



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره ششم، شماره سوم، پاییز ۹۷

<http://jair.gonbad.ac.ir>

تأثیر استفاده از سطوح مختلف پودر بذر استبرق (*Calotropis procera*) در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792 بر شاخص‌های رشد، کار آبی تغذیه و میکروبیوتای روده

امید صفری^۱، حمیدرضا احمدنیای مطلق^{۱*}

^۱استادیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

تاریخ ارسال: ۹۵/۶/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۰

چکیده

مطالعه حاضر به‌منظور بررسی پتانسیل استفاده از پودر بذر گیاه استبرق (*C. procera*) در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) در پنج سطح ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ درصد به‌علاوه شاهد (صفر درصد) در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. جهت انجام آزمایش ۳۶۰۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۱۱/۵±۳/۶۴ گرم) در ۱۸ عدد حوضچه تقسیم شدند و پس از یک دوره سازگاری دو هفته‌ای به‌مدت ۵۶ روز با شش جیره آزمایشی تغذیه شدند. شاخص‌های رشد، کبدی، امعاء و احشاء کار آبی تغذیه به همراه ترکیب شیمیایی لاشه، بقا و ضریب تبدیل غذایی و میکروبیوتای روده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد افزایش میزان پودر بذر استبرق در جیره غذایی ماهیان تا سطح ۴٪ موجب افزایش معنی‌دار رشد ویژه و تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک روده نسبت به تیمار شاهد شد. نسبت کار آبی پروتئین با افزایش سطح پودر بذر استبرق به میزان ۳ تا ۵ درصد تفاوت آماری معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان داد ولی تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی وجود نداشت. همچنین میزان بقا، ضریب تبدیل غذایی، شاخص کبدی و شاخص امعاء و احشاء به‌ترتیب در تیمارهای دارای سطوح ۲، ۳، ۴ و ۵ درصد پودر بذر استبرق در بهترین وضعیت خود قرار گرفتند. نتایج نشان داد که استفاده از حداکثر ۳٪ پودر بذر استبرق به‌عنوان یک افزودنی غذایی گیاهی می‌تواند گزینه مناسبی جهت استفاده در جیره قزل‌آلای رنگین‌کمان باشد.

واژه‌های کلیدی: *O. mykiss*، پودر بذر استبرق، رشد، میکروبیوتای روده

*نویسنده مسئول: ahmadniae@ferdowsi.um.ac.ir

مقدمه

از میان تمامی منابع غذایی مورد استفاده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، منابع غذایی حیوانی و به‌ویژه پودر ماهی که اصلی‌ترین منبع پروتئین حیوانی می‌باشد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Bhosale et al., 2010)، اما به دلایل گوناگون در سالیان اخیر استفاده از پودر ماهی همواره با موانع دشواری همراه بوده است. با توجه به افزایش توسعه پرورش متراکم ماهیان آب شیرین در دنیا رقابت بسیار شدیدی جهت مصرف منابع محدود پودر ماهی به وجود آمده است (FAO, 2010). این در حالی است که کاهش ذخایر جهانی ماهی و روند رو به افزایش قوانین سخت‌گیرانه بهره‌برداری از منابع دریایی موجبات تعطیلی بسیاری از کارخانه‌های تولید پودر ماهی از جمله کارخانه‌های ایرانی را فراهم آورده است. علاوه بر آن تولید پودر ماهی در مناطق خاصی از جهان وجود دارد که باعث گران‌تر شدن قیمت آن و مشکلات ناشی از دسترسی به آن در بسیاری از کشورهای فعال در صنعت آبزی‌پروری شده است. همچنین از نظر بهداشتی کیفیت پودر ماهی متغیر بوده و در بسیاری موارد باعث بروز مشکلاتی مانند آلودگی‌های قارچی و کمبودهای ویتامینی در جیره غذایی می‌گردد (Mokhayer, 2006). بنابراین توجه به منابع جدید پروتئینی با قابلیت جایگزینی با پودر ماهی در صنعت تولید غذای آبزیان در شرایط اخیر، از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. به همین دلیل در سالیان اخیر مطالعات زیادی در مورد جایگزینی انواع پروتئین‌های گیاهی با آرد ماهی صورت گرفته است.

استبرق با نام علمی *Calotropis procera* از خانواده *Asclepiadaceae* درختچه‌ای با ارتفاع ۲/۵ متر است (Vadlapudi et al., 2012). این گیاه نیازهای اکولوژیکی پایینی داشته و در زمین‌هایی که برای کشاورزی مناسب نیستند و دارای شرایط گرم، کم‌آب، سنگلاخی و قلیایی هستند (Meena et al., 2011)، به خوبی رشد می‌کند و در چنین شرایطی در تمام مدت سال دارای گل و میوه می‌باشد (Little et al., 1974). این گیاه بومی بخش‌هایی از آفریقا، شبه جزیره عربستان، جنوب و جنوب شرق آسیا بوده (Rahman and Wilcock, 1991) و در ایران نیز در نقاط گرمسیری از استان خوزستان تا سیستان و بلوچستان تا ارتفاع ۱۱۰۰ متری از سطح دریا دیده می‌شود (Sabeti, 1995).

بیشتر تحقیقات انجام شده روی این گیاه در مورد خواص دارویی آن است (Oudhia and Dixit, 1999; Oudhia, 1994). همچنین قسمت‌های مختلف این گیاه به‌عنوان ضد باکتری، ضد قارچ و ضد ویروس معرفی شده است (Ishnava et al., 2011; Freitas et al., 2011; Oliveira et al., 2010). در صنعت آبزی‌پروری نیز از فرآورده شیرابه آن به‌عنوان ضد عفونی کننده آب استفاده شده است (Velmurugan et al., 2012). صفری و همکاران (Safari et al., 2013) گزارش کردند که چربی‌های ضروری استخراج شده از پودر بذر استبرق بر فعالیت‌های بیولوژیکی برخی از گروه‌های باکتریایی تأثیر گذاشته و باعث کنترل رشد این باکتری‌ها می‌شود.

