



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره دوم، شماره سوم، پاییز ۹۳

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

بررسی تأثیر باسیلوس‌های پروبیوتیکی بر انرژی مصرف شده و ترشح آمونیاک و اوره در لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss* Wabau, 1792)

حکیمه سرگزی^{۱*}، حجت‌اله جعفریان^۲، سعید یلقی^۳، محمد فرهنگی^۴

^۱دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

^۲دانشیار گروه شیلات، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

^۳کارشناس مرکز تحقیقات شیلات استان گلستان، گرگان، ایران

^۴مریی گروه شیلات، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

تاریخ ارسال: ۹۲/۱۱/۱۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱/۲۲

چکیده

در این تحقیق اثرات باسیلوس‌های پروبیوتیکی بر روی انرژی مصرف شده و دفع آمونیاک و اوره در لارو ماهیان قزل‌آلا با بکارگیری مخلوط پنج‌گونه از باسیلوس‌های پروبیوتیکی از طریق مکمل‌سازی جیره به مدت ۶۰ روز بررسی شد. لاروهای ماهی قزل‌آلا (با وزن متوسط 463 ± 32 میلی‌گرم) با جیره حاوی 1×10^6 CFU/ml (تیمار ۱-Tau)، 1×10^7 CFU/ml (تیمار ۲-Tau) و 1×10^8 CFU/ml (تیمار ۳-Tau) در هر ۱۰۰ گرم غذا مکمل سازی شده و اثر آنها با تیمار شاهد با جیره فاقد پروبیوتیک مقایسه شد. تغذیه از ۵ تا ۸ درصد وزن بدن متغیر بود. اما در حین آزمایش دفع، ماهیان تغذیه نشدند. نتایج نشان داد که دفع آمونیاک و اوره در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0/05$). کمترین میزان دفع آمونیاک و اوره در تیمار ۲-Tau مشاهده شد و بیشترین میزان دفع آمونیاک و اوره در هر دو حالت در تیمار شاهد مشاهده شد. میزان انرژی مصرفی در تیمارهای آزمایشی به‌طور معنی‌داری ($P < 0/05$) کمتر از شاهد بود. نتایج نشان داد که باسیلوس‌های پروبیوتیکی قادرند میزان انرژی مصرف شده و دفع آمونیاک و اوره را کاهش دهند.

واژه‌های کلیدی: جیره، پروبیوتیک، دفع آمونیاک، ماهی قزل‌آلا

*نویسنده مسئول: h.sargazi68@gmail.com

مقدمه

با افزایش جمعیت کره زمین تقاضا برای تولید مواد غذایی از جمله آبزیان افزایش یافته است و نیاز به گسترش آبی‌پروری به شدت احساس می‌شود. اولین نکته‌ای که در توسعه آبی‌پروری باید مورد توجه قرار گیرد استفاده بهینه از منابع آب و زمین می‌باشد (Avnimelech, 2009). دومین هدفی که در توسعه سیستم‌های آبی‌پروری باید در درجه اهمیت قرار گیرد آسیب نرساندن به محیط زیست است (Naylor *et al.*, 2000). هدف سوم نیز ساخت و طراحی سیستم‌ها و روش‌هایی است که سود بیشتر را جهت مسائل اقتصادی و اجتماعی فراهم کند (Avnimelech, 2009). یافتن راهکار برای کاهش دفع آمونیاک دارای هر سه پیش نیاز ذکر شده برای توسعه آبی‌پروری پایدار می‌باشد.

مقدار دفع آمونیاک و اوره برای گونه‌های مختلف ماهی در رابطه با تغذیه آنهاست و برای سیستم‌های پرورش متراکم ماهی مهم است، زیرا نحوه سوخت و ساز پروتئین تا حدی تعریف کننده یک رژیم غذایی خاص است (Dosdat *et al.*, 1995; Ge'lineau *et al.*, 1998). فرآورده اصلی در متابولیسم پروتئین در ماهیان استخوانی آمونیاک و نسبت قابل توجهی ترکیبات نیتروژن دار و اوره می‌باشد (Wood, 1993). آمونیاک عمده‌ترین و مهم‌ترین ماده دفعی فعالیت‌های متابولیسمی آبزیان می‌باشد (Till *et al.*, 2003) که به صورت تعادلی و به دو حالت یونیزه و غیر یونیزه در آب وجود دارد. این تعادل تحت تأثیر برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی آب می‌باشد (Rahaman *et al.*, 1996). آمونیاک غیر یونیزه (NH_3) برای آبزیان سمی بوده و در صورت بالا رفتن غلظت آن از حد مجاز، ابتدا برای آبزیان استرس ایجاد کرده و با تداوم آن باعث تلفات سنگینی در تکثیر و پرورش آبزیان می‌شود (Shingles *et al.*, 2001). هنگام افزایش میزان آمونیاک آب استخرها، دفع آمونیاک توسط ماهی کاهش می‌یابد و باعث می‌شود میزان آمونیاک در خون و بافت ماهی افزایش یابد و عوارض جانبی مانند افزایش pH خون، افزایش نیاز به اکسیژن و کاهش توانایی حمل اکسیژن توسط هموگلوبین اتفاق می‌افتد. علاوه بر این‌ها آمونیاک باعث تخریب بافت آبشش ماهی می‌شود و سبب ایجاد تغییرات بافتی در کلیه‌ها، طحال و بافت تیروئید می‌گردد که ماهی را مستعد ابتلا به بیماری می‌کند. سمیت آمونیاک تولید را در صنعت آبی‌پروری محدود می‌کند (Adhikari, 1999). از مهم‌ترین مزایای کاهش ترکیبات نیتروژنی می‌توان به کاهش سمیت در محیط زیست موجود و کاهش آلودگی پسماندهای مزارع پرورش ماهی اشاره کرد (Sun *et al.*, 2007).

