

ارزیابی عملکرد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی، جمعیت میکروبی و بافت‌شناسی روده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با پروتئین تک‌یاخته

عباس زمانی^{۱*}، سعید خلجی^۲

۱- گروه علوم و مهندسی شیلات دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست دانشگاه ملایر، ملایر، ایران.

۲- گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه ملایر، ملایر، ایران.

چکیده

هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی استفاده از پروتئین تک‌یاخته باکتریایی (IPL68) به عنوان جایگزین پودر ماهی بر عملکرد رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی (پروتاز، لیپاز و α -آمیلاز)، جمعیت میکروبی و بافت‌شناسی روده بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (وزن متوسط: $55 \pm 2/51$ گرم) برای مدت ۶ هفته بود. پنج جیره آزمایشی با سطوح جایگزینی صفر (D1)، ۲۵ (D2)، ۵۰ (D3)، ۷۵ (D4) و ۱۰۰ درصد (D5) پودر ماهی تهیه گردید. بررسی شاخص افزایش وزن بدن، ضریب رشد ویژه، شاخص وضعیت و شاخص کبدی نشان داد در جیره آزمایشی D3 بطور معنی‌داری بالاتر از سایر جیره‌های غذایی بودند ($P < 0/05$). ضریب تبدیل غذایی در جیره آزمایشی D3 و D5 به ترتیب کمترین و بیشترین مقدار را با یک اختلاف معنی‌دار نشان داد ($P < 0/05$). میزان نرخ بقاء در جیره‌های آزمایشی ۱۰۰ درصد بود. بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم‌های پروتاز، لیپاز و α -آمیلاز در روده ماهیان تغذیه شده با جیره آزمایشی D3 مشاهده شد که نسبت به جیره‌های غذایی D4 و D5 اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$). بیشترین تعداد کل باکتری و باکتری‌های اسید لاکتیک در جیره غذایی D3 مشاهده شد که با سایر جیره‌های غذایی اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0/05$). بیشترین ارتفاع پرز و نسبت ارتفاع پرز به عمق کرپیت در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی D3 مشاهده شد که با جیره‌های D1، D2 و D4 اختلاف معنی‌داری نداشت ولی با جیره غذایی D5 اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$). براساس نتایج بدست آمده، جیره غذایی حاوی ۵۰ درصد پروتئین تک‌یاخته نسبت به سایر جیره‌ها می‌تواند برای رشد بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مناسب باشد.

کلید واژه‌ها: آنزیم، باکتری اسید لاکتیک، پروتئین تک‌یاخته، پودر ماهی

مقدمه

در سال‌های اخیر افزایش تقاضا برای ماهی و فرآورده‌های حاصل از آن به عنوان یک منبع غذایی با ارزش از نظر محتوای پروتئین و اسیدهای چرب غیر اشباع امگا ۳ منجر به رشد چشمگیر صنعت آبزی‌پروری شده است. بر اساس گزارش فائو در سال ۲۰۲۰ میزان تولید در بخش آبزی پروری تقریباً با میزان صید برابر بوده است به‌طوری‌که میزان صید و آبزی پروری به ترتیب برابر ۹۰/۳ و ۸۷/۵ میلیون گزارش شده است [۱]. استفاده از پودر ماهی در جیره غذایی ماهیان همچنان رایج است و صنعت آبزی‌پروری نیز مصرف کننده عمده این فرآورده ماهی است. از آنجایی‌که پودر ماهی یک منبع پروتئین پایدار نیست، صنعت آبزی پروری به دنبال جایگزین‌هایی است که ارزان‌تر و سازگار با محیط زیست باشد. از جمله این منابع می‌توان به منابع گیاهی و میکروبی (تک‌یاخته) اشاره کرد. استفاده از منابع گیاهی در جیره غذایی ماهی به طور قابل توجهی افزایش یافته است ولی به علت برخی محدودیت‌ها مانند وجود عوامل ضد تغذیه‌ای که برای اکثر ماهیان پرورشی، به‌ویژه گونه‌های گوشتخوار مشکل‌ساز است استفاده از آنها را به‌طور گسترده محدود می‌کند [۲]. از سوی دیگر، افزایش تقاضا برای پروتئین‌های گیاهی می‌تواند اثرات مخربی بر محیط زیست مانند نگرانی در مورد جنگل زدایی، تغییر کاربری اراضی و انباشت مواد آلی^۱ داشته باشد [۳]. منابع گیاهی مانند کنجاله سویا این مزیت را دارند که بسیار ارزان‌تر از پودر ماهی هستند و به عنوان منبع پروتئین با کیفیت بالا در نظر گرفته می‌شوند ولی به دلیل محتوای بالای عوامل ضد مغذی می‌تواند در جیره غذایی ماهیانی مانند ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) باعث افزایش نفوذپذیری و التهاب روده شود [۴].

¹ -Eutrophication

پروتئین تک‌یاخته (SCP) می‌تواند یک منبع جایگزین مناسب برای پودر ماهی در جیره غذایی تلقی شود [۵-۸]. پروتئین تک‌یاخته به سلول‌های فاقد آب موجودات تک‌یاخته مانند قارچ‌ها، باکتری‌ها، مخمرها و ریزجلبک‌ها اطلاق می‌شود که از فرآیندهای تخمیر زیست‌توده از صنعت و کشاورزی (مانند ملاس، آب پنیر، نشاسته، آلکان‌ها، هیدروکربن‌ها، سلولزها، آمونیاک، نیترات طبیعی و ... گاز) مشتق می‌شوند [۹]. SCP ها دارای مزایایی مانند سرعت رشد بالا، تجدیدپذیر بودن و توانایی رشد بر روی بستری از پسماندهای صنعتی بوده و از ترکیب مواد مغذی مناسبی مانند محتوای پروتئین بالا (۶۰ تا ۸۲ درصد در ماده خشک)، محتوای چربی بالا، ویتامین‌های گروه B، رنگدانه‌ها و بتا گلوکان‌ها برخوردارند [۱۰]. همچنین در مقایسه با منابع گیاهی نیاز به آب کمی دارند و تحت‌تاثیر شرایط محیطی قرار نمی‌گیرند [۹]. SCP باکتریایی به عنوان یک منبع پروتئین امیدبخش در جیره غذایی آبزیان در نظر گرفته می‌شود که از مهمترین مزایای آنها می‌توان به توانایی تغییر ترکیب زیست توده بر اساس تنظیمات مختلف تولید آنها، محتوای بالایی پروتئین خام (۸۰ درصد)، سرعت رشد بالا و توانایی رشد در بسترهای مختلف مانند ضایعات آلی و مواد پتروشیمی مانند اتانول، متان، متانول و نیتروژن، گاز سنتز، CO₂ و H₂ اشاره نمود [۱۱، ۱۲]. در آبرزی پروری، SCP به‌عنوان یک جایگزین پروتئینی برای منابعی مانند پودر ماهی و کنجاله سویا در نظر گرفته شده است و اکثر مطالعات انجام شده اثرات مثبتی بر افزایش رشد نشان داده‌اند [۱۳]. از این مطالعات می‌توان به استفاده از SCP باکتریایی در جیره غذایی ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*S. salar*) [۱۴]، قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) [۱۵]، تیلپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) [۱۶]، ماهی دم زرد ژاپنی (*Seriola quinqueradiata*) [۱۷] و گربه ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) [۱۸] اشاره نمود. بسیاری از آنها امکان جایگزینی ۲۰-۵ درصد در جیره غذایی قزل‌آلای رنگین کمان، ۳۰ درصد در گربه ماهی، ۳۶-۴ درصد در ماهی آزاد اقیانوس اطلس و ۵۰ درصد در تیلپیا نیل را به‌جای پودر ماهی گزارش کرده‌اند. با این حال، زیست توده تولید شده از باکتری‌ها حاوی سطوح بالایی از اسیدهای نوکلئیک است که حذف آنها در فرآیند تولید هزینه محصول را افزایش می‌دهد [۱۹]. لذا ارزیابی توانایی گوارش، بافت‌شناسی روده و جمعیت میکروبی آن می‌تواند از مهم‌ترین عوامل موثر در فرآیند جایگزینی پودر ماهی بوسیله این منابع میکروبی باشد [۲۰].

