تأثیر عصاره آنزیمی باسیلوس‌های پروبیوتیکی بر رشد و ترکیبات بیوشیمیایی لاشه لارو قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

نفیسه پریچه*[۱]، حجت ا... جعفریان[۱]، محمد هرسیج[۱]، علی‌رضا احمدی[۲]، جواد سهندی[۳]

۱. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران
۲. گروه علوم بیومدیکال، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
۳. گروه علوم محیطی و بوم‌شناسی دریایی، دانشکده علوم زیستی دریا، دانشگاه اقیانوسی چین، چینگ‌تائو، چین

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۳/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۳/۲۷

چکیده

مطالعه حاضر به منظور ارزیابی تأثیر عصاره آنزیمی تولید شده به وسیله پنج گونه باسیلوس پروبیوتیکی بر رشد و ترکیبات بیوشیمیایی لاشه لاروهای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با وزن اولیه ۰/۱۹۷ ±۰/۵۸۳ گرم انجام شد. عصاره آنزیمی به‌وسیله باسیلوس‌های پروبیوتیکی در محیط کشت مایع با غلظت‌های $۱۰^{۶} \times ۱$، $۱۰^{۷} \times ۱$ و $۱۰^{۸} \times ۱$ واحد کلنی در ۱۰۰ گرم محیط کشت تولید شد و به ترتیب به جیره‌های لاروهای ماهی قزل-آلای رنگین‌کمان افزوده‌شد. نتایج به‌دست آمده از زیست‌سنجی لاروها در پایان دوره مطالعه، نشان داد که استفاده از سوسپانسیون آنزیمی با بیشترین غلظت میکروبی ($۱۰^{۸} \times ۱$ واحد کلنی در ۱۰۰ گرم) در تیمار سوم (۳/۷۷ ± ۲۰/۰۲ گرم) باعث افزایش معنی‌دار رشد شده‌است ($P<۰/۰۵$). همچنین در مورد سایر شاخص‌های رشد از جمله نرخ رشد ویژه و میانگین رشد روزانه نتایج معنی‌داری مشاهده‌شد ($P<۰/۰۵$). بررسی ترکیبات بیوشیمیایی لاشه بر اساس استاندارد AOAC (1990) نشان داد بیشترین درصد پروتئین خام در تیمار T۱ و T۳ و کمترین میزان آن درتیمار شاهد بود. نتایج به‌دست‌آمده در مورد دیگر ترکیبات بیوشیمیایی همچون چربی و انرژی خام نیز با تیمار شاهد اختلاف معناداری داشت. در مورد میزان بقاء نیز تیمارهای آزمایشی بالاترین نرخ را در مقایسه با تیمار شاهد داشت ($P<۰/۰۵$). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد عصاره آنزیمی باسیلوس‌های پروبیوتیکی باعث بهبود عملکرد رشد و کارآیی غذایی در لارو قزل‌آلای رنگین‌کمان و همچنین افزایش نرخ بقاء لاروها می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، عصاره آنزیم، باسیلوس، قزل‌آلا، رشد.

