احتیاجات تغذیه‌ای لارو ماهیان دریایی

بهزاد سروی[۱]

۱. پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، هرمزگان، ایران، صندوق پستی: ۹۳۱۶۵-۷۹۱۶۷۲.

*نویسنده مسئول :bsarvi@ut.ac.ir

چکیده

یکی از مشکلات کلیدی در توسعه نیافتن صنعت پرورش ماهیان دریایی در جهان عدم موفقیت در تولید پیوسته بچه ماهیان در شرایط اسارت است. این موضوع ریشه در بالا بودن تلفات لارو ماهیان دریایی در زمان پرورش در شرایط محصور دارد. تلفات بالای لاروها در این مقطع زمانی می‌تواند ناشی از عوامل مختلفی باشد. مشخصاً، تغذیه یکی از عوامل محوری در موفقیت فعالیت‌های آبزی پروری بوده و در طول دوره لاروی دارای یک تأثیر مستقیم در کاهش یا افزایش تلفات است. علی‌رغم پیشرفت‌های قابل توجه در زمینه تغذیه ماهیان، هنوز سوالات بی‌پاسخ بسیاری در زمینه لارو ماهیان دریایی باقی مانده است. لارو ماهیان دریایی فاقد معده در هفته‌های آغازین خروج از تخم هستند. اگرچه فقدان معده در آنها به این معنا نیست که لوله گوارشی فاقد کارایی است، بلکه موضوع چالش برانگیز این است که تعیین نماییم چه ترکیبات تغذیه‌ای، مولکولی و ذرات هستند که روده لاروها توانایی هضم و جذب آنها را داراست. بنابراین، درک و فهم جامع از احتیاجات تغذیه‌ای لارو ماهیان دریایی به تکامل و ساخت خوراک‌های فرموله شده و به کارگیری ترکیبات تغذیه‌ای ضروری جهت غنی‌سازی غذای زنده در زمان پرورش لاروها در شرایط اسارت کمک می‌نماید. این امر منجر به افزایش رشد و بازماندگی لاروها می‌گردد.

کلمات کلیدی: لارو ماهیان دریایی، نیاز تغذیه‌ای، جیره فرموله، غذای زنده، رشد و بازماندگی

مقدمه

تعیین احتیاجات تغذیه‌ای لاروها یکی از جنبه‌های بسیار پیچیده در تغذیه ماهیان است. مسلماً آگاهی از احتیاجات تغذیه‌ای لاروها در طول دوره تکامل در بهینه کردن فرمولاسیون خوراک به کار گرفته شده در دوره لاروی که اصطلاحاً به ریز ذرات غذایی[1] معروف است، محصولات غنی‌کننده غذای زنده (روتیفر و آرتمیا) و پروتکل‌های تغذیه‌ای مشارکت داشته و سبب بهبود کیفیت لاروها و بچه ماهیان می‌گردد. تا قبل از باز شدن دهان، تغذیه جنین و لاروهای تازه از تخم خارج شده از طریق باز جذب محتویات غذایی کیسه زرده صورت می‌پذیرد که به این مرحله تغذیه داخلی[2] اطلاق می‌گردد. بعد از باز شدن دهان و جذب کیسه زرده، تغذیه خارجی[3] آغاز می‌شود. ذخایر غذایی موجود در کیسه زرده لاروها در شروع تغذیه فعال بسیار محدود است. بنابراین، بازماندگی لاروها به میزان زیادی وابسته به کیفیت غذایی است که در شروع تغذیه خارجی برای آنها فراهم می‌گردد و باید پوشش دهنده تمام نیازهای تغذیه‌ای آنها باشد.

عدم تکامل دستگاه گوارش لارو ماهیان دریایی در زمان تفریخ و تغییرات دستگاه گوارش آنها در طول دوره تکامل نشان می‌دهد که احتیاجات تغذیه‌ای بین لاروها و بچه ماهیان مشابه یکدیگر نیستند. در حقیقت یک خوراک فرموله‌ای که به خوبی از رشد بچه ماهیان حمایت می‌کند، منجر به بروز نتایج ضعیف رشد و بازماندگی در لاروها می‌گردد. این نشان دهنده اختصاصی بودن احتیاجات تغذیه‌ای لاروهاست. به دلیل اینکه لاروها در طول دوره تکامل خود به دلیل متامورفیسم دست خوش تغییرات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی قابل ملاحظه می‌گردند.

طراحی و فرمولاسیون خوراک‌ها و محصولات غنی کننده غذای زنده، نیازمند شناسایی احتیاجات تغذیه‌ای لاروها و به کارگیری این اطلاعات در فرمولاسیون محتوای ترکیبات تغذیه‌ای خوراک و غنی کننده‌هاست (Kolkovski et al., 2009). احتیاجات تغذیه‌ای غالباً به عنوان احتیاج برای حداکثر رشد و بازماندگی تعریف می‌شوند، به طوری که ارتباط ماهی، خوراک و تغذیه دارای یک تأثیر مهم در تعیین احتیاجات کمی است (Hamre et al., 2013). همچنین احتیاجات تغذیه‌ای می‌تواند به عنوان احتیاج برای تأمین حداقل انرژی مورد نیاز برای زنده نگه داشتن ماهی[4]، احتیاج برای حداقل هزینه تولید[5] و یا احتیاج برای سلامت ماهی[6] تعریف شوند. هدف مطالعه حاضر احتیاجات تغذیه‌ای لارو ماهیان دریایی برای حداکثر رشد و بازماندگی است.

بخش عمده‌ای از تحقیقات صورت گرفته در رابطه با احتیاجات تغذیه‌ای لاروها، روی چربی‌ها متمرکز بوده است. در حقیقت تا زمانی که دانش ساخت ریزذرات غذایی برای لاروها فراهم نبود، مطالعات در زمینه احتیاجات چربی آنها آسان‌تر انجام می‌گرفت. چون میزان چربی کل یا پروفایل اسیدهای چرب در غذای زنده وابسته به نوع تغذیه آنها بوده و به راحتی قابل تغییر است، اما تغییر میزان پروتئین و پروفایل اسیدهای آمینه در غذای زنده به دلیل وابستگی آنها به متابولیسم و برنامه ژنتیکی موجود، تقریباً غیر ممکن است. این در حالیست که رشد در واقع ساخت پروتئین و ذخیره آن در بدن می‌باشد. به این ترتیب با ساخت و به کارگیری خوراک‌های فرموله و تغذیه لاروها با آنها امکان بررسی احتیاجات پروتئینی نیز فراهم گردید (Srivastava et al., 2006).

بهینه‌سازی ترکیبات غذایی درشت مغذی‌ها (پروتئین، چربی و کربوهیدرات) در جیره غذایی در مراحل مختلف رشد لاروها و بچه ماهیان متفاوت است. چراکه این دو دارای یک رفتار تغذیه‌ای کاملاً متفاوت هستند که تا حدودی به سبب تفاوت در ظهور معده و عملکرد کامل این اندام در آنهاست. به دلیل عدم شکل‌گیری معده به عنوان مکانی برای ذخیره غذا در لارو ماهیان دریایی در مراحل اولیه تکامل، آنها بدون بروز نشانه‌های سیری، گرایش به یک تغذیه پیوسته از مواد غذایی در دسترس دارند. همین عامل سبب کاهش زمان عبور غذا از روده و کم شدن بازدهی هضم و جذب مواد غذایی می‌گردد. اما برعکس، بچه ماهیان زمانی که معده آنها کاملاً پر گردد، تغذیه را متوقف می‌نمایند. این موضوع از عبور سریع غذا از روده آنها

[1]. Microdiet
[2]. Endogenous feeding
[3]. Exogenous feeding
[4]. Requirement for body maintenance
[5]. Requirement for least cost production
[6]. Requirement for fish health

جلوگیری کرده و سبب افزایش هضم و جذب ترکیبات غذایی می‌گردد (Rønnestad et al., 2013).

تعیین احتیاجات تغذیه‌ای لاروها به روش مستقیم و غیر مستقیم امکان پذیر است. متداول‌ترین روش ارزیابی احتیاجات غذایی لاروها در روش مستقیم، تغذیه آنها با غذای زنده یا خوراک فرموله‌ای است که تنها میزان یک ماده تغذیه‌ای معین در آنها متغیر است. این تکنیک به مطالعه دز-پاسخ[1] نیز معروف است. باید توجه داشت در غذای زنده همان طور که اشاره شد امکان کنترل برخی مواد تغذیه‌ای نظیر، اسیدهای چرب وجود دارد ولی دست‌کاری مقادیر مواد غذایی مثل، پروتئین کل، اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و مواد معدنی دشوار می‌باشد. به دلیل اینکه برنامه ژنتیکی و متابولیسم بدن خود موجود زنده سبب تغییر مقادیر مواد غذایی اخیر می‌گردد که از طریق غنی‌سازی فراهم می‌شوند. در این حالت استفاده از ریزذرات غذایی یک روش مناسب برای تعیین احتیاجات تغذیه‌ای لاروها خواهد بود. اگرچه خوراک‌های فرموله شده خود دارای مشکلات گوناگونی نظیر، تراوش و پایداری در زمان ورود به آب هستند. روش‌های غیر مستقیم به کار گرفته شده جهت ارزیابی احتیاجات تغذیه‌ای لاروها شامل، ۱- مطالعه ترکیبات بیوشیمیایی غذای زنده‌ای که لاروها در محیط‌های طبیعی زیست خود به صورت عمده از آنها تغذیه می‌نمایند (کوپه‌پودها). ۲- بررسی ترکیبات بیوشیمیایی تخم، به دلیل اینکه آنها باید دربردارنده تمام مواد غذایی باشند که برای رشد و تکامل جنین و لارو تا مرحله جذب کیسه زرده ضروریست. ۳- مطالعه سرنوشت یک ماده غذایی (استفاده از آن در تولید انرژی و یا مشارکت آن در بافت‌ها) در طول دوره تکامل جنین و لارو می‌تواند اطلاعات نسبتاً مهمی را در رابطه با اهمیت آن برای رشد فراهم آورد. ۴- مطالعه فعالیت آنزیمی و بیان ژن‌های ارتباط یافته با متابولیسم یک ماده غذایی خاص یا مکانیزیم‌های فیزیولوژیکی که این ماده مورد استفاده قرار می‌گیرد. ۵- مطالعات رفتاری ارتباط یافته با تکامل سریع سیستم عصبی مرکزی و اندام‌های حسی می‌تواند فراهم آورنده اطلاعاتی در رابطه با اهمیت مواد غذایی به کار گرفته شده در تکامل آنها نظیر، اسیدهای چرب ضروری، ویتامین E، و اسیدهای آمینه باشد. ۶- استفاده از مواد رادیو اکتیو جهت نشان‌دار کردن یک ماده غذایی خاص و خوراندن آن به لاروها با تکنیک لوله موئین[2]، اطلاعات دقیقی را در رابطه با هضم و ذخیره‌سازی آن فراهم می‌آورد (Kolkovski et al., 2009). روتیفر و آرتمیا از غذاهای زنده متداول به کار گرفته شده جهت تغذیه لارو ماهیان دریایی در زمان پرورش آنها در شرایط اسارت هستند. مقایسه ترکیبات بیوشیمیایی پیکره این دو موجود غذایی اخیر با کوپه‌پودها که منبع غذایی اصلی لاروها را در دریا تشکیل می‌دهد، حاکی از آن است که این دو زئوپلانکتون اخیر دارای کمبودهایی از نقطه نظر درشت مغذی‌ها[3] و ریز مغذی‌ها[4] در قیاس با کوپه‌پودها هستند. بنابراین ضروریست که این ترکیبات قبل از به کارگیری روتیفر و آرتمیا جهت تغذیه لارو ماهیان دریایی از طریق غنی‌سازی در آنها افزایش یابد.