یکی از مهمترین گونه‌های پرورشی در ایران ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*O. mykiss*) می‌باشد که بر اساس سالنامه آماری سازمان شیلات ایران [۲۱] میزان تولید آن ۱۸۹۹۳۲ تن در سال ۱۴۰۰ بوده است که ۴۴ درصد از کل ماهیان پرورشی ایران را تشکیل می‌دهد. لذا یافتن جایگزین مناسب برای پودر ماهی در تهیه جیره غذایی این گونه به‌ویژه برای مراحل اولیه رشد به‌دلیل نیاز پروتئینی بالا ضروری می‌باشد. هدف از انجام این تحقیق دستیابی به یک جیره غذایی مناسب با استفاده از IPL 68 به‌عنوان یک SCP باکتریایی به‌جای پودر ماهی و ارزیابی تأثیر آن بر عملکرد رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی، بافت‌شناسی روده و جمعیت باکتریایی آن در بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نحوه پرورش

در این تحقیق ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با وزن متوسط $2/51 \pm 0/55$ گرم با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی/ تاریکی به مدت ۶ هفته در ۱۵ عدد مخزن با حجم تقریبی ۴۰ لیتر پرورش داده شد. به‌طوریکه در هر مخزن تعداد ۱۵ عدد ماهی رهاسازی گردید. ماهی‌ها قبل از شروع آزمایش به مدت ۷۲ ساعت قطع غذا شدند سپس به مدت دو هفته با غذای تجاری جهت سازگاری با شرایط آزمایشی تغذیه شدند. تغذیه ماهیان با جیره‌های غذایی آزمایشی تهیه شده، روزانه ۴ بار و به مدت ۶ هفته بر اساس ۴ درصد وزن بدن انجام گرفت. در این مدت مدفوع و غذای به‌جای مانده در محیط پرورشی ۳۰ دقیقه بعد از اتمام غذادهی روزانه تخلیه شده و آب مخازن نیز روزانه تا ۹۰ درصد تعویض گردید. از هر مخزن ۷ عدد ماهی جهت تعیین فعالیت آنزیم‌های گوارشی و باقی‌نیز جهت تعیین شاخص‌های رشد، جمعیت میکروبی و بافت‌شناسی روده نمونه برداری شدند.

طی دوره آزمایش شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب شامل دما (14 ± 0.5 °C)، pH (8.2 ± 0.1)، شوری (کمتر از ۱ g/L) و اکسیژن محلول (9.5 ± 0.1 mg/L) اندازه‌گیری گردید.

آماده‌سازی جیره غذایی

برای بررسی تاثیر استفاده از SCP به‌جای پودر ماهی از محصول IPL 68 استفاده گردید که از تخمیر مواد خام گیاهی مانند چغندر قند، ملاس نیشکر و گلوکز گندم توسط باکتری غیر GMO^۱ و با استفاده از مونوسدیم ال-اسید گلوتامیک تولید می‌شود و حاوی ۶۸ درصد پروتئین با پروفایل اسید آمینه‌ای مناسب به‌ویژه ترئونین، ایزولوسین و والین است. از دیگر ویژگی‌های آن می‌توان به رنگ قهوه‌ای مطلوب و بوی آن اشاره نمود که شبیه پودر ماهی است و از نظر هزینه مقرون به صرفه بوده و قابلیت دسترسی بالایی دارد. در تحقیق حاضر، ۵ جیره غذایی شامل جیره شاهد D1 (۱۰۰ درصد آرد ماهی؛ ۰ درصد IPL 68)، جیره D2 (۷۵ درصد آرد ماهی؛ ۲۵ درصد IPL 68)، جیره D3 (۵۰ درصد آرد ماهی؛ ۵۰ درصد IPL 68)، جیره D4 (۲۵ درصد آرد ماهی؛ ۷۵ درصد IPL 68) و جیره D5 (۰ درصد آرد ماهی؛ ۱۰۰ درصد IPL 68) مورد مطالعه قرار گرفت. برای جیره‌نویسی از نرم افزار Aquafeed استفاده شد و تنظیم جیره غذایی به نحوی صورت گرفت که مطابق با نیازهای غذایی بچه‌ماهی قزل آلا^۲ رنگین کمان باشد و جیره‌ها از نظر میزان پروتئین، چربی و انرژی همسان باشند [۲۲]. جهت تهیه جیره‌های آزمایشی ابتدا اقلام غذایی بر اساس جدول ۱ تهیه شده و بعد از الک کردن و آسیاب نمودن به‌صورت کاملاً پودری آماده شدند. سپس اقلام غذایی بر اساس مقادیر مورد نیاز توسط ترازو توزین و با یکدیگر مخلوط شدند و به آنها آب اضافه شد. خمیر حاصله بوسیله چرخ گوشت با اندازه چشمه ۲ میلی‌متر پلت شده و برای خشک کردن به مدت ۲۴ ساعت در معرض جریان هوا در دمای اتاق قرار گرفت و پلت‌های خشک شده در کیسه‌های پلاستیکی در دمای یخچال (۴°C) نگهداری شدند.

تعیین شاخص‌های رشد

در انتهای دوره آزمایش ماهیان جهت تعیین شاخص‌های رشد، ابتدا به مدت ۴۸ ساعت قبل از نمونه‌برداری قطع غذا شده و سپس با استفاده از سوزن قطع نخاع گردیدند [۲۳]. سپس شاخص‌های افزایش وزن بدن^۳، ضریب رشد ویژه^۴، ضریب وضعیت^۵، نرخ بقا^۶ و شاخص کبدی^۷ با استفاده از روابط زیر محاسبه شد [۲۴].

افزایش وزن بدن (گرم) = وزن نهایی - وزن اولیه

ضریب رشد ویژه = $\ln(\text{وزن نهایی (گرم)} - \ln(\text{وزن اولیه (گرم)})) / \text{زمان پرورش (روز)}$ × ۱۰۰

شاخص وضعیت = $(\text{وزن نهایی (گرم)} / \text{طول کل (cm)})^3$ × ۱۰۰

نرخ بقا = $(\text{تعداد ماهیان در انتهای دوره پرورش} / \text{تعداد اولیه ماهیان}) \times ۱۰۰$

شاخص کبدی = $(\text{وزن کبد (گرم)} / \text{وزن نهایی (گرم)}) \times ۱۰۰$

ضریب تبدیل غذایی = مقدار غذای خشک مصرف شده / مقدار افزایش وزن بدن

^۱ -Genetically Modified Organism

^۲ -Body Weight Gain

^۳ - Specific Growth Ratio

^۴ -Condition Factor

^۵ -Feed Conversion Ratio

^۶ - Survival Rate

^۷ - Hepatosomatic Index

سنجش ترکیب شیمیایی جیره غذایی

برای تعیین ترکیب تقریبی جیره غذایی از روش AOAC [۲۵] استفاده گردید. میزان رطوبت بر اساس اختلاف وزن حاصل از قرار دادن نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای 105°C به دست آمد. میزان پروتئین خام از روش کج‌لدال، میزان چربی خام با استفاده از روش سوکسله و میزان خاکستر نیز با سوزاندن نمونه خشک شده در کوره الکتریکی در دمای 550°C و برای مدت ۵ ساعت اندازه‌گیری گردید.

