری از این محصول و با هدف کاهش قیمت تمام شده خوراک استفاده نمود.

کلمات کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، (*Oncorhynchus mykiss*)، آکوپرو، بافت‌شناسی، رشد، آنزیم‌های کبدی و شاخص‌های خون.

مقدمه

در تولید تجاری خوراک آبزیان، آرد ماهی به دلیل دارا بودن مقادیر بالای پروتئین خام و سطوح بهینه اسید آمینه و هضم پذیری بالا، منبع اصلی پروتئین خوراک آبزیان بوده است. رشد سریع آبی‌پروری برای تامین نیاز انسان به گوشت ماهی، امروزه با چالشی روبروست و آن کاهش صید ماهیان دریایی و عدم تامین آرد ماهی مورد نیاز این صنعت است. کاهش صید و تولید آرد ماهی و افزایش قیمت آن سبب شد منابع گیاهی مانند کنجاله و دیگر ترکیبات سویا جایگزین آن شود (Hardy, 2010). این منابع از نظر اسیدهای آمینه غنی بوده و قیمت آنها نیز اقتصادی می باشد اما حاوی مواد ضد مغذی بوده که استفاده از آن را در جیره آبزیان محدود می کند (Jobling, 2012). همچنین میزان اندک برخی آمینواسیدهای محدود کننده مانند متیونین و تریونین در این ماده، بر مشکلات قبلی می افزاید. برای غلبه بر این مشکلات امروزه ترکیبات دیگری از سویا تولید شده اند که علاوه بر سطح پروتئین بالا، به دلیل فرایند پیچیده و پیشرفته تولید، فاقد مواد ضد مغذی بوده و آن را به محصولی ایده آل برای جایگزینی آرد ماهی تبدیل می کند (Gaylord et al., 2007). از این مواد می توان به پروتئین متراکم سویا، سویای پر چرب، سویای کم چرب و ایزوله پروتئین سویا نام برد. در این بین محصولی ایرانی به نام آکوپرو نیز جهت استفاده در جیره های آبزیان تولید شده است. به ادعای شرکت سازنده، در فرآیند تولید این محصول تیمار آنزیمی و عملیات اکستروژن بر روی کنجاله سویا به شکلی صورت گرفته که میزان مواد ضد مغذی موجود در کنجاله سویا به صفر رسیده و قابلیت هضم محتوای پروتئینی و در نتیجه بازدهی آن در جیره افزایش یافته

است. افزودن برخی آمینواسیدها و مکمل های غذایی، آنزیم ها و طعم دهنده ها موجب شده از این محصول علاوه بر خوراک آبزیان، در خوراک دام و طیور نیز استفاده گردد. مطالعات زیادی بر روی جایگزینی آرد ماهی با سویا و مشتقات آن از دهه ۸۰ میلادی تاکنون صورت گرفته که در طی این مدت پارامترهای مرتبط با رشد و تغذیه (Oliva-Teles et al., 1998) ایمنی و بیماری (Rumsey et al., 1994)، خون شناسی (Acar et al., 2013)، عملکرد آنزیمی کبد و گوارش (Sales, 2009)، بافت شناسی (Miao et al., 2018) و کیفیت لاشه مورد بررسی قرار گرفته است. در همه این مطالعات پروفایل آمینواسید تقریباً مناسب سویا، علی رغم میزان اندک متیونین آن، مورد تائید قرار گرفته و البته به برخی مشکلات ایجاد شده توسط این ماده نیز پرداخته شده است. در ماهیان دریایی، کاهش رشد شدید و عدم غذاگیری بعد از افزودن میزان سویا در جیره های آزمایشی مشاهده شده (Gatlin Iii et al., 2007) و به نظر می رسد این دسته از ماهیان به دلایل فیزیولوژیک نسبت به حذف آرد ماهی از جیره خود حساس می باشند (Urán et al., 2009). در جیره ماهیان گرمابی به دلیل ساختار گوارش سازگارتر با ترکیبات سویا، استفاده از این ماده موفقیت آمیز تر بوده است (Solomon et al., 2018). در قزل آلالی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) اما، به دلیل سیستم گوارش منطبق با گوشتخواری و حساسیت این گونه به طعم، مزه و بوی حاصل از سطوح بالای ترکیبات سویا، استفاده از این ماده را با محدودیت مواجه کرده است. لذا استفاده از دیگر ترکیبات جیره مانند آنچه در سطور بالا اشاره شد، می تواند راهکاری مناسب برای تعدیل قیمت تمام شده جیره های قزل آلالی رنگین کمان و کاهش مصرف

جیره های آزمایشی

آرد ماهی کیلکا، ضایعات کشتار گاهی طیور، آرد ماهی متو، آرد گندم، سویای فرآوری شده، گلوتن، نمک، پرمیکس، آنزیمیت و روغن در ترکیب جیره ها استفاده گردید. آکوپرو توسط شرکت سنادم پارس در اختیار این پروژه قرار گرفت (جدول ۱). پس از تهیه مواد اولیه، آنالیز تقریبی آنها در آزمایشگاه تغذیه پژوهشکده آبی پروری جنوب کشور انجام شد. در مرحله بعد داده های آزمایشگاه وارد نرم افزار جیره نویسی AFOS گردید تا جیره هایی با پروتئین یکسان طوری طراحی شوند که در جیره اول تنها ۱۰٪ و در جیره آخر ۵۰٪ محتوای پروتئین خام از آکوپرو تامین گردد. بر اساس فرمول، مواد اولیه دقیقاً توزین و در یک مخلوط کن به مدت ۵ دقیقه مخلوط شدند. معادل ۲۵٪ وزن مواد خشک، آب ولرم افزوده شد تا خمیری همگن ایجاد شود. خمیر تشکیل شده با استفاده از یک دستگاه چرخ گوشت از دای ۲/۵ میلی متر عبور داده شد تا پلت ها شکل گیرند. پلت های حاصل در خشک کن با دمای ۴۰ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد تا رطوبت آنها به ۱۰٪ کاهش یابد. در خاتمه بر روی پلت های خشک شده میزان مجاز روغن سویا اسپری گردید و خوراک ها در کیسه های جداگانه بسته بندی و در محیط خنک تا زمان استفاده قرار گرفت. اجزاء ترکیب جیره ها، آنالیز تقریبی و فرمولاسیون آنها در جداول ۱ و ۲ ارائه شده است.

فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب

منبع آب مورد استفاده از چشمه با دمای ثابت ۱۲- ۱۱ درجه سانتی گراد و پی اچ ۷/۹-۷/۳ و فاقد تغییرات معنی داری در فاکتورهای شیمیایی آب در طول آزمایش بود. میزان اکسیژن محلول آب بطور ثابت ۷/۸

آرد ماهی باشد. این تحقیق در نظر دارد آکوپرو که از مشتقات سویا می باشد را در جیره قزل آلای رنگین کمان جایگزین آرد ماهی نماید تا اثرات آن بر رشد، شاخص های خون، بافت روده و کبد و آنزیم های کبدی مشخص گردد. در صورت امکان جایگزینی آرد ماهی با این ترکیب، می توان انتظار داشت قیمت جیره های قزل آلای رنگین کمان کاهش و از میزان مصرف آرد ماهی و اثرات زیست محیطی آن اجتناب کرد.

مواد و روش ها

ماهیان آزمایشی

تعداد ۵۴۰ قطعه بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان (*O. mykiss*) با میانگین وزن 18 ± 2 گرم بصورت کاملاً تصادفی در ۱۸ تانک فایبرگلاس ۲۵۰ لیتری (۳۰ قطعه در هر تانک) توزیع شدند. آب مورد نیاز از چشمه تامین و پارامترهای فیزیکی شیمیایی آن بطور هفتگی توسط دستگاه دیجیتال قابل حمل مولتی متر WTW ثبت گردید. غذادهی به ماهیان ابتدا با جیره تجاری آغاز و به مرور در طول یک هفته (دوره سازگاری) با غذای آزمایشی جایگزین گردید. میزان جیره هر تانک با استفاده از جدول استاندارد و بر اساس وزن توده زنده و دمای آب در ابتدا ۲/۷٪ و در انتهای دوره ۲/۱٪ محاسبه و در ۳ نوبت در ساعات ۸، ۱۲ و ۱۶ به ماهیان داده شد. میزان جیره غذایی ماهیان هر دو هفته یکبار و بعد از هر زیست سنجی مورد بازبینی قرار می گرفت. لازم به ذکر است که قبل از معرفی ماهیان قزل آلای رنگین کمان به تانک های فایبرگلاس تعداد ۳۰ قطعه ماهی مورد زیست سنجی قرار گرفت، تا اطلاعات اولیه قبل از آغاز آزمایش در دسترس باشد.

جدول ۲: آنالیز تقریبی جیره های آزمایشی بر اساس ماده خشک

آنالیز	شاهد	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰
پروتئین	۴۰±۱	۳۹/۱±۵	۳۹/۱±۹	۳۹/۱±۹	۳۹/۱±۹	۳۹/۱±۹
چربی	۲±۱۲	۱۲/۲±۵	۱۲/۲±۳	۱۲/۲±۲	۱۲/۲±۱	۱۲/۲±۲
فیبر	۱/۱±۷	۱/۱±۲	۱/۱±۲	۱/۱±۷	۱/۱±۹	۲/۱±۲
خاکستر	۷/۱±۹	۷/۱±۸	۷/۱±۶	۷/۱±۴	۷/۱±۲	۴/۱±۹
عصاره عاری از ازت	۱/۱±۱	۱/۱±۱	۱/۱±۲	۱/۱±۲	۱/۱±۳	۱/۱±۴

پارامترهای خون شناسی

در انتهای دوره آزمایش، از هر تکرار ۶ قطعه ماهی بصورت تصادفی انتخاب و با استفاده از دوز مناسب پور گل میخک بیهوش گردید. با استفاده از سرنگ انسولین از ورید ساقه دمی نسبت به خونگیری اقدام شد و خون گرفته شده برای اندازه گیری فاکتورهای بیوشیمیایی و پارامترهای خون شناسی از قبیل گلبول های سفید و قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، اندیس های گلبولی، گلبول های قرمز و شمارش افتراقی لوکوسیت ها طبق استاندارد ارائه شده توسط (Feldman and Steptoe, 2003) مورد استفاده قرار گرفتند.

اندازه گیری شاخص های بیوشیمیایی خون

اندازه گیری شاخص های گلوکز، پروتئین تام، آلبومین، ایمونوگلوبین (IgM)، ALT، ALP، AST با استفاده از کیت های آزمایشگاهی (شرکت پارس آزمون، تهران) و بوسیله دستگاه اتوآنالایزر (EuroIser, Belgium) صورت گرفت. اندازه گیری گلوکز به روش گلوکز اکسیداز، پروتئین تام به روش بروموکرزول، اندازه گیری IgM به روش ایمونوتوربیدی متریك و تری گلیسیرید به روش آنزیمی لپاز (Lipase/ GPO-) صورت گرفت. سنجش آنزیم های آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین

فسفاتاز (ALP) به روش آنزیماتیک کینتیک (Shahsavani *et al.*, 2010) و میزان فعالیت لایزوزوم سرم از طریق جذب نوری و با استفاده از دستگاه بیوفتومتر و طبق روش (Ellis, 1990) مورد سنجش قرار گرفت.

بررسی های هیستولوژیکی بافت روده

در این بررسی تعداد ۶ عدد ماهی از هر تانک بصورت تصادفی انتخاب و پس از بیهوشی، روده و کبد هر کدام برداشته و به منظور تثبیت در محلول فرماین ۱۰٪ به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. برای انجام مراحل تهیه مقاطع بافتی شامل آبگیری، شفاف سازی و آغشتگی با پارافین، نمونه ها به دستگاه هیستوکنیت منتقل گردید. پس از طی مراحل فوق، نمونه ها در قالب های پارافینی قرار داده شد و برش هائی با ضخامت ۳-۵ میکرومتر توسط میکروتوم دوار تهیه گردید. برش ها بر روی لام قرار گرفت تا رنگ آمیزی آنها به روش هماتوکسیلین و اتوزین انجام پذیرد. پس از اتمام مراحل فوق، نمونه ها جهت بررسی بافت شناسی در زیر میکروسکوپ نوری قرار گرفت (Humason, 1961).

تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات جمع آوری شده

اختلافات موجود بین تیمارها از نظر فاکتورهای رشد (وزن نهایی، میزان غذای مصرفی، ضریب تبدیل غذایی، نسبت بازده پروتئین و ضریب رشد ویژه)، ترکیب لاشه، فاکتورهای خون شناسی و بیوشیمیایی در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در شش سطح جایگزینی و هر کدام با ۳ تکرار تکرار و با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه واریانس قرار گرفت. مقایسه میانگین ها نیز بوسیله آزمون چند دامنه دانکن در سطح ۹۵ درصد ($p < 0.05$) انجام شد. همچنین طراحی نمودار ها و جداول با استفاده از نرم افزار Excel 2013 انجام شد.

نتایج

شاخص های رشد

شاخص رشد شامل وزن نهایی، طول کل، ضریب چاقی، ضریب رشد ویژه، نرخ تبدیل غذایی، افزایش وزن بدن و درصد افزایش وزن بدن در هر یک از تیمارها در روز ۸۰ مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی تمامی فاکتورهای رشد در پایان دوره نشان داد که تیمار چهارم بهترین نتایج را نسبت به سایر تیمارهای غذایی دارد ولی بین تیمارها اختلاف معنی دار وجود نداشت ($p \geq 0.05$) (جدول ۳).

