اثرات مکمل غذایی ماکرو جلبک قرمز دریایی *Gracilaria pygmaea* بر آنالیز تقریبی لاشه، قابلیت هضم ظاهری و فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی باس دریایی آسیایی *Lates calcarifer*

آناهیتا فرهودی[1]، ایمان سوری‌نژاد*[1،5]، محمود نفیسی بهابادی[2]، میر مسعود سجادی[3]، علیرضا سالارزاده[4]

[1]گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

[2]گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بوشهر، بوشهر، ایران.

[3]گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران.

[4]گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرعباس، بندرعباس، ایران.

[5]گروه فناوری‌های نوین، پژوهشکده منطقه‌ای جنگل‌های حرا، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

*نویسنده مسئول: sourinejad@hormozgan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۸/۵/۲۲

چکیده

در یک پژوهش ۶ هفته‌ای، اثر افزودن پودر ماکروجلبک قرمز گراسیلاریا (*Gracilaria pygmaea*) به جیره بر آنالیز تقریبی لاشه، قابلیت هضم ظاهری و فعالیت آنزیم‌های گوارشی در ماهی باس دریایی آسیایی (*Lates calcarifer*) با میانگین وزن اولیه ۵/۹±۲۸ گرم و در قالب یک طرح کاملاً تصادفی بررسی گردید. جیره‌های آزمایشی شامل دو جیره کنترل مثبت (آرد ماهی) و منفی (آرد ماهی-پودر سویا) و سه جیره حاوی پودر جلبک گراسیلاریا در سطوح ۳، ۶ و ۹ درصد بودند. نتایج نشان داد نرخ رشد ویژه در تیمار تغذیه شده با گراسیلاریا ۶٪ بیشتر از سایر تیمارها بود ($P<0/05$). در پایان دوره، مقادیر پروتئین خام، خاکستر و ماده خشک در لاشه ماهیان تیمارهای مختلف، تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($P>0/05$) و تنها در تیمار گراسیلاریا ۳٪ میزان چربی لاشه نسبت به سایر تیمارها بالاتر بود ($P<0/05$). نتایج قابلیت هضم ظاهری پروتئین، چربی و ماده خشک در ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف جلبک گراسیلاریا، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها نشان نداد ($P>0/05$) هرچند این مقادیر در تیمار ۶٪ کمی بهتر بود. در ماهیان تغذیه شده با جیره ۹٪، فعالیت آنزیم پپسین ۱/۴۶ و ۱/۲۶ برابر کمتر از فعالیت این آنزیم در ماهیان تیمار به‌ترتیب ۳٪ و ۶٪ بود ($P<0/05$). فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و لیپاز نیز در تیمار ۹٪، کمتر از تیمارهای ۳٪ و ۶٪ بود ($P<0/05$). یافته‌های تحقیق نشان‌دهنده پتانسیل پودر جلبک *G. pygmaea* به‌عنوان مکمل غذایی تا سطح ۶ درصد در جیره در بهبود عملکرد رشد، آنالیز تقریبی لاشه، قابلیت هضم ظاهری و عمده فعالیت آنزیم‌های گوارشی در ماهی گوشتخوار باس دریایی آسیایی می‌باشد.

واژگان کلیدی: مکمل غذایی، ماکروجلبک دریایی، پرورش، آنزیم گوارشی.

مقدمه

از دهه ۱۹۶۰ تاکنون تحقیقات زیادی به‌منظور دستیابی به منابع پروتئینی ارزان قیمت جهت تغذیه جمعیت انسانی در حال رشد و نیز تغذیه حیوانات از جمله آبزیان صورت گرفته است. از آن‌جایی که آرد ماهی فراوان‌ترین و در عین حال گران‌ترین منبع پروتئین حیوانی در تولید جیره غذایی طیور، دام‌های پرورشی و آبزیان است، بازارهای جهانی همیشه به دنبال یک منبع جایگزین مناسب بوده‌اند (Ferraz de Arruda *et al*., 2007). منابع گیاهی و جانوری جایگزین برای آرد ماهی مانند پودر سویا، پودر کتان، پودر گلوتن ذرت، پودرهای اسکوئید، میگو، استخوان و گوشت، پودر هیدرولیز شده پر، خون و ضایعات طیور در تحقیقات متعددی به‌منظور جایگزینی جزئی یا کامل با آرد ماهی مورد بررسی قرار گرفته‌اند، هر چند تاکنون منبع پروتئین جانوری یا گیاهی مناسبی که بتواند به‌صورت کامل جایگزین آرد ماهی شود، گزارش نشده است (Rangacharyulu *et al*., 2003). جایگزینی آرد ماهی با منابع پروتئینی ارزان-تر و قابل دسترس‌تر همواره مورد توجه صنایع غذایی و تولیدی حیوانات پرورشی از جمله دام، طیور و آبزیان بوده است. شاید بتوان گفت یکی از ارزان‌ترین

محصولات دارای پروتئین (در برخی موارد با درصد بالا) محصولات کشاورزی می‌باشند که در این ارتباط، پروتئین‌های گیاهی مانند سویا، کلزا و ذرت در جیره آبزیان پرورشی، مورد تحقیقات گسترده‌ای قرار گرفته‌اند (Palmegiano *et al*., 2005). کمبودهای موجود در پروفیل اسیدهای آمینه و وجود برخی مواد ضد تغذیه‌ای (Anti-nutrients) در اکثر محصولات کشاورزی دامنه استفاده از آن‌ها را محدود می‌سازد و امروزه محققین با استفاده از فناوری‌های مختلف به‌دنبال حذف این عوامل ضد تغذیه‌ای هستند (Hardy, 1999). از سوی دیگر، اخیراً منابع پروتئین‌های گیاهی دریایی مانند جلبک‌های دریایی توجه بیشتری را به خود جلب نموده است تا بتوانند جایگزین آرد ماهی در جیره های غذایی حیوانات پرورشی شوند.

ماکروجلبک‌ها در مقایسه با میکروجلبک‌ها پروتئین کمتری دارند، با این حال به لحاظ بهبود رشد، سوخت و ساز چربی‌ها و بهبود کیفیت گوشت قابل توجه بوده (Wassef *et al*., 2001) و به لحاظ دارا بودن پروتئین، چربی، کربوهیدرات، اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب ضروری، املاح معدنی، ویتامین، انواع رنگدانه و بسیاری از موادآلی دیگر از ارزش دارویی بالایی برخوردارند (قرنجینک، ۱۳۸۹). از سوی دیگر، استفاده از ماکروجلبک‌های دریایی در نقش مکمل غذایی و به‌دلیل ارزش غذایی بالا، سهولت دسترسی و هزینه نسبتاً پائین، همواره مورد توجه بوده است (Ragaza *et al*., 2013). بهبود عملکرد رشد و تغذیه، عملکرد مناسب کبد، متابولیسم بهتر چربی، بهبود فعالیت‌های فیزیولوژیک و پاسخ به استرس، مقاومت در برابر بیماری و بهبود کیفیت گوشت در جیره‌های حاوی مکمل‌های جلبکی گزارش شده است (Nakagawa and Montgomery, 2007; Yin *et al*., 2014; Wan *et al*., 2016; Guerreiro *et al*., 2019).