بیشترین دفع چند ساعت پس از مصرف غذا می‌باشد که به عوامل مختلفی از جمله میزان نیتروژن مصرفی، درجه حرارت و گونه ماهی بستگی دارد (Ramnarine *et al.*, 1987; Kaushik and Cowey, 1990). اکثر تحقیقات روی ترشح آمونیاک و اوره و ازت متابولیکی بر مبنای مواردی از جمله سایز و گونه ماهی (Dosdat *et al.*, 1996)، سطوح پروتئین جیره (Engin and Carter, 2001)، دفعات تغذیه

(Ramnarine *et al.*, 1987) و دمای محیط (Lihua and Haoru, 2009) انجام شده است و نقش پروبیوتیک‌ها بر ترشح آمونیاک و اوره کمتر گزارش شده است. تغذیه نقش مهمی در حفظ سلامتی و رفتار طبیعی، شکل ظاهری و بهبود عملکرد تولیدمثلی در گونه‌های مختلف ماهیان دارد (Keshavanath, 2006). گونه باسیلوس رشد را بهبود می‌بخشد و مقاومت ماهی را در برابر بیماری‌ها افزایش می‌دهد، همچنین سبب بهبود کیفیت آب نیز می‌شود (Gatesoupe, 1999). بسیاری از لاکتوباسیلوس‌ها و باسیلوس‌های پروبیوتیکی دارای آنزیم‌های خارج سلولی از جمله آمیلاز، لیپاز و پروتئاز بوده و از طریق تحریک اشتها، افزایش متابولیسم میکروبی موجب ارتقاء سطح تغذیه توسط میزبان گشته (Irianto and Austin, 2002) و با افزایش قابلیت هضم و جذب بهتر مواد غذایی خورده شده، موجب افزایش کارایی تغذیه و بالطبع موجب رشد بیشتر در لارو ماهیان می‌گردند (Ghosh *et al.*, 2003). همچنین پروبیوتیک‌ها همراه با تغذیه لاروها و جاگیر شدن در دستگاه گوارش اثر میکروارگانیزم‌های مضر را از طریق رقابت با آن‌ها از بین می‌برند (Thompson, 1999). ماهی قزل آلا از مهمترین ماهیان پرورشی در کشور می‌باشد که پرورش آن در تمام کشور رواج دارد. در این مطالعه تأثیر ۵ گونه پروبیوتیکی شامل (باسیلوس لیچنی فورمیس *B. licheniformis*، باسیلوس ساب‌تیلیس *B. subtilis*، باسیلوس پلی میکسا *B. Polymyxa*، باسیلوس لتروس پروس *B. laterosporus* و باسیلوس سیرکولانس *B. circulans*) بر موازنه انرژی و ترشح آمونیاک و اوره مورد بررسی قرار گرفت. هدف از انجام این مطالعه استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان راهکاری در جهت کاهش نیتروژن دفعی بود که خود منجر به کاهش آلودگی محیطی، کاهش اثرات سمی و افزایش بازده اقتصادی می‌شود.

مواد و روش‌ها

سوسپانسیون باکتریایی و جیره‌های آزمایشی: گونه‌های باسیلوس‌های پروبیوتیکی تحت عنوان محصول تجاری پروتکسین آکواتک^۱ از شرکت نیکو تک (پروتکسین) تهیه شد. این فرآورده میکروبی شامل ۵ گونه از باسیلوس‌های پروبیوتیکی (*B. licheniformis*، *B. subtilis*، *B. Polymyxa*، *B. laterosporus* و *B. circulans*) بود. میزان حضور هر یک از باسیلوس‌های فوق‌الذکر در سوسپانسیون باکتریایی به ترتیب شامل ۳۸/۳۵، ۱۷/۵۴، ۸/۲۵، ۲۵/۰۷ و ۱۰/۷۸ درصد بود. از سوسپانسیون مخلوط باکتریایی، با استفاده از محلول نمکی نرمال استریل (۰/۰۸۷ NaCl)w/v رقت‌های سریالی در دامنه 10^{-1} تا 10^{-8} تهیه گردید (Rengpipat *et al.*, 1998). غلظت‌های

