اثر متقابل جایگزینی جلبک *Dunaliella salina* با فرآورده های فرعی کشاورزی و پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* بر فعالیت آنزیم های گوارشی *Artemia franciscana*

شاه‌نور عشقی[1]، احمد ایمانی[1*]، فرزانه نوری[2]، ناصر آق[2]
* a.imani@urmia.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه
۲- گروه تکثیر و پرورش آبزیان، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹٤ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۵

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی تاثیر جایگزینی جلبک *Dunaliella salina* با فرآورده‌های فرعی کشاورزی (سبوس گندم، سبوس برنج و ترکیب سبوس گندم/برنج) و پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* بر فعالیت آنزیم های گوارشی *Artemia franciscana* طی یک دوره کامل پرورشی ۱۷ روزه پس از سیست گشایی انجام گرفت. این مطالعه بصورت یک آزمایش عاملی ۴×۲ شامل ۸ تیمار غذایی (تلفیقی از سطوح مختلف جایگزینی جلبک *Dunaliella salina* با سبوس گندم، سبوس برنج، سبوس گندم/سبوس برنج به همراه پروبیوتیک) در قالب یک طرح کاملاً تصادفی ساده و در سه تکرار طراحی و اجرا گردید. در پایان آزمایش فعالیت آنزیم های گوارشی اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که تیمار سبوس گندم بدون پروبیوتیک بیشترین تأثیر را بر فعالیت آنزیم آمیلاز (۲/۰۶±۰/۳ میکرومول مالتوز بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه) داشت ($p<0/05$). آرتمیای تغذیه شده با جلبک *Dunaliella salina* و پروبیوتیک (۷/۱۱±۰/۸۷ واحد فعالیت آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه) دارای بیشترین فعالیت آلکالین پروتئازی و تیمار ترکیبی سبوس گندم/برنج به همراه پروبیوتیک (۰/۰۰۹±۰/۰۰۵ میلی‌مول پارانیتروفنل بر میلی‌گرم پروتئین بر ساعت) دارای بیشترین میزان فعالیت آنزیم لیپاز بودند ($p<0/05$). این مطالعه نشان داد که پروبیوتیک مورد استفاده در این آزمایش، موجب کاهش میزان فعالیت آنزیم آمیلاز گردید، اما اثر آن بر میزان فعالیت آنزیم‌های آلکالین پروتئاز و لیپاز با توجه به نوع منبع غذایی مورد استفاده بسیار متفاوت بود، به طور مثال در زمان تغذیه آرتمیاها با جلبک *Dunaliella salina* موجب افزایش قابل توجه فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز گردید، در حالیکه استفاده توام آن با ترکیب سبوس گندم و برنج موجب افزایش فعالیت آنزیم لیپاز شد. همچنین نتایج این آزمایش نشان داد که *Artemia franciscana* از قابلیت تنظیم الگوی آنزیم‌های گوارشی خود بر اساس نوع جیره مصرفی برخوردار است. بنابراین می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که در کشت انبوه آرتمیا در استخرهای خاکی، استفاده همزمان سبوس گندم و برنج برای تغذیه آرتمیا موجب افت قابل توجه فعالیت آمیلاز و آلکالین پروتئاز می‌گردد که می‌تواند بر قابلیت هضم و سرانجام جذب مواد مغذی اثر گذاشته و سبب کاهش تولید یا افت کیفیت محصول نهایی گردد.

لغات کلیدی : پروبیوتیک، آنزیم های گوارشی، فرآورده های فرعی کشاورزی، *Artemia franciscana*

*نویسنده مسئول

مقدمه

آرتمیا بصورت زنده یا زیتوده آن کاربرد وسیعی در پرورش ماهی و میگو دارد (Bengtson *et al*., 1991). به دلیل محدودیت ذخایر طبیعی آرتمیا در جهان، نیاز به پرورش متراکم آرتمیا جهت تامین نیاز صنعت آبزی پروری بیش از پیش احساس می شود (Lavenes and Sorgeloos, 1996; Moraiti-Ioannidou *et al*., 2009). با توجه به اهمیت پرورش آرتمیا، تولید مصنوعی سیست و زیتوده آن طی چند دهه اخیر به یکی از فعالیتهای اقتصادی بسیار مهم در صنعت آبزی پروی تبدیل شده است. بر همگان مشخص شده است که در صنعت آبزی پروری متراکم بیش از ٪۵۰ هزینه پرورش مربوط به تهیه غذا می باشد، قیمت پائین و ارزان محصولات فرعی کشاورزی می تواند هزینه تولید را کاهش داده و باعث سودآوری این صنعت گردد (Anh *et al*., 2009)، چرا که از محدودیت های تولید انبوه آرتمیا، تامین جلبک‌های تک سلولی بویژه در مقیاس های بزرگ می‌باشد (Sorgeloos *et al*., 2001)، تولید جلبک های تک سلولی مانند *Dunaliella salina* و *Dunaliella tertiolecta* برای کشت و پرورش گونه-های مختلف آرتمیا مستلزم صرف هزینه گزاف و بکارگیری نیروی انسانی متخصص است. معرفی منابع غذایی دیگر برای پرورش آرتمیا البته با مد نظر قرار دادن ویژگی‌هایی نظیر دسترسی آسان و هزینه پایین که در عین حال قادر به تامین احتیاجات غذایی حیوان باشد، از ضروریات توسعه صنعت پرورش آرتمیا به شمار می‌رود. محصولات جانبی و ارزان قیمت کشاورزی از جمله سبوس گندم، سبوس برنج، کنجاله سویا و ... می تواند جایگزین مناسب و ارزان قیمتی برای جلبک *Dunaliella salina* باشد و در توسعه آتی این صنعت موثر واقع شود (Anh *et al*., 2009; Ownagh *et al*., 2015). پرورش آرتمیا در شرایط متراکم نیازمند استفاده از سیستم های هوادهی است که خود موجب سهولت استفاده از ترکیباتی نظیر سبوس گندم، سبوس برنج و ... برای تغذیه آرتمیا می-گردد. همچنین مشاهده شده است که استفاده از ترکیبات غذایی خشک باعث افزایش مرگ میر آرتمیا می‌گردد، اما استفاده از ترکیبات غذایی مشابه به همراه پرگنه‌های باکتریایی باعث افزایش بقاء لاروهای آرتمیا گشت (Douillet, 1986). نتیجه آن که مطالعات آینده در ارتباط با پرورش متراکم و تغذیه آرتمیا باید به مواردی نظیر بیوشیمی آنزیم‌های گوارشی، کنترل ترشح و سازش آنها با شرایط محیطی به ویژه نوع جیره مصرفی، گیرنده‌های شیمیایی و نقش آنها در تغذیه جانور و شناسایی مکانیسم‌های تحریک‌کنندگی آنها با تأکید بر یافتن منابع غذایی مناسب تغذیه‌ای مناسب، نوجه ویژه‌ای داشته باشد.

