

## اثر افزودن کنجاله پنبه دانه به همراه مخمر (*Saccharomyces cerevisiae* PTCC5052) و مخمر غنی شده با آهن به جیره غذایی ماهی قزل آلاي رنگين کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بر توجیه اقتصادی تولید، خصوصیات بیوشیمیایی خون، فلور میکروبی و وضعیت هیستوپاتولوژیک روده

سید مرتضی حسینی<sup>\*</sup>، اسمعیل پقه<sup>۱</sup>، بهروز قره وی<sup>۱</sup>، ملیکا قلیچ پور<sup>۱</sup>

۱- بخش بازسازی ذخایر آبزیان، مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

### چکیده

هدف از این مطالعه ارزیابی اثر افزودن کنجاله پنبه دانه همراه با مخمر *Saccharomyces cerevisiae* سویه PTCC5052 -به شکل غنی شده با آهن یا غنی نشده- بر توجیه اقتصادی تولید، خصوصیات بیوشیمیایی خون، فلور میکروبی و وضعیت هیستوپاتولوژیک روده در قزل آلاي رنگين کمان جوان بود. ماهی ها با وزن حدود ۳۱ گرم در ۱۶ تانک در قالب چهار تیمار و چهار تکرار توزیع شدند. یک جیره شاهد بدون کنجاله پنبه دانه، یک جیره حاوی ۱۵ درصد کنجاله پنبه دانه و دو جیره حاوی ۱۵ درصد کنجاله پنبه دانه به همراه  $1 \times 10^8$  cfu/g مخمر یا مخمر غنی شده با آهن به مدت ۸ هفته در اختیار ماهی ها قرار گرفتند. نتایج نشان داد اختلاف معنی داری در راندمان تولید ماهی، شاخص های بیوشیمیایی پلاسما و وضعیت هیستوپاتولوژیک روده بین تیمارها وجود نداشت. قیمت تمام شده خوراک به ازای تولید ماهی در تیمارهای حاوی کنجاله پنبه دانه نسبت به تیمار شاهد به طور معنی داری کاهش یافت و پایین ترین قیمت مربوط به تیمار بدون مخمر بود. اختلاف معنی داری در فراوانی میکروبی بین تیمار شاهد و کنجاله پنبه دانه مشاهده نشد ولی افزودن مخمر یا مخمر غنی شده به جیره باعث افزایش تراکم جنس *Saccharomyces*، کاهش تراکم جنس *Aeromonas* و *Vibrio* و کاهش تراکم گونه *Yersinia ruckeri* در روده ماهی شد. نتایج این تحقیق نشان می دهد که افزودن ۱۵ درصد کنجاله پنبه دانه به جیره غذایی ماهی قزل آلاي رنگين کمان می تواند توجیه اقتصادی تولید ماهی را افزایش دهد و افزودن مخمر به این جیره باعث بهبود فلور میکروبی روده ماهی می شود.

**کلید واژه ها:** کنجاله پنبه دانه، رشد، فلور میکروبی روده، خون، هیستوپاتولوژی

### مقدمه

آبزی پروری نقش مهمی در اشتغالزایی و امنیت غذایی کشور دارد. ماهی قزل آلا با بیش از ۲۰۸ هزار تن تولید سالانه در کشور (سالنامه آماری شیلات کشور، ۱۴۰۳)، سهم بالایی در تولیدات آبزی پروری کشور دارد. یکی از چالش های پرورش قزل آلا در کشور، جیره غذایی آن است. جیره غذایی بخش عمده هزینه تولید قزل آلا را شامل می شود، بنابراین وجود جیره های غذایی با کارایی بالا، یکی از عوامل تضمین کننده پایداری این صنعت خواهد بود. در سال های اخیر به دلیل رشد تولیدات آبزی پروری در کشور، تامین نهاده های تولید غذای آبزیان با چالش های متعددی روبرو بوده است. یکی از محصولات داخلی که می تواند در جیره غذایی آبزیان استفاده شود، کنجاله پنبه دانه است. تولید سالانه پنبه دانه در کشور حدود ۱۳۰ هزار تن می باشد (اخبار وزارت جهاد، لینک خبر <https://tn.ai/2833175>). در حال حاضر بخش زیادی از این محصول به صورت خام مورد استفاده در پرورش دام سنگین قرار می گیرد. با این حال، بخشی از این محصول برای روغن کشی استفاده می شود و سهم آن رو به افزایش است. کنجاله پنبه دانه بسته به نوع فرآیند روغن کشی می تواند بین ۳۰-۴۵ درصد پروتئین داشته باشد<sup>[۱]</sup>. در حال حاضر بخش عمده کنجاله پنبه دانه کشور به روش استخراج با حلال روغن کشی می شود و کنجاله حاصل از آن دارای پوسته بوده و حدود ۲۵ درصد پروتئین و ۳۰

### نوع مقاله

#### مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۱۰

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۳/۱۲/۱۵

\*نویسنده مسئول:

Seyyedmorteza.hoseini@gmail.com

درصد فیبر دارد و به قیمت ۱۹۰ هزار ریال به فروش می‌رسد. ولی استخراج روغن کنجاله پنبه دانه به روش پرس کردن باعث کاهش قابل توجه مقدار فیبر و افزایش پروتئین آن خواهد شد، زیرا دانه ها قبل از پرس باید پوسته‌گیری شوند. به این ترتیب کاهش فیبر کنجاله به ۵ درصد باعث افزایش پروتئین آن تا بالای ۳۵ درصد می‌شود که مناسب استفاده در جیره ماهی خواهد شد. با این کار قیمت هر کیلوگرم کنجاله پنبه دانه به ۲۵۰ هزار ریال خواهد رسید. با توجه به قیمت کنجاله پنبه دانه و دسترسی آن در کشور، استفاده از آن در فرمولاسیون جیره غذایی آبزیان می‌تواند مد نظر قرار گیرد تا سهم کنجاله سویا در جیره غذایی کاهش یابد. با این وجود، کنجاله پنبه دانه محدودیت‌هایی برای استفاده در جیره آبزیان دارد. یکی از این موارد، وجود گوسیپول در کنجاله پنبه دانه است. گوسیپول برای جانوران تک معده‌ای مسمومیت‌زا است و استفاده از مقدار زیاد کنجاله پنبه دانه در جیره آبزیان منجر به افزایش مقدار گوسیپول آزاد جیره و کاهش رشد می‌شود [۳، ۴]. روش‌های مختلفی برای خنثی سازی گوسیپول کنجاله پنبه دانه ارائه شده است که می‌توان به استفاده از تخمیر میکروبی و افزودن آهن به جیره غذایی اشاره نمود.

*Saccharomyces cerevisiae* یک مخمر پرکاربرد در آبی‌پروری است [۴]. مطالعات زیادی نشان داده‌اند که این مخمر به صورت سلول کامل، عصاره مخمری و یا تنها دیواره سلولی آن که حاوی مقادیر زیادی پریبیوتیک است (مانان الیگوساکارید و بتا گلوکان)، می‌تواند منجر به افزایش رشد، ایمنی و مقاومت در برابر بیماری در ماهی‌های مختلف شود [۵-۹]. همچنین، مشخص شده است که این مخمر می‌تواند گوسیپول کنجاله پنبه دانه را در شرایط تخمیر برون تنی تا ۸۷۰ درصد خنثی نماید [۱۰]. مطالعات نشان داده‌اند که فعالیت‌های تخمیری در روده ماهی‌ها از جمله قزل آلا رنگین کمان وجود دارند [۱۱، ۱۲]. لذا می‌توان مخمر را به عنوان عامل تخمیر به جیره غذایی ماهی اضافه نمود تا علاوه بر مزایای ذکر شده در بالا، ضمن تخمیر کنجاله در روده ماهی، میزان گوسیپول را نیز کاهش دهد.

مطالعات انجام شده در ماهی‌های مختلف نشان داده است که افزودن نمک‌های آهن به جیره غذایی حاوی گوسیپول باعث تجمع گوسیپول در اندام‌های بدن شده و اثرات منفی آن را کاهش می‌دهند [۱۳-۱۶]. مکمل‌های معدنی جیره زمانی که به صورت نمک‌های محلول در آب به جیره اضافه می‌شوند، قابلیت جذب بالایی در ماهی دارند ولی مشکل استفاده از آنها بالا بودن نرخ آبشویی آنهاست که ضمن کاهش اثر بخشی، باعث آلودگی آب می‌شوند. در عوض نمک‌های نامحلول، نرخ جذب بالایی ندارند ولی آبشستگی آنها کم است. به همین دلیل باید چند برابر مقدار مورد نیاز از این نمک‌ها به جیره اضافه نمود تا میزان مقدار مورد نیاز روزانه خود را دریافت نماید که اینکار باعث افزایش دفع نمک به صورت مدفوع و آلودگی آب می‌شود [۱۷]. یکی از راه‌های افزایش جذب مواد معدنی و کاهش دفع آنها، استفاده از شکل آلی آنهاست [۱۸]. به این منظور این نمک‌ها به محیط کشت میکروب‌های خاص اضافه می‌شوند که پس از جذب توسط آنها، با اسیدهای آمینه مثل متیونین باند می‌شوند و به شکل نمک آلی در می‌آیند که جذب بالایی دارند [۱۷]. استفاده از آهن آلی در جیره غذای گربه ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*) [۱۹، ۲۰]، سوکلا (*Rachycentron canadum*) [20]، و سیم سرطلایی (*Sparus aurata*) [21، 22]، میزان نیاز به آهن جیره را کاهش داده و تا حدودی منجر به بهبود شاخص‌های رشد و ایمنی شده است. تا کنون اثر مخمر غنی شده با آهن بر خنثی سازی گوسیپول جیره غذایی و رشد و سلامت ماهی قزل آلا رنگین کمان بررسی نشده است. لذا هدف از این تحقیق بررسی اثر جایگزینی آرد سویا با آرد پنبه دانه و استفاده از مخمر *S. cerevisiae* بر شاخص‌های اقتصادی تولید، خصوصیات بیوشیمیایی پلاسما، بافت شناسی و ترکیب فلور باکتریایی روده ماهی قزل آلا رنگین کمان بود.