ماکروجلبک گراسیلاریا از خانواده گراسیلاریاسه Gracilariaceae و رده جلبک‌های قرمز Rhodophyta است. گراسیلاریا در سرتاسر جهان پراکنش دارد، اما اغلب در آب‌های گرمسیری و نیمه گرمسیری رشد می‌کند (ربیعی و همکاران، ۱۳۸۶). یکی از گونه‌های گراسیلاریا، گونه *Gracilaria pygmaea* است که سواحل استان بوشهر منابع عظیمی از این نوع جلبک‌ها را در سرتاسر ناحیه پایین جزر و مدی شنی کم عمق دارا است و هر ساله مقادیر زیادی از این جلبک‌ها همراه امواج به ساحل آورده می‌شوند. این گونه بومی کشور، به‌دلیل زی‌توده قابل توجه در طبیعت و همچنین قابلیت تولید انبوه به‌صورت پرورش مصنوعی، به‌صورت کاربردی و در مقیاس تجاری می‌تواند از یک سو به‌عنوان منبع قابل استفاده در جیره غذائی آبزیان مورد توجه کارخانجات سازنده غذای آبزیان و از سوی دیگر پرورش دهندگان مصنوعی جلبک قرار گیرد.

سوف دریایی غول پیکر، *Lates calcarifer*، یا باس دریایی در آسیا (Asian seabass) و بارامونده (Barramundi) در استرالیا از راسته سوف ماهی شکلان Perciformes می‌باشد (Glencross, 2006) و بومی منطقه هند و اقیانوس آرام بوده و در آب‌های ساحلی، از خلیج‌فارس تا استرالیا پراکنش دارد (Greenwood, 1976). این گونه در طی سال‌های اخیر به کشور وارد شده است و هم اکنون در استان‌های جنوبی کشور در قفس و استخرهای خاکی به ویژه در سیستم پرورش در قفس پرورش داده می‌شود.

با توجه به اهمیت ذکر شده برای جلبک‌ها و غنی بودن سواحل جنوبی کشور از منابع عظیم جلبکی، لازم است برنامه‌ریزی مناسبی جهت اعمال مدیریت کارآمد و حفظ، توسعه و بهره‌برداری علمی و اقتصادی از این ذخائر با ارزش دریایی صورت گیرد. تحقیق حاضر به‌دنبال بررسی امکان افزودن ماکروجلبک قرمز دریایی گراسیلاریا (*Gracilaria pygmaea*) در جیره غذایی گونه تازه وارد پرورشی باس دریایی آسیایی در ایران می‌باشد تا ضمن بررسیِ امکان استفاده از این نوع پروتئین‌ها و سطح مورد نیاز آن‌ها، تاثیر استفاده از آن‌ها بر آنالیز تقریبی لاشه و فعالیت آنزیم‌های گوارشی در ماهیان مورد استفاده در صنعت روبه رشد آبزی پروری ماهیان دریایی، مشخص شود.

مواد و روش‌ها

تهیه پودر جلبک گراسیلاریا و آماده‌سازی جیره‌های آزمایشی: ماکروجلبک دریایی مورد نظر پس از شناسایی در سواحل بوشهر و مطابقت با کلید

شناسایی، از منطقه مورد نظر جمع‌آوری شد. برای شناسایی از منابع Magruder (۱۹۸۸) و اطلس جلبک‌های دریایی سواحل خلیج فارس و دریای عمان (قرنجینک، ۱۳۸۹) استفاده گردید. ماکروجلبک پس از شستشو و خشک کردن با آون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۲۴ ساعت، آسیاب شده و به‌صورت پودر تهیه شد. آنالیز تقریبی پودر ماکروجلبک گراسیلاریا شامل ۱۵/۰۴ درصد پروتئین، ۱ درصد چربی، ۱۱ درصد خاکستر و ۱/۲ درصد فیبر در ماده خشک بود. جیره پایه استفاده شده برای تغذیه باس دریایی آسیایی دارای ۴۸-۴۵ درصد پروتئین، ۱۸-۱۶ درصد چربی و ۲۰ درصد کربوهیدرت بود (Glencross, 2006). در این تحقیق پودر جلبک قرمز گراسیلاریا در سه سطح ۳، ۶ و ۹ درصد به جیره اضافه گردید و جیره‌های کنترل مثبت (فاقد پودر سویا) و منفی (آرد ماهی-پودر سویا) فاقد پودر جلبک گراسیلاریا بودند (Ragaza *et al.*, 2015). در این آزمایش جیره‌های ساخته شده از همه نظر یکسان بوده و تنها درصد پروتئین جلبک قرمز گراسیلاریا در آن متفاوت بود.

پس از تعیین درصد اجزای غذایی مورد نیاز، ابتدا مواد اولیه مورد نیاز، آسیاب و از الک ۵۰۰ میکرونی عبور داده شدند. سپس با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱گرم توزین گردید. سپس مواد اولیه وزن شده و به خوبی مخلوط گردید. اجزای غذایی ابتدا به‌مدت ۱۰ دقیقه به صورت خشک هم‌زده شده و سپس به آن ۳۰ درصد وزن خشک غذا، آب با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، روغن ماهی، روغن سویا و سایر افزودنی‌ها اضافه گردید. سپس مخلوط اجزای غذایی، به‌مدت ۱۵ دقیقه هم‌زده و با استفاده از دستگاه پلت-ساز به‌صورت پلت‌هایی با قطر متوسط ۳ میلی‌متر درآمد. به‌منظور تسریع در خشک شدن، پلت‌های غذایی به‌مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای حدود ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

به‌منظور اطلاع از میزان چربی کل، پروتئین خام، کربوهیدرات، خاکستر و رطوبت، مواد اولیه مورد نیاز جهت ساخت جیره مورد آنالیز قرار گرفتند (AOAC, 2005). پس از آنالیز مواد اولیه، ۵ جیره با استفاده از نرم‌افزار WUFFDA فرموله و ساخته شد و یک طرح آزمایش کاملاً تصادفی شامل ۵ جیره و ۳ تکرار از هر جیره مورد استفاده قرار گرفت. به‌منظور اطمینان از مطابقت غذای ساخته شده با فرمول مورد نظر، جیره‌ها پس از ساخت، مجدداً مورد تجزیه قرار گرفتند. با توجه به طولانی بودن دورهٔ پرورش، به منظور حفظ کیفیت جیره‌های ساخته شده، نگهداری آن‌ها در شرایط سرد (۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد) در طول دوره صورت پذیرفت. ترکیب و آنالیز تقریبی جیره-های آزمایشی مورد نظر در جدول ۱ آورده شده است.

محل انجام آزمایش و نحوه پرورش: تحقیق حاضر در پژوهشکده خلیج‌فارس واقع در استان بوشهر صورت گرفت. بچه‌ماهیان باس دریایی آسیایی از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان دریایی راموز تهیه شد. در ابتدای آزمایش زیست‌سنجی ماهیان انجام شد. تعداد ۱۵۰ قطعه بچه ماهی پرورشی قبل از شروع آزمایش به‌مدت ۱۵ روز به شرایط آزمایشگاهی و غذای کنستانتره سازگار شدند. پس از طی مرحله سازگاری، ماهیانی که از لحاظ وزن و طول تقریبی در یک اندازه بودند، به‌طور تصادفی انتخاب و در ۱۵ مخزن فایبرگلاس (هر مخزن حاوی ۱۰ قطعه ماهی با متوسط وزن اولیه ۵/۹±۲۸ گرم (میانگین±انحراف معیار) توزیع گردیدند و به مدت ۶ هفته با جیره‌های غذایی ساخته شده، دو بار در روز در ساعات ۹ و ۱۷ تغذیه شدند. آزمایش در یک سالن سرپوشیده با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی انجام شد. هوادهی از طریق سنگ هوا و با سیستم هوادهی مرکزی در طول دوره برقرار بود و عوامل کیفی آب شامل دمای آب، میزان شوری و اکسیژن محلول، روزانه و pH به‌صورت هفتگی سنجش گردید.

