هفتمین کنفرانس ملی ماهی شناسی ایران

The 7th Iranian Conference of Ichthyology

برگزار کننده: دانشگاه لرستان با همکاری انجمن ماهی شناسی ایران

زمان: ۸ و ۹ آبان ۱۳۹۸

محورهای کنفرانس

- تنوع زیستی و حفاظت از ماهیان
- بیوسیستماتیک و رده بندی ماهیان
- زیست شناسی، بوم شناسی و جغرافیای زیستی ماهیان
- ژنتیک، فیزیولوژی و تکوین ماهیان
- تکثیر، پرورش و تغذیه ماهیان
- بهداشت، بیماری و انگل های ماهیان
- ماهی شناسی کاربردی
- ماهی و ماهی شناسی در علوم دیگر

آدرس دبیرخانه: استان لرستان، خرم آباد، کیلومتر ۵ جاده تهران، دانشگاه لرستان، معاونت پژوهش و فناوری

کد پستی: ۶۸۱۵۱-۴۴۳۱۶ ایمیل: ichthyoconf@lu.ac.ir آدرس سایت: www.ichconf.lu.ac.ir

بسمه تعالی

دانشگاه لرستان

شماره مجوز ISC

98190-61942

هفتمین کنفرانس ملی ماهی‌شناسی ایران

The 7th Iranian Conference of Ichthyology

بدین‌وسیله گواهی می‌شود **جناب آقای دکتر حمیدرضا احمدنیای مطلق**

در هفتمین کنفرانس ملی ماهی‌شناسی ایران شرکت نموده و مقاله خود را با عنوان **تغییر جمعیت باکتری‌ها و مخمرهای روده ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus*) در پاسخ به جیره‌های حاوی عصاره پوست انار (*Punica granatum*)** را به‌صورت **پوستر** ارائه کرده‌اند.

نویسندگان به ترتیب ظهور در مقاله: **زهرا رخناره، حمیدرضا احمدنیای مطلق*، امید صفری، یحیی سلاح‌ورزی**

دکتر محمد فیضیان	دکتر علی غلامی‌فرد	دکتر منوچهر نصری	دکتر سهیل ایگدری
رئیس کنفرانس	دبیر علمی کنفرانس	دبیر اجرایی کنفرانس	رئیس انجمن ماهی‌شناسی ایران

تغییر جمعیت باکتری‌ها و مخمرهای روده ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus*) در پاسخ به جیره‌های حاوی عصاره پوست انار (*Punica granatum*)

زهرا رخناره[1]؛ حمیدرضا احمدنیای مطلق[1*]؛ امید صفری[1]؛ یحیی سلاح ورزی[2]

[1] *گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط‌زیست، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران*
[2] *گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران*
Email: ahmadnia@um.ac.ir*

چکیده

امروزه با توجه به محدودیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، محققین، محصولات گیاهی را جهت مدیریت سلامت آبزیان موردبررسی قرار داده‌اند. عصاره‌ی پوست انار علاوه بر مواد معدنی، ویتامین‌ها، بتاکاروتن، پلی‌ساکاریدهای پیچیده، قندهای احیاکننده و فیبر دارای ترکیبات ضد اکساینده، ضدمیکروبی عامل رنگ و طعم‌دهنده نیز می‌باشد. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر عصاره انار بر شاخص‌های رشد و جمعیت باکتری‌ها و مخمرهای موجود در روده ماهی کاراس انجام شد. برای این منظور ۶۰ قطعه ماهی کاراس (۱۱/۰۴±۰/۲۲) در ۱۵ آکواریوم ۱۰۰ لیتری در قالب طرح کاملاً تصادفی توزیع شدند. ماهیان در طول دوره آزمایش با جیره‌های حاوی عصاره پوست انار ۰/۱، ۱، ۲ و ۴ درصد وزن غذا به مدت ۶۰ روز به میزان ۲ درصد وزن بدن تغذیه شدند. نتایج نشان داد عصاره پوست انار در تیمار ۴درصد به‌صورت معنی‌داری شاخص‌های رشد (وزن نهایی، افزایش وزن، ضریب رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی) را در مقایسه با تیمار شاهد کاهش داد ($p<0/05$). عصاره انار تأثیری بر تعداد کل باکتری‌های دستگاه گوارش و تعداد کل باکتری‌های اسیدلاکتیک نداشت اما تعداد کل باکتری‌های گرم منفی روده‌ای به‌صورت معنی‌داری در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با تیمار شاهد کمتر بود ($p<0/05$). تعداد کل مخمرهای موجود در روده نیز افزایش معنی‌داری را در تیمارهای آزمایشی نشان دادند ($p<0/05$). با توجه به نتایج، به دلیل اثر منفی عصاره پوست انار بر رشد، استفاده از آن به میزان ۲درصد وزن غذا جهت کاهش باکتری‌های گرم منفی روده‌ای توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: انار، رشد، باکتری، مخمر