باکتری‌های جنس لاکتوباسیلوس در بین گونه‌های مختلف پروبیوتیک ها، بیشتر از سایر گروههای میکروبی در آبزی پروری مورد توجه و استفاده قرار گرفته‌اند. این باکتری های گرم مثبت می‌توانند جزو فلور طبیعی آبزیان سالم از جمله آرتمیا باشند (Ringø and Gatesoupe, 1998). این باکتری‌ها قادر به تولید و ترشح تعدادی زیادی از آنزیم های مهم خارج سلولی شامل پروتئازهایی مانند باسی تراسین[۱] و سابتی لین[۲] می باشند (Sanders *et al*., 2003). این باکتری‌ها از طریق بالا بردن کارآیی سیستم گوارش در فرآیند هضم شرکت داشته و در نهایت رشد میزبان را بهبود می بخشند. در مطالعه Ahmadnia Motlagh و همکاران (۲۰۰۹) استفاده از پروبیوتیک به همراه جیره غذایی موجب بهبود رشد آرتمیا گردید. این پژوهشگران بخشی از این افزایش رشد را به استفاده آرتمیاها از این باکتری ها به عنوان غذا نسبت دادند. پروبیوتیک ها همچنین می-توانند بقاء آرتمیا و در نتیجه میزان زیتودهٔ آرتمیای موجود در سیستم پرورشی را افزایش دهند (Orozco-Medina *et al*., 2002). بخشی از این قابلیت‌ها به توانایی پروبیوتیک‌ها جهت افزایش فعالیت آنزیم های گوارشی و به تبع آن بهبود بازده تغذیه‌ای آبزیان نسبت داده شده است (Balcazar *et al*., 2006; El-Haroun *et al*., 2006; Wang, 2007). همچنین محدود نمودن آثار ناگوار عوامل باکتریایی بیماری‌زا نیز یکی دیگر از سازوکارهای اثرگذاری پروبیوتیک‌ها عنوان شده است (Austin *et al*., 1995;

[۱] Bacitracin
[۲] Subtilin

Macey and Coyne, 2005; Wang *et al*., 2008; Hoseinifar *et al*., 2015). پروبیوتیک ها همچنین با استقرار خود در دستگاه گوارش و فعالیت میکروبی‌های خود، قادرند به عنوان منبعی از مکمل های غذایی از جمله ویتامین ها و اسیدهای آمینه ضروری عمل کنند (Skrodenyte – Arbaciauskiene, 2007; Balcazar *et al*., 2008).

تحقیق پیش‌رو با هدف تعیین رژیم غذایی مناسب جهت پرورش انبوه آرتمیا در استخرهای خاکی طرح ریزی و اجرا گردید. بدین منظور اثر جایگزینی جلبک *Dunaliella salina* با فرآورده‌های فرعی کشاورزی (سبوس گندم، سبوس برنج، ترکیب سبوس گندم/برنج) به عنوان منابع ارزان و در دسترس جهت تولید انبوه آرتمیا در استخرهای خاکی به همراه پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی *Artemia franciscana* طی یک دوره کامل پرورشی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

پرورش جلبک

پرورش جلبک در شرایط کنترل شده فاکتورهای محیطی جلبک *Dunaliella salina* با استفاده از محیط والنه[۳] و شرایط استاندارد محیطی مثل شوری (۱۲۰-۱۱۰ گرم در لیتر)، دما (۲۵-۲۴ درجه سانتی گراد)، نور (۲۰۰۰ لوکس)، هوادهی (به حد لازم که جلبک ها رسوب ننمایند) و پی اچ (۸/۷-۸/۲) انجام گرفت. شمارش و تعیین تراکم جلبک ها جهت تغذیه آرتمیا با لام بورکر صورت گرفت.