لذا، در این مقاله مروری سعی شد که اطلاعات کاربردی در زمینه نیازهای غذایی لارو ماهیان دریایی جهت کمک به فرمولاسیون بهینه ریز ذرات غذایی و محصولات غنی کننده غذای زنده که جهت پرورش آنها در شرایط اسارت به کار گرفته می‌شود مورد ارزیابی و تحلیل قرار گیرد.

۲- احتیاجات چربی

تخم ماهیان دریایی دارای یک محتوی چربی زیاد در حدود ۲۰ درصد است. چربی‌ها به همراه اسیدهای آمینه آزاد مهمترین منبع تأمین انرژی جنین و لاروهای در حال تکامل ماهیان دریایی هستند (Rønnestad et al., 1999). در متابولیسم هوازی، ترتیب مصرف مواد جهت تولید انرژیی در تخم‌های فاقد قطرات چربی (تخم‌های تیپ I) با تخم‌هایی که دارای قطرات چربی هستند (تخم‌های تیپ II) متفاوت است. به صورت خلاصه در تخم‌های تیپ یک که فاقد قطرات چربی هستند، ۷۰ درصد انرژی از طریق کاتابولیسم اسیدهای آمینه و ۳۰ درصد باقی مانده از کاتابولیسم فسفولیپیدها و تری اسیل گلیسرول‌ها به دست می‌آید. در تخم‌های تیپ دو که دارای قطرات چربی هستند و شناور می‌باشند، ۵۰ درصد انرژی از متابولیسم اسیدهای آمینه و ۵۰ درصد دیگر از چربی‌های خنثی نظیر، استرهای واکسی و تری اسیل گلیسرول‌ها تأمین می‌گردد (Rønnestad et al., 1999). ترکیبات چربی تخم

[1] . Dose-response
[2] . Tube feeding technique
[3] . Macronutrients
[4] . Micronutrients

ماهیان مساوی و برابر با احتیاجات چربی لارو ماهیان دریایی هستند (Sargent et al., 1999).

۲-۱- منابع چربی و چربی کل

چربی‌های موجود در خوراک فرموله بخشی از آن مربوط به پودر ماهی یا سایر پودرهایی است که به عنوان منبع پروتئینی جیره به کار گرفته می‌شوند. این پودرها عمدتاً از ترکیبات دریایی نشأت می‌گیرند. سایر چربی‌ها از قبیل روغن کبد ماهی کاد، رون ماهی منهادن و روغن استخراج شده از تخم ماهی به عنوان منبع تری‌گلیسیرید به جیره افزوده می‌گردند. لیستین سویا یا چربی‌ها با منشأ دریایی نظیر، روغن کریل تأمین کننده منبع فسفولیپید جیره هستند. در یک منبع غذایی چربی‌ها تعیین کننده میزان سطح انرژی بوده و در لاروهای در حال تکامل چربی‌ها عمده‌ترین منبع تأمین انرژی هستند. سطح چربی در خوراک‌های فرموله به کار گرفته شده در دوره لاروی بین ۳۰-۱۸ درصد بسته به نوع گونه ماهی و منبع تأمین کننده چربی در جیره متغیر است (Cahu and Zambonino Infante, 2001).

۲-۲- احتیاجات فسفولیپید

فسفولیپیدها عنصر اصلی سازنده دیواره سلولی بوده و ماهیان قادر به ساخت آنها هستند. اما در دوره لاروی میزان ساخت این ماده به اندازه‌ای نیست که تأمین کننده نیاز لاروها باشد. در حقیقت سلول‌های انتروسیت جدار روده و شبکه اندوپلاسمیک نرم و خشن[1] که ساخت فسفولیپیدها در آن صورت می‌پذیرد در لاروهای تازه به تغذیه افتاده به شکل ضعیفی تکامل یافته است (Caballero et al., 2006). نقش فسفولیپیدها به عنوان یک منبع فراهم کننده انرژی در زمانی که لاروها دارای یک محدودیت در توانایی هضم چربی‌های خنثی[2] هستند به اثبات رسیده است. قابلیت هضم اسیدهای چرب رژیم غذایی زمانی که به شکل فسفولیپیدها فراهم می‌گردند نسبت به تری‌گلیسیریدها بالاتر است. فسفولیپیدها نقش مهم‌تری را در تأمین منابع اسیدهای چرب غیر اشباع (HUFA) نسبت به چربی‌های خنثی در جیره دوره لاروی دارند.

فسفولیپیدها در تسهیل امولسیون چربی‌ها و هضم آنها در دستگاه گوارش، دارای اهمیت هستند. این ماده غذایی در افزایش انتقال چربی‌ها بین بافت‌های مختلف و ارگان‌ها به خصوص از سلوهای جذبی جدار روده به سلوهای کبدی دارای اهمیت است (Izquierdo et al., 2000). فسفاتایدیل کولین[3] و فسفاتایدیل اینوزیتول[4] دو فرم مهم از فسفولیپیدها هستند. چربی‌ها به صورت لیپوپروتئین‌ها منتقل می‌شوند. فسفاتایدیل‌کولین عمده‌ترین چربی قطبی[5] در لیپوپروتئین ماهیان است. بنابراین، کمبود میزان فسفولیپید جیره به خصوص فسفاتایدیل کولین سبب ممانعت و کاهش ساخت لیپوپروتئین‌ها و تجمع چربی در سلول‌های جذبی جدار روده می‌گردد (Izquierdo et al., 2000). در ساخت خوراک‌های فرموله به کار گرفته شده در دوره لاروی (ریز ذرات غذایی)، فسفولیپیدها سبب افزایش چسبندگی عناصر سازنده جیره به یکدیگر شده و به این ترتیب میزان تراوش مواد محلول در آب از آنها کاهش می‌یابد. مهمترین منبع فسفولیپیدی به کار گرفته شده در بسیاری از آزمایش‌های تغذیه‌ای لیستین سویا است. سطح فسفولیپید جیره به سن لاروها و درجه تکامل سیستم هضمی آنها ارتباط می‌یابد. مناسب‌ترین جیره برای لارو ماهیان دریایی در بردارنده ۱۰ درصد (وزن خشک جیره) فسفولیپید می‌باشد که براساس مقدار آن در تخم یا کیسه زرده لارو ماهیان دریایی تعیین شده است (Sargent et al., 1999). فسفولیپیدها با منشاء دریایی (روغن کریل و روغن اسکوئید) به دلیل غنی بودن از اسیدهای چرب غیر اشباع دارای بازدهی بالاتری نسبت به فسفولیپیدها با منشاء گیاهی (لیستین سویا) در رشد و بازماندگی لارو ماهیان دریایی هستند. همچنین کوپه‌پودها دارای درصدی بالا از فسفولیپیدهای غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع می‌باشند.

۲-۳- احتیاجات اسیدهای چرب ضروری

اسیدهای چرب غیر اشباع (n-3 HUFA) نظیر، EPA[6] (۲۰:۵n-۳) و DHA[7] (۲۲:۶n-۳) از خانواده اسید چرب لینولنیک[8] (W_3) به همراه اسیدهای چرب غیر اشباع (n-6 HUFA) نظیر، ARA[9] (۲۰:۴n-۶) از خانواده

[1] . Rough and smooth endoplasmic reticulum
[2] . Neutral lipids
[3] . Phosphatidylcholine
[4] . Phosphatidylinositol
[5] . Polar lipid
[6] . Eicosapentaenoic acid
[7] . Docosahexaenoic acid
[8] . Linolenic fatty acid
[9] . Arachidonic acid

اسید چرب لینولئیک[1] (W_6) به میزان زیادی در سلول‌های اجزای مختلف ماهیان یافت می‌گردند و دارای نقش‌های حیاتی متنوع، مخصوصاً در مرحله لاروی هستند. اسیدهای چرب غیر اشباع ترکیبات ضروری در خوراک ماهیان دریایی هستند، به دلیل اینکه آنها توانایی ساخت این اسیدهای چرب را ندارند. برعکس، ماهیان آب شیرین توانایی ساخت این اسیدهای چرب غیر اشباع را در صورت وجود پیش‌ساز آنها (اسید چرب لینولنیک و اسید چرب لینولئیک) در جیره خود دارند.

در کل کمبود میزان اسیدهای چرب ضروری در غذای زنده و ریزذرات غذایی سبب بروز مشکلاتی نظیر، ناهنجاری‌های اسکلتی، کاهش تغذیه و رشد، کاهش فعالیت شنا، افزایش تلفات، نقصان در اتساع کیسه شنا و رنگ‌گیری غیر نرمال ماهیان پهن[2] در دوره لاروی می‌گردد. میزان بهینه اسیدهای چرب غیر اشباع در غذای لارو ماهیان دریایی در حدود ۳ درصد وزن خشک جیره یا ۱۵ درصد کل چربی جیره پیشنهاد شده است (Zambonino Infante and Cahu, 1999).

۲-۳-۱- احتیاج به DHA

نشان داده شده است که DHA دارای نقش مهمتری نسبت به EPA در بهبود رشد، بازماندگی و مقاومت در برابر استرس است (Izquierdo, 1996). این اسید چرب در بافت‌های عصبی ، اندام‌های حسی، سلول‌های مخروطی و استوانه‌ای در شبکیه چشم، سیستم عصبی مرکزی و تکامل استخوان دارای اهمیت بسیار است. همچنین در رنگ‌گیری و متامورفیسم ماهیان پهن وجود این اسید چرب ضروریست.

به صورت کلی میزان احتیاج به این اسید چرب از ۰/۵ تا ۲/۵ درصد وزن خشک جیره بسته به نوع گونه متغیر است (Hamre et al., 2013). مقادیر بیش از حد این ماده غذایی در جیره غذایی سبب بروز مشکلاتی نظیر، ناهنجاری‌های عضلانی، اسکلتی و مغزی در دوره لاروی و افزایش تلفات می‌گردد. این مشکلات ریشه در اکسیداسیون این اسید چرب و افزایش رادیکال‌های آزاد در بدن ماهی دارد. به کارگیری ترکیبات آنتی اکسیدانتی مانند ویتامین E در زمان افزایش مقادیر این اسید چرب در جیره سبب کاهش قابل ملاحظه این ناهنجاری‌ها در دوره لاروی می‌گردد (Sargent et al., 1999).

۲-۳-۲- احتیاج به EPA

چندین نقش عمومی و اختصاصی را EPA در متابولیسم ماهیان بازی می‌کند. این اسید چرب از ترکیبات اصلی چربی‌های قطبی لاروهاست و تنظیم کننده یکپارچگی و عملکرد نرمال غشاء سلولی است. همچنین یک پیش‌ساز مهم پروستوگلاندین‌ها در ماهیان دریایی محسوب می‌گردد و دارای یک نقش برجسته در تنظیم سیستم ایمنی در گونه‌های معینی از ماهیان دریایی است (Ganga et al., 2005). سطوح متوسط این اسید چرب در جیره غذایی دارای تأثیر ذخیره‌سازی[3] بر اسید چرب DHA بوده و سبب افزایش مشارکت این اسید چرب در فسفولیپیدها در مرحله لاروی می‌گردد (Izquierdo et al., 2000). این اسید چرب در رشد و بازماندگی لاروها اثر گذار بوده و دارای یک نقش مهم در تنظیم استرس در لارو ماهیان می‌باشد. در واقع EPA به همراه ARA تنظیم کننده تولید کورتیزول در ماهیان است. میزان نیاز به این اسید چرب بسته به نوع گونه ماهی بین ۰/۷ تا ۱/۶ درصد وزن خشک جیره متغیر است.

