شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۴، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰
صفحات ۵۸۶-۵۷۵

بررسی برخی از خصوصیات بیوشیمیایی و میکروبی بیوسیلاژ تولید شده از آلایش تولیدی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

رضا صفری[1*]، سهیل ریحانی پول[2]، زهرا یعقوب‌زاده[1]، زهرا بانکه‌ساز[3]، محمدجواد تقوی[3]، عین‌اله صفری[3]

۱. استادیار، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

۲. دانش آموخته دکتری تخصصی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۳. کارشناس آزمایشگاه، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

تاریخ ارسال: ۱۴۰۰/۰۴/۱۳ **تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۰۹**

چکیده

با افزایش تولید، مصرف و مراکز فرآوری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، استفاده بهینه از ضایعات تولید شده بسیار حائز اهمیت است. از راه‌های تبدیل این ضایعات به محصولاتی با ارزش افزوده بالا می‌توان به تولید بیوسیلاژ اشاره کرد. هدف از مطالعه حاضر بررسی برخی از خصوصیات شیمیایی و میکروبی بیوسیلاژ تولید شده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به عنوان محصولی مناسب جهت استفاده در صنعت غذای دام، طیور و آبزیان است. نتایج نشان داد که محصول تولید شده دارای ۵۲/۳ درصد پروتئین و ۸/۳۰ درصد چربی است. شاخص‌های پراکسید و مجموع ترکیبات ازته فرار برای بیوسیلاژ به ترتیب ۲/۶۱ میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم و ۴۴/۰ میلی‌گرم ازت در ۱۰۰ گرم اندازه‌گیری شد. لگاریتم شمارش کلی باکتری‌ها، کلی‌فرم‌ها، کلی‌فرم مدفوعی، اشرشیاکلی و کپک و مخمر در محصول تولیدشده به ترتیب ۸/۷۸، ۳/۷۲، ۱/۱۸، صفر و ۳/۲۳ تعداد بر گرم گزارش گردید. اندازه‌گیری مقادیر فلزات سنگین در بیوسیلاژ حاصل از ضایعات قزل‌آلا نشان داد که غلظت‌های منگنز، مس، آهن و روی در این محصول به ترتیب ۱۰/۶، ۱۳/۷، ۲۵۱/۳ و ۱۱۸/۷ میلی‌گرم در کیلوگرم است. بنابر نتایج تحقیق حاضر و مقایسه این یافته‌ها با سایر پژوهش‌ها می‌توان اذعان نمود که بیوسیلاژ تولیدشده در تحقیق حاضر از نظر شاخص‌ها و ویژگی‌های مورد بررسی تقریبا معادل سایر مواد مصرفی در تغذیه دام، طیور و آبزیان است و می‌توان این محصول را به عنوان جایگزینی مناسب برای سایر محصولات رایجی که در صنعت تغذیه استفاده می‌شوند به کار برد.

واژگان کلیدی: بیوسیلاژ، کنترل کیفی، شاخص‌های میکروبی، ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

* نویسنده مسئول: رضا صفری
Email: safari1351@gmail.com

Journal of Fisheries
Vol. 74, No. 4, Winter 2021
pp. 575-586

Investigation of some chemical and microbial properties of biosilage produced from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) wastes

Reza Safari[1*], Soheyl Reyhani Poul[2], Zahra Yaghoubzadeh[1], Zahra Bankehsaz[3], Mohammad Javad Taghavi[3], Eynollah Safari[3]

1. Assistant Professor, Caspian Sea Ecology Research Institute, Fisheries Science Research Institute, Agricultural Education and Extension Research Organization, Sari, Iran
2. PhD graduate, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
3. Laboratory expert, Caspian Sea Ecology Research Institute, Fisheries Science Research Institute, Agricultural Education and Extension Research Organization, Sari, Iran

Received: 04-Jul-2021 **Accepted: 01-Oct-2021**

Abstract
With the increase in production, consumption and processing centers of rainbow trout, the optimal use of the generated waste is very important. One of the ways to convert these wastes into high value-added products is to produce biosilage. The aim of this study was to investigate some of the chemical and microbial properties of biosilage produced from rainbow trout wastes as a suitable product for use in the livestock, poultry and fish feed industry. The results showed that the product has 52.27% protein and 8.3% fat. PV and TVB-N for biosilage were measured to be 2.61 meq/kg and 44.0 mg/100g, respectively. Logarithm total viable bacteria, coliforms, Fecal coliforms, *Escherichia coli* and mold and yeast count in the product were reported 8.78, 3.72, 1.18, zero and 3.23 per gram, respectively. The concentrations of manganese, copper, iron and zinc were 10.6, 13.7, 251.3 and 118.7 mg/kg, respectively in the produced silage. According to the results of the present study and comparison of these findings with other studies, it can be claimed that the biosilage produced in the present study is almost equivalent to other consumables for feeding livestock, poultry and fish in terms of indicators and characteristics and this product can be used as a suitable alternative to other common products used in the food industry.

Key words: Biosilage, Heavy metal, Quality control, Microbial indices, Rainbow trout

Corresponding author: Reza Safari Email: safari1351@gmail.com

۱. مقدمه

حجم زیاد ضایعات تولیدشده در مراکز فراوری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان موضوعی است که در صورت توجه ویژه به آن، می‌تواند سودآوری به همراه داشته باشد. این ضایعات در صورت دورریز، موجب آلودگی محیط زیست می‌شوند. راه‌های مختلفی برای استفاده بهینه از این ضایعات وجود دارد. این ضایعات می‌توانند به روش‌های مختلف (شیمیایی و آنزیمی) آبکافت و به پودر پروتئینی تبدیل شوند که این پروتئین‌ها در ساخت محیط کشت باکتری به عنوان منبع نیتروژن (Safari *et al*., 2012) و صنایع غذایی (از جهت خواص امولسیفایری، کف‌زایی و آنتی‌اکسیدانی) کاربرد دارند (Reyhani Poul *et al*., 2017). راه دیگر استفاده صحیح از این ضایعات، تبدیل آن‌ها به پودر ماهی است. این پودر در خوراک دام، طیور و آبزیان قابلیت مصرف دارد. تبدیل این ضایعات به پودر ماهی تقریبا سنتی بوده و از سالیان دور انجام می‌شود.

