



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره ششم، شماره سوم، پاییز ۹۷

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

تأثیر بکارگیری دو نوع از آنزیم‌های کربوهیدراتی (سلولاز و آلفا آمیلاز)

بر عملکرد رشد و فلور باکتریایی روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

Oncorhynchus mykiss (Walbaum, 1792)

عارف حشمتی^۱، عبدالمحمد عابدیان کناری^{۲*}

^۱ دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

^۲ آستاد، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

تاریخ ارسال: ۹۵/۶/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۶

چکیده

مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثر استفاده از آنزیم‌های سلولاز و آلفا آمیلاز بر رشد، فلور باکتریایی روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) به مدت ۸ هفته طراحی و اجرا گردید. تعداد ۲۴۰ قطعه بچه ماهی قزل-آلای رنگین‌کمان (میانگین وزنی $13/33 \pm 0/72$ گرم) در هشت تیمار آزمایشی (در سه تکرار) شامل دو سطح کربوهیدرات (۲۰ و ۳۰ درصد) سه نوع آنزیم (آمیلاز، سلولاز و مخلوط دو آنزیم به نسبت مساوی) و دو گروه شاهد (بدون آنزیم در دو سطح کربوهیدرات ۲۰ و ۳۰ درصد)، در ۲۴ مخزن فایبر گلاس (۱۰۰ لیتری) به تعداد ۱۰ قطعه توزیع شدند. غذادهی سه بار در روز و در حد سیری صورت گرفت. در انتهای دوره آزمایش، ۱۰ ماهی از هر تکرار مورد سنجش فاکتورهای رشد اندازه‌گیری شدند و از هر تکرار ۲ عدد ماهی به صورت تصادفی جهت سنجش فلور باکتریایی کل و لاکتوباسیلوس‌های روده نمونه‌برداری شد. میان تیمارها در شاخص افزایش وزن تفاوت معنی‌دار نبود. کمترین ضریب تبدیل غذایی نیز در تیمار ۱ و ۶ مشاهده شد. بیشترین و کمترین میزان فلور باکتریایی روده به ترتیب در تیمار مخلوط آنزیم (۱:۱) با کربوهیدرات ۳۰ درصد و تیمار شاهد با کربوهیدرات ۲۰ درصد مشاهده گردید، به‌طور کلی نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق نشان داد که استفاده از آنزیم در تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان موجب تغییر در جمعیت باکتریایی روده می‌گردد و در برخی تیمارها بر شاخص‌های تغذیه‌ای تأثیر مثبت مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: *O. mykiss*، سلولاز، آلفا آمیلاز، فلور باکتریایی روده، فاکتورهای تغذیه‌ای

*نویسنده مسئول: aabedian@modares.ac.ir

مقدمه

تقاضای رو به رشد برای مصرف ماهی و محدود بودن ذخایر طبیعی موجب توسعه آبی‌پروری در جهان شده است که علت آن را می‌توان به کیفیت بالای پروتئین، اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب مفید ماهی اشاره نمود (FAO, 2008). ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) باتوجه به کیفیت گوشت و بازار پسندی به‌عنوان یک گونه ارزشمند در میان ماهیان پرورشی محسوب می‌شود (Hebb *et al.*, 2003). موفقیت و توسعه پایدار صنعت آبی‌پروری بستگی به کاهش هزینه‌های پرورش دارد که در این بین هزینه خوراک ۵۰ تا ۶۰ درصد هزینه کل را در بر می‌گیرد و گران‌ترین ماده تشکیل دهنده غذای ماهی، پودر ماهی است (Sinha *et al.*, 2011). از این رو تحقیقات گسترده‌ای در راستای جایگزینی پودر ماهی با مواد پروتئینی گیاهی انجام شده است (Castillo and Gatlin, 2015). اختلاط مواد مشتق شده از گیاهان در غذای ماهیان روز به روز در حال افزایش است و یکی از محدودیت‌های اصلی در استفاده از مواد گیاهی حضور پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای در گیاهان است (Hebb *et al.*, 2003). ماهی و دیگر حیوانات تک‌معدده‌ای آنزیم‌هایی مانند سلولاز بتا گلوکاناز بتا زایلاناز که بر هضم پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای مؤثرند را ندارند (Kuz'mina, 1996). آلفا آمیلاز گلیکوزیدهایی هستند که پلیمرهای آلفا ۱ به ۴ را هیدرولیز می‌کنند، پیوندهای آلفا ۱ به ۴ داخلی را به‌طور تصادفی می‌شکنند و به الیگو ساکاریدهایی ۲ تا ۶ ملوکول گلوکز تبدیل می‌کنند (Wong, 2013). آنزیم‌های سلولازی پیوندهای بتا ۱ به ۴ گلیکوزیدی ملوکول سلولز را به‌طور تصادفی می‌شکنند و قطعات الیگوساکاریدی تولید می‌کنند (Bayer *et al.*, 2007). آنزیم‌های خارجی با کاهش طول زنجیره کربوهیدرات‌ها و تولید الیگومرها و پلیمرهای کوچک‌تر باعث افزایش بستر مورد نیاز باکتری‌ها شده و در نتیجه تغییر جمعیت باکتری‌های روده را ایجاد می‌کنند (Bedford *et al.*, 2001). از این رو در این تحقیق استفاده از دو آنزیم خارجی آلفا‌آمیلاز و سلولاز جهت بهبود عملکرد غذای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان حاوی دو سطح کربوهیدرات ۲۰ و ۳۰ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ساخت جیره: این آزمایش در آذر سال ۱۳۹۴ در آزمایشگاه آبی‌زیان دانشگاه تربیت مدرس اجرا شد. در این آزمایش از آنزیم سلولاز و آلفا‌آمیلاز شرکت Orba (استانبول-ترکیه) استفاده گردید. اقلام غذایی از کارخانه خوراک دام و آبی‌زیان مازندران (ساری-ایران) تهیه و پس از آنالیز اقلام غذایی جدول ۱ توسط نرم افزار Lindo جیره‌ها ساخته شد.