مطالعات نشان داده است که افزودنی‌های گیاهی می‌تواند سبب افزایش رشد (Shalaby *et al.*, 2006)، تحریک اشتها (Citarasu, 2010)، عملکرد سیستم ایمنی (Ergün *et al.*, 2011)، بهبود رنگ پوست، افزایش درصد تفریح و مقاومت در برابر بیماری‌ها در ماهیان پرورشی (Yılmaz *et al.*, 2011) شود. محققین از دانه خرنوب (Carob seed) در جیره غذایی بچه‌ماهیان میش‌ماهی (*Argyrosomus regius*) در سطوح ۰،۷۵، ۱۵۰ و ۲۵ گرم در کیلوگرم استفاده کردند. نتایج نشان داد که جایگزینی دانه خرنوب با پروتئین تا سطح ۲۲۵ گرم در کیلوگرم شاخص‌های رشد و ترکیب لاشه را تحت تأثیر قرار نداده و فعالیت آنزیم‌های گوارشی با افزایش میزان دانه خرنوب کاهش یافت (Couto *et al.*, 2016). طی مطالعه‌ای تأثیر استفاده از آویشن، رزماری و شنبلیله به‌عنوان افزودنی غذایی، بر رشد و ترکیب لاشه ماهی سی‌باس اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد استفاده از آویشن سبب افزایش معنی‌دار کارایی پروتئین در جیره غذایی شد اما تفاوت معنی‌داری در میزان افزایش وزن، ضریب تبدیل غذایی و ضریب رشد ویژه مشاهده نشد.

هرچند که در مطالعات پیشین، استفاده از میوه، بذر، برگ، ساقه و ریشه گیاهان مختلف در جیره غذایی آبزیان گزارش شده است (Nakagawa *et al.*, 2007)، اطلاعات محدودی در رابطه با کاربردهای بذر استبرق در آبی‌پروری وجود دارد و هیچ گزارشی در رابطه استفاده از استبرق به‌عنوان افزودنی غذایی آبزیان یافت نشد. لذا هدف از انجام تحقیق حاضر بررسی امکان استفاده از سطوح مختلف پودر بذر استبرق به‌عنوان افزودنی غذایی در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در کارگاه پرورشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان شهرستان مشهد (طرقبه، مشهد، خراسان رضوی) انجام شد. از تعداد ۳۶۰۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن متوسط $3/64 \pm$ گرم جهت انجام آزمایش (۲۰۰ قطعه در هر واحد آزمایشی) استفاده گردید. ماهیان مورد نظر تهیه و بعد از دو هفته سازگاری، در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد آزمایش قرار گرفتند. هر واحد شامل حوضچه‌های پرورشی با ابعاد ۱۰×۱×۰/۵ متر بود. تغذیه ماهیان در دوره سازگاری با استفاده از جیره‌های تجاری (EFT1، شرکت اصفهان مکمل، اصفهان، ایران) صورت گرفت. این آزمایش دارای ۱۸ واحد آزمایشی بوده از طرح کاملاً تصادفی به‌دلیل شرایط یکنواخت آزمایشگاهی استفاده شد. جیره‌ها (در سه تکرار) به‌صورت تصادفی بین واحدهای آزمایشی توزیع شد. تغذیه ماهیان در حد اشتها و سه بار در روز (در ساعات ۷:۰۰، ۱۳:۰۰ و ۱۸:۰۰)، طی ۵۶ روز انجام شد (Safari, 2011). زیست‌سنجی ماهیان هر ۱۴ روز انجام شد. شاخص‌های فیزیوشیمیایی شامل دما ۱۶/۱۵ درجه سانتی‌گراد، پی‌اچ

برابر با ۷/۱، اکسیژن محلول ۷/۹ میلی‌گرم در لیتر توسط دستگاه دیجیتالی سنجش پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب (HOAIMA[®] Canada 00987) سنجش شد.

جدول ۱- فرمولاسیون و ترکیب شیمیایی (درصد ماده خشک) جیره غذایی شاهد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*)

درصد	اقلام غذایی
۵۰	پودر ماهی
۰	پودر بذر استبرق
۸	کنجاله سویا
۴/۵	آرد گندم
۵/۶	آرد ذرت
۱۰/۳	گلوتن ذرت
۹	روغن ماهی
۹	روغن سویا
۰/۱	کولین کلراید (۷۰ درصد)
۰/۵	ویتامین C
۱/۵	مکمل ویتامینی ^۱
۱	مکمل مواد معدنی ^۱
۰/۴۹	دی کلسیم فسفات (۹۵ درصد)
۰/۰۱	مارکر اکسید ایتریوم
ترکیب شیمیایی (برحسب درصد ماده خشک)	
۴۵/۰۳	پروتئین خام (درصد)
۱۸/۴۰	چربی خام (درصد)
۱۸/۸۰	انرژی خام (مگا ژول بر کیلوگرم)
۲۳/۹۵	نسبت پروتئین خام به انرژی ناخالص (گرم بر مگاژول)

^۱ مکمل معدنی (در هر کیلوگرم) حاوی منیزیم، ۱۰۰ میلی‌گرم؛ روی، ۶۰ میلی‌گرم؛ آهن، ۴۰ میلی‌گرم؛ مس، ۵ میلی‌گرم؛ کبالت، ۰/۱ میلی‌گرم؛ ید، ۱ میلی‌گرم؛ آنتی‌اکسیدان، ۱۰۰ میلی‌گرم و مکمل ویتامینی (در هر کیلوگرم) حاوی ویتامین E، ۳۰ میلی‌گرم؛ ویتامین K، ۳ میلی‌گرم؛ تیامین، ۲ میلی‌گرم؛ ریبوفلاوین، ۷ میلی‌گرم؛ پیریدوکسین، ۳ میلی‌گرم؛ پانتوتنیک اسید، ۱۸ میلی‌گرم؛ نیاسین، ۴۰ میلی‌گرم؛ فولاسین، ۱/۵ میلی‌گرم؛ کولین، ۶۰۰ میلی‌گرم؛ بیوتین، ۰/۷ میلی‌گرم و سیانو کوبالامین، ۰/۰۲ میلی‌گرم بود (تهیه شده از شرکت کیمیا رشد، گلستان، گرگان، ایران).