تهیه عصاره سبوس گندم و سبوس برنج

سبوس گندم و سبوس برنج ابتدا توسط یک آسیاب برقی با اندازه غربال ۵۰۰-۳۰۰ میکرون خرد و به یک بشر ۵ لیتری منتقل شدند. پس از افزودن آب مقطر و هوادهی شدید به مدت ۱ ساعت، مواد چسبیده به پوسته سبوس (ذرات غذایی) از آن زدوده شد. جهت تغذیه آرتمیا تا روز ۸ پرورش از ذرات عبور داده شده از فیلتر ۳۰ میکرونی استفاده گردید و سپس تا پایان دوره پرورش (روز ۱۷) آرتمیاها با ذرات غذایی عبور کرده از فیلتر ۵۰ میکرونی تغذیه شدند. ذرات غذایی مذکور نخست در انکوباتور در دمای ۳۸ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند و سپس جهت حفظ حالت مطلوب تا زمان تغذیه در یخچال نگهداری شدند (Ownagh *et al*., 2015).

روش تهیه باکتری *Lactobacillus rhamnosus*

این باکتری ها به صورت لیوفیلیزه بوده و در ابتدا در شرایط استریل و در زیر هود لامینارفلو ویال های محتوی ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت MRS broth و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط هوازی و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. پس از رشد (ایجاد کدورت) محیط ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد و دور ۲۵۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. پس از این مرحله، محلول رویی دور ریخته شده و رسوب حاصل ۲ مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل شستشو شدند (اشنوخواه و همکاران، ۱۳۹۲) و براساس جدول غذادهی استاندارد و درصد شراکت آن در تغذیه آرتمیا به محیط پرورش اضافه شد (Coutteau *et al*., 1992).

آماده سازی محیط پرورش

بر اساس روش استاندارد Sorgeloos و همکاران (۱۹۸۰) دمای محیط پرورش ۲۸-۲۷ ℃ درجه سانتی گراد، نور ۲۰۰۰ لوکس، پی اچ تقریبی ۸/۵-۷/۵، شوری آب ۷۰ گرم در لیتر و هوادهی برای تأمین اکسیژن (۰/۳۵±۷/۰ میلی‌گرم در لیتر) و معلق نگه داشتن ذرات غذایی، مهیا گردید. حجم ظروف پرورش آرتمیا یک لیتر و مخروطی شکل بود.

تیمارهای آزمایشی

این پژوهش بصورت یک آزمایش عاملی ۴×۲ و در قالب یک طرح کاملاً تصادفی ساده شامل ۸ ترکیب غذایی (سطوح مختلف سبوس گندم، سبوس برنج، ترکیب

[۳] Walne

سبوس گندم و برنج و جلبک *Dunaliella salina* به همراه پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus*) و در سه تکرار طراحی و اجرا گردید (جدول ۱). هر تکرار شامل ۵۰۰ عدد ناپلی آرتمیا بود. آزمایش به مدت ۱۷ روز به طول انجامید. عمل تغذیه آرتمیاها در هر یک از تیمارهای غذایی طبق جدول استاندارد غذادهی آرتمیا انجام گردید(Coutteau *et al*., 1992) . عمل غذادهی در دو نوبت در هر روز بود و برای دقت در غذادهی در مقادیر کمتر غذا به کمک یک سمپلر قابل تنظیم (با دقت ۲ میکرون) و در مواردی که حجم غذای روزانه آرتمیا زیاد بود با پیپت انجام گردید. عمل تعویض آب جهت حفظ کیفیت آب در روزهای ۸، ۱۱ و ۱۴ پرورش صورت گرفت.

جدول ۱: تیمارهای غذایی و اجزاء تشکیل دهنده جیره غذایی

تیمارغذایی	اجزاء جیره غذایی
۱	جلبک *Dunaliella salina* (٪۱۰۰)[DS]
۲	سبوس گندم (٪۸۵) + جلبک *Dunaliella salina* (٪۱۵)[WB+DS]
۳	سبوس برنج (٪۸۵) + جلبک *Dunaliella salina* (٪۱۵)[RB+DS]
۴	سبوس گندم (٪۴۲/۵) + سبوس برنج (٪۴۲/۵) + جلبک *Dunaliella salina* (٪۱۵)[WB+RB+DS]
۵	جلبک *Dunaliella salina* (٪۹۰) + پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* (٪۱۰)[DS+PRO]
۶	سبوس گندم (٪۷۵) + جلبک *Dunaliella salina* (٪۱۵) + پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* (٪۱۰)[WB+DS+PRO]
۷	سبوس برنج (٪۷۵) + جلبک *Dunaliella salina* (٪۱۵) + پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* (٪۱۰)[RB+DS+PRO]
۸	سبوس گندم (٪۳۷/۵) + سبوس برنج (٪۳۷/۵) + جلبک *Dunaliella salina* (٪۱۵) + پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* (٪۱۰)[WB+RB+DS+PRO]