## مواد و روش‌ها

### تولید مخمر و غنی‌سازی با آهن

مخمر *S. cerevisiae* سویه ۵۰۵۲ به صورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران تهیه شد و روی پلیتهای ۱۰ سانتی متری حاوی محیط کشت PDA (محیط کشت سیب زمینی، دکستروز، آگار؛ محصول Q-Lab کانادا) به مدت ۷۲ ساعت و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد کشت داده شد.

به منظور غنی سازی مخمر با آهن، از روش Gaensly, Picheth<sup>[۲۳]</sup> با برخی تغییرات استفاده شد. ابتدا محیط کشت نوترینت براث (محصول شرکت Q-Lab کانادا) تهیه شد و ۵۰۰ میلی لیتر محیط کشت آماده در یک ارلن مایر یک لیتری اتوکلاو شد. سپس مخمر از پلیت‌های PDA به ارلن مایر تلقیح شد. ارلن مایر حاوی محیط کشت براث و مخمر روی شیکر و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت و به مدت ۴۸-۷۲ ساعت سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه شیک شد. زمانیکه کدورت محیط کشت زیاد شد، جذب نوری آن در برابر آب مقطر در طول موج ۶۰۰ نانومتر در اسپکتروفتومتر قرائت شد. زمانیکه جذب نوری بالاتر از ۱/۶۰۰ بود، تکثیر مخمر تمام شده تلقی گردید و مخمر غنی نشده در این مرحله برداشت شد.

پس از پایان تکثیر و رشد مخمر، به منظور غنی سازی مخمر با آهن، ۴۹۷ میلی گرم آهن (به شکل سولفات آهن II) در هر لیتر محیط کشت حاوی مخمر اضافه شد و به مدت ۱۶ ساعت دیگر روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه شیک شد. سپس مخمر غنی شده تولیدی با استفاده از سانتریفیوژ و شستشو با سرم فیزیولوژی استریل جمع آوری شد. محلول رویی سوسپانسیون نیز برای اندازه‌گیری باقی مانده آهن نمونه گیری شد. پس از جمع آوری مخمر غنی شده، ابتدا تعداد سلول در هر میلی لیتر توسط کشت روی پلیت‌های حاوی PDA انجام شد. مقداری از مخمر جمع‌آوری شده (بدون محیط کشت یا سرم فیزیولوژی) نیز در دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد در آن به مدت ۲۴ ساعت خشک شد و سپس ۵۰ میلی گرم از مخمر خشک شده با ۱۰ برابر اسید نیتریک ۶۵ درصد اولتراپور (کیان کاوه، ایران) در لوله‌های شیشه‌ای در پیچ‌دار مخلوط شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد هضم شدند. پس از هضم و خنک شدن لوله‌ها، مقدار ۱ میلی لیتر آب مقطر به لوله اضافه شد و به شدت تکان داده شد. محلول به دست آمده (زرد رنگ) برای اندازه‌گیری آهن استفاده شد. تمام مراحل بالا به غیر از فاز غنی‌سازی، برای مخمر غنی نشده نیز انجام گردید. اندازه گیری آهن در باقی مانده محیط کشت براث و مخمر هضم شده به روش Ferrozine انجام شد<sup>[۲۴]</sup>. بر این اساس، باقیمانده آهن در محیط کشت، مخمر غنی نشده و مخمر غنی شده به ترتیب ۱/۲ میلی گرم در دسی لیتر، ۰/۰۷ میلی گرم در گرم و ۱۸/۹ میلی گرم در گرم ماده خشک بود.

### جیره‌های غذایی

در این تحقیق از ۴ جیره غذایی ساخته شد (جدول ۱). جیره شاهد فاقد کنجاله پنبه دانه و مخمر بود و سه جیره دیگر حاوی ۱۵ درصد کنجاله پنبه دانه بود که با آرد سویا جایگزین شده بود. یکی از جیره‌های حاوی کنجاله پنبه دانه با  $1 \times 10^8$  CFU/g سلول مخمر و جیره دیگر با همین مقدار مخمر غنی شده با آهن غنی‌سازی شدند. این مقدار مخمر در تحقیقات قبلی نتایج مثبتی در ماهی قزل آلا داشته است<sup>[۲۵]</sup>. کنجاله پنبه دانه مورد استفاده در این تحقیق حاوی ۳۳/۲ درصد پروتئین خام، ۲۷/۲ درصد چربی خام، ۱۳/۴ درصد فیبر خام و ۳/۵ درصد خاکستر بود. به منظور افزودن مخمر به جیره های غذایی، ابتدا یک سوسپانسیون از مخمرها در سرم فیزیولوژیک استریل تهیه شد. تراکم سلول در هر سوسپانسیون به روش رقیق‌سازی سریالی تعیین شد و سپس مقدار لازم از هر سوسپانسیون به جیره‌های غذایی اضافه شد تا به تراکم  $1 \times 10^8$  CFU/g سلول مخمر برسند.

جیره های غذایی با استفاده از نرم افزار WUFFDA تنظیم فرموله شدند. به منظور تولید جیره‌های غذایی، ابتدا اقلام جیره با الک یک میلی متری الک شدند تا مواد درشت و زائد از آنها خارج شود. سپس، پودر ماهی، پودر گوشت، آرد گندم، آرد کنجاله سویا و کنجاله پنبه دانه به مقدار لازم توزین شده و در یک تشت با هم مخلوط شدند. در ادامه روغن کلزا و آفتابگردان به میزان مناسب توزین شده و به مخلوط قبلی اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه مخلوط شدند. در انتها نیز سایر مواد جیره توزین شده و در ۳۵۰ میلی لیتر آب حل شده و به یک کیلوگرم مخلوط قبلی اضافه و هم زده شدند. سوسپانسیون مخمرها نیز در این مرحله با آب جایگزین و به مخلوط مواد جیره اضافه شد. خمیر حاصله توسط چرخ گوشت با دای ۳ میلی متر به صورت رشته‌ای درآمد و به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در برابر باد پنکه خشک شد. سپس رشته‌های خشک شده در اندازه‌های مناسب خرد شدند تا پلت‌های غذایی تهیه شوند. پروفایل اسید آمینه (جدول ۲) و پروفایل اسید چرب (جدول ۳) جیره های غذایی پیش از شروع آزمایش تعیین گردید.

آنالیز ترکیب شیمیایی جیره‌های غذایی به روش AOAC [26] انجام شد. به این منظور، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد خشک شدند تا مقدار رطوبت به دست آید. برای اندازه‌گیری پروتئین نمونه‌ها از روش کلدال و محاسبه مقدار نیتروژن استفاده شد. مقدار نیتروژن به دست آمده در ضریب ۶/۲۵ ضرب شد تا مقدار پروتئین محاسبه شود. مقدار چربی جیره با استفاده از روش استخراج اتری و دستگاه سوکسله تعیین شد. در این روش از پترولیوم اتر به عنوان حلال استفاده شد. برای تعیین خاکستر، نمونه‌ها به مدت ۸ ساعت در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد سوزانده شدند.