تهیه جیره‌های غذایی: از پودر بذر استبرق در سطوح ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ درصد به همراه یک جیره غذایی شاهد (در مجموع شش تیمار و هر یک در سه تکرار) استفاده شد (جدول ۱). جیره‌های غذایی (حاوی ۴۵ درصد پروتئین خام و نسبت پروتئین خام به انرژی ناخالص ۲۳/۴ گرم بر مگاژول) با کمک نرم‌افزار جیره‌نویسی UFFDA فرموله شد (National Research Council, 1993). جیره‌های غذایی آزمایشی حاوی پروتئین و انرژی برابر بود. اجزاء جیره‌های غذایی با افزودن آب به شکل خمیری یکنواخت تبدیل و سپس خمیر حاصل از دستگاه چرخ گوشت با قطر چشمه ۲ میلی‌متر عبور داده شد (Hardy and Barrows, 2002). در نهایت پلت‌های مرطوب در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک (Farhangi and Carter, 2001)، بسته‌بندی و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آنالیزهای شیمیایی و شاخص‌های رشد: پروتئین خام (از طریق روش کلدال)، چربی خام (به روش سوکسله)، انرژی خام (از طریق بمب الکتریکی مدل پار)، فیبر خام، خاکستر (با استفاده از کوره الکتریکی در ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت)، فسفر (به روش تیتراسیون با مولیدات وانادیوم) و عصاره عاری از نیتروژن (به صورت محاسباتی) پودر بذر استبرق، اقلام غذایی، جیره‌های غذایی آزمایشی و لاشه ماهیان ($n=3$) به روش نمونه‌برداری تصادفی نقطه‌ای ساده پس از این که نمونه‌ها جمع‌آوری شد و در آن ۱۰۵°C به مدت ۶ ساعت به وزن ثابت رسیدند، طبق روش‌های استاندارد انجام شد (Association of Official Analytical Chemists, 2005). جیره‌های آزمایشی در شرایط خلا خشک (۱۰۰- درجه سانتی‌گراد)، سپس در دمای ۵۵۰ سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت به خاکستر تبدیل و با اسیدهای پرکلریک و نیتریک هضم گردید.

جدول ۲- ترکیب شیمیایی بذر استبرق (بر حسب درصد ماده خشک) مورد استفاده در تغذیه ماهی قزل‌آلای - رنگین‌کمان (*O. mykiss*)

مقدار	ترکیب شیمیایی
۹۵/۷۱	ماده خشک (درصد)
۴/۷۵	پروتئین خام (درصد)
۲۰/۱۱	چربی خام (درصد)
۳۸/۵۷	فیبر خام (درصد)
۵/۰۴	خاکستر (درصد)
۲۷/۲۹	عصاره عاری از ازت (درصد)
۱/۵۴	فسفر (درصد)
۲/۳۵	کلسیم (درصد)
۱/۹۸۸	انرژی ناخالص (مگاژول بر کیلوگرم)

ترکیب شیمیایی پودر بذر استیرق: پودر بذر استیرق حاوی ۴/۷۵ درصد پروتئین خام بوده ولی حاوی مقدار زیادی فیبر خام (۳۸/۵۷ درصد) می‌باشد. میزان چربی خام در این دانه ۲۰/۱۱ درصد است (جدول ۲).

ارزیابی شاخص‌های رشد: با استفاده از معیارهایی نظیر میزان ضریب رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، شاخص وضعیت، بازده کارایی پروتئین (PER)، چربی (LER) و انرژی (EER)، ارزش تولیدی پروتئین (PPV)، چربی (LPV) و انرژی (EPV) جیره‌های غذایی آزمایشی مورد مطالعه قرار گرفتند (Glencross *et al.*, 2007; Farhangi and Carter, 2001):

$$\begin{aligned} & \left[\ln \text{ وزن نهایی} - \ln \text{ وزن ابتدایی} \right] \times 100 = \text{ضریب رشد ویژه} \\ & \text{میزان افزایش وزن / غذای شده مصرف} = \text{ضریب تبدیل غذایی} \\ & 100 \times \left(\frac{\text{طول کل / وزن نهایی}}{\text{طول کل / وزن ابتدایی}} \right)^3 = \text{شاخص وضعیت} \\ & \text{چربی خام مصرف شده} / \text{میزان افزایش وزن} = \text{بازده کارایی پروتئین} \\ & 100 \times (\text{پروتئین مصرف شده} / \text{پروتئین باز جذب شده}) = \text{ارزش تولیدی پروتئین} \\ & (\text{پروتئین خام مصرف شده} / \text{میزان افزایش وزن}) = \text{بازده کارایی چربی} \\ & 100 \times (\text{چربی مصرف شده} / \text{چربی باز جذب شده}) = \text{ارزش تولیدی چربی} \\ & (\text{انرژی خام مصرف شده} / \text{میزان افزایش وزن}) = \text{بازده کارایی انرژی} \\ & 100 \times (\text{انرژی مصرف شده} / \text{انرژی باز جذب شده}) = \text{ارزش تولیدی انرژی} \end{aligned}$$

در معادلات فوق W_f, W_i و W_{gain} به ترتیب حاکی از وزن اولیه، وزن نهایی و اضافه وزن (به گرم)، t دوره زمانی (روز) و Feed consumed میزان مصرف غذا (به گرم) است. همچنین مقدار مصرف غذا به صورت تجمعی در یک دوره زمانی مشخص گزارش شد.