تأثیر بکارگیری دو نوع از آنزیم‌های کربوهیدرانی (سلولاز و آلفا آمیلاز)...

جدول ۱- تجزیه تقریبی مواد اولیه مورد استفاده در جیره غذایی (بر حسب درصد ماده خشک) قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*)

شاخص مواد اولیه	رطوبت (درصد)	پروتئین (درصد)	چربی (درصد)	کربوهیدرات (درصد)	خاکستر (درصد)
پودر ماهی	۱۵	۷۲	۴/۵۶	۱/۱۲	۲۱/۹۲
سویا	۹	۵۱/۶۹	۰/۸۸	۴۱/۹۹	۵/۴۳
آرد گندم	۱۱	۱۰/۹۱	۰/۷۷	۸۷/۱۷	۱/۱۴

سپس کلیه مواد اولیه براساس فرمول‌های نوشته شده جدول (۲) توزین شدند. برای ساخت جیره‌ها مواد خشک با هم مخلوط شدند. مواد معدنی، ویتامینی و نیز روغن‌ها اضافه شد و توسط چرخ گوشت با چشمه ۳/۵ میلی‌متر پلت شدند. سپس پلت‌ها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت در خشک‌کن نگهداری گردید تا خشک شوند (Abedian Kenari et al., 2011). بعد از سرد شدن، آنزیم‌ها با روغن مخلوط و روی جیره‌ها اسپری شد و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری شد (Castillo and Gatlin, 2015). جهت حصول از مطابقت جیره‌های ساخته شده با فرمول مورد نظر جیره‌ها دوباره مورد سنجش قرار گرفتند.

جدول ۲- فرمول جیره ساخته شده برای تغذیه قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*)

اقلام غذایی*	جیره دارای کربوهیدرات ۳۰٪	جیره دارای کربوهیدرات ۲۰٪
پودر ماهی	۳۰	۴۵
پودر سویا	۳۱/۳۵۹	۱۰/۷۲
آرد گندم	۱۸/۹۶۵	۱۷/۲۲۴
روغن ماهی	۴/۳۶۷۵	۶/۳۲۴۵
روغن سویا	۴/۳۶۷۵	۶/۳۲۴۵
لسیتین	۰/۵	۰/۵
دی کلسیم فسفات	۱	۱
مکمل معدنی**	۵	۵
مکمل ویتامینه***	۳	۳
ضد قارچ	۰/۲۵	۰/۲۵
پر کننده	۱/۱۷۱	۴/۶۳۷
آنتی اکسیدان (BHT) ****	۰/۰۲	۰/۰۲

* اقلام غذایی از کارخانه خوراک دام و آبزیان مازندران (ساری - ایران) تهیه گردید.

** هر کیلوگرم مکمل معدنی حاوی آهن (۶ گرم)، روی (۱۰ گرم)، سلنیوم (۲۰ میلی‌گرم)، کبالت (۱۰۰ میلی‌گرم)، مس (۶۰۰ میلی‌گرم)، منگنز (۵ گرم)، بید (۴۰۰ میلی‌گرم)، کولین کلراید (۶۰ گرم)

*** هر ۵ کیلوگرم مکمل ویتامینه ۰/۵ درصد حاوی ویتامین‌های E=۱۵۰ IU, D_۳=۲۰۰۰۰۰ IU, A=۸۰۰۰۰۰ IU, B_۱=۰/۰۵/gr.

B_۲=۲۰۰ gr, B_۳=۸۰ gr, B_۴=۱۵۰ gr, B_۵=۴۰ gr, B_۶=۵۰ gr, B_۷=۵۰ gr, K_۲=۵۰ gr, Enositol=۵۰۰ gr, C=۵۰۰ gr

**** Butylated Hydroxyl Toluene

درصد آنالیز جیره‌های آزمایشی در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳- آنالیز تقریبی جیره‌های آزمایشی (درصد ماده خشک) قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*)