جدول ۱: فرمولاسیون، ترکیب شیمیایی (درصد) و قیمت تمام شده جیره های غذایی.

| اقلام غذایی                     | قیمت هر کیلوگرم | شاهد   | پنبه دانه | مخمر   | مخمر غنی شده |
|---------------------------------|-----------------|--------|-----------|--------|--------------|
| آرد گندم                        | ۱۸۰۰۰۰          | ۲۳/۴   | ۲۳/۵      | ۲۳/۵   | ۲۳/۵         |
| آرد کنجاله سویا                 | ۲۵۰۰۰۰          | ۲۵     | ۱۲        | ۱۲     | ۱۲           |
| پودر ماهی کیلکا                 | ۸۰۰۰۰۰          | ۱۶/۴   | ۱۷/۳      | ۱۷/۳   | ۱۷/۳         |
| آرد کنجاله پنبه دانه            | ۲۵۰۰۰۰          | ۰      | ۱۵        | ۱۵     | ۱۵           |
| پودر گوشت کشتارگاه طیور         | ۲۰۰۰۰۰          | ۲۵     | ۲۵        | ۲۵     | ۲۵           |
| روغن کلزا                       | ۱۸۰۰۰۰۰         | ۵/۵    | ۳/۵       | ۳/۵    | ۳/۵          |
| روغن آفتابگردان                 | ۱۸۰۰۰۰۰         | ۲/۸    | ۱/۷       | ۱/۷    | ۱/۷          |
| مکمل معدنی                      | ۱۰۰۰۰۰۰         | ۱      | ۱         | ۱      | ۱            |
| مکمل ویتامینی                   | ۱۰۰۰۰۰۰         | ۰/۵    | ۰/۵       | ۰/۵    | ۰/۵          |
| متیونین                         | ۱۷۹۰۰۰۰         | ۰/۲۵   | ۰/۲۵      | ۰/۲۵   | ۰/۲۵         |
| لیزین                           | ۹۱۰۰۰۰          | ۰/۱۵   | ۰/۲۵      | ۰/۲۵   | ۰/۲۵         |
| ترکیب شیمیایی                   |                 |        |           |        |              |
| رطوبت                           |                 | ۹/۵    | ۹/۸       | ۹/۲    | ۹/۴          |
| پروتئین خام                     |                 | ۴۱/۴   | ۴۱/۷      | ۴۱/۶   | ۴۱/۴         |
| چربی خام                        |                 | ۱۷     | ۱۷/۹      | ۱۷/۵   | ۱۷/۲         |
| خاکستر                          |                 | ۷/۷    | ۷/۰       | ۷/۲    | ۷/۵          |
| فیبر خام                        |                 | ۳/۲۰   | ۴/۰۰      | ۴/۲۱   | ۴/۰۵         |
| فسفر کل                         |                 | ۰/۶۶   | ۰/۷۲      | ۰/۷۵   | ۰/۷          |
| گوسیپول کل (میلی گرم/کیلوگرم)   |                 | -      | ۱۶۶۰      | ۱۷۱۰   | ۱۶۰۰         |
| گوسیپول آزاد (میلی گرم/کیلوگرم) |                 | -      | ۱۲۱       | ۱۱۲    | ۱۳۰          |
| آهن (میلی گرم/کیلوگرم)          |                 | ۱۵۲    | ۱۵۳       | ۱۴۸    | ۱۵۱          |
| قیمت تمام شده (ریال)            |                 | ۴۹۳۵۶۰ | ۴۳۱۵۵۰    | ۴۳۱۵۵۰ | ۴۳۱۵۵۰       |

برای تعیین پروفیل اسید آمینه از دستگاه HPLC مجهز به دتکتور فلوروسنت (مدل Agilent 1090 system, Palo Alto, CA, USA) استفاده شد. به این منظور ابتدا نمونه به مدت ۲۴ ساعت توسط اسید هیدروکلریک ۶ نرمال در دمای ۱۱۵ درجه سانتی‌گراد هضم گردید. سپس محلول حاصل توسط فیلتر سرسرنگی صاف شده و مراحل پروتئین‌زدایی (توسط تری کلرواستیک اسید) و مشتق سازی (توسط OPA) انجام گردید. مقدار هر اسید آمینه با توجه به پیک استاندارد آن و زمان عبور از ستون (C18) تعیین گردید [۲۷].

پروفیل اسیدهای چرب جیره‌های غذایی با استفاده از دستگاه GC-MS انجام شد. استخراج چربی با استفاده از مخلوط اتر-کلر فورم انجام شد. پس از متیلاسیون اسیدهای چرب، نمونه به دستگاه تزریق و مقدار هر یک از اسیدهای چرب بر اساس گراف استاندارد محاسبه شد [۲۸].

جدول ۲: پروفیل اسیدهای آمینه (درصد جیره) جیره‌های غذایی

| اسیدهای آمینه | شاهد | پنبه دانه | مخمر | مخمر غنی شده |
|---------------|------|-----------|------|--------------|
| آرژنین        | ۲/۸  | ۲/۹       | ۲/۸  | ۲/۷          |
| گلیسین        | ۲/۸  | ۲/۸       | ۲/۹  | ۲/۸          |
| سرین          | ۲/۱  | ۲         | ۲    | ۲/۲          |
| هیستیدین      | ۱    | ۱         | ۱/۱  | ۱/۱          |
| ایزولوسین     | ۱/۶  | ۱/۵       | ۱/۶  | ۱/۴          |
| لوسین         | ۲/۴  | ۲/۲       | ۲/۴  | ۲/۳          |
| لیزین         | ۲/۵  | ۲/۵       | ۲/۶  | ۲/۵          |
| متیونین       | ۱    | ۱         | ۱/۱  | ۱            |
| سیستئین       | ۰/۵۲ | ۰/۷۶      | ۰/۶۲ | ۰/۷۱         |
| فنیل آلانین   | ۱/۷  | ۱/۷       | ۱/۸  | ۱/۷          |
| تیروزین       | ۱/۱  | ۰/۹۴      | ۰/۹  | ۱            |
| ترئونین       | ۱/۵  | ۱/۴       | ۱/۴  | ۱/۵          |
| تریپتوفان     | ۰/۴۸ | ۰/۴۶      | ۰/۴۵ | ۰/۴۸         |
| والین         | ۱/۹  | ۱/۹       | ۲    | ۱/۹          |

جدول ۳: پروفیل اسیدهای چرب (درصد از روغن جیره) جیره‌های غذایی

| اسیدهای چرب                    | شاهد | پنبه دانه | مخمر | مخمر غنی شده |
|--------------------------------|------|-----------|------|--------------|
| C14:0                          | ۰/۶۷ | ۰/۸۶      | ۰/۸  | ۰/۷۷         |
| C14:1n5                        | ۰/۱۲ | ۰/۰۷      | ۰/۰۵ | ۰/۰۸         |
| C16:0                          | ۱۹/۹ | ۲۱/۲      | ۲۲   | ۲۱           |
| C16:1n7                        | ۲/۵  | ۲/۴       | ۲/۶  | ۲/۳          |
| C18:0                          | ۶/۸  | ۵/۹       | ۶    | ۵/۷          |
| C18:1n9                        | ۳۴   | ۳۱        | ۳۰/۳ | ۳۱/۳         |
| C18:1n7                        | ۱/۵  | ۰         | ۰    | ۰            |
| C18:2n6cis                     | ۲۶/۷ | ۳۲        | ۳۲/۳ | ۳۱/۵         |
| C18:3n3                        | ۲/۴  | ۱/۶       | ۱/۸  | ۱/۷          |
| C20:0                          | ۰/۴۸ | ۰/۴۲      | ۰/۳۸ | ۰/۴۱         |
| C20:1n9                        | ۰/۷۷ | ۰/۵۶      | ۰/۶۰ | ۰/۵۴         |
| C20:2n6                        | ۰/۱۶ | ۰/۱۱      | ۰/۱۳ | ۰/۱۴         |
| C20:4n6                        | ۰/۴۹ | ۰/۴۲      | ۰/۳۸ | ۰/۴۵         |
| C20:3n3                        | ۰    | ۰/۰۴      | ۰/۰۶ | ۰/۰۳         |
| C20:5n3                        | ۰/۶۵ | ۰/۶۳      | ۰/۶۵ | ۰/۶۲         |
| C22:0                          | ۰/۳۳ | ۰/۲۴      | ۰/۲۲ | ۰/۲۱         |
| C22:1n9                        | ۰/۳۱ | ۰/۰۹      | ۰/۱۰ | ۰/۰۸         |
| C22:6n3                        | ۲/۴  | ۲/۳       | ۲/۴  | ۲/۵          |
| C24:0                          | ۰/۵۰ | ۰/۲۱      | ۰/۲۳ | ۰/۲۰         |
| C24:1n9                        | ۰    | ۰         | ۰    | ۰            |
| مجموع اشباع                    | ۲۶/۷ | ۲۸/۸      | ۲۹/۶ | ۲۸/۳         |
| مجموع تک غیر اشباع             | ۳۹/۲ | ۳۴/۱      | ۳۳/۷ | ۳۴/۳         |
| مجموع n-6                      | ۲۷/۴ | ۳۲/۵      | ۳۲/۸ | ۳۲/۱         |
| مجموع n-3                      | ۵/۵  | ۴/۶       | ۴/۹  | ۴/۹          |
| نسبت اشباع:غیر اشباع چندانگانه | ۰/۸۲ | ۰/۷۸      | ۰/۷۹ | ۰/۷۶         |