راه دیگر تبدیل این ضایعات به فراورده‌هایی با ارزش افزوده بالا و تولید محصولی بر مبنای تکنولوژی و فناوری روز، تولید سیلاژ است. سیلاژ یک محصول تخمیری بر پایه واکنش‌های اتولیز، شیمیایی و میکروبی است. بیوسیلاژ یا سیلاژ بیولوژیک، سیلاژی است که در مراحل تولید آن از باکتری‌های مفید (بعنوان باکتری‌های آغازگر) جهت آبکافت و تجزیه پروتئین‌ها استفاده می‌شود. هدف از تولید بیوسیلاژ، استفاده از این محصول در صنعت تغذیه دام، طیور و آبزیان به عنوان جایگزینی مناسب برای پودر ماهی است (در صورت مطلوب‌بودن کیفیت، ترکیب شیمیایی و شاخص‌های شیمیایی و میکروبی فساد).

در مطالعات مختلف از سیلاژ (بیوسیلاژ) بعنوان جایگزین پودر ماهی در جیره غذایی آبزیان (طیور) استفاده شده است (Kamei *et al*., 2018; Gullu *et al*., 2014; Goosen *et al*., 2014; Ramírez *et al*., 2016; Shabani *et al*., 2019; Najim *et al*., 2014). تحقیق حاضر بخشی از طرح تولید بیوسیلاژ از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است. در تحقیق پیش‌رو بیوسیلاژ تولیدشده از نظر ترکیب شیمیایی، ترکیب برخی مواد معدنی، شاخص‌های شیمیایی مولد فساد و شاخص های میکروبی مورد سنجش قرار گرفته است.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. تولید بیوسیلاژ

آلایش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از بازار ماهی فروشان شهرستان ساری تهیه و در مجاورت یخ یا زنجیره سرد و در کوتاه‌ترین زمان به آزمایشگاه پژوهشکده اکولوژی دریای خزر انتقال داده شد و تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از انجمادزدایی در محیط، نمونه‌ها چرخ و به یک ارلن ۲ لیتری انتقال داده شدند. پس از اضافه‌کردن آب مقطر (به مقدار ۳۰ درصد ماده اولیه)، جهت غیرفعال‌کردن آنزیم‌های داخلی و همچنین حذف باکتری‌های بیماری‌زای احتمالی (سالمونلا تیفی موریوم و اشرشیا کلی)، نمونه‌ها در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد بن‌ماری به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. سپس از باکتری‌های تجزیه‌کننده پروتئین (باسیلوس سوبتی لیس[۱] و باسیلوس لیکنوفورمیس[۲] (واجد آنزیم پروتئاز مانند باکتری‌های گرم مثبت اسپوردار) و باکتری‌های تولیدکننده اسید (لاکتوباسیلوس پلانتاروم[۳]، لاکتوباسیلوس بولگاریکوس[۴]، لاکتوباسیلوس رامنوسوس[۵]، پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی[۶]، لاکتوباسیلوس کازئیی[۷] (جهت کاهش pH سوسپانسیون و تسریع‌نمودن فرآیند تخمیر مانند باکتری‌های لاکتیک) تحت عنوان باکتری‌های آغازگر یا استارترهای میکروبی جهت هضم ضایعات استفاده شد. جهت آماده‌سازی اولیه باکتری‌های اسپوردار از محیط کشت تریپتیک سوی براث[۸] و باکتری‌های اسید لاکتیک

[۱] *Bacillus subtilis*
[۲] *Bacillus licheniformis*
[۳] *Lactobacillus plantarum*
[۴] *Lactobacillus bulgaricus*
[۵] *Lactobacillus rhamnosu*
[۶] *Pediococcus acidilactici*
[۷] *Lactobacillus casei*
[۸] *Tryptic Soy broth*

از محیط کشت MRS براث[1] استفاده گردید. بدین ترتیب که پس کشت اولیه هر باکتری در محیط های مذکور و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت، عمل سانتریفوژ در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. پس از شستشو با سرم فیزیولوژی (۳ مرتبه)، مجددا سانتریفوژ انجام گردید و در نهایت با لوله ۳ مک فارلند (۹×۱۰^{۸}) مقایسه شد و جهت تزریق به عنوان محرک تجزیه زیستی مورد استفاده قرار گرفت. میزان تلقیح باکتری‌ها بصورت مخلوط باکتری‌ها در لوگ ۸ به مقدار ۵ درصد ماده اولیه بوده است. لازم به ذکر است که باکتری های مورد استفاده انحصاری بود و دارای ویژگی‌هایی نظیر رشد در pH اسیدی، توانایی رشد در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا ۶ ساعت و همچنین خواص پروتئازی بالا بودند. به هنگام اضافه‌نمودن استارترهای میکروبی یا محرک تجزیه زیستی، منبع کربوهیدرات (ملاس نیشکر) به طور همزمان نیز به ماده اولیه اضافه گردید (به مقدار ۱۰ درصد ماده اولیه). نمونه‌ها در محدوده دمایی ۴۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد تا نمونه‌ها در شرایط یکنواخت یا هموژن تخمیر گردند. پس از اتمام فرآیند، جهت جداسازی روغن از محصول تولیدشده، نمونه‌ها در دور ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از خارج‌کردن روغن، به سوسپانسیون باقیمانده مقدار ۳ درصد سبوس برنج (جهت افزایش نسبی ماده خشک در محصول نهایی و تسهیل در فرآیند خشک‌کردن) اضافه شد و در نهایت فرآیند خشک‌شدن در دمای ۶۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت. در مرحله نهایی، نمونه‌ها با استفاده از دستگاه خردکن مولینکس، به ذرات یکسان تبدیل و پس از بسته‌بندی، در مکان خشک و خنک نگهداری شدند (Palkar *et al*., 2017; Palkar *et al*., 2018).