آنالیز تقریبی	جیره ۲۰٪ کربوهیدرات	جیره ۳۰٪ کربوهیدرات
پروتئین خام (/.)	۴۰/۵۱	۴۰/۵۸
چربی خام (/.)	۱۵/۵	۱۱/۲۲
خاکستر (/.)	۲۳/۵۷	۱۸/۱۲
کربوهیدرات (/.)	۲۰/۴۲	۳۰/۰۸
رطوبت (/.)	۲/۹۶	۲/۶۶
انرژی کل (Kj/g)	۱۹/۱۹	۱۹/۱۸

روش پرورش: بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی (۱۳/۳۳ گرم) از شرکت قزل سخت‌سر شمال تهیه و برای انجام آزمایش به آزمایشگاه تحقیقات آبزیان دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس انتقال یافت. پس از انجام مرحله سازگاری به مدت ۱۰ روز، ۲۴۰ قطعه به‌طور تصادفی در ۲۴ تانک فایبرگلاس (۱۰۰ لیتری) با حجم آب ۸۰ لیتر به میزان ۱۰ قطعه در هر تانک توزیع شد. غذادهی ماهیان در حد سیری ظاهری در ۳ وعده (ساعت ۸، ۱۳ و ۱۸) انجام گرفت. آزمایش در یک سالن سرپوشیده با دوره‌ی نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی انجام شد. میزان دمای آب ۱۴ تا ۱۶ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۸ تا ۹ میلی‌گرم در لیتر و pH ۷/۴ تا ۸/۴ به ثبت رسید. مدت اجرای پروژه ۸ هفته و تعویض آب مخازن روزانه بود.

تیمارهای غذایی: تیمارهای غذایی شامل دو سطح کربوهیدرات ۲۰ و ۳۰ درصد و دو آنزیم آلفا‌امیلاز و سلولاز بودند، جدول (۴).

جدول ۴- تیمارهای غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) بر اساس میزان کربوهیدرات مورد استفاده و آنزیم‌های اضافه شده به جیره

درصد کربوهیدرات آنزیم	جیره دارای کربوهیدرات ۲۰ درصد	جیره دارای کربوهیدرات ۳۰ درصد
بدون آنزیم (شاهد)	تغذیه ماهی در کل دوره با کربوهیدرات ۲۰ درصد (تیمار ۱)	تغذیه ماهی در کل دوره با کربوهیدرات ۳۰ درصد (تیمار ۵)
آلفا‌امیلاز	تغذیه ماهی در کل دوره با کربوهیدرات ۲۰ درصد و آلفا‌امیلاز ۵۰۰ mg/kg (تیمار ۲)	تغذیه ماهی در کل دوره با کربوهیدرات ۳۰ درصد و آلفا‌امیلاز ۵۰۰ mg/kg (تیمار ۶)
سلولاز	تغذیه ماهی در کل دوره با کربوهیدرات ۲۰ درصد و سلولاز ۵۰۰ mg/kg (تیمار ۳)	تغذیه ماهی در کل دوره با کربوهیدرات ۳۰ درصد و سلولاز ۵۰۰ mg/kg (تیمار ۷)
مخلوط سلولاز و آلفا‌امیلاز	تغذیه ماهی در کل دوره با کربوهیدرات ۲۰ درصد و مخلوط آلفا‌امیلاز ۲۵۰ mg/kg و سلولاز ۲۵۰ mg/kg (تیمار ۴)	تغذیه ماهی در کل دوره با کربوهیدرات ۳۰ درصد و مخلوط آلفا‌امیلاز ۲۵۰ mg/kg و سلولاز ۲۵۰ mg/kg (تیمار ۸)

آزمایش میکروبی روده: قبل از نمونه‌برداری برای انجام آزمایشات میکروبی غذادهی ماهیان ۲۴ ساعت قطع شد. برای کشت باکتریایی ۶ ماهی از هر تیمار به‌طور تصادفی انتخاب گردید. به‌منظور شمارش باکتری‌های روده، سطح پوست ماهیان با الکل ضدعفونی کرده و با کمک پنس و قیچی استریل روده ماهیان بدون تماس با سطح بیرونی ماهی جدا شد. از نمونه‌های روده ماهی به میزان یک واحد برداشته و همراه با ۹ واحد سرم فیزیولوژی ۰/۸۵٪ به مدت ۲ دقیقه هموژن گردید. جهت شمارش باکتری‌های روده از مخلوط مذکور رقت‌های سریالی اعشاری (۱:۱۰) تهیه شد (Gonzalez *et al.*, 1999). جهت شمارش لاکتوباسیلوس‌های روده از محیط کشت deMan Rogosa and Sharp Agar MRS (Merk-Germany) استفاده شد. بعد از ساخت محیط کشت ۰/۱ ml نمونه با میکروسمپلر به پتری‌دیش خالی منتقل شده و سپس یک لایه محیط کشت آماده به نمونه اضافه شد و جهت مخلوط شدن نمونه با محیط کشت پتری‌دیش به‌صورت سینوسی تکان داده شد. پس از سرد شدن لایه اول، لایه نازک دیگری به لایه اول اضافه گردید. جهت شمارش فلور باکتریایی کل روده از محیط کشت (Plate Ceount Merk-Germany) استفاده شد. بعد از ساخت محیط کشت ۰/۱ ml از نمونه هموژن شده به پتری‌دیش حاوی محیط کشت PCA منتقل شد و به روش کشت سطحی، کشت داده شد. شمارش لاکتوباسیلوس‌های روده و فلور کل باکتریایی روده بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C انجام پذیرفت. همچنین برای تأیید نتایج آزمون، پلیت‌های تلفیق نشده همراه با سایر پلیت‌ها در انکوباتور قرار داده شدند. داده‌های حاصل از شمارش چشمی پلیت‌های مربوط به روده در عکس رقت ضرب شدند (Gonzalez *et al.*, 1999) و در نهایت داده‌ها به‌صورت لگاریتم تعداد کلنی در هر گرم از روده (log cfu/g) گزارش شد (Ben-Gigley *et al.*, 1998).