### پرورش ماهی و نمونه برداری

بچه ماهی قزل آلاي رنگين کمان از یک مزرعه بخش خصوصی در شهرستان ساری تهیه شد که میانگین وزنی آن حدود ۲۰ گرم بود. تعداد ۳۰۰ قطعه ماهی به ایستگاه تحقیقات شیلاتی قره سو واقع در شهرستان بندر ترکمن منتقل شد. ماهی ها ابتدا به مدت یک هفته در یک مخزن ۲۰۰۰ لیتری ذخیره سازی شدند و جیره غذایی شاهد دریافت نمودند تا با شرایط جدید سازگار شوند. سپس تعداد ۲۴۰ قطعه ماهی سالم و هم اندازه در ۱۶ مخزن پلاستیکی ۳۰۰ لیتری (حاوی ۱۲۰ لیتر آب) توزیع شدند. در هر مخزن تعداد ۱۵ قطعه بچه ماهی قزل آلاي رنگين کمان با میانگین وزن حدود ۳۱ گرم ذخیره سازی شد. مخازن به سیستم آبدهی از چاه ایستگاه متصل بوده و نرخ جریان آب در خلال دوره ۱ لیتر در دقیقه بود. کلیه مخازن توسط پمپ مرکز هوادهی شدند و سیفون مواد زائد کف مخازن به صورت روزانه و نظافت سطوح داخلی مخازن هفته ای دو بار انجام شد. ماهی ها به مدت ۸ هفته با جیره های غذایی مختلف تغذیه شدند و نرخ غذادهی روزانه ۳-۴ درصد بود که در دو وعده در اختیار ماهی ها قرار می گرفت. در طول دوره، دما ( $13/3 \pm 2/35$  درجه سانتی گراد)، اکسیژن محلول ( $8/57 \pm 1/00$  میلی گرم در لیتر)، pH ( $8/00 \pm 0/04$ )، آمونیاک غیر یونیزه ( $0/01 \pm 0/001$  میلی گرم در لیتر) و آهن ( $94/5 \pm 4/21$  میکروگرم در لیتر) آب با استفاده از دستگاه Hach (HQ40D, Palintest (Model 7100, Palintest House, Kingsway, Team Valley, Loveland, Colorado, USA و Gateshead, Tyne & Wear, NE11 0NS, United Kingdom) اندازه گیری شدند.

در انتهای دوره پرورش سه ماهی از هر مخزن صید و در محلول میخک بیهوش شدند. خونگیری با سرنگ هیپارینه از قسمت پشت باله مخرجی انجام شد. پلاسماي خون توسط سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد جدا و تا زمان آزمایشات بعدی در فریزر نگهداری شد. پس از خونگیری، ماهی ها با ضربه به سر و قطع نخاع آسان کشی شدند. سپس حفره شکمی ماهی ها باز شد و نمونه ای از انتهای روده ماهی برای بررسی میکروب های روده جدا و در نیتروژن مایع منجمد شد. همچنین، تکه ای از روده میانی جدا شد و در فرمالین ۱۰ درصد فیکس و برای تهیه مقاطع بافتی استفاده گردید.

### ارزیابی اقتصادی عملکرد جیره های غذایی

برای ارزیابی عملکرد اقتصادی جیره های غذایی از شاخص های تولید ماهی در واحد حجم آب و هزینه تمام شده خوراک استفاده شد:

$$\text{تولید ماهی در واحد حجم} = (\text{کیلوگرم در متر مکعب}) = \text{بیومس نهایی} \div \text{حجم آب آکواریوم}$$

$$\text{هزینه تمام شده خوراک} = (\text{ریال به ازای هر کیلوگرم ماهی تولید شده}) = (\text{قیمت تمام شده جیره} \times \text{ضریب تبدیل غذایی جیره}) \div \text{بیومس تولید شده}$$

### ارزیابی شاخص های بیوشیمیایی پلاسما

اندازه گیری کورتیزول،  $T_3$  و  $T_4$  پلاسما به روش الایزا انجام شد. به این منظور از کیت تجاری شرکت مونوبایند (آمریکا) برای اندازه گیری کورتیزول و کیت های شرکت پیشتاز طب (ایران) برای اندازه گیری هورمون های تیروئیدی در دستگاه میکروپلیت ریدر (DANA 3200, Iran) استفاده شد [۲۹]. اندازه گیری گلوکز، تری گلیسیرید و کلسترول در نمونه های پلاسما با استفاده از کیت های شرکت زیست شیمی (ایران) و دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد.

### تهیه مقاطع بافتی روده

جهت انجام مراحل آبدگیری و پارافینه کردن نمونه های فیکس شده روده، از دستگاه تیشوپروسور استفاده شد و نهایتاً نمونه ها در بلوک های پارافینی قرار گرفتند. سپس با استفاده از دستگاه میکروتوم، برش هایی با ضخامت ۵ میکرون تهیه و پس از قرار گرفتن روی لام، با استفاده از رنگ اتوزین-هماتوکسیلین رنگ آمیزی شدند. از هر نمونه تعداد ۲ مقطع با فواصل ۲۰۰ میکرون تهیه گردید. در نهایت مقاطع بافتی تهیه شده جهت ارزیابی تغییرات بافتی در روده استفاده شدند [۳۰].

### فراوانی جمعیت میکروبی روده

به منظور آماده‌سازی نمونه‌های روده منجمد شده، ابتدا ۵۰۰ میکرولیتر بافر (۱۰۰ میلی‌مول NaCl، ۵۰ میلی‌مول Tris-HCl، ۱۰۰ میلی‌مول EDTA)، ۵۰ میکرولیتر SDS ۱۰ درصد، ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K و ۱۰ میکرولیتر لیزوزیم به هر نمونه اضافه و در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انکوبه شد. سپس گلس بید به نمونه‌ها اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه شیک شدند. نمونه‌های هضم شده برای استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم و با استفاده از کیت شستشو تجاری (شرکت GeneAll، سئول، کره) استفاده شدند. کیفیت DNA استخراج شده توسط نانودراپ و ژل آگارز تایید شد.

جدول ۴: لیست پرایمرهای استفاده شده برای تشخیص باکتری‌ها و مخمر

| منبع | محصول (bp) | توالی پرایمر           | گروه میکروبی هدف           |
|------|------------|------------------------|----------------------------|
| [31] | ۲۳۳        | TGGAACAGRTGCTAATACCG   | <i>Lactobacillus</i> sp.   |
|      |            | GTCCATTGTGGAAGATTCCC   |                            |
| [32] | ۱۸۳        | TCTGGACATCGCTCTGG      | <i>Yersinia ruckeri</i>    |
|      |            | AGTTTTTTTTGCGTAGATAGGA |                            |
| [33] | ۱۶۷        | ACACAGGTGAGCACGCTAAA   | <i>Streptococcus iniae</i> |
|      |            | CGTCACCATCGTCTTGGTCA   |                            |
| [34] | ۱۱۴        | GGCGTAAAGCGCATGCAGGT   | <i>Vibrio</i> sp.          |
|      |            | GAAATTCTACCCCCCTCTACAG |                            |
| [35] | ۲۳۰        | GAGAAGGTGACCACCAAGAACA | <i>Aeromonas</i> sp.       |
|      |            | CTGACATCGGCCTTGAATCTC  |                            |
| [36] | ۲۶۰        | GTGAAATTTGTTGAAAGGGAA  | <i>Saccharomyces</i> sp.   |
|      |            | GACTCCTTGGTCCGTGTT     |                            |
| [37] | ۲۰۰        | ACTCCTACGGGAGGCAGCAG   | All bacteria               |
|      |            | ATTACCGCGGCTGCTGG      |                            |

برای تعیین کمی جمعیت مخمر و باکتری‌ها، از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۴) و روش rt-PCR استفاده شد. ۱۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده در ۲۵ میکرولیتر محیط واکنش PCR (حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر RealQ Plus 2x Master Mix Green و ۰/۲۵ میکرومول از هر پرایمر مخلوط شد. چرخه حرارتی واکنش PCR شامل ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۴۰ چرخه (شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد) بود [۳۸]. مقادیر Ct هر نمونه برای کمی‌سازی نسبی باکتری‌های هدف بر اساس نرمال‌سازی نسبت به نمونه شاهد و ژن مرجع (universal 16s primer) و فرمول  $\Delta\Delta Ct^{-2}$  استفاده شد [۳۹].

### تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون Shapiro-Wilk تایید شد. سپس اثر معنی‌دار تیمارهای آزمایشی بر شاخص‌های اقتصادی تولید ماهی، شاخص‌های بیوشیمیایی پلاسما، فراوانی جنس *Saccharomyces* sp.، *Vibrio* sp. و *Lactobacillus* sp. و فراوانی گونه *Streptococcus iniae* در روده با استفاده از آزمون One-way ANOVA و Duncan بررسی شد. فراوانی جنس *Aeromonas* sp. و گونه *Yersinia ruckeri* در روده ماهی با استفاده از آزمون ناپارامتری Kruskal-Wallis و Mann-Whitney U تجزیه و تحلیل شدند، زیرا بر اساس آزمون Levene، این پارامترهای واریانس همگن نداشتند. آزمون‌های آماری در نرم افزار SPSS v22 انجام شد و معنی‌داری در سطح  $P < 0.05$  بررسی شد.

### نتایج

شاخص‌های تولید و تحلیل اقتصادی جیره‌های غذایی در جدول ۵ نشان داده شده‌اند. تیمارهای غذایی اثر معنی‌داری بر تولید ماهی در واحد حجم آب نداشتند. هزینه تمام شده خوراک برای تولید هر کیلوگرم ماهی به طور معنی‌داری در تیمارهای کنجاله پنبه دانه کمتر از تیمار شاهد بود و کمترین مقدار در تیمار کنجاله پنبه دانه بدون مخمر مشاهده شد.