۲،۲. تجزیه ترکیب بیوشیمیایی سیلاژ

۱.۲،۲. پروتئین خام

برای اندازه‌گیری پروتئین خام، یک گرم نمونه (بیوسیلاژ) و ۸ گرم کاتالیزور پروتئین (شامل ۱۰۰ گرم سولفات‌سدیم یا پتاسیم و ۱۰ گرم سولفات مس و ۱ گرم پودر سلنیوم) و ۲۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ را داخل بالن هضم کجلدال ریخته و بالن روی حرارت قرار داده شد. در انتها مایع بی‌رنگی در ته بالن باقی ماند. عمل هضم زیر محوطه سرپوشیده مجهز به ونتیلاتور انجام شد. چرا که بخارات متصاعدشده از بالن هضم سوزاننده است. مرحله بعدی تقطیر ماده هضم‌شده بود که به بالن حاوی نمونه هضم، ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و سود ۵۰ درصد اضافه گردید و روی حرارت قرار داده شد. سپس ۵۰ میلی‌لیتر اسیدبوریک و چند قطره معرف متیل رد را داخل یک ارلن ریخته و در زیر رفریژران محل تقطیر قرارداده شد؛ به طوری که انتهای لوله متصل به رفریژران در حدود ۲ میلی‌لیتر در محلول اسیدی غوطه‌ور گردد. میزان نیتروژن آزاد در ارلن جمع و وارد محلول اسیدی ۰/۱ نرمال شد. در مرحله بعد، این عمل آنقدر ادامه یافت تا هیچگونه تغییر رنگی در لوله مشاهده نشود. در پایان محتوای ارلن توسط اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال تیتر شد (Iranian National Standard No. 924, 1993; AOAC, 2005). میزان پروتئین خام از روابط زیر به دست آمد. در این روابط، N، درصد نیتروژن نمونه، V، حجم اسید مصرفی برای نمونه، N، نرمالیته اسید و m، وزن نمونه خشک بر حسب گرم است.

$$N\ (\%) = 1400VN/1000m$$
$$Protein\ (\%) = 6.25N$$

۲.۲.۲. خاکستر

پنج گرم از نمونه (بیوسیلاژ) به داخل کروزه منتقل و سپس روی شعله حرارت داده شد. حرارت‌دادن تا عدم تصاعد دود از کروزه ادامه داشت. کروزه‌ها در داخل کوره و در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت حرارت داده شدند. با ظاهرشدن خاکستر سفید، نمونه‌ها از کوره خارج و برای سردشدن در داخل دسیکاتور قرار داده شدند و سپس وزن آن‌ها مشخص گردید

[1] *De Man, Rogosa and Sharp broth*

AOAC, 2005; Iranian National Standard No. 744,) 2002). درصد خاکستر با فرمول ذیل محاسبه گردید.

۱۰۰ × وزن نمونه خشک/ وزن خاکستر = درصد خاکستر

۳.۲,۲. رطوبت

پتری دیش‌های حاوی نمونه (۱۰ گرم بیوسیلاژ) به مدت ۶ ساعت در آون ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس جهت سردشدن به دسیکاتور منتقل و در نهایت وزن آن‌ها ثبت گردید (AOAC, 2005; Iranian National Standard No. 745, 1350). برای محاسبه میزان رطوبت نمونه از رابطه زیر استفاده شد. در این رابطه m_1 وزن ظرف و نمونه قبل از خشک‌کردن، m_2 وزن ظرف و نمونه بعد از خشک کردن و m_0 وزن نمونه اولیه است.

درصد رطوبت= $(m_1- m_2) / m_0$

۴.۲,۲. چربی

مقدار ۲۰ گرم از نمونه (بیوسیلاژ) به داخل دکانتور ۵۰۰ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس ۱۶۰ میلی‌لیتر متانول و به همین میزان کلروفرم به دکانتور اضافه گردید. با اضافه‌کردن آب مقطر به مجموعه، فازها از یکدیگر جدا شدند. نسبت متانول، کلروفرم و آب ۲: ۲: ۱/۶ بود. سپس لایه کلروفرمی محتوی چربی به وسیله دستگاه روتاری خارج گردید. با خروج حلال و توزین مجدد بالن، مقدار چربی نمونه بر حسب درصد با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (AOAC, 2005; Iranian National Standard No. 742, 2003; Suvanich *et al*., 2000).

۱۰۰×(وزن نمونه اولیه/ وزن چربی) = درصد چربی

۲,۳. اندازه‌گیری شاخص‌های شیمیایی مولد فساد

۱.۲,۳. عدد پراکسید (PV)

برای تعیین مقدار پراکسید ابتدا ۱۵ گرم از نمونه (بیوسیلاژ) که به خوبی مخلوط شده بود، در دکانتور ۵۰۰ میلی‌لیتر قراری داده شد. سپس ۳۰ میلی‌لیتر کلروفرم به آن اضافه گردید. پس از تکان‌دادن، مجددا ۳۰ میلی‌لیتر کلروفرم و بعد ۶۰ میلی‌لیتر متانول به آن افزوده شد. پس از ۲۴-۱۲ساعت، ۳۶ میلی‌لیتر آب مقطر به نمونه اضافه و مخلوط به مدت ۱-۲ ساعت تا تشکیل سه فاز استراحت داده شد. با دقت، ۲۰ میلی‌لیتر از فاز پایین به ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری سر سمباده‌ای منتقل و ۲۵ میلی‌لیتر اسیداستیک کلروفرمی (نسبت کلروفرم به اسید استیک ۳:۲) به آن اضافه گردید. در مرحله بعد، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول یدور پتاسیم اشباع (که به صورت تازه آماده شد و در تاریکی قرار گرفت) و ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر به محتویات ارلن اضافه گردید و پس از نهادن درب آن، به مدت ۱ دقیقه در تاریکی استراحت داده شد. سپس مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر معرف نشاسته ۱ درصد به آن افزوده و پس از بستن درب ارلن، محلول به شدت تکان داده شد. ید آزادشده، باعث تغییر رنگ محلول شد که با محلول تیوسولفات ۰/۰۱ نرمال، تا بیرنگ‌شدن محلول یا ظهور رنگ شیری و شفاف‌شدن فاز بالایی روغن تیتر گردید (Iranian National Standard No. 493, 2004; Egan *et al*., 1997). میزان پراکسید بر حسب میلی‌اکی‌والان پراکسید در یک کیلوگرم چربی با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید.