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد: در ابتدا دوره تمام بچه‌ماهیان با ترازو (دقت ۰/۰۱ گرم) توزین شده و پس از آن در انتهای دوره (۸ هفته) نیز کل ماهیان مورد سنجش وزنی و طولی قرار گرفتند. درصد زنده‌مانی و سایر شاخص‌های رشد شامل: افزایش وزن بدن (WG)، نرخ رشد ویژه (ضریب رشد ویژه)، ضریب تبدیل غذایی (ضریب تبدیل غذایی)، کارایی پروتئین (PER)، شاخص وضعیت (CF)، توسط روابط ذیل تعیین شدند (Fynn-Aikins *et al.*, 1992).

$100 \times (\text{تعداد کل ماهی اولیه} / \text{تعداد ماهی زنده مانده}) = \text{زنده مانی}$

$100 \times \text{دوره پرورش} / [\text{وزن ابتدایی (گرم)} - \text{وزن انتهایی (گرم)}] = \text{ضریب رشد ویژه}$

$\text{وزن تر به دست آمده (گرم)} / \text{مقدار غذای خشک داده شده (گرم)} = \text{ضریب تبدیل غذایی}$

$CF = 100 \times (\text{طول (سانتی‌متر)}^3 / \text{وزن نهایی})$

$WG = \text{وزن ابتدای (گرم)} - \text{وزن انتهایی (گرم)}$

$PER = \text{پروتئین مصرفی (گرم)} / \text{وزن تر تولید شده (گرم)}$

طراحی آزمایش و آنالیز آماری: این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی برنامه‌ریزی و اجرا گردید. تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به رشد لاکتوباسیلوس‌های روده و فلور کل باکتریایی با آزمون ANOVA و Two-way انجام شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون آماری دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. از نرم‌افزار SPSS-20 برای آنالیز آماری و Excel برای رسم نمودارها استفاده گردید.

نتایج

براساس نتایج به‌دست آمده (جدول ۵) بین تیمارهای آزمایشی شاخص افزایش وزن بدن تفاوت معنی دار آماری نداشت ($P > 0/05$). بین تیمارهای آزمایشی شاخص ضریب تبدیل غذایی تفاوت معنی دار داشت ($P \leq 0/05$) به‌طوری‌که بهترین ضریب تبدیل غذایی (کمترین مقدار) در تیمارهای ۱، ۲ و ۶ دیده شد. اختلاف ضریب رشد ویژه معنی دار بود ($P \leq 0/05$) به‌طوری‌که تیمار شاهد کربوهیدرات ۲۰ درصد بالاتر از سایر تیمارها بود و کمترین میزان در تیمار مخلوط آنزیم‌ها (۱:۱) کربوهیدرات ۲۰ درصد دیده شد و سایر تیمارها در یک سطح قرار داشتند. شاخص وضعیت نیز دارای اختلاف معنی دار بود ($P \leq 0/05$) به‌طوری‌که بالاترین میزان شاخص وضعیت در تیمار ۶ دیده شد و کمترین مقدار در تیمارهای ۵ و ۸ مشاهده شد و سایر تیمارها در یک سطح قرار داشتند. تفاوت معنی داری در شاخص زنده‌مانی و میزان کارایی پروتئین در میان تیمارها دیده نشد ($P > 0/05$).