*نویسنده مسوول، پست الکترونیک: n.pariche@gmail.com

۱. مقدمه

کیفیت گوشت آبزیان پرورشی از موارد مهمی است که بسیار تحت تأثیر محیط پرورش و ترکیبات مغذی درون جیره است. باکتری‌های پروبیوتیکی قادر به تولید آنزیم‌های خارج سلولی بوده که این آنزیم‌ها باعث افزایش فرآیند هضم می‌شود و افزایش رشد را به همراه خواهنداشت (Douillet and Langdon,1994)؛ لذا به‌کارگیری این آنزیم‌ها، می‌تواند در افزایش رشد و کاهش هزینه‌های تغذیه‌ای آبزیان پرورشی بسیار مفید باشد؛ همچنین موجب افزایش سطوح پروتئین در لاشه ماهیان تولید شده می‌شود. در مهره‌داران عالی هضم غذا از دو طریق آنزیم تولید شده به‌وسیله میزبان غذایی و همچنین آنزیم مترشحه از فلور باکتریایی موجود در دستگاه گوارش موجود صورت می‌گیرد (Kar et al., 2008). مطالعات محدودی توسط Bairagi et al. 2002 ؛ Ghosh et al., 2002a؛ Saha et al., 2006 در مورد باکتری‌های تولیدکننده آنزیم در دستگاه گوارش انجام شده‌است. در مطالعه‌ای تاثیر باسیلوس‌ها در ترشح آنزیم‌های گوارشی با اندازه‌گیری آنزیم دستگاه گوارش در لارو تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) با مقایسه میزان آنزیم مترشحه در دستگاه گوارش مشخص شد که پروبیوتیک‌های مورد استفاده قادرند علاوه بر ترشح آنزیم، موجب تحریک سلول‌های دستگاه گوارش شده، موجب تولید آنزیم‌های گوارشی شوند (Jafaryan, 2006) .ترشح آنزیمی ضمن بهبود کارآیی غذایی موجب تسهیل در فرآیند هضم شده، نهایتاً افزایش ابقاء پروتئین را در پی خواهد داشت و موجب افزایش ترکیبات مغذی از جمله پروتئین در لاشه خواهدشد. در برخی از موارد از آنزیم‌های سنتتیک به صورت مکمل استفاده شده‌است (Ghobadi et al., 2009 ؛Ayoleke *et al*., 2006)، ولی در مورد استفاده از سوسپانسیون آنزیم‌های خارج سلولی پروبیوتیک‌ها به صورت مجزا گزارشات اندکی ارائه شده‌است. اکثر مطالعات شامل بررسی آنزیمی دستگاه گوارش حاوی میکروب‌های باکتریایی پروبیوتیکی در آن‌ها بوده‌است. Yildirim و Turan (2010) نشان دادند مکمل‌سازی آنزیم در رژیم غذایی گربه ماهی آفریقایی *Clarias gariepinus* باعث افزایش ترشح آنزیم، افزایش بقاء، وزن بدن و همچنین بهبود ضریب تبدیل غذایی می‌شود. این نتایج همسو با مطالعات صورت گرفته در مورد هیبرید *Oreochromis niloticus* × *O. aureus* (Lin et al., 2007) قزل‌آلای رنگین‌کمان (Farhangi and Carter, 2007) است. همچنین Boonyaratpalin و همکاران (2000) گزارش کردند تیلاپیا نیل تغذیه شده با رژیم غذایی آرد هسته خرما همراه با آنزیم RonozymeVP9 افزایش وزن و ANPU[1] (مصرف پروتئین خالص ظاهری) قابل توجهی را نسبت به ماهیان تغذیه شده با سطوح مشابه آرد هسته خرما داشتند. Zhou و همکاران (2009) نیز بیان کردند آنزیم‌ها در رژیم غذایی ماهی می‌تواند به عنوان مکمل مورد استفاده قرارگیرد که این آنزیم‌ها شامل آمیلاز (به منظور بهبود قابلیت هضم نشاسته)، پروتئاز (به منظور افزایش قابلیت هضم پروتئین) و لیپاز (به منظور بهبود قابلیت هضم چربی) می‌باشند. در مطالعه‌ای دیگر Soares و همکاران (2008) گزارش کردند گنجاندن پروتئاز در جیره غذایی سبب کاهش ضریب تبدیل غذایی، افزایش وزن و میزان رشد ویژه در گونه *Cichla temensis* جوان می‌شود؛ با این حال استفاده از آنزیم‌های تولید شده توسط پروبیوتیک‌ها در آبزی‌پروری همچنان نیازمند مطالعات بیشتر است. بر همین اساس این مطالعه با هدف ارزیابی استفاده از آنزیم تولید شده توسط باسیلوس‌های پروبیوتیکی (*Bacillus subtilis*، *B. circulance*، *B. licheniformis*، *B. polymyxa*، *B. latrospores*) و تأثیر آن بر عملکرد رشد، بقا و ترکیبات بیوشیمیایی لاشه لارو قزل‌آلای رنگین‌کمان طراحی و اجرا شد.

[1] Apparent net protein utilization

۲. مواد و روش‌ها

در این مطالعه از لاروهای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با میانگین وزن اولیه ۰/۱۹۷ ±۰/۵۸۳ گرم (انحراف معیار± میانگین) استفاده‌شد. پس از تهیه لاروها از کارگاه پرورش ماهیان سردابی واقع در منطقه گزنک شهرستان آمل (مازندران) و انتقال آنها به آزمایشگاه، لاروها برای مدت ۱۴ روز جهت سازگاری با محیط مطالعه (آزمایشگاه آبزی‌پروری- دانشگاه گنبد کاووس) نگهداری شدند. پس از سازگاری لاروها با محیط مطالعه، آن‌ها را در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تیمار شامل: سه تیمار آزمایشی و یک تیمار شاهد که هر یک دارای سه تکرار بود، تقسیم‌بندی گردید. برای این کار از مخازن پلاستیکی ۱۵ لیتری استفاده شد و تعداد ۳۰ لارو در هر مخزن رها شد. لاروها روزانه در۴ نوبت و به میزان ۸-۴ درصد وزن زنده تغذیه شدند (Mohamadi azarm., 2004).

محیط کشت مورد استفاده در این مطالعه، محیط کشت مایع اختصاصی باسیلی تولید شرکت پروتکسین (انگلستان-لندن) بود که طبق دستورالعمل شرکت سازنده پس از توزین با آب مقطر مخلوط و درون اتوکلاو استریل شد. پس از انجام اتوکلاو مخلوط پنج باکتری باسیلی شامل: *Bacillus circulance, Bacillus subtilis, Bacillus polymyxa, Bacillus licheniformis, Bacilluslaterosporus* با غلظت‌های ۱×۱۰^{۶} (T1)، ۱×۱۰^{۷} (T2) و ۱×۱۰^{۸} (T3) واحد کلنی به محیط کشت تلقیح شد و در دمای ۳۷ ^{o}C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از مدت زمان مذکور سوسپانسیون محیط کشت و باکتری در سانترفیوژ DENLEY مدل BS400 با دور ۵۰۰۰rpm سانتریفیوژ شده و عصاره آنزیمی از محیط کشت جداشد. عصاره آنزیمی تهیه‌شده به جیره غذایی لارو-ها اسپری شد و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری شد. پس از تهیه سوسپانسیون استخراجی آنزیم‌های آمیلاز و لیپاز و پروتئاز اندازه‌گیری گردید که نتایج مربوط به آن در جدول ۱ ارائه شده‌است.