1. Protexin Aquatech. probiotic international limited. stoke. subHamodon. Somesset TA 146 QE united kingdom

مقطر استریل به ترتیب به‌طور جداگانه به ۱۰۰ گرم جیره که شامل غذای آغازین لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Biomar company in France) با میزان پروتئین و چربی خام یکسان (به ترتیب ۵۰ و ۱۲ درصد) مخلوط و مکمل سازی گردیدند. جهت حصول اطمینان از استقرار باکتری‌ها در دستگاه گوارش کشت باکتریایی داده شد و باکتری‌ها شناسایی شدند (Ghosh *et al.*, 2002). جیره‌های آزمایشی که به ترتیب تحت عنوان جیره ۱-Tau، ۲-Tau و ۳-Tau نامگذاری شدند، پس از یکنواخت شدن، در انکوباتور با دمای ۴۰°C (Nikoskelainen *et al.*, 2003)، در مدت ۵ ساعت خشک گردیدند (۱۰ درصد رطوبت). به دلیل مرطوب شدن و چسبیدن ذرات غذا به هم، جیره‌های مکمل سازی شده از الک‌های ریز چشمه (۰/۱ میلی‌متری) عبور داده شده و مطابق با نیاز لاروهای ماهی در اختیار آن‌ها قرار گرفتند. جیره تیمار شاهد با همین فرآیند ساخته شد، ولی به آنها هیچگونه باسیلوس پروبیوتیکی اضافه نگردید (Ghosh *et al.*, 2002). مقدار غذای مورد نیاز لاروهای قزل‌آلا به ازاء هر روز بر اساس جدول استاندارد (وزن توده ماهی و درجه حرارت آب) تعیین و در ابتدای دوره پرورش شش بار در روز و به دنبال رشد لاروها سه بار در روز بین آنها توزیع شد. باقیمانده غذایی نیز با استفاده از میکرو پی‌پت با دقت از ظروف جمع‌آوری گردید. این مقدار غذای جمع‌آوری شده از کل غذای عرضه شده کسر گردیده و غذای خورده شده روزانه محاسبه گردید (Ghosh *et al.*, 2003).

تیمارهای آزمایشی: تعداد ۵۶۰ قطعه لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از مرکز تکثیر ماهی قزل‌بی‌نظیر واقع در محور هراز تهیه شده و به آزمایشگاه شیلات دانشگاه گنبد منتقل شدند و با جیره‌های آزمایش مورد تغذیه قرار گرفتند. هر یک از تیمارها واجد ۳ تکرار و هر تکرار شامل ظروف ۱۶ لیتری دارای ورودی و خروجی آب بود که در هر یک از آن‌ها ۳۵ قطعه لارو ماهی قزل‌آلا با متوسط وزن اولیه 463 ± 32 میلی‌گرم معرفی شد. سرعت جریان ورودی آب به گونه‌ای بود که هر دقیقه یک لیتر آب وارد ظروف می‌شد. هوادهی مستمر توسط یک دستگاه پمپ الکتریکی هوا مدل هایلا صورت می‌گرفت.

اندازه‌گیری آمونیاک و اوره: اندازه‌گیری آمونیاک و اوره در انتهای دوره پس از ۶۰ روز غذادهی با پروبیوتیک‌ها، انجام گرفت. بدین صورت که تعداد ۵ ماهی به‌طور تصادفی از هر تکرار انتخاب شده و پس از وزن شدن، ماهیان هر تکرار به‌طور جداگانه، به مدت ۲۴ ساعت بدون هوادهی در ظروف ۱۶ لیتری قرار گرفتند. به‌منظور جلوگیری از تأثیر ترشحات نیتروژنی مربوط به باکتری‌ها و سایر میکروارگانیسم‌های آبزی همراه با نمونه تکرارهای آمونیاک و اوره، یک تانک ۱۶ لیتری از همان آب اما بدون ماهی نیز به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. در پایان ۲۴ ساعت نمونه آب از هر ظرف به‌طور جداگانه گرفته شده و سپس غلظت آمونیاک از طریق روش فنول-هیپوکلرید به صورت زیر تعیین شد (Solorzano, 1969). آمونیاک

کل از تفریق مقدار به دست آمده با مقدار آمونیاک تانک بدون ماهی بدست آمد. غلظت اوره با استفاده از آنزیم اوره آز محاسبه گردید (Elliott, 1976). در طول این آزمایش ماهیان تغذیه نشدند.