جدول ۵- نتایج شاخص‌های رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) تغذیه‌شده با آنزیم‌های خارجی

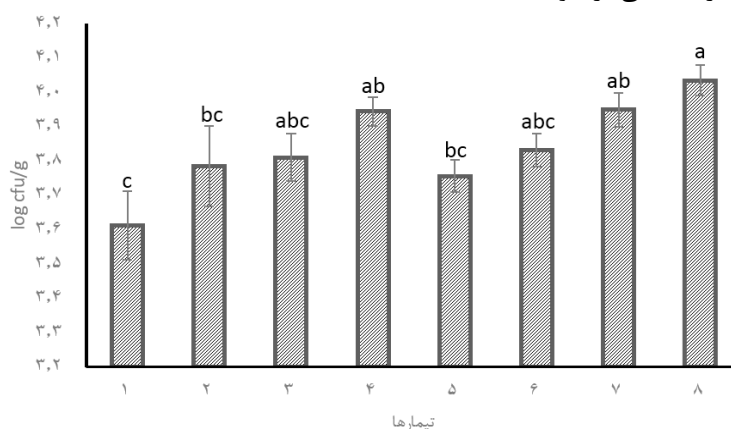
زنده مانی	شاخص وضعیت	افزایش وزن بدن (گرم)	میزان کارایی پروتئین	ضریب رشد ویژه	ضریب تبدیل غذایی	شاخص اندازه‌گیری تیمار
۱۰۰	۰/۹۹±۰/۰۶ AB	۳۶/۷۳±۲/۲۳ A	۲/۰۲±۰/۱۸ A	۲/۲۴±۰/۱۶ A	۰/۸۳±۰/۰۲ D	کربوهیدرات ۲۰ درصد بدون آنزیم (شاهد)
۱۰۰	۰/۹۹±۰/۰۴ AB	۳۶/۰۳±۱/۷۸ A	۲/۹۶±۰/۱۵ A	۲/۱۴±۰/۰۲ AB	۰/۸۴±۰/۰۱ D	کربوهیدرات ۲۰ درصد با آلفاآمیلاز
۱۰۰	۱/۰۱±۰/۰۵ AB	۳۴/۶±۲/۲۵ A	۲/۸۲±۰/۱۸ A	۲/۰۹±۰/۱۴ AB	۰/۸۹±۰/۰۲ C	کربوهیدرات ۲۰ درصد با سلولاز
۱۰۰	۱/۰۵±۰/۰۴ AB	۳۱/۷۳±۴/۸۷ A	۲/۵۹±۰/۰۴ A	۱/۹۵±۰/۱۹ B	۰/۹۸±۰/۱۶ A	کربوهیدرات ۲۰ درصد با مخلوط آنزیم‌ها (۱:۱)
۱۰۰	۰/۹۸±۰/۰۳ B	۳۲/۷۷±۳/۰۷ A	۲/۶۹±۰/۰۴ A	۲/۰۱±۰/۱۲ AB	۰/۹۴±۰/۰۲ B	کربوهیدرات ۳۰ درصد بدون آنزیم (شاهد)
۱۰۰	۱/۱۶±۰/۰۴ A	۳۵/۸۳±۲/۱ A	۲/۹۳±۰/۱۷ A	۲/۱۲±۰/۰۲ AB	۰/۸۵±۰/۰۱ D	کربوهیدرات ۳۰ درصد با آلفاآمیلاز
۱۰۰	۱/۰۴±۰/۰۲ AB	۳۶/۳۷±۳/۵۷ A	۲/۶۳±۰/۳۱ A	۲/۰۹±۰/۱۱ AB	۰/۹۶±۰/۱۳ BA	کربوهیدرات ۳۰ درصد با سلولاز
۱۰۰	۱/۰۲±۰/۰۳ AB	۳۲/۵±۳/۹ A	۲/۴۴±۰/۳۱ A	۱/۹۹±۰/۱۶ B	۰/۹۶±۰/۰۶ BA	کربوهیدرات ۳۰ درصد با مخلوط آنزیم‌ها (۱:۱)
-	۰/۳۱۴	۰/۱۹۲	۰/۲۸۲	۰/۳۰۶	.	اثر سطح آنزیم*
-	۰/۳۲۲	۰/۷۵۴	۰/۲۲۲	۰/۱۵۲	.	اثر سطح کربوهیدرات*
-	۰/۱۵۰	۰/۴۳۷	۰/۶۵۸	۰/۲۸۸	.	اثر متقابل*

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی دار است ($P \leq 0/05$).

* = میزان sig آزمون two way

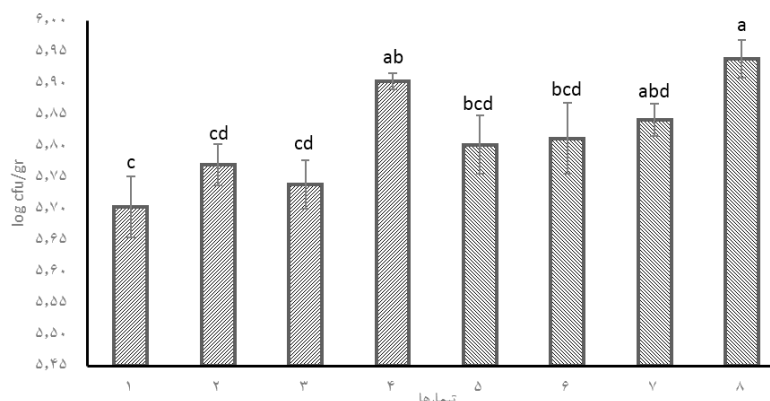
تأثیر بکارگیری دو نوع از آنزیم‌های کربوهیدرانی (سلولاز و آلفاآمیلاز)...