جدول ۱. مقادیرفعالیت ویژه آنزیم‌های گوارشی ترشح شده توسط باسیلوس‌های پروبیوتیکی در سوسپانسیون‌های باکتریایی

تیمار / آنزیم	شاهد (IU/mg protein)	۱×۱۰^{۶} CFU/ml	۱×۱۰^{۷} CFU/ml	۱×۱۰^{۸} CFU/ml
آنزیم آمیلاز کل	۰^{d}	۰/۱۱۲۳±۰/۰۲۲^{c}	۰/۲۰۲۳±۰/۰۰۴^{b}	۱/۰۱۰۲±۰/۲۰۲^{a}
آنزیم لیپاز کل	۰^{d}	۰/۰۰۵۳±۰/۰۰۱^{c}	۰/۰۱۳۴ ±۰/۰۲۶^{b}	۰/۰۹۴۴ ±۰/۰۱۸^{a}
آنزیم پروتئاز کل	۰^{d}	۰/۰۰۷۱ ±۰/۰۰۱^{c}	۰/۰۱۴۳ ±۰/۰۰۲^{b}	۰/۰۸۶۳ ±۰/۰۱۷^{a}

حروف غیر مشابه در هر ردیف نشانگر معنی‌دار بودن اختلاف است.

در مطالعه حاضر از جیره تجاری ساخت شرکت بیضاء ۲۱ با ترکیبات تقریبی ۴۵٪ پروتئین خام، ۱۴٪ چربی خام و ۴۳۰۰ کالری بر گرم انرژی خام استفاده شد. برای تهیه جیره‌های آزمایشی عصاره‌های آنزیمی تهیه شده بر جیره‌های توزین شده، اسپری شد. برای اطمینان از تاثیر آنزیم‌ها جیره شاهد با استفاده از سوسپانسیون حاوی محیط کشت مایع بدون افزوده شدن باسیلوس‌های پروبیوتیکی مکمل‌سازی شده، مورد تغذیه تیمار شاهد قرار گرفت.

جهت بررسی وضعیت رشد ماهیان در پایان دوره ۶۰ روزه مطالعه تمامی لاروها در هر یک از مخازن صید و پس از بیهوش‌سازی در مخلوط پودر گل میخک طول و وزن آنها با استفاده از تخته زیست‌سنجی با دقت یک میلی‌متر و ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری و ثبت‌شد.

در ابتدای دوره آزمایش از لاروهای تهیه شده ماهی قزل‌آلا، تعداد ۳۰ قطعه نمونه برداری شد. همچنین در انتهای دوره آزمایش تعداد ۱۵ قطعه ماهی از هر تیمار جهت تجزیه لاشه و تعیین ترکیبات شیمیایی بدن لاروهای ماهی مطابق با استاندارد (1990) AOAC نمونه برداری شد. پروتئین خام با استفاده از روش میکرو کجلدال و با تعیین مقدار نیتروژن کل و بر اساس ۱۶ درصد نیتروژن، چربی خام مطابق با روش سوکسله، انرژی خام با استفاده از دستگاه بمب کالریمتر، رطوبت و ماده خشک لاشه به‌طور وزنی بعد از انجماد، خشک برای مدت ۲۴ ساعت تعیین شد. همچنین خاکستر لاشه با استفاده از سوزاندن نمونه‌ها درکوره با حرارت ۵۵۰ درجه سانتیگراد برای ۶ ساعت تعیین شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها در تیمارهای ذکر شده بر اساس طرح کاملاً تصادفی پس از بررسی نرمال بودن داده با آزمون شاپیرو-ولیک با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون دانکن در سطح معنی‌دار P<۰/۰۵ صورت گرفت و از بسته نرم افزارآماری SPSS (نسخه ۱۹) و Excel در محیط ویندوز استفاده شد.

۳.نتایج

نتایج تاثیر استفاده از عصاره حاوی آنزیم‌های تولید شده توسط باسیلوس‌های پروبیوتیکی مصرف شده در مطالعه حاضر بر معیارهای رشد و درصد بقا لاروها در جدول۲ ارائه شده است. در خصوص نتایج مربوط به وزن نهایی نتایج نشان دهنده اختلاف معنی‌دار تیمار آزمایشی نسبت به شاهد بود (P<۰/۰۵). کمترین میانگین وزنی به‌دست آمده، مربوط به گروه شاهد به میزان ۴/۰۴ ± ۱۴/۲۸ گرم بود و بیشترین میزان ۳/۷۷ ± ۲۰/۰۲ گرم مربوط به تیمار T۳ بود. نرخ رشد ویژه نیز در لاروهای قزل‌آلا در تیمار آزمایشی بیشترین میزان را در مقایسه با تیمار شاهد داشت (P<۰/۰۵). درصد میانگین رشد روزانه از ۶/۷۴ ± ۲۲/۹۱ درتیمار شاهد به ۶/۹۵ ± ۳۱/۶۲ در تیمار T۳ رسید، در حالی که غذای نسبی خورده‌شده درتیمار شاهد بیشترین میزان را در مقایسه با تیمار T۳ داشت (P<۰/۰۵). در مورد میزان بقاء نیز تیمارهای آزمایشی بالاترین نرخ را داشتند و کمترین نرخ بقاء در تیمار شاهد مشاهده‌شد (P<۰/۰۵).