۲-۳-۳- احتیاج به ARA

این اسید چرب ماده اصلی سازنده یکی از مهمترین گروه‌های چربی قطبی به نام فسفاتایدیل اینوزیتول است. در لارو ماهیان دریایی افزایش ARA تا ۱ درصد وزن خشک جیره در صورتی که میزان DHA و EPA جیره به ترتیب ۱/۳ و ۰/۷ درصد وزن خشک جیره باشند، سبب افزایش رشد و بازماندگی لاروها می‌گردد (Bessonart et al., 1999). این اسید چرب نه تنها تنظیم کننده تولید کورتیزول در ماهیان است، بلکه در تنظیم بیان ژن‌های وابسته به استرس نظیر، HSP70[4] در لارو ماهیان دریایی دخالت دارد. همچنین ARA در رنگ‌گیری نرمال ماهیان پهن نقش بسیاری مهمی را ایفا می‌نماید. میزان نیاز به این اسید چرب از ۰/۶ درصد وزن خشک جیره در لارو ماهیان آب شور تا ۲/۵ درصد وزن خشک جیره در لارو ماهیان آب شیرین متغیر است (Kolkovski et al., 2009).

[1] . Linoleic fatty acid
[2] . Flatfish
[3] . Sparing effect
[4] . Heat shock proteins

۴-۳-۲- اهمیت نسبت اسیدهای چرب ضروری

نه تنها مقادیر مطلق اسیدهای چرب ضروری، بلکه نسبت‌های بهینه میان آنها نیز در جیره بسیار حائز اهمیت است. هر دو این عوامل در مشارکت این چربی‌ها در بافت‌ها، عملکرد نرمال غشای سلولی، انرژی حاصل از متابولیسم آنها و تولید ترکیبات متابولیکی زیست فعال از آنها دارای نقش هستند. نسبت بهینه DHA/EPA بسته به نوع گونه ماهی بین۲-۱/۵ است. در حالی که این نسبت بین EPA/ARA بسته به نوع گونه بین ۸-۵ می‌باشد (Kolkovski et al., 2009).

۳- ویتامین‌ها

میزان اکثر ویتامین‌های محلول در آب در جلبک و غذای زنده (روتیفر و آرتمیا) پرورش یافته در تفریخگاها متناسب با احتیاجات ویتامین‌های محلول در آب لاروها می‌باشد، به استثنای پیریدوکسین[1] (B_6) در روتیفر و تیامین[2] (B_1) در آرتمیا که نیاز به غنی‌سازی آنها وجود دارد (Hamre et al., 2013). هر دو این ویتامین‌ها دارای نقش ضروری در متابولیسم ماهیان هستند. پیریدوکسین در متابولیسم اسیدهای آمینه در سطوح مختلف و تنظیم سیستم ایمنی ضروری است. در حالی که تیامین به عنوان کوآنزیم کوکربوکسیلاز[3] عمل کرده و در کربوکسیل زدایی اکشایشی آلفا-کتو اسیدها[4] ضروریست و از این رو در اکتساب انرژی از اسیدهای آمینه، قندها و چربی‌ها نقش دارد. کمبود تیامین با افزایش درجه حرارت و متعاقباً شدت یافتن نرخ متابولیسم تسریع می‌گردد. شگ ماهیان حاوی آنزیم تیامیناز بوده که این آنزیم در اثر حرارت تخریب می‌گردد. تیامین موردنیاز لاروها مورد ارزیابی قرار نگرفته است. اما سطح مورد نیاز این ویتامین در جیره ماهیان بالغ ۵-۱ میلی‌گرم در کیلوگرم عنوان شده است (NRC, 2011). همچنین میزان مورد نیاز پیریدوکسین در جیره لارو ماهیان دریایی ۳ میلی‌گرم در کیلوگرم تعیین شده است (Rønnestad et al., 1997).

ویتامین C یا اسکوربیک اسید دارای یک نقش بسیار مهم و حیاتی در طول دوره تکامل لاروی بوده و از بروز ناهنجاری‌ها در اسکلت و سر پوش آبششی جلوگیری به عمل می‌آورد. سطوح توصیه شده این ویتامین در جیره ۱۵۰۰-۲۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم است. غلظت‌های اسکوربیک اسید یافت شده در غذاهای زنده غنی‌سازی نشده (روتیفر و آرتمیا) (۴-۶۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، تأمین کننده نیاز لارو گونه‌های مختلف ماهی و میگو به این ویتامین می‌باشد (Merchie, et al., 1997) .

در ریزذرات غذایی تعیین میزان بهینه ویتامین‌ها برای تأمین احتیاجات لاروها بسیار ضروریست. همچنین اغلب احتیاجات ویتامین‌های محلول در آب برای لاروها نسبت به بچه ماهیان همان گونه بالاتر است. این موضوع نه تنها به احتیاجات متابولیکی بالاتر لاروها نسبت بچه ماهیان ارتباط دارد، بلکه بالا بودن نسبت سطح به حجم ریزذرات غذایی به کار گرفته شده جهت تغذیه لاروها آنها را بیشتر مستعد تراوش و اکسیداسیون می‌نماید. از این رو، در حالی که میزان احتیاج بچه ماهیان به مخلوط ویتامینی[5] ۲-۳ درصد جیره است، در ساخت ریز ذرات غذایی استفاده شده جهت تغذیه لاروها این میزان می‌تواند به ۷-۶ درصد جیره افزایش یابد (Kolkovski et al., 2009).

برعکس ویتامین‌های محلول در آب، محتوی ویتامین‌های محلول در چربی در جلبک و غذای زنده کشت شده در تفریخگاها بین گروه‌ها و شرایط مختلف پرورشی بسیار متفاوت بوده و اغلب منجر به کمبود یا مسمومیت ویتامینی[6] می‌گردد. محتوی ویتامین E یا آلفا توکوفرول[7] در لاروها از زمان تفریخ تا شروع تغذیه فعال و حتی در دوره تغذیه با روتیفر کاهش می‌یابد. با شروع تغذیه لاروها با آرتمیا این وضعیت بهبود می‌یابد. افزایش محتوی ویتامین E ریز ذرات غذایی تا ۱۵۰۰ الی ۳۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، سبب بهبود رشد و مقاومت به استرس در لارو ماهیان دریایی می‌گردد (Betancor et al., 2011). لازم به ذکر است بازدهی ویتامین E به شدت وابسته به حضور ویتامین C در جیره است. به عبارت دیگر ویتامین C از اکسیداسیون ویتامین E جلوگیری به عمل می‌آورد. در کل میزان ویتامین C و E در ریز ذرات غذایی به کار گرفته شده جهت تغذیه لاروها باید بالای ۱ گرم در هر کیلوگرم جیره باشد (Hamre et al., 2013).

[1] . Pyridoxine
[2] . Thiamine
[3] . Coenzyme cocarboxilase
[4] . Alfa-keto acids
[5] . Vitamin Premix
[6] . Hypo/hypervitaminosis
[7] . Alpha-tocopherol

ویتامین A یا رتینول[1] در بینایی، رشد، تکامل استخوان، تولید مثل، حفظ و نگهداری بافت‌های اپیتلیال نقش دارد. میزان بهینه این ویتامین در جیره ۱۰-۵ میلی‌گرم در کیلوگرم توصیه شده است (Mazurais et al., 2009). کارتنوئیدها پیش ساز این ویتامین بوده و در زمان تغذیه لاروها با آرتمیا، محتوی کارتنوئیدی این غذای زنده به نظر می‌رسد برای پوشش احتیاجات لاروها به ویتامین A کافی باشد.

حضور ویتامین D یا کلسیفرول[2] در خوراک لاروها برای رشد نرمال و تکامل سیستم هضمی و اسکلتی آنها ضروریست. سطح توصیه شده این ویتامین در دوره لاروی ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم است (۱۹ IU/g) (Darias et al., 2010).

همان‌طور که ملاحظه می‌گردد ویتامین A و D در تکامل نرمال لاروها دخیل بوده و به میزان کم مورد احتیاج هستند. مصرف بیش از حد این دو سبب مسمومیت ویتامینی، تشدید ناهنجاری‌های استخوانی و رنگ‌گیری غیر عادی در لاروها می‌گردد.

۴- مواد معدنی

تحقیقات در رابطه با احتیاجات مواد معدنی در لاروهای ماهی تنها از سال ۲۰۰۵ آغاز گردیده و تعداد مقالات انتشار یافته در این زمینه اندک است. روتیفر که به عنوان یک منبع غذای اصلی در شروع تغذیه فعال لارو اکثر ماهیان دریایی پرورش یافته در تفریخگاه‌ها به کار گرفته می‌شود دارای سطوح بسیار پایین مواد معدنی در مقایسه با کوپه‌پودها است (Hamre and Harboe, 2008). سلنیوم (Se) و منگنز (Mn) در روتیفر حتی کمتر از سطوح توصیه شده در NRC (۲۰۱۱) برای ماهیان بالغ است. در مقابل، آرتمیا در بردارنده سطوح بالای اکثر مواد معدنی به استثنای ید (I) و روی (Zn) می‌باشد (Hamre et al., 2007). این دو ماده معدنی اخیر در روتیفرها نیز با کمبود مواجه است. در سیستم‌های مدار بسته، ازن استفاده شده برای ضد عفونی آب در طول باز چرخش آن در سیستم، سبب اکسیداسیون ید گردیده و آنرا از فرم با قابلیت دسترسی زیستی در آب دریا به یک فرم غیر قابل دسترس (IO_3^-) تبدیل می‌کند. بعلاوه تشکیل نیترات در سیستم‌های مدار بسته سبب اختلال در جذب ید در ماهیان می‌گردد (Morris et al., 2011). باید در نظر داشت به کارگیری غلظت‌های بالای ید جهت غنی‌سازی روتیفر و آرتمیا دارای اثرات سمی بر لاروهای تغذیه شده با آنها خواهد داشت. این در حالیست که کوپه‌پودها حاوی تا ۳۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ید هستند. اینکه چرا کوپه‌پودها دارای اثرات سمی بر لارو ماهیان نیستند، ممکن است ریشه در قابلیت دسترسی زیستی و یا تفاوت در سمیت اشکال مختلف ید داشته باشد. همچنین ید دارای خاصیت باکتری‌کشی بوده و سبب کاهش بار باکتریایی در محیط کشت گردیده و متعاقباً منجر به افزایش بازماندگی لاروها می‌گردد (Hamre et al., 2013). از این رو پیشنهاد می‌گردد که در زمان پرورش لارو ماهیان دریایی در شرایط اسارت حتماً از ید جهت غنی‌سازی غذای زنده به خصوص روتیفر استفاده گردد. در کل مطالعه احتیاجات تغذیه‌ای لارو ماهیان دریایی به مواد معدنی به دلیل حضور این مواد در آب دریا و همچنین به سبب اینکه اشکال مختلف مواد معدنی دارای قابلیت دسترسی زیستی متفاوت هستند، کار پیچیده‌ای می‌باشد. جهت ساخت ریز ذرات غذایی مورد استفاده جهت تغذیه لارو ماهیان دریایی، افزودن مخلوط مواد معدنی[3] به میزان ۳-۲ درصد جیره توصیه گردیده است (Kolkovski et al., 2009).

۵- احتیاجات پروتئین

۱-۵- منابع پروتئین

عمده منابع پروتئینی که در فرمولاسیون خوراک لاروها در مطالعات مختلف به کار گرفته شده‌اند، شامل پودر ماهی، پودر اسکوئید، پودر میگو، پودر کریل، پودر خرچنگ، پودر گلوتن، پودر سفیده تخم‌مرغ، پودر مخمر و کازئین بوده است. در ساخت ریزذرات غذایی منابع پروتئینی بر اساس پروفایل اسید آمینه آنها انتخاب شده و صرفاً به عنوان منبع پروتئینی خوراک به کار گرفته می‌شوند. در زمان تغذیه لاروها با غذای زنده نظیر، روتیفر و آرتمیا پروتئین فراهم شده توسط آنها نسبت به پروتئین فراهم شده توسط ریز ذرات غذایی بسیار قابل دسترس‌تر است. به دلیل اینکه پروتئین‌های غذای زنده از نوع محلول در آب بوده که نسبت به پروتئین موجود در ریز ذرات غذایی که غیر محلول در آب می‌باشند دارای قابلیت هضم بالاتر برای لاروها با

[1] . Retinol
[2] . Calciferol
[3] . Mineral premix

سیستم گوارشی غیر تکامل یافته هستند (Tonheim et al., 2007).