فاکتورهای اندازه‌گیری: نیتروژن دریافت شده (میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز) = (غذای خورده شده (میلی‌گرم) × درصد ماده خشک × درصد پروتئین) ÷ ۶/۲۵ (Engin and Carter, 2001)
انرژی دریافت شده (کیلوژول بر کیلوگرم در روز) = (وزن غذای خورده شده × درصد ماده خشک × انرژی غذا (کیلوژول) (Engin and Carter, 2001)

آمونیاک مترشحه (میلی‌گرم بر گرم در روز) = [آمونیاک نهایی (میلی‌گرم بر لیتر) - آمونیاک اولیه (میلی‌گرم بر لیتر)] × حجم آب ÷ [وزن توده ماهی در هر تانک (گرم)] (Engin and Carter, 2001)
اوره مترشحه (میلی‌گرم بر گرم در روز) = [اوره نهایی (میلی‌گرم بر لیتر) - اوره اولیه (میلی‌گرم بر لیتر)] × حجم آب ÷ [وزن توده ماهی در هر تانک (گرم)] (Engin and Carter, 2001)
انرژی تلف شده بر اساس آمونیاک مترشحه (کیلوژول بر کیلوگرم در روز) = آمونیاک مترشحه × ۲۴/۸۳ (کیلوژول بر گرم) (Brafield, 1985; Cockcroft and Du-Preez, 1990)
انرژی تلف شده بر اساس اوره مترشحه (کیلوژول بر کیلوگرم در روز) = اوره مترشحه × ۲۳/۰۳ (کیلوژول بر گرم) (Elliott, 1976)

انرژی کل تلف شده به انرژی خورده شده = (مجموع انرژی تلف شده بر اساس آمونیاک و اوره) - انرژی خورده شده از طریق جیره) × ۱۰۰ (Elliott, 1976)

معیارهای کیفی آب: در طول دوره آزمایش با استفاده از هواده الکتریکی (مدل هایلا)، اکسیژن محلول در سطح 7.87 ± 0.52 میلی‌گرم در لیتر حفظ گردید. اکسیژن محلول، قابلیت هدایت الکتریکی، دما، شوری و pH آب با استفاده از دستگاه واترچکر هانا^۱ مدل ۸۳۲۰۰ ساخت کشور آمریکا، به صورت روزانه اندازه‌گیری گردید. مقادیر فسفات، سولفات، نیتريت، نیترات، بیکربنات، کلسیم، منیزیم، سدیم و پتاسیم در هر هفته با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر هج^۲ مدل DI/۲۰۰۰ ساخت کشور آمریکا، انجام گردید. همچنین اندازه‌گیری درجه حرارت آب نیز در هر روز ۳ مرتبه همزمان با دفعات تغذیه لارو ماهیان انجام گرفت.

روش آماری، روش تجزیه و تحلیل داده‌ها: این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت و برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و تست Duncan در سطح ۵ درصد در برنامه SPSS ویرایش ۱۷ استفاده شد.

1. Hi, multi parameter photometer
2. Hach

نتایج

معیارهای کیفی آب به شرح جدول ۱ بدست آمدند.

جدول ۱ - معیارهای کیفی آب

معیار	شوری mg/lit	قابلیت هدایت اکتريکی µm/s	کدورت NTU	دما سانتی‌گراد	اکسیژن محلول mg/lit	پی‌اچ
مقدار	۲۳۵۰±۳۲/۴۱	۳۶۷۱/۸±۵۱/۷	۰/۸۹±۰/۱۴	۱۶/۲±۱/۳۵ ^{oC}	۷/۸۷±۰/۵۲	۷/۶±۰/۱۸

ادامه جدول ۱- معیارهای کیفی آب

معیار	فسفات mg/lit	سولفات mg/lit	نیتريت mg/lit	نترات mg/lit	بيکربنات mg/lit	کلسیم mg/lit	منیزم mg/lit	سدیم mg/lit	پتاسیم mg/lit
مقدار	۰/۳۶±۰/۰۸	۱۱۰۴±۱۵۴	۰/۰۱۳±۰/۰۰۱	۱۵/۸۴±۰/۲	۳۴۰±۲۷	۳۰۴±۱۴	۸۶/۴±۶/۵	۲۹۶±۶/۵	۱۲±۰/۵۱

درصد ترکیبات و مواد مغذی جیره مورد استفاده در این تحقیق بر اساس اطلاعات شرکت تولید کننده شامل پروتئین خام ۵۰٪، چربی خام ۱۲٪، انرژی خام ۴۵۰۰ کالری برگرم، ماده خشک ۹۰٪ و رطوبت ۱۰٪ بود. نتایج به‌دست آمده از تأثیر ترکیب پروبیوتیک‌ها بر دفع نیتروژن در جدول ۲ ذکر شده است. میزان نیتروژن (که براساس پروتئین خام جیره به‌دست آمده است) و میزان انرژی دریافت شده در همه تیمارهای آزمایشی برابر است. در این مطالعه مشخص شد بیشترین مقدار آمونیاک مترشحه در جیره شاهد (فاقد ترکیب پروبیوتیکی) و کمترین آن در تیمار Tau-۲ بوده است. نکته مثبت این که در همه تیمارهای آزمایشی میزان ترشح آمونیاک به نسبت گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$). همچنین کمترین میزان اوره مترشحه نیز در تیمار Tau-۲ مشاهده شد. میزان ترشح اوره و آمونیاک در تیمار Tau-۱ به نسبت دو تیمار Tau-۲ و Tau-۳ بیشتر بوده اما به نسبت شاهد کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$).