= عدد پراکسید

وزن نمونه روغن /۱۰۰×حجم تیوسولفات مصرفی× نرمالیته

۲.۲,۳. مجموع ترکیبات ازته فرار (TVB-N)

ابتدا ۱۰ گرم از نمونه (بیوسیلاژ) و ۲ گرم اکسیدمنیزیم در یک بالن کلدال توزین گردید. سپس ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۲ قطره اکتانول (به عنوان ضد کف) و تعدادی ساچمه شیشه‌ای (یا سنگ جوش به منظور بهتر صورت‌گرفتن انتقال حرارت و به دام‌افتادن حباب‌های حاصل از عمل جوش در داخل فضای متخلخل و محبوس‌شده آن و جلوگیری از پریدن مایع) نیز به محتویات بالن افزوده گردید. سپس سیستم کلدال نصب شد و در زیر لوله خروجی سیستم، ارلنی ۵۰۰

میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر اسیدبوریک ۲ درصد دارای ۲-۳ قطره معرف متیل رد قرار گرفت. به طوری که سر لوله خروجی کاملاً درون محلول ارلن قرار داشته باشد. سپس گازهایی که معرف بازهای نیتروژنه فرار هستند پس از برقراری جریان آب سرد و روشن‌شدن هیتر، متصاعد شدند که این فرایند به صورت تغییر رنگ محلول از ارغوانی به زرد نمایان شد. در نهایت این محلول با اسیدسولفوریک ۰/۱ نرمال تا ارغوانی‌شدن مجدد محلول تیتر گردید (Jeon *et al*., 2002).

۱۴ × حجم اسید سولفوریک مصرفی = مجموع ترکیبات ازته فرار

۲،۴. شمارش میکروارگانیسم‌ها

۱.۲،۴. کل باکتری‌ها

جهت تعیین شمارش کلی باکتری‌ها در نمونه‌های تهیه‌شده (بیوسیلاژ)، از محیط کشت تریپتیک سوی آگار (TSA)[1] استفاده گردید. پس از تهیه رقت‌های متوالی از نمونه‌های اولیه، ۰/۱ میلی‌لیتر از آن روی محیط کشت مذکور به طور سطحی پخش گردید. در صورت نیاز (بالابودن تعداد باکتری‌ها در یک پلیت) رقیق‌سازی نمونه‌ها (تا لوگ ۶) در محلول سرم فیزیولوژی انجام شد و پلیت‌های کشت داده‌شده مربوط به کل باکتری‌ها بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه شمارش شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، کلنی‌ها بعد از شمارش، در عکس رقت مورد استفاده ضرب شده و لگاریتم تعداد کلنی در هر میلی‌لیتر (log cfu/ml) محاسبه گردید (Standard No. 1 - 8923, 2007; Ibrahim, 2007; Hernández *et al*., 2014).

۲.۲،۴. کلی‌فرم‌ها و اشرشیا کلی

جهت شمارش کلی‌فرم‌ها، از محیط کشت ECC کروم آگار استفاده گردید. ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت‌های تهیه‌شده روی محیط کشت مذکور به طور سطحی کشت داده شد. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت به طور همزمان در دو دمای ۳۵ و ۴۴/۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. رشد کلنی‌های متمایل به آبی در هر دو دما، نشان‌دهنده وجود اشرشیاکلی، رشد کلنی‌های قرمز در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد نشان‌دهنده کل کلی‌فرم و رشد کلنی‌های قرمز در دمای ۴۴/۵ درجه سانتی‌گراد نشان‌دهنده کلی‌فرم‌های مدفوعی است. پس از اتمام زمان انکوباسیون، کلنی‌ها بعد از شمارش، در عکس رقت مورد استفاده ضرب شده و لگاریتم تعداد کلنی در هر میلی‌لیتر (log cfu/ml) محاسبه گردید (Standard No. 11166. 2007; Hernández *et al*., 2014).

۳.۲،۴. کپک و مخمر

برای شمارش قارچ‌ها از محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار[2](PDA) استفاده گردید. بدین ترتیب که ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت‌های تهیه‌شده به صورت سطحی روی محیط مذکور کشت داده شد و نمونه‌ها به مدت ۵ روز در دمای ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. تعداد کلنی‌های کپک و مخمر شمارش و با احتساب رقت مورد استفاده، محاسبه شدند (Standard No. 3-10899. 2012).

۲.۵. اندازه‌گیری فلزات در نمونه‌های بیوسیلاژ

به منظور اندازه گیری فلزات در محصول، ابتدا نمونه‌های بیوسیلاژ در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد آون خشک شدند. سپس ۰/۳ گرم از نمونه‌های بیوسیلاژ به ۴ میلی‌لیتر اسیدنیتریک غلیظ اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند. جهت هضم، نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد بر هات پلیت قرار داده شدند. پس از خنک‌شدن نمونه‌ها، با افزودن ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱ میلی‌لیتر بی‌کرومات پتاسیم (۲ درصد) حجم نهایی به ۵۰ میلی‌لیتر افزایش یافت. جهت تجزیه کمی نمونه‌ها (جدول ۱)، قرائت با استفاده از دستگاه اتمیک ابزوربشن

[1] Tryptic Soy Agar
[2] Potato Dextrose agar

(Thermo، آمریکا) با استفاده از روش شعله و لامپ‌های اختصاصی برای فلزات منگنز، روی، آهن و مس طبق جدول ذیل انجام گرفت (MOOPAM, 1999).

جدول ۱- کنترل کیفی روش آزمون فلزات سنگین در بیوسیلاژ

فلز	Std Added (ppm)	LOD	LOQ	Recovery (%)
Mn	۰/۵	۰/۰۲۵۳	۰/۰۰۸۴	۱۰۰/۲۴
Cu	۰/۵	۰/۰۰۴۸	۰/۰۱۵۹	۹۹/۱۷۲
Zn	۰/۵	۰/۰۰۵۳	۰/۰۱۷۷	۱۰۴/۰۰۸
Fe	۰/۵	۰/۰۰۸۴	۰/۰۲۷۹	۱۰۶/۸۰۴
Mn	۰/۵	۰/۰۱۰۱	۰/۰۳۳۸	۱۰۲/۰۵۶

۳. نتایج

۱.۳. ترکیب بیو شیمیایی سیلاژ تولیدی

جدول ۲ ترکیب شیمیایی بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را نشان می‌دهد. مطابق جدول محصول تولیدشده ۵۲/۲۷ درصد پروتئین و ۸/۳ درصد چربی، ۱۱ درصد خاکستر و ۱۰ درصد رطوبت داشت.