تهیه عصاره آنزیمی، سنجش فعالیت آنزیم و پروتئین محلول

برای این منظور، ابتدا ماهیان بعد از بیهوشی کامل با عصاره گل میخک با استفاده از سوزن قطع نخاع شده و کالبد شکافی جهت جداسازی روده روی یخ انجام شد. بعد از جداسازی، نمونه‌ها توزین شده و در بافر ۵۰ میلی مولار تریس - HCl ، $\text{pH} = 8.0$ (حاوی ۱۰ میلی مولار CaCl_2 و ۵/۰ مولار NaCl) با نسبت ۱ به ۲۰ مخلوط و با استفاده از هموژنایزر (مدل Hand Held WT130) همگن سازی در حضور یخ به مدت ۱ دقیقه در 11000rpm انجام شد. سپس مخلوط حاصله برای ۳۰ دقیقه در دمای 4°C در 10000rpm سانتریفیوژ گردید و محلول رویی به عنوان عصاره آنزیمی جهت سنجش فعالیت آنزیم انتخاب گردید [۲۶]. برای سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز از کازئین ۱ درصد به عنوان سوبسترا استفاده شد و میزان جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت شد [۲۷]. فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز با استفاده از روش Bernfeld [۲۸] اندازه‌گیری گردید که در این روش از نشاسته به عنوان سوبسترا استفاده شد و مالتوز رهاسازی شده با کمک معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید شناسایی و در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید. برای سنجش فعالیت آنزیم لیپاز از روش Iijima و همکاران [۲۹] و از پارانیتروفیل مریستات به عنوان سوبسترا استفاده شد و جذب پارانیتروفیل رهاسازی شده در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت گردید. در تمام سنجش‌ها در نمونه شاهد از آب مقطر به جای نمونه آنزیمی استفاده شد. جهت تعیین فعالیت اختصاصی آنزیم‌های مورد مطالعه، میزان پروتئین محلول در روده با روش Lowry و همکاران [۳۰] و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (1 mg/ml) به عنوان استاندارد سنجش گردید.

جدول ۱- اقلام (گرم در کیلوگرم غذا) و ترکیب تقریبی جیره‌های آزمایشی تهیه شده.

اقلام جیره غذایی	D1	D2	D3	D4	D5
پودر ماهی	۵۰۰	۳۷۵	۲۵۰	۱۲۵	۰
پودر گوشت و استخوان	۶۰	۴۹/۴	۳۸/۸	۲۸/۲	۱۷/۶
روغن سویا	۲۰	۲۰	۲۰	۲۶	۳۸
روغن ماهی	۷۰	۸۲	۹۳	۱۰۰	۱۰۰
گلوتن ذرت	۹۰	۸۰/۲	۷۰/۴	۶۰/۶	۵۰/۸
IPL68 ^۱	۰	۱۲۵	۲۵۰	۳۷۵	۵۰۰
آرد گندم	۱۳۰	۱۳۳	۱۳۸	۱۳۸	۱۴۰
آکوپرو ^۲	۶۴/۸	۶۴/۸	۶۴/۸	۶۴/۸	۶۴/۸
امپریال ^۳	۴۰	۴۰	۴۰	۴۰	۴۰
مکمل معدنی ^۴	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
مکمل ویتامینی ^۵	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
آنتی اکسیدان	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲
ضد قارچ	۵	۵	۵	۵	۵
پرکننده	۰	۵/۴	۹/۸	۱۷/۲	۲۳/۶
ترکیب تقریبی جیره غذایی (درصد)					
رطوبت	۴/۵۰	۴/۴۱	۴/۹۱	۴/۸۳	۵/۰۰
چربی کل	۲۱/۵۰	۲۱/۵۰	۲۱/۵۰	۲۱/۵۰	۲۱/۵۰
پروتئین کل	۴۵/۶۸	۴۵/۷۲	۴۵/۴۷	۴۵/۵۱	۴۵/۴۴
خاکستر	۸/۰۲	۷/۹۱	۷/۸۷	۷/۷۳	۷/۶۸

کربوهیدرات	۲۰/۳۰	۲۰/۴۶	۲۰/۲۵	۲۰/۴۳	۲۰/۳۸
انرژی ناخالص (kcal/g)	۵/۴۴	۵/۴۵	۵/۴۳	۵/۴۴	۵/۴۳

۱- IPL68 (تولید شده در شرکت Intraco بلژیک): نوعی محصول تهیه شده از زیست توده باکتریایی کشته شده که از اسید مونو سدیم - آل گلوتامیک با استفاده از تخمیر میکروبی مواد خام گیاهی مانند ملاس چغندر قند، نیشکر و یا قند میوه تهیه می‌شود و حاوی ۱۰ درصد رطوبت، ۶۸ درصد پروتئین، ۳/۲۵ درصد چربی، ۱ درصد فیبر خام و ۱۰ درصد خاکستر می‌باشد.

۲- آکوپرو (تولید شده در شرکت یسنا مهر): سویای فرآوری شده. میزان پروتئین ۵۱ درصد، انرژی قابل متابولیسم ۲۸۷۰ kcal/kg، رطوبت ۱۲ درصد، خاکستر ۷ درصد، چربی ۲/۸ درصد، فیبر خام ۴ درصد، نشاسته ۵ درصد و قند ۹ درصد است.

۳- امپریال (تولید شده در شرکت کارگیل آمریکا): منبعی با میزان پروتئین ثابت و خلوص بالاست که از ذرت تهیه شده است. میزان پروتئین ۷۵ درصد، چربی ۲ درصد، حداکثر فیبر خام ۱ درصد، نشاسته ۱ درصد، انرژی قابل متابولیسم ۳/۳۵ kcal/g است.

۴- مکمل معدنی (میلی گرم/کیلوگرم): KCl : ۲۰۰ میلی گرم، KI : ۶۰ میلی گرم، $\text{COCL}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: ۷ میلی گرم، $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: ۱۴ میلی گرم، $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: ۴۰۰ میلی گرم، $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: ۲۰۰ میلی گرم، $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: ۸۰ میلی گرم، $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: ۶۵ میلی گرم، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: ۳۰۰۰ میلی گرم، $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: ۲۰۰۰۰ میلی گرم، NaCl : ۱۳۶ میلی گرم و Zeolite : ۵۸۴۰ میلی گرم و کریر تا ۱ کیلوگرم است.

۵- مکمل ویتامینی حاوی تیامین (۱۲ میلی گرم)، ریبوفلاوین (۵ میلی گرم)، پیرویدوکسین (۶ میلی گرم)، سیانو کوبالامین (۰/۰۵ میلی گرم)، نمک منادیون (K₃) (۵ میلی گرم)، اینوزیتول (۱۰۰ میلی گرم)، پانتوتیک اسید (۳۰ میلی گرم)، فولیک اسید (۲ میلی گرم)، بیوتین (۰/۰۶ میلی گرم)، رتینول استات (۲۵ میلی گرم)، D3- کوله کلسیفرول (۵ میلی گرم)، آلفا- توکوفرول (۴۰ میلی گرم)، آسکوربیک اسید (۵۰۰ میلی گرم)، نیاسین (۳۵ میلی گرم)، اتوکسی کوئین (۱۵۰ میلی گرم) و کریر تا ۱۰۰۰ میلی گرم است.

پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت بر حسب درصد ماده خشک است و محاسبه کربوهیدرات بر حسب رابطه (پروتئین + چربی + خاکستر + رطوبت) - ۱۰۰ و محاسبه انرژی ناخالص بر حسب کیلوکالری بر گرم جیره از رابطه حاصلضرب مقدار انرژی موجود در هر گرم پروتئین (۵/۶۵ kcal)، چربی (۹/۴۵ kcal) و کربوهیدرات (۴/۱۱ kcal) تعیین گردید [۲۲].