جدول ۲. شاخص‌های رشد لارو قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی مکمل‌سازی شده با سوسپانسیون آنزیمی حاصل از پنج گونه باسیلوس پروبیوتیکی (انحراف معیار± میانگین)

شاخص‌های رشد	شاهد	تیمارهای آزمایشی		
		T۱	T۲	T۳
میانگین وزن اولیه (گرم)	۰/۵۳ ± ۰/۱۹	۰/۵۳ ± ۰/۱۹	۰/۵۳ ± ۰/۱۹	۰/۵۳ ± ۰/۱۹
میانگین وزن نهایی (گرم)	$۱۴/۲۸ ± ۴/۰۴^{c}$	$۱۸/۵۵ ± ۳/۷۱^{b}$	$۱۹/۵۵ ± ۴/۶۶^{ab}$	$۲۰/۰۲ ± ۳/۷۷^{a}$
میانگین طول نهایی (سانتیمتر)	$۱۰/۸۷ ± ۰/۹۵^{c}$	$۱۱/۷۲ ± ۰/۸۷^{b}$	$۱۱/۹۹ ± ۱/۱۰^{ab}$	$۱۲/۰۴ ± ۰/۹۵^{a}$
نرخ رشد ویژه [۱]	$۵/۳۹ ± ۰/۵۲^{b}$	$۵/۸۶ ± ۰/۳۳^{a}$	$۵/۹۱ ± ۰/۴۲^{a}$	$۵/۹۴ ± ۰/۳۷^{a}$
درصد میانگین رشد روزانه [۲]	$۲۲/۹۱ ± ۶/۷۴^{b}$	$۳۰/۰۲ ± ۶/۱۹^{a}$	$۳۱/۲۸ ± ۷/۹۷^{a}$	$۳۱/۶۲ ± ۶/۹۵^{a}$
غذای نسبی خورده شده (درصد)[۳]	$۵/۲۴ ± ۱/۸۶^{a}$	$۴/۶۸ ± ۱/۰۶^{b}$	$۴/۴۱ ± ۱/۱۸^{b}$	$۴/۶۲ ± ۱/۳۵^{b}$
نرخ‌وزن‌نسبی‌بدست‌آمده(درصد)[۴]	$۳۰۹۲/۶۳ ± ۸۱۶/۶۴^{c}$	$۳۳۴۲/۲۹ ± ۷۷۹/۳۱^{b}$	$۳۵۷۸/۹۸ ± ۸۴۵/۵۵^{a}$	$۳۴۴۰/۹۸ ± ۸۲۰/۸۲^{ab}$
درصد بقاء لاروها[۵]	$۹۲/۱۴^{b}$	$۹۵/۷۱^{a}$	$۹۶/۴۲^{a}$	$۹۷/۱۴^{a}$

حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

(۱) (Helland et al., 1996) ۱۰۰ × [مدت مطالعه / (وزن اولیه ln – وزن نهایی ln)] = (٪) نرخ رشد ویژه

(۲) (De Silva and Anderson, 1995) ۱۰۰ × [مدت مطالعه / (وزن اولیه – وزن نهایی)] = (٪) میانگین رشد روزانه

(۳) (اقتباس از جعفریان، ۱۳۸۵) ۱۰۰ × [[(مدت مطالعه × افزایش وزن) × ۰/۵] / غذای خورده شده] = (٪) غذای نسبی خورده شده

(۴) نرخ وزن نسبی بدست آمده (٪) = [وزن اولیه / (وزن اولیه – وزن نهایی)] × ۱۰۰ (De Silva and Anderson, 1995)

(۵) درصد بازماندگی لاروها = [تعداد اولیه لاروها / (تعداد اولیه – تعداد نهایی)] × ۱۰۰ (Felix and Sudharsan, 2004)

جدول۳. ترکیبات بیوشیمیایی لاشه لارو قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره های آزمایشی مکمل‌سازی شده با سوسپانسیون آنزیمی حاصل از پنج گونه باسیلوس پروبیوتیکی (انحراف معیار± میانگین)

ترکیبات بیوشیمیایی	تیمارهای آزمایشی			
	شاهد	T۱	T۲	T۳
پروتئین خام (درصد)	۶۲/۲۱ ± ۰/۶۴^{c}	۶۸/۳۳ ± ۰/۳۹^{a}	۶۶/۷۶ ± ۰/۶۹^{b}	۶۷/۷۷ ± ۰/۴۱^{ab}
چربی خام (درصد)	۸/۰۲ ± ۰/۳۷^{b}	۸/۵۷ ± ۰/۲۳^{b}	۱۰/۰۶ ± ۰/۶۱^{a}	۸/۶۸ ± ۰/۶۷^{b}
انرژی خام (کالری بر گرم)	۴۳۶۰/۴۲ ± ۵۲/۶۱^{c}	۴۴۸۹/۰۳ ± ۱۵/۱۹^{ab}	۴۵۸۹/۸۵ ± ۸۹/۳۹^{a}	۴۴۶۶/۶۷ ± ۲۹/۱۷^{b}
ماده خشک (درصد)	۲۴/۳۸۳ ± ۰/۷۹۷^{a}	۲۴/۷۰۶ ± ۱/۸۵۱^{a}	۲۵/۱۶۲ ± ۱/۵۸۲^{a}	۲۵/۷۸۰± ۲/۹۵۳^{a}
خاکستر (درصد)	۶/۱۳۲ ±۰ /۳۹۷^{a}	۶/۹۰۹ ± ۰/۶۳۴^{a}	۶/۶۵۶ ± ۱/۱۶۳^{a}	۶/۸۹۹ ± ۱/۵۴۶^{a}
رطوبت	۷۵/۶۱۶ ± ۰/۷۹۷^{a}	۷۵/۲۹۳ ± ۱/۸۵۱^{a}	۷۴/۸۳۷ ± ۱/۵۸۲^{a}	۷۴/۲۱۹ ± ۲/۹۵۳^{a}