سنجش فعالیت آنزیم های گوارشی

جهت تهیه عصاره آنزیمی، مقدار معینی از آرتمیا به نسبت وزنی ۵: ۱ در بافر Tris-HCl ۵۰ میلی مولار، ۷، توسط هموژنایزر (مدل Polytron PT1300Δ) به مدت ۱/۵ دقیقه همگن گردید و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال دار (مدل Z36HK) در دمای ۴ ℃ با دور ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. محلول رویی، جهت سنجش پروتئین محلول و فعالیت آنزیمی در دمای ℃ ۸۰- نگهداری شد (Chong *et al*., 2002). میزان پروتئین محلول نمونه ها به روش (Bradford, 1976) تعیین گردید. جهت سنجش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز ابتدا به ۲۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی ۲۵۰ میکرولیتر نشاسته یک درصد اضافه شد و پس از ۳ دقیقه ۰/۵ میلی لیتر از معرف رنگی اسید نیتروسالیسیلیک به آن اضافه گردید و در دمای ۱۰۰ درجه به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. سپس ۵ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه شد و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانو متر قرائت گردید. میزان فعالیت آلفا -آمیلاز، بر حسب میکرو مول مالتوز آزاد شده تحت اثر آنزیم در دقیقه به ازای میلی گرم پروتئین محاسبه گردید (Bernfeld, 1955). هر سنجش لیپازی شامل ۷ میکرولیتر عصاره آنزیمی به همراه ۸۶ میکرولیتر محلول Sodium cholate و ۲/۵ میکرولیتر محلول متوکسی اتانول بود. پس از افزودن ۵/۵ میکرولیتر پارانیتروفنیل مریستات به مجموعه فوق و انکوباسیون نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه، جذب نوری نموه‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت گردید (Iijima, 1998). جهت تعیین فعالیت آنزیم پروتئاز کل ابتدا ۲۰ میکرولیتر از عصاره خام آنزیمی با ۰/۵ میلی لیتر محلول Azocasein دو درصد در Tris-HCl ۵۰ میلی مولار و پی اچ ۷/۵ مخلوط و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه، ۰/۵ میلی لیتر TCA (Trichloroacetic Acid) به آن اضافه گردید.

نمونه‌ها سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت g ۶۵۰۰ سانتریفیوژ شدند. فعالیت ویژه آلکالین پروتئاز به ازای مدت انکوباسیون (۱۰ دقیقه) و میزان پروتئین عصاره آنزیمی (میلی گرم) محاسبه گردید (Garcia-Carreno and Haard, 1993).

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

این تحقیق در قالب یک طرح آماری کاملاً تصادفی انجام شد. توزیع نرمال داده‌ها و همگنی واریانس گروه‌های آزمایشی پیش از انجام آنالیز واریانس به ترتیب به کمک آزمون شاپیرویلک و لون مورد بررسی قرار گرفت. تمام داده ها با استفاده از روش آنالیز واریانس دو طرفه (Two-way ANOVA) مورد ارزیابی قرار گرفتند. در صورت معنی‌داری آزمون آنالیز واریانس ($p<0.05$)، از آزمون مقایسهٔ میانگین توکی برای جداسازی تیمارهای آزمایشی استفاده شد. تمام آنالیزهای آماری توسط نرم افزار آماری SPSS19 Inc., Chicago, IL, USA انجام گرفت. نتایج به صورت "خطای معیار±میانگین" گزارش شدند.

نتایج

جدول ۲ نتایج آنالیز واریانس میزان فعالیت آنزیم آمیلاز گروه‌های مختلف آزمایشی را نشان می دهد. وجود پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* موجب کاهش فعالیت این آنزیم گردید (۱/۹۰±۰/۲۰ در مقابل ۱/۰۹±۰/۱۸ میکرومول مالتوز بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه). همچنین اثر عامل نوع جیرهٔ غذایی نیز در فعالیت آنزیم آمیلاز موثر بود. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در گروه تغذیه شده با سبوس گندم به همراه ۱۵ درصد جلبک *Dunaliella salina* (۲/۵۳±۰/۳) و کمترین مقدار آن در گروه تغذیه شده با جلبک *Dunaliella salina* (۱/۰۸±۰/۱۲) مشاهده شد (جدول ۳)($p<۰/۰۵$).

جدول ۲: آنالیز واریانس فعالیت آنزیم آمیلاز تیمارهای مختلف آزمایشی در انتهای دوره پرورش

منبع	درجه آزادی	P-value
پروبیوتیک	۱	۰/۰۰۱
نوع غذا	۳	۰/۰۲۲
پروبیوتیک×نوع غذا	۳	۰/۱۱۶
خطا	۱۶	
کل	۲۳	

جدول ۳: فعالیت آنزیم آمیلاز تیمارهای مختلف آزمایشی در پایان روز ۱۷ پرورش (خطای معیار ± میانگین، n=۶)

تیمار	فعالیت آنزیم آمیلاز (میکرومول مالتوز بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه)
جلبک *Dunaliella salina*	۱/۰۸±۰/۱۲ [a]
سبوس گندم	۲/۰۶±۰/۳ [b]
سبوس برنج	۱/۵۷±۰/۲۳ [ab]
سبوس برنج+سبوس گندم	۱/۲۸±۰/۴۱ [ab]

حروف متفاوت نشانگر وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد ($p<۰/۰۵$)

تحلیل آماری فعالیت آنزیم لیپاز نشان داد (جدول ۴) که عامل مهم تأثیر گذار بر ایجاد اختلاف بین تیمارهای مورد مطالعه، اثر متقابل پروبیوتیک×نوع غذا بود، به نحوی که بیشترین فعالیت این آنزیم مربوط به تیمار ترکیبی سبوس برنج و گندم به همراه جلبک و پروبیوتیک (۰/۰۹±۰/۰۰۵ واحد فعالیت آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه) بود ($p<۰/۰۵$، جدول ۵).

طبق تحلیل‌های آماری خلاصه شده در جدول ۶، اثر متقابل پروبیوتیک×نوع غذا عامل تأثیر گذار بر میزان فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز تیمارهای مختلف آزمایشی در پایان دوره پرورش بود، به نحوی که بیشترین فعالیت آنزیمی مربوط به تیمار جلبک *Dunaliella salina* به همراه پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* (۷/۱۱±۰/۸۷ میلی‌مول پارانیتروفنل بر میلی‌گرم پروتئین بر ساعت) بود. در مقایسه تیمار جلبک بدون پروبیوتیک دارای کمترین میزان فعالیت آنزیمی بود ($p<۰/۰۵$، جدول ۷).