جمعیت میکروبی و بافت‌شناسی روده

به منظور بررسی جمعیت باکتری‌های کل و اسید لاکتیک در روده ماهیان، در انتهای دوره از تیمارهای مختلف به طور تصادفی نمونه برداری صورت گرفت. برای این منظور ابتدا ۲۴ ساعت قبل از نمونه برداری تغذیه ماهیان قطع گردید. سپس از هر تکرار ۳ ماهی به طور تصادفی برداشته و پس از بیهوشی کامل با عصا گل میخک، نخاعی شده و برای از بین بردن باکتری‌های سطح بدن ماهی از اتانول ۷۰ درصد استفاده شد. سپس کالبدشکافی ماهیان با استفاده از تیغ جراحی استریل انجام شده و روده آنها پس از جداسازی در هاون چینی استریل هموژن گردید. پس از تهیه نمونه هموژن با استفاده سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد رقت‌های مختلف تهیه گردید. از رقت‌های مورد نظر تحت شرایط استریل مقدار ۰/۱ میلی لیتر به پلیت حاوی محیط کشت نوترینت آگار برای بررسی جمعیت باکتری‌های کل و از محیط کشت MRS برای بررسی جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک منتقل و با استفاده از پیت پاستور استریل در سطح آن پخش گردید و انکوباسیون پلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در دمای اتاق و در شرایط هوازای انجام شد. برای مطالعه تغییرات بافت‌شناسی، از قسمت میانی بافت روده نمونه برداری انجام شد و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژیک، نمونه‌ها در محلول بافر فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند. بعد از آماده سازی نمونه‌ها، مقاطع بافتی تهیه شده با روش همتاکسین - آئوزین رنگ‌آمیزی شدند. برای بررسی مقاطع بافتی تهیه شده، از میکروسکوپ نوری استفاده شد و با استفاده از نرم‌افزار image tool، ارتفاع پرز (از نوک پرز تا محل اتصال کریپت) و عمق کریپت محاسبه گردید [۸].

آنالیز آماری

این مطالعه بر اساس طرح آزمایشی کاملاً تصادفی طراحی گردید و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده شد. ابتدا نرمال بودن داده‌ها با کمک آزمون Kolmogorov-Smirnov مورد ارزیابی قرار گرفت و آزمون همگنی واریانس نیز توسط تست Levene انجام شد. برای بررسی وجود اختلاف معنی‌دار بین شاخص‌های مورد بررسی در جیره‌های آزمایشی با ۳ تکرار از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) استفاده گردید و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها با کمک آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه گردیدند.

نتایج

نتایج مربوط به شاخص‌های رشد در جدول ۲ نشان داده شده است. تاثیر IPL 68 بر وزن نهایی و میزان افزایش وزن بدن نشان داد به ترتیب کم‌ترین و بیش‌ترین آن‌ها مربوط به جیره D5 و D3 بود، به‌طوری‌که در جیره D3 نسبت به سایر جیره‌های آزمایشی افزایش معنی‌داری مشاهده

گردید ($P < 0.05$). میزان ضریب تبدیل غذایی با افزایش جایگزینی تا ۵۰ درصد کاهش معنی‌داری یافت ولی با افزایش تا سطوح ۷۵ و ۱۰۰ درصد میزان آن افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$). میزان نرخ بقا در ماهیان تحت آزمایش با افزایش جایگزینی IPL68 اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با جیره شاهد نشان نداد. میزان ضریب رشد ویژه با افزایش جایگزینی IPL68 تا ۵۰ درصد افزایش معنی‌داری یافت ولی با افزایش تا سطوح ۷۵ و ۱۰۰ درصد میزان آن کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$). کمترین و بیشترین میزان شاخص وضعیت به ترتیب در ماهیان تغذیه شده با جیره D3 و D5 مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$). میزان شاخص کبدی با افزایش میزان جایگزینی IPL68 تا سطح ۷۵ درصد افزایش یافت (جیره D1، D2، D3 و D4) ولی در سطح جایگزینی ۱۰۰ درصد (جیره D5) میزان آن کاهش یافت ولی اختلاف معنی‌داری بین جیره‌های آزمایشی مشاهده نگردید.

نتایج بررسی فعالیت آنزیم‌های پروتئازکل، لیپاز و α -آمیلز در روده بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی در جدول ۳ نشان داده شده است. بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم پروتئاز کل در روده ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی D3 و کم‌ترین آن در ماهیان تغذیه شده با جیره D5 مشاهده شد؛ به‌طوریکه میزان فعالیت آن در مقایسه با ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی D1 و D2 اختلاف معنی‌داری نداشت ولی با سایر جیره‌ها این اختلاف معنی‌دار بود ($P < 0.05$). بالاترین میزان فعالیت آنزیم لیپاز در روده ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی D3 مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با جیره‌های D1 و D2 مشاهده نشد در حالیکه افزایش معنی‌داری را با جیره D4 و D5 نشان داد ($P < 0.05$). بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم α -آمیلز در روده ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی D3 بود که با جیره‌های D1 و D2 اختلاف معنی‌داری نشان نداد ولی نسبت به جیره‌های D4 و D5 افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$).

جدول ۲- عملکرد رشد بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*O. mykiss*) تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی حاوی سطوح مختلف IPL68.

جیره غذایی شاخص‌های رشد	D1	D2	D3	D4	D5
وزن اولیه (گرم)	۲/۵۱±۰/۵۵	۲/۵۱±۰/۵۵	۲/۵۱±۰/۵۵	۲/۵۱±۰/۵۵	۲/۵۱±۰/۵۵
وزن نهایی (گرم)	۱۳/۰۵±۱/۰۴ ^c	۱۴/۳۶±۰/۵۷ ^b	۱۶/۶۸±۰/۳۸ ^a	۹/۴۲±۰/۲۶ ^d	۴/۲۹±۰/۱۳ ^e
افزایش وزن بدن (گرم)	۱۰/۵۵±۱/۰۴ ^c	۱۱/۸۵±۰/۵۷ ^b	۱۴/۱۷±۰/۲۸ ^a	۶/۹۱±۰/۲۶ ^d	۱/۷۸±۰/۱۳ ^e
ضریب رشد ویژه	۲/۷۴±۰/۱۳ ^c	۲/۹۰±۰/۰۶ ^b	۳/۱۵±۰/۰۳ ^a	۲/۲۰±۰/۰۴ ^d	۰/۸۹±۰/۰۴ ^e
شاخص کبدی	۱/۴۰±۰/۱۲	۱/۴۲±۰/۱۳	۱/۴۲±۰/۱۴	۱/۴۹±۰/۱۱	۱/۳۱±۰/۰۸
شاخص وضعیت	۰/۹۴±۰/۰۳ ^b	۰/۹۹±۰/۰۶ ^a	۱/۰۵±۰/۰۳ ^a	۰/۹۳±۰/۰۳ ^{bc}	۰/۸۷±۰/۰۱ ^c
ضریب تبدیل غذایی	۰/۹۴±۰/۰۱ ^c	۰/۸۹±۰/۰۴ ^c	۰/۷۶±۰/۰۱ ^d	۱/۱۹±۰/۰۶ ^b	۲/۰۷±۰/۳۷ ^a
نرخ بقا	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

کوچک غیر مشترک در هر ردیف بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($\alpha = 0.05$, $Mn \pm Sd$, $n=3$).