شاخص‌های باکتریایی: در پایان آزمایش جهت بررسی تأثیر پودر بذر بر ترکیب باکتریایی دستگاه گوارش، از هر تکرار به صورت تصادفی ۳ ماهی به عنوان نمونه صید شد. پس از بیهوش کردن ماهیان با استفاده از دوز مناسب پودر گل میخک، سطح بدن ماهیان توسط الکل ۷۰ درصد ضد عفونی شده و از روده ماهیان طبق دستورالعمل استاندارد (Mahious and Ollevier, 2005) نمونه برداری شد. نمونه‌های روده پس از انتقال به آزمایشگاه به وسیله هاون چینی استریل هموژن شد. پس از تهیه نمونه هموژن با استفاده از محلول نمکی استریل نرمال (0.9 NaCl w/v درصد) رقت‌های مختلف در دامنه 10^{-1} تا 10^{-8} تهیه گردید. از رقت‌های مورد نظر تحت شرایط استریل حجمی معادل ۰/۱ میلی‌لیتر برداشته و به پلیت حاوی محیط کشت منتقل شد برای شمارش تعداد کل باکتری‌های هوازی و تعداد کل

باکتری‌های اسیدلاکتیک قابل شمارش (LAB) به ترتیب از محیط کشت Plate Count Agar و MRS Agar استفاده شد (Mahious and Ollevier, 2005).

انکوباسیون بلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در دمای اتاق و در شرایط هوازی انجام شد. تعداد باکتری‌ها در هر یک نمونه‌ها بر اساس واحد کلنی CFU (تعداد کلنی × عکس ضریب رقیق‌سازی = CFU/g intestine) شمارش و تعیین شد.

آنالیز آماری: کلیه داده‌های درصدی به صورت $\arcsin \sqrt{x}$ تبدیل شدند. بعد از تحقق دو شرط اصلی آزمون‌های پارامتریک تجزیه واریانس (همگن بودن واریانس و نرمال بودن داده‌ها)، از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) برای مقایسه واریانس بین تیمارها و از آزمون دانکن برای بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها (در سطح اعتماد ۵ درصد) با کمک نرم‌افزار آماری تحت ویندوز SPSS-18 استفاده گردید.

نتایج

شاخص‌های رشد: نتایج حاصل از میانگین وزن بدن ماهیان نشان داد که از ابتدا تا پایان دوره آزمایش با افزایش سطح پودر بذر استبرق تا میزان ۰.۴٪ میانگین وزن ماهیان به‌طور معنی‌داری ($P < 0/05$) نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت و پس از آن مجدداً کاهش معنی‌داری ($P < 0/05$) مشاهده شد (جدول ۳).

شاخص وضعیت به‌دست آمده در این آزمایش بالاتر از یک بود و اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد (جدول ۳). نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان رشد ویژه ماهیان در طول مدت آزمایش نشان داد که با افزایش میزان پودر بذر استبرق در جیره غذایی ماهیان تا سطح ۰.۴٪ بر میزان رشد ویژه به‌طور معنی‌داری ($P < 0/05$) نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت ($P < 0/05$) و پس از آن با افزایش این ماده غذایی میزان رشد ویژه کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$) (جدول ۳).

ضریب تبدیل غذایی: با افزودن ۱ درصد پودر بذر استبرق ضریب تبدیل غذایی به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد شد ($P < 0/05$) و پس از آن با افزایش این ماده غذایی تا میزان ۳-۲ درصد، ضریب تبدیل غذایی به حداقل میزان خود رسید (جدول ۴)؛ اما پس از افزایش بیشتر پودر بذر استبرق ضریب تبدیل غذایی به تدریج افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$).

جدول ۳- مقایسه میانگین (\pm خطای استاندارد) وزن، شاخص وضعیت و میزان رشد ویژه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف پودر بذر استبرق در مدت ۵۶ روز ($n=3$)

تیمار	شاهد	سطوح مختلف پودر بذر استبرق (درصد)				
		۱	۲	۳	۴	۵
وزن اولیه (گرم)	۱۱/۴۰±۳/۶۵	۱۱/۵۰±۳/۶۴	۱۱/۶۰±۳/۶۴	۱۱/۷۰±۳/۶۶	۱۱/۴۰±۳/۶۴	۱۱/۸۰±۳/۷۰
وزن نهایی (گرم)	۳۳/۵۰±۳/۶۰ ^a	۳۷/۷۰±۳/۸۰ ^b	۳۷/۳۰±۳/۰۴ ^b	۴۱/۷۰±۳/۹۴ ^c	۴۲/۸۰±۳/۶۴ ^{cd}	۳۶/۷۰±۳/۶۴ ^b
شاخص وضعیت (درصد)	۱/۱۸±۰/۴۲	۱/۱۷±۰/۷۳	۱/۱۹±۰/۵۲	۱/۲۲±۰/۳۱	۱/۲۴±۰/۴۰	۱/۲۹±۰/۳۲
رشد ویژه (درصد در روز)	۱/۹۲±۰/۲۳ ^a	۲/۱۲±۰/۲۲ ^c	۲/۰۹±۰/۲۳ ^c	۲/۲۷±۰/۲۳ ^d	۲/۳۶±۰/۳۰ ^e	۲/۰۳±۰/۲۰ ^b

ردیف‌های با حداقل یک حرف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت آماری معنی‌داری با هم ندارند.

¹ Standard Error of Mean (SEM)

میزان بقاء در تمامی تیمارهای آزمایشی که با غذای حاوی سطوح مختلف پودر بذر استبرق تغذیه شده بودند، نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری بالاتر بود ($P < 0/05$). این افزایش میزان درصد بقا تا تیمار حاوی ۲ درصد پودر بذر استبرق ($91/7 \pm 10/14$) افزایش نشان داد ($P < 0/05$) و پس از آن روند کاهشی خود را ادامه داد (جدول ۴).

شاخص کبدی و شاخص امعاء و احشاء: با افزایش میزان پودر بذر استبرق در جیره غذایی ماهیان تا میزان ۴٪ میزان شاخص کبدی افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$) و پس از آن این شاخص با کاهش مواجه شد (جدول ۴). همچنین با افزایش این ماده غذایی تا سطح ۵٪ شاخص امعاء و احشاء افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان داد ($P < 0/05$).