حروف غیر مشابه در هر ردیف نشانه معنی‌دار بودن اختلاف است (P<۰/۰۵)

نتایج مربوط به ترکیبات بیوشیمیایی لاشه لاروهای قزل‌آلا در جدول۳ نشان‌داده شده‌است. نتایج این بخش نشان داد استفاده از عصاره آنزیمی در جیره غذایی لارو قزل‌آلای رنگین‌کمان موجب افزایش پروتئین خام در تیمارهای آزمایشی می شود به طوری که تیمار T۳ و T۱ بیشترین میزان پروتئین خام لاشه و تیمار شاهد کمترین میزان را داشتند (P<۰/۰۵). همچنین اختلاف معنی‌داری در مورد چربی خام و انرژی خام مشاهده شد (P<۰/۰۵)؛ این در حالی بود که نتایج مربوط به ماده خشک، رطوبت و خاکستر اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵).

۴. بحث و نتیجه گیری

باسیلوس‌های پروبیوتیکی قادر به تولید آنزیم‌های خارج سلولی از جمله آنزیم‌های پروتئاز، لیپاز و آمیلاز هستند. این آنزیم‌ها باعث افزایش فرآیند هضم و افزایش رشد خواهند شد (Douillet and Langdon, 1994). در همین خصوص مطالعه‌ای با هدف بررسی تاثیر پروبیوتیک‌های باسیلوسی در ترشح آنزیم‌های گوارشی در مورد لارو تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) با مقایسه میزان آنزیم مترشحه در دستگاه گوارش توسط Jafaryan (2006) انجام شد. بر اساس مطالعه Jafaryan et.al (2007) ترشح آنزیم‌های خارج سلولی باسیلوس‌های پروبیوتیکی ضمن بهبود کارآیی غذایی، موجب تسهیل در فرآیند هضم شد. مطابق با این یافته‌ها در تحقیق حاضر تهیه عصاره آنزیمی از باسیلوس‌های پروبیوتیکی و استفاده از آن جهت مکمل‌سازی جیره غذایی لاروهای ماهی قزل-آلای رنگین‌کمان به افزایش وزن بدن و میانگین رشد روزانه منجر شد (P<۰/۰۵). به نظر می‌رسد این افزایش رشد به علت افزایش میزان آنزیم دستگاه گوارش و افزایش قابلیت هضم مواد غذایی جیره باشد (Gatesoupe and Ringo, 1998). در تایید این یافته Jafaryan (2006) گزارش داد استفاده از باسیلوس‌ها علاوه بر تولید آنزیم موجب تحریک سلولی دستگاه گوارش در جهت ترشح هرچه بیشتر آنزیم‌ها شده است. افزودن آنزیم تریپسین گاوی در جیره غذایی لارو کپور معمولی نیز موجب افزایش فعالیت آنزیم-های پروتئولیتیک گردید و این افزایش فعالیت آنزیمی در رشد لاروها بروز نمود (Dabrowski and Glogowski, 1977). در مطالعه حاضر نتایج نشان داد که افزودن آنزیم‌های گوارشی موجب افزایش کارآیی ترکیبات غذایی از جمله پروتئین و چربی خام شده و افزایش ابقاء این ترکیبات را در لاشه تیمارهای آزمایشی موجب گردید. مطابق با این نتایج Carter et al. (1994) از آنزیم کربوهیدراز در جیره غذایی ماهی آزاد اطلس استفاده نمودند و شاهد افزایش رشد و

افزایش کارآیی غذایی در این گونه بودند که منجر به افزایش ابقاء پروتئین در پیکره ماهی آزاد اطلس شد. نتایج مشاهده شده در این مطالعه در مورد افزایش رشد در لاروهای قزل‌آلا، نشان داد که تیمارهای آزمایشی تغذیه شده با جیره حاوی بیشترین میزان آنزیم بیشترین افزایش رشد را داشته‌است. بیشترین رشد وزنی و درصد افزایش وزن و همچنین میانگین رشد روزانه در تیمار T۳ و کمترین میزان آن‌ها در تیمار شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵). مطابق با این نتایج، نرخ رشد ویژه در این مطالعه از ۰/۵۲ ± ۵/۳۹ درصد در تیمار شاهد به ۰/۳۷± ۵/۹۴ درصد در تیمار T۳ افزایش یافت. افزایش رشد در لاروهای قزل‌آلا همراه با کاهش غذای نسبی خورده شده‌بود که عامل این افزایش رشد می‌تواند با فعالیت آنزیم‌های تولیدشده توسط باسیلوس‌ها مرتبط باشد؛ به‌طوری‌که موجب افزایش بهره‌برداری ماهی از جیره مصرفی شده‌است.