جدول ۴: آنالیز واریانس فعالیت آنزیم لیپاز تیمارهای مختلف آزمایشی در انتهای دوره پرورش

منبع	درجه آزادی	P-value
پروبیوتیک	۱	۰/۰۱۴
نوع غذا	۳	۰/۲۴۹
پروبیوتیک×نوع غذا	۳	۰/۰۰۹
خطا	۱۶	
کل	۲۳	

جدول ۵: فعالیت آنزیم لیپاز تیمارهای مختلف آزمایشی در پایان روز ۱۷ پرورش (خطای معیار ± میانگین، n=۳)

تیمار	فعالیت آنزیم لیپاز (واحد فعالیت آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه)
جلبک *Dunaliella salina*	۰/۰۶۳±۰/۰۱۴ ab
سبوس گندم	۰/۰۴۳±۰/۰۰۴ a
سبوس برنج	۰/۰۴۷±۰/۰۰۵ a
سبوس برنج+سبوس گندم	۰/۰۴۳±۰/۰۰۸ a
جلبک *Dunaliella salina*+پروبیوتیک	۰/۰۴۳±۰/۰۰۹ a
سبوس گندم+پروبیوتیک	۰/۰۵۷±۰/۰۰۷ ab
سبوس برنج+پروبیوتیک	۰/۰۷۳±۰/۰۱۱ ab
سبوس برنج+سبوس گندم+پروبیوتیک	۰/۰۹±۰/۰۰۵ b

حروف متفاوت نشانگر وجود اختلاف معنی دار آماری است ($p<۰/۰۵$)

جدول ۶: آنالیز واریانس فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز تیمارهای مختلف آزمایشی در انتهای دوره پرورش

منبع	درجه آزادی	P-value
پروبیوتیک	۱	۰/۴۷۲
نوع غذا	۳	۰/۰۰۱
پروبیوتیک×نوع غذا	۳	۰/۰۰۰
خطا	۱۶	
کل	۲۳	

جدول ۷: فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز تیمارهای مختلف آزمایشی در پایان روز ۱۷ پرورش (خطای معیار ± میانگین، n=۳)

تیمار	فعالیت آنزیم لیپاز (میلی‌مول پارانیتروفنل بر میلی‌گرم پروتئین بر ساعت)
جلبک *Dunaliella salina*	۱/۴۵±۰/۴۲ [a]
سبوس گندم	۲/۶۷±۰/۴۲ [ab]
سبوس برنج	۴/۱۶±۰/۲۴ [b]
سبوس برنج+سبوس گندم	۱/۸۷±۰/۸۳ [ab]
جلبک *Dunaliella salina*+پروبیوتیک	۷/۱۱±۰/۸۷ [c]
سبوس گندم+پروبیوتیک	۱/۵۳±۰/۴۹ [a]
سبوس برنج+پروبیوتیک	۱/۲۰±۰/۱۶ [a]
سبوس برنج+سبوس گندم+پروبیوتیک	۱/۴۰±۰/۲۹ [a]

حروف متفاوت در هر ستون نشانگر وجود اختلاف معنی دار آماری می باشند (p<۰/۰۵)

بحث

در پرورش آرتمیا بیشترین سهم هزینه های تولید معمولاً مربوط به تولید جلبک های تک سلولی بوده و فرآورده های فرعی کشاورزی به عنوان جایگزین مناسب این جلبک های تک سلولی، براساس میزان کربوهیدرات، چربی و پروتئین موجود در آنها، که به عنوان سوبسترای محرک تولید آنزیم های گوارشی هستند، می‌توانند مورد استفاده قرار بگیرند (Ownagh *et al*., 2015). در دنیای جانوری مشخص شده است که عوامل محیطی از جمله نوع جیره غذایی مصرفی حیوان می تواند موجب تغییر الگوی فعالیت آنزیم‌های گوارشی آن گردد (Samain *et al*., 1980; Rungraungsak-Torrissen *et al*., 1994; Sunde *et al*., 2001; Imani *et al*., 2009). چنین انعطاف‌پذیری در الگوی فعالیت آنزیمی جانوران موجب شده است که از آن‌ها بعنوان شاخص‌های بیوشیمیایی وضعیت یک جمعیت یا حتی یک بوم‌سازگان استفاده شود (Rungruangsak-Torrissen, 2012; Seebaugh *et al*., 2012).

در مطالعه Lashkarizadeh و همکاران (۲۰۱۱) استفاده از جیره های غذایی مختلف (آرد گندم، غذای کپور معمولی، آرد دانه سویا، ترکیب آرد دانه سویا با آرد کانولا و ترکیب آرد دانه سویا با آرد گندم) در تغذیه *Artemia urmiana* طی یک دوره پرورش ۱۵ روزه مشخص گردید که میزان فعالیت آنزیم‌های مختلف گوارشی کاملا تحت تاثیر نوع جیره غذایی مورد استفاده در تغذیه آرتمیاها قرار گرفت که با نتایج تحقیق حاضر به این مفهوم که *Artemia franciscana* نیز همانند سایر جانوران نسبت به تغییر جیره غذایی حساس بوده و قابلیت سازگاری با شرایط تغذیه‌ای را داراست، همخوانی داشت. Noori و همکاران (۲۰۱۲) بیشترین میزان فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز را در لارو تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) تغذیه شده با جیرهٔ غذایی ترکیبی فرموله شده با آرتمیا (میزان پروتئین بالا) گزارش دادند. Pavasovic و همکاران (۲۰۰۴) دریافتند که جایگزینی مقداری از پروتئین غذا با کربوهیدرات ها در خرچنگ لجنی (*Scylla serrata*) موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های موثر بر هضم کربوهیدرات ها گردید. همچنین در پژوهش دیگری مشخص شد که بین میزان فعالیت آنزیم آمیلاز در خرچنگ دراز آب شیرین و محتوای چربی جیره غذایی رابطهٔ عکس وجود داشت. همچنین کمترین میزان فعالیت آنزیم لیپاز در تیمار تغذیه شده با آرد گندم مشاهده شد (Pavasovic *et al*., 2007). در مطالعه حاضر نیز علت این امر می تواند به کمتر بودن مقدار چربی ضایعات کشاورزی در مقایسه با جلبک *Dunaliella salina* مورد استفاده در این آزمایش نسبت داده شود. از منظر فعالیت آنزیم های گوارشی، ارتباط نزدیکی بین نتایج تحقیق حاضر با نتایج پژوهشگران فوق وجود دارد، بطوریکه کمترین میزان