شاخص‌های کارآیی لاشه ماهیان: با افزایش میزان پودر بذر استبرق در جیره غذایی ماهیان، نسبت کارآیی پروتئین و ارزش تولیدی پروتئین تا میزان ۳٪ افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$) و پس از آن با جیره‌های غذایی حاوی ۴ و ۵ درصد پودر بذر استبرق تفاوت آماری معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۵). در همین ارتباط، با افزایش میزان پودر بذر استبرق در جیره غذایی ماهیان از ۱ به ۵ درصد، شاخص‌های کارآیی تغذیه چربی و انرژی روندهای افزایشی معنی‌داری ($P < 0/05$) را نشان دادند و به بیشترین مقادیر خود در جیره غذایی حاوی ۵٪ بذر استبرق به‌ترتیب $5/32 \pm 2/93$ و $4/47 \pm 3/07$ رسیدند (جدول ۵).

تأثیر استفاده از سطوح مختلف پودر بذر استبرق (*Calotropis procera*) ...

جدول ۴- مقایسه میانگین (\pm خطای استاندارد) ضریب تبدیل غذایی، بقاء، شاخص کبدی و شاخص امعاء و احشاء ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) تغذیه‌شده با جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف پودر بذر استبرق در مدت ۵۶ روز ($n=3$)

تیماز	شاهد	سطوح مختلف پودر بذر استبرق (درصد)				
		۵	۴	۳	۲	۱
ضریب تبدیل غذایی	$1/71 \pm 0/21^c$	$1/49 \pm 0/10^b$	$1/31 \pm 0/10^a$	$1/38 \pm 0/11^{ab}$	$1/47 \pm 0/10^b$	
بقاء (درصد)	$82/0 \pm 8/66^a$	$90/7 \pm 8/14^c$	$91/7 \pm 7/91^e$	$90/1 \pm 8/06^d$	$86/8 \pm 9/12^b$	
شاخص کبدی (درصد)	$1/43 \pm 0/20^b$	$1/48 \pm 0/21^d$	$1/45 \pm 0/21^c$	$1/50 \pm 0/20^e$	$1/37 \pm 0/20^a$	
شاخص امعاء و احشاء (درصد)	$10/13 \pm 1/33^a$	$11/35 \pm 1/37^b$	$12/60 \pm 1/55^c$	$13/41 \pm 1/48^d$	$15/24 \pm 1/83^f$	

ردیف‌های با حداقل یک حرف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت آماری معنی‌داری با هم ندارند.

ترکیبات شیمیایی لاشه ماهیان آزمایشی: میزان ماده خشک لاشه ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های غذایی شاهد (۲۵/۱۳ درصد) و حاوی سطوح مختلف پودر بذر استبرق (۲۵/۳۶-۲۵/۲۰ درصد) تفاوت آماری معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند (جدول ۶). میزان چربی خام (از ۲/۸۶ به ۲/۹۷ درصد) و پروتئین خام (از ۲۰/۶۵ به ۲۱/۳۷ درصد) لاشه ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های غذایی آزمایشی با افزایش سطح استفاده از پودر بذر استبرق (از ۱ به ۵ درصد) روند افزایشی معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد (به ترتیب ۲۰/۶۷ و ۲/۸۴ درصد) نشان داد ($P < 0/05$) (جدول ۶). در مقابل مقدار فسفر (از ۱/۲۶ به ۰/۹۱ درصد) لاشه ماهیان تغذیه‌شده روندی کاهشی معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد (۱/۲۷ درصد) نشان داد ($P < 0/05$) (جدول ۶).

جدول ۵- مقایسه میانگین (\pm خطای استاندارد) شاخص‌های کارآیی تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) تغذیه‌شده با جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف پودر بذر استبرق در مدت ۵۶ روز ($n=3$)

تیماز	شاهد	سطوح مختلف پودر بذر استبرق (درصد)				
		۵	۴	۳	۲	۱
نسبت کارآیی پروتئین	$2/17 \pm 0/31^a$	$2/36 \pm 0/21^b$	$2/59 \pm 0/30^b$	$2/48 \pm 0/29^c$	$2/47 \pm 0/25^c$	
نسبت کارآیی چربی	$3/26 \pm 0/29^a$	$3/68 \pm 0/33^b$	$3/89 \pm 0/33^b$	$4/70 \pm 0/41^c$	$5/32 \pm 0/49^d$	
نسبت کارآیی انرژی	$2/17 \pm 0/99^a$	$2/36 \pm 0/91^b$	$2/59 \pm 0/27^b$	$2/48 \pm 0/39^c$	$4/47 \pm 0/50^d$	
ارزش تولیدی پروتئین (درصد)	$47/17 \pm 5/26^a$	$49/06 \pm 4/02^b$	$49/79 \pm 5/49^c$	$52/38 \pm 6/11^d$	$52/50 \pm 5/78^d$	
ارزش تولیدی چربی (درصد)	$69/66 \pm 7/50^a$	$70/78 \pm 7/03^b$	$71/13 \pm 8/52^b$	$72/34 \pm 7/25^c$	$74/92 \pm 8/44^d$	
ارزش تولیدی انرژی (درصد)	$70/27 \pm 6/93^a$	$75/31 \pm 7/49^b$	$75/58 \pm 7/44^b$	$78/30 \pm 8/00^c$	$80/49 \pm 9/36^d$	

ردیف‌های با حداقل یک حرف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت آماری معنی‌داری با هم ندارند.

جدول ۶- مقایسه میانگین (\pm خطای استاندارد) مقایسه ترکیب بیوشیمیایی لاشه قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) تغذیه شده (بر حسب وزن تر، درصد) با جیره‌های غذایی شاهد و حاوی سطوح مختلف پودر بذر استبرق ($n=3$)