جدول ۳- فعالیت آنزیم های گوارشی در روده بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*O.mykiss*) تغذیه شده با جیره های آزمایشی حاوی سطوح مختلف IPL68.

جیره غذایی	پروتئاز کل	لیپاز	α - آمیلاز
D1	$51/47 \pm 1/45^a$	$34/2 \pm 0/3^a$	384 ± 16^a
D2	$52/02 \pm 1/01^a$	$34/3 \pm 1/4^a$	393 ± 18^a
D3	$53/53 \pm 0/99^a$	$35/8 \pm 1/0^a$	400 ± 13^a
D4	$49/44 \pm 1/28^b$	$32/3 \pm 0/7^b$	334 ± 13^b
D5	$36/01 \pm 1/19^c$	$29/9 \pm 0/7^c$	327 ± 15^b

حروف کوچک غیر مشترک در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی دار می باشد ($n=3$, $\alpha=0.05$, $Mn \pm Sd$).

نتایج بررسی فلور باکتریایی روده ماهی قزل آلائی رنگین کمان با سطوح مختلف SCP در جدول ۴ نشان داده شده است. بیشترین تعداد کل باکتری ها در جیره غذایی D3 مشاهده شد که با سایر جیره های غذایی اختلاف معنی داری داشت ($P < 0.05$). بیشترین تعداد باکتری های اسید لاکتیک در جیره غذایی D3 مشاهده شد که با جیره غذایی D2 اختلاف معنی داری نداشت ولی نسبت به سایر جیره ها افزایش معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$).

جدول ۴- تعداد کل باکتری و باکتری اسید لاکتیک در روده بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*O.mykiss*) تغذیه شده با جیره های آزمایشی حاوی سطوح مختلف IPL68.

جیره غذایی	تعداد باکتری اسید لاکتیک	تعداد کل باکتری
D1	$3/12 \pm 0/83^b$	$3/49 \pm 0/87^c$
D2	$3/36 \pm 1/64^a$	$3/68 \pm 1/53^b$
D3	$3/93 \pm 1/52^a$	$4/25 \pm 1/61^a$
D4	$3/08 \pm 1/60^b$	$3/41 \pm 1/48^c$
D5	$2/82 \pm 1/44^c$	$3/18 \pm 1/44^d$

حروف کوچک غیر مشترک در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی دار می باشد ($n=3$, $\alpha=0.05$, $Mn \pm Sd$). تعداد باکتری بر اساس (Log CFU/g) گزارش شده است.

اثر جایگزینی سطوح مختلف SCP جیره غذایی بر بافت شناسی روده بچه ماهیان در جدول ۵ نشان داده شده است. بیشترین ارتفاع پرز در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی D3 مشاهده شد که با جیره های D1، D2 و D4 اختلاف معنی داری نداشت ولی با جیره غذایی D5 اختلاف معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$). کمترین و بیشترین عمق کریپت در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی D5 و D1 مشاهده شد ولی اختلاف معنی داری بین جیره های غذایی مشاهده نگردید. بیشترین نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت نیز در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی D3 ثبت گردید که با جیره های D1، D2 و D4 اختلاف معنی داری نداشت ولی با جیره غذایی D5 اختلاف معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$).

جدول ۵- ارزیابی بافت‌شناسی روده بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*O. mykiss*) تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی حاوی سطوح مختلف IPL68.

جیره غذایی	ارتفاع پرز (μ)	عمق کریبت (μ)	نسبت ارتفاع پرز به عمق کریبت
D1	$258/31 \pm 27/99^a$	$45/40 \pm 9/64$	$5/94 \pm 1/46^a$
D2	$270/21 \pm 33/11^a$	$28/52 \pm 11/28$	$7/44 \pm 2/04^a$
D3	$273/54 \pm 49/41^a$	$28/09 \pm 11/14$	$7/63 \pm 2/17^a$
D4	$267/98 \pm 91/14^a$	$43/60 \pm 14/69$	$6/73 \pm 2/93^a$
D5	$166/01 \pm 37/76^b$	$28/05 \pm 8/74$	$4/45 \pm 0/85^b$

حروف کوچک غیر مشترک در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($Mn \pm Sd$, $n=3$, $\alpha=0/05$).

بحث

در مطالعه حاضر استفاده از SCP باکتریایی (IPL68) تا سطح ۵۰ درصد به‌جای پودر ماهی در جیره غذایی تاثیر مثبتی بر عملکرد رشد بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در مقایسه با گروه شاهد داشت و در سطوح جایگزینی بالاتر (۷۵ و ۱۰۰ درصد) کاهش معنی‌داری در عملکرد رشد مشاهده گردید. میزان بالای نوکلئوتید در SCP باکتریایی می‌تواند خوش طعمی و مصرف خوراک را افزایش دهد زیرا مشخص شده است که نوکلئوتیدها می‌توانند به‌دلیل دارا بودن اینوزین و اینوزین مونوفسفات به‌عنوان محرک تغذیه‌ای عمل کنند [۳۱ و ۳۲]. همچنین پیشنهاد شده است که SCP باکتریایی می‌تواند از طریق متابولیسم گلوکولید باعث بهبود متابولیسم چربی و حفظ هموستازی انرژی کل بدن از طریق مسیر سیگنالینگ پروتئین کیناز فعال شده با آدنوزین مونوفسفات گردد [۳۲]. Aas و همکاران [۱۴] گزارش دادند جایگزینی پودر ماهی با ۱۸ درصد SCP باکتریایی وزن نهایی ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*S. salar*) را تا ۳۴ درصد افزایش داد. همچنین گنجاندن میزان پائین SCP باکتریایی (۶/۲۵ درصد) در جیره غذایی ماهی آزاد اقیانوس اطلس میزان SGR را تا ۰/۰۷٪ افزایش داد اما در سطوح بالا (۵۰ درصد) میزان SGR به‌طور قابل توجهی کاهش یافت [۳۳]. در ماهی هالیبوت اقیانوس اطلس (*Hippoglossus hippoglossus*) جیره غذایی حاوی ۹ درصد SCP باکتریایی تولید شده از گاز طبیعی تاثیر منفی بر عملکرد رشد و نسبت راندمان خوراک نداشت [۳۴]. Rhodes و همکاران [۳۵] دریافتند زیست توده تخمیر شده و خشک باکتریایی می‌تواند تا ۱۳ درصد در جیره غذایی گیش ماهی فلوریدا (*Trachinotus carolinus*) بدون کاهش قابل توجه عملکرد رشد استفاده گردد. در ماهی کپور علفخوار، جایگزینی کنجاله سویا با SCP حاصل از باکتری (*Clostridium autoethanogenum*) در سطح ۵ درصد باعث افزایش کارایی جیره و وزن نهایی شد، در حالیکه در سطح ۱۰ درصد باعث کاهش بقاء و آسیب کبدی شد که ممکن است با میزان کم اسید آمینه آرژنین در SCP استفاده شده مرتبط باشد [۳۶]. همچنین گزارش شده است که استفاده از SCP حاصل از باکتری *C. autoethanogenum* در جیره غذایی شانک سیاه (*Acanthopagrus schlegelii*) تا سطح ۵۸ درصد و در جیره غذایی ماهی بس دهان بزرگ (*Micropterus salmoides*) تا ۲۰ درصد به‌جای پودر ماهی تاثیر منفی بر عملکرد رشد نداشت [۳۷ و ۳۸]. این تفاوت در مقدار جایگزینی ممکن است به عادات تغذیه‌ای، اندازه گونه و سطح پودر ماهی مورد استفاده در جیره غذایی مربوط باشد. هر چند در مقایسه با منابع پروتئین جانوری و گیاهی، SCP باکتریایی حاوی عوامل ضد تغذیه‌ای و آمین بیوژنیک کمتری هستند ولی کاهش عملکرد رشد در سطوح بالای جایگزینی SCP باکتریایی ممکن است به دلایل زیر مرتبط باشد: (۱) پودر ماهی حاوی مقدار زیادی پپتیدهای کوچک فعال و فاکتورهای رشد ناشناخته است که در SCP باکتریایی نسبتاً کمتر است و برای سلامت و رشد روده ضروری هستند. (۲) در مقایسه با پودر ماهی، SCP باکتریایی در برخی از اسیدهای آمینه مانند آرژنین، هیستیدین و تریپتوفان کمبود دارد. (۳) مقدار برخی از مواد کمیاب فعال مانند تائورین و تری متیل آمین اکساید (TMAO) در SCP باکتریایی پائین‌تر از پودر ماهی است؛ به‌عنوان مثال تائورین یک اسید آمینه غیر پروتئینی