مقدمه

امروزه صنعت آبزی‌پروری سریع‌ترین رشد را در صنایع تولید مواد غذایی داشته است FAO (2016) در سطح جهانی، این صنعت ازلحاظ تنوع گونه‌ای، تراکم و پرورش در حال گسترش است و در حال حاضر هدف از آبزی‌پروری به حداکثر رساندن راندمان تولید، برای بهینه‌سازی سودآوری هست Jahabakhshi et al. (2015). امروزه شیوع بیماری‌های خطرناک باکتریایی و ویروسی در صنعت آبزی‌پروری محدودیتی بزرگ محسوب می‌شوند(Yaoling et al. (1998. همواره راه‌حل‌هایی برای برطرف کردن این مشکلات ارائه‌شده است، به‌عنوان‌مثال در بخش کنترل بیماری‌ها، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها مطرح شد که این داروها مشکلات ویژه‌ای ازجمله مقاوم شدن عوامل بیماری‌زا و مسائل زیست‌محیطی را بـه وجـود آورده‌اند؛ استفاده‌ی گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات شیمیایی مختلف منجر به باقی ماندن داروها در بافت بدن موجودات و محیط و مقاوم شدن عوامل بیماری‌زا در ماهی‌های تحت درمان شده است(YeolLee and Gao (2012 از طرفی استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده یا ضدمیکروبی موفقیت کمی در پیش‌گیری یا درمان آبزیان داشته است Food and Agriculture Organization of the United Nations.(2008). ازجمله مواد جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توان افزودنی‌های خوراکی همانند آنتی‌بیوتیک، پروبیوتیک‌ها، ویتامین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، هورمون‌ها، آنزیم‌های خوراکی و گیاهان دارویی را نام برد Ahmadniaye, Safari, & Paolucci, (2019) در بین محرک‌های ایمنی انواع طبیعی آن به‌ویژه عصاره‌های گیاهی، به علت ایجاد آسیب کمتر به ماهی و محیط‌زیست به‌تازگی بیشتر موردتوجه بوده‌اند(Shafiei et al. (2016. عصاره‌های حاصل از بخش‌های مختلف میوه انار، غنی از ترکیبات فنولی بوده و عصاره پوست و روغن بذر آن، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی‌ای است که از آن می‌توان در غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد استفاده کرد Sarkhosh et al.(2007). در بین اجزای مختلف، عصاره پوست انار، دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی در شرایط آزمایشگاهی است که با میزان بالای ترکیبات فنولی وجود در این بخش همبستگی دارد(Wenjoun et al.(2010. پوست انار به دلیل حضور فنول هایی نظیر الاژیک، تانن‌ها، اسید الاژیک و اسید گالیک دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بسیار بالایی می‌باشد. بیشترین میزان ترکیبات فنولی در پوست انار مشاهده‌شده به‌گونه‌ای که میزان آن در پوست این میوه حدود ۱۰ برابر آب انار برآورد شده است Kazemizadeh and Fadaei Noghani (2016) استفاده از عصاره‌ی پوست انار به‌عنوان یک عنصر غذایی غنی از ضداکساینده در حال افزایش است Abolhasani and Barzegar(2016) و امروزه در صنایع غذایی به‌عنوان نگه‌دارنده در مواد غذایی‌ای که مستعد فساد اکسیداتیو هستند، نیز استفاده می‌شود Barizi et al. (2016) به‌عنوان‌مثال در مطالعه ترخاصی و همکاران اثر پوشش خوراکی حاوی عصاره پوست انار بر کیفیت و ماندگاری فیله ماهی کپور نقره‌ای در طول نگهداری در یخچال بررسی شد نتایج این مطالعه، اثر آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره پوست انار و پوشش‌های خوراکی را به‌عنوان حائل در عمر مفید فیله کپور نقره‌ای را نشان داده است که باعث تأخیر در اکسیداسیون چربی فیله ماهی در مدت‌زمان نگهداری در یخچال شده است Tarkhasi et al. (2016). ترکیبات ذکرشده در پوست انار همچون الاژیک اسید، فعالیت قابل‌توجه ضدمیکروبی نیز در برابر باکتری‌های بیماری‌زا نشان داده‌اند Siri . Pai et al.(2008)همکاران (۲۰۱۱) فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ی آبی و الکلی پوست انار را در برابر پاتوژن هایی ازجمله vibrio، cholera، Salmonella Escherichia coli، بررسی کردند. نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد که عصاره‌ی الکلی (اتانولی) تأثیر بیشتری در برابر پاتوژن های یادشده دارد Pai et al. (2011). Seeram و همکاران (۲۰۰۶) ترکیبات فنولیـک موجـود در انـار را مسئول ویژگی ضـدمیکروبی آن دانسـتند. با توجه به مطالعات انجام‌شده روی دیگـر جـانوران دربارهٔ آثار مثبت عصاره پوست انار بر تقویت سیستم ایمنی غیراختصاصی، مقاومت در برابر ویروس‌ها و بهبود رشد به نظر می‌رسد اسـتفاده از محصولات فرعی حاصل از صنایع فراوری میـوه انـار در خوراک آبزیان به دلیل غنی بودن از مـواد پلـی فنولـه بتوانند در تولید انواع جیره‌های غـذایی حـاوی ترکیبـات مؤثر دارویی گیاهی نقش مهمی ایفا کنند. در این صورت، آبزیان تولیدشده با این

خوراک‌ها ازنظر استانداردهای سلامت مصرف‌کننده از اهمیت بالایی برخوردار خواهند شد. بنابراین بررسی چگونگی استفاده از عصاره این گیاه در مقیاس آزمایشگاهی می‌تواند تجربه علمی و اطلاعات ارزشمندی را برای اجرای چنین برنامه غذایی تجاری و در سطح کارگاه‌های پرورشی فراهم آورد (Shafiei et al. (2016. با توجه به مرور منابع صورت گرفته، مطالعه‌ای که به بررسی جمعیت میکروبی روده ماهیان در پاسخ به عصاره پوست انار پرداخته باشد یافت نشد؛ لذا، این پژوهش با هدف مطالعه‌ی تغییرات جمعیت باکتری‌های روده ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus*) در پاسخ به جیره‌های حاوی عصاره پوست انار (*Punica granatum*) طراحی شد.