تیمار	شاهد	سطوح مختلف پودر بذر استبرق (درصد)				
		۱	۲	۳	۴	۵
ماده خشک	۲۵/۱۳±۴/۹۳ ^a	۲۵/۲۰±۵/۱۲ ^a	۲۵/۳۵±۳/۲۱ ^{ab}	۲۵/۳۶±۵/۰۲ ^{ab}	۲۵/۳۴±۴/۲۲ ^{ab}	۲۵/۳۵±۴/۲۵ ^{ab}
پروتئین خام	۲۰/۶۷±۴/۲۵ ^a	۲۰/۶۵±۴/۲۳ ^a	۲۰/۸۳±۵/۰۲ ^a	۲۱/۲۴±۵/۱۸ ^{ab}	۲۱/۳۴±۲/۶۴ ^b	۲۱/۳۷±۲/۲۸ ^b
چربی خام	۲/۸۴±۰/۲۷ ^a	۲/۸۶±۰/۲۵ ^a	۲/۸۹±۰/۲۸ ^a	۲/۹۱±۰/۲۸ ^{ab}	۲/۹۵±۰/۳۰ ^b	۲/۹۷±۰/۳۰ ^b
انرژی خام (مگا ژول در کیلوگرم)	۴/۷۹±۰/۵۱ ^a	۴/۸۴±۰/۵۸ ^a	۴/۸۵±۰/۵۲ ^{ab}	۴/۹۷±۰/۴۶ ^b	۵/۰۱±۰/۵۲ ^b	۵/۰۸±۰/۶۰ ^b
خاکستر	۲/۲۶±۰/۲۱ ^a	۲/۲۸±۰/۲۱ ^a	۲/۳۲±۰/۲۱ ^{ab}	۲/۳۵±۰/۲۱ ^b	۲/۳۸±۰/۲۱ ^b	۲/۴۷±۰/۲۱ ^c
فسفر	۱/۲۷±۰/۰۹ ^d	۱/۲۶±۰/۰۹ ^d	۱/۱۵±۰/۰۹ ^c	۱/۰۰±۰/۰۹ ^b	۰/۹۸±۰/۰۸ ^b	۰/۹۱±۰/۰۹ ^a

ردیف‌های با حداقل یک حرف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت آماری معنی‌داری با هم ندارند.

تغییرات فلور باکتریایی دستگاه گوارش ماهیان آزمایشی: نتایج نشان داد با افزایش میزان پودر بذر استبرق تا سطح ۴٪ تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک افزایش پیدا می‌کند ($P < 0/05$) اما هنگامی که این میزان به ۵٪ می‌رسد روند کاهشی آغاز می‌شود (جدول ۷). هرچند تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در این سطح همچنان بیشتر از تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک گروه شاهد است ($P < 0/05$).

جدول ۷- مقایسه میانگین (\pm خطای استاندارد) تعداد کل باکتری‌های هوازی و باکتری‌های اسیدلاکتیک (تعداد کلنی در هر گرم روده) و نسبت شمارش باکتری‌های اسیدلاکتیک به شمارش کلی باکتری‌های هوازی موجود در روده قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف پودر بذر استبرق در مدت ۵۶ روز ($n=3$)

تیمار	شاهد	سطوح مختلف پودر بذر استبرق (درصد)				
		۱	۲	۳	۴	۵
تعداد کل باکتری‌ها ($\times 10^6$)	۴/۸۵±۰/۴۹	۴/۸۳±۰/۴۹	۴/۷۵±۰/۴۸	۴/۶۶±۰/۴۹	۴/۷۹±۰/۵۱	۴/۹۰±۰/۵۰
تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک ($\times 10^4$)	۳/۲±۰/۳۵ ^a	۴/۷±۰/۳۵ ^c	۵/۰±۰/۲۹ ^c	۵/۳±۰/۳۱ ^{cd}	۶/۱۰±۰/۵۲ ^c	۳/۴±۰/۳۹ ^b
نسبت تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک به تعداد کل باکتری‌ها (10^2)	۶/۶۰±۰/۵۸ ^a	۹/۷۰±۱/۰ ^b	۱۰/۵±۱/۰ ^{bc}	۱۱/۴۰±۰/۹۹ ^c	۱۲/۷۰±۰/۹۹ ^d	۶/۹۰±۰/۵۲ ^a

ردیف‌های با حداقل یک حرف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت آماری معنی‌داری با هم ندارند.

بحث و نتیجه‌گیری

توجه به فن‌آوری‌های تولید فرآورده‌های جدید با ارزش افزوده بالا از منابع پروتئین گیاهی تجدیدپذیر، یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های پیش روی صنعت تولید غذای آبزیان با چشم‌انداز آبی‌پروری پایدار و ارگانیک محسوب می‌شود (Safari, 2011). در مطالعه حاضر بهبود در شاخص‌های رشد تا سطح ۰.۴ جیره غذایی روند افزایشی نشان داد و پس از آن با شیب کندی از شاخص‌های رشد کاسته شد، اما همچنان شاخص‌های رشد ماهیان نسبت به جیره غذایی بدون پودر بذر استبرق (جیره شاهد) مطلوب‌تر بود. محققین اثرات گیاه لیوول را در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ و ۱/۵ و ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مدت ۱۱۲ روز در جیره غذایی ماهی *Labeo rohita* بررسی کردند. نتایج نشان داد که ماهیان تیمار ۰.۲ بیشترین میزان رشد را دارند. ماهیانی که در جیره غذایی آن‌ها از این گیاه استفاده شده بود کارایی غذایی بالاتر و نسبت جذب پروتئین و کربوهیدرات بهتر و توانایی هضم بهتری در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. همچنین نسبت RNA به DNA در عضلات و کبد آن‌ها بالاتر از گروه کنترل بود. این ماهیان دارای چربی و پروتئین لاشه بالاتری نیز بودند. طی مطالعه‌ای سطوح مختلف زیره سیاه، سیر و بیوژن تجاری را در مورد میزان رشد ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) در دو فصل تابستان و زمستان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که طی ماه‌های تابستان تیمارهای مختلف از نظر رشد اختلاف معنی‌داری نشان ندادند اما در دوره زمستان تیمار دریافت‌کننده ۰.۱ سیر رشد را در ماهی مورد نظر افزایش داد (Diab et al., 2008).