بررسی شاخص‌های رشد: فاکتورهای رشد شامل افزایش وزن بدن، افزایش وزن روزانه، نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذا از طریق فرمول‌های ذیل محاسبه گردید (Abdelghany and Ahmad, 2002; Marcouli *et al.*, 2006):

رابطه ۱: افزایش وزن بدن = وزن نهایی بدن – وزن اولیه بدن

رابطه ۲: میزان رشد روزانه = (وزن نهایی بدن – وزن اولیه بدن) / تعداد روزهای پرورش

رابطه ۳: نرخ رشد ویژه = [(Ln وزن نهایی- Ln وزن اولیه) / تعداد روزهای پرورش] × ۱۰۰

رابطه ۴: ضریب تبدیل غذا = مقدار غذای گرفته شده

جدول ۱ - ترکیب و آنالیز تقریبی جیره‌های آزمایشی مورد استفاده در تیمارهای مختلف (بر حسب درصد).

ترکیبات جیره‌های آزمایشی	کنترل مثبت	کنترل منفی	گراسیلاریا ۳٪	گراسیلاریا ۶٪	گراسیلاریا ۹٪
آرد ماهی	۵۴	۴۴	۴۲/۶۸	۴۱/۳۶	۴۰/۰۴
پودر سویا	۰	۱۴/۹	۱۳/۶۲	۱۳/۶۴	۱۲/۸۶
گلوتن گندم	۱۱/۹	۱۱/۹	۱۲	۱۱/۸	۱۱/۹
آرد گندم	۱۰/۶	۵/۰۰	۴/۵	۳	۲
روغن ماهی	۶/۴	۶/۷۵	۶/۷۵	۶/۷۵	۶/۷۵
روغن سویا	۶/۴	۶/۷۵	۶/۷۵	۶/۷۵	۶/۷۵
پودر جلبک قرمز گراسیلاریا	۰	۰	۳	۶	۹
پرمیکس ویتامین	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
پرمیکس مواد معدنی	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
پودر اسکوئید	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
آنتی اکسیدان	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲
ژلاتین	۵	۵	۵	۵	۵
اکسید کروم (Cr_2O_3)	۱	۱	۱	۱	۱
جمع کل	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
آنالیز تقریبی (٪ ماده خشک)					
پروتئین	۴۶/۲۶	۴۶/۳۹	۴۶/۶۷	۴۶/۹	۴۶/۵۷
چربی	۱۸	۱۷/۶۴	۱۷/۷۷	۱۶/۹۶	۱۷/۷۸
خاکستر	۱۶	۱۴/۵۸	۱۵/۶۵	۱۶/۴۷	۱۶/۷۸
رطوبت	۱۰/۸۷	۱۰/۵۵	۱۱	۱۰/۶۳	۱۰/۷۱

کنترل مثبت: جیره شاهد، منبع پروتئین اصلی: آرد ماهی؛ کنترل منفی: جیره شاهد، منبع پروتئین اصلی: آرد ماهی- پودر سویا؛ گراسیلاریا ۳٪: جیره غذایی حاوی جلبک گراسیلاریا به میزان ۳٪؛ گراسیلاریا ۶٪: جیره غذایی حاوی جلبک گراسیلاریا به میزان ۶٪؛ گراسیلاریا ۹٪ جیره غذایی حاوی جلبک گراسیلاریا به میزان ۹٪.

/ افزایش وزن توده

آنالیز تقریبی لاشه: برای سنجش ترکیب لاشه شامل سنجش پروتئین خام، چربی خام، خاکستر و رطوبت از روش AOAC (۲۰۰۵) استفاده شد. پروتئین خام از روش کلدال (Kjeldahl method) و با ضریب تبدیل ۶/۲۵ محاسبه گردید. چربی کل با دستگاه Soxtec system، خاکستر با دستگاه کوره الکتریکی و رطوبت با دستگاه آون تعیین گردید.

قابلیت هضم ظاهری: یک هفته قبل از جمع آوری مدفوع از آب، ماهی‌ها در تانک‌های پلاستیکی دایره-ای با جیره‌های غذایی جدید سازگار شدند. سپس ماهی‌ها به‌مدت ۳ هفته با جیره‌های مورد آزمایش جهت جمع آوری مدفوع تغذیه شدند. غذادهی به ماهی‌ها به‌صورت دستی و روزانه در ساعت‌های ۹ صبح و ۱۷ بعد از ظهر بر اساس میزان توصیه شده در جدول تغذیه‌ای بر مبنای وزن بدن و دمای آب به میزان ۲/۲ درصد وزن بدن صورت گرفت. جمع آوری مدفوع پس از یک هفته عادت‌دهی با جیره حاوی اکسید کروم شروع شد. جمع‌آوری مدفوع روزانه ساعت ۷ صبح قبل از غذادهی نوبت اول انجام گرفت. مدفوع از طریق سیفون از کف تانک‌ها جمع‌آوری شد. آب سیفون شده در ظرف‌های یک لیتری سرریز گردید و بعد از ۵ دقیقه که مدفوع در کف ظرف ته نشین شد محلول بالایی خارج و مواد کف در لوله‌های ۵۰ میلی‌لیتری در سانتریفیوژ یخچال‌دار با سرعت ۵۰۰۰ دور در ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. نمونه‌های حاصل در ظرف‌های پلاستیکی در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان آنالیز نگهداری شدند (Vasagam *et al.*, 2007).

در پایان دوره آزمایش ماهیان موجود در هر وان با غلظت ppm ۱۰۰ عصاره گل میخک بیهوش و با عمل تشریح، به‌دقت روده از سایر اعضای دستگاه گوارش جدا و مدفوع در داخل تیوپ‌های پلاستیکی استریل قرار داده شد. نمونه‌ها تا شروع انجام آزمایش-ها در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در نهایت براساس روش استاندارد (Tibbetts *et al.*, 2006)، قابلیت هضم ظاهری ماده خشک جیره‌های غذایی و قابلیت هضم ظاهری پروتئین و چربی جیره‌های غذایی تعیین شد.

سنجش آنزیم‌های گوارشی: برای سنجش آنزیم-های گوارشی، نمونه‌برداری از ماهیان در انتهای دوره

انجام گرفت. در زمان نمونه‌برداری، ماهی‌ها با آب مقطر شستشو داده شدند تا نمک و مواد اضافی از بدن ماهی پاک شود و سپس ماهی در ازت مایع، در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد، نگهداری گردید. پروتئین محلول نمونه‌های هموژن شده دستگاه گوارش ماهی باس دریایی آسیایی توسط دستگاه اسپکتروفتومتری و با روش Bradford (۱۹۷۶) سنجش شد. جهت رسم منحنی استاندارد از آلبومین سرم گاوی (BSA) استفاده گردید. برای سنجش آنزیم‌های پپسین، تریپسین، کیموتریپسین، آمیلاز و لیپاز از روش Furne و همکاران (۲۰۰۵) استفاده شد. براساس این روش، هموژناسیون توسط بافر Tris-HCl ۱۰۰ میلی‌مولار و EDTA ۰/۱ میلی-مولار و Triton X-100 ۰/۱ درصد به نسبت وزنی: حجمی ۱ به ۹ انجام گردید و محلول هموژن در سانتریفوژ یخچال‌دار در ۸۰۰۰rpm سانتریفوژ و سوپرناتانت حاصله در ۸۰- نگهداری گردید. برای استخراج آنزیم‌های روده‌ای براساس روش Storelli و همکاران (۱۹۸۶) از بافر Manitol ۵۰ میلی‌مولار و Tris ۲ میلی‌مولار استفاده شد.