نتایج این مطالعه نشان داد استفاده از آنزیم تولید شده توسط باسیلوس‌های پروبیوتیکی موجب بالا رفتن ابقاء پروتئین در لاشه ماهیان در تیمارهای آزمایشی شده است؛ همچنین چربی موجود در لاشه ماهیان در تیمارهای آزمایشی افزایش یافت. این افزایش پروتئین و چربی مسلماً به علت افزایش کارآیی ترکیبات مغذی جیره بوده است. همچنین به نظر می‌رسد افزایش پروتئین خام به این علت است که آنزیم‌های مترشحه از پروبیوتیک‌ها از جمله آنزیم پروتئاز موجب افزایش قابلیت هضم ترکیبات پروتئینی غذای خورده شده در روده آبزی هدف شده و در نتیجه سبب می‌گردند تا این ترکیبات به خوبی در روده آبزی جذب شده و درصد پروتئین خام لاشه افزایش یابد (Ghosh et al. 2002). علت دیگر آن است که آمیلاز باکتریایی با هیدرولیز نشاسته و افزایش استفاده از کربوهیدرات ممکن است باعث شود پروتئین کمتری برای تامین انرژی مورد استفاده قرار گیرد و در نتیجه افزایش ابقاء پروتئین صورت گیرد (Ghosh et al., 2002). در تایید این نتایج می‌توان به مطالعه(2007) Mohamed et al. ، Diab et al. (2002) و Lara-Flores et al. (2003) اشاره‌نمود. افزایش پروتئین لاشه همسو با افزایش کارآیی تغذیه لاروها بود و این بهبود می‌تواند به علت افزایش آنزیم-های هاضم پروتئین جیره باشد که موجب ابقاء بیشتر پروتئین در پیکره لاروها شده‌است. همسو با این نتایج Alizadeh et al. (2011) با استفاده از پروبیوتیک تجاری بیوپلاس[1] در جیره غذایی لاروهای ماهی قزل‌آلا با وزن اولیه ۴۰۰ میلی‌گرم موفق به افزایش درصد پروتئین لاشه از ۰/۰۸ ± ۱۰/۲۶ درصد در تیمار شاهد به ۰/۳ ± ۱۵/۰۸ درصد در تیمار پنجم تغذیه شده با یک درصد از پروبیوتیک مصرفی شدند. همچنین استفاده از پروبیوتیک تجاری بیوژن موجب افزایش چربی خام از ۰/۴۴±۴/۶۰ درصد اولیه به ۰/۳۹ ±۶/۸۸ درصد در تیمار تغذیه شده با ۰/۳ درصد از این پروبیوتیک تجاری در لاروهای کپور معمولی گردید (Noveirian et al., 2011). در تشریح این افزایش پروتئین و چربی در لاشه لاروها نیز می‌توان پروبیوتیک‌ها را عامل آن دانست به‌طوری‌که ضمن تاثیر بر متابولیسم اسیدهای صفراوی، موجب تحریک جذب چربی می‌شوند (Shariatmadari and mohiti asl, 2009) و با ترشح آنزیم‌های خارج سلولی موجب شکست زنجیره‌های پیچیده اسیدهای آمینه شده، جذب آن‌ها را تسهیل می‌کنند. این افزایش پروتئین و چربی موجب افزایش انرژی نیز خواهدشد.

نتایج مربوط به نرخ بقاء لاروها در طول دوره پرورش و تغذیه با جیره حاوی آنزیم‌های باسیلوسی نشان‌داد که این مکمل‌سازی ارتقاء بقاء را نیز موجب گردیده است؛ به‌طوری‌که تیمارهای آزمایشی بالاترین نرخ را داشتند و کمترین نرخ بقاء در تیمار شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵). افزایش آنزیم در دستگاه گوارش موجب ساده شدن ساختار ترکیبات غذایی مختلف در دستگاه گوارش می‌شود و در طی آن شرایط مساعدی

[1] BioPlus

جهت افزایش فلور میکروبی مفید و کاهش عوامل بیماری‌زا بروز پیدا خواهد کرد؛ چراکه فعالیت آنزیمی در شرایط دستگاه گوارش تولید اسیدهای آلی از جمله اسید لاکتیک را در پی دارد و این اسید در ساختار فلور میکروبی بیماری‌زا ورود پیدا کرده و باعث کاهش توسعه آن‌ها خواهد شد (Sahandi, 2013). با این روند علاوه بر افزایش کارآیی غذایی و افزایش رشد کاهش تلفات مشاهده‌شد. در تایید این نتایج Ghosh et al. (2002b) با استفاده از آنزیم آمیلاز میکروبی در جیره غذایی ماهی روهو به شکل مکمل‌سازی شاهد افزایش نرخ بقاء در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با تیمار شاهد بودند. همچنین Ghosh et al. (2004) با استفاده از جیره تخمیر شده ماهی روهو با استفاده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی روند افزایش آنزیم‌های تولید شده را در جیره غذایی موجب شده و تغذیه ماهی روهو از آن جیره موجب افزایش بقاء گردید. در مورد استفاده از خود باسیلوس‌ها در جیره غذایی نیز افزایش بقاء در مطالعاتی همچون Jafaryan (2006) و Sahandi et al. (2012) مورد بررسی و تایید قرار گرفته‌است. با توجه به این نتایج و نتایج مطالعات مرتبط با استفاده از آنزیم‌های باسیلوسی در جیره غذایی لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به عنوان شیوه‌ای نوین در صنعت آبزی‌پروری موجب ارتقاء رشد شده و همچنین موجب افزایش کارآیی غذایی در تیمارهای آزمایشی شده است. از دیگر مزایای استفاده از آنزیم‌های مکمل‌سازی شده در جیره این گونه ماهی، افزایش بقاء بود که در جهت کاهش تلفات موثر واقع‌شد. نتایج این مطالعه می‌تواند به عنوان شیوه‌ای راهبردی در صنعت آبزی‌پروری کشور استفاده شود.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد استفاده از آنزیم‌های حاصل از فعالیت باسیلوس‌های پروبیوتیکی، موجب ارتقاء رشد و شاخص‌های مربوط به آن در لاروهای قزل‌آلای رنگین‌کمان شد، ضمن اینکه بیشترین غلظت باکتریایی موجب بهبود کیفیت لاشه لاروها شد. اهمیت آنزیم‌های گوارشی در این مطالعه به وضوح نشان داده‌شد و قابلیت استفاده از آنزیم‌های خارج سلولی باسیلوس‌ها در تغذیه لاروهای قزل‌آلا رنگین‌کمان مورد ارزیابی و تایید قرارگرفت.