اجرای آزمایش

این آزمایش به‌صورت یک طرح کاملاً تصادفی در آزمایشگاه شیلات دانشکده منابع طبیعی و محیط‌زیست دانشگاه فردوسی مشهد به اجرا درآمد. جهت اجرای آزمایش، ۶۰ قطعه بچه ماهی کاراس طلایی (۱۱/۰۴±۰/۲۲) هم‌وزن و هم‌اندازه از یکی از مراکز تکثیر معتبر شهر مشهد خریداری شد. پس از طی کردن مراحل سازگاری به مدت ده روز، ماهیان به‌صورت کاملاً تصادفی در ۱۵ آکواریوم ۱۰۰ لیتری جداگانه تقسیم شدند. از آب شهری کلرزدایی شده با استفاده از هوادهی برای این آزمایش استفاده شد.

تهیه عصاره انار: جهت تهیه‌ی عصاره‌ی انار ابتدا ۳ کیلوگرم انار فردوس خریداری شد؛ سپس پوست آنان جدا شده و در دمای اتاق (۲۳ درجه سانتی گراد) و در کنار بخاری خشک گردید. پوست انار خشک‌شده آسیاب شد و سپس به نسبت ۱ گرم پودر و ۱۰سی سی حلال (متانول ۹۶٪) خالص‌سازی شد و بعد از آن ۴۸ ساعت بهم زده شد تا استخراج به‌خوبی صورت گیرد. مخلوط حلال و پودر پوست انار با استفاده از پمپ خلاء صاف شدند و عصاره‌ی اولیهء پودر به دست آمد و پس از سانتریفیوژ، عصاره تر تشکیل شد. برای اندازه‌گیری عصاره خشک، نمونه‌ها داخل دستگاه Rotary با دمای ۴۰ درجه و ۱۸۰ دور در دقیقه قرار گرفتند، نمونه غلیظ شده عصاره داخل پتری دیش قرارگرفته و در دمای ۴۰ درجه و ۴۸ ساعت خشک شد. جهت رقیق‌سازی و اسپری عصاره انار بر جیره عصاره مایع با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد.

جهت تغذیه ماهیان از خوراک مخصوص ماهیان زینتی محصول شرکت انرژی استفاده شد (ماده خشک ۶۹/۷۴±۲/۲۵، پروتئین خام ۴۰/۹۲±۱/۳۷، چربی خام ۳۷/۱۵±۰/۷۰، خاکستر ۲/۷۲±۰/۵۹، فیبر خام ۳/۱۵±۰/۹۵ و عصاره عاری از ازت ۱۹/۲۳±۱/۱۲). بر اساس دستورالعمل Ahmaniaye motlagh et al. (2017) جهت آماده‌سازی جیره‌های آزمایشی عصاره انار با سطوح صفر (شاهد)، ۰/۱ ، ۱، ۲ و ۴ درصد وزن غذا با محلول ژلاتین (۸ گرم بر لیتر) مخلوط شده و روی سطح غذا اسپری شد. غذاهای آماده‌شده به مدت یک ساعت در معرض جریان هوا قرار گرفتند تا خشک شده و تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

به مدت ۶۰ روز ماهیان با غذای آزمایشی سه بار در روز و به میزان ۲ درصد وزن بدن تغذیه شدند. شرایط محیطی به‌صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی تنظیم شد. برای آگاهی از عملکرد جیره‌های آزمایشی و چگونگی رشد ماهیان، در ابتدای دوره‌ی پرورش و در طول دوره‌ی پرورش هر ۱۴ روز زیست‌سنجی با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم صورت گرفت Jahabakhshi et al. (2015) لازم به ذکر است جهت کاهش خطا در آزمایش، در روز زیست سنجی و روز قبل از آن، غذادهی صورت نگرفت.

بررسی اثرات عصاره پوست انار بر عملکرد رشد

شاخص‌های رشد شامل وزن اولیه، وزن نهایی، میزان افزایش وزن، ضریب رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی انتهای دوره آزمایش و با استفاده از فرمول‌های زیر به دست آمدند Ahmadniaye motlagh et al.(2017).