بالاترین مقدار فلور باکتریایی کل روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمار تغذیه شده جیره حاوی آنزیم‌های آلفاآمیلاز و سلولاز مخلوط با ۳۰ درصد کربوهیدرات ($\log=5/93 \pm 0/03$ cfu/ml) دیده شد و بعد آن در تیمار آلفاآمیلاز و سلولاز مخلوط (۱:۱) کربوهیدرات ۲۰ ($\log=5/9 \pm 0/01$ cfu/ml) دیده شد و کمترین مقدار نیز در تیمار شاهد کربوهیدرات ۲۰ ($\log=5/7 \pm 0/05$ cfu/ml) مشاهده گردید (شکل ۱). نتایج نشان داد که سطح آنزیم و سطح کربوهیدرات هر دو بر جمعیت فلور کل باکتریایی روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مؤثر بوده‌اند ($\text{Two-way ANOVA}, p \leq 0/05$) در حالی که اثر متقابل بین سطح آنزیم و سطح کربوهیدرات معنی‌دار نبود ($\text{Two-way ANOVA}, p \geq 0/05$).



شکل ۱- شمارش فلور کل باکتریایی روده قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) {۱: شاهد کربوهیدرات ۲۰٪؛ ۲: کربوهیدرات ۲۰٪ با آلفاآمیلاز؛ ۳: کربوهیدرات ۲۰٪ با سلولاز؛ ۴: کربوهیدرات ۲۰٪ با مخلوط آلفاآمیلاز و سلولاز (۱:۱)؛ ۵: شاهد کربوهیدرات ۳۰٪؛ ۶: کربوهیدرات ۳۰٪ با آلفاآمیلاز؛ ۷: کربوهیدرات ۳۰٪ با سلولاز؛ ۸: کربوهیدرات ۳۰٪ با مخلوط آلفاآمیلاز و سلولاز (۱:۱)} - حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است ($P \leq 0/05$).

بیشترین تعداد لاکتوباسیلوس‌های روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمار آلفاآمیلاز و سلولاز (۱:۱) در جیره حاوی ۳۰٪ کربوهیدرات به تعداد ($\log=4/03 \pm 0/04$ cfu/ml) دیده شد. بعد از آن در تیمار حاوی ۲۰٪ کربوهیدرات و آلفاآمیلاز و سلولاز مخلوط (۱:۱) به تعداد ($\log=3/94 \pm 0/04$ cfu/ml) مشاهده شد. تیمار شاهد کربوهیدرات ۲۰٪ در پایین‌ترین میزان قرار داشت (شکل ۲). نتایج نشان داد که آنزیم و کربوهیدرات بر جمعیت لاکتوباسیلوس‌ها مؤثر می‌باشد ($\text{Two-way ANOVA}, P \leq 0/05$) در حالی که اثر متقابل بین سطح آنزیم و جمعیت لاکتوباسیلوس‌ها معنی‌دار نبود ($\text{ANOVA}, P \geq 0/05$). (Two-way ANOVA).



شکل ۲- جمعیت لاکتوباسیلوس‌های روده در تیمارهای مختلف تغذیه قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*): ۱: شاهد کربوهیدرات ۲۰٪؛ ۲: کربوهیدرات ۲۰٪ با آلفا آمیلاز؛ ۳: کربوهیدرات ۲۰٪ با سلولاز؛ ۴: کربوهیدرات ۲۰٪ با مخلوط آلفا آمیلاز و سلولاز (۱:۱)؛ ۵: شاهد کربوهیدرات ۳۰٪؛ ۶: کربوهیدرات ۳۰٪ با آلفا آمیلاز؛ ۷: کربوهیدرات ۳۰٪ با سلولاز؛ ۸: کربوهیدرات ۳۰٪ با مخلوط آلفا آمیلاز و سلولاز (۱:۱) - حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است ($P \leq 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