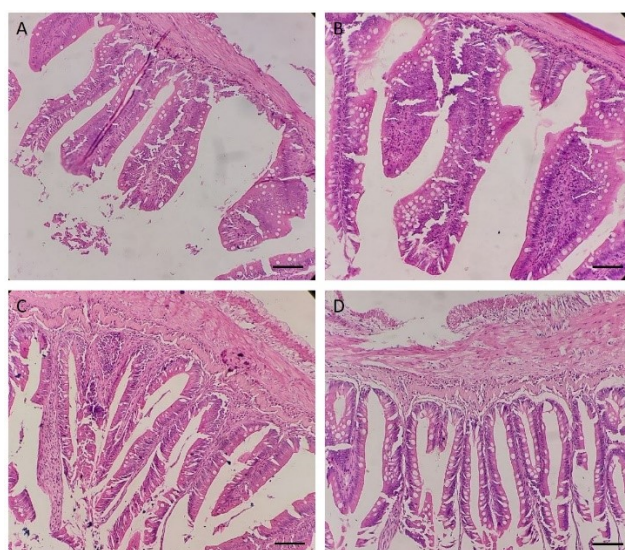
جدول ۵: شاخص‌های تولید ماهی و توجیه اقتصادی جیره‌های آزمایشی پس از ۸ هفته پرورش. حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ( $n = 4$ ).

| Sig.   | مخمر غنی شده        | مخمر             | پنبه دانه        | شاهد             |                                                      |
|--------|---------------------|------------------|------------------|------------------|------------------------------------------------------|
| ۰/۳۷۸  | $15/4 \pm 0/30$     | $15/1 \pm 0/65$  | $15/8 \pm 0/56$  | $15/2 \pm 0/56$  | تولید ماهی در واحد حجم (کیلوگرم/متر مکعب)            |
| <۰/۰۰۱ | $422 \pm 6/42^{ab}$ | $434 \pm 20/4^b$ | $412 \pm 7/15^a$ | $495 \pm 15/6^c$ | هزینه تمام شده خوراک (هزار ریال/کیلوگرم ماهی تولیدی) |

تیمارهای غذایی اثر معنی‌داری بر شاخص‌های بیوشیمیایی پلاسمای خون نداشتند (جدول ۶). همچنین، تصاویر میکروسکوپی مقاطع بافت روده ماهی در شکل ۱ نشان داده شده‌اند. عارضه مشهودی در هیچ یک از تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد و بافت روده در همه تیمارها حالت طبیعی داشت.

جدول ۶: شاخص‌های بیوشیمیایی پلاسمای ماهی پس از ۸ هفته تغذیه با جیره‌های آزمایشی ( $n = 4$ ).

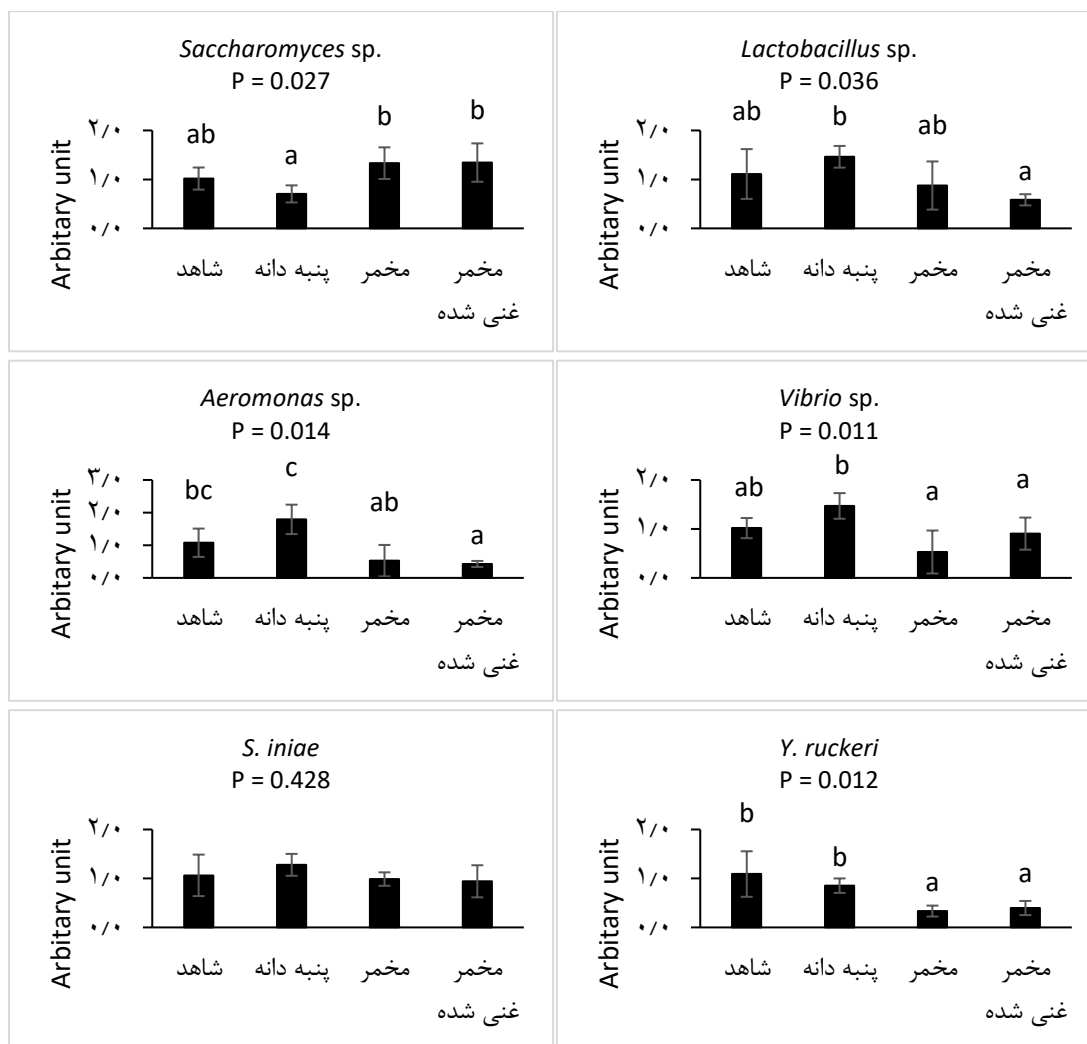
| Sig.  | مخمر غنی شده    | مخمر            | پنبه دانه       | شاهد            |                                    |
|-------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------------------|
| ۰/۹۱۹ | $49/3 \pm 9/29$ | $44/8 \pm 9/78$ | $48/0 \pm 9/20$ | $48/5 \pm 10/9$ | کورتیزول (نانوگرم/میلی لیتر)       |
| ۰/۰۵۲ | $3/98 \pm 0/77$ | $4/10 \pm 0/44$ | $3/70 \pm 0/65$ | $2/75 \pm 0/68$ | T <sub>3</sub> (نانوگرم/میلی لیتر) |
| ۰/۹۶۵ | $13/3 \pm 2/22$ | $13/0 \pm 2/16$ | $12/5 \pm 1/29$ | $13/0 \pm 2/58$ | T <sub>4</sub> (میلی گرم/دسی لیتر) |
| ۰/۷۱۷ | $49/5 \pm 8/35$ | $55/0 \pm 5/10$ | $54/0 \pm 5/72$ | $52/8 \pm 8/46$ | گلوکز (میلی گرم/دسی لیتر)          |
| ۰/۰۸۳ | $152 \pm 7/99$  | $149 \pm 9/67$  | $133 \pm 14/9$  | $133 \pm 14/4$  | تری گلیسرید (میلی گرم/دسی لیتر)    |
| ۰/۲۷۲ | $258 \pm 34/1$  | $245 \pm 25/5$  | $247 \pm 29/1$  | $215 \pm 33/5$  | کلسترول (میلی گرم/دسی لیتر)        |



شکل ۱: مقاطع بافتی روده ماهی در تیمارهای مختلف. A: شاهد؛ B: کنجاله پنبه دانه؛ C: مخمر؛ D: مخمر غنی شده. میله مقیاس معادل ۲۵ میکرون است.



فراوانی میکروبی در روده ماهی‌های آزمایشی در شکل ۲ نشان داده شده است. تیمارهای غذایی اثر معنی‌داری روی تراکم گونه *S. iniae* نداشتند ولی فراوانی سایر میکروب‌های مورد آزمایش را تغییر دادند. اختلاف معنی‌داری در فراوانی جنس *Lactobacillus sp.* بین تیمار شاهد و سایر تیمارها مشاهده نشد ولی فراوانی این جنس در تیمار مخمر غنی شده کمتر از تیمار کنجاله پنبه دانه بود. اختلاف معنی‌داری در فراوانی جنس *Saccharomyces sp.* بین تیمار شاهد و سایر تیمارها مشاهده نشد ولی فراوانی این جنس در تیمار پنبه دانه و مخمر، اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت ولی فراوانی این جنس در تیمار مخمر به طور معنی‌داری کمتر از تیمار پنبه دانه بود. فراوانی جنس *Aeromonas sp.* در تیمار مخمر غنی شده به طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد و سایر تیمارها مشاهده نشد ولی فراوانی این جنس در تیمارهای مخمر و مخمر غنی شده کمتر از تیمار پنبه دانه بود. فراوانی گونه *Y. ruckeri* در تیمار شاهد و پنبه دانه برابر و به طور معنی‌داری بالاتر از تیمارهای مخمر و مخمر غنی شده بود.