یکی از عوامل اقتصادی بودن پرورش آبزیان میزان ضریب تبدیل غذایی است. ضریب تبدیل غذایی ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۰.۲ پودر بذر استبرق (۱/۳۱) تفاوت آماری معنی‌داری ($P < 0.05$) را با تیمار شاهد (۱/۷۱) بعد از ۵۶ روز تغذیه نشان داد. این امر می‌تواند به دلیل بهبود فلور باکتریایی روده ماهیان تغذیه شده با پودر بذر استبرق و به تبع آن افزایش کارایی غذا باشد. همچنین افزایش کارایی هضم کربوهیدرات‌ها نیز می‌تواند یکی دیگر از عوامل کاهش ضریب تبدیل غذایی باشد. هرچند که بین ضریب تبدیل غذایی ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی ۰.۲ و ۰.۳ درصد پودر بذر استبرق تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد. افزایش میزان پودر بذر استبرق در جیره غذایی ماهیان تا سطح ۰.۴ موجب افزایش معنی‌دار ($P < 0.05$) میزان رشد ویژه (۲/۳۶ درصد در روز) نسبت به تیمار شاهد (۱/۹۲ درصد در روز) گردید. در مطالعه حاضر با توجه به حداقل میزان مشاهده شده ضریب تبدیل غذایی در تیمار حاوی ۰.۲ پودر بذر استبرق، می‌توان این مقدار را به‌عنوان سطح مطلوب قلمداد نمود زیرا علاوه بر کاهش هزینه‌های غذا و غذایی به سبب مقدار کمتر غذایی، از آلودگی ثانویه آب محیط پرورش و به تبع آن کاهش پارامترهای کیفی آب جلوگیری خواهد کرد (Falahatkar et al., 2006).

نسبت کارایی پروتئین با افزایش سطح استفاده از پودر بذر استبرق در سطوح ۳ تا ۵ درصد تفاوت آماری معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان داد ولی تفاوت آماری معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. با این حال، بیشترین میزان کارایی چربی (۵/۳۲) و انرژی (۴/۴۷) در جیره غذایی حاوی ۵٪ پودر بذر استبرق مشاهده شد. در مطالعه مشابهی، استفاده از آویشن در جیره غذایی ماهی سی‌باس اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) به میزان ۱٪، منجر به افزایش کارایی پروتئین شد در حالی که شاخص‌های رشد در مطالعه مورد نظر تفاوت معنی‌داری نشان ندادند (Yılmaz and Ergün, 2011).

شاخص امعا و احشاء در ماهیانی که با جیره حاوی ۵٪ پودر بذر استبرق تغذیه شده بودند در بالاترین سطح قرار داشت، این مسئله احتمالاً به دلیل وجود میزان بالای چربی در بذر گیاه استبرق می‌باشد. در مورد شاخص کبدی نیز ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۳٪ پودر بذر استبرق بالاترین میزان این شاخص را نشان دادند، اما میزان بالای شاخص کبدی در این تیمار علاوه بر وجود چربی تجمع یافته در کبد می‌تواند به دلیل تجمع مواد متفاوت دیگر در کبد باشد.

در دهه اخیر به نقش باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش در تنظیم فیزیولوژی رشد و تولید مثل آبزیان توجه ویژه‌ای شده است. جوامع باکتریایی پروبیوتیکی موجود در دستگاه گوارش با تولید مواد مغذی ضروری مانند اسیدهای چرب ضروری و آنزیم‌های گوارشی (آمیلاز، پروتاز و لیپاز)، کارایی هضم پروتئین و چربی‌ها را در جیره افزایش می‌دهند. باکتری‌های اسیدلاکتیک از جمله مهم‌ترین، پرکاربردترین و موفق‌ترین پروبیوتیک‌ها می‌باشد که بیش از ۵۰ گونه را شامل می‌شوند (Tannock, 2004). این باکتری‌ها گروهی از باکتری‌های گرم مثبت، میله‌ای و یا گرد هستند که اسپور تولید نمی‌کنند، کاتالاز منفی و اکسیداز منفی می‌باشند، این باکتری‌ها از کربوهیدرات‌ها به‌عنوان انرژی استفاده کرده و اسیدلاکتیک تولید می‌کنند (Ahmadnia, 2015). در مطالعه حاضر تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک دستگاه گوارش در تمامی تیمارهای تغذیه‌شده با جیره غذایی حاوی پودر دانه استبرق افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان داد. این باکتری‌ها با افزودن پودر دانه استبرق تا سطح ۴٪ روند افزایشی داشته و پس از آن رو به کاهش نهادند. به نظر می‌رسد پودر دانه استبرق با دارا بودن خصوصیات پربیوتیکی منجر به افزایش تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک دستگاه گوارش ماهیان شده است. با توجه به نتایج آنالیز شیمیایی، پودر دانه استبرق دارای میزان زیادی فیبر غیر قابل هضم می‌باشد. بر اساس تعریف، پربیوتیک ماده غذایی غیر قابل هضمی است که از طریق تحریک رشد و فعالیت یک یا تعداد محدودی از باکتری‌های مفید موجود در روده (مانند باکتری‌های اسیدلاکتیک) اثرات سودمندی برای میزبان داشته و می‌تواند سلامتی و رشد میزبان را بهبود بخشد (Hoseinifar et al., 2015). هرچند برای ادعای این فرضیه نیاز به تحقیقات گسترده‌تری می‌باشد. در مجموع مطالعه حاضر نشان داد که اگر هدف وزن نهایی و میزان رشد ویژه باشد تا میزان ۴٪ پودر بذر استبرق را می‌توان در جیره غذایی ماهی استفاده نمود. در صورتی که هدف شاخص‌های دیگری همچون

نسبت کارآیی چربی و انرژی باشد بسته به هدف جیره‌نویسی می‌توان تا ۵٪ از پودر بذر استبرق را در جیره غذایی ماهی بکار برد. با توجه به اینکه تولید بذر این گیاه در مقادیر زیاد در اواخر پاییز و اوایل زمستان اتفاق می‌افتد و به سهولت قابل برداشت می‌باشد (Francis, 2001)، استفاده از آن به‌عنوان بخشی از خوراک آبزیان که بیشترین سهم را در هزینه‌های تولید دارا است، می‌تواند هزینه‌های تولید را کاهش دهد.