وزن اولیه (گرم) – وزن نهایی (گرم) = افزایش وزن (گرم)

۱۰۰ × مدت زمان پرورش (روز) / [(متوسط وزن نهایی)Ln – (متوسط وزن اولیه)Ln] = ضریب رشد ویژه

میزان افزایش وزن (گرم) / مقدار غذای مصرف شده (گرم) = ضریب تبدیل غذایی

بررسی اثرات عصاره پوست انار بر شاخص های میکروبی

در پایان آزمایش جهت بررسی تأثیر عصاره پودر پوست انار بر ترکیب باکتریایی روده ماهیان مورد آزمایش، از هر تیمار ۳ ماهی به‌عنوان نمونه برداشته شد؛ پس از بی‌هوش کردن ماهیان با استفاده از پودر گل میخک (۰/۵ گرم در لیتر)، سطح بدن ماهیان توسط الکل ۷۰٪ ضدعفونی شد و از روده ماهیان طبق روش استاندارد (Mahious and Ollevier, (2005 نمونه‌برداری شد. نمونه‌های روده به همراه ۱۵ قطعه بید شیشه‌ای درون کرایوتیوپ (۲ سی سی) انتقال یافت. نمونه‌ها به‌وسیله‌ی دستگاه هموژنایزر به مدت ۲۰ ثانیه و با دور ۴۰۰ دور بر دقیقه هموژن شدند. پس از تهیه‌ی نمونه‌های هموژن با استفاده از محلول نمکی استریل نرمال (۰/۹ w/v NaCl درصد) رقت‌های مختلف در دامنه $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-۱۰}$ تهیه گردید. برای شمارش تعداد کل باکتری‌های هوازی از محیط کشت Plate Count Agar (Merck، آلمان)، باکتری‌های لاکتوباسیل از محیط کشتMRS Agar (Merck، آلمان)، قارچ از محیط کشت Potato Dextrose Agar (ibersco، سوئیس)، باکتری‌های گرم منفی روده‌ای از محیط کشت MacConkey Agar (Merck، آلمان) استفاده شد.

گرمخانه گذاری پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت درون با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در شرایط هوازی انجام شد. تعداد باکتری‌ها در هریک از نمونه‌ها بر اساس واحد تشکیل‌دهنده کلونی CFU (عکس ضریب رقیق‌سازی ×تعداد کلنی =CFU/g) شمارش و تعیین گردید.

تجزیه و تحلیل داده ها

قبل از آنالیز داده ها، نرمال بودن و همگن بودن آن‌ها به ترتیب با استفاده از تست شاپیروویلک-اسمیرنوف و تست لون آزمون گردید. از آزمون‌های واریانس یک طرفه و توکی جهت مقایسه میانگین ها در سطوح اطمینان ۵ درصد استفاده گردید. جهت تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS24 و جهت رسم نمودارها از نرم افزار Excel2010 استفاده گردید.

نتایج

نتایج حاصل از استفاده از سطوح مختلف عصاره پوست انار بر شاخص‌های رشد ماهی کاراس طلایی (*C. auratus*) طی ۶۰ روز آزمایش در جدول ۱ نمایش داده شده است. بر اساس نتایج، وزن نهایی در تیمارهای ۰/۱، ۱ و ۲ درصد اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد نشان نداد؛ اما این شاخص در تیمار ۴درصد به میزان معنی‌داری کمتر از شاهد بود ($p<۰/۰۵$). ضریب رشد ویژه و میزان افزایش وزن نیز در گروه تیمار ۴درصد به صورت معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد گزارش شد. بالاترین ضریب تبدیل غذایی در تیمار ۴درصد مشاهده شد ($p<۰/۰۵$).

نتایج استفاده از عصاره پوست انار بر شاخص های میکروبی روده ماهی قرمز (جدول ۲) نشان داد تیمارهای دریافت کننده عصاره پوست انار افزایش معنی‌داری را در تعداد باکتری‌های کل و باکتری‌های اسیدلاکتیک با تیمار شاهد نشان ندادند. تعداد باکتری‌های

گرم منفی در گروه شاهد به میزان معنی‌داری بیشتر از تیمار های آزمایشی بود (p<۰/۰۵). مخمرهای روده نیز در تیمارهای ۲ و ۴ درصد افزایش معنی‌داری را با شاهد نشان داد (p<۰/۰۵).

جدول ۱- مقایسه میانگین (± انحراف معیار) شاخص‌های رشد ماهی کاراس طلایی تغذیه شده با جیره های حاوی عصاره پوست انار (r=3)

تیمارهای آزمایشی	شاهد	۰/۱ درصد	۱ درصد	۲ درصد	۴ درصد
وزن اولیه	۱۰/۹۲±۰/۲۴	۱۰/۸۷±۰/۱۴	۱۱/۲۳±۰/۱۲	۱۰/۹۰±۰/۱۶	۱۱/۲۹±۰/۰۶
وزن نهایی	۱۴/۴۵±۰/۱۲^{b}	۱۳/۷۶±۰/۰۶^{ab}	۱۴/۲۱±۰/۴۰^{b}	۱۳/۶۷±۰/۷۳^{ab}	۱۳/۰۱±۰/۵۰^{a}
افزایش وزن	۳/۵۳±۰/۲۸^{b}	۲/۸۸±۰/۰۴^{b}	۳/۰۰±۰/۳۰^{b}	۲/۷۶±۰/۴۵^{ab}	۱/۷۲±۰/۴۵^{a}
ضریب رشد ویژه	۰/۵۶±۰/۰۴^{b}	۰/۴۷±۰/۰۱^{b}	۰/۴۷±۰/۰۴^{b}	۰/۴۵±۰/۸۵^{b}	۰/۲۸±۰/۰۶^{a}
ضریب تبدیل غذایی	۲/۱۰±۰/۰۰^{a}	۲/۵۶±۰/۰۲^{ab}	۲/۶۵±۰/۲۸^{ab}	۲/۹۴±۰/۶۶^{ab}	۳/۳۴±۰/۲۵^{b}

*داده‌های با حروف غیرمشترک در هر ردیف ازنظر آماری اختلاف معنی‌دار دارند.