فعالیت آنزیم آمیلاز مربوط به گروه تغذیه شده با جلبک *Dunaliella salina* بود. مطالعه Samain و همکاران (۱۹۸۰) نشان داد که کمیت و کیفیت شیمیایی جلبک تتراسلمیس مورد استفاده در تغذیه *Artemia franciscana* موجب تغییر الگوی فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و تریپسین گردید. در مطالعه حاضر بیشترین میزان فعالیت آنزیم لیپاز مربوط به تیمار ترکیبی سبوس گندم-سبوس برنج-جلبک به همراه پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* بدست آمد. همچنین بیشترین میزان فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز مربوط به تیمار جلبک *Dunaliella salina* به همراه پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* (۷/۱۱±۰/۸۷ واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین) بدست آمد که می‌تواند به دلیل بالا بودن مقدار پروتئین جیره مورد استفاده یا اثر تحریکی پروبیوتیک بر فعالیت این آنزیم باشد.

در پژوهش انجام شده توسط Ahmadnia Motlagh و همکاران (۲۰۱۲) مشخص گردید که تغذیه *Artemia urmiana* با *Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis* موجب افزایش آنزیم‌های پروتئاز و آمیلاز بود، در حالی‌که تاثیری روی میزان فعالیت آنزیم لیپاز نداشت. نتایج مطالعه آن‌ها مغایر نتایج مطالعه حاضر بود به نحوی پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* موجب کاهش فعالیت آنزیم آمیلاز گردید و اثر آن بر میزان فعالیت آنزیم‌های آلکالین پروتئاز و لیپاز با توجه به نوع منبع غذایی مورد استفاده بسیار متفاوت بود. دلایل مختلفی از جمله گونه آرتمیای مورد مطالعه، پروبیوتیک‌های اضافه شده به محیط پرورش و همچنین منابع غذایی مورد استفاده برای تغذیه آرتمیا اشاره نمود. بطور مثال نشان داده شده است که گونه‌های مختلف پروبیوتیک اثرات متفاوتی روی میزان فعالیت‌های آنزیمی برجای می‌گذارند (Wang, 2007). همچنین منشا این تفاوت الگوی‌های متفاوت فعالیت آنزیم‌های گوارشی نیازمند بررسی‌های مولکولی بیشتری است به طور مثال در گروه تغذیه شده با جلبک *Dunaliella salina* حضور پروبیوتیک موجب افزایش چشمگیر (تقریبا ۵ برابر) فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز شده است در حالیکه در سایر گروه‌ها وجود پروبیوتیک در محیط موجب کاهش فعالیت این آنزیم گردید (کاملا عکس روند تغییرات فعالیت آنزیم لیپاز میان گروه‌های آزمایشی). در مطالعه Wang (2007) مشخص گردید که افزودن پروبیوتیک *Bacillus coagulans* و *Rhodobacter sphaeroides* در جیره غذایی میگوی وانامی موجب بهبود فعالیت آنزیم‌های پروتئاز، آمیلاز، لیپاز و سلولاز گردید. تفاوت مطالعه حاضر با دو مطالعه قبلی از نظر الگوی تغییرات فعالیت آنزیم‌های گوارشی به نظر می رسد که بیشتر متاثر از پروبیوتیک‌های مورد استفاده باشد؛ زیرا در مطالعه حاضر تنها یک گونه باکتریایی استفاده شده است، در حالیکه در پژوهش‌های یاد شده ترکیبی از چند گونه باکتریایی به کار رفته است. چنین نتیجه‌ای در مطالعات دیگر نیز مورد بحث قرار گرفته است (Bogut *et al*., 1998; Wang and Xu, 2006)، پاسخگویی به این پرسش مستلزم بررسی انفرادی و ترکیبی گونه‌های مختلف پروبیوتیکی، البته با مد نظر قرار دادن ترکیب مواد غذایی مورد استفاده در تغذیه موجود هدف می‌باشد.

بعنوان نتیجه گیری کلی می‌توان چنین بیان نمود که ترکیب سبوس گندم و برنج موجب افت قابل توجه فعالیت آنزیم‌های گوارشی بویژه آمیلاز و آلکالین پروتئاز می‌شود، که می‌تواند بر قابلیت هضم و سرانجام جذب مواد مغذی اثر بگذارد که خود سبب کاهش سطح تولید یا افت کیفیت محصول تولیدی خواهد شد. این یافته با نتایج رشد و بقاء گروه‌های مختلف آزمایشی در پایان دوره پرورش کاملا همخوانی دارد (نتایج در دست چاپ نگارندگان). همچنین به نظر می‌رسد افزودن باکترهای پروبیوتیکی به محیط پرورش آرتمیا می‌تواند نتایج مثبتی در پی داشته باشد. البته اظهار نظر در این مورد مستلزم مطالعات بیشتری بویژه در زمینه استفاده ترکیبی انواع پروبیوتیک‌ها و همچنین تعیین قابلیت هضم ضایعات کشاورزی برای آرتمیا می‌باشد.