قدردانی

نگارندگان از تمامی کارکنان دانشگاه گنبد کاووس که در طول انجام این مطالعه همکاری داشته‌اند کمال امتنان را دارند.

منابع

Alizadeh, M., Farzanfar, A. and Nafisi-Bahabadi, M. 2011. The effect of probiotic Bioplus 2B on growth performance and carcass composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) larvae. Indian Journal of Fisheries 58(4): 55-59.

AOAC. 1990. In: W. Horwitz (Ed.), Official Methods of Analyses, 15th edition. *Association of Official Analytical Chemists* Inc, Arlington, VA. P: 445.

Ayoleke, E.O., Greg, I.P., Morenike, A.A. and Dominique, P.B. 2006. Dietary incorporation of soybean meal and exogenous enzyme cocktail can affect physical characteristics of faecal material egested by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 254:466-475.

Bairagi, A., Ghosh, K.S., Sen, S.K. and Ray, A.K. 2002. Enzyme producing bacterial floraisolated from fish digestive tracts. Aquaculture International 10: 109-121.

Boonyaratpalin, M., Promkunthong, W. and Hunter, B. 2000. Effect of enzyme Pretreatment on in vitro Glucose solubility of Asian Plant By product and Growth Digestibility of oil Palm Expeller Meal by *Oreochromis Niloticus* (Nile Tilapia). In Hartngsveldt W.V. (Ed). Proceeding the Third European symposium on feed enzymes, PP: 86-92.

Carter, C.G., Houlihan, D.F., Buchanan, B. and Mitchell, A.I. 1994. Growth and feed utilization efficiencies of seawater Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed a diet containing supplementary enzymes. Aquaculture and Fishery Management 25: 37-46.

De Silva, S.S., and Anderson, T.A. 1995. Fish Nutrition in Aquaculture, Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London SE1 8HN, UK, PP: 318.

Diab, A.S., EL-Nagar, O.G. and Abd-El-Hady, M.Y. 2002. Evaluation of *Nigella sativa* L. (black seeds; baraka), *Allium sativum* (garlic) & Biogen as a feed additives on growth performance of *Oreochromis niloticus* fingerlings. Veterinary Medicine Journal of Suez canal university 2: 745-753.

Douillet, P.A. and Langdon, C.J. 1994. Use of a probiotic for the culture of larvae of the pacific Oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture 119: 25-40.

Farhangi, M., Carter, C. 2007. Effect of enzyme supplementation to dehulled lupin-based diets on growth, feed efficiency, nutrient digestibility and carcass composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Research 38 (12) : 1274-1282

Felix, N., and Sudharsan, M., 2004 . Effect of glycine betaine, a feed attractant affecting growth and feed conversion of juvenile fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture Nutrition 10:193-197.

Gatesoupe, F.J. and Ringo, E. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture 199: 25-40.

Ghobadi, Sh., Matin-Far, A., Nezami, Sh.A. and Soltani, M. 2009. Influence of supplementary enzymes Avizyme on fish meal replacement by soy bean meal and its effects on growth performance and survival rate of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Fisheries, 2:11-22.

Ghosh, K., Sen, S.K. and Ray, A.K. 2002a. Characterization of Bacillus Isolated from the Gut of Rohu, *labeo rohita*, fingerlings and its significance in digestion. Applied Aquaculture 12: 33-42.

Ghosh, K., Sen, S.K. and Ray, A.K. 2002b. Characterization of Bacillus Isolated from the Gut of Rohu, *labeo rohita*, fingerlings and its significance in digestion. Applied Aquaculture 12: 33-42.

Ghosh, K., Sen, S.K. and Ray, A.K. 2004. Growth and survival of Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton,1822) spawn feed diets fermented with intestine bacterium, *Bacillus circulans*. Acta Ichthyologica etpiscatoria 34(2):155-165.

Helland, S.J., Grisdale, H. B., and Nerland, S. 1996. A simple method for the measurement of daily feed intake of groups of fish in tanks. Aquaculture 139: 157-163.

Dabrowski, K.R. and Glogowski, J. 1977. Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes indigestion processes in fish. Hydrobiologia 54:129–134.