است که می‌تواند ظرفیت ایمنی ماهی را تقویت کند [۳۸]. بنابراین، استفاده از تائورین، TMAO، پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه مورد نیاز در جیره غذایی می‌تواند استفاده از SCP باکتریایی را در سطوح جایگزینی بالا عملی سازد.

بافت‌شناسی روشی مهمی برای ارزیابی اقلام غذایی مورد استفاده در جیره غذایی در نظر گرفته می‌شود و می‌تواند تغییرات رخ داده در فرآیندهای هضم، جذب و همچنین مقاومت در برابر عوامل بیماریزا را نشان دهد. روده محل هضم و جذب مواد مغذی است و بافت‌شناسی آن می‌تواند به طور مستقیم منعکس کننده سلامت روده باشد. در مطالعه حاضر، ارتفاع پرزها در جیره غذایی D5 (حاوی ۱۰۰ درصد SCP) به طور قابل توجهی کاهش یافت، که ممکن است به دلیل عدم تغذیه از پپتیدهای کوچک و سایر مواد مغذی موجود در پودر ماهی باشد، جائیکه پودر ماهی در این جیره غذایی کاملاً با SCP جایگزین گردید. پپتیدهای کوچک می‌توانند مستقیماً توسط سلول‌های اپیتلیال مخاط روده جذب شوند و تشریح آنزیم‌های گوارشی و هضم غذا را تسریع کرده و ساختار طبیعی و عملکرد غشای مخاطی در دستگاه گوارش را حفظ کنند. در ماهی کپور علفخوار هنگامیکه از ۱۰ درصد SCP باکتریایی در حضور میزان پائینی از پودر ماهی (۶ درصد) در جیره غذایی استفاده گردید یک آسیب در روده خلفی از جمله ریزش میکروویلی، شل شدن لامینا پروپریا و کاهش سلول‌های جامی شکل مشاهده شد [۳۶]. همچنین استفاده از SCP باکتریایی در جیره غذایی ماهی بس دهان بزرگ (*M. salmoides*) در سطوح ۵ درصد به جای پودر ماهی باعث افزایش ارتفاع پرز روده شد و در سطوح ۱۰ و ۱۵ درصد ارتفاع پرز کاهش یافت ولی اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد مشاهده نشد درحالی‌که در سطوح جایگزینی بالاتر (۲۰ و ۲۵ درصد) ارتفاع پرز بطور معنی‌داری کاهش یافت [۸]. در ماهی شانک سرطلایی استفاده از SCP باکتریایی در جیره غذایی تا سطح ۲۰ درصد به جای پودر ماهی تغییری در ساختار آناتومیک روده را نشان نداد. ارتفاع بیشتر پرزهای روده شاخصی از عملکرد فعال آنها است و به موازات افزایش ارتفاع پرز، عملکرد هضم و جذب مواد مغذی نیز به دلیل افزایش مساحت سطح جذب، بیان آنزیم‌های نوار مساوی و سیستم‌های حمل و نقل مواد مغذی، افزایش می‌یابد. افزایش ارتفاع پرزها و نسبت ارتفاع آنها به عمق کریپت به طور مستقیم با افزایش جایگزینی سلول‌های اپیتلیال رابطه مستقیم دارد. کریپت‌ها در قاعده پرزها قرار دارند و به عنوان کارخانه سازنده سلول‌های پرز در نظر گرفته می‌شوند به‌طوری‌که منشأ سلول‌های اپیتلیال روده، مهاجرت سلول‌ها از کریپت‌ها به سمت نوک پرزها می‌باشد [۳۹]. در زمینه تاثیر جیره غذایی حاوی SCP باکتریایی بر بافت‌شناسی روده در ماهیان اطلاعات اندکی وجود دارد. با این حال، جیره غذایی حاوی اسید نوکلئیک تأثیر مثبتی بر بافت‌شناسی روده مانند افزایش ارتفاع انتروسیت دارد [۳۲].

در سال‌های اخیر مطالعات رو به رشدی در زمینه بررسی جمعیت میکروبی دستگاه گوارش ماهیان به عنوان یک ابزار قدرتمند برای ارزیابی وضعیت گوارش و سلامت روده صورت گرفته است. میکروبیوتای روده در ماهیان نقش مهمی در گوارش، تولید اسیدهای آمینه، محرک ایمنی و تشریح ترکیبات بازدارنده جهت حفاظت از روده در برابر عوامل بیماریزای باکتریایی دارد. در مطالعه حاضر بیشترین تعداد کل باکتری و باکتری‌های اسید لاکتیک در جیره غذایی D3 مشاهده شد که نسبت به سایر جیره‌های غذایی افزایش داشت ($P < 0.05$). بررسی Marchi و همکاران [۸] در ماهی شانک سرطلایی (*Sparus aurata*) نشان داد در جیره غذایی حاوی ۱۰ درصد SCP باکتریایی به جای پودر ماهی جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک افزایش یافت ولی در سطوح بالاتر کاهش در جمعیت این باکتری‌ها، باکتری‌های کل روده و همچنین تنوع گونه‌های آنها مشاهده گردید. باسیلوس‌ها به عنوان یکی از مهم‌ترین گونه‌های مفید باکتریایی، نقش مثبتی در تقویت سیستم ایمنی و مقاومت در برابر بیماری در ماهیان دارند و از طریق تولید آنزیم‌های گوارشی (پروتئاز، لیپاز، فیتاز، کیتیناز)، تخریب عوامل ضد تغذیه‌ای گیاهی و افزایش سطح مواد مغذی از طریق ساخت مولکول‌های زیستی ضروری (مانند اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب و ویتامین‌ها) نقش مهمی در بهبود گوارش ماهیان ایفا می‌کنند. در مطالعه حاضر، افزایش تعداد کل باکتری‌های روده و باکتری‌های اسید لاکتیک تا سطح جایگزینی ۵۰ درصد SCP می‌تواند به دلیل افزایش تعداد پرزهای روده باشد که در سایر مطالعات نیز به آن اشاره شده است [۴۰ و ۴۱].