جدول ۳. شاخص های مرتبط با رشد و تغذیه در پاسخ به جایگزینی آرد ماهی با آکو پرو در جیره قزل آلی رنگین کمان

تیمار	شاهد	۱۰٪	۲۰٪	۳۰٪	۴۰٪	۵۰٪
وزن اولیه (گرم)	۱۸/۱±۴/۲	۱۸/۱±۵/۱	۱۸/۱±۶/۱	۱۸/۱±۴/۱	۱۸/۱±۳/۱	۱۸/۱±۲/۱
میانگین وزن نهایی	۶۲/۳±۴/۷	۷±۶۱/۸	۴±۵۷/۰	۵۵/۷±۰/۰	۶۳/۵±۰/۵	۵۸/۱±۰/۵
طول نهایی (سانتی متر)	۱۸۰±۲/۶	۱۸/۴±۰/۹۵	۱۷/۰±۹/۳۷	۱۸/۰±۶/۳	۱۷/۰±۶۶/۹	۱۸/۰±۱/۳۷
افزایش وزن بدن	۴۳/۳±۴/۷	۴۲/۷±۸/۸	۳۹/۴±۴/۰	۳۹/۷±۸/۴	۴۵/۴±۰/۵	۴۰/۱±۱/۵
درصد افزایش وزن بدن	۷۱/۱±۰/۸۶۸	۷۰/۳±۱/۷	۶۸/۲±۵/۲	۶۶/۴±۷/۸	۷۱/۲±۳/۰	۶۹/۰±۰/۸
ضریب تبدیل غذایی	۰/۷۱±۰/۰۵	۰/۷۵±۰/۱۳	۰/۸±۰/۰۸	۰/۸۸±۰/۱۹	۰/۷±۰/۰۶	۰/۷۹±۰/۰۳
نرخ رشد ویژه	۱/۵۵±۰/۰۷	۱/۵۱±۰/۱۵	۱/۴۴±۰/۰۸	۱/۳۸±۰/۱۷	۱/۵۶±۰/۰۸	۱/۴۶±۰/۰۳
شاخص وضعیت	۱/۰±۰/۷/۱۱	۰/۹۷±۰/۰۶	۰/۹۹±۰/۰۳	۰/۹۹±۰/۰۷	۰/۹۷±۰/۰۳	۰/۹۷±۰/۰۴

اندازه گیری شاخص های خون شناسی

با توجه به داده های موجود در جدول ۴ میزان گلبول سفید در تیمار پنج و شاهد به طور معنی داری بالاتر از سایر گروه ها بود ($p < 0.05$). کمترین میزان گلبول های سفید در تیمار سوم ولی بدون اختلاف معنی داری با تیمارهای دوم و چهارم به ثبت رسید ($p > 0.05$). بیشترین میزان گلبول قرمز در تیمار دوم مشاهده شد ولی اختلاف معنی داری با تیمارهای شاهد و چهارم و

پنجم مشاهده نشد ($p > 0.05$). تیمارهای اول و سوم نیز به طور معنی داری کمترین میزان گلبول های قرمز را داشتند. در مورد هموگلوبین نیز تیمار دوم بیشترین میزان هموگلوبین را نشان داد که اختلاف معنی داری با تیمار چهارم نداشت ولی با سایر تیمارها اختلاف معنی داری مشاهده شد ($p < 0.05$). بالاترین میزان هماتوکریت نیز همانند گلبول قرمز و هموگلوبولین در تیمار دوم مشاهده شد ($p > 0.05$), که طور معنی داری

بیشتر از سایر گروه ها بود ($p < 0/05$). کمترین میزان هماتوکریت نیز در تیمارهای سوم و اول مشاهده گردید ($p < 0/05$). در مورد شاخص حجم متوسط گلبولی (MCV) بیشترین میزان در گروه شاهد و تیمار اول و کمترین میزان در تیمار سوم مشاهده شد. بین تیمار شاهد و اول، دوم، چهارم و پنجم اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($p > 0/05$). هیچ گونه اختلاف معنی داری در ارتباط با وزن متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد ($p > 0/05$). با این حال بیشترین میزان این فاکتور در تیمار اول و کمترین آن در تیمار دوم به ثبت رسید.

متوسط نوتروفیل از $1/22 \pm 19/67$ در تیمار شماره دو تا $1/24 \pm 27/44$ در تیمار پنجم متغیر بوده است.

میزان نوتروفیل تیمار پنج با تیمار شاهد اختلاف معنی داری نشان نداده است با این حال با سایر تیمارها اختلاف معنی داری مشاهده گردید ($p < 0/05$). بیشترین میزان لنفوسیت نیز در تیمار شماره دو مشاهده شد که البته با تیمارهای اول و سوم اختلاف معنی داری نداشت. میانگین میزان مونوسیت نیز از $1/09 \pm 3/78$ در تیمار دوم تا $0/88 \pm 5/55$ در تیمار پنجم متغیر بود. تیمار پنجم اختلاف معنی داری را با سایر تیمارها نشان داد ($p < 0/05$)، ولی میان سایر تیمارها هیچ گونه اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($p > 0/05$). هیچ گونه اختلاف معنی داری در ارتباط با میزان ائوزینوفیل در بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد ($p > 0/05$).

جدول ۴: شاخص‌های خونی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در پاسخ به جایگزینی آرد ماهی با آکوپرو