باتوجه به اینکه تغذیه نقش مهمی در رشد آبزیان دارد (Sinha *et al.*, 2011)، استفاده از جیره غذایی با هضم‌پذیری مناسب نقش به‌سزایی در تأمین نیازهای آبی ایفا می‌کند. در مطالعه حاضر بالاترین رشد در تیمار شاهد حاوی کربوهیدرات ۲۰ درصد مشاهده شد اما تفاوت معنی‌داری بین تیمارها دیده نشد ($P > 0.05$) که با مطالعات قمی و همکاران (Ghomi *et al.*, 2012) که در تیمار آنزیم خارجی با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بالاترین رشد را مشاهده کرد، مطابقت ندارد. در مطالعه حاضر میزان ضریب تبدیل غذایی در تیمار شاهد و تیمار تغذیه شده با جیره‌های دارای ۲۰ درصد کربوهیدرات همراه با آلفا آمیلاز و ۳۰ درصد کربوهیدرات حاوی آلفا آمیلاز پایین‌ترین میزان بود و در سایر تیمارها بالاتر بود که شاید این تأثیر متفاوت به دلیل افزایش بیش از حد، کاهش اندازه الیگوساکاریدها و مونوساکاریدهای تولید شده باشد، در نتیجه باعث اسهال اسمزی می‌شود که باعث کاهش میزان هضم و جذب می‌شود و به طبع آن میزان ضریب تبدیل غذایی متفاوتی به دست می‌آید (Schutte, 1990). در تحقیقات قمی و همکاران (Ghomi *et al.*, 2012) نیز در میزان ضریب تبدیل غذایی با تغییر در میزان آنزیم نتایج متفاوتی حاصل شد. میزان به‌دست‌آمده ضریب رشد ویژه در مطالعه حاضر در تیمار شاهد حاوی ۲۰ درصد کربوهیدرات بالاتر از سایر تیمارها بود. در این تحقیق میزان کارایی پروتئین تفاوت معنی‌داری میان تیمارها وجود نداشت ($P > 0.05$). در این تحقیق هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه

شاهد و تیمارهای مختلف از نظر درصد بازماندگی مشاهده نشد ($P > 0/05$). کلیه تیمارها از بازماندگی بالایی برخوردار بودند که می‌تواند دلیل آن ایجاد شرایط مناسب تغذیه‌ای و رفع نیازهای غذایی در تمامی تیمارها در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان باشد. در مطالعه حاضر بالاترین میزان فاکتور وضعیت در تیمار آلفاآمیلاز کربوهیدرات ۳۰ درصد مشاهده شد. فرهنگی و کارتر (Farhangi and Carter, 2007) گزارش کردند آنزیم اثر معنی‌داری بر فاکتور وضعیت ندارد و به‌نظر آنها به‌دلیل تأثیر عواملی همچون مقدار، نوع و میزان سوبسترا نتیجه استفاده از آنزیم غیر قابل پیش‌بینی است.

فلور میکروبی طبیعی روده یک جز متابولیسی فعال دفاع میزبان است (Berg, 1996). فلور طبیعی، غنی‌ترین چالش آنتی‌ژن را به‌همراه یک اثر تحریکی قوی برای بلوغ بافت لنفوئید وابسته به روده برای میزبان فراهم می‌کند (Benno and Mitsuoka, 1986). تعدادی از گونه‌های باکتریایی موجود در فلور روده به‌طور بالقوه مضر حساب می‌شوند که علت این مساله، توانایی بالقوه آنها در تولید سموم، توانایی تهاجم مخاطی یا فعال سازی کارسینوژن‌ها و ایجاد پاسخ التهابی است (Salminen *et al.*, 1998). از جنس‌های باکتریایی غالب روده می‌توان به مواردی چون Clostridium, Eubacterium, Peptococcus, Isolauri, Escherchia و Veillonella, Bifidobacterium, Bacterioides, Lactobacillus اشاره نمود (et al., 2002). در این تحقیق مشخص گردید که با افزودن آنزیم‌های خارجی جمعیت باکتریایی تغییر می‌کند. جیره‌های دارای ۳۰ درصد کربوهیدرات نسبت به جیره‌های دارای ۲۰ درصد کربوهیدرات از مقدار باکتری بیشتری در روده برخوردار بودند. با مقایسه آنزیم‌ها دیده شد که ترکیب آنها اثر به مراتب بالاتری نسبت به اثر مجزای آنها داراست. باکتری‌هایی که دارای ویژگی بهبود دهنده سلامت هستند، بیفیدوباکتريا و لاکتوباسیلوس‌ها هستند (Freter, 1992). عملکرد اصلی فلور میکروبی روده فعالیت متابولیسی است که منجر به حفظ انرژی و مواد غذایی قابل جذب می‌شود همچنین می‌توان به آثار مهم تروفیک بر سلولهای اپی‌تیال روده و عملکرد ایمنی و حفاظت میزبان در برابر هجوم میکروبی بیگانه اشاره نمود (Guarner and Malagelada, 2003). براساس مطالعه جمعیت باکتری لاکتوباسیلوس‌ها در این تحقیق مشخص شد که با افزودن آنزیم جمعیت باکتریایی مفید نیز تغییر می‌کند. بالاترین تعداد باکتری‌های روده در تیمار آلفاآمیلاز و سلولاز مخلوط با ۳۰ درصد کربوهیدرات و بعد از آن تیمار مخلوط با ۲۰ درصد کربوهیدرات مشاهده شد. علت این افزایش این است که آنزیم‌های کربوهیدرات‌تازی با افزایش میزان سوبسترای در دسترس باکتری‌ها برای افزایش فعالیت آنها باعث افزایش بار باکتریایی روده می‌شوند (Bedford *et al.*, 2001). این افزایش جمعیت تا حدی باعث بهبود رشد می‌گردد و بیش از آن کارایی رشد را کاهش می‌دهد بر همین اساس گزارش شده است که تجمع بیش از حد باکتری‌ها در روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان سبب کاهش رشد می‌گردد (Sharifuzzaman and Austin, 2010).