آنزیم‌های گوارشی توانایی هضم در جانور مورد مطالعه را نشان می‌دهند و مطالعه فعالیت آنها می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در زمینه فیزیولوژی هضم در ماهیان و میزان نیاز ماهی به مواد مغذی ضروری مانند پروتئین‌ها، لیپیدها یا کربوهیدرات‌ها فراهم نماید [۴۲ و ۴۳]. در این تحقیق نتایج

بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی نشان داد بیش‌ترین میزان فعالیت در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی D3 و کمترین آن در جیره غذایی D5 مشاهده گردید. همانطور که قبلاً درباره مطالعه جمعیت میکروبی در این تحقیق به آن اشاره شد بیشترین جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک در جیره غذایی D3 مشاهده شد که می‌تواند بر میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی نیز تاثیرگذار باشد؛ زیرا این باکتری‌ها نقش مهمی در تولید آنزیم‌های گوارشی دارند [۴۴]. در ماهی شانک سیاه (*A.schlegelii*)، استفاده از SCP باکتریایی تا ۱۸ درصد در جیره غذایی به‌جای پودر ماهی اثر قابل توجهی بر فعالیت آنزیم‌های پروتئاز، لیپاز و α -آمیلاز در دستگاه گوارش نداشت ولی در سطوح جایگزینی بالاتر میزان فعالیت این آنزیم‌ها بخصوص α -آمیلاز کاهش یافت [۳۷]. همچنین در مطالعه Yang و همکاران [۳۸] نتایج نشان داد جایگزینی پودر ماهی با SCP باکتریایی در سطح ۵ درصد تاثیری بر میزان فعالیت آنزیم‌های پروتئاز و α -آمیلاز نداشت ولی در سطوح ۱۰ تا ۲۰ درصد میزان فعالیت آنزیم پروتئاز به طور معنی‌داری کاهش یافت در حالیکه آنزیم α -آمیلاز کاهش معنی‌داری را نشان نداد. در نتایج این محققین نیز به این نکته اشاره شده است که گنجاندن سطوح بالای SCP باکتریایی در جیره غذایی می‌تواند باعث آسیب به ساختار بافتی روده (کاهش ارتفاع پرز) و در نتیجه تاثیر بر جذب پپتیدهای کوچک و ترشح آنزیم‌های گوارشی گردد.

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های این تحقیق جیره غذایی حاوی ۵۰ درصد SCP (IPL68) باکتریایی می‌تواند تاثیر مثبتی بر عملکرد رشد، آنزیم‌های گوارشی، ساختار بافتی و جمعیت میکروبی روده در بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان داشته باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از تلاش و زحمات مستمر کارشناسان آزمایشگاه گروه علوم و مهندسی شیلات و گروه علوم دامی دانشگاه ملایر قدردانی می‌نمایند.

تأییدیه‌های اخلاقی

موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع

موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

سهام نویسندگان در مقاله

اسامی نویسندگان بر اساس سهم آنها در صفحه اول مقاله به ترتیب آمده است.

منابع مالی

مطالعه حاضر بخشی از طرح پژوهشی (شماره ۳۴۶-۱-۸۴/۵) است که با حمایت مالی معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه ملایر انجام شده است.

منابع:

- [1] FAO., 2022. The State of the World Fisheries and Aquaculture. FAO fisheries and aquaculture Department, Rome.
- [2] Kroghdahl, A., Penn, M., Thorsen, J., Refstie, S., Bakke, A.M., 2010. Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. Aquaculture Research. 41(3), 333-344.
- [3] Woodgate, S.L., Wan, A.H., Hartnett, F., Wilkinson, R.G., Davies, S.J., 2022. The utilisation of European processed animal proteins as safe, sustainable and circular ingredients for global aquafeeds. Reviews in Aquaculture. 14(3), 1572-1596.
- [4] Knudsen, D., Jutfelt, F., Sundh, H., Sundell, K., Koppe, W., Frøkiær, H., 2008. Dietary soya saponins increase gut permeability and play a key role in the onset of soyabean-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). British Journal of Nutrition. 100(1), 120-129.

- [5] Øverland, M., Karlsson, A., Mydland, L.T., Romarheim, O.H., Skrede, A., 2013. Evaluation of *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts as protein sources in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*. 402, 1-7.
- [6] Vidakovic, A., Langeland, M., Sundh, H., Sundell, K., Olstorpe, M., Vielma, J., Kiessling, A., Lundh, T., 2016. Evaluation of growth performance and intestinal barrier function in Arctic Charr (*Salvelinus alpinus*) fed yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), fungi (*Rhizopus oryzae*) and blue mussel (*Mytilus edulis*). *Aquaculture nutrition*. 22(6), 1348-1360.
- [7] Langeland, M., Vidakovic, A., Vielma, J., Lindberg, J.E., Kiessling, A., Lundh, T., 2016. Digestibility of microbial and mussel meal for Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) and Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquaculture nutrition*. 22(2), 485-495.
- [8] Marchi, A., Bonaldo, A., Scicchitano, D., Candela, M., De Marco, A., Falciglia, S., Mazzoni, M., Lattanzio, G., Clavenzani, P., Dondi, F., Gatta, P.P., 2023. Feeding gilthead sea bream with increasing dietary bacterial single cell protein level: Implication on growth, plasma biochemistry, gut histology, and gut microbiota. *Aquaculture*. 565, 739132.
- [9] Sharif, M., Zafar, M.H., Aqib, A.I., Saeed, M., Farag, M.R., Alagawany, M., 2021. Single cell protein: Sources, mechanism of production, nutritional value and its uses in aquaculture nutrition. *Aquaculture*. 531, 735885.
- [10] Aruna, T.E., Aworh, O.C., Raji, A.O., Olagunju, A.I., 2017. Protein enrichment of yam peels by fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* (BY4743). *Annals of Agricultural Sciences*. 62(1), 33-37.
- [11] Jones, S.W., Karpol, A., Friedman, S., Maru, B.T., Tracy, B.P., 2020. Recent advances in single cell protein use as a feed ingredient in aquaculture. *Current opinion in biotechnology*. 61, 189-197.
- [12] Delamare-Deboutteville, J., Batstone, D.J., Kawasaki, M., Stegman, S., Salini, M., Tabrett, S., Smullen, R., Barnes, A.C., Hülsen, T., 2019. Mixed culture purple phototrophic bacteria is an effective fishmeal replacement in aquaculture. *Water research* X. 4, 100031.
- [13] Guo, J., Qiu, X., Salze, G., Davis, D.A., 2019. Use of high-protein brewer's yeast products in practical diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*. 25(3), 680-690.
- [14] Aas, T.S., Grisdale-Helland, B., Terjesen, B.F., Helland, S.J., 2006. Improved growth and nutrient utilisation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing a bacterial protein meal. *Aquaculture*. 259(1-4), 365-376.
- [15] Hardy, R.W., Patro, B., Pujol-Baxley, C., Marx, C.J., Feinberg, L., 2018. Partial replacement of soybean meal with *Methylobacterium extorquens* single-cell protein in feeds for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research*. 49(6), 2218-2224.
- [16] Smáráson, B.Ö., Alriksson, B., Jóhannsson, R., 2019. Safe and sustainable protein sources from the forest industry—The case of fish feed. *Trends in Food Science & Technology*. 84, 2-14.
- [17] Biswas, A., Takakuwa, F., Yamada, S., Matsuda, A., Saville, R.M., LeBlanc, A., Silverman, J.A., Sato, N., Tanaka, H., 2020. Methanotroph (*Methylococcus capsulatus*, Bath) bacteria meal as an alternative protein source for Japanese yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture*. 529, 735700.
- [18] Adeoye, A.A., Akegbejo-Samsons, Y., Fawole, F.J., Olatunji, P.O., Muller, N., Wan, A.H., Davies, S.J., 2021. From waste to feed: Dietary utilisation of bacterial protein from fermentation of agricultural wastes in African catfish (*Clarias gariepinus*) production and health. *Aquaculture*. 531, 735850.
- [19] Rumsey, G.L., Winfree, R.A. and Hughes, S.G., 1992. Nutritional value of dietary nucleic acids and purine bases to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 108(1-2), 97-110.
- [20] Trejo-Escamilla, I., Galaviz, M.A., Flores-Ibarra, M., Alvarez Gonzalez, C.A., López, L.M., 2017. Replacement of fishmeal by soya protein concentrate in the diets of *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890) juveniles: effect on the growth performance, in vitro digestibility, digestive enzymes and the haematological and biochemistry parameters. *Aquaculture Research*. 48(8), 4038-4057.
- [21] Iranian fisheries organization, 2021. Statistical year book. Tehran, 29 p.
- [22] NRC (National Research Council), 2011. Nutrient Requirements of Fish. National Academy Press, Washington DC, USA.
- [23] Zamani, A., Hajimoradloo, A., Madani, R., Johari, A., Kalbasi, M., Farhangi, M., 2006. Comparison of digestive enzyme activity in the stomach, pyloric caeca and intestine in diploid and triploid female of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 15(2), 29-36.
- [24] Hamza, N., Mhetli, M., Khemis, I.B., Cahu, C., Kestemont, P., 2008. Effect of dietary phospholipid levels on performance, enzyme activities and fatty acid composition of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *Aquaculture*. 275(1-4), 274-282.
- [25] AOAC., 2005. Official Method 950.89 Horwitz, W., Latimer, G. (Eds). Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, USA.