برای تعیین فعالیت آنزیم پپسین از سوبسترای هموگلوبین استفاده گردید. هموگلوبین تحت تاثیر آنزیم تجزیه و به اسید آمینه تیروزین تبدیل می‌شود که در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت انجام می‌شود. واحد فعالیت آنزیم پپسین بر حسب میکرومول تیروزین که در مدت یک دقیقه و به ازای میلی‌گرم پروتئین آزاد می‌شود، محاسبه گردید (Anson, 1938; Worthington, 1991). اندازه‌گیری تریپسین به روش Erlanger و همکاران (۱۹۶۱) انجام شد. از Benzoyl–DL-arginin-p-nitroanilide به‌عنوان سوبسترا استفاده شد که در dimethylsulfoxide حل و با بافر Tris-HCl ۰/۰۵مولار، $Cacl_2.2H_2O$ ۰/۰۲ مولار به حجم رسانده شد. محلول آنزیمی استخراج شده با محلول سوبسترای تازه تهیه شده مخلوط و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، عمل انکوباسیون انجام گردید. جذب مخلوط حاصله در ۴۱۰ نانومتر قرائت گردید. فعالیت آنزیم تریپسین بر حسب میکرومول nitroanilide که در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین آزاد می‌شود، سنجیده شد.

اندازه‌گیری کیموتریپسین به روش Erlanger و همکاران (۱۹۶۱) انجام شد. از Succinyl- (Ala)2 –Pro –phe-p-nitroanilide به‌عنوان سوبسترا استفاده گردید. محلول این سوبسترا در بافر Tris-HCl و $Cacl_2.2H_2O$ تهیه شد. محلول سوبسترا با محلول آنزیمی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مخلوط می‌شود و افزایش جذب در ۴۱۰ نانومتر، هر دقیقه تا ۳ دقیقه سنجیده می‌شود و فعالیت کیموتریپسین بر حسب میکرومول سوبسترا SAPNA که در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین آزاد می‌شود، محاسبه می-گردد. جهت سنجش فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز از روش Bernfeld و همکاران (۱۹۵۵) استفاده گردید. سنجش این آنزیم با استفاده از نشاسته به‌عنوان سوبسترا در بافر فسفات سدیم و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و رسم منحنی استاندارد مالتوز انجام شد. میزان جذب در ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید. واحد فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز، بر حسب میکرومول مالتوز آزاد شده تحت تأثیر آنزیم در دقیقه به میلی‌گرم پروتئین محاسبه می‌گردد.

جهت سنجش فعالیت آنزیم لیپاز از روش Iijiama و همکاران (۱۹۹۸) استفاده گردید. فعالیت لیپازی با استفاده از هیدرولیز p-nitrophenyl myristate به‌عنوان سوبسترا تعیین شد. جهت سنجش از محلول ۰/۵۳ میلی‌مولار p-nitrophenyl myristate، ۰/۲۵ میلی‌مولار 2-methoxy ethanol، ۵۰ میلی‌مولار sodium cholate و ۰/۲۵ مولار Tris-HCl در pH ۹ استفاده شد. فعالیت اختصاصی لیپاز برابر است با آزادسازی یک میکرومول p-nitrophenyl myristate در یک دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد که در ۴۰۵ نانومتر قرائت شد.

آنالیز آماری: قبل از انجام آزمون آنالیز واریانس، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک و یکنواختی واریانس با آزمون لون بررسی شد. برای آنالیز واریانس داده‌های نرمال از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه استفاده گردید. برای مقایسه میانگین تیمارهای مختلف از آزمون دانکن استفاده شد. حداقل سطح معنی‌دار بودن آزمون‌ها $P\geq$۰/۰۵ در نظر گرفته شد. تمام داده ها به‌صورت میانگین ± انحراف از معیار گزارش شده و ارزیابی‌ها در سه تکرار صورت گرفت.

جدول ۲ - مقایسه میانگین شاخص‌های رشد باس دریایی آسیایی تغذیه شده با سطوح مختلف جلبک قرمز گراسیلاریا.

پارامترهای رشد	وزن اولیه (گرم)	وزن نهایی (گرم)	افزایش وزن بدن	میزان رشد روزانه	نرخ رشد ویژه	ضریب تبدیل غذایی
کنترل مثبت	۲۷/۱۳±۳/۳۴	۸۳/۳۳±۵/۶	۵۶/۱۹±۸/۳۳	۱/۷۲±۰/۱۷	۳/۳۳±۰/۱۹ ab	۱/۰۲±۰/۰۹
کنترل منفی	۲۸/۸۳±۲/۲۳	۸۳/۴۴±۷/۳۴	۵۴/۶۱±۶/۶۱	۱/۷۳±۰/۲۲	۳/۴۰±۰/۲۲ ab	۱/۰۱±۰/۰۷
گراسیلاریا ۳٪	۲۸/۸±۳/۱۴	۷۸/۸±۵/۸۱	۵۰/۰۰±۸/۴۶	۱/۵۸±۰/۱۸	۳/۱۳±۰/۱۹ ab	۱/۱۲±۰/۲۴
گراسیلاریا ۶٪	۲۹/۱۰±۳/۳۷	۸۸/۴۴±۶/۴۱	۵۹/۳۴±۹/۷۰	۱/۸۸±۰/۲	۳/۴۸±۰/۱۹ a	۰/۹±۰/۰۹
گراسیلاریا ۹٪	۳۰/۵۰±۰/۵۱	۷۶/۴۲±۵/۰۵	۴۵/۹۲±۵/۳۷	۱/۵۱±۱/۵۷	۳/۲۹±۰/۲۲ b	۱/۱۵±۰/۱۲

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف از معیار بیان شده‌اند. وجود حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$). عدم نمایش حروف، بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

جدول ۳ - مقایسه میانگین قابلیت هضم ظاهری (بر حسب درصد) در ماهی باس دریایی آسیایی تغذیه شده با سطوح مختلف جلبک قرمز گراسیلاریا.

قابلیت هضم ظاهری	کنترل مثبت	کنترل منفی	گراسیلاریا ۳٪	گراسیلاریا ۶٪	گراسیلاریا ۹٪
پروتئین	۹۱/۲±۱/۲	۹۱/۳±۰/۸	۹۰/۸±۱/۱	۹۱/۸۱±۱/۹	۹۰/۵±۱/۰
چربی	۸۵/۸ ±۰/۳۳	۸۴/۱±۰/۴۲	۸۵/۲±۰/۵۹	۸۵/۱±۰/۳۷	۸۴/۲±۰/۴۳
ماده خشک	۶۷/۴±۰/۷۵	۶۷/۸±۰/۶	۶۸/۴±۰/۹	۶۸/۷۸±۰/۸	۶۷/۲±۰/۷

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف از معیار بیان شده‌اند. عدم نمایش حروف معنی داری نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است ($P>۰/۰۵$).

نتایج

فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب: نتایج مربوط به میانگین درجه حرارت، اکسیژن، شوری و pH در طول دوره آزمایش به‌ترتیب ۲/۵±۳۰/۱۲ درجه سانتیگراد، ۰/۳۲±۶/۲۴ میلی گرم در لیتر، ۴۰ گرم در لیتر و ۷/۸ بود.

شاخص‌های رشد: در جدول ۲، نتایج مربوط به اندازه‌گیری شاخص‌های رشد ماهیان در تیمارهای مختلف ارائه شده است. نتایج نشان داد که استفاده از سطوح متفاوت جلبک قرمز گراسیلاریا به‌مدت ۶ هفته در جیره غذایی باس دریایی آسیایی، روی میزان رشد روزانه، ضریب تبدیل غذایی و وزن نهایی نه تنها تأثیر منفی ندارد ($P>۰/۰۵$) بلکه وزن نهایی، افزایش وزن بدن، میزان رشد روزانه و ضریب تبدیل غذایی در ماهیان تغذیه شده با گراسیلاریا ۶ درصد تمایل به بهبود نسبت به سایر تیمارها داشت. از نظر نرخ رشد ویژه، در تیمار تغذیه شده با گراسیلاریا ۶ درصد این میزان بیشتر از تیمار گراسیلاریا ۹ درصد ($P<۰/۰۵$) و بهتر از سایر تیمارها بود.