شکل ۲: فراوانی جنس‌ها و گونه‌های میکروبی در روده ماهی پس از ۸ هفته تغذیه با جیره‌های غذایی مختلف. حروف متفاوت روی میله‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (n = ۴).

## بحث و نتیجه گیری

کنجاله پنبه دانه یکی از محصولات فرعی کشت پنبه در کشور است که می‌تواند به عنوان منبع پروتئین و چربی در جیره غذایی دام و آبزیان استفاده شود. مهم‌ترین شاخص برای معرفی یک جیره غذایی جدید در آبی‌پروری، توجیه اقتصادی آن است که مستقیماً روی قیمت تمام شده تولید ماهی و سودآوری مزرعه موثر است. در این تحقیق مشخص شد که افزودن ۱۵ درصد کنجاله پنبه دانه به جیره غذایی قزل آلا رنگین کمان، اثر معنی‌داری در میزان تولید در واحد حجم آب ندارد که نشان می‌دهد رشد و کارایی جیره غذایی بین تیمارها یکسان بوده است (وزن نهایی در تیمارهای مختلف ۱۲۶-۱۲۱ گرم و ضریب تبدیل غذایی ۱/۰۱-۰/۹۵ بوده است). در راستای این نتایج Luo, Xue<sup>[۴۰]</sup> نشان دادند که افزودن ۱۵ درصد کنجاله پنبه دانه کم گوسپیول به جیره غذایی (۱۰ میلی گرم/کیلوگرم گوسپیول آزاد) ماهی قزل آلا رنگین کمان ۴۰ گرمی اثر معنی‌داری بر رشد و تولید ماهی ندارد. اما در تحقیق دیگری که روی ماهی قزل آلا ۱۱ گرمی انجام شد مشخص گردید که افزودن ۱۵ درصد کنجاله پنبه دانه به جیره غذایی (معادل ۱۶۵ میلی گرم/کیلوگرم گوسپیول آزاد) باعث کاهش راندمان تولید ماهی می‌شود<sup>[۴۱]</sup>. این نتایج نشان می‌دهند که وزن ماهی (یا مرحله زیستی) آن اثر مهمی در کارایی کنجاله پنبه دانه در جیره ماهی قزل آلا رنگین کمان دارد و سطح گوسپیول جیره به تنهایی عامل اثر گذار نیست. قیمت پایین‌تر کنجاله پنبه دانه نسبت به کنجاله سویا باعث کاهش قیمت تمام شده جیره غذایی می‌شود و در صورتیکه کارایی جیره‌ها تغییر نکند، قیمت تمام شده ماهی کاهش خواهد یافت که برای آبی‌پروران مطلوب است. در این تحقیق، هزینه تمام شده خوراک در تیمارهای پنبه دانه، مخمر و مخمر غنی شده کمتر از تیمار شاهد بود که باعث افزایش سودآوری پرورش ماهی قزل آلا رنگین کمان می‌شود.

در این تحقیق، افزودن مخمر یا مخمر غنی شده با آهن تأثیر معنی‌داری بر تولید ماهی نداشت. با این وجود، Zargham, Emtiazjoo<sup>[۲۵]</sup> گزارش نمودند که افزودن این سویه از مخمر به جیره غذایی لارو ماهی قزل آلا رنگین کمان باعث افزایش رشد و بقا می‌شود. اختلاف در این یافته‌ها ممکن است به تفاوت در وزن ماهی (یا مرحله زیستی) و ترکیب جیره غذایی نسبت داده شود که تحقیقات بیشتری برای اثبات آن لازم است. همچنین، افزودن مخمر به جیره غذایی حاوی کنجاله پنبه دانه باعث کاهش توجیه اقتصادی پرورش قزل آلا رنگین کمان شد؛ اگرچه توجیه اقتصادی آن کماکان بالاتر از تیمار شاهد بود. لذا، بر اساس این نتایج افزودن مخمر یا مخمر غنی شده با آهن به جیره غذایی حاوی کنجاله پنبه دانه، از لحاظ قیمت تمام شده خوراک، توجیه اقتصادی ندارد.

بررسی‌های شیمی بالینی می‌توانند تصویری عمومی از وضعیت سلامت موجود زنده ارائه نمایند. کورتیزول و گلوکز خون به عنوان شاخص‌های استرس در ماهی شناخته می‌شوند که افزایش آنها نشانه بروز استرس و تغییر متابولیسم انرژی از آنابولیسم به کاتابولیسم است که منجر به کاهش رشد خواهد شد<sup>[۴۲]</sup>. همچنین، هورمون‌های تیروئیدی نقش آنابولیک در بدن دارند و باعث افزایش رشد می‌شوند. کاهش این هورمون‌ها نشانه بروز استرس یا تغییرات فیزیولوژیکی است که منجر به کاهش رشد می‌شوند<sup>[۴۳]</sup>. افزایش چربی خون می‌تواند به دلیل آسیب‌های سلولی و آزاد شدن فسفولیپیدهای غشاء سلولی باشد که نشانه دهنده وضعیت بد سلامت در ماهی است در حالیکه کاهش چربی خون می‌تواند به دلیل اختلال در سنتز کلسترول در کبد یا کاهش انرژی دریافتی روزانه باشد<sup>[۴۴، ۴۵]</sup>. تحقیقات معدودی در این زمینه روی ماهی‌ها انجام شده و معمولاً از سطوح بالای کنجاله پنبه دانه یا پروتئین آن در جیره غذایی ماهی استفاده شده است. برای مثال، استفاده از ۳/۴۰-۷/۲۰ درصد کنجاله پنبه دانه در جیره غذایی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) باعث کاهش گلوکز و تری‌گلیسرید خون در بالاترین غلظت کنجاله شد ولی اثری روی کورتیزول خون نداشت. با توجه به کاهش رشد و کارایی جیره در تیمار ۳/۴۰ درصد کنجاله، کاهش گلوکز و تری‌گلیسرید احتمالاً به دلیل کاهش انرژی دریافتی روزانه بوده است<sup>[۴۶]</sup>. استفاده از ۵۰ درصد کنسانتره پروتئین پنبه دانه در جیره غذایی ماهی خاوباری ژاپنی (*Acipenser schrenckii*) منجر به کاهش معنی‌دار تری‌گلیسرید پلاسما شد ولی اثری روی کلسترول و گلوکز پلاسما نداشت. مجدداً کاهش قابلیت هضم مواد غذایی جیره و رشد ماهی نشان می‌دهد ماهی‌ها با کمبود انرژی دریافتی روزانه مواجه بوده‌اند<sup>[۴۷]</sup>. نتایج این تحقیق نشان داد که افزودن ۱۵ درصد کنجاله پنبه دانه اثر منفی بر شاخص‌های شیمی بالینی خون در ماهی قزل آلا رنگین کمان ندارد که می‌تواند نشانه‌ای از دریافت انرژی روزانه کافی و فعالیت‌های متابولیکی طبیعی ماهی باشد. همچنین، در راستای نتایج این تحقیق، افزودن مخمر به جیره غذایی ماهی تیلایبی نیل (*Oreochromis niloticus*) به میزان ۵ گرم در کیلوگرم<sup>[۴۸]</sup> و به جیره غذایی فیل ماهی (*Huso huso*) به میزان ۱۰-۲۰ گرم در کیلوگرم<sup>[۴۹]</sup> اثر معنی‌داری بر کورتیزول، گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسرید خون نداشته است.

مشخص شده است که افزودن کنجاله پنبه دانه یا پروتئین آن به جیره غذایی ماهی باعث تغییرات مورفولوژیکی در روده ماهی می‌شود. به عنوان مثال افزودن ۲۴ درصد کنسانتره پروتئین پنبه دانه به جیره غذایی هامور مرواریدی (*Epinephelus fuscoguttatus* × *Epinephelus*)

*lanceolatus*)<sup>[۵۰]</sup> یا ۴۰-۶۰ درصد کنجاله پنبه دانه به جیره غذایی ماهی گیش طلایی (*Trachinotus ovatus*)<sup>[۳]</sup> باعث کاهش تعداد و ارتفاع ریز پره‌های روده شده است. از طرفی، افزودن ۲۰ گرم در کیلوگرم مخمر به جیره غذایی گربه ماهی کانال (*Ictalurus punctatus*)<sup>[۵۱]</sup> یا ۴-۱ گرم در کیلوگرم مخمر به جیره غذایی سیم سرطلایی (*Sparus aurata*)<sup>[۵۲]</sup> باعث توسعه ساختار روده ماهی شده است. در این تحقیق اختلاف مشهودی در ساختار روده ماهی‌ها در تیمارهای مختلف مشاهده نشد که می‌تواند به دلیل سطوح پایین مخمر و کنجاله پنبه دانه استفاده شده باشد.