۲-۵- سطوح پروتئین

میزان پروتئین مورد نیاز لاروها بیشتر از بچه ماهیان و ماهیان بالغ همان گونه است. این موضوع به دلیل نرخ رشد بالای لاروها و مصرف بالای پروتئین به عنوان منبع انرژی در آنهاست (Kolkovski et al., 2009). میزان پروتئین به کار گرفته شده جهت ساخت ریز ذرات غذایی مورد استفاده جهت تغذیه لارو ماهیان دریایی بین ۷۰-۵۰ درصد جیره است.

۳-۵- احتیاجات اسیدهای آمینه

از ۲۰ اسید آمینه متداول، ۱۰ نوع از آنها برای ماهیان ضروری بوده و توانایی ساخت آنها در ماهیان وجود ندارند. این اسیدهای آمینه، شامل لوسین، ایزولوسین، والین، ترئونین، فنیل آلانین، متیونین، تریپتوفان، آرژنین، هیستیدین و لایزین هستند. لازم به ذکر است، کمبود برخی شبه اسیدهای آمینه نظیر، تورین و پیش‌سازهای آن مثل، متیونین و سیستئین می‌تواند محدود کننده میزان رشد و بازماندگی در لارو ماهیان دریایی باشد. لارو ماهیان دریایی در طول هفته‌های آغازین پس از شروع تغذیه خارجی دارای میزان دفع نیتروژن بسیار بالا هستند. این موضوع نشان می‌دهد انرژی متابولیسمی در این مقطع بسیار وابسته به کاتابولیسم اسیدهای آمینه است (Rønnestad et al., 1999). به عبارت دیگر در دوره لاروی اسیدهای آمینه غیر ضروری به صورت ترجیحی جهت تولید انرژی به کار گرفته می‌شوند، در حالی که اسیدهای آمینه ضروری جهت رشد ذخیره‌سازی می‌گردند (Hamre et al., 2013).

متأسفانه تاکنون با استفاده از خوراک فرموله آزمایشات اندکی برای تعیین احتیاجات لارو ماهیان دریایی به اسیدهای آمینه ضروری و تعیین سطوح بهینه آنها انجام گرفته است. در واقع تراوش اسیدهای آمینه از ریز ذرات غذایی در زمان معرفی آنها به مخازن پرورش لاروی سبب مشکل شدن تعیین دقیق احتیاجات فیزیولوژیکی لاروها به آنها می‌گردد. از این رو می‌توان این طور تصور نمود که احتیاجات لاروها به اسیدهای آمینه ضروری جهت تکامل از لحاظ کیفی همانند بچه ماهیان است. با این تفاوت که احتیاج به این اسیدهای آمینه در دوره لاروی بسیار بالاتر از زمان پرورش بچه ماهیان است. در کل پروفایل اسیدهای آمینه ضروری بدن ماهیان می‌تواند اندیکاتور خوبی برای شناسایی احتیاجات اسیدهای آمینه مورد نیاز آنها باشد. بنابراین، در دوره لاروی نیز می‌توان به طریقه مشابه عمل نمود و آنالیز اسیدهای آمینه پیکره آنها را به عنوان ملاکی برای تعیین احتیاجات اسیدهای آمینه ضروری آنها قرار داد (Conceição et al., 1997). مقایسه پروفایل اسیدهای آمینه لاروها با غذای زنده مورد استفاده جهت تغذیه آنها این امکان را فراهم می‌آورد که پیش‌بینی نماییم آیا غذای زنده مورد استفاده تأمین کننده احتیاجات اسیدهای آمینه ضروری لاروها می‌باشد یا نیاز به غنی‌سازی آن وجود دارد. همچنین دانش ما در رابطه با انتقال دهنده‌های روده‌ای اسیدهای آمینه در مراحل اولیه تکامل لارو ماهیان دریایی بسیار جزئی و اندک است. بنابراین، تعیین احتیاجات اسیدهای آمینه ضروری در دوره لاروی و شناسایی انتقال دهنده‌های آنها امری بسیار ضروری است.

۴-۵ - اهمیت اشکال مولکولی پروتئین

در دوره لاروی اسیدهای آمینه آزاد سریع‌تر از پروتئین‌های هیدرولیز شده و این فرم پروتئینی نیز راحت‌تر از پروتئین‌های هیدرولیز نشده و پیچیده جذب می‌گردد. در واقع در لاروها اسیدهای آمینه آزاد بدون نیاز به هضم قبلی مستقیماً از لوله گوارش قابل جذب هستند. با افزایش سن و سایز لاروها ظرفیت هضمی پروتئین‌های هیدرولیز نشده افزایش می‌یابد (Tonheim et al., 2005). نقش اسیدهای آمینه آزاد و پپتیدهای کوچک در تکامل لاروها بوسیله محققین مختلفی مورد ارزیابی قرار گرفته است. همان طور که اشاره شد در مراحل اولیه تکامل لارو ماهیان دریایی اسیدهای آمینه آزاد در تولید انرژی نقش دارند و باید از طریق خوراک برای آنها فراهم گردند. در هفته‌های آغازین خروج لارو ماهیان دریایی از تخم معده هنوز تمایز نیافته است. بنابراین، در غیاب اسید کلریدریک و آنزیم پپسین که در هضم معدی نقش دارند، پروتئین‌های بلعیده شده نمی‌توانند دناتوره گردند و اسیدهای آمینه آزاد با بازدهی بیشتری نسبت به پروتئین‌ها جذب می‌شوند (Rønnestad et al., 1999). همچنین اسیدهای آمینه آزاد موجود در غذا سبب تحریک ترشح آنزیم تریپسین می‌گردند که نشان دهنده بهبود یافتن ترشح آنزیم‌های هضمی پانکراسی تحت تأثیر این اسیدهای آمینه است. علاوه بر عملکرد تغذیه‌ای، اسیدهای آمینه آزاد نقش بسیار

مهمی را در مراحل آغازین شروع تغذیه لارو ماهیان دریایی به عنوان جاذب تغذیه‌ای[1] ایفا می‌نمایند.

پروتئین هیدرولیز مدت زمان مدیدی است که به عنوان یک فرم بسیار مفید پروتئینی در تغذیه لاروها به کار گرفته شده است. استفاده از این منبع پروتئینی در ساخت غذاهای فرموله می‌تواند به هضم آسان‌تر و افزایش کارایی ریز ذرات غذایی کمک نماید. در دوره لاروی پروتئین هیدرولیزها دارای ارزش تغذیه‌ای بسیار بالا بوده و سبب افزایش رشد و بازماندگی لاروها می‌گردند. علی‌رغم اهمیت پروتئین هیدرولیز و اسیدهای آمینه آزاد در تغذیه لاروها، میزان به کارگیری آنها در جیره دارای محدودیت است. این پدیده ممکن است ناشی از جریان سریع پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه آزاد در طول روده باشد. در حالی که سرعت جذب مواد غذایی در روده در این مرحله از تکامل لاروها کندتر می‌باشد. در نتیجه اکثر این مواد ضروری برای متابولیسم بدون جذب از سیستم هضمی و گوارشی لاروها خارج می‌شوند (Cahu et al., 1999).

این اشکال پروتئینی (اسیدهای آمینه آزاد و پروتئین هیدرولیز) بسته به نوع گونه می‌توانند تا ۳۰ درصد پروتئین جیره لاروها را تشکیل دهند (Kolkovski and Tandler, 2000). برعکس دوره لاروی، پروتئین هیدرولیز در پرورش بچه ماهیان دارای اهمیت نبوده و بعضاً سبب سرکوب رشد در آنها می‌گردد. دلیل این موضوع نیز بالا بودن فعالیت پپتیدازهای موجود در سیتوپلاسم سلول‌های انتروسیت جدار روده در دوره لاروی است که در هضم پروتئین هیدرولیز نقش دارد. کاهش فعالیت ویژه این آنزیم در بچه ماهیان به دلیل تکامل روده و افزایش فعالیت ویژه آنزیم‌های هضمی پروتئین در پرزهای جدار روده است (Zambonino Infante and Cahu, 2001). به عبارت دیگر در مراحل اولیه تکامل لاروی هضم پروتئین درون سلولی بوده و در بخش انتهایی روده رخ می‌دهد. اما با حرکت لاروها به سمت متامورفیسم توانایی هضم خارج سلولی پروتئین در روده آنها تکامل می‌یابد.

۶- غنی‌سازی غذای زنده

همان‌گونه که پیش‌تر اشاره شد، مقایسه ترکیبات بدن کوپه‌پودها با غذاهای زنده متداول استفاده شده در تفریخگاها یعنی روتیفر و آرتمیا اطلاعات ارزشمندی را در رابطه با ضعف‌های تغذیه‌ای این دو زئوپلانکتون از نظر درشت مغذی‌ها و ریز مغذی‌ها در اختیار ما قرار می‌دهد.

درشت مغذی‌ها به ترکیباتی آلی ارجاع داده می‌شود که به میزان زیاد مورد احتیاج موجودات زنده هستند و شامل پروتئین، چربی و کربوهیدرات می‌باشند. در مقابل، ریز مغذی‌ها به ترکیباتی اطلاق می‌گردد که به میزان کم مورد احتیاج موجودات زنده هستند. ریز مغذی‌ها به دو دسته آلی و معدنی تقسیم می‌شوند. ریز مغذی‌های آلی شامل ویتامین‌ها و برخی از اسیدهای آمینه آزاد هستند. ریز مغذی‌های معدنی خود شامل دو دسته هستند. دسته اول ماکرومینرال‌ها[2] شامل، ترکیبات معدنی، نظیر فسفر، کلیسم، منیزیم، پتاسیم و گوگرد هستند. دسته دوم میکرومینرال‌ها[3]، شامل ترکیباتی، مثل آهن، منگنز، روی، ید، سلنیوم و مس می‌باشند. به این ترکیبات عناصر کمیاب[4] نیز اطلاق می‌گردد، که عموماً به میزان کمتر از ۱۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم ماده غذایی خشک مورد احتیاج هستند. جهت جبران ضعف‌های تغذیه‌ای روتیفر و آرتمیا می‌توانیم آنها را توسط ماده مورد نظر غنی‌سازی[5] نماییم. مواد تغذیه‌ای می‌تواند به صورت مستقیم به محیط کشت آنها اضافه گردد که به روش غنی‌سازی مستقیم[6] معروف است. در این روش اخیر ماده مورد نظر ممکن است از طریق یک امولسیون روغنی به محیط کشت افزوده گردد. این روش اغلب برای تنظیم سطح چربی‌ها، ویتامین‌ها و مواد معدنی در غذاهای زنده مورد استفاده قرار می‌گیرد.