قابلیت هضم ظاهری: نتایج حاصل از قابلیت هضم ظاهری پروتئین، چربی و ماده خشک در ماهی باس دریایی آسیایی تغذیه شده با سطوح مختلف جلبک قرمز گراسیلاریا، اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($P>۰/۰۵$). با این حال به‌نظر می‌رسد که در تیمار گراسیلاریا ۶ درصد ، قابلیت هضم پروتئین، چربی و ماده خشک در مقایسه با سایر تیمارها بهتر است (جدول ۳).

آنالیز تقریبی لاشه: نتایج آنالیز تقریبی لاشه شامل پروتئین خام، چربی خام، خاکستر و ماده خشک در ماهی باس دریایی آسیایی تغذیه شده با سطوح مختلف جلبک گراسیلاریا در جدول ۴ ارائه شده است. طبق نتایج تفاوت معنی‌داری از نظر پروتئین، خاکستر و ماده خشک در بین تیمارهای آزمایشی مختلف مشاهده نگردید ($P>۰/۰۵$)؛ تنها تفاوت از نظر میزان چربی بوده که بیشترین میزان چربی در ماهیان تغذیه شده با تیمار گراسیلاریا ۳ درصد (۱/۵۲±۲۴/۳۳) دیده شد ($P<۰/۰۵$).

آنزیم‌های گوارشی: نتایج فعالیت آنزیم‌های گوارشی (پپسین، تریپسین، کیموتریپسین، لیپاز و آمیلاز) در ماهی باس دریایی آسیایی تغذیه شده با سطوح متفاوت جلبک قرمز گراسیلاریا در جدول ۵ آمده است. پروتئاز اسیدی پپسین در ماهیان تغذیه شده

جدول ۴ - مقایسه میانگین آنالیز تقریبی لاشه در ماهی باس دریایی آسیایی تغذیه شده با سطوح مختلف جلبک قرمز گراسیلاریا.

آنالیز تقریبی	کنترل مثبت	کنترل منفی	گراسیلاریا ۳٪	گراسیلاریا ۶٪	گراسیلاریا ۹٪
پروتئین	۵۶/۰۱±۳/۶۳	۵۶/۶۵±۲/۲۰	۵۶/۳۵±۳/۴۵	۵۸/۵۱±۱/۳۶	۵۹/۱۴±۲/۴۰
چربی	۲۱/۳۳±۰/۵۷^{b}	۲۲/۳۳±۱/۱۵^{ab}	۲۴/۳۳±۱/۵۲^{a}	۲۲/۰۰±۱/۷۳^{b}	۲۱/۳۳±۰/۵۷^{b}
خاکستر	۱۵/۲۸±۱/۹۲	۱۴/۵۸±۰/۲۲	۱۳/۹۳±۲/۰۹	۱۵/۶۶±۱/۰۶	۱۳/۱۳±۰/۸۱
ماده خشک	۳۰/۶۵±۱/۰۸	۳۰/۶۳±۰/۳۵	۳۱/۰۹±۰/۹۶	۳۰/۷۲±۰/۸۱	۳۰/۱۵±۰/۲۹

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف از معیار بیان شده‌اند. حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$).

جدول ۵ - مقایسه میانگین فعالیت آنزی‌های گوارشی در ماهی باس دریایی آسیایی تغذیه شده با سطوح مختلف جلبک قرمز گراسیلاریا.

آنزیم‌های گوارشی	کنترل مثبت	کنترل منفی	گراسیلاریا ۳٪	گراسیلاریا ۶٪	گراسیلاریا ۹٪
پپسین	۶۰/۷۹±۱/۱۵^{ab}	۶۱/۴۸±۰/۵۲^{a}	۵۸/۹۰±۰/۴۴^{b}	۵۰/۷۸±۱/۷۵^{c}	۴۰/۳۳±۲/۰۱^{d}
تریپسین	۱۵/۸۵±۰/۸۹	۱۵/۳۰±۰/۸۳	۱۴/۶۳±۱/۱۷	۱۵/۳۲±۱/۰۲	۱۴/۲۳±۰/۴۶
کیمو تریپسین	۷/۱۴±۰/۳۸	۷/۷۰±۰/۶۶	۶/۳۳±۰/۸۰	۷/۰۹±۰/۵۵	۶/۳۲±۰/۹۸
آمیلاز	۳۹/۳۱±۲/۹۱^{a}	۲۸/۷۱±۱/۵۴^{b}	۲۹/۹۲±۱/۹۶^{b}	۳۰/۷۴±۱/۵۹^{b}	۲۳/۸۶±۱/۳۹^{c}
لیپاز	۹/۲۱±۰/۹۸^{a}	۷/۱۰±۰/۹۹^{b}	۹/۲۹±۰/۹۸^{ab}	۸/۱۱±۰/۸۹^{ab}	۵/۱۹±۱/۰۳^{c}

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف از معیار بیان شده‌اند. حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$).

با تیمار کنترل منفی (۶۱/۴۸±۰/۵۲ u/mg protein) و ماهیان تغذیه شده با تیمار گراسیلاریا ۹ درصد (۴۰/۳۳±۲/۰۱ u/mg protein) به‌ترتیب، بیشترین و کمترین فعالیت را نشان داد ($P<۰/۰۵$). در ماهیان تغذیه شده با جیره گراسیلاریا ۹ درصد، فعالیت آنزیم پپسین ۱/۴۶ و ۱/۲۶ برابر کمتر از فعالیت این آنزیم در ماهیان تغذیه شده با تیمار به‌ترتیب ۳ و ۶ درصد بود ($P<۰/۰۵$).

نتایج نشان داد فعالیت پروتئازهای قلیایی شامل تریپسین و کیموتریپسین تحت تأثیر سطوح مختلف جلبک گراسیلاریا قرار نگرفت و تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مختلف آزمایشی مشاهده نگردید ($P>۰/۰۵$). فعالیت آمیلاز و لیپاز تحت تأثیر سطوح مختلف جلبک گراسیلاریا قرار گرفت و کمترین فعالیت آنزیم‌های مذکور در گروه تغذیه شده با جیره آزمایشی گراسیلاریا ۹ درصد و بیشترین فعالیت در گروه تغذیه شده با جیره کنترل مثبت مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و لیپاز در تیمار ۹ درصد به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمارهای ۳ و ۶ درصد بود.

بحث

در سال‌های اخیر، یکی از مباحث مورد توجه در پرورش متراکم ماهیان گوشتخوار، کاهش اثرات زیست محیطی جیره‌های غذایی بوده است؛ که برای این مهم پیشنهاد می‌شود از پروتئین‌های حیوانی در جیره غذایی کمتر استفاده شود (Sampaio-Oliveira and Cyrino, 2007). از علت‌های مهم در انتخاب جلبک *G. pygmaea* به‌منظور استفاده در جیره غذایی ماهیان دریایی می‌توان به اهمیت اقتصادی، ارزش غذایی بالا و فروانی آن در سواحل خلیج فارس اشاره کرد.