منابع

اشنوخواه، م.، توکمه چی، ا.، فرخی، ف. و مناف فر، ر.، ۱۳۹۲. مقایسه تأثیر اشکال مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی بر رشد و ایمنی ماهی قزل‌آلای

رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله دامپزشکی ایران, ۳۵-۲۵ :(۴)۹.

Ahmadnia motlagh, H.R., Farhangi, M. and Hosseinifer, S. H., 2009. Potential application of probiotics as a modulator of artemia nauplii bacterial load. In: *International workshop of Artemia, Biology and Distribution Symposium.* 19-20, June, Urmia, Iran.

Ahmadnia motlagh, H.R., Farhangi, M., Rafiee, Gh. and Noori, F., 2012. Modulating gut microbiota and digestive enzyme activities of Artemia urmiana by administration of different levels of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. Aquaculture International, 20:693–705**.**

Anh, N.T.N., Van Hoa, N., Van Stappen, G. and Sorgeloos, P., 2009. Effect of different supplemental feeds on proximate composition and Artemia biomass production in salt ponds. *Aquaculture*, 286(3): 217-225.

Balcázar, J.L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D. and Múzquiz, J.L., 2006. The role of probiotics in aquaculture. Veterinary microbiology, 114(3): 173-186.

Balcázar, J.L., Vendrell, D., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J.L. and Girones, O., 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*, 278(1): 188-191.

Bengtson, D.A., Leger, P. and Sorgeloos, P., 1991. Use of Artemia as a food source for aquaculture. Artemia biology, 11: 255-285.

Bernfeld, P., 1955. Amylases, α and β. *Methods in enzymology*, 1: 149-158.

Bogut, I., Milaković, Z., Bukvić, Ž., Kristek, S. and Zimmer, R., 1998. Influence of probiotic (*Streptococcus faecium* M74) on growth and content of intestinal microflora in carp (*Cyprinus carpio*). *Czech Journal of Animal Science*, 43(5): 231-235.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254.

Chong, A.S.C., Hashim, R., Lee, C.Y. and Ali, B.A., 2002. Partial characterization and activities of proteases form the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). *Aquaculture* 203, 321-333.

Coutteau, P., Brendonck, L., Lavens, P. and Sorgeloos, P., 1992. The use of manipulated baker's yeast as an algal substitute for the laboratory culture of Anostraca. *Hydrobiologia*, 234(1): 25- 32.

Douillet, P., 1987. Effect of the bacteria on the nutrition of the brine shrimp Artemia fed on the dried diets. In: Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Decleir, W., Jaspers, E. (Eds.), Artemia Research and its Applications. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture, volume 3. Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 295– 308.

El-Haroun, E.R., Goda, A.S. and Chowdhury, K., 2006. Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). Aquaculture Research, 37(14): 1473-1480.

Garcia-Carreno, F.L. and Haard, N.F., 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. Journal of Food Biochemistry, 17(2): 97- 113.

Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A., Amoozegar, M.A., Sharifian, M. and Esteban, M.Á., 2015. Modulation of innate immune response, mucosal parameters and disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) upon synbiotic feeding. Fish & shellfish immunology, 45(1): 27-32.

Iijima, N., Tanaka, S. and Ota, Y., 1998. Purification and characterization of bile salt activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. Fish Physiology and Biochemistry, 18: 59–69.

Imani, A., Yazdanparast, R., Farhangi, M., Bakhtiyari, M. and Saljoghi, Z.S., 2009. Effect of different food deprivation periods on digestive enzyme activities of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture Eroupe 2009, Torndheim, Norway, pp. 191-192.

Jamali, H., Imani, A., Abdollahi, D., Roozbehfar, R. and Isari, A., 2015. Use of Probiotic Bacillus spp. in Rotifer (*Brachionus plicatilis*) and Artemia (*Artemia urmiana*) Enrichment: Effects on Growth and Survival of Pacific White Shrimp, Litopenaeus vannamei, Larvae. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 7(2), 118-125.

Lashkarizadeh, M., Farhangi, M., Agh, N. and Safari, O., 2011. Comparison of the digestive enzyme activities in *Artemia urmiana* from nauplii to adult stages using different diets. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 20: 115- 128.

Lavens, P. and Sorgeloos, P., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper, No. 361. Rome, FAO. 295p.

Macey, B.M. and Coyne, V.E., 2005. Improved growth rate and disease resistance in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture*, 245(1): 249-261.

Moraiti-Ioannidou, M., Castritsi-Catharios, J., Miliou, H. and Sorgeloos, P., 2009. Biochemical composition and digestive enzyme activity during naupliar development of *Artemia* spp from three solar saltworks in Greece. Aquaculture, 286(3): 259-265.

Noori, F., Van Stappen, G. and Sorgeloos, P., 2012. Preliminary study on the activity of protease enzymes in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*, Borodin, 1897) larvae in response to different diets: effects on growth and survival. Aquaculture Research, 10: 198- 207.