مواد تغذیه‌ای ممکن است از طریق یک حامل و به صورت غیر مستقیم در اختیار روتیفر و آرتمیا قرار گیرد که به روش غنی‌سازی غیرمستقیم[7] معروف است. این حاملین شامل، دانه‌های اسپری شده چربی[8] و لیپوزوم‌ها[9] هستند که از آنها اغلب برای رساندن ترکیبات تغذیه‌ای محلول در آب به غذاهای زنده استفاده می‌شود (Langdon et al., 2008). از جلبک و خوراک‌های فرموله شده نیز جهت انتقال مواد تغذیه‌ای مورد نظر به روتیفر و آرتمیا می‌توان

1 . Food attractant
2 . Macrominerals
3 . Microminerals
4. Trace elements
5. Enrichment and/or boosting
6. Direct enrichment
7. Indirect enrichment
8. Lipid spray beads
9. Liposomes

استفاده نمود (Dhert et al., 2001). در خوراک‌های فرموله شده گروه‌های مختلفی از مواد غذایی با توجه به کمبودهای تغذیه‌ای زئوپلانکتون مورد نظر فرموله می‌گردند. همچنین اخیراً از مخمر[1] نیز به عنوان حاملین برخی از ریز مغذی‌های معدنی، نظیر سلنیوم (Penglase et al., 2011) و روی (Nematzadeh et al., 2018) جهت غنی‌سازی روتیفر و آرتمیا استفاده گردیده است. خود مخمر به عنوان یک منبع پروتئینی در غنی‌سازی روتیفر و آرتمیا مطرح است. با توجه به خاصیت فیلتر کنندگی روتیفر و آرتمیا مواد تغذیه‌ای اضافه شده به محیط کشت آنها به صورت غیر انتخابی و با توجه به سایز آنها فیلتر شده و سپس وارد دستگاه گوارش آنها می‌گردند. روتیفرها ذرات با سایز ۱۰-۱/۶ میکرون و ناپلی آرتمیا ذرات با اندازه ۵۰-۱ میکرون را به راحتی فیلتر کرده و می‌بلعند (Hamre et al., 2013). روتیفرها قادر به پر کردن روده خود از مواد غذایی در یک مدت زمان کوتاه هستند. بنابراین، می‌توان روتیفرها را با ترکیبات غذایی مورد نظر قبل از اینکه آنها مورد تغذیه لاروها قرار گیرند، غنی‌سازی نمود. لازم به ذکر است ناپلی آرتمیای تازه تفریخ شده (ناپلی اینستار I[2]) فاقد تغذیه فعال بوده و بعد از جذب محتویات کیسه زرده خود تغذیه خارجی را آغاز می‌نمایند. ناپلی اینستار I در درجه حرارت انکوباسیون سیست‌ها (۲۸-۲۵ درجه سانتی‌گراد) در عرض ۸-۶ ساعت به مرحله دوم لاروی یعنی متا ناپلی اینستار II[3] تکامل می‌یابد که دارای تغذیه فعال در این مرحله است. غنی‌سازی روتیفر و آرتمیا از نظر بازه زمانی به دو دسته تقسیم می‌شود. غنی‌سازی کوتاه مدت[4]، در این روش غذای زنده قبل از اینکه جهت تغذیه لاروها مورد استفاده قرار بگیرد به مدت ۸-۳ ساعت توسط ماده غذایی مورد نظر غنی‌سازی می‌گردد. این مدت کوتاه غنی‌سازی تنها سبب ورود ماده غنی کننده به دستگاه گوارش غذای‌های زنده می‌گردد. به همین دلیل این روش به غنی‌سازی روده‌ای[5] هم معروف است. یکی از مشکلات این روش این است که میزان ورود ماده مورد نظر به دستگاه گوارش غذای زنده بستگی به حجم دستگاه گوارش و میزان پر یا خالی بودن آن دارد. بنابراین، قبل از اینکه ماده مورد نظر از روده روتیفر و آرتمیا تخلیه گردد باید مورد استفاده لاروها قرار گیرد (Lavens and Sorgeloos, 1996). روتیفرها قادر به تخلیه روده خود ۲۵-۲۰ دقیقه بعد از پر شدن در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد هستند.

غنی‌سازی طولانی مدت[6]: در این روش غذای زنده به مدت طولانی (۱۲-۲۴ ساعت) در معرض عامل غنی کننده مورد نظر در محیط کشت خود قرار می‌گیرد. این مدت زمان طولانی غنی‌سازی این امکان را فراهم می‌آورد که ماده غنی کننده از دستگاه گوارش غذای زنده جذب گردیده و به بافت‌های بدن آن انتقال یابد. به همین دلیل این روش به غنی‌سازی بافتی[7] هم مشهور است (Lavens and Sorgeloos, 1996). مهمترین حُسن این روش حفظ طولانی مدت ماده غذایی جذب شده در پیکره روتیفر و آرتمیا است. اما، در عین حال این احتمال وجود دارد که ماده غنی کننده مورد نظر توسط خود غذای زنده متابولیزم گشته و مورد مصرف قرار گیرد. این پدیده به خصوص در مورد درشت مغذی‌هایی نظیر، پروتئین و گروه‌های مختلف چربی‌ها، نظیر فسفولیپیدها بسیار شایع است (Dhert et al., 2001).

بنابراین، انتخاب تکنیک و زمان غنی‌سازی به زیست شناسی موجود، اندازه ذرات به کار گرفته شده جهت غنی‌سازی، ماهیت ماده غنی کننده، پر یا خالی بودن، حجم و اندازه دستگاه گوارش زئوپلانکتون مورد نظر، توان و دانش علمی و امکانات در دسترس بستگی دارد. برای مثال، زمانی که از امولسیون‌های روغنی جهت غنی‌سازی روتیفرها استفاده می‌گردد، یک حداقل زمان ۱۲ ساعته جهت غنی‌سازی توصیه گردیده است که سبب افزایش جذب اسیدهای چرب غیر اشباع می‌گردد. همچنین غنی‌سازی روتیفرها با پروتئین و فسفولیپید محدود می‌گردد به غنی‌سازی کوتاه مدت، چون در غیر این صورت این مواد توسط خود ارگانیزم مصرف می‌گردد. غنی‌سازی روتیفرها توسط ریز مغذی‌ها می‌تواند به صورت کوتاه مدت و یا بلند مدت انجام شود. البته در مورد ریز مغذی‌هایی که در غلظت‌های بالا مستعد ایجاد سمیت و مسمومیت هستند،

1. *Saccharomyces cerevisiae*
2. Instar I nauplii
3. Instar II metanauplii
4. Short term enrichment
5. Gut enrichment
6. Long term enrichment
7. Tissue enrichment

نظیر ویتامین A، ید و سلنیوم غنی‌سازی کوتاه مدت توصیه گردیده است (Hamre et al., 2013).

غنی‌سازی آرتمیا توسط ترکیبات غذایی مختلف اکثراً به صورت بلند مدت بوده و یک حداقل زمان ۱۲ ساعته توصیه گردیده است (Sorgeloos et al., 2001). در آرتمیا یک گرایش طبیعی در تبدیل DHA به EPA وجود دارد (Navarro et al., 1999). همچنین آرتمیا فسفولیپید دریافتی از طریق غنی‌سازی را مصرف می‌کند. بنابراین، اگر هدف از غنی‌سازی افزایش سطوح DHA و فسفولیپید در ناپلی‌های آرتمیا و متعاقباً لاروهای تغذیه شده با آن باشد، این موضوع اخیر باید مورد توجه قرار گیرد.

کوپه‌پودها دارای مقادیر قابل ملاحظه‌ای پروتئین هستند. در مقایسه با کوپه‌پودها، آرتمیا نیز دارای مقادیر کافی از این ماده بوده که تأمین کننده احتیاجات لاروهای تغذیه شده با آن است. اما، روتیفرها نیاز دارند که حتماً با این درشت مغذی به صورت کوتاه مدت غنی‌سازی گردند. غلظت ویتامین C در آرتمیا تا حدودی نسبت به کوپه‌پودها کمتر است، اما، همین میزان موجود خیلی بالاتر از مقادیر مورد نیاز ذکر شده برای ماهیان است (*Nutr. Requir. Fish Shrimp*, 2011). بنابراین، ناپلی‌های آرتمیا نیاز به غنی‌سازی با ویتامین C ندارند. روتیفرها در صورتی که از مخمر نانوایی[1] جهت کشت آنها استفاده گردد از نظر ویتامین C فقیر بوده و حتماً نیاز است که محتوای این ویتامین در آنها از طریق غنی‌سازی افزایش یابد.

روتیفر و آرتمیای غنی نشده به صورت نرمال فاقد ویتامین A هستند. اگرچه آرتمیا حاوی مقادیر زیادی کانتاگزانتین[2] است که می‌تواند در ماهی به ویتامین A تبدیل گردد. روتیفر حاوی مقادیر بسیار کمتری کارتنوئید در مقایسه با آرتمیا و کوپه‌پودهاست و ممکن است ریسک کمبود ویتامین A در لاروهای تغذیه شده با آنها وجود داشته باشد (Moren et al., 2002).

اکثر ریز مغذی‌ها نظیر، تیامین، منگنز، ید و روی به راحتی می‌توانند از طریق حل کردن مستقیم این ترکیبات در محیط کشت روتیفر و ناپلی‌های آرتمیا در پیکره آنها افزایش یابند (Hamre et al., 2013). در کل اگر ترکیبات موجود در کوپه‌پودها را به عنوان مرجعی جهت ارزیابی احتیاجات تغذیه‌ای لارو ماهیان دریایی و پیش‌بینی و تخمین کمبودهای تغذیه‌ای روتیفر و آرتمیا مورد استفاده در تفریخگاه‌های تولید بچه ماهیان دریایی در نظر بگیریم آنگاه:

روتیفرها نیاز است که توسط ترکیباتی نظیر، پروتئین، فسفولیپید، اسیدهای چرب غیر اشباع (EPA و DHA)، ویتامین C، تیامین (B_1)، ویتامین‌های E و A ، مواد معدنی، مثل فسفر و تمام ریز مغذی‌ها از جمله ید، روی، منگنز و سلنیوم به غیر از آهن غنی‌سازی گردند (Hamre et al., 2013). همچنین آرتمیا نیاز دارد که توسط اسیدهای چرب غیر اشباع نظیر، EPA وDHA، ویتامین‌هایی مثل، تیامین و کوبالامین[3] (B_{12}) و ریز مغذی‌هایی مانند، ید و روی غنی‌سازی گردد (Hamre et al., 2013).

امولسیون‌های بر پایه روغن به کار گرفته شده جهت غنی‌سازی روتیفر و آرتمیا غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع هستند. به منظور کاهش خطر اکسیداسیون این اسیدهای چرب باید غلظت‌های بالای ویتامین C و E در فرمولاسیون این امولسیون‌ها استفاده گردد.

سطح ایمن ید در روتیفر ۲۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک است. جهت غنی‌سازی روتیفرها با ید و سلنیوم می‌توان به ترتیب سدیم یدید[4] (۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و سلنیت سدیم[5] (۷ میلی‌گرم در لیتر) را به مدت یک و نیم ساعت به محیط کشت آنها افزود (Hamre et al., 2008). روتیفر قادر به حفظ ریز مغذی‌ها به استثنای ید به صورت طولانی مدت هستند، به طوری که بعد از دو ساعت گرسنگی به صورت کامل از ید تخلیه می‌گردد (Srivastava et al., 2012).

۷- ساخت غنی‌کننده بر پایه روغن

یکی از غنی‌کننده‌های متداول به کار گرفته شده جهت غنی‌سازی روتیفر و آرتمیا، امولسیون‌های روغنی هستند که غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع و فسفولیپید بوده و سبب بهبود محتوی EPA، DHA و ARA در آنها می‌گردد. به صورت خلاصه، جهت ساخت یک امولسیون روغنی (۱۰۰۰ میلی‌لیتر) می‌توان از ترکیب آب مقطر (۳۸۰ میلی‌لیتر)، روغن کبد ماهی کاد (۴۰۰

[1]. Baker yeast
[2]. Cantaxanthin
[3]. Cobalamin
[4]. Sodium iodide
[5]. Sodium selenite

میلی‌لیتر) و لیستین سویا (۲۰۰ میلی‌لیتر) استفاده نمود. نحوه مخلوط کردن این ترکیبات به این ترتیب است که ابتدا روغن کبد ماهی کاد و لیستین سویا تا ۵۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شده و سپس به آب مقطر گرم شده به همین میزان درجه حرارت اضافه می‌گردند. به این مجموعه یک امولسیفایر، نظیر پلی سوربات ۸۰ (با نام تجاری توئین ۸۰[1])(۲۰ میلی‌لیتر) اضافه گردیده و به کمک مخلوط کن این ترکیبات تا دستیابی به یک مخلوط کرم رنگ هم‌زده می‌شود. غنی‌سازی روتیفر و آرتمیا توسط ویتامین C و E می‌تواند هم‌زمان با غنی‌سازی آنها با اسیدهای چرب غیر اشباع صورت گیرد. به همین منظور اسکوربیل پالمیتات[2] به عنوان منبع ویتامین C و آلفا توکوفرول استات به عنوان منبع ویتامین E با توجه به خصوصیت چربی دوستی‌شان می‌توانند در این محلول غنی کننده حل گردند (به میزان ۲۰w/w درصد). همچنین سایر ویتامین‌ها و مواد معدنی که جهت غنی‌سازی روتیفر و آرتمیا مورد نیاز هستند را می‌توان به این امولسیون روغنی به صورت مستقیم اضافه نمود.