جدول ۲- ترکیب بیو شیمیایی بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات قزل‌آلای رنگین‌کمان

ترکیب بیوشیمیایی	مقدار (٪)
پروتئین	۵۲/۰±۲۷/۳۶
چربی	۸/۰±۳/۲
رطوبت	۱۰/۰±۵۸/۵۷
خاکستر	۱۱/۰±۵۶/۴۵

۲.۳. شاخص‌های شیمیایی مولد فساد

مقادیر دو شاخص شیمیایی مولد فساد عبارتند از عدد پراکسید (PV) و مجموع ترکیبات ازته فرار (TVB-N) برای بیوسیلاژ تهیه‌شده از ضایعات در جدول ۳ ارائه شده است. عدد پراکسید در محصول تولیدشده ۲/۶۱ میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم اندازه‌گیری شد. مجموع ترکیبات ازته فرار کل برای بیوسیلاژ ۴۳/۹۷ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم محاسبه گردید.

جدول ۳- شاخص‌های شیمیایی مولد فساد در بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات ماهی قزل‌آلا

شاخص شیمیایی مولد فساد	مقدار
PV (meq/kg lipid)	۲/۰±۶۱/۱۶
TVB-N (mg/100g)	۴۳/۰±۹۷/۵۷

۳.۳. شمارش میکروارگانیسم‌های موجود در بیوسیلاژ

در جدول ۴ تعداد برخی از میکروارگانیسم‌های شاخص در بیوسیلاژ ارائه شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، تعداد کل باکتری‌ها، کلی‌فرم‌ها، کلی‌فرم مدفوعی

و کپک و مخمر در محصول تولیدشده به ترتیب ۸/۷۸، ۳/۷۲، ۱/۱۸ و ۳/۲۳ لگاریتم تعداد بر گرم بود. مطابق نتایج، محصول تولیدشده فاقد اشرشیاکلی است.

جدول ۴- شمارش میکروارگانیسم‌ها در بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات قزل‌آلا

میکروارگانیسم‌ها	تعداد (لگاریتم تعداد بر گرم)
کل باکتری‌ها	۸/۰±۷۸/۵
کلی‌فرم	۳/۰±۷۲/۱
کلی فرم مدفوعی غیر اشرشیا کلی	۱/۰±۱۸/۰۴
اشرشیاکلی	۰
کپک و مخمر	۳/۰±۲۳/۰۶

۴.۳. مقدار مواد معدنی در بیوسیلاژ

جدول ۵ مقادیر برخی مواد معدنی را در بیوسیلاژ نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود، آهن بیشترین سهم (۲۵۱/۳۳ میلی‌گرم در کیلوگرم) را در بین فلزات به خود اختصاص داد.

جدول ۵- مقادیر مواد معدنی در بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات قزل‌آلا

فلزات	مقدار (میلی‌گرم در کیلوگرم)
منگنز (Mn)	۱۰/۰±۶۴/۲۴
مس (Cu)	۱۳/۰±۷۲/۱۶
آهن (Fe)	۲۵۱/۹±۳۳/۰۷
روی (Zn)	۱۱۸/۱±۶۵/۶۷

۴. بحث و نتیجه‌گیری کلی

نتایج ترکیب بیوشیمیایی محصول نشان داد که بیوسیلاژ حاصل از ضایعات قزل‌آلا نسبت به بیوسیلاژ حاصل از ضایعات مرغ (Safari *et al.*, 2020)، پروتئین (۵۲/۲۷ درصد در مقابل ۵۹/۰۹ درصد) و چربی (۸/۳ درصد در مقابل ۲۱/۳ درصد) کمتر، اما خاکستر (۱۱/۵۶ درصد در مقابل ۶/۱۷ درصد) بیشتری دارد. اما مقادیر رطوبت در هر دو محصول تقریبا مشابه است. این تفاوت در مقادیر ترکیب بیوشیمیایی به عوامل مختلفی مانند نوع سوبسترا، شرایط تولید و ... بستگی دارد. از آنجا که هدف اصلی از تولید بیوسیلاژ، استفاده از این محصول در جیره غذایی غذایی آبزیان، دام، طیور به جای پودر ماهی، پودر گوشت و پودر خون است، ترکیب شیمایی محصول تولیدشده در این تحقیق با پودرهای مذکور مقایسه شد. تجزیه ترکیب شیمایی پودر گوشت در تحقیق Safari و همکاران (۲۰۲۰) نشان داد که این محصول حدود ۵۶ درصد پروتئین، ۲۱ درصد چربی و ۱۴ درصد خاکستر دارد. طبق این نتایج می‌توان گفت بیوسیلاژ تولیدشده در تحقیق حاضر از پودر گوشت پروتئین، چربی و خاکستر کمتری دارد. اما مقدار رطوبت در بیوسیلاژ ضایعات قزل‌آلا و پودر گوشت تقریبا یکسان گزارش شده است. مقایسه ترکیب بیوشیمیایی محصول تولیدشده در پژوهش حاضر با پودر ماهی کیلکا (Safari *et al.*, 2020) نشان داد مقادیر پروتئین (۵۶/۲۵ درصد در مقابل ۵۲/۲۷