یکی از اثرات استفاده از کنجاله پنبه دانه یا فرآورده‌های آن در جیره غذایی ماهی تغییر فلور میکروبی روده ماهی بوده است. مثلاً، افزودن ۲۴ درصد کنسانتره پروتئین پنبه دانه به جیره غذایی ماهی گیش طلایی باعث کاهش جمعیت فیرمیکات‌ها و افزایش جمعیت ویبریوها و پروتوباکترها در انتهای روده شد<sup>[۳]</sup>. همین مقدار کنسانتره پروتئین پنبه دانه در جیره هامور مرواریدی باعث کاهش تراکم بیفیدوباکترها و افزایش پاتوژن‌های فرصت طلب مانند ویبریوها، پروتوباکترها و اکتینوباکترها در انتهای روده شد<sup>[۵۰]</sup>. از طرفی، افزودن مخمر یا محصولات استخراج شده از آن به جیره غذایی ماهی باعث بهبود فلور میکروبی روده ماهی شده است. مثلاً افزودن ۴ گرم در کیلوگرم مخمر اتولیز شده به جیره غذایی کفشک سنگالی (*Solea senegalensis*) باعث کاهش جمعیت ویبریوها در روده ماهی شده است<sup>[۵۳]</sup>. همچنین، افزودن ۶-۲ گرم مخمر به جیره غذایی ماهی تیلایپای نیل باعث افزایش تعداد مخمر و باسیلوس‌ها در روده ماهی شده است<sup>[۵۴]</sup>. در این تحقیق، افزودن کنجاله پنبه دانه به مقدار ۱۵ درصد در جیره اثر معنی‌داری روی میکروب‌های روده ماهی نداشت ولی افزودن مخمر یا مخمر غنی شده به این جیره باعث کاهش جمعیت باکتری‌های مضر و افزایش جمعیت مخمر در روده شد. افزایش تراکم باکتری‌های مضر در روده باعث بروز التهاب و حساسیت به بیماری‌های می‌شود<sup>[۵۵]</sup>؛ لذا، مخمر یا مخمر غنی شده با آهن می‌تواند به عنوان افزودنی به جیره اضافه شوند تا سلامت روده ماهی را افزایش دهند.

### نتیجه گیری نهایی

این تحقیق نشان داد کنجاله پنبه دانه می‌تواند تا مقدار ۱۵ درصد در جیره غذایی ماهی قزل آلا رنگین کمان استفاده شود بدون اینکه بر راندمان تولید در واحد حجم آب، شاخص‌های شیمی بالینی و بافت شناسی روده اثر معنی‌داری داشته باشد. جیره حاوی کنجاله پنبه دانه باعث کاهش قیمت تمام شده ماهی تولیدی می‌شود که سوددهی مزارع را افزایش خواهد داد. از طرفی افزودن مخمر یا مخمر غنی شده با آهن می‌تواند در بهبود فلور میکروبی روده ماهی‌های تغذیه شده با جیره غذایی حاوی کنجاله پنبه دانه مفید واقع شود.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان از پرسنل ایستگاه تحقیقات شیلاتی قره سو، آقایان وحید تراج و سید احمد حجازی که در خلال پرورش ماهی و نمونه‌برداری کمک نمودند، قدردانی می‌نمایند.

**تأییدیه اخلاقی:** موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

**تعارض منافع:** هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان گزارش نشده است.

**منابع مالی:** این اثر تحت حمایت صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) برگرفته از طرح شماره ۴۰۲۰۸۰۶ انجام شده است.

**سهم نویسندگان:** ارائه طرح پژوهش: سید مرتضی حسینی؛ نمونه‌برداری: سید مرتضی حسینی، اسمعیل پقه، عباسعلی آقایی مقدم، بهروز قره وی؛ انجام کارهای آزمایشگاهی: سید مرتضی حسینی، ملیکا قلیچ پور؛ فراهم آوردن داده‌ها: سید مرتضی حسینی، عباسعلی آقایی مقدم، ملیکا قلیچ پور؛ تجزیه و تحلیل داده‌ها: سید مرتضی حسینی، ملیکا قلیچ پور؛ نوشتن نسخه اولیه مقاله: سید مرتضی حسینی؛ تصحیح و ویرایش نسخه نهایی مقاله: سید مرتضی حسینی

### منابع

- Jobling M. National Research Council (NRC): Nutrient requirements of fish and shrimp. Aquac Int. 2012;20(3):601-2.
- Fu S, Qian K, Liu H, Song F, Ye J. Effects of fish meal replacement with low-gossypol cottonseed meal on the intestinal barrier of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*). Aquac Res. 2022;53(1):285-99.
- Shen J, Liu H, Tan B, Dong X, Yang Q, Chi S, et al. Effects of replacement of fishmeal with cottonseed protein concentrate on the growth, intestinal microflora, haematological and antioxidant indices of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*). Aquacult Nutr. 2020;26(4):1119-30.

4. Navarrete P, Tovar-Ramírez D. Use of yeasts as probiotics in fish aquaculture. In: Hernandez-Vergara M, Perez-Rostro C, editors. Sustainable aquaculture techniques. 1. Rijeka, Croatia: IntechOpen; 2014. p. 135-72.
5. Agboola JO, Øverland M, Skrede A, Hansen JØ. Yeast as major protein-rich ingredient in aquafeeds: a review of the implications for aquaculture production. Rev Aquacult. 2021;13(2):949-70.
6. Andriamialinirina THJ, Irm M, Taj S, Lou JH, Jin M, Zhou Q. The effects of dietary yeast hydrolysate on growth, hematology, antioxidant enzyme activities and non-specific immunity of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish Shellfish Immunol. 2020;101:168-75.
7. Barnes ME, Durben DJ, Reeves SG, Sanders R. Dietary yeast culture supplementation improves initial rearing of McCaughy strain rainbow trout. Aquacult Nutr. 2006;12(5):388-94.
8. Ozório ROA, Portz L, Borghesi R, Cyrino JEP. Effects of dietary yeast (*Saccharomyces cerevisia*) supplementation in practical diets of tilapia (*Oreochromis niloticus*). Animals [Internet]. 2012; 2(1):[16-24 pp.].
9. Rimoldi S, Gini E, Koch JFA, Iannini F, Brambilla F, Terova G. Effects of hydrolyzed fish protein and autolyzed yeast as substitutes of fishmeal in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diet, on fish intestinal microbiome. BMC Vet Res. 2020;16(1):118.
10. Zhang W-J, Xu Z-R, Zhao S-H, Sun J-Y, Yang X. Development of a microbial fermentation process for detoxification of gossypol in cottonseed meal. Animal feed science and technology. 2007;135(1):176-86.
11. Lyons P, Turnbull J, Dawson KA, Crumlish M. Phylogenetic and functional characterization of the distal intestinal microbiome of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from both farm and aquarium settings. J Appl Microbiol. 2017;122(2):347-63.
12. Clements KD. Fermentation and gastrointestinal microorganisms in fishes. Gastrointestinal Microbiology: Volume 1 Gastrointestinal Ecosystems and Fermentations. 1997:156-98.
13. Barros MM, Lim C, Evans JJ, Klesius PH. Effect of iron supplementation to cottonseed meal diets on the growth performance of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Journal of applied aquaculture. 2000;10(1):65-86.
14. Barros MM, Lim C, Klesius PH. Effect of soybean meal replacement by cottonseed meal and iron supplementation on growth, immune response and resistance of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. Aquaculture. 2002;207(3):263-79.
15. El-Saidy DMSD, Gaber MM. Use of cottonseed meal supplemented with iron for detoxification of gossypol as a total replacement of fish meal in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) diets. Aquac Res. 2004;35(9):859-65.
16. Lim S-J, Lee K-J. Partial replacement of fish meal by cottonseed meal and soybean meal with iron and phytase supplementation for parrot fish *Oplegnathus fasciatus*. Aquaculture. 2009;290(3):283-9.
17. Lim C, Sealey WM, Klesius PH. Iron methionine and iron sulfate as sources of dietary iron for channel catfish *Ictalurus punctatus*. J World Aquac Soc. 1996;27(3):290-6.
18. Chanda S, Paul B, Ghosh K, Giri S. Dietary essentiality of trace minerals in aquaculture-A Review. Agricultural reviews. 2015;36(2):100-12.
19. Sealey WM, Lim C, Klesius P. Influence of the dietary level of iron from iron methionine and iron sulfate on immune response and resistance of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri*. J World Aquac Soc. 1997;28(2):142-9.
20. Qiao YG, Tan BP, Mai KS, Ai QH, Zhang WB, Xu W. Evaluation of iron methionine and iron sulphate as dietary iron sources for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). Aquacult Nutr. 2013;19(5):721-30.
21. Buyinza I, Lochmann R, Sinha AK, Thompson M, Romano N, Ramena G. Elevated concentrations of organic and inorganic forms of iron in plant-based diets for channel catfish prevent anemia but damage liver and intestine, respectively, without impacting growth performance. Fish Physiol Biochem. 2023;49(2):289-305.
22. Rigos G, Samartzis A, Henry M, Fountoulaki E, Cotou E, Sweetman J, et al. Effects of additive iron on growth, tissue distribution, haematology and immunology of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. Aquac Int. 2010;18(6):1093-104.
23. Gaensly F, Picheth G, Brand D, Bonfim T. The uptake of different iron salts by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Brazilian journal of microbiology. 2014;45:491-4.
24. Riemer J, Hoepken HH, Czerwinska H, Robinson SR, Dringen R. Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. Anal Biochem. 2004;331(2):370-5.
25. Zargham D, Emtiazjoo M, Sahafi H, Bashti T, Razmi K. The effect of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strain: ptcc5052 on growth parameters and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. Advances in environmental biology. 2011;5:1393-400.
26. AOAC. Official Methods of Analysis. 18th ed. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International; 2005.
27. Hoseini SM, Taheri Mirghaed A, Ghelichpour M, Pagheh E, Iri Y, Abdolvahhab K. Effects of dietary tryptophan supplementation and stocking density on growth performance and stress responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 2020;519:734908.
28. Agh N, Jasour MS, Noori F. Potential development of value-added fishery products in underutilized and commercial fish species: Comparative study of lipid quality indicators. Journal of the American oil chemists' society. 2014;91(7):1171-7.
29. Ghelichpour M, Taheri Mirghaed A, Hoseini SM, Perez Jimenez A. Plasma antioxidant and hepatic enzymes activity, thyroid hormones alterations and health status of liver tissue in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to lufenuron. Aquaculture. 2020;516:734634.
30. Hoseini SM, Sinha R, Fazel A, Khosraviani K, Hosseinpour Delavar F, Arghideh M, et al. Histopathological damage and stress- and immune-related genes' expression in the intestine of common carp, *Cyprinus carpio* exposed to copper and polyvinyl chloride microparticle. Journal of experimental zoology part A: ecological and integrative physiology. 2022;337(2):181-90.
31. Byun R, Nadkarni MA, Chhour K-L, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. J Clin Microbiol. 2004;42(7):3128-36.
32. Bastardo A, Ravelo C, Romalde JL. Highly sensitive detection and quantification of the pathogen *Yersinia ruckeri* in fish tissues by using real-time PCR. Appl Microbiol Biotechnol. 2012;96(2):511-20.