نتایج نشان داد که استفاده از جلبک *G. pygmaea* در سطوح ۹-۳ درصد جیره غذایی باس دریایی آسیایی، تفاوت معنی‌داری را در عملکرد رشد موجب نگردید، هرچند در سطح ۶ درصد سبب بهبود شاخص‌های تغذیه‌ای رشد از جمله وزن نهایی، افزایش وزن بدن، میزان رشد روزانه و ضریب تبدیل غذایی شد. با این حال، نرخ رشد ویژه در ماهیان تغذیه شده با تیمار گراسیلاریا ۶ درصد در مقایسه با سایر تیمارها بیشتر بود. براساس نتایج به‌نظر می‌رسد استفاده از پودر گراسیلاریا به میزان ۶ درصد می‌تواند تا حدودی تأثیر مثبتی بر روند رشد داشته باشد، اما با افزایش میزان آن در جیره غذایی، عملکرد رشد کاهش می‌یابد. یافته‌های Appler (۱۹۸۵) نتایج مشابهی را در ماهی *Oreocromis niloticus* و *Tilapia zillii* نشان داد به‌طوری که استفاده از جلبک سبز *Hydrodictyon reticulatum* به میزان ۵ درصد موجب بهبود عملکرد رشد و کارآیی استفاده از پروتئین شد و افزایش میزان جلبک در جیره

غذایی، مانع از بهبود شاخص‌های مذکور گردید. تأثیر مثبت استفاده از ماکروجلبک بر شاخص‌های تغذیه‌ای در سطوح پائین در ماهی پهن ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) (Ragaza *et al*., 2013)، باس دریایی اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) (Wassef *et al*., 2013)، سیم سرخ دریایی (*Pagrus major*) (Yone *et al*., 1986) و باراموندی (*Lates calcarifer*) (Shapawi and Zamary, 2016) نیز گزارش شده است. برخی محققین نیز نتایج متضاد را گزارش نموده‌اند که از جمله می‌توان به کاهش عملکرد رشد در قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، در استفاده از جلبک قرمز *Porphyra dioica* اشاره کرد (Soler-Vila *et al*., 2009). کاهش عملکرد رشد با استفاده از ماکروجلبک‌ها به میزان ۱۰ درصد در جیره غذایی سیم سر طلایی (*Sparus aurata*) (Wassef *et al*., 2005) و تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) (Azaza *et al*., 2008) نیز گزارش شده است.

ماکروجلبک‌ها منابع غنی از ویتامین‌ها، مواد معدنی، پلی فنول‌ها، پروتئین و چربی‌هایی هستند که از جمله عوامل تأثیر گذار بر رشد مطلوب هستند. در کنار ارزش غذایی بالا، ماکروجلبک‌ها حاوی کربوهیدرات هستند که در دسته پلی ساکاریدهای غیر نشاسته‌ای طبقه‌بندی می‌شوند (Fleurence, 1999). پلی ساکاریدهای غیر نشاسته‌ای با مانع شدن از فعالیت آنزیم‌های گوارشی یا با اتصال به اسیدهای صفراوی، موجب کاهش هضم و جذب نوترینت‌ها می‌شوند. این‌طور به‌نظر می‌رسد که مقادیر بالای ماکروجلبک در جیره غذایی با کاهش هضم‌پذیری پروتئین و چربی، سبب کاهش رشد می‌گردد (Francis *et al*., 2001; Burtin, 2003). چنین نتایجی در مطالعه حاضر و در ماهیان تغذیه شده با جیره آزمایشی گراسیلاریا ۹ درصد مشاهده گردید که کمترین عملکرد رشد را داشت.

در مطالعه حاضر، فعالیت پپسین در ماهیان تغذیه شده با تیمار گراسیلاریا ۹ درصد کاهش محسوسی را نشان داد که می‌تواند گواهی بر فرضیه Horie و همکاران (۱۹۹۵) باشد، مبنی بر آن‌که فیبر موجود در غذا می‌تواند مانع از فعالیت پپسین و به دنبال آن، سبب کاهش رشد ماهی گردد؛ به‌خصوص آن‌که مرحله اول هضم در ماهیان گوشتخوار، در معده اتفاق می‌افتد (Greenwood, 1953). براساس نتایج فعالیت تریپسین و کیموتریپسین به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر ماکروجلبک *G. pygmaea* قرار نگرفت؛ که نشان دهنده عدم تأثیر پودر ماکروجلبک مذکور بر پروتئازهای قلیایی است. علاوه بر این، کاهش در فعالیت آنزیم لیپاز و آمیلاز در ماهیان تغذیه شده با جیره آزمایشی گراسیلاریا ۹ درصد احتمالاً به‌دلیل افزایش در تخریب آنزیم‌های مذکور باشد تا کاهش در ترشح آن‌ها. پلی ساکاریدهای غیر نشاسته‌ای در گیاهان با آب یا مواد معدنی، کاتیون‌ها و مواد آلی جذب شده، ساختارهای شبکه‌ای تشکیل می‌دهند (Brinker, 2009). پلی ساکاریدهای غیر نشاسته‌ای محلول در جلبک‌ها، در طبیعت به‌صورت لزج و چسبناک یافت می‌شوند و در صورتی که در حد مطلوب و به میزان مناسب در جیره غذایی استفاده شوند سبب افزایش چسبناکی غذا و هضم روده‌ای می‌گردند (Xuan *et al*., 2013). استفاده بیش از حد از پلی ساکاریدهای غیر نشاسته‌ای به‌دلیل کاهش امکان اتصال آنزیم به سوبسترا، موجب کاهش قابلیت هضم پذیری پروتئین و چربی شده و مانع از واکنش مؤثر بین آنزیم و سوبسترا در سطح روده می‌شود (Francis *et al*., 2001). نتایج مطالعه حاضر با نتایج Xuan و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از ماکروجلبک *Gracilaria lemaneiformis* در ماهی سیم دریایی سر سیاه (*Acanthopagrus schlegelii*) مطابقت دارد.

در تحقیق حاضر، سطوح مختلف ماکروجلبک *G. pygmaea* تأثیر معنی‌داری بر میزان پروتئین خام، خاکستر و ماده خشک در ماهی باس دریایی آسیایی نداشت؛ اما میزان چربی ماهی ارتباط منفی با درصد جلبک در جیره‌های آزمایشی داشت؛ این امر بیانگر آن است که ماکروجلبک *G. pygmaea* متابولیسم چربی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در تحقیقی که با استفاده از *G. lemaneiformis* در ماهی سیم دریایی سرسیاه انجام شد، ماهیان تغذیه شده با تیمار دارای ۲۰ درصد جلبک در مقایسه با سایر تیمارها (۵، ۱۰ و ۱۵ درصد) کمترین میزان چربی را داشتند (Xuan *et al*., 2013). بالا بودن

چربی در گوشت آبزیان، نه تنها یکی از فاکتورهای مؤثر در کاهش طعم ماهیان پرورشی می‌باشد، بلکه بازارپسندی آبزیان را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد (Wassef *et al.*, 2001).