۸- خوراک‌های فرموله شده

یکی از اهداف مهم تحقیقات صورت گرفته روی تغذیه لارو ماهیان دریایی، به دست آوردن اطلاعاتی است که بتوان از آن به عنوان پایه تکامل ریز ذرات غذایی جهت تغذیه لاروها استفاده نمود. این موضوع سبب کاهش وابستگی لاروها به غذای زنده می‌گردد که تولید آن در عین دشوار بودن به زیر ساخت و نیروی انسانی زیاد احتیاج دارد. هرچند جایگزینی کامل غذای زنده با خوراک فرموله در مراحل اولیه تکامل لارو ماهیان دریایی تاکنون موفقیت‌آمیز نبوده است، اما با توجه به تحقیقات گسترده‌ای که در این عرصه در حال اجراست بزودی محقق خواهد گردید. طراحی و تکامل ریز ذرات غذایی روی موضوعاتی نظیر، تغییر غذایی زود هنگام لاروها از غذای زنده به خوراک فرموله، تغذیه ترکیبی[3] لاروها با استفاده از غذای زنده و خوراک فرموله، جایگزینی غذای زنده با خوراک فرموله از شروع تغذیه فعال و رساندن برخی ترکیبات خاص به دستگاه گوارش لاروها متمرکز گردیده است. ریز ذرات غذایی به کار گرفته شده جهت تغذیه لاروهای پلاژیک ماهیان دریایی باید دارای ساختار و ویژگی‌های منحصر بفردی باشند. اولاً، باید برای جلوگیری از تجزیه و تخریب بعد از شناوری در آب به اندازه کافی پایدار بوده و بتوانند ترکیبات غذایی محلول در آب را در خود به خوبی حفظ نمایند. دوماً ، ذرات باید اندازه متناسب با دهان لاروها داشته و جهت تغذیه آنها قابل دسترس در ستون آب باشند و به سرعت ته‌نشین نگردند. سوماً، ذرات باید به عنوان یک ایتم غذایی برای لاروها قابل شناسایی بوده و بوسیله سیستم گوارشی آنها قابل هضم باشند. نهایتاً، ریز ذرات غذایی باید برآورده کننده احتیاجات انرژیتیک و تغذیه‌ای برای لاروهای در حال رشد و تکامل باشند (Yúfera et al., 2003). دستیابی به تمامی این فاکتورها به خصوص یافتن یک تعادل بین پایداری ریز ذرات غذایی در آب و جلوگیری از تراوش بیش از حد محتویات آنها از یک سو و قابلیت هضم مناسب ریز ذرات غذایی از سوی دیگر یک چالش بسیار دشوار است.

برای اینکه در طول دوره جستجوی مواد غذایی، ریزذرات غذایی توسط لاروها ردیابی و شناسایی گردند ضروریست به آنها ترکیباتی تحت عنوان جاذب تغذیه‌ای افزوده گردد. برخی اسیدهای آمینه آزاد نظیر، آلانین، گلاسین و آرژنین و ترکیبات بتائینی به عنوان جاذب تغذیه‌ای مطرح هستند (Kolkovski et al., 1997). بعلاوه این اسیدهای آمینه تحریک کننده ترشح هورمون‌های هضمی دستگاه گوارش نظیر، بومبزین[4] و کوله‌سیستوکنین[5] می‌باشند. هورمون‌های اخیر تحریک کننده حرکات کرمی شکل روده[6] و ترشح آنزیم‌های هضمی پانکراسی بخصوص تریپسین به داخل روده هستند (Koven et al., 2001). بنابراین، همان طور که ملاحظه می‌گردد ساخت ریز ذرات غذایی تنها نمی‌تواند براساس یک تقلید ساده از ترکیبات تقریبی غذاهای زنده تشکیل دهنده لاروها در محیط‌های طبیعی پرورش آنها باشد، بلکه برای تحریک لاروها به بلع آنها و همچنین هضم و جذب کارآمد ریز ذرات غذایی، ترکیباتی نظیر، جاذب‌های تغذیه‌ای باید در ساخت آنها به کار گرفته شود.

۹- بلع ریز ذرات غذایی

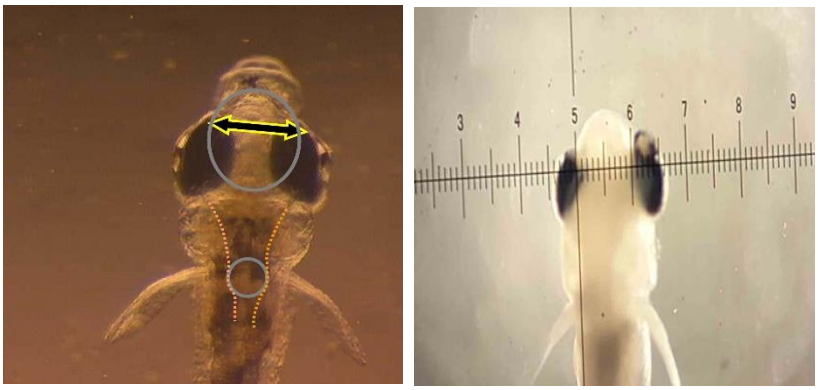
استفاده از ریز ذرات غذایی با اندازه کوچکتر از ۵۰ میکرون در تغذیه آغازین لارو ماهیان دریایی مناسب

[1] . Tween 80
[2] . Ascorbyl palmitate
[3] . Co-feeding
[4] . Bombesin
[5] . Cholecystokinin
[6] . Peristaltic movement

نمی‌باشد. به دلیل اینکه ذرات با اندازه کوچکتر از این سایز به آسانی توسط لاروها تشخیص داده نمی‌شوند. در عین حال نمونه‌های بزرگتر از این اندازه نیز سبب مسدود شدن لوله گوارش لاروهای تازه به تغذیه افتاده می‌گردند (Cahu and Zambonino Infante, 2001).

اندازه ریز ذرات غذایی بلعیده شده در ارتباط با اندازه دهان لاروهاست. در طول دوره پرورش لارو ماهیان دریایی، لاروها با طول کل کمتر از ۴/۵ میلی‌متر ذرات غذایی ۱۵۰-۵۰ میکرون را جهت تغذیه انتخاب می‌کنند. لاروها با طول کل بزرگتر از ۴/۵ میلی‌متر از ذرات غذایی با اندازه بین ۱۵۱-۲۵۰ میکرون جهت تغذیه استفاده می‌کنند. لاروها با طول کل بزرگتر از ۶ میلی‌متر ذرات بزرگتر از ۲۵۰ میکرون را می‌بلعند. از روز چهلم بعد از تفریخ می‌توان از ذرات با اندازه۶۰۰-۴۰۰ میکرون جهت تغذیه بچه ماهیان استفاده نمود. به طور کلی می‌توان گفت لارو ماهیان دریایی ذرات غذایی را که قطر آنها ۵۰-۲۵ درصد پهنای دهان آنها باشند، براحتی می‌بلعند (Yúfera and Darias, 2007). جهت اندازه‌گیری اندازه دهان در لارو ماهیان می‌توان از تکنیک اندازه‌گیری فاصله بین دو چشم مطابق تصویر زیر استفاده نمود. در واقع قطر حلق که ۵۰-۲۵ درصد قطر دهان است تعیین کننده اندازه ذرات غذایی قابل بلع توسط لاروهاست.

در زمان تغذیه لاروها با ریز ذرات غذایی باید آنها در دفعات متعدد و به میزان زیاد (شیری اشباع[1]) به مخازن پرورش لاروی افزوده گردند. دو دلیل برای این موضوع می‌توان ذکر نمود. اولاً، چون ریز ذرات غذایی به سرعت از دسترس لاروها خارج می‌شود باید دائماً در دسترس لاروها باشند (Yúfera et al., 1999). ثانیاً، به دلیل اینکه لاروها در مراحل اولیه تکامل خود دارای محدودیت‌هایی در شنای فعال و تعقیب طعمه هستند، پس دسترسی آنها، به دلیل ضعف در شنا، به همه ذرات غذایی موجود در مخزن کم است و تنها قادرند از ریز ذرات غذایی اطراف بدن خود که در حال سقوط‌اند تغذیه نمایند. بنابراین، با افزودن ریز ذرات غذایی به میزان زیاد به مخازن پرورش لاروی، شانس غذاگیری لاروها افزایش می‌یابد (Cahu and Zambonino Infante, 2001). یکی دیگر از دلایل ضعیف بودن میزان بلع لاروها از ریز ذرات غذایی کم بودن میزان کنتراست آنها نسبت به رنگ مخازن پرورش لاروی است. حضور برخی از رنگ دانه‌ها نظیر، آستاگزانتین[2] در ریز ذرات غذایی، قابلیت مشاهده و تشخیص آنها توسط لاروها را افزایش می‌دهد (Cahu and Zambonino Infante, 2001).



شکل ۱- نحوه اندازه‌گیری سایز دهان در لاروها با استفاده از تکنیک فاصله جلویی دو چشم که در شکل توسط پیکان نمایش داده می‌شود. دایره کوچک‌تر بیانگر قطر حلق است.

[1]. Ad libitum

[2]. Asthaxanthin

۱۰- روش‌های ساخت ریز ذرات غذایی

تراوش[1] مواد غذایی به داخل آب یکی از مشکلات اساسی در توسعه و ساخت غذای مناسب برای لارو ماهیان است. ذرات غذایی باید در آب پایدار بوده و همچنین برای لاروها دلپذیر و قابل هضم باشند. خوراک‌های فرموله استفاده شده برای تغییر رژیم غذایی دیر هنگام لاروها (چهل روز بعد از تفریخ) می‌توانند از آسیاب و سپس الک کردن پلت‌های غذایی تهیه گردند. اما ریز ذرات غذایی با سایز کوچکتر می‌تواند به روش‌هایی نظیر، میکروباندینگ[2] (MBD)، میکروکوتینگ[3] (MCD)، میکروکپسوله[4] (MED)، میکرو اکسترود گرد شده[5] (MEM)، ذرات ملحق شده از طریق چرخش[6] (PARA) و ذرات غذایی مرکب[7] (CP) تهیه گردند. باید توجه داشت جهت تهیه ریز ذرات غذایی اجزاء تشکیل دهنده خوراک باید به سایزی کوچکتر از ۵۰ میکرون آسیاب گردند.