تیماهای آزمایشی (میانگین ± انحراف معیار)						فاکتورهای هماتولوژی
۵۰٪	۴۰٪	۳۰٪	۲۰٪	۱۰٪	شاهد	
۱۷۹۷±۱۰۲۰ ^d	۱۰۴۴±۶۹۶ ^{ab}	۹۸۱±۶۲۴ ^a	۶۹۵±۶۴۱ ^{ab}	۱۱۵۶±۷۴۴ ^b	۱۴۸۳±۸۷۷ ^c	تعداد گلبولهای سفید (WBC) (mm ³)
۱/۰±۵۲/۱۲ ^{ab}	۱/۰±۵۷/۱۳ ^b	±۴۴/۱/۰۸ ^a	۱/۰±۶۲/۱۱ ^b	۱/۰±۴۳/۶۴ ^a	۱/۰±۵۱/۱۴ ^{ab}	تعداد گلبولهای قرمز (RBC) (mm ³) (× 10 ⁶)
۸/۰±۶۶/۳۶ ^{ab}	۹/۰±۱۶/۵۵ ^{bc}	۸/۰±۴۸/۳۶ ^a	۹/۰±۰۴/۴۱ ^c	۸/۰±۴۳/۳۱ ^a	۸/۰±۹۳/۶۵ ^b	هموگلوبین (Hb)
۴۹/۱±۵/۵ ^{bc}	۵۱/۳±۴/۵ ^{cd}	۴۶/۲±۵۵/۶۵ ^a	۵۳/۳±۱۱/۲۶ ^d	۴۷/۲±۱۱/۲ ^{ab}	۵۰/۴±۰/۰ ^{bc}	هماتوکریت (HCT)
۳۲۶/۶±۸/۶ ^{ab}	۳۲۷/۶±۶/۷ ^{ab}	۳۲۳/۴±۵/۳ ^a	۳۲۸/۶±۳/۳ ^{ab}	۳۲۹/۵±۸/۱ ^b	۳۳۰/۶±۱۱/۲۵ ^b	حجم متوسط گلبولی (MCV) (فمتولیترا)
۵۸/۱±۱۱/۰۵ ^a	۵۸/۱±۲۲/۹۸ ^a	۵۸/۱±۸/۲۷ ^a	۵۸/۱±۰/۶۶ ^a	۵۹/۱±۰/۲۲ ^a	۵۸/۱±۸۱/۹ ^a	وزن متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) (پیکوگرم)
±۶۷/۱۷/۵۰ ^{ab}	±۳۳/۱۷/۵۰ ^a	۱۷/۰±۴۴/۵۳ ^a	۱۸/۰±۱۱/۳۳ ^b	±۶۷/۱۷/۵۰ ^{ab}	۱۷/۰±۵۵/۵۳ ^a	نسبت هموگلوبین گلبولی (MCHC) (%)
۲۷/۱±۴۴/۲۴ ^c	۲۲/۳±۳۳/۰۴ ^b	۱۹/۲±۷۸/۵۹ ^a	۱۹/۱±۶۷/۲۲ ^a	۲۱/۲±۸۹/۵۷ ^{ab}	۲۵/۳±۴۴/۲۱ ^c	نوتروفیل (%)
۶۶/۱±۶۷/۵۸ ^a	۷۲/۴±۶۷/۰۹ ^b	۷۵/۳±۴۴/۳۹ ^{bc}	۷۶/۱±۱۱/۴۵ ^c	۷۳/۳±۴۴/۳۹ ^{bc}	۶۹/۴±۴۴/۰۳ ^a	لنفوسیت (%)
۵/۰±۵۵/۸۸ ^b	۳/۰±۸۹/۹۳ ^a	۴/۰±۴۴/۸۸ ^a	۳/۱±۷۸/۰۹ ^a	۴/۰±۲۲/۸۳ ^a	۴/۱±۳۳/۲۲ ^a	مونوسیت (%)
۱/۰±۰/۰۵ ^a	۱/۰±۶۷/۰ ^a	۱/۰±۰/۰۵ ^a	۱/۰±۳۳/۰ ^a	۱/۰±۳۳/۳۳ ^a	۱/۰±۷۵/۵ ^a	ائوزینوفیل (%)

شاخص های بیوشیمیایی خون

شاخص های بیوشیمیایی در جدول ۵ گزارش شده است. میزان پروتئین سرم خون در تیمار پنجم ($0/18 \pm$) $2/88$ گرم در دسی لیتر) به طور معنی داری کمتر از سایر تیمارها بود ($p < 0/05$). سایر تیمارها اختلاف معنی داری با هم نشان ندادند و میزان پروتئین تام از $3/17$ تا $3/39$ گرم در دسی لیتر متغیر بود. در مورد آلبومین هیچ گونه اختلاف معنی داری در تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد مشاهده نشد ($p > 0/05$) و میزان آلبومین از $1/08 \pm 0/15$ تا $1/22$ گرم در دسی لیتر در تیمار دوم متغیر بود. میزان چربی کل در تیمار شاهد ($144/32 \pm 754/22$ گرم در دسی لیتر) به طور معنی داری بیشتر از سایر تیمارها بود ($p < 0/05$)، و در تیمار پنجم ($103/83 \pm 480/22$ گرم در دسی لیتر) کمتر از سایر تیمارها بود که البته اختلاف معنی با تیمار سوم و چهارم مشاهده نشد ($p > 0/05$).

در مورد گلوکز دامنه تغییرات زیادی مشاهده شد به طوری که کمترین میزان گلوکز در تیمار ($22/94 \pm$) $85/22$ میلی گرم در دسی لیتر) مشاهده شد و بیشترین آن در تیمار شاهد ($215/11 \pm 55/61$ میلی گرم در دسی لیتر) بود که طور معنی داری بیشتر از سایر تیمارها بود ($p < 0/05$). تیمارهای دوم تا پنجم هیچ گونه اختلاف معنی داری با هم نداشتند ($p > 0/05$). میزان اوره در تیمار اول ($3/12 \pm 0/93$ میلی گرم در دسی لیتر) کمتر از سایر تیمارها بود ولی به جز با تیمار دوم اختلاف معنی داری با سایر تیمارها مشاهده نشد ($p > 0/05$).

تیمار دوم نیز به طور معنی داری دارای بیشترین میزان اوره ($5/31 \pm 0/86$ میلی گرم در دسی لیتر) بود ($p < 0/05$). میزان کراتنین نیز در تیمار اول به طور معنی داری بیشتر از سایر تیمارها بود ($p < 0/05$). میزان آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) از $32/76 \pm$ تا $426/89$ U/L در تیمار اول تا $541/67 \pm 87/88$ در تیمار پنجم متغیر بود. میزان AST در گروه شاهد نیز $76/3 \pm$ تا $442/3$ U/L بود. میزان AST در تیمار پنجم به طور معنی داری بیشتر از سایر تیمارها به جز تیمار چهارم ($62/33 \pm$) $495/22$ U/L) بود. دامنه تغییرات آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) نیز از $3/7 \pm 7/0$ در تیمار شاهد تا $23/7 \pm 5/2$ U/L متغیر بود. میزان ALT در تیمار پنجم به طور معنی داری بیشتر از سایر تیمارها بود ($p < 0/05$). میزان آلکالین فسفاتاز (ALP) از $289/1 \pm 65/5$ U/L در تیمار پنجم تا $539/4 \pm 157/4$ U/L در تیمار شاهد متغیر بود.