ژو و همکاران (Zhou *et al.*, 2013) در تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که آنزیم‌های خارجی کربوهیدراتازی باعث افزایش تعداد باکتری‌های روده می‌گردد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. به‌عنوان یک نتیجه‌گیری کلی، می‌توان گزارش داد که با افزایش کربوهیدرات جیره غذایی، عملکرد آنزیم‌ها بهبود می‌یابد. به‌طوری‌که عملکرد تغذیه‌ای و تأثیر بر فلور باکتریایی روده، آنزیم‌ها در جیره‌های حاوی کربوهیدرات بالا نسبت به جیره‌های دارای کربوهیدرات پایین‌تر، بیشتر مشهود است.

منابع

- Abedian Kenari A.A., Sotoudeh E., Rezaei M.H. 2011. Dietary soybean phosphatidylcholine affects growth performance and lipolytic enzyme activity in Caspian brown trout (*Salmo trutta Caspius*) alevin. *Aquaculture Research*, 42(5): 655-663.
- Bayer E.A., Lamed R., Himmel M.E. 2007. The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3): 237-245.
- Bedford M.R., Apajalahti J., van der Poel A.F.B., Váhl J.L., Kwakkel R.P. 2001. Implications of diet and enzyme supplementation on the microflora of the intestinal tract. In: *Advances in Nutritional Technology. Proceedings of the 1st World Feed Conference*, Utrecht, Netherlands, pp: 197-206.
- Ben-Gigley B., Vieites Baptista de Sousa J.M., Villa T.G. 1998. Changes in biogenic amines and microbiological analysis in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage. *Journal of Food Protection*, 61(5): 608-615.
- Benno Y., Mitsuoka T. 1986. Development of intestinal microflora in humans and animals. *Life, Earth and Health Science*, 5(1):13-25.
- Berg R.D. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology*, 4(11): 430-435.
- Castillo S., Gatlin D.M. 2015. Dietary supplementation of exogenous carbohydrase enzymes in fish nutrition: a review. *Aquaculture*, 435: 286-292.
- FAO. 2008. The state of world aquaculture. Updated 2009. [Cited December 2009]. Available from: www.fao.org.
- Farhangi M., Carter C.G. 2007. Effect of enzyme supplementation to dehulled lupin-based diets on growth, feed efficiency, nutrient digestibility and carcass composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Research*, 38: 1274-1282.
- Freter R. 1992. Factors affecting the microecology of the gut. In: Fuller R (Eds.). *Probiotics: The scientific basis*. Springer Netherlands, pp: 111-144.
- Fynn-Aikins K., Hung S.S., Liu W., Li H. 1992. Growth lipogenesis and liver composition of juvenile white sturgeon fed different levels of D-glucose. *Aquaculture*, 105: 61-72.

- Gonzalez C.J., López-Díaz T.M., Prieto M., Otero A. 1999. Bacterial microflora of wild brown trout (*Salmo trutta*), wild pike (*Esox lucius*), and aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Food Protection*, 62(11): 1270-1277.
- Ghomi M.R., Shahriari R., Langroudi H.F., Nikoo M., von Elert E. 2012. Effects of exogenous dietary enzyme on growth, body composition, and fatty acid profiles of cultured great sturgeon *Huso huso* fingerlings. *Aquaculture International*, 20(2): 249-254.
- Guarner F., Malagelada J.R. 2003. Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 361(9356): 512-519.
- Hebb C.D., Castell J.D., Anderson D.M., Batt J., 2003. Growth and feed conversion of juvenile winter flounder (*Pleuronectes americanus*) in relation to different protein-to-lipid levels in isocaloric diets. *Aquaculture*, 221: 439-449.
- Isolauri E., Kirjavainen P.V., Salminen S. 2002. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation. *Gut*, 50(3): 54-59.
- Kuz'mina V.V. 1996. Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. *Aquaculture*, 148: 25-37.
- Sharifuzzaman S.M., Austin B. 2010. Kocuria SM1 controls vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, 108(6): 2162-2170.
- Salminen S., Bouley C., Boutron M.C., Cummings J.H., Franck A., Gibson G.R., Rowland I. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, 80(1): 147-171.
- Schutte J.B. 1990. Nutritional implications and metabolizable energy value of D-xylose and L-arabinose in chicks. *Poultry Science*, 69(10): 1724-1730.
- Sinha A.K., Kumar V., Makkar H.P., De Boeck G., Becker K. 2011. Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition—A review. *Food Chemistry*, 127: 1409-1419.
- Wong D.W. 2013. *Food enzymes: structure and mechanism*. Springer Science & Business Media. 851 P.
- Zhou Y., Chen C., Johansson M.J. 2013. The pre-mRNA retention and splicing complex controls tRNA maturation by promoting TAN1 expression. *Nucleic Acids Research*, 41(11): 69-78.