جدول ۲- مقایسه میانگین (± انحراف معیار) تعداد کل باکتری‌های هوازی (۱۰^{۵}×)، گرم منفی (۱۰^{۳}×)، اسیدلاکتیک (۱۰^{۳}×) و مخمرهای موجود در روده ماهی کاراس طلایی تغذیه شده با جیره های حاوی عصاره پوست انار (r=3)

تیمارهای آزمایشی	شاهد	۰/۱ درصد	۱ درصد	۲ درصد	۴ درصد
باکتری‌های هوازی	۵۳/۰۰±۱۰/۲۱^{a}	۳۸/۲۰±۱۷/۰۰^{a}	۵۰/۰۰±۹/۵۰ ^{a}	۶۷/۰۰±۱۲/۴۷ ^{a}	۷۱/۶۶±۱۵/۷۳ ^{a}
باکتری‌های گرم منفی	۱۶۸/۳۷±۱۸/۵۱^{c}	۱۰۲/۱۶±۱۶/۰۴^{b}	۷۳/۰۰±۹/۴۰^{ab}	۶۰/۱۱±۱۲/۰۰^{a}	۶۸/۰۹±۷/۱۱^{a}
باکتری‌های اسید لاکتیک	۱۰/۱۴±۶/۸۶ ^{a}	۲۰/۱۶±۸/۵۳ ^{a}	۱۸/۹۶±۱۰/۲۲^{a}	۳۳/۶۵±۱۳/۵۹^{a}	۲۳/۴۷±۱۲/۰۰^{a}
مخمر	۲۷/۰۳±۴/۰۰^{a}	۸۵/۴۷±۱۰/۴۴^{b}	۴۶/۷۷±۹/۸۷^{a}	۷۹/۱۱±۷/۳۲^{b}	۹۹/۸۶±۱۰/۸۴^{b}

*داده‌های با حروف غیرمشترک در هر ردیف ازنظر آماری اختلاف معنی‌دار دارند.

بحث

خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی پوست انار به دلیل حضور تانن، آلکالوئیدها و فنول هایی نظیر الاژیک، تانن‌ها، اسید الاژیک و اسید گالیک در آن دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بسیار بالایی می‌باشد(Oliveira et al., 2010) مواد زیستی موجود در انار می‌توانند به‌عنوان افزودنی طبیعی برای نگه‌داری و افزایش کیفیت غذا به‌کاربرده شوند Abolhasani and Barzegar(۲۰۱۶) ؛ به‌طورکلی بخش‌های مختلف انار سرشار از ویتامین‌ها و مواد تحریک‌کننده‌ی اشتها می‌باشد و به‌عنوان یک منبع غنی از آنتوسیانین ها و آنتی اکسیدان ها به رشد و سلامت بیشتر کمک می‌کند، درنتیجه به دلیل همه‌ی این ویژگی‌ها استفاده از ترکیبات میوه انار در صنعت مواد غذایی در حال افزایش است. طبق بررسی‌های انجام‌شده، مطالعات بسیار اندکی روی تأثیر استفاده از عصاره‌ی الکلی پوست انار برشاخص های رشد ماهیان در کنار بررسی خواص آنتی اکسدانی انها صورت گرفته است.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از ۴درصد عصاره الکلی پوست انار در جیره غذایی ماهی کاراس سبب کاهش معنی دار وزن نهایی شد؛ به‌طوری‌که گروه شاهد بیشترین رشد را نسبت به تیمارهای دیگر داشت. در ارتباط با سایر ماهیان چون قزل آلا و همچنین بعضی حیوانات پرورشی دیگر مانند طیور استفاده از عصاره بخش‌های مختلف انار منجر به افزایش رشد شده است. رضوانی و رحیمی(۱۳۹۵) به بررسی اثر افزودن عصاره پوست انار به جیره دارای روغن سویا و مطالعه تأثیر آن بر عملکرد و تیتر آنتی بادی جوجه‌های گوشتی پرداختند. نتایج نشان داد عصاره پوست انار در جیره‌های حاوی چربی و بدون چربی می‌تواند با

بهبود خوراک مصرفی روزانه، گوارش‌پذیری مواد غذایی، فلور میکروبی مفید و سیستم ایمنی، را ارتقا دهد، بدون اینکه تأثیر نامطلوبی بر ضریب تبدیل غذایی و افزایش وزن داشته باشد. در مطالعه مذکور، افزایش وزن در تیمار دارای عصاره را می‌توان به افزایش خوش‌خوراکی و به دنبال آن افزایش مصرف خوراک و بهبود سلامت نسبت داد، که احتمالاً به سبب بهبود گوارش‌پذیری چربی، ماده‌ی خشک، کلسیم، فسفر و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی باشد. بهبود در افزایش وزن بدن جوجه‌های گوشتی همچنین احتمالاً می‌تواند به علت تغییر در ترکیب و فعالیت فلور میکروبی روده نیز باشد که ممکن است از رشد باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری و سموم آن‌ها را خنثی کند زیرا این سموم سبب کاهش گوارش‌پذیری پروتئین و شکستن آن به نیتروژن در دستگاه گوارش می‌شود(Rezvani and Rahimi (2017.