درصد) و چربی (۲۲/۳۱ درصد در برابر ۸/۳ درصد) در پودر ماهی مذکور بیشتر از بیوسیلاژ ضایعات قزل‌آلا است. ضمن اینکه دو محصول میزان خاکستر برابری ارائه کردند (حدود ۱۱/۵ درصد). مقایسه ترکیب شیمیایی پودر خون (Safari *et al*., 2020) با بیوسیلاژ تولیدشده در تحقیق حاضر نشان داد که پودر خون حاوی مقادیر بسیار بالاتری از پروتئین (۸۳/۳۳ درصد) می‌باشد اما مقادیر چربی (۱/۷۵ درصد در مقابل ۸/۳ درصد) و خاکستر (۵/۰۶ درصد در مقابل ۱۱/۵۶ درصد) در این محصول از بیوسیلاژ ضایعات قزل‌آلا کمتر است. مقادیر پروتئین و چربی در پودر ماهی آنچوی در ماه نوامبر، دسامبر و ژانویه به ترتیب از ۷۴ تا ۷۶ درصد (پروتئین) و ۸ تا ۹/۱۵ درصد (چربی) متغیر بود (Turan *et al*., 2007). اگرچه این محصول از نظر مقادیر چربی با بیوسیلاژ ضایعات قزل‌آلا مشابه اما محتوی پروتئین بیشتری بود. پودر ماهی تولیدشده از منبع UFB[1] دارای ۶۷/۵ درصد پروتئین، ۸ درصد چربی و ۲۰/۳ درصد خاکستر بود. این محصول در مقایسه با بیوسیلاژ قزل‌آلا (تحقیق پیش‌رو) پروتئین و خاکستر بیشتری داشت. ضمن اینکه مقادیر چربی در دو محصول تقریبا یکسان گزارش شد (Ido and Kaneta, 2020). در تحقیق مذکور میزان پروتئین، چربی و خاکستر پودر ماهی Anchoveta به ترتیب ۷۱/۳، ۹/۸ و ۱۶/۴ درصد بیان شد که این مقادیر بیشتر از پروتئین، چربی و خاکستر در بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات قزل آلا است. سیلاژ اسیدی تولیدشده از آلایش ماهی در تحقیق Haider و همکاران (۲۰۱۶) دارای ۳۲/۱۷ درصد پروتئین، ۹/۵۶ درصد چربی، ۶/۵ درصد خاکستر و ۵/۱۶ درصد رطوبت بود. مقایسه بیوسیلاژ تولیدشده در پژوهش حاضر با سیلاژ اسیدی تحقیق مذکور نشان می‌دهد که بیوسیلاژ قزل‌آلا دارای مقادیر پروتئین، رطوبت و خاکستر بیشتری است. ضمن اینکه مقادیر چربی در بیوسیلاژ قزل‌آلا مقداری کمتر از سیلاژ اسیدی است (۸/۳ در مقابل ۹/۵۶ درصد). پودر ماهی تولید شده در تحقیق Murthy و همکاران (۲۰۱۳)، دارای ۶۳/۸۸ درصد پروتئین، ۴/۱۱ درصد چربی و ۲۱/۶۹ درصد خاکستر بود. مقایسه این محصول با بیوسیلاژ قزل‌آلا نشان داد که پودر ماهی تولیدشده در تحقیق مذکور پروتئین و خاکستر بیشتر، اما چربی کمتری دارد. تجزیه ترکیب بیوشیمیایی پودر اسکوئید نشان داد که این محصول ۶۶/۸۸ درصد پروتئین، ۳/۱۵ درصد چربی و ۲۰/۹۶ درصد هم خاکستر دارد (Murthy *et al*., 2013). بیوسیلاژ تولیدشده در تحقیق حاضر حاوی مقادیر کمتری از پروتئین و خاکستر نسبت به پودر اسکوئید بود اما چربی بیشتری داشت.

در تحقیق حاضر بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات قزل-آلا از نظر شاخص‌های شیمیایی مولد فساد نیز ارزیابی شد. چرا که این دو عامل بر کیفیت محصول و بازدهی آن در فرایند رشد جاندار اثرگذار هستند. مقایسه نتایج عدد پراکسید و مجموع ترکیبات نیتروژن فرار در محصول تولیدشده در تحقیق حاضر و بیوسیلاژ حاصل از ضایعات مرغ نشان داد که بیوسیلاژ قزل‌آلا دارای مقادیر کمتری از عدد پراکسید (۲/۶۱ در مقابل ۴/۴۶ میلی‌اکی‌والان بر گرم) و مجموع ترکیبات نیتروژن فرار (۴۳/۹۷ در مقابل ۴۶/۵۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم) است که این عامل نشان-دهنده کیفیت و قابلیت ماندگاری بالاتر است. یکی از مزایایی که برای بیوسیلاژ در مقابل پودر ماهی، پودر گوشت و خون ارائه می‌شود، ماندگاری بیشتر محصول است. در خط تولید پودر ماهی و گوشت به لحاظ عدم جداسازی مطلوب روغن از پودر، شاخص PV در زمان انبارداری، به سرعت افزایش یافته و باعث فساد محصول می‌گردد. همین شرایط در خصوص پودر خون نیز صادق بوده با این تفاوت که فسادی که در این محصول رخ می‌دهد ناشی از تجزیه پروتئین و افزایش شاخص TVB-N است و بر ماندگاری محصول تاثیر منفی می‌گذارد. مقایسه نتایج تحقیق حاضر و مطالعه Safari و همکاران (۲۰۲۰) نیز گویایی چنین امری است. میزان مجموع ترکیبات نیتروژن فرار برای پودر گوشت، پودر خون و پودر ماهی کیلکا به ترتیب ۱۲۳/۳۶، ۱۳۶/۴۶ و ۵۶/۳۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم گزارش شد که بسیار بیشتر از این شاخص در بیوسیلاژ حاصل از ضایعات قزل‌آلا است.

[1] From Urban Fisheries

همچنین عدد پراکسید در پودر گوشت و پودر ماهی کیلکا به ترتیب ۱۲/۳۶ و ۵/۴۵ میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم گزارش شده است (Safari *et al*., 2020) که تقریبا ۶ و ۲ برابر این مقدار در بیوسیلاژ قزل‌آلا است. در پژوهش Ido و Kanet (۲۰۲۰) مجموع ترکیبات نیتروژن فرار برای پودر ماهی تهیه‌شده از منبع UFB، ۱۱۲/۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم گزارش شد که رقم بالایی است و زمان ماندگاری محصول را کاهش می‌دهد. همچنین در تحقیق مذکور این شاخص برای پودر ماهی Anchoveta، ۹۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم بیان شد. عدد پراکسید در پودر ماهی و پودر اسکوئید تولیدشده در تحقیق Murthy و همکاران (۲۰۱۳) به ترتیب ۱۱/۳۱ و ۱۴/۱۱ میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم اندازه‌گیری شد. همچنین مجموع ترکیبات نیتروژن فرار (TVB-N) در دو پودر مذکور به ترتیب ۱۹۵/۶۶ و ۴۱۴/۸۶ میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم گزارش گردید. عدد پراکسید در این دو پودر حدودا ۶ برابر این مقدار در بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات قزل‌آلا بود. این نتایج باز هم نشان می‌دهد که بیوسیلاژ ماندگاری بسیار بیشتری از پودر ماهی و اسکوئید دارد.