جدول ۵: شاخص‌های بیوشیمیایی خون ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در پاسخ به جایگزینی آرد ماهی با آکوپرو

شاخص‌های بیوشیمیایی	شاهد	۱۰٪	۲۰٪	۳۰٪	۴۰٪	۵۰٪
پروتئین کل (g/dl)	۳/۰±۳۳/۳۲ ^a	۳/۰±۲۲/۲۷ ^a	۳/۰±۳۹/۳۲ ^a	۳/۰±۱۷/۳۲ ^a	۳/۰±۲۰/۲۲ ^a	۲/۰±۸۸/۱۸ ^b
آلبومین (g/dl)	۱/۰±۰۸/۱۵ ^a	۱/۰±۱۴/۰۹ ^a	۱/۰±۲۲/۱۸ ^a	۱/۰±۱۰/۲۹ ^a	۱/۰±۲۲/۲۶ ^a	۱/۰±۱۱/۱۱ ^a
چربی کل (g/dl)	۷۵۴/۱۴۴±۲/۳ ^c	۶۲۷/۵۵±۸/۳ ^b	۶۲۱/۱۲۸±۶/۶ ^b	۵۶۷/۷۷±۱/۰ ^{ab}	۵۴۷/۳۴±۷/۵ ^{ab}	۴۸۰/۱۰۳±۲/۸ ^a
گلوکز (mg/dl)	۲۱۵/۵۵±۱/۶ ^c	۱۱۵/۱۷±۷/۴ ^b	۸۹/۲۲±۲/۹ ^a	۱۰۴/۸±۰/۲ ^{ab}	۱۰۰/۳۰±۳/۹ ^{ab}	۸۵/۷±۲/۱ ^{ab}
اوره (mg/dl)	۴/۰±۱۹/۸۸ ^a	۳/۰±۱۲/۹۳ ^a	۳/۰±۳۱/۸۶ ^a	۳/۱±۲۲/۴ ^a	۳/۰±۱۴/۸۳ ^a	۳/۱±۵۳/۲۴ ^a
کراتینین (mg/dl)	±۳۱/۰/۰۴ ^{ab}	۰/۰±۴۲/۱ ^c	۰/۰±۳۵/۰۵ ^b	۰/۰±۲۵/۰۷ ^a	۰/۰±۲۶/۰۴ ^a	۰/۰±۲۵/۰۱ ^a
(U/L) AST	۴۴۲/۷۶±۳/۳ ^a	۴۲۶/۳۲±۸/۷ ^a	۴۶۱/۴۳±۸/۰ ^a	۴۳۹/۱۰۱±۷/۸ ^a	۴۹۵/۶۲±۲/۳ ^{ab}	۵۴۱/۸۷±۶/۱ ^b
(U/L) ALT	۷/۳±۰/۷ ^a	۸/۲±۶/۶ ^a	۱۰/۲±۲/۶ ^a	۹/۲±۰/۶ ^a	۱۵/۵±۵/۸ ^b	۲۳/۵±۷/۲ ^b
(U/L) ALP	۵۳۹/۱۵۷±۴/۴ ^d	۴۱۰/۱۱۶±۸/۰ ^{bc}	۴۴۵/۹۹±۶/۷ ^{cd}	۳۳۵/۷۲±۴/۹ ^{ab}	۴۰۱/۷۰±۳/۱ ^{bc}	۲۸۹/۶۵±۱/۵ ^a

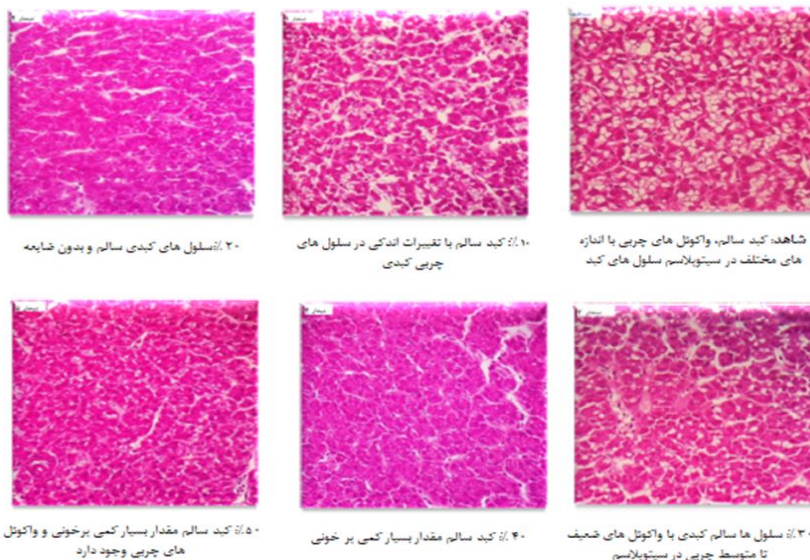
بافت شناسی کبد

هیچ گونه ضایعه یا اثر نامطلوبی بر سلول های کبدی

نداشته است (شکل ۱).

تصاویر زیر حاصل بافت شناسی کبد بوده و نشان

داد حذف آرد ماهی و جایگزینی آن با آکوپرو



شکل ۱: اثر جایگزینی آرد ماهی با آکوپرو بر بافت کبد قزل آلائی رنگین کمان (بزرگنمایی 40x)

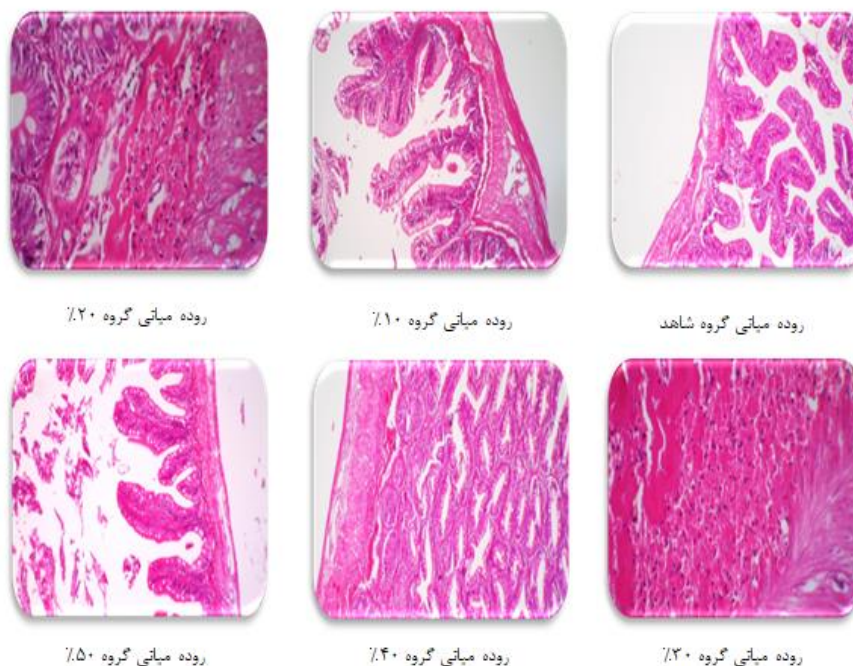
بافت شناسی روده

تاثیر منفی بر بافت قسمت میانی روده ماهیان نداشته و

هیچ گونه ضایعه و آسیبی مشاهده نگردید (شکل ۲).