براساس نتایج مطالعه حاضر قابلیت هضم ظاهری پروتئین، چربی و ماده خشک در ماهی باس دریایی آسیایی تغذیه شده با سطوح مختلف جلبک قرمز گراسیلاریا، متفاوت نبود. به‌طور کلی نتایج قابلیت هضم ظاهری پروتئین در تحقیق حاضر برای ماهی باس دریایی آسیایی در محدوده ۹۰ تا ۹۱ درصد مشاهده شد و در محدوده ای از مقادیر که قبلاً برای هضم ظاهری پروتئین ترکیبات گیاهی در گونه‌های مختلف ماهی گزارش شده است، قرار داشت. Gomes و همکاران (۱۹۹۵) گزارش دادند که هضم ظاهری پروتئین برای آرد ماهی بین ۸۶/۶ و ۹۲/۳ درصد و برای پودرهای گیاهی مختلف بین ۸۰/۲ و ۹۵/۳ درصد است. Glencross و Hawkins (۲۰۰۴) هضم ظاهری پروتئین برای آرد سویا را ۸۷ درصد گزارش دادند. Gaylord و همکاران (۲۰۱۰) هضم ظاهری پروتئین را برای آرد ماهی های مختلف ۸۹ تا ۹۷ درصد، برای کنسانتره های گیاهی ۸۹ تا ۱۰۰ درصد و برای آردهای گیاهی ۷۰ تا ۸۹ درصد گزارش نمودند. در مطالعه حاضر قابلیت هضم ظاهری چربی در محدوده ۸۴ تا ۸۵ درصد به‌دست آمد. Cheng و Hardy (۲۰۰۴) در تحقیقات خود قابلیت هضم ظاهری چربی را برای مواد گیاهی مختلف در همین محدوده گزارش دادند. بالاترین قابلیت هضم چربی‌ها توسط این محققان برای آرد سویا ۸۶/۱ درصد، برای جو ۸۰/۷ درصد، برای گلوتن ذرت ۷۶ درصد و برای گندم ۷۷/۳ درصد گزارش شد.

در مجموع، براساس نتایج به نظر می‌رسد استفاده از پودر ماکروجلبک قرمز گراسیلاریا به عنوان مکمل غذایی تا سطح ۶ درصد در ترکیب جیره غذایی ماهی باس دریایی آسیایی، تأثیر مطلوبی بر عملکرد رشد، آنالیز تقریبی لاشه، قابلیت هضم ظاهری و فعالیت آنزیم‌های دخیل در گوارش و هضم ماهی باس دریایی آسیایی دارد، به‌طوری که نرخ رشد ویژه در ماهیان تغذیه شده با جیره گراسیلاریا ۶ درصد در مقایسه با سایر تیمارهای آزمایشی، بالاتر بود. همچنین استفاده از این سطح از پودر جلبک گراسیلاریا متابولیسم چربی را به‌طور مؤثری تحت تأثیر قرار داده و موجب کاهش میزان چربی انباشته شده در لاشه ماهی نسبت به سطوح بالاتر جلبک گردید.

تشکر و قدردانی

از مدیریت و کارکنان محترم مرکز تکثیر و پرورش ماهیان دریایی راموز-شرکت هوواش، به‌ویژه جناب آقای مهندس بحری و جناب آقای مهندس شاهرخی تشکر می‌شود. از کارکنان و کارشناسان پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس بویژه سرکار خانم دکتر مریم عضدی، از جناب آقای دکتر وحید مرشدی، خانم مهندس نرجس تنگستانی و جناب آقای مهندس ابراهیمی به جهت همکاری در اندازه-گیری‌های آزمایشگاهی صمیمانه قدردانی می‌گردد.

منابع

ربیعی ر.، اسدی م.، نژاد ستاری ط.، مجد ا.، سهرابی‌پور ج. ۱۳۸۶. بررسی تنوع گونه‌ای جلبک‌ها در رویشگاه جلبک قرمز *Gracilaria salicornia* در سواحل قشم. پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان. ۶۶: ۸۵-۹۲.

شرافت ن.، معتمدزادگان ع.، صفری ر. ۱۳۹۲. اثر زمان هیدرولیز ضایعات پس از پخت ماهی تن هوور (*Skipjack tuna*) با آنزیم آلکالاز بر راندمان بازیافت و اندازه مولکولی پروتئین‌های هیدرولیز شده. مجله نوآوری در علوم و فناوری غذایی. ۵(۳): ۵۴-۴۷.

قرنجینک ب.م. ۱۳۸۹. اطلس جلبک‌های دریایی سواحل خلیج فارس و دریای عمان. انتشارات موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۷۰ صفحه.

Abdelghany A.E., Ahmad M.H. 2002. Effects of feeding rates on growth and production of Nile tilapia, common carp and silver carp polycultured in fertilized ponds. *Aquaculture Research* 33, 415-423.

Anson M.L. 1938. The estimation of Pepsin, Trypsin, Papain and Cathepsin with Hemoglobin. *Journal of General Physiology* 22, 79-89.

AOAC. 2005. Official Method of Analysis 17th (end), Washington. DC: Association of Official Analytical Chemists.

Appler H.N. 1985. Evaluation of Hydrodictyon reticulatum as protein source in feeds for *Oreocromis* (Tilapia) *niloticus* and *Tilapia zillii*. *Journal of Fish*

Liu K., Hu G. 2010., An overview of progress toward developing an all plant-based diet for rainbow trout. *Bulletin of Fisheries Research Agency* 31, 9-14.

Glencross B., 2006. The nutritional management of barramundi, *Lates calcarifer* – a review. *Aquaculture Nutrition* 12, 291-309.

Glencross B., Hawkins W., 2004. A comparison of the digestibility of lupin (*Lupinus* sp.) kernel meals as dietary protein sources when fed to either, rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* or red sea bream, *Pagrus auratus*. *Aquaculture Nutrition* 10, 65-73.

Gomes E.F., Rema P., Kaushik S. 1995. Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): digestibility and growth performance. *Aquaculture* 130, 177-186.

Greenwood P.H. 1976. A review of the family Centropomidae (Pisces, Perciformes). *Bulletin of the British Museum (Natural History)* 29, 1-81.

Greenwood P.H. 1953. Feeding mechanism of the cichlid fish *Tilapia esculenta* Graham. *Nature* 172, 207-208.

Guerreiro I., Magalhães R., Coutinho F., Couto A., Sousa S., Delerue-Matos C., Domingues V.F., Oliva-Teles A., Peres H. 2019. Evaluation of the seaweeds *Chondrus crispus* and *Ulva lactuca* as functional ingredients in gilthead seabream (Sparus aurata). *Journal of Applied Phycology* 31, 2115-2124.

Hardy R.W. 1999. Aquaculture's rapid growth requirements for alternative protein sources. *Feed Management Journal* 50, 25-28.

Horie Y., Sugase K., Horie K. 1995. Physiological differences of soluble and insoluble dietary fibre fractions of brown algae and mushrooms in pepsin activity in vitro and protein digestibility. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 4, 251-255.

Iijima N., Tanaka S., Ota Y. 1998. Purfication and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream (*Pagrus major*). *Journal of Fish Physiology and Biochemistry* 18, 59-69.

Magruder W.H., 1988. Sargassum (*Phaeophyta, Fucales, Sargassaceae*) in the Hawaiian Islands. In: Abbott, I. A. [Ed.] Taxonomy of Economic Seaweeds. 2, California Sea Grant College Program, La Jolla, California, 65-87.

Marcouli P.A., Alexis M.N., Andriopoulou A., Georgudaki J. 2006. Dietary lysine requirement of juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Nutrition* 12, 25-33.

Biology 27, 327-334.

Azaza M.S., Mensi F., Ksouri J., Dhraief M.N., Brini B., Abdelmouleh A., Kraïem M.M. 2008. Growth of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L fed with diets containing graded levels of green algae ulva meal (*Ulva rigida*) reared in geothermal waters of southern Tunisia. *Journal of Applied Ichthyology* 24, 202-207.

Bernfeld P. 1951. Amylases α and β. In: P. Colowick, N.O. Kaplan (eds.), Methods in Enzymology, New York, Academic Press, 411 p.

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

Brinker A. 2009. Improving the mechanical characteristics of faecal waste in rainbow trout: the influence of fish size and treatment with a non-starch polysaccharide (*guar gum*). *Aquaculture Nutrition* 15, 229-240.

Burtin P. 2003. Nutritional value of seaweeds. *Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry* 2, 498-503.