منابع

- Ahmadnia H.R. 2015. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* and lactoferrin on gut microbiota, skin mucus and reproductive parameters in female *Carassius auratus*. Ph.D thesis, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources. Gorgan, Iran. (In Persian).
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. Official Methods of Analysis (16th edn). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA, USA. 771 P.
- Bhosale S.V., Bhilave M.P., Nadaf S.B. 2010. Formulation of Fish Feed using Ingredients from Plant Sources. *Research Journal of Agricultural Sciences*, 1(3): 284-287.
- Citarasu T. 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 18: 403-414.
- Couto N., Wood J., Barber J. 2016. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine*, 95: 27-42.
- Diab D.L., Gillespie M.A., Highhouse S. 2008. Are maximizers really unhappy? The measurement of maximizing tendency. *Judgment and Decision Making*, 3: 364-370.
- FAO. 2010. The state of world aquaculture. Updated 2010. [Cited 18 December 2010]. Available from: www.fao.org
- Freitas C.D.T., Nogueira F.C.S., Vasconcelos I.M., Oliveira J.T.A., Domont G.B., Ramos M.V. 2011. Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: Biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. *Plant Physiology Biochemistry*, 49: 738-743.
- Ergün S., Yılmaz S., Yigit, M. 2011. Effects of thyme, rosemary and fenugreek on some hematological and immunological parameters of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Mediterranean Aquaculture*, 20: 19-21.
- Falahatkar B., Soltani M., Abtahi B., Kalbasi M., Porkazemi M., Yasemi M. 2006. Effects of vitamin C on some growth parameters, survival and hepatosomatic index in juvenile cultured beluga, *Huso huso*. *Pajouhesh & Sazandegi*, 72: 98-103

- Farhangi M., Carter CG. 2001. Growth, physiological and immunological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to different dietary inclusion levels of dehulled lupin (*Lupinus angustifolius*). *Aquaculture Research*, 32: 329-340.
- Francis JK. 2001. *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. *International Institute of Tropical Forestry, Jardín Botánico Sur*, 102(2): 61-256.
- Glencross B.D., Booth M., Allan G.L. 2007. A feed is only as good as its ingredients- a review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. *Aquaculture Nutrition*, 13: 17-34.
- Hardy RW., Barrows F. 2002. Diet Formulation and Manufacture. In: Halver JE, Hardy RW (Eds.). *Fish Nutrition*. Academic Press, pp: 505-600.
- Hoseinifar S.H., Esteban M.Á., Cuesta A., Sun Y.Z. 2015. Prebiotics and Fish Immune Response: A Review of Current Knowledge and Future Perspectives. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 23: 315-328.
- Ishnava K.P., Chauhan J.B., Garg A.A., Thakkar A.M. 2011. Antibacterial and phytochemical studies on *Calotropis gigantea* (L.) R. Br. Latex against selected cariogenic bacteria. *Saudi Journal of Biology Science*, 19(1): 34-41.
- Little E.L., Woodbury R.O., Wadsworth F.H. 1974. *Trees of Puerto Rico and the Virgin Islands*. Vol. 2. *Agriculture Handbook*. U.S. Department of Agriculture, Washington, DC. 1024 P.
- Mahious A., Ollevier F. 2005. Probiotics and prebiotics in aquaculture: a review. In: 1st Regional workshop on techniques for enrichment of live food for use in larviculture AAARC, pp: 17-26.
- Meena A.K., Yadav A., Rao M.M. 2011. Ayurvedic uses and pharmacological activities of *Calotropis procera* Linn. *Asian Journal of Traditional Medicines*, 6(2): 45-53.
- Mokhayer B. 2006. *Diseases of farmed fish*. The University of Tehran Press, Tehran. 428 P. (In Persian).
- Nakagawa H., Sato M., Gatlin D.M. 2007. *Dietary Supplements for the Health and Quality of Cultured Fish*. CAB International. USA. 256 P.
- National Research Council (NRC). 1993. *Nutrient Requirements of Fish*. Washington, DC: National Academy Press. 114 P.
- Oliveira J.S., Costa-Lotufo L.V., Bezerra D.P., Alencar N.M.N., Marinho-Filho J.D.B., Figueiredo I.S.T. 2010. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 382: 139-149.
- Oudhia P. 1999. Studies on allelopathy and medicinal weeds in chickpea fields. *International Chickpea and Pigeonpea Newsletter*, 6: 29-33.
- Oudhia P., Dixit A. 1994. Weeds in Ambikapur region (Madhya Pradesh) and their traditional use. *Weeds News*, 1(2): 19-21.

- Rahman M.A., Wilcock C.C. 1991. A taxonomic revision of *Calotropis* (Asclepiadaceae). *Nordic Journal of Botany*, 11(3): 301-308.
- Sabeti H. 1995. *Forests, Trees and Shrubs of Iran*. Yazd University Press. 410 P. (In Persian).
- Safari O. 2011. Study on the production of canola protein concentrate through different processing methods (physical, chemical and biological) with aim of using in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ph.D thesis, University of Tehran. (In Persian).
- Safari O., Mehraban M., Ahmadian H.R. 2013. Study on the biological activity of essential oils in *Calotropis persica* and *Vitex pseudo onegund*. The second national congress on medicinal plants. Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. (In Persian).
- Shalaby A., Khattab Y., Abdel Rahman A. 2006. Effects of Garlic (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 12: 172-201.
- Tannock G.W. 2004. A special fondness for *lactobacilli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3189-3194.
- Vadlapudi V., Behara M., Kaladhar DSVGK., Suresh kumar SVN., Seshagiri B., John Paul M. 2012. Antimicrobial profile of crude extracts *Calotropis procera* and *Centella asiatica* against some important pathogens. *Indian Journal of Science and Technology*, 5(8): 3132-3136.
- Velmurugan S., Viji V.T., Babu M.M., Punitha M.J., Citarasu T. 2012. Antimicrobial effect of *Calotropis procera* active principles against aquatic microbial pathogens isolated from shrimp and fishes. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1: 812-817.
- Yılmaz S., Ergün, S. 2011. Effect of red pepper (*Capsicum annum*) on pigmentation of blue streak hap (*Labidochromis caeruleus*). *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah*, 63:1-6.