بیشترین میزان انرژی تلف شده بر اساس آمونیاک و اوره نیز به‌ترتیب از ۴۸/۷۷ و ۹/۰۵ کیلوژول بر کیلوگرم در روز تیمار شاهد به ۳۵/۷۱ و ۵/۶۴ کیلوژول بر کیلوگرم در روز در تیمار Tau-۲ کاهش یافت. کمترین میزان انرژی کل تلف شده از طریق ترشح آمونیاک و اوره نیز در تیمار Tau-۲ به‌دست آمد که با میزان به‌دست آمده در تیمار Tau-۳ تفاوت معنی‌داری نداشت. اما با شاهد و تیمار Tau-۱ اختلاف معنی‌داری نشان داد.

بررسی تاثیر باسیلوس های پروبیوتیکی بر انرژي مصرف شده و ترشح آمونیاک....

جدول ۲. مقادير ترشحات نيتروژنی لارو ماهی قزل آلاي تغذیه شده با جیره مکمل شده با باسیلوس های پروبیوتیکی

سطح پروبیوتیک CFU/ml				پارامتر	صفر شاهد
1×10^4 CFU/ml Tau-۳	1×10^7 CFU/ml Tau-۲	1×10^6 CFU/ml Tau-۱			
۵۶۵/۷۰	۵۶۵/۷۰	۵۶۵/۷۰	۵۶۵/۷۰	نيتروژن مصرفی (میلی گرم بر کیلوگرم در روز)	۵۶۵/۷۰
۱۳۳/۰۱	۱۳۳/۰۱	۱۳۳/۰۱	۱۳۳/۰۱	انرژي مصرفی (کیلوژول بر کیلوگرم در روز)	۱۳۳/۰۱
$1/47 \pm 0/12^c$	$1/44 \pm 0/12^c$	$1/7 \pm 0/08^b$	$1/96 \pm 0/13^a$	آمونیاک مترشحه (میلی گرم بر گرم در روز)	$1/96 \pm 0/13^a$
$0/26 \pm 0/04^c$	$0/25 \pm 0/03^c$	$0/34 \pm 0/01^b$	$0/39 \pm 0/02^a$	اوره مترشحه (میلی گرم بر گرم در روز)	$0/39 \pm 0/02^a$
$36/52 \pm 2/89^c$	$35/71 \pm 3/05^c$	$42/14 \pm 1/95^b$	$48/77 \pm 3/26^a$	انرژي تلف شده بر اساس آمونیاک مترشحه (کیلوژول بر کیلوگرم در روز)	$48/77 \pm 3/26^a$
$5/89 \pm 0/98^c$	$5/64 \pm 0/69^c$	$7/75 \pm 0/18^b$	$9/05 \pm 0/46^a$	انرژي تلف شده بر اساس اوره مترشحه (کیلوژول بر کیلوگرم در روز)	$9/05 \pm 0/46^a$
$31/89 \pm 2/88^c$	$31/09 \pm 2/37^c$	$37/51 \pm 1/6^b$	$43/47 \pm 2/7^a$	انرژي کل تلف شده از طریق ترشح آمونیاک و اوره به انرژي مصرفی (درصد)	$43/47 \pm 2/7^a$

حروف لاتین غیر یکسان در هر ردیف نشانه معنی دار بودن می باشد ($P < 0/05$).

بحث و نتیجه گیری

در ماهیان استخوانی ترشحات نيتروژنی حدود ۷۰ تا ۹۰ درصد به شکل آمونیاک از بدن خارج می شود (Dosdat, 1996). در نتیجه اندازه گیری نرخ ترشح آمونیاک و اوره هم در اثرات مختلف زیست محیطی آمونیاک و هم در چگونگی میزان متابولیسم پروتئین ها کمک شایانی می کند و بینش کلی نسبت به توازن نيتروژن در بدن ماهی می دهد (Remen *et al.*, 2008; Lam *et al.*, 2008).

در این بررسی تاثیر ترکیب پنج پروبیوتیک در چهار گروه و سه غلظت بر دفع نيتروژن در لارو ماهی قزل آلا مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که باسیلوس های پروبیوتیکی می توانند باعث کاهش دفع اوره و آمونیاک شده و میزان پروتئین لاشه را افزایش دهند (Sargazi *et al.*,

2014c). در همین راستا مشاهده شد که در تمامی لاروهایی که از جیره‌های مکمل سازی شده با پروبیوتیک‌ها تغذیه شده بودند، میزان نیتروژن دفعی در مقایسه با لاروهای تغذیه شده با جیره پایه کاهش محسوسی نشان داد. با اندازه‌گیری مقادیر ازت متابولیکی مترشحه، مقادیر ازت آمونیاکی و اوره در تیمارهای تحت تأثیر پروبیوتیک‌ها در حد معنی‌داری کاهش یافت که به تبع از آن انرژی از دست داده شده در این خصوص نیز کاهش پیدا کرد. کمترین میزان ترشح اوره (۰/۲۵ میلی‌گرم بر گرم در روز) و آمونیاک (۱/۴۴ میلی‌گرم بر گرم در روز) در تیمار ۲-Tau بود که اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد داشت (P < ۰/۰۵). فرامرزی و همکاران (Faramarzi et al., 2011)، نیز در مطالعه‌ای روی تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) به نتایج مشابه‌ای دست یافتند.