Jafaryan, H. 2006. The effects of *Bacillus* bacteria as a probiotic on the growth factors, survival rate and digestive enzymes activity in the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) larvae by enrichment of *Artemia urmiana* nauplii". Ph.D. Thesis of Fishery. Gorgan University of Agri. Sci. & Nat Res. Pp 103.

Jafaryan, H., Azari Takami, gh., Kamali, a., Soltanii, M. Habibi rezaei, M. 2007. Using bioencapsulated probiotic bacteria in *Artemia urmiana* nauplii for growth and survival of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) larvae. Gorgan University of Agri. Sci. & Natural Resours. 14:77-87

Kar, N. and Ghosh, K. 2008. Isolation and Characterization of Extracellular Enzyme Producing Bacilli in the Digestive Tracts of Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) and Murrel, *Channa punctatus* (Bloch). Asian Fisheries Science 21:421-434.

Lara-Flores, M., Miguel, A., Beatriz, E. and Lopez-Madrid, W. 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 216: 193-201.

Lin, S., Mai, K. Tan, B., 2007. Effects of exogenous enzyme supplementation in diets on growth and feed utilization in tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture Research 38: 1645-1653.

Mohamadi-Azarrm, H., Abedian, A. and Abtahi, B. 2004. Effects of probiotic on growth and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Marine Science. 2-3: 69-75.

Mohamed, K.A. 2007. Effect of Using Probiotic and Yeast as Growth Promoters in Commercial Diet of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fingerlings. Agricultural Research Journal. Suez Canal University 7 (3): 41-47.

Noveirian, H.A. and Nasrollahzadeh, A. 2012. The effects of different levels of biogen probiotic additives on growth indices and body composition of juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.).Caspian Journal of Environmental Science 10(1): 115-121.

Saha, S., Roy, R.N., Kumar-Sen, S. and Ray, A.K. 2006. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). Aquaculture Research 37: 380-388.

Sahandi, J., Jafaryan, H., Roozbehfar, R., Babaei, S. and Dehestani, M. 2012. The use of two enrichment forms (*Brachionus plicatilis* enrichment and rearing water enrichment) with probiotic bacilli spore on growth and survival of Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Iranian Journal of Veterinary Research 13(4): 289-295.

Sahandi, J. 2013. Effect of two probiotic, *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* in-feed on growth and digestibility of Rainbow trout larvae (*Oncorhynchus mykiss*). M.Sc. theses. University of Gonbad Kavous. Pp 106.

Soares, C.S., Filho, M.P., Roubach, R. et al. 2008. Protease exógena em dietas para juvenis de tucunaré-paca (Cichla sp.). Revista Brasileira de Zootecnia 37(6) :971-976.

Shariatmadari, F., and Mohiti-Asl,. M. 2009. The additive of domestic animals, poultry and aquatic animals diets. Printed by University of Tarbiat Modarres, Tehran. Pp 417.

Yildirim, Y.B. and Turan, F. 2010. Effects of exogenous enzyme supplemention in diets on growth and feed utilization in African catfish, *Clarias gariepinus*. Journal of Animal and Veterinary Advances 9 (2): 327-331.

Zhou, A., Liu, Y., Shi, P., He, S., Yao, B. and Ringø, E. 2009. Molecular characterization of the autochthonous micro-biota in the gastrointestinal tract of adult yellow grouper (*Epinephelus awoara*) cultured in cages. Aquaculture 286: 184-189

Effects of *Bacillus* probiotic enzyme extract on growth and carcass biochemical composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae

Nafiseh Paricheh[1*], Hojatollah Jafaryan[1], Mohammad Harsij[1], Ali Reza Ahmadi[2], Javad Sahandi[3]

1.Department of Fisheries, Faculty of Natural Resource, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran
2. Department of BioMedical, Al-Zahra University, Tehran, Iran
3. Department of Marine Environmental and Ecological Sciences, College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao, China

Abstract

The present study was done to evaluate the effects of enzyme extract, produced by five species of probiotics *Bacillus* on growth and carcass biochemical composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae with initial body weight of 0.583 ± 0.197 g (mean ± SD). The enzyme extract was produced by *Bacillus* probiotics in broth media with concentrations of 1×10^6, 1×10^7 and 1×10^8 CFU/100g and then it was added into the feed of rainbow trout larvae respectively. The results of larval biometry at the end of the study showed that the use of enzyme extract with the highest *Bacillus* concentration (1×10^8 CFU/100g) in T3 (20.02 ±3.77 g) significantly increased the growth ($P<0.05$). Also other growth parameters as specific growth rate and average daily growth showed significant differences ($P<0.05$). The study of carcass biochemical composition according to AOAC (1990) standard showed that T1 and T3 had the highest crude protein content and control had the lowest crude protein content. Also the experimental treatments showed the highest survival rate in comparison with the control ($P<0.05$). The results of this study showed that enzyme extract of *Bacillus* probiotic improved the growth performance and feed efficiency in rainbow trout larvae and also increased the survival rate.

Keyword: Probiotic, Enzyme extract, Bacillus, Trout, Growth.

Table 1. Specific activity of digestive enzymes that secreted by *Bacillus* probiotics in bacterial suspension.

Table 2. Growth parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae fed with supplemented diet with enzymatic suspension, yielded from five *Bacillus* species (m±sd).

Table 3. Biochemical body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae fed with supplemented diet with enzymatic suspension, yielded from five *Bacillus* species (m±sd).

*Corresponding author, E-mail: n.pariche@gmail.com