در حال حاضر تکنیک میکروباندینگ (MBD) متداول‌ترین و ساده‌ترین روش برای تهیه ریز ذرات غذایی استفاده شده در پرورش لارو ماهیان دریایی می‌باشد. در این خوراک ترکیبات غذایی پودر شده بوسیله یک شبکه پایدار در آب با منشاء پلی‌ساکاریدی از قبیل، آگار[8]، کارگینان[9]، آلجینات کلسیم[10] و کربوکسیل متیل سلولز[11] (López-Alvarado et al., 1994) یا منشاء پروتئینی، نظیر کازئین[12]، زئین[13] و ژلاتین[14] (People Le Ruyet et al., 1993) که به عنوان بایندر در خوراک استفاده می‌شوند، به یکدیگر متصل می‌گردند. خوراک تولید شده به این روش خشک شده و سپس آسیاب می‌گردد و در نهایت برای به دست آوردن سایز مورد نظر، ذرات آسیاب شده الک می‌گردند. لارو ماهیان آب شیرین، از قبیل ماهیان خاویاری دارای یک توانایی ضعیف در شکستن و هضم شبکه کارگینان هستند. بنابراین، استفاده از ریز ذرات غذایی ساخته شده با این بایندر اخیر جهت تغذیه لارو ماهیان خاویاری توصیه نمی‌گردد. برعکس، گونه‌های آب شور در روده خود دارای باکتری‌های سنتز کننده آنزیم کارگیناز[15] هستند و همین موضوع توانایی این لاروها را در هضم چنین ریز ذرات غذایی شرح می‌دهد. در بین خوراک‌های میکروباندینگ ریزذرات غذایی ساخته شده با استفاده از بایندر آگار و آلجینات دارای پایداری بهتر در آب و در عین حال هضم راحت‌تر در دستگاه گوارش لاروها هستند. خوراک‌های میکروباندینگ به سبب نداشتن پوشش یا غشاء خارجی نظیر، کپسول به راحتی برای لاروها قابل هضم هستند و همچنین بالا بودن تراوش مواد غذایی از آنها سبب افزایش جذابیت این ذرات برای لاروها می‌گردد (Kolkovski, 2001).

خوراک‌های میکروکوتینگ (MCD) همان غذای میکروباندینگ هستند که به منظور کاهش تراوش، آنها را با یک لایه از جنس چربی یا لیپوپروتئین پوشش‌دار می‌کنند. این روش عموماً در مقیاس تجاری به کار گرفته نمی‌شود (Önal and Langdon, 2004).

خوراک‌های میکروکپسوله (MED) با تکنیک‌های مختلفی تولید می‌گردند. در این روش ذرات دارای یک غشاء یا کپسول خارجی بوده که محتویات خوراک را از محیط پیرامونی جدا می‌کند. دیواره کپسول به حفظ یکپارچگی خوراک تا زمان مصرف کمک کرده و از تراوش و از هم پاشیدگی ترکیبات غذایی در آب جلوگیری به عمل می‌آورد. اگرچه این ویژگی ممکن است تراوش ترکیبات محلول در آب را که جاذب تغذیه‌ای هستند محدود نماید و از این رو سبب کاهش جذب لارو به تغذیه از آنها گردد (Kolkovski et al., 2009). همچنین دیواره کپسولی سبب سخت شدن هضم آنها در دستگاه گوارش لاروها می‌گردد. جهت ایجاد غشاء یا دیواره کپسولی در این تکنیک می‌توان از پلیمرهایی نظیر، آلجینات، کیتوزان، ژلاتین، زئین، کربوکسیل متیل سلولز یا پروتئین با پیوند متقاطع استفاده نمود (Hamre et al., 2013). خوراک‌های میکروکپسوله تهیه شده با استفاده از پروتئین با پیوند متقاطع دارای شکل منظم بوده و پایدار در آب هستند. اما

[1] . Leaching
[2] . Microbound
[3] . Microcoated
[4] . Microencapsulated
[5] . Microextruded Marumerized
[6] . Particle-assisted rotational agglomeration
[7] . Complex particle
[8] . Agar
[9] . Carrgeenan
[10] . Calcium alginate
[11] . Carboxymethyl-cellulose
[12] . Casein
[13] . Zein
[14] . Gelatin
[15]. Carrageenases

مشکل این خوراک اخیر سخت بودن هضم آن برای لارو می‌باشد.

خوراک میکرو اکسترود گرد شده (MEM) دارای کیفیت بسیار بالا بوده و در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است. به طوری که هم اکنون این خوراک به صورت تجاری در بازار در دسترس است. تولید این خوراک یک فرایند دو مرحله‌ای، شامل اکستروژن سرد و سپس گرد کردن ذرات خارج شده از اکستروژن بوسیله یک دستگاه گرد کننده[1] است. با استفاده از این تکنیک امکان تولید ذرات با سایز ۱۰۰۰-۵۰۰ میکرون وجود دارد.

تولید ذرات ملحق شده از طریق چرخش (PARA) یک فرایند تک مرحله‌ای است که توانایی تولید خوراک با سایز۵۰۰-۵۰ میکرون را دارد. ریز ذرات تولید شده به این روش دارای چگالی کمتری نسبت به ذرات میکرو اکسترود هستند به سبب اینکه در این روش فرایند اکستروژن وجود ندارد. در این تکنیک از یک دستگاه گرد کننده استفاده می‌گردد. اساس کار این دستگاه حرکت یک محفظه چرخشی است که خمیر مخلوط ترکیبات غذایی داخل آن ریخته می‌شود. چرخش محفظه سبب قطعه قطعه شدن خمیر به ذرات غذایی کوچک گلوله‌ای شکل می‌گردد. اندازه ذرات نهایی به سرعت چرخش محفظه و سایز ذرات غذایی تشکیل دهنده خمیر بستگی دارد (Barrows and Lellis, 2006).

پیشرفته‌ترین تکنیک در ساخت ذرات غذایی جهت تغذیه لاروها تولید ریز ذرات غذایی مرکب (CP) است. از این تکنیک در مقیاس آزمایشگاهی استفاده می‌گردد. در ساخت ذرات غذایی مرکب حداقل از دو نوع ریز ذرات غذایی متفاوت در تشکیل یک ذره غذایی واحد استفاده می‌گردد. هدف از به کارگیری این تکنیک ساخت خوراکی است که در رساندن مواد غذایی به لاروها کامل و بی‌نقص باشد. در واقع ایده ساخت ذرات غذایی مرکب، نشأت گرفته از ایجاد تکنیکی برای کاهش تراوش ترکیبات غذایی محلول در آب از ریز ذرات غذایی است. برای رفع این مشکل، ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه محلول در آب در لیپوزوم‌ها، دانه‌های اسپری شده چربی و کپسول‌ها با دیواره لیپیدی به دام اندخته شده و این ذرات در ساخت ریز ذرات غذایی به کار گرفته می‌شوند (Langdon et al., 2007).

پیچیده‌ترین مشکل تکنیکی در طراحی ریز ذرات غذایی فرموله شده جهت تغذیه لاروها جلوگیری از مقادیر بالای تراوش ترکیبات محلول در آب بعد از معرفی آنها به مخازن پرورش است. همان طور که قبلاً اشاره شد ریز ذرات غذایی به دلیل کوچک بودن، نسبت سطح به حجم بالاتر بوده و فاصله هسته تا سطح بسیار کم است و همین عامل سبب افزایش تراوش می‌گردد. به طوری که خوراک‌های میکروباندینگ بین ۹۵-۵۰ درصد محتوی اسیدهای آمینه آزاد، ویتامین‌ها و پروتئین هیدرولیز شده خود را در طول چند دقیقه اول جذب آب از دست می‌دهند. همچنین ۳۰-۱۵ درصد وزن خشک این نوع خوراک در مدت زمان کوتاهی از بین می‌رود. از سوی دیگر، خوراک‌های میکروکپسوله با غشاء پروتئینی با پیوند متقاطع، تا ۸۵ درصد کل محتوی اسیدهای آمینه و تقریباً تمام وزن خشک خود را می‌توانند در طول چندین ساعت اول بعد از معرفی به مخازن پرورش حفظ نمایند.

۱۱- جهت‌گیری مطالعات آینده

در مجموع یافته‌های اخیر به دست آمده در رابطه با احتیاجات تغذیه‌ای لارو ماهیان دریایی یک بستر مناسبی را برای فرمولاسیون ریز ذرات غذایی و ساخت غنی‌کننده‌های غذای زنده فراهم آورده است. قابلیت هضم ریز ذرات غذایی یک شرط بنیادین و حیاتی برای موفقیت به کارگیری آنها در پرورش لاروهاست. فرایند تولید روی قابلیت هضم ترکیبات تغذیه‌ای تشکیل دهنده ریز ذرات غذایی، بخصوص پروتئین‌ها تاثیرگذار است. از طرف دیگر، ظرفیت هضم لاروها با افزایش سن و تکامل آنها بهبود می‌یابد و متعاقباً توانایی هضم ریز ذرات غذایی برای آنها به تدریج سهل‌تر می‌گردد. قابلیت هضم منابع پروتئینی رژیم غذایی یک فاکتور موثر در تعیین بازدهی هضم آنها بوسیله لارو ماهیان می‌باشد به همین دلیل است که در خوراک‌های فرموله شده برای لاروها و خوراک‌های تغییر رژیم غذایی (وینینگ) همان طور که قبلاً اشاره شد، بخشی از سهم پروتئین جیره را پروتئین هیدرولیز تشکیل می‌دهد. در واقع این یک روش تسهیل هضم و افزایش قابلیت دسترسی به پپتایدها و اسیدهای آمینه در داخل روده لاروهاست (Cahu and Zambonino Infante, 2001). همچنین خود ماهیت پروتئین روی قابلیت هضم آن بسیار

[1]. Marumerizer

تأثیر گذار بوده، به طوری که پروتئین‌های محلول در آب قابلیت هضم بسیار بالایی برای لارو ماهیان دارند.

وجود دانش کافی در رابطه با تغذیه لاروها و یک تکنولوژی کارآمد برای ساخت ریز ذرات غذایی جهت برآورده‌سازی احتیاجات تغذیه‌ای و انرژیتیک لاروها ضروریست. برعکس غذای زنده، در ریز ذرات غذایی قابلیت تغییر تمام ترکیبات تغذیه‌ای مطابق با نیاز فرمولاسیون وجود دارد. همچنین در خوراک‌های فرموله شده مشکل تغییرات در محتوی ماده غذایی مورد نظر ناشی از فرایندهای متابولیکی خود غذای زنده وجود ندارد. از این رو، ریز ذرات غذایی یک ابزار ایده‌ال در پیشرفت مطالعه احتیاجات تغذیه‌ای لاروها هستند. اگرچه برخی محدودیت‌ها در فرمولاسیون ریز ذرات غذایی وجود دارد. اولاً بخشی از خوراک را بایندر تشکیل می‌دهد که بسته به نوع تکنولوژی ساخت آن می‌تواند بین ۴۰-۵ درصد کل توده ذره را شامل گردد. این بخش پیوند دهنده اجزا تشکیل دهنده خوراک می‌تواند قابل هضم، تا حدودی قابل هضم و غیر قابل هضم باشد. از طرف دیگر، مشکل تراوش که قبلاً شرح داده شد، ممکن است تناسب ریز مغذی‌های محلول در آب را در خوراک تغییر دهد. علی‌رغم این موانع، ریز ذرات غذایی امکان طراحی خاص و ویژه را در فرمولاسیون خوراک فراهم آورده و جهت تحقیقات در زمینه احتیاجات تغذیه‌ای لاروها با موفقیت به کار گرفته می‌شوند.