استفاده از جیره‌های غذایی حاوی ۱، ۲، ۳ و ۴ درصد آرد هسته‌ی انار در تغذیه ماهی قزل آلای رنگین کمان(*Oncorhynchus mykiss*)نشان داد حداکثر اضافه نمودن ۳درصد پودر دانه انار در جیره غذایی می تواند رشد را افزایش دهد. براساس نتایج آزمایش مذکور، ترکیبات فنلی و تانن موجود در پودر دانه انار -تا میزان مشخصی- با تحریک اشتها می توانند منجر به افزایش رشد شود و کاربرد بیش از حد آنان (۴درصد) رشد را کاهش می دهد (Emadi, Negarestan and Heidari, 2017). همچنین خوراندن پودر پوست انار به موش صحرایی در سطوح (۵، ۱۰ و ۱۵ درصد) افزایش وزن بدن را نسبت به گروه شاهد کاهش داد (Hossin (2009. نتایج آزمایشات مذکور با نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر مطابقت دارد. درواقع افزایش یا کاهش رشد آبزیان در پاسخ به افزودنی‌های خوراکی، برآیند فرایندهای بسیاری در بدن موجود زنده می باشد؛ مطالعات نشان داده اند که میزان بالای تانن ها ممکن است باعث کاهش جذب غذا، کاهش قابلیت هضم پروتئین و کربوهیدرات ها، آهسته شدن حرکات روده و افت خوش‌خوراکی غذا شود (Reed (1995. بررسی اثر عصاره انار بر تغذیه گوساله هولشتاین نیز نشان داد هضم ماده خشک، ماده آلی و نشاسته تحت تأثیر قرار نگرفت اما هضم پروتئین و چربی به شدت کاهش یافت (Oliveira et al.(2010.

در مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که به دلیل ترکیباتی همچون تانن و پلی فنول های فراوان موجود در عصاره پوست انار و خاصیت ضد تغذیه‌ای آن‌ها، حرکات روده کاهش یافته و با کاهش هضم و جذب کربوهیدرات ها، پروتئین ها و چربی ها، رشد در سطح ۴ درصد عصاره پوست انار کاهش یافت.

امروزه تمایل به استفاده از ضد میکروب‌های طبیعی در مواد غذایی افزایش‌یافته است. گزارش‌ها زیادی مبنی بر فعالیت ضدباکتریایی و ضد قارچی عصاره قسمت‌های مختلف انار ارائه شده است. در بین اجزای مختلف، عصاره پوست انار، دارای بیشترین فعالیت ضد میکروبی در شرایط آزمایشگاهی است که با میزان بالای ترکیبات فنولی موجود در این بخش (و آلکالوئیدی شامل پله‌تیرین و تانن های قابل هیدرولیز از قبیل پونیکالین، گالیک اسید، الاژیک اسید و آنتوسیانین‌ها) همبستگی دارد Abdollahzadeh et al.(2011); Naz, Siddiqi, Ahmad, Rasool, & Sayeed.(2007).; Reddy, Gupta, Jacob, Khan, & Ferreira, (2007). در ارتباط با فعالیت ضد میکروبی عصاره پوست انار مطالعات فراوانی در خصوص کنترل بار باکتریایی محصولات غذایی دریایی صورت گرفته است(Shafiei et al (2016. بر اساس مرور منابع، پژوهش حاضر، برای اولین بار به بررسی تأثیر عصاره پوست انار بر جمعیت میکروبی روده ماهی پرداخته است.

محققین، فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ی آبی و الکلی پوست انار را در برابر برخی از باکتری‌های بیماری زا بررسی کردند و نتیجه گرفتند که عصاره‌ی اتانولی در مقایسه با سایر فراورده های انار، تأثیر بیشتری در برابر باکتری‌های سالمونلا، شیگلا و ای-کولای داشت (Pai et al. (2011. در مطالعه ای که ارتباط پوست میوه، برگ و بذرهای انار با محتوای فنولیکی آن بررسی شد؛ عصاره متانولی پوست انار در غلظت ۱۵۰۰ قسمت در میلیون، به صورت موثری از رشد میسلیوم قارچ ها جلوگیری کرد Tehranifar, Selahvarzi, Kharrazi, & Bakhsh.(2011).

احتمالا کاهش در تعداد باکتری‌های گرم منفی نیز به دلیل خاصیت ضدباکتریایی تانن های موجود در عصاره پوست انار باشد؛ چرا که ثابت شده است که این فعالیت ضد باکتریایی ممکن است مربوط به وجود تانن‌های هیدرولیز پذیر و پلی فنولیک ها در عصاره انار و بطور خاص پونیکالاژین و اسید گالاژیک باشد (Reddy et al.(2007. این بدان معنی است که اثر ضد میکروبی تانن ها به سمیت و ساختار مولکولی آن مربوط می شود. تانن ها ممکن است بر روی دیواره سلولی و در سراسر غشای سلولی عمل کنند زیرا می توانند پروتئین ها را رسوب دهند (Vasconcelos et al.(2006. آنها همچنین ممکن است بسیاری از آنزیم ها مانند گیکوزیلترانزفرازها را سرکوب کنند (Abdollahzadeh et al., 2011; Vasconcelos et al.(2006؛ بنابراین، خواص ضد میکروبی عصاره انار ممکن است به طور مستقیم عفونت های دستگاه گوارش را کاهش دهد Oliveira et al. (2010).