نتایج مطالعات آسیب شناسی بافت روده نشان داد

که جایگزینی آرد ماهی با آکوپرو در همه گروه ها



شکل ۲: اثر جایگزینی آرد ماهی با آکوپرو بر بافت روده قزل آلائی رنگین کمان (بزرگنمایی 40x)

بحث

این مطالعه نشان داد که آکوپرو می تواند بصورت کامل و بدون اثر منفی بر رشد و پارامترهای تغذیه ای، جایگزین آرد ماهی در جیره قزل آلالی رنگین کمان گردد. اگر چه گزارشات زیادی در زمینه اثرات منفی کنجاله سویا بر رشد بسیاری از گونه ها ارائه شده است اما، رشد چشمگیر در زمینه فن آوری تولید خوراک و فرآوری سویا، سبب افزایش کیفیت و هضم پذیری آن شده است. بطوری که در حال حاضر هضم پذیری پروتئین سویا ۹۰٪ می باشد (Fagbenro, 2004). مشکلات مرتبط با سویا شامل مواد ضد مغذی، پروفایل نامتعادل اسید آمینه و ایجاد مزه نامطلوب و اتصال پروتئین به مواد معدنی و در نهایت عدم دسترسی ماهی به این ترکیبات می باشد (Oliva-Teles *et al.*, 1998). کاهش رشد و کاهش کارایی غذایی به دلیل جایگزینی آرد ماهی با سویا در قزل آلالی رنگین کمان و دیگر گونه های ماهی به دلیل کاهش فعالیت پروتئاز گزارش شده است (Santigosa *et al.*, 2010). متیونین محدود کننده ترین اسید آمینه در سویا و ترکیبات آن می باشد. کاهش میزان این آمینواسید سبب ایجاد اثر منفی بر سنتز پروتئین می گردد و در نهایت سبب کاهش رشد و کاهش کارایی خوراک خواهد شد (Silva-Carrillo *et al.*, 2012). از سوی دیگر طعم خوراک و خوشمزگی آن نیز باید مدنظر قرار گیرد، زیرا این پارامتر نقش مهمی در غذاگیری داشته و می تواند رشد را متاثر سازد (Cheng *et al.*, 2010). سویا و ترکیبات آن به شرطی در جیره غذایی قزل آلالی رنگین کمان می توانند مفید باشند که بخوبی فرآوری شده و با آمینواسیدهای ضروری و ویتامین ها تقویت گردند (Stickney *et al.*, 1996) و این دلیل اصلی عدم ایجاد

اثرات منفی بر رشد ماهی قزل آلالی رنگین کمان توسط آکوپرو می باشد.

امروزه توجه زیادی به خصوصیات بیوشیمیایی خون ماهیان به عنوان شاخص وضعیت درونی بدن آنها می گردد (Edsall, 1999). در بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی خون ماهیان، بررسی پلاسمای خون بر بررسی سرم خون ارجحیت دارد. به خوبی مشخص است که هموگلوبین، هماتوکریت و سلول های قرمز به ایمنی غیر اختصاصی و عملکرد آن مرتبط هستند بطوریکه تعداد سلول های قرمز به عنوان شاخص سلامت ماهی می باشند (Zhou *et al.*, 2004). دامنه طبیعی برخی شاخص های خونی برای ماهی قزل آلالی رنگین کمان توسط (Wedemeyer and Chatterton, 1970) گزارش شده است. بر این اساس دامنه طبیعی اوره (۴/۵-۰/۹ میلی گرم در دسی لیتر)، چربی و کلسترول (۱۶۱-۳۶۵ گرم در دسی لیتر)، گلوکز (۱۵۱-۴۱ گرم در دسی لیتر) و پروتئین کل (۶-۲ گرم در دسی لیتر) می باشد. بر اساس این گزارش، پروتئین کل، اوره و کلسترول در همه گروه ها در دامنه طبیعی قرار دارند. گلوکز فقط در گروه شاهد بالاتر از حد نرمال است. تعیین دامنه این شاخص ها جهت تعیین وضعیت ماهی بسیار مهم است. به عنوان مثال کورتیزول بالا نشان از استرس ماهی و پروتئین کل و اوره خارج از حد نرمال نشان از عدم تعادل جیره و نامرغوب بودن منبع پروتئین مصرفی دارد. با توجه به اینکه پروتئین و اوره در این آزمایش در دامنه مطلوب و نرمال قرار دارند، می توان نتیجه گرفت آکوپرو چه از نظر تعادل پروتئین و اسید آمینه و چه از نظر نوع و منبع پروتئین، توانسته است عملکرد خوبی در بدن ماهیان مورد آزمایش داشته باشد. در این آزمایش گلوکز در گروه شاهد بالاتر از

شد، دامنه طبیعی آنزیم آمینوترانسفراز ۸-۴ میکروگرم، دامنه نرمال آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز ۳۵۱-۲۰۲ میکروگرم و دامنه طبیعی آلکالین فسفاتاز ۹۸۸-۶۴۷ میکروگرم در لیتر برای ماهی آزاد اقیانوس اطلس معرفی و اعلام کرد این اعداد می‌توانند برای تعیین سلامت ماهی در نظر گرفته شوند. نتایج حاصل از این آزمایش در دامنه معرفی شده توسط این محقق قرار دارند و می‌توان بر سلامت ماهیان بعد از استفاده از آکوپرو به عنوان یک منبع پروتئین گیاهی صحه گذاشت. این آنزیم‌ها در کپور معمولی و ماهی حوض طلائی (Brenden and Hulzingat, 1986)، ماهی قزل آلا (Hille, 1982)، گریه ماهی (Tavares-Dias and Moraes, 2007) و تاس ماهی (Shahsavani *et al.*, 2010) بررسی شده و همواره بین نتایج اختلافاتی مشاهده شده است. این اختلافات می‌تواند به دلیل روش نمونه‌برداری، روش آنالیز، سن و جنس ماهی باشد. همچنین استرس ناشی از صید و دستکاری ماهی و اثر آن بر پارامترهای خونی و آنزیمی را نباید از نظر دور داشت.

به دلیل افزایش استفاده از پروتئین‌های گیاهی به جای آرد ماهی در صنعت رو به گسترش آبی پروری، این ترکیبات به دلیل دارا بودن مواد ضد مغذی، فیبر و کربوهیدرات بالا و پروفایل اسید آمینه متفاوت، می‌توانند اثرات منفی بر دستگاه گوارش داشته باشند. کبد و روده مهمترین ارگان‌های داخلی در زمینه هضم و جذب مواد مغذی می‌باشند. کنترل تغییرات بافتی ناشی از اثر مواد غذائی گیاهی در این دو ارگان، یکی از روش‌های مهم در زمینه تعیین میزان اثر منفی این مواد بر سلامت دستگاه گوارش ماهی می‌باشد (Rašković *et al.*, 2011). استفاده از آکوپرو بر اساس داده‌های

حد نرمال قرار دارد درحالیکه در تیمارهای مختلف کاهش داشته و در سطح نرمال قرار گرفته است. کاهش میزان گلوکز پلاسما نشان دهنده تاثیر ترکیبات سویا بر متابولیسم انرژی در بدن ماهیان است (Kaushik *et al.*, 1995). در ادامه باید گفت عوامل مختلفی بر روی شاخص های فوق تاثیر گذارند که شامل رشد و اندازه ماهی، جنسیت، بلوغ، تخم ریزی و دوره های نوری، تغذیه و جیره ماهی (Hille, 1982) و نمی‌توان ارتباط روشنی بین پارامترها و ترکیب بیوشیمیایی خون با جایگزینی آرد ماهی با سایر منابع گیاهی در جیره ماهیان پرورشی بدست آورد (Imanpoor *et al.*, 2010).