Orozco-Medina, C., Maeda-Martínez, A.M. and López-Cortés, A., 2002. Effect of

Trypsin: Structure, Biosynthesis and Functions, pp.1-59.

Samain, J.F., Moal, J., Daniel, J.Y., Le Coz, J.R. and Jezequel, M., 1980. The digestive enzymes amylase and trypsin during the development of Artemia: effect of food conditions. The Brine Shrimp Artemia, 2: 427-443.

Sanders, M., Morelli, L. and Tompkins, T., 2003. Sporeformers as human probiotics Bacillus, Sporolactobacillus and Brevibacillus. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2(3): 101-110.

Seebaugh, D.R., Wallace, W.G., L'Amoreaux, W.J. and Stewart, G.M., 2012. Carbon assimilation and digestive toxicity in naïve grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) exposed to dietary cadmium. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 88(3): 449-455.

Skrodenytė-Arbaĉiauskienė, V., 2007. Enzymatic activity of intestinal bacteria in roach *Rutilus rutilus*. Fisheries science, 73(4): 964- 966.

Sorgeloos, P., Baeza-Mesa, M., Bossuyt, E., Versichele, D. and Bernardino, A., 1980. Culture of *Artemia* on rice bran: The conversion of a waste-product into highly nutritive animal protein. Aquaculture, 21(4): 393- 396.

Sorgeloos, P., Dhert, P. and Candreva, P., 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia spp.*, in marine fish larviculture. Aquaculture, 200(1): 147-159.

aerobic gram-positive heterotrophic bacteria associated with *Artemia franciscana* cysts on the survival and development of its larvae. Aquaculture, 213(1): 15-29.

Ownagh, E., Agh, N., and Noori, F., 2015. Comparison of the growth, survival and nutritional value of Artemia using various agricultural by-products and unicellular algae *Dunaliella salina*. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 14(2), 358-368.

Pavasovic, A., Anderson, A.J., Mather, P.B. and Richardson, N.A., 2007. Influence of dietary protein on digestive enzyme activity, growth and tail muscle composition in redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens). Aquaculture Research, 38(6): 644-652.

Pavasovic, M., Richardson, N.A., Anderson, A.J., Mann, D. and Mather, P.B., 2004. Effect of pH, temperature and diet on digestive enzyme profiles in the mud crab, *Scylla serrata*. Aquaculture, 242(1): 641-654.

Ringø, E. and Gatesoupe, F.J., 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture, 160(3): 177-203.

Rungraungsak-Torrissen, K., Lied, E. and Espe, M., 1994. Differences in digestion and absorption of dietary protein in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with genetically different trypsin isozymes. Journal of Fish Biology, 45(6): 1087-1104.

Rungruangsak-Torrissen, K., 2012. Trypsin and its implementations for growth, maturation, and dietary quality assessment.

Sunde, J., Taranger, G.L. and Rungruangsak-Torrissen, K., 2001. Digestive protease activities and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Fish Physiology and Biochemistry, 25(4): 335-345.

Wang, Y.B. and Xu, Z.R., 2006. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Animal Feed Science and Technology, 127: 283–292.

Wang, Y.B., 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 269: 259- 264.

Wang, Y.B., Li, J.R. and Lin, J., 2008. Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. Aquaculture, 281(1): 1-4.

Interactive effect of replacing *Dunaliella salina* algae by agricultural by-products and probiotic *Lactobacillus rhamnosus* on digestive enzymes activity of *Artemia franciscana*

Eshghi S.[1]; Imani A.[1]*; Noori F.[2], Agh N.[2]

* a.imani@urmia.ac.ir

1-Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University
2- Department of Aquaculture, Urmia Lake Research Institute, Urmia University

Abstract

This study was carried out to evaluate the effect of replacing *Dunaliella salina* algae by agricultural by-products (wheat bran, rice bran and wheat/rice bran) and probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* on digestive enzymes activity of *Artemia franciscana* in a 17-day period post hatch. The study was a 4×2 factorial experiment carried out as a completely randomized design trial consisting of different dietary treatments (combinations of various substitution levels of *Dunaliella salina* by wheat bran, rice bran and wheat/rice bran along with probiotic *Lactobacillus rhamnosus*). All treatments were performed in triplicates. At the end of the trial, digestive enzymes activity was assayed. The results revealed that *Artemia* fed wheat bran without any dietary probiotic supplementation showed significantly higher amylase activity (2.06±0.3μmol maltose mg protein^{-1} min^{-1}) (p<0.05). Treatment fed *Dunaliella salina* algae and probiotic showed significantly higher alkaine protease activity (7.11±0.87 U mg protein^{-1} min^{-1}) and those fed wheat/rice bran with probiotic had significantly higher lipase activity (0.09±0.005 mmol p-nitrophenol mg protein^{-1} min^{-1}) (p<0.05). It was revealed that dietary probiotic inclusion resulted in decreased amylase activity whilst its effect on the alkaline protease and lipase activities were totally dependent upon the feed ingredients (e.g., simultaneous feeding of artemia by *Dunaliella salina* algae and probiotic led to higher alkaline protease activity, while receiving probiotic resulted in higher lipase activity in group fed wheat/rice bran). Our results also showed that digestive enzyme profile of *Artemia franciscana* was responsive to dietary treatment. Conclusively, using wheat/rice bran in artemia pond culture would result in inferior digestive enzymes activity especially alkaline protease and lipase with subsequent effects on nutrient digestion/absorption efficiency and undesirable effects on pond productivity and final product quality.

Keywords: Probiotic, Digestive enzyme, Agriculture by-product, *Artemia franciscana*

---

*Corresponding author