33. Torres-Corral Y, Santos Y. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Streptococcus iniae* using the lactate permease gene. J Fish Dis. 2021;44(1):53-61.
34. Tall A, Teillon A, Boisset C, Delesmont R, Touron-Bodilis A, Hervio-Heath D. Real-time PCR optimization to identify environmental *Vibrio* spp. strains. J Appl Microbiol. 2012;113(2):361-72.
35. Yu C-P, Farrell SK, Robinson B, Chu K-H. Development and application of real-time PCR assays for quantifying total and aerolysin gene-containing *Aeromonas* in source, intermediate, and finished drinking water. Environ Sci Technol. 2008;42(4):1191-200.
36. Kesmen Z, Özbekar E, Büyükkiraz M. Multifragment melting analysis of yeast species isolated from spoiled fruits. J Appl Microbiol. 2018;124(2):522-34.
37. Fierer N, Breitbart M, Nulton J, Salamon P, Lozupone C, Jones R, et al. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. Appl Environ Microbiol. 2007;73(21):7059-66.
38. Hoseini SM, Yousefi M, Afzali-Kordmahalleh A, Pagheh E, Taheri Mirghaed A. Effects of dietary lactic acid supplementation on the activity of digestive and antioxidant enzymes, gene expressions, and bacterial communities in the intestine of common carp, *Cyprinus carpio*. Animals [Internet]. 2023; 13(12):[1934 p.].
39. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$  method. Methods. 2001;25(4):402-8.
40. Luo L, Xue M, Wu X, Cai X, Cao H, Liang Y. Partial or total replacement of fishmeal by solvent-extracted cottonseed meal in diets for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquacult Nutr. 2006;12(6):418-24.
41. Cheng ZJ, Hardy RW. Apparent digestibility coefficients and nutritional value of cottonseed meal for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 2002;212(1):361-72.
42. Barton BA. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integr Comp Biol. 2002;42(3):517-25.
43. Deal CK, Volkoff H. The role of the thyroid axis in fish. Front Endocrinol (Lausanne). 2020;11:596585-.
44. Hoseini SM, Yousefi M, Rajabiesterabadi H, Pakinat M. Effect of short-term (0-72 h) fasting on serum biochemical characteristics in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Journal of applied ichthyology. 2014;30(3):569-73.
45. Hoseini SM, Hedayati A, Ghelichpour M. Plasma metabolites, ions and thyroid hormones levels, and hepatic enzymes' activity in Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) exposed to waterborne manganese. Ecotoxicol Environ Saf. 2014;107(0):84-9.
46. Su J, Hou H, Wang C, Luo Y. Effects of replacing soybean meal with cottonseed meal on growth, muscle amino acids, and hematology of juvenile common carp, *Cyprinus carpio*. Aquac Int. 2019;27(2):555-66.
47. Wang Ca, Zhao Z, Lu S, Liu Y, Han S, Jiang H, et al. Physiological, nutritional and transcriptomic responses of sturgeon (*Acipenser schrenckii*) to complete substitution of fishmeal with cottonseed protein concentrate in aquafeed. Biology [Internet]. 2023; 12(4):[490 p.].
48. Sutthi N, Thaimuangphol W. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth performances, body composition and blood chemistry of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) under different salinity conditions. Iranian journal of fisheries sciences. 2020;19(3):1428-46.
49. Hoseinifar SH, Mirvaghefi A, Merrifield DL. The effects of dietary inactive brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* on the growth, physiological responses and gut microbiota of juvenile beluga (*Huso huso*). Aquaculture. 2011;318(1):90-4.
50. Chen G, Yin B, Liu H, Tan B, Dong X, Yang Q, et al. Effects of fishmeal replacement with cottonseed protein concentrate on growth, digestive proteinase, intestinal morphology and microflora in pearl gentian grouper (*♀Epinephelus fuscoguttatus* × *♂Epinephelus lanceolatus*). Aquac Res. 2020;51(7):2870-84.
51. Xia R, Hao Q, Xie Y, Zhang Q, Ran C, Yang Y, et al. Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* on growth, intestinal and liver health, intestinal microbiota and disease resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquaculture reports. 2022;24:101157.
52. El-Bab AFF, Saghir SAM, El-Naser IA, El-Kheir SMMA, Abdel-Kader MF, Alruhaimi RS, et al. The effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, oxidative status, and immune response of sea bream (*Sparus aurata*). Life [Internet]. 2022; 12(7):[1013 p.].
53. Batista S, Medina A, Pires MA, Moriñigo MA, Sansuwan K, Fernandes JMO, et al. Innate immune response, intestinal morphology and microbiota changes in Senegalese sole fed plant protein diets with probiotics or autolysed yeast. Appl Microbiol Biotechnol. 2016;100(16):7223-38.
54. Opiyo MA, Jumbe J, Ngugi CC, Charo-Karisa H. Dietary administration of probiotics modulates non-specific immunity and gut microbiota of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in low input ponds. International journal of veterinary science and medicine. 2019;7(1):1-9.
55. Medina-Félix D, Garibay-Valdez E, Vargas-Albores F, Martínez-Porchas M. Fish disease and intestinal microbiota: A close and indivisible relationship. Rev Aquacult. 2023;15(2):820-39.

## Effect of adding cottonseed meal along with yeast (*Saccharomyces cerevisiae* PTCC5052) or iron-enriched yeast to diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on economic justification of production, blood biochemical properties, microbial flora and histopathological status of the intestine

Seyyed Morteza Hoseini<sup>1\*</sup>, Esmail Pagheh<sup>1</sup>, Abbasali Aghaeimoghaddam<sup>1</sup>, Behrouz Gharavi<sup>1</sup>, Melika Ghelichpour<sup>1</sup>

1- Inland Waters Aquatics Resources Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Gorgan, Iran

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of adding cottonseed meal along with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain PTCC5052—either iron-enriched or non-enriched—on the economic justification of production, biochemical blood characteristics, microbial flora, and histopathological status of the intestine in juvenile rainbow trout. Fish weighing approximately 31 g were distributed in 16 tanks in four treatments with four replications. One control diet without cottonseed meal, one diet containing 15% cottonseed meal, and two diets containing 15% cottonseed meal along with  $1 \times 10^8$  cfu/g of yeast or iron-enriched yeast were provided to the fish for 8 weeks. The results indicated no significant differences in fish production efficiency, plasma biochemical indices, and histopathological status of the intestine among the treatments. The cost of feed per unit of fish production in the treatments containing cottonseed meal significantly decreased compared to the control treatment, with the lowest cost was observed in the treatment without yeast. No significant differences in microbial abundance were observed between the control treatment and the cottonseed meal treatment; however, the addition of yeast or iron-enriched yeast to the diet resulted in an increased density of the genus *Saccharomyces*, a reduction in the density of the genera *Aeromonas* and *Vibrio*, and a decrease in the density of *Yersinia ruckeri* in the fish intestine. The results of this study indicate that adding 15% cottonseed meal to the diet of rainbow trout can enhance the economic justification for fish production, and the addition of yeast to this diet improves the microbial flora in the fish's intestine.

**KEYWORDS:** Cottonseed meal, Growth, Microbial flora, Blood, Histopathology

### ARTICLE TYPE

Original Research

### ARTICLE HISTORY

Received: 19 January  
2025

Accepted: 30  
February 2025

ePublished: 06 March  
2025

\* Corresponding Author: SM Hoseini

Email address: seyyedmorteza.hoseini@gmail.com

Tel: +989112750713

© Published by Tarbiat Modares University

ISSN: 2322-5513