آنزیم های آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارات آمینو ترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) آنزیم‌هایی هستند که علاوه بر خون، در بافت قلب، آبشش، کلیه، عضله و کبد وجود دارند و این آنزیم‌ها به عنوان شاخصی مناسب برای تعیین میزان کاهش یا نقص در کارائی یک ارگان به دلیل آسیب های احتمالی می‌باشد (Çelik, 2004). کبد عضو حیاتی بدن همه جانداران است. در کبد آنزیم ALT، AST و ALP در پاسخ به ایجاد بیماری و یا آسیب هپاتوسیت ها تولید شده و در جریان خون رها می‌شوند. در صورتیکه میزان این آنزیم‌ها در خون پنج برابر بالاتر از حد نرمال باشند، می‌توان با قطعیت نسبت به آسیب دیدگی کبد و سلول های آن اذعان کرد (Dorcas and Solomon, 2014) و این موضوع در کلیه جانداران و همچنین ماهی وجود دارد. با توجه به اینکه ترکیبات سویا می‌توانند آسیب های کبدی ایجاد کنند، لذا علاوه بر بررسی آسیب شناسی کبد، در این آزمایش، آنزیم‌های کبدی و میزان سطح آن در خون ماهیان تحت آزمایش بررسی گردید. در مطالعه‌ای که توسط (Sandnes *et al.*, 1988) انجام

بیماری کاهش طول پرزهای روده است که در مطالعه اخیر مشاهده نگردید. مطالعات نشان داده است علائم آماس روده با توجه به میزان و درصد جایگزینی آرد ماهی با سویا و همچنین منبع سویای مورد استفاده از نظر جغرافیائی از ۳ روز تا یک هفته آشکار می‌گردد (Urán *et al.*, 2009). در آزادماهیان استفاده از ۴۰٪ سویا در جیره سبب کاهش همگنی ساختار روده بعد از هفت روز غذادهی گردید (Baeverfjord and Krogdahl, 1996). در مطالعه Rumsey (۱۹۹۵) استفاده از میزان بالاتر از ۵۰٪ سویا در فرمول جیره سبب حذف همگنی لایه‌های موکوسی و افزایش تعداد و تنوع واکوئل‌ها گردید. اثر ترکیبات سویا بر ساختار و بافت روده به دلیل وجود *Stachyosr*, *Raffinose* و *Saponins* و *Lectins* می‌باشد (Wang *et al.*, 2017). این ترکیبات در آکوپرو و با استفاده از فنآوری بروز اکتسروژن کاملاً حذف شده و در آزمایش کیفی محصول به اثبات رسیده است.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی شرکت سندام پارس و با استفاده از امکانات مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج انجام گرفت. این پروژه با کد ۹۵۰۹۶۹-۹۵۰۵۹-۱۲-۸۸-۲۴ در سامانه طرح‌های پژوهشی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ثبت گردید. نویسندگان مقاله، مراتب تشکر و قدردانی خود از حمایت‌های فوق را اعلام می‌دارند.

منابع

1. Acar, Ü., Türker, A., Bulut, M., Yıldırım, Ö., Yılmaz, S., Sabri Kesbiç, O., 2013. The effect of dietary soybean meal on growth, nutrient utilization, body composition and some serum biochemistry variables of two

حاصل، هیچ‌گونه اثر منفی بر روده و کبد ماهیان آزمایشی نداشت. این نتیجه به دلیل استفاده از تکنولوژی پیشرفته اکسروژن در فرآوری این محصول، استفاده از آمینواسیدهای سنتتیک با هدف بهبود پروفایل آمینواسید آن، استفاده از انواع آنزیم‌ها در این محصول و حذف کامل مواد ضد مغذی به دست آمده است. تغییرات بافت شناسی در روده بر اساس نوع گونه و خوراک مورد آزمایش می‌تواند متفاوت باشند (Rašković *et al.*, 2011).

از بافت شناسی کبد در بسیاری از مطالعات برای بررسی وضعیت غذای آبیان استفاده شده است. تغییرات هیستولوژیک ناشی از تغذیه نامناسب به سادگی در کبد قابل تشخیص‌اند (Tacon, 1992). این تغییرات شامل دژنراسانس چربی در کبد، تشکیل واکوئل در سلول‌های کبدی، تغییر در فعالیت‌های متابولیک و پارانشیم و نکروز سلول‌های کبدی می‌باشد. ترکیبات سویا و منابع گیاهی قادر به ایجاد تغییرات فوق دراز مدت هستند بخصوص اگر این ترکیبات به عنوان منبع پروتئین و یا کربوهیدرات در جیره ماهی استفاده شوند (Poleksić *et al.*, 2007). هیچ‌یک از علائم فوق در بافت شناسی کبد ماهیان تحت آزمایش مشاهده نگردید. با توجه به حساسیت عضوی مانند کبد، چنین به نظر می‌رسد آکوپرو قادر است بدون اثر منفی بر این ارگان حیاتی بدن، نیازهای غذائی ماهی را نیز تامین نماید. این امر می‌تواند به دلیل متعادل بودن جیره آزمایشی و فرآوری خوب آکوپرو و همچنین غنی سازی آن و استفاده از برخی آنزیم‌ها باشد.