Cheng Z.J., Hardy R.W., Huige N.J. 2004. Apparent digestibility coefficients of nutrients in brewer's and rendered animal by-products for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)). *Aquaculture Research* 35, 1-9.

Erlanger B.F., Kokowski N., Cohen W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95, 271- 278.

Ferraz de Arruda L., Borghesi R., Oetterer M. 2007. Use of fish waste as silage - a review. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50 (5), 879-886.

Fleurence J. 1999. Seaweed proteins: biochemical nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science & Technology* 10, 2-28.

Francis G., Makkar H.P.S., Becker K. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199, 197-227.

Furne M., Hidalgo M.C., Lopez A., Garcia-Gallego M., Morales A.E., Domezain A., Domezain J., Sanz A. 2005. Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii)* and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss)*, A comparative study. *Aquaculture* 250, 391-398.

Gaylord G.T., Barrows F.T., Overturf K.G.,

hepatopancreas and midgut. *Animal Feed Science and Technology* 132, 250-266.

Wan A.H.L., Soler-Vila A., O'Keeffe D., Casburn P., Fitzgerald R., Johnson M.P. 2016. The inclusion of *Palmaria palmata* macroalgae in Atlantic salmon (*Salmo salar*) diets: effects on growth, haematology, immunity and liver function. *Journal of Applied Phycology* 28, 3091-3100.

Wassef E.A., El-Sayed A., Sakr E. 2013. *Pterocladia* (Rhodophyta) and *Ulva* (Chlorophyta) as feed supplements for European seabass, *Dicentrarchus labrax* L., fry. *Journal of Applied Phycology* 25, 1369-1376.

Wassef E.A., Elmasry M.H., Mikhail F.R., 2001. Growth enhancement and muscle structure of striped mullet, *Mugil cephalus* L., fingerlings by feeding algal meal-based diets. *Aquaculture Research* 32, 315-322.

Wassef, E.A., El-Sayed A.F.M., Kandeel K.M., Sakr E.M., 2005. Evaluation of *Pterocla dia (*Rhodophyta) and *Ulva* (Chlorophyta) meals as additives to gilthead seabream *Sparus aurata* diets. *Egyptian Journal of Aquatic Research* 31, 321-332.

Worthington C.C. 1991. Worthigton enzyme manual related Biochemical. 3th Edition. Freehold. New Jersey. pp. 250-253.

Xuan X., Wen X., Li S., Zhu D., Li Y. 2013. Potential use ofmacro-algae Gracilaria lemaneiformis in diets for the black sea bream, Acanthopagrus schlegelii, juvenile. *Aquaculture* 412-413, 167-172.

Yin G., Li W., Lin Q., Lin X., Lin J., Zhu Q., Jiang H., Huang Z. 2014. Dietary administration of laminarin improves the growth performance and immune responses in *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology* 41, 402-406.

Yone Y., Furuichi M., Urano K. 1986. Effects of dietary wakame Undaria penatifida and Ascophyllum nodosum supplements on growth, feed efficiency, and proximate compositions of liver and muscle of red sea bream. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 528, 1465-1468.

Nakagawa H., Montgomery W.L., 2007. Algae. In: H. Nakagawa, M. Sato, D.M. Gatlin III (eds), Dietary supplements for the health and quality of cultured fish. Cabi International, Cambridge, USA, pp. 133-167.

Palmegiano G.B., Agradi E., Forneris G., Gai F., Gasco L., Rigamonti E., Sicuro B., Zoccarato I. 2005. Spirulina as a nutrient source in diets for growing sturgeon (*Acipenser baeri*). *Aquaculture Research* 36, 188-195.

Ragaza J.A., Koshio S., Mamauag R.E., Ishikawa M., Yokoyama S., Villamor S.S. 2015. Dietary supplemental effects of red seaweed *Eucheuma denticulatum* on growth performance, carcass composition and blood chemistry of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Research* 46 (3), 647-657.

Rangacharyulu P.V., Giri S.S., Paul B.N., Yashoda K.P., Rao R.J., Mahendrakar N.S., Mohanty S.N., Mukhopadhyay P.K. 2003. Utilization of fermented silkworm pupae silage in feed for carps. *Bioresource Technology* 86, 29-32.

Sampaio-Oliveira A.M.B.M., Cyrino J.E.P. 2007. Digestibility of plant protein-based diets by largemouth bass *Micropterus salmoides*. *Aquaculture Nutrition* 14, 318-323.

Shapawi R., Zamry A.A. 2016. Response of Asian seabass, *Lates calcarifer* juvenile fed with different seaweed-based diets. *Journal of Applied Animal Research* 44, 121-125.

Soler-Vila A., Coughlan S., Guiry M.D., Kraan S. 2009. The red alga *Porphyra dioica* as a fish-feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on growth, feed efficiency, and carcass composition. *Journal Applied Phycology* 21, 617-624.

Storelli C., Vilella S., Cassano G. 1986. Na-dependent D-glucose and L-alanine transport in eel intestinal brush border membrane vesicles. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 251, 463-469.

Tibbetts S.M., Milley J.E., Santosh P.L. 2006. Apparent protein and energy digestibility of common and alternative feed ingredients by Atlantic Cod, *Gadus morhua* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture* 261, 1314-1327.

Vasagam K.P.K., Balasubramanian T., Venkatesan R. 2007. Apparent digestibility of differently processed grain legumes, cow pea and mung bean in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius and associated histological anomalies in

Dietary supplemental effects of macro algae *Gracilaria pygmaea* on proximate analysis, apparent digestibility and digestive enzymes activity of Asian sea bass (*Lates calcarifer*)

Anahita Farhoudi[1], Iman Sourinejad[*1,5], Mahmoud Nafisi Bahabadi[2], Mir Masoud Sajjadi[3], Alireza Salarzadeh[4]

[1]Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.
[2]Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Persian Gulf, Bushehr, Iran.
[3]Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran.
[4]Department of Fisheries, Islamic Azad Unbiversity, Bandar Abbas Branch, Bandar Abbas, Iran.
[5]Department of Modern Technologies, Mangrove Forests Research Center, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

*Corresponding author: sourinejad@hormozgan.ac.ir
Received: 2019/1/19 Accepted: 2019/8/13

Abstract

A 6-week experiment was conducted to investigate the effects of dietary supplementation of red macroalga, *Gracilaria pygmaea* on proximate analysis, apparent digestibility and digestive enzymes activities of Asian sea bass, *Lates calcarifer*, with an initial mean weight of 28±5.9 g using a completely random design. The experimental diets were prepared using a fishmeal based positive control diet and a fishmeal-soy protein negative control diet supplemented with 3, 6 and 9% of red macro algae. The results indicated that the special growth rate was significantly higher for the 6% *G. pygmea* inclusion ($P<0.05$). At the end of the trial, the crude protein, ash and dry matter of fish carcass were not significantly different between the treatments ($P>0.05$), except for the fish fed with the 3% inclusion diet that exhibited significantly higher lipid level compared to the others ($P<0.05$). The results of the apparent digestibility of protein, fat and dry matter did not show significant differences ($P>0.05$), although these values were slightly improved in 6% inclusion treatment. The pepsin activity was decreased by about 1.46-fold and 1.26-fold in fish fed with the 9% diet when compared with those fed with the 3 and 6%, respectively ($P<0.05$). Activities of amylase and lipase were significantly lower in 9% treatment compared to 3 and 6% treatments ($P<0.05$). Present findings show the potential of *G. pygmaea* powder as a dietary supplement up to 6% inclusion in the diet to improve growth performance, carcass proximate composition, apparent digestibility and most of the digestive enzymes activities of the carnivorous Asian sea bass.

Keywords: Dietary supplement, Marine macro algae, Rearing, Digestive enzyme.