یک دسته دیگر از شاخص‌هایی که در بیوسیلاژ تولیدشده از آلایش قزل‌الا مورد بررسی قرار گرفتند، شاخص های میکروبی بودند. شمارش کلی باکتری‌ها در محصول تولیدشده در تحقیق حاضر کمتر از بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات مرغ (Safari *et al*., 2020) بود (۸/۷۸ در مقابل ۹/۵۴ لگاریتم تعداد بر گرم). تعداد کلی‌فرم‌ها در بیوسیلاژ ضایعات قزل‌آلا بیشتر از بیوسیلاژ حاصل از ضایعات مرغ گزارش شد (۳/۷۲ در مقابل کمتر از یک لگاریتم تعداد بر گرم). همین نتیجه در مورد شمارش کپک‌ها و مخمرها نیز صادق بود. به گونه‌ای که تعداد این میکروارگانیسم‌ها در بیوسیلاژ حاصل از ضایعات قزل‌آلا بیشتر از بیوسیلاژ حاصل از ضایعات مرغ بود (۳/۲۳ در مقابل ۲/۱۵ لگاریتم تعداد بر گرم). شمارش کلی‌فرم مدفوعی در بیوسیلاژ حاصل از ضایعات قزل‌الا بیشتر از یک لگاریتم تعداد بر گرم بود (۱/۱۸) اما این تعداد در بیوسیلاژ حاصل از آلایش مرغ کمتر از یک لگاریتم تعداد بر گرم گزارش گردید. همچنین بیوسیلاژ تولیدشده در تحقیق حاضر فاقد اشرشیاکلی (صفر) بود، اما بیوسیلاژ حاصل از ضایعات مرغ کمتر از یک لگاریتم تعداد بر گرم اشرشیاکلی داشت (Safari *et al*., 2020). مقایسه شاخص های میکروبی در محصول تولیدشده در تحقیق حاضر با پودر ماهی کیلکا نشان داد که شمارش باکتری‌های کل در بیوسیلاژ از پودر ماهی بیشتر است (۸/۷۸ در برابر ۷/۲۵ لگاریتم تعداد بر گرم). اما تعداد کپک و مخمر (۵/۸۶ لگاریتم تعداد در گرم)، کلی‌فرم مدفوعی (۲/۲۱ لگاریتم تعداد بر گرم)، اشرشیاکلی (کمتر از یک لگاریتم تعداد بر گرم) در پودر ماهی کیلکا (Safari *et al*., 2020) از بیوسیلاژ بیشتر بود. شمارش کپک و مخمر، اشرشیاکلی و کلی‌فرم مدفوعی در پودر گوشت و پودر خون به مراتب بیشتر از بیوسیلاژ تولیدشده در تحقیق حاضر بود. برای مثال شمارش کپک و مخمر در پودر گوشت و پودر خون تقریبا برابر و معادل ۵/۴۸ لگاریتم تعداد بر گرم بود (Safari *et al*., 2020) اما این تعداد برای بیوسیلاژ ۳/۲۳ لگاریتم تعداد بر گرم اندزاه‌گیری شد. تعداد کل باکتری‌ها (۸/۷۸ در برابر ۷/۸۵ لگاریتم تعداد بر گرم) و کلی‌فرم (۳/۷۲ در برابر ۳/۲۵ لگاریتم تعداد بر گرم) در بیوسیلاژ بیشتر از پودر گوشت ثبت شد (Safari *et al*., 2020).

از آنجا که عناصر موجود در خوراک دام، طیور و آبزیان غیرمستقیم وارد چرخه غذایی انسان می‌شوند، اندازه‌گیری غلظت این فلزات در بیوسیلاژ ضروری به نظر می‌رسد. طی پژوهشی، غلظت مس در پودر ماهی و پودر سویا (به عنوان غذای ماهی) یکسان و ۰/۲ میلی‌گرم در کیلوگرم اندازه‌گیری شد (Adeniji and Okedeyi, 2017). اما در مطالعه حاضر غلظت مس (Cu) در بیوسیلاژ بسیار بیشتر از پودر ماهی و پودر سویای مورد بررسی در تحقیق مذکور اندازه‌گیری شد (۱۳/۷۲ میلی‌گرم در کیلوگرم). در پژوهش Adeniji و Okedeyi (۲۰۱۷) غلظت روی (Zn) در پودر ماهی و پودر سویا به ترتیب ۱/۷ و ۰/۹ میلی‌گرم در کیلوگرم محاسبه شد. مقایسه غلظت این عنصر در بیوسیلاژ قزل‌آلا و دو محصول مذکور نشان می‌دهد که غلظت روی (Zn) در بیوسیلاژ تقریبا ۹۰ تا ۱۰۰ برابر این غلظت در پودر ماهی

و پودر سویا است (۱۱۸/۶۵ میلی‌گرم در کیلوگرم). میانگین غلظت مس در پودر ماهی و پودر اسکوئید به ترتیب ۷/۳۱ و ۵۰/۷۶ میلی گرم/کیلوگرم گزارش شده است (Murthy *et al*., 2013). مقایسه این نتایج با یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد که غلظت مس در پودر ماهی کمتر از بیوسیلاژ تولید شده درتحقیق حاضر است، اما غلظت این فلز در پودر اسکوئید بیش از ۳/۵ برابر در بیوسیلاژ قزل‌الا اندازه‌گیری شد.

بنابر نتایج تحقیق حاضر و مقایسه این یافته‌ها با سایر پژوهش‌ها می‌توان ادعا کرد که بیوسیلاژ تولیدشده در تحقیق حاضر از نظر ترکیب شیمیایی، برخی عناصر مغذی، شاخص‌های بیوشیمیایی مولد فساد و شاخص‌های میکروبی تقریبا معادل (و حتی مطلوب‌تر از) سایر مواد مصرفی جهت تغذیه دام، طیور و آبزیان است و می‌توان این محصول را در صنعت تغذیه آبزیان به کار برد.