در مطالعه حاضر، با وجود کاهش باکتری‌های گرم منفی، تعداد باکتری‌های هوازی و اسید لاکتیک (به عنوان گروه مفید) افزایش نیافت، با توجه به مرور منابع صورت گرفته ترکیبات ضدمیکروبی موجود در انار علاوه بر باکتری‌های گرم منفی، باکتری‌های گرم مثبت مانند باسیلوس ها را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهند (Naz et al.(2007. همواره خاصیت ضد قارچی عصاره پوست انار مورد توجه محققین بوده است (Abdollahzadeh et al.(2011 در این آزمایش، افزایش تعداد مخمرهای روده را احتمالا بتوان با کاهش رقابت آنان با باکتری ها و کنترل قارچ های روده در ارتباط دانست.

نتیجه‌گیری

آزمایش حاضر نشان داد استفاده از عصاره پوست انار در جیره ماهی کاراس در سطوح ۰/۱، ۱ و ۲ درصد وزن غذا، تأثیری بر میزان رشد ماهی نداشت و افزایش این عصاره به میزان ۴ درصد به میزان معنی‌داری رشد را کاهش داد. نتایج بررسی‌های میکروبی روده نیز نشان داد باکتری‌های گرم منفی و تعداد مخمرهای روده‌ای تحت تأثیر تیمارهای حاوی عصاره پوست انار (۲ و ۴ درصد) به ترتیب کاهش و افزایش یافتند. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، درصورت استفاده از میزان ۲درصد عصاره پوست انار در جیره غذایی، علاوه بر کنترل شرایط میکروبی روده، رشد نیز تحت تأثیر قرار نخواهد گرفت. پیشنهاد می‌گردد در مطالعات بعدی تأثیر عصاره پوست انار بر جمعیت میکروبی سایر آبزیان و تغییرات ناشی از آن بر بافت‌شناسی روده نیز مورد مطالعه قرار گیرد.

منابع

Abdollahzadeh, Sh. Mashouf, RY. Mortazavi, H. Moghaddam, M.H. Roozbahani, N. & Vahedi, M. (2011). Antibacterial and Antifungal Activities of Punica Granatum Peel Extracts Against Oral Pathogens. Journal of Dentistry (Tehran, Iran), 8(1), 1–6.

Abolhasani, A. and Barzegar, M.(2016).a review on the application of different parts of in food industry.First international congress of 24 th national congress of Iranian food science and technology.(2016).

Ahmadniaye motlagh, H. Abdolmajid, H. Rasul, G. Agh, N. Safari, O. & Mahkameh, L. (2017). Reproductive performance and intestinal bacterial changes of Carassius auratus fed supplemented lactoferrin and Lactobacillus rhamnosus PTCC 1637 diet. Iranian Journal of Ichthyology, 4(2):150–161.

Ahmadniaye, M. Safari, O. & Paolucci, M. (2019). Effect of different levels of milkweed (Calotropis persica) seed powder on the growth parameters, immunity and gut microbiota of oncorhynchus mykiss. Iranian Journal of Veterinary Science and Technology, 11(1): 43–67.

Barizi, E. shekarforush, s. sh. (2016). Investigation of the antioxidant properties of metanolic peel extract of pomegranate (Punica granatum var. Rabbab). Journal of Food Hygiene, Vol. 6, No 23.

Emadi, H. Negarestan, H. & Heidari, M. (2017). The core of pomegranate (Punica granatum) seed kernel meal effects of growth parameters of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Iranian Scientific Fisheries Journal, 25(4): 171–175.

FAO (2016) 2016 | FAO | Food and Agriculture Organization of the United Nations. http://www.fao.org/news/archive/news-by-date/2016/en/. Accessed 21 Sep 2018.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2008) The state of food and agriculture 2008. 128

Hossin, F. L. A. (2009). Effect of pomegranate (Punica granatum) peels and it's extract on obese hypercholesterolemic rats. Pakistan Journal of Nutrition, 8(8): 1251–1257.

Jahanbakhshi ,A. R. Ahmadniye Motlagh ,H. R. Javadi Mosavi ,M. and Rahimi kia, A.(2015). Effects oF garllc (allIum sativum) extract on growth performance, survival rate, some hematological and biochemical indices of gourami (trIchogaster trichopterus). Iranian Jornal of Animal . Scienc Reasearch.Vol 7.:218_224

Kazemizadeh, R. and Fadaei Noghani, V.(2016). The determination of antioxidant activity, total polyphenols and microbial total count of functional flavored milk containing pomegranate peel extract and date datesyrup during cold storage . Iranian Food Science and Technology Research Journal Vol. 12(4): 489-498

Mahious ,A. Ollevier, F. 2005. Probiotics and prebiotics in aquaculture: a review. In: 1st Regional workshop on techniques for enrichment of live food for use in larviculture AAARC, pp: 17-26.