در پاسخ به مصرف غذا میزان آمونیاک ترشح شده به شدت افزایش می‌یابد (Jobling, 1981) و بیشتر نیتروژن دفع شده از دامینه شدن اسیدهای آمینه پروتئین‌ها در جیره به دست می‌آید (Wood, 1993; Brunty et al., 1997). در نتیجه فرآیند دامینه شدن مواد نیتروژنی و دی‌اکسیدکربن تولید می‌شود. یکی از دلایل احتمالی کاهش دفع آمونیاک و اوره در تیمارهایی که از جیره حاوی پروبیوتیک تغذیه کرده بودند می‌تواند به علت کسب انرژی ماهی از منابعی مانند چربی‌ها و قندها باشد که در نتیجه آن پروتئین کمتر دامینه شده و مواد نیتروژنی کمتری نیز دفع می‌شود. در این بررسی جهت بررسی این احتمال میزان دی‌اکسید کربن تولیدی اندازه‌گیری شد و نتیجه حاکی از آن بود که تولید دی‌اکسیدکربن در تیمارهای پروبیوتیکی در مقایسه با شاهد کاهش یافته بود (Sargazi et al., 2014b). نتیجه اینکه پروتئین بیشتر در بدن ذخیره شده و رشد را بهبود بخشیده است. از سوی دیگر کاهش دفع مواد زائد نیتروژنی نیز شرایط مناسب‌تری برای ماهیان ایجاد کرده که خود می‌تواند علت دیگری بر رشد مضاعف لاروها باشد. چنین نتایجی در مطالعات مربوط به رشد لاروهای ماهی در همین مطالعه مشاهده شد (Sargazi et al., 2014a). همچنین این احتمال نیز وجود دارد که باسیلوس‌ها همراه با غذا وارد تانکرهای اصلی شده و به بدن ماهی چسبیده و پس از انتقال ماهی‌ها به تانکرهای جدید برای اندازه‌گیری میزان آمونیاک مترشحه در آب ساکن فعال شده و شروع به استفاده از آمونیاک و نیتريت و سایر مواد زائد نیتروژنی برای تبدیل آنها به بیوماس باکتریایی کرده است (Sreedevi and Ramasubramanian, 2011).

در مشابهت با تحقیق حاضر جمالی و همکاران (Jamali et al., 2012)، با استفاده از غنی سازی آرتمیا پارتنوژنتیکا (*Artemia parthenogenetica*) با باسیلوس‌های گرم مثبت نشان دادند که این پروبیوتیک‌ها می‌توانند باعث کاهش اوره و آمونیاک ترشح شده شوند و میزان پروتئین لاشه را از ۷۲/۹۰٪ در تیمار شاهد به ۷۵/۶۶٪ در تیمار سوم با غلظت 3×10^8 CFU/l افزایش دهند. همچنین لشکرلوکی و همکاران (Lashkarbolouki et al., 2011)، گزارش کرد که غنی سازی دافنی (*Daphnia sp.*) با عصاره مخمر

Saccharomyces cerevisiae) با نام تجاری A-max باعث کاهش ترشح اوره و آمونیاک شده و پروتئین لاشه را در تاس‌ماهی ایرانی افزایش می‌دهد.

برخی محققین ثابت کرده‌اند که یک رابطه خطی بین نیتروژن دریافتی و میزان اوره دفعی در سپر ماهی (Verbeeten *et al.*, 1999) و مارماهی (Knights, 1985) وجود دارد. این مکانیسم روشن نیست اما به نظر می‌رسد تطابق معنی‌داری از لحاظ سنتز اوره در برخی از ماهیان استخوانی در هنگام سم‌زدایی آمونیاک در زمان‌هایی که آمونیاک آزاد نمی‌تواند در محیط دفع شود، مانند غلظت بالای آمونیاک زیست محیطی وجود دارد (Walsh, 1998). در این بررسی میزان اوره مترشحه حدود ۲۰ درصد کل مواد نیتروژنی بود که در تیمارهای پروبیوتیکی ۳ درصد کاهش یافته و به ۱۷ درصد کل مواد نیتروژنی می‌رسد. خسروی کتولی و همکاران (Khosravikatoili *et al.*, 2012)، در استفاده از مخلوط چند پروبیوتیک شامل باسیلوس لیچنی فورمیس، باسیلوس سوبتلیس و مخمر ساکرومایسس سرویزیا مشاهده کردند که اوره مترشحه از ۲۹/۸۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز در تیمار شاهد به ۲۴/۷۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز در تیمار سوم آزمایشی کاهش یافت. گوش و همکاران (Ghosh *et al.*, 2003)، نیز با استفاده از باسیلوس‌های پروبیوتیکی در ماهی روهو مشاهده کردند که درصد آمونیاک و اوره ترشحه در تیمار با غلظت $1/5 \times 10^8$ CFU/L نسبت به سایر تیمارها با غلظت‌های $1/5 \times 10^6$ CFU/L و $1/5 \times 10^7$ CFU/L و شاهد بالاتر بود.

باتوجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق مشخص شد که ترکیب پروبیوتیکی پنج گونه باکتری جنس باسیلوس می‌تواند روی میزان نیتروژن مترشحه مؤثر باشد. به‌طوری‌که با افزایش میزان غلظت پروبیوتیک‌ها در جیره، میزان ترشح آمونیاک و اوره به‌طور چشمگیری کاهش یافت. این مسئله از طرفی بر رشد ماهی تاثیر مثبت دارد (به خاطر جلوگیری از اتلاف انرژی) و از طرف دیگر سبب کاهش ترشح آمونیاک و اوره و کاهش آلودگی‌های محیط در تیمارهای پروبیوتیکی و افزایش کیفیت آب نیز می‌شود.

منابع

- Adhikari S. 1999. Ammonia toxicity in aquafarming. *Fish Chimes.*, 19(3): 20–22.
- Avnimelech Y. 2009. *Biofloc Technology A Practical Guide Book*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. (United States).
- Brafield A.E. 1985. Laboratory studies of energy budgets. In: Tytler P., Calow P (Eds.). *Fish Energetics, New perspectives*. Croom Helm, London, pp: 257–282.
- Brunty J.L., Bucklin R.A., Davis J., Baird C.D., Nordstedt R.A. 1997. The influence of feed protein intake on tilapia ammonia production. *Aquacultural Engineering*, 16: 161–166.

- Cockcroft A.C. Du-Preez H.H. 1990. Nitrogen and energy loss in the marine teleost *Lithognathus mormyrus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 140: 159–171.
- Dosdat A., Metailler R., Tetu N., Servais F., Chartois H., Huelvan C., Desbruyeres E. 1995. Nitrogenous excretion in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* under controlled conditions. *Aquaculture*, 26: 639–650.
- Dosdat A., Servais F., Metailler R., Huelvan C., Desbruyeres E. 1996. Comparison of nitrogenous losses in five teleost fish species. *Aquaculture*, 141: 107-127.
- Elliott J.M. 1976. Energy losses in the waste products of brown trout (*Salmo trutta* L.). *Animal Ecology*, 45: 561–580.
- Engin K., Carter C.G. 2001. Ammonia and urea excretion rates of juvenile Australian short-finned eel (*Anguilla australis australis*) as influenced by dietary protein level. *Aquaculture*, 199: 123-136.
- Faramarzi M. 2011. Enrichment of *Daphnia magna* with *Bacillus circulans* and *Bacillus licheniformis* to enhance growth and nutrition parameters and resistance against environmental stress and reduce ammonia nitrogen in *Acipenser persicus*. MSc. Thesis, Gonbad Kavoods University.
- Gatesoupe F.J. 1999. Review: The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180: 147-165.
- Ge'lineau A., Me'dale F., Boujard T. 1998. Effect of feeding time on postprandial nitrogen excretion and energy expenditure in rainbow trout. *Fish Biology*, 52: 655–664.
- Ghosh K., Sen S.K., Ray A.K. 2002. 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., Ray A.K. 2003. Supplementation of an isolated fish gut bacterium, *bacillus circulans*, in Formulated diets for Rohu, *Labeo rohita*, Fingerlings. *Bamidgeh*, 55(1): 13-21.
- Irianto A., Austin B. 2002. Probiotic in aquaculture, *Fish Diseases*, 25: 1-10.
- Jamali H. 2012. Bioencapsulation of *Artemia parthenogenetica* with gram positive bacilli for enhancement of growth and feeding parameters and survival rate in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. MSc. Thesis, Gonbad Kavoods University.
- Jobling M. 1981. Some effects of temperature, feeding and body weight on nitrogenous excretion in young plaice (*Pleuronectes platessa* L). *Fish Biology*, 18: 87–96.
- Kaushik S.J., Cowey C.B. 1990. Dietary factors affecting nitrogen excretion by fish. In: Cowey CB, ChoCY (Eds.). *Nutritional Strategies and Aquaculture Waste*, Proceedings of the First International Symposium on Nutritional Strategies in Management of Aquaculture Waste, Ontario, University of Guelph, Canada, pp: 3–19.