اصولاً تغییر رژیم غذایی زود هنگام لاروها به خوراک فرموله یا استفاده انحصاری از ریز ذرات غذایی جهت پرورش لارو ماهیان دریایی یک هدف ایده‌ال جهت دستیابی در زمان پرورش آنها در شرایط اسارت می‌باشد. در مقیاس آزمایشگاهی شرطی کردن لاروها به خوراک فرموله بوسیله به کارگیری پروتکل‌های تغذیه ترکیبی (غذای زنده + ریز ذرات غذایی) و استفاده از ریز ذرات غذایی با طراحی و فرمولاسیون کارآمد، امکان جایگزینی کامل غذای زنده را در هفته‌های نخست بعد از تفریخ بدون کاهش رشد و بازماندگی لاروها فراهم آورده است. اما به کارگیری انحصاری ریز ذرات غذایی جهت تغذیه لارو ماهیان دریایی از زمان شروع تغذیه فعال منجر به بروز نتایج ضعیف گردیده است. در این حالت اخیر استفاده اندک از غذای زنده سبب بهبود قابل ملاحظه رشد و بازماندگی لاروها می‌گردد. این نشان دهده این حقیقت است که علی‌رغم پیشرفت‌های قابل توجه در زمینه فرمولاسیون ریز ذرات غذایی آنها هنوز فاقد برخی فاکتورهای تغذیه‌ای و یا ویژگی‌ها هستند که برای هضم، قابلیت دسترسی ترکیبات تغذیه‌ای و جذب ترکیبات تشکیل دهنده آنها مخصوصاً در مراحل اولیه تکامل لاروی ضروری می‌باشند، اما از طرفی غذای زنده دارای آنهاست. بنابراین، تحقیقات آتی در زمینه تغذیه لارو ماهیان دریایی باید روی یافتن این فاکتورها و خصوصیات در غذای زنده و به کارگیری آنها در فرمولاسیون ریز ذرات غذایی متمرکز گردد.

منابع

BARROWS, F. T. & LELLIS, W. A. 2006. Effect of diet processing method and ingredient substitution on feed characteristics and survival of larval walleye, Sander vitreus. Journal of the world aquaculture society, 37, 154-160.

Bessonart, M., Izquierdo, M.S., Salhi, M., Gonzalez, M.M., 1999. Bessonart et al_Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream *Sparus aurata* L larvae_1999_Aquacult 179_265-275.

Betancor, M.B., Atalah, E., Caballero, M., Benítez-Santana, T., Roo, J., Montero, D., Izquierdo, M., 2011. α-Tocopherol in weaning diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) improves survival and reduces tissue damage caused by excess dietary DHA contents. Aquac. Nutr. 17, 112-122.

Caballero, M.J., Torstensen, B.E., Robaina, L., Montero, D., Izquierdo, M., 2006. Vegetable oils affect the composition of lipoproteins in sea bream (*Sparus aurata*). Br. J. Nutr. 96, 830–839.

Cahu, C., Zambonino Infante, J., 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. Aquaculture 200, 161–180.

Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., Quazuguel, P., Le Gall, M.M., 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. Aquaculture 171, 109–119.

Conceição, L.E.C., van der Meeren, T., Verreth, J.A.J., Evjen, M.S., Houlihan, D.F., Fyhn, H.J., 1997. Amino acid metabolism and protein turnover in larval turbot (*Scophthalmus maximus*) fed natural zooplankton or Artemia. Mar. Biol. 129, 255–265.

Darias, M.J., Mazurais, D., Koumoundouros, G., Glynatsi, N., Christodoulopoulou, S., Huelvan, C., Desbruyeres, E., Le Gall, M.M., Quazuguel, P., Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., 2010. Dietary vitamin D3 affects digestive system ontogenesis and ossification in European sea bass (*Dicentrachus labrax*, Linnaeus, 1758). Aquaculture 298, 300–307.

Dhert, P., Rombaut, G., Suantika, G., Sorgeloos, P., 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. Aquaculture 200, 129–146.

Ganga, R., Bell, J.G., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., 2005. Effect of dietary lipids on plasma fatty acid profiles and prostaglandin and leptin production in gilthead seabream (*Sparus aurata*). Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 142, 410–418.

Hamre, K., Harboe, T., 2008. Critical levels of essential fatty acids for normal pigmentation in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. Aquaculture 277, 101–108.

Hamre, K., Holen, E., Moren, M., 2007. Pigmentation and eye migration in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae: New findings and hypotheses. Aquac. Nutr. 13, 65–80.

Hamre, K., Mollan, T.A., Sæle, Ø., Erstad, B., 2008. Rotifers enriched with iodine and selenium increase survival in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. Aquaculture 284, 190–195.

Hamre, K., Yúfera, M., Rønnestad, I., Boglione, C., Conceição, L.E.C., Izquierdo, M., 2013. Fish larval nutrition and feed formulation: Knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing. Rev. Aquac. 5, 26-58.

Izquierdo, M.S., 1996. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. Aquac. Nutr. 2, 183–191.

Izquierdo, M.S., Socorro, J., Arantzamendi, L., Hernández-Cruz, C.M., 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. Fish Physiol. Biochem. 22, 97–107.

Kolkovski, S., 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles - Implications and applications to formulated diets, in: Aquaculture 200, 181-201.

Kolkovski, S., Arieli, A., Tandler, A., 1997. Visual and chemical cues stimulate microdiet ingestion in sea bream larvae. Aquac. Int. 5, 527-536.

Kolkovski, S., Lazo, J., Leclercq, D., Izquierdo, M., 2009. Fish larvae nutrition and diet: New developments, in: New Technologies in Aquaculture: Improving Production Efficiency, Quality and Environmental Management.

Kolkovski, S., Tandler, A., 2000. The use of squid protein hydrolysate as a protein source in microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. Aquac. Nutr. 6, 11–15.

Koven, W., Kolkovski, S., Hadas, E., Gamsiz, K., Tandler, A., 2001. Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: A review. Aquaculture 194, 107–121.

Langdon, C., Clack, B., Önal, U., 2007. Complex microparticles for delivery of low-molecular weight, water-soluble nutrients and pharmaceuticals to marine fish larvae. Aquaculture 268, 143–148.

Langdon, C., Nordgreen, A., Hawkyard, M., Hamre, K., 2008. Evaluation of wax spray beads for delivery of low-molecular weight, water-soluble nutrients and antibiotics to Artemia. Aquaculture 284, 151-158.

Lavens, P., Sorgeloos, P., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture, Fao Fisheries Technical Paper.

López-Alvarado, J., Langdon, C.J., Teshima, S.-I., Kanazawa, A., 1994. Effects of coating and encapsulation of crystalline amino acids on leaching in larval feeds. Aquaculture 122, 335–346.

Mazurais, D., Glynatsi, N., Darias, M.J., Christodoulopoulou, S., Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.-L., Koumoundouros, G., 2009. Optimal levels of dietary vitamin A for reduced deformity incidence during development of European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) depend on malformation type. Aquaculture 294, 262–270.

Merchie, G., Lavens, P., Sorgeloos, P., 1997. Optimization of dietary vitamin C in fish and crustacean larvae: a review. Aquaculture 155, 165–181.

Moren, M., Næss, T., Hamre, K., 2002. Conversion of β-carotene, canthaxanthin and astaxanthin to vitamin A in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) juveniles. Fish Physiol. Biochem. 27, 71-80

Morris, A.L., Hamlin, H.J., Francis-Floyd, R., Sheppard, B.J., Guillette, L.J.J., 2011. Nitrate-induced goiter in captive whitespotted bamboo sharks *Chilosryllium plagiosum*. J. Aquat. Anim. Health 23, 92–99.

Navarro, J.C., Henderson, R.J., McEvoy, L.A., Bell, M. V., Amat, F., 1999. Lipid conversions during enrichment of Artemia. Aquaculture 174, 155-166.

Nematzadeh, K., Ahmadifard, N., Samadi, N., Agh, N., Ghaderpour, S., 2018. The effects of zinc-enriched *Saccharomyces cerevisiae* on the growth and mineral composition of marine rotifer, *Brachionus plicatilis*. International Journal of Aquatic Biology 6, 88-94

Nutrient Requirements of Fish and Shrimp, 2011. , Nutrient Requirements of Fish and Shrimp.

Önal, U., Langdon, C., 2004. Characterization of lipid spray beads for delivery of glycine and tyrosine to early marine fish larvae. Aquaculture 233, 495–511.

Penglase, S., Hamre, K., Sweetman, J.W., Nordgreen, A., 2011. A new method to increase and maintain the concentration of selenium in rotifers (*Brachionus* spp.). Aquaculture 315, 144-253.

People Le Ruyet, J., Alexandre, J.C., Thébaud, L., Mugnier, C., 1993. Marine Fish Larvae Feeding: Formulated Diets or Live Prey? J. World Aquac. Soc. 24, 211–224.

Rønnestad, I., Lie, Ø., Waagbø, R., 1997. Vitamin B6 in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*—endogenous utilization and retention in larvae fed natural zooplankton. Aquaculture 157, 337–345.

Rønnestad, I., Thorsen, A., Finn, R.N., 1999. Fish larval nutrition: A review of recent advances in the roles of amino acids. Aquaculture 177, 201–216.

Rønnestad, I., Yúfera, M., Ueberschär, B., Ribeiro, L., Sæle, Ø., Boglione, C., 2013. Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: Current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. Rev. Aquac. 5, 59-98.

Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., Tocher, D., 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: Current status and future directions. Aquaculture 179, 217–229.

Sorgeloos, P., Dhert, P., Candreva, P., 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. Aquaculture 200, 147–159.

Srivastava, A., Hamre, K., Stoss, J., Chakrabarti, R., Tonheim, S.K., 2006. Protein content and amino acid composition of the live feed rotifer (*Brachionus plicatilis*): With emphasis on the water soluble fraction. Aquaculture 254, 534–543.

Srivastava, A., Hamre, K., Stoss, J., Nordgreen, A., 2012. A study on enrichment of the rotifer Brachionus “Cayman” with iodine from different sources. Aquaculture 334–337, 82–88.

Tonheim, S.K., Espe, M., Hamre, K., Rønnestad, I., 2005. Pre-hydrolysis improves utilisation of dietary protein in the larval teleost Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 321, 19–34.

Tonheim, S.K., Nordgreen, A., Høgøy, I., Hamre, K., Rønnestad, I., 2007. In vitro digestibility of water-soluble and water-insoluble protein fractions of some common fish larval feeds and feed ingredients. Aquaculture 262, 426–435.

Yúfera, M., Darias, M.J., 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. Aquaculture 268, 53-63.

Yúfera, M., Kolkovski, S., Fernández-Díaz, Rinchard, J., Lee, K.J., Dabrowski, K., 2003. Delivering bioactive compounds to fish larvae using microencapsulated diets. Aquaculture 227, 277–291.

Yúfera, M., Pascual, E., Fernández-Díaz, C., 1999. A highly efficient microencapsulated food for rearing early larvae of marine fish. Aquaculture 177, 249–256.

Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., 1999. High Dietary Lipid Levels Enhance Digestive Tract Maturation and Improve *Dicentrarchus labrax* Larval Development. J. Nutr. 129, 1195–1200.

ZAMBONINO-INFANTE, J. & CAHU, C. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology,* 130**,** 477-487.

Marine fish larval nutrition requirement

Behzad Sarvi

1. Persian Gulf and Oman Sea Ecological Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran, post box:79167-93165

*Corresponding author: bsarvi@ut.ac.ir

Abstract

One of the key problems in the lack of development of the marine fish industry in the world is the failure to produce juvenile fish continuously in captivity. This is due to the high mortality of marine fish larvae during rearing in captive conditions. The high mortality of larvae at this stage can stem from various factors. Specifically, nutrition is one of the central factors in the success of aquaculture activities and has a direct effect on reducing or increasing mortality during the larval period. In spite of significant advances in fish nutrition, many questions remain unanswered regarding marine fish larvae nutrition. Marine fish larvae lack a stomach in the first weeks after hatching. However, this does not mean that the digestive tract is non-functional, but the challenge is to determine which nutrients, molecules, or particles the gut can be digested and absorbed. A comprehensive understanding of the nutritional requirements of marine fish larvae contributes to the development and fabrication of formulated feeds and the utilization of essential nutrients to enrich live foods during larval rearing in captivity. This subject leads to increased growth and survival of larvae.

Key words: Marine fish larvae, nutritional requirements, formulated food, live foods, growth and survival