تقدیر و تشکر

پژوهشگران حاضر بر خود لازم می‌دانند از همکاران بخش‌های تخصصی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر تشکر و قدردانی نمایند.

۵. منابع

References

AOAC., 2005. Official method of Analysis. 17th Edition, Association of Officiating Analytical Chemists, Washington DC.

Adeniji, C. A., Okedeyi, O. O., 2017. Preliminary assessment of heavy metal concentrations in selected fish feed ingredients in Nigeria. *Journal of Fisheries & Livestock Production* 5(1), 1-4.

Egan, H., Krik, R. S., Sawyer, R., 1997. Pearson's Chemical Analysis of Foods [Book]. Longman Group Ltd, - 9 (ed): pp. 609-634.

Güllü, K., Acar, Ü., Tezel, R., Yozukmaz, A., 2014. Replacement of fish meal with fish processing by-product silage in diets for the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Pakistan Journal of Zoology 46*(6), 697-1703.

Goosen, N. J., de Wet, L. F., Görgens, J. F., Jacobs, K., Bruyn, A. 2014. Fish silage oil from rainbow trout processing waste as alternative to conventional fish oil in formulated diets for Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Animal Feed Science and Technology 188*, 74-84.

Hernández, C., Osuna, L., Hernandez, A.B., 2014. Effect of fishmeal replacement by poultry by-product meal on growth performance, proximate composition, digestive enzyme activity, haematological parameters and gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture Nutrition 42* (1), 1-12.

Haider, M. S., Ashraf, M., Azmat, H., Khalique, A., Javid, A., Atique, U., Akram, S., 2016. Nutritive evaluation of fish acid silage in *Labeo rohita* fingerlings feed. *Journal of Applied Animal Research 44*(1), 158-164.

Iranian National Standard No. 745.1970. Meat and its products-Moisture measurement. Iran Institute of Standards and Industrial Research.

Iranian National Standard No. 924. 1993. Measurement of total protein in meat and its products. Iran Institute of Standards and Industrial Research.

Iranian National Standard No. 744. 2002. Meat and its products - Determination of total ash - Test method. Iran Institute of Standards and Industrial Research.

Iranian National Standard No. 742. 2003. Meat and its products - Determination of total fat - Test method. Iran Institute of Standards and Industrial Research.

Ido, A., Kaneta, M,. 2020. Fish oil and fish meal production from urban fisheries biomass in Japan. *Sustainability*, *12*(8), 3345.

Jeon, Y. J., Kamil, J. Y., Shahidi, F., 2002. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *Journal of agricultural and food chemistry*, *50*(18), 5167-5178.

Kamei, M., Sahu, B., Raman, S., Nanda, S., Choudhury, D., Dorothy, M. S,. 2018. Use of Fish Silage Based Blended Protein Source for Replacement of Fish Meal in Thai-Pangas Diet. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 7*(10), 2949-2961.

Moopam, R. 1999. Manual of oceanographic observations and pollutant analysis methods. *ROPME. Kuwait 1*(20), 122-133.

Murthy, L. N., Mohan, C. O., Ravishankar, C. N., Badonia, R., 2013. Biochemical quality and heavy metal content of fish meal and squid meal produced in Veraval, Gujarat. ICAR.

Najim, S. M., Al-Noor, S. S., Jasim, B. M., 2014. Effects of fish meal replacement with fish biosilage on some haematological and biochemical parameters in common carp *Cyprinus carpio* fingerlings. *International Journal of Fisheries and Aquaculture 4*(3), 112-116.

Palkar, N. D., Koli, J. M., Patange, S. B., Sharangdhar, S. T., Sadavarte, R. K., Sonavane, A. E., 2017. Comparative study of fish silage prepared from fish market waste by using different techniques. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 6*(12), 3844-3858.

Palkar, N. D., Koli, J. M., Gund, D. P., Patange, S. B., Shrangdher, S. T., Sadawarte, R. K., Akhade, A. R., 2018. Preparation of co-dried fish silage by using fish market waste and its comparative study. *International journal of pure and applied bioscience 6*(2), 1567-1577.

Ramírez Ramírez, J. C., Ibarra Espain, J. I., Gutiérrez Leyva, R., Ulloa, J. A., Rosas Ulloa, P. 2016. Use of biological fish silage in broilers feed: effect on growth performance and meat quality. *Journal of Animal and Plant Sciences (JAPS) 27*(3), 4293-4304.

Reyhani Poul, S., Jafarpour, A., Safari, R., 2017. Functional and antioxidant properties of fish protein hydrolysate from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) viscera by enzymatic method. *Fisheries Science and Technology Journal* 5 (4), 13-28 (In Persian).

Suvanich, V., Jahncke, M. L., Marshall, D. L., 2000. Changes in selected chemical quality characteristics of channel catfish frame mince during chill and frozen storage. *Journal of food science 65*(1), 24-29.

Standard No. 1 – 8923. 2007. Microbiology of Food and Animal Feed - Preparation of Primary Suspension and Decimal Dilutions for Microbiological Tests Part One: General Regulations for Preparation of Primary Suspension and Decimal Dilutions, Iranian Institute of Standards and Industrial Research.

Sallam, K. I., 2007. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food control 18*(5), 566-575.

Standard No. 3-10899., 2012. Microbiology of food and animal feed - Mold and yeast counting method, Iranian Institute of Standards and Industrial Research.

Safari, R., Motamedzadegan, A., Ovissipour, M., Regenstein, J. M., Gildberg, A., Rasco, B., 2012. Use of hydrolysates from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. *Food and Bioprocess Technology 5*(1), 73-79.

Safari, R., Yaghoubzadeh, Z., Bankehsaz, Z., Reyhani Poul, S., 2020 Production of biosilage from chicken waste. Research Project, Caspian Sea Ecology Research Institute.

Shabani, A., Boldaji, F., Dastar, B., Ghoorchi, T., Zerehdaran, S., Ashayerizadeh, A., 2021. Evaluation of increasing concentrations of fish waste silage in diets on growth performance, gastrointestinal microbial population, and intestinal morphology of broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology 275*, 114874.

Turan, H., Kaya, Y., Erkoyuncu, İ., 2007. Protein and lipid content and fatty acid composition of anchovy meal produced in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 31*(2), 113-117.