- [26] Zamani, A., Khajavi, M., Abedian Kenari, A., Haghbin Nazarpak, M., Solouk, A., Esmaeili, M., Gisbert, E., 2023. Physicochemical and Biochemical Properties of Trypsin-like Enzyme from Two Sturgeon Species. *Animals*. 13(5), 853.
- [27] Walter, H.E., 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer, H.U. Ed. *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. V. Verlag Chemie, Weinheim. 270–277.
- [28] Bernfeld, P. Amylases α and β . In *Methods in Enzymology*; Colowick, P., Kaplan, N.O., Eds.; Academic Press: New York, NY, USA, 1951; Volume 1, pp. 149–157.
- [29] Iijima, N., Tanaka, S., Ota, Y., 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiology and Biochemistry*. 18, 59-69.
- [30] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193, 265–275.
- [31] Gamboa-Delgado, J., Márquez-Reyes, J.M., 2018. Potential of microbial-derived nutrients for aquaculture development. *Reviews in Aquaculture*. 10(1), 224-246.
- [32] Hossain, M.S., Koshio, S., Kestemont, P., 2020. Recent advances of nucleotide nutrition research in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*. 12(2), 1028-1053.
- [33] Storebakken, T., Baeverfjord, G., Skrede, A., Olli, J.J., Berge, G.M., 2004. Bacterial protein grown on natural gas in diets for Atlantic salmon, *Salmo salar*, in freshwater. *Aquaculture*. 241(1-4), 413-425.
- [34] Aas, T.S., Hatlen, B., Grisdale-Helland, B., Terjesen, B.F., Penn, M., Bakke-McKellep, A.M., Helland, S.J., 2007. Feed intake, growth and nutrient utilization in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed diets containing a bacterial protein meal. *Aquaculture Research*. 38(4), 351-360.
- [35] Rhodes, M.A., Zhou, Y., Davis, D.A., 2015. Use of dried fermented biomass as a fish meal replacement in practical diets of Florida pompano, *Trachinotus carolinus*. *Journal of Applied Aquaculture*. 27(1), 29-39.
- [36] Wei, H., Yu, H., Chen, X., Chao, W., Zou, F., Chen, P., Zheng, Y., Wu, X., Liang, X., Xue, M., 2018. Effects of soybean meal replaced by *Clostridium autoethanogenum* protein on growth performance, plasma biochemical indexes and hepatopancreas and intestinal histopathology of grass carp (*Ctenopharyngodon idyllus*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*. 30(10), 4190-4201.
- [37] Chen, Y., Sagada, G., Xu, B., Chao, W., Zou, F., Ng, W.K., Sun, Y., Wang, L., Zhong, Z., Shao, Q., 2020. Partial replacement of fishmeal with *Clostridium autoethanogenum* single-cell protein in the diet for juvenile black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*). *Aquaculture Research*. 51(3), 1000-1011.
- [38] Yang, P., Li, X., Song, B., He, M., Wu, C., Leng, X., 2023. The potential of *Clostridium autoethanogenum*, a new single cell protein, in substituting fish meal in the diet of largemouth bass (*Micropterus salmoides*): Growth, feed utilization and intestinal histology. *Aquaculture and Fisheries*. 8(1), 67-75.
- [39] Pluske, J.R., Thompson, M.J., Atwood, C.S., Bird, P.H., Williams, I.H., Hartmann, P.E., 1996. Maintenance of villus height and crypt depth, and enhancement of disaccharide digestion and monosaccharide absorption, in piglets fed on cows' whole milk after weaning. *British Journal of Nutrition*. 76(3), 409-422.
- [40] Hassaan, M.S., El-Sayed, A.M.I., Mohammady, E.Y., Zaki, M.A., Elkhyat, M.M., Jarmolowicz, S., El-Haroun, E.R., 2021. Eubiotic effect of a dietary potassium diformate (KDF) and probiotic (*Lactobacillus acidophilus*) on growth, hemato-biochemical indices, antioxidant status and intestinal functional topography of cultured Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed diet free fishmeal. *Aquaculture*. 533, 736147.
- [41] Huan, D., Li, X., Chowdhury, M.A.K., Yang, H., Liang, G., Leng, X., 2018. Organic acid salts, protease and their combination in fish meal-free diets improved growth, nutrient retention and digestibility of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *Aquaculture Nutrition*. 24(6), 1813-1821.
- [42] Bolasina, S., Pérez, A., Yamashita, Y., 2006. Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. 252(2-4), 503-515.
- [43] Navarro-Guillen, C., Yufera, M., Perera, E., 2022. Biochemical features and modulation of digestive enzymes by environmental temperature in the greater amberjack, *Seriola dumerili*. *Frontiers in Marine Science*. 9, 960746.
- [44] Nyman, A., 2016. Single cell protein in fish feed: effects on gut microbiota. Licentiate Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

The evaluation of bacterial single cell protein on performance, digestive enzymes activity, gut histology and gut microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry

Abbas Zamani ^{1*}, Saeed Khalaji ²

1- Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Environment, Malayer University, Malayer, Iran.

2- Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Science, Malayer University, Malayer, Iran.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate fish meal replacement by a bacterial single cell protein (IPL68) on growth performance, digestive enzymes activity (protease, lipase and α -amylase), gut histology and gut microbiota in rainbow trout fry (initial weight = 2.51 ± 0.55 g) for 6 weeks. Five diets were formulated with different bacterial SCP level (0: D1, 25: D2, 50: D3, 75: D4 and 100: D5%) to replace fishmeal protein. At the end of the trial, body weight gain, specific growth rate, condition factor and hepatosomatic index showed the higher values than other diets with a significant difference ($P < 0.05$). The food conversion ratio had the lowest and highest values in D3 and D5 diets, respectively, with a significant difference ($P < 0.05$). The survival rate in all experimental diets was 100%. The highest activity of protease, lipase and α -amylase enzymes was observed in the intestines of fish fed with D3 diet, which showed a significant difference compared to D4 and D5 diets ($P < 0.05$). The highest number of total bacteria and lactic acid bacteria was observed in diet D3, which was significantly different from other diets ($P < 0.05$). The highest villus height (μm) and the ratio of villus height to crypt depth was observed in fish fed with D3 diet, which was not significantly different from D1, D2 and D4 diets, but showed a significant difference with D5 diet ($P < 0.05$). Based on the obtained results, D3 diet can be suitable for the growth of rainbow trout fry compared to other diets.

KEYWORDS: Enzyme, Lactic acid bacteria, Single cell protein, Fishmeal

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received: 12 oct 2023

Accepted: 4 Feb 2024

ePublished: 20 Feb
2024

* Corresponding Author:

Email address: a.zamani@malayeru.ac.ir

Tel: 08132355330

© Published by Tarbiat Modares University

ISSN: 2322-5513