Naz, S. Siddiqi, R. Ahmad, S. Rasool, S. A. & Sayeed, S. A. (2007). Antibacterial activity directed isolation of compounds from Punica granatum. Journal of Food Science, 72(9):M341–M345.

Oliveira, R. A. Narciso, C. D. Bisinotto, R. S. Perdomo, M. C. Ballou, M. A. Dreher, M., & Santos, J. E. P. (2010). Effects of feeding polyphenols from pomegranate extract on health, growth, nutrient digestion, and immunocompetence of calves. Journal of Dairy Science, 93(9): 4280–4291. https://doi.org/10.3168/jds.2010-3314

Pai, V. Rubee Chanu, T.Chakraborty, R. Raju, B. (2011) Evaluation of the antimicrobial activity of Punica granatum peel against the enteric pathogens : An invitro study. 1:57–62

Reddy, M. K. Gupta, S. K. Jacob, M. R. Khan, S. I. & Ferreira, D. (2007). Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from Punica granatum L. Planta Medica, 53(05): 461–467.

Reed, J. D. (1995). Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. Journal of Animal Science, 73(5): 1516–1528.

Rezvani,M.R. Rahimi, s.(2017). Effects of adding pomegranate peel extract and commercial antioxidant to diets on performance, nutrient digestibility, gastrointestinal micro flora and antibody titer of broilers . Journal of Veterinary Research, 72(2):147-156,2017

Sarkhosh ,A. Zamani ,Z. Fatahi ,R. Ghorbani, H. Hadian, J.(2007). A review on medicinal characterstics of pomegranate (punica granatum L.). Journal of medicinal plants, 2(22): 13_24.

Seeram, N.P. Henning, S.M. Zhang, Y. et al (2006) Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. Journal of Nutr 136:2481–2485. doi: 10.1093/jn/136.10.2481

Shafiei ,F.soofiani, M.N. Ebrahimi, E. Nematollahi ,A. Mohebbi ,A.(2016). Effect of alcoholic extract of pomegranate peel (Punica granatum L.) on blood parameters of common carp (Cyprinus carpio) fingerling. Scientific - Research Journal of fisheries & technology,5(2).

Siri, S. Wadbua, P. Kitancharoen, N. (2008) Antibacterial and phytochemical studies of 20 Thai medicinal plants against catfish-infectious bacteria, Aeromonas caviae.

Tehranifar, A., Selahvarzi, Y., Kharrazi, M., & Bakhsh, V. J. (2011). High potential of agro-industrial by-products of pomegranate (Punica granatum L.) as the powerful antifungal and antioxidant substances. Industrial Crops and Products, 34(3): 1523–1527.

Vasconcelos, L. C. de S.. Sampaio, F. C. Sampaio, M. C. C. Pereira, M. do S. V. Higino, J. S. & Peixoto, M. H. P. (2006). Minimum inhibitory concentration of adherence of Punica granatum Linn (pomegranate) gel against S. mutans, S. mitis and C. albicans. Brazilian Dental Journal, 17(3): 223–227.

Wenjuan, Q.u., Zhongli, P. and Haile, Ma. (2010). Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. Food Engergy, 16-23.

Yaoling, L. Jiunrong, C.S. Mengsyh, L.I, et al (1998) The effects of garlic powder on the hypolipidemic function and antioxidative tatus in hamsters. Journal of Nutr..

YeolLee ,J. Gao, Y .(2012) Review of the Application of Garlic, Allium sativum, in Aquaculture. Journal of World Aquac Soc 43:447–458. doi: 10.1111/j.1749-7345.2012.00581.x.

Changes in gut bacteria and yeast count of *Carassius auratus* fed pomegranate (*Punica granatum*) peel extract supplemented diets

Zahra Rokhnareh [1]; Hamidreza Ahmadniaye Motlagh [1,*]; Omid Safari[1]; Yahya Selahvarzi

[1] *Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Environment, Ferdowsi University of Mashhad, Iran*
[2] *Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture,Ferdowsi University of Mashhad, Iran*
Email: ahmadnia@um.ac.ir*

Abstract
Today, due to the limited use of antibiotics, researchers have been investigating herbal products for aquatics health management. In addition to minerals, vitamins, beta-carotene, polysaccharides, and fiber, pomegranate peel has antioxidant, antimicrobial, colorant, and flavoring properties. The aim of this study was to investigate the effect of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract on growth indices and gut bacteria and yeast count of *Carassius auratus*. For this, 60 fish (11.04±0.22) were distributed in 15 aquariums (100-L) in a completely randomized design. Fish were fed diets containing 0.1, 1, 2, and 4% pomegranate peel extract for 60 days at 2% body weight during the experiment. Results showed that pomegranate peel extract significantly reduced growth indices (final weight, weight gain, SGR, and FCR) at 4% compared to the control ($p < 0.05$). Pomegranate peel extract did not affect the total aerobic bacteria, and total lactic acid bacteria count, but the intestinal gram-negative bacteria count was significantly reduced in experimental treatments ($p < 0.05$). Total yeast count showed a significant increase in treated animals ($p < 0.05$). According to the results, due to the negative effect of pomegranate peel extract on growth, it is recommended to be used at 3% of the diet to reduce intestinal gram-negative bacteria.
Keywords: Pomegranate, Growth, Bacteria, Yeast