آماس روده از مشکلاتی است که ماهی قزل‌آلا رنگین کمان بعد از مصرف ترکیبات سویا به آن مبتلا می‌شود (Refstie *et al.*, 2000). از علائم بارز این

- nondiabetic middle-aged men and women. *Health Psychology*, 22, 398-412 .
11. Gatlin III, D. M., Barrows, F. T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T. G., Hardy, R. W., . . . Nelson, R., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research*, 38, 551-579 .
 12. Gaylord, T. G., Barrows, F. T., Teague, A. M., Johansen, K. A., Overturf, K. E., Shepherd, B., 2007. Supplementation of taurine and methionine to all-plant protein diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 269, 514-524 .
 13. Hardy, R. W., 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research*, 41, 770-776 .
 14. Hille, S., 1982. A literature review of the blood chemistry of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich. *Journal of Fish Biology*, 20, 535-569 .
 15. Humason, G. L., 1961. Animal tissue techniques. Pages 3-60
 16. Imanpoor, M. R., Bagheri, T., Azimi, A., 2010. Serum biochemical change induced by soybean meal in diet on Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. *Global Veterinaria*, 5, 61-64 .
 17. Jobling, M., 2012. National Research Council (NRC): Nutrient requirements of fish and shrimp (pp. 65-88). USA: Springer Science & Business Media.
 18. Kaushik, S., Cravedi, J., Lalles, J., Sumpter, J., Fauconneau, B., Laroche, M., 1995. Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 133, 257-274 .
 19. Miao, S., Zhao, C., Zhu, J., Hu, J., Dong, X., Sun, L., 2018. Dietary soybean meal affects intestinal homeostasis by altering the microbiota, morphology and inflammatory banded seabream, *Diplodus vulgaris* (Geoffroy Saint-Hilaire, 1817). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12, 749-758 .
 2. Baeverfjord, G., Krogdahl, Å., 1996. Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. *Journal of Fish Diseases*, 19, 375-387 .
 3. Brenden, R. A., Hulzlngat, H., 1986. Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in gold fish, *Carassius auratus* L. Paper presented at the Journal of Fish Disease.
 4. Çelik, E., 2004. Blood chemistry (electrolytes, lipoproteins and enzymes) values of black scorpion fish (*Scorpaena porcus* Linneaus 1758) in the Dardanelles. *Journal of Biology*, 4, 716-719 .
 5. Cheng, Z., Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Ma, H., Li, Y., Zhang, J., 2010. Effects of dietary canola meal on growth performance, digestion and metabolism of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture*, 305, 102-108 .
 6. Dorcas, I., Solomon, R. 2014. Calculation of liver function test in *Clarias gariepinus* collected from three commercial fish ponds. *Nat Sci*, 12, 107-123 .
 7. Edsall, C. C., 1999. A blood chemistry profile for lake trout. *Journal of Aquatic Animal Health*, 11, 81-86 .
 8. Ellis, A. E., 1990. Lysozyme assays. *Techniques in fish immunology*, 1, 101-103 .
 9. Fagbenro, O. A., 2004. Soybean meal replacement by roquette (*Eruca sativa* Miller) seed meal as protein feedstuff in diets for African Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822), fingerlings. *Aquaculture Research*, 35, 917-923 .
 10. Feldman, P. J., Steptoe, A., 2003. Psychosocial and socioeconomic factors associated with glycated hemoglobin in

- growth: a meta-analysis. *British Journal of Nutrition*, 102: 1709-1722 .
27. Sandnes, K., Lie, Ø., Waagbø, R., 1988. Normal ranges of some blood chemistry parameters in adult farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology*, 32, 129-136.
 28. Santigosa, E., Saénz de Rodrigáñez, M. Á., Rodiles, A., Barroso, F. G., Alarcón, F. J., 2010. Effect of diets containing a purified soybean trypsin inhibitor on growth performance, digestive proteases and intestinal histology in juvenile sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research*, 41, e187-e198 .
 29. Shahsavani, D., Mohri, M., Kanani, H. G., 2010. Determination of normal values of some blood serum enzymes in *Acipenser stellatus* Pallas. *Fish physiology and biochemistry*, 36, 39-43 .
 30. Silva-Carrillo, Y., Hernández, C., Hardy, R. W., González-Rodríguez, B., Castillo-Vargasmachuca, S., 2012. The effect of substituting fish meal with soybean meal on growth, feed efficiency, body composition and blood chemistry in juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). *Aquaculture*, 364, 180-185 .
 31. Solomon, S. G., Okomoda, V. T., Oguiche, O., 2018. Nutritional value of raw *Canavalia ensiformis* and its utilization as partial replacement for soybean meal in the diet of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) fingerlings. *Food science & nutrition*, 6, 207-213 .
 32. Stickney, R. R., Hardy, R. W., Koch, K., Harrold, R., Seawright, D., Masee, K. C., 1996. The effects of substituting selected oilseed protein concentrates for fish meal in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* diets. *Journal of the World Aquaculture Society*, 27, 57-63 .
 33. Tacon, A. G., 1992. Nutritional fish pathology: morphological signs of nutrient deficiency and toxicity in farmed fish: *Food & Agriculture Org.*
 20. Oliva-Teles, A., Pereira, J. P., Gouveia, A., Gomes, E., 1998. Utilisation of diets supplemented with microbial phytase by seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquatic Living Resources*, 11, 255-259 .
 21. Poleksić, V., Rašković, B., Marković, Z., Dulić, Z., Stanković, M., Živić, I., Lakić, N., 2007. Effects of different dietary protein sources on intestine and liver morphology of carp yearlings. Paper presented at the Proceedings of the 3rd Serbian Congress for Microscopy. Belgrade, Serbia, Serbian Microscopy Society.
 22. Rašković, B. S., Stanković, M. B., Marković, Z. Z., Poleksić, V. D., 2011. Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. *Journal of Agricultural Sciences*, 56, 87-100 .
 23. Refstie, S., Korsøen, Ø J., Storebakken, T., Baeverfjord, G., Lein, I., Roem, A. J., 2000. Differing nutritional responses to dietary soybean meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 190, 49-63 .
 24. Rumsey, GL., 1995. Soy protein in diets of rainbow trout: Effects on growth, protein absorption, gastrointestinal histology, and non-specific serologic and immune response. *Nutrition and utilization technology in aquaculture*, 166-188 .
 25. Rumsey, Siwicki, A. K., Anderson, D. P., Bowser, P. R., 1994. Effect of soybean protein on serological response, non-specific defense mechanisms, growth, and protein utilization in rainbow trout. *Veterinary immunology and immunopathology*, 41, 323-339 .
 26. Sales, J., 2009. The effect of fish meal replacement by soyabean products on fish cytokine gene expression in northern snakehead. *Scientific reports*, 8, 113 .

34. Tavares-Dias, M., Moraes, F., 2007. Haematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. *Journal of Fish Biology*, 71, 383-388 .
35. Urán, P., Schrama, J., Jaafari, S., Baardsen, G., Rombout, J., Koppe, W., Verreth, J., 2009. Variation in commercial sources of soybean meal influences the severity of enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture nutrition*, 15, 492-499 .
36. Wang, Y.-r., Wang, L., Zhang, C.-x., Song, K., 2017. Effects of substituting fishmeal with soybean meal on growth performance and intestinal morphology in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture Reports*, 5, 52-57 .
37. Wedemeyer, G., Chatterton, K., 1970. Some blood chemistry values for the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 27, 162-1164 .
38. Zhou, Q.C., Tan, B.P., Mai, K. S., Liu, Y.J., 2004. Apparent digestibility of selected feed ingredients for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*, 241, 441-451 .