- Keshavanath P., Patil P. 2006. Nutrition in ornamental fishes. *Fish Chemistry*, 26(8):13-17.
- Khosravi katoli K.H., Jafaryan H., Abdollahi D., Tavana D. 2012. Ammonia and urea excretion rates of silver carp larvae affected by food supplementation Combination of probiotic. *Modern Veterinary Researches*, (3)10: 55-61.
- Knights B. 1985. Energetics and fish farming. In: Tytler P, Calow P (Eds.). *Fish Energetics: New Perspectives*. Johns Hopkins University, Press, Baltimore, pp: 309-341.
- Lam S.S., Ambak M.A., Juash A., Law A.T. 2008. Waste excretion of marble goby (*Oxyeleotris marmorata* Bleeker) fed with different diets. *Aquaculture*, 27: 49-56.
- Lashkarbolouki M., Jafaryan H., Faramarzi M., Zabihi A., Adineh H. 2011. The effect of feeding with *Saccharomyces cerevisiae* extract (Amax) on ammonia and urea excretion in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) larvae by bioenrichment of *Daphnia magna*. *Research in Biology*, 2: 110-115.
- Lihua S., Haoru C.H. 2009. Effects of ration and temperature on growth, fecal production, nitrogenous excretion and energy budget of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 292: 197-206.
- Naylor R.L., Goldberg R.J., Primavera J.H., Kautsky N., Beveridge M.C.M., Clay J., Folke C., Lubchenco J., Mooney H., Troell M. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405: 1017-1024.
- Nikoskelainen S., Ouwehand A.C., Bylund G., Salminen S., Lilius E.M. 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish and Shellfish Immun.*, 15: 443-452.
- Rahaman E., Donell M., Pilley C.M. 1996. Excretion and distribution of ammonia and the influence of boundary layer acidification in embryonic Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Experimental Biology*, 199: 2713-2723.
- Ramnarine I.W., Pirie J.M., Johnstone A.D.F., Smith G.W. 1987. The influence of ration size and feeding frequency on ammonia excretion by juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua* L). *Fish Biology*, 31: 545-559.
- Remen M.A.K., Imsland S.O., Jonassen S., Foss A. 2008. Interactive effect of ammonia and oxygen on growth and physiological status of juvenile Atlantic Cod (*Codrus morhuo*). *Aquaculture*, 274: 292-299.
- Rengpipat S., Phianphak W., Piyatiratitvorakul S., Menasveta P. 1998. Effects of probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture*, 167: 301-313.
- Sargazi H., Jafaryan H., Yelghi S., Farhangi M. 2014a. The role of probiotic bacillus on the growth and survival in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. 2nd International Conference on the Persian Gulf Oceanography, February 18-19, Tehran, Iran.

- Sargazi H., Jafaryan H., Yelghi S., Farhangi M. 2014b. Improve water quality farming fish by reducing the amount of CO₂ and O₂ uptake, by adding a mixture of probiotics in the diet. The First National Conference on Natural Resources Management, February 27, Gonbad, Iran.
- Sargazi H., Jafaryan H., Yelghi S., Farhangi M. 2014c. Effect of different dietary probiotic bacillus on body composition, feed conversion ratio and specific growth rate of Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) larvae. The Second Iranian Conference of Ichthyology, May 7-8, Karaj, Iran.
- Shingles A., McKenzie D.J., Taylor E.W., Butler P.J., Cerandini S. 2001. Effects of sublethal ammonia exposure on swimming performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Experimental Biology*, 204: 2691-2698.
- Solorzano L. 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenol-hypochlorite method, *Limnology and Oceanography*, 14: 799-801.
- Sreedevi P.R., Ramasubramanian V. 2011. Biocontrol of ammonia pollution in the rearing water of fish by inducing a heterotrophic bacterial-based food chain in the medium, *Aquaculture International*, 19: 789-796.
- Sun L., Chen H., Huang L. 2007. Growth, fecal production, nitrogen excretion and energy budget of juvenile yellow grouper (*Epinephelus awoara*) relative to ration level. *Aquaculture*, 264: 228-235.
- Thompson F.L., Abrea P.C., Cavalli R. 1999. The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae. *Aquaculture*, 174(1-2): 139-153.
- Till L., Ferling H., Maike G., Rolf N., Rita T. 2003. Development and subcellular effects of chronic exposure to sub-lethal concentration of ammonia in brown trout (*Salmo trutta fario*) early life stages. *Aquatic Toxicology*, 65: 39-54.
- Verbeeten B.E., Carter C.G., Purser G.J. 1999. The combine effect of feeding time and ration on growth performance and nitrogen metabolism of greenback flounder. *Fish Biology*, 55: 1328-1344.
- Walsh P.J. 1998. Nitrogen excretion and metabolism. In: Evans DH (Eds.). *The Physiology of Fishes*. CRC Press, Boca Raton, pp: 199-214.
- Wood C.M. 1993. Ammonia and urea metabolism and excretion. In: Evans DH (Eds.). *Physiology of Fishes*. CRC Press, Boca Raton, pp: 379-425.