

University of Guilan

University of Guilan with collaboration of Iranian
Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 10, No. 2, 2024, pages: 65-78
DOI: 10.22124/janb.2024.28059.1254



RESEARCH PAPER

OPEN ACCESS

FTIR: A novel method for identifying fish gut contents

Abolfazl Aminimehr, Mohammad Amini Chermahini*, Laleh Moosavi Dehmoordi

Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Behbahan Khatam Alanbia University of
Technology, Behbahan, Khuzestan, Iran

Received 01 March 2024

Revised 11 June 2024

Accepted 13 June 2024

KEYWORDS ABSTRACT

FTIR

Tilapia

Feces

Bloodworm

Gammarus

Wheat

Introduction: If the composition of ingested food changes along the digestive tract in such a way that fish feces reflect the initial composition of the consumed food, there would be no need to sacrifice fish to identify the contents of their gut. Instead, one could determine the fish's diet in nature or fish farms simply by analyzing their feces. The aim of this study was to investigate different foods and their composition alterations along the digestive tract using FTIR spectroscopy for the first time, to evaluate the possibility of determining an index to identify the consumed food using the resulting feces.

Materials and methods: Five different types of food were used to feed tilapia: common carp-formulated feed, Gammarus, bloodworm, a combination of bloodworm-Gammarus (1:1), and wheat. Ten fish were placed in each tank. Feeding was conducted for 10 days, twice daily. After 7 hours of the last feeding, the fish were euthanized using clove powder. The feces were collected from the end of the intestine, preserved in liquid nitrogen, then freeze-dried and homogenized. The samples were analyzed using the ATR-FTIR.

Results and discussion: By comparing the obtained wavelengths, specific patterns were identified between the ingested food and the resulting feces. The ratio of fats in the feed and the resulting feces showed the least change, making fats as one of the groups that can be used to distinguish samples. Based on the results, foods of animal- or plant-origin, i.e., bloodworm, Gammarus, and wheat, and the feces resulting from them, can be easily distinguished from each other and from the formulated feed. However, the formulated feed, which is a mixture of various plant and animal-derived materials, and its resulting feces were not as distinguishable.

Conclusion: According to the results, it seems that the FTIR will be practical and reliable method to identify foods used by fish in aquaculture or nature using fish feces. Probably, in the latter case, it will be easier to identify,

because in nature, more uniform food items (plant or animal sources) are usually consumed.

*Corresponding author: mamini57@yahoo.com; m.amini@bkatu.ac.ir





"مقاله پژوهشی"

FTIR، روشی نوین برای شناسایی محتویات لوله گوارش ماهی

ابوالفضل امینی مهر، محمد امینی چرمهینی*، لاله موسوی دهموردی
گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم الأنبياء، بهبهان، خوزستان

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۴

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۳/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۱

کلمات کلیدی

FTIR
ماهی تیلاپیا
مدفوع
کرم خونی
گاماروس
گندم

چکیده

اگر ترکیب خوراک مصرف شده در طول امتداد گوارش طوری تغییر کند که مدفوع ماهی نشاندهنده ترکیب اولیه خوراک مصرف شده باشد، برای شناسایی محتویات لوله گوارش نیازی به کشتن ماهی نیست و فقط با بررسی مدفوع ماهی می‌توان جیره ماهی را در طبیعت یا محیط‌های پرورشی تعیین کرد. برای این منظور، پنج نوع غذای متفاوت شامل غذای کنسانتره کپور معمولی، گاماروس، کرم خونی، ترکیب گاماروس-کرم خونی (به نسبت مساوی) و گندم برای تغذیه تیلاپیا استفاده شد. در هر مخزن ۱۰ عدد ماهی قرار گرفت. غذاهای به مدت ۱۰ روز و دو مرتبه در روز انجام شد. ۷ ساعت پس از آخرین غذادهی، ماهیان با استفاده از پودر گل میخک آسان‌کشی و مدفوع ماهیان از قسمت انتهایی روده جمع‌آوری شد. سپس قبل از انجماد خشک و همگن کردن، در نیتروژن مایع نگهداری شد. نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ATR-FTIR سنجش شدند. با مقایسه طول موج‌های حاصل از این سنجش، بین غذای خورده شده و مدفوع حاصل از آن الگوهای مشخصی تشخیص داده شد. به دلیل اینکه نسبت بین چربی‌ها و اسیدهای چرب بین خوراک و مدفوع حاصل از آن کمترین تغییر را دارد، گروهی هستند که می‌توانند برای تفکیک نمونه‌ها استفاده شوند. بر اساس نتایج می‌توان بیان کرد که غذاهای با منشأ حیوانی یا گیاهی یعنی کرم خونی، گاماروس و گندم و مدفوع حاصل از آنها به راحتی از همدیگر و از غذای کنسانتره قابل تفکیک هستند، اما غذای کنسانتره که ترکیبی از مواد مختلف با منشأ گیاهی و حیوانی است و مدفوع حاصل از آن چندان قابل تفکیک نبود.

مقدمه

طیف سنجی فوریه تبدیل مادون قرمز (Fourier Transform Infrared Spectrometer) به عنوان روشی سریع، پرقدرت و توسعه یافته را می‌توان برای شناسایی مولکول‌ها و به خصوص گروه عاملی مولکول‌ها استفاده کرد.

اساس سنجش FTIR در بررسی پرتوهای مادون قرمز جذب شده توسط نمونه مورد سنجش است (Cebi et al. 2023). با توجه به قابلیت آن به عنوان یک فناوری شناسایی، طیف سنجی FTIR همراه با فنون شیمی‌سنجی، یک روش تحلیلی قابل اعتماد برای شناسایی انواع اجزای متشکله ترکیبات غذایی مختلف است (Rohman et al. 2011). طیف‌سنجی FTIR سریع و غیرمخرب بوده و آماده‌سازی نمونه برای سنجش آسان است (Rohman et al. 2014). در این روش فقط چندین میلی گرم مواد نیاز است (Wang et al. 2010). سنجش FTIR یکی از سنجش‌های پرکاربرد و در عین حال به نسبت ارزان قیمت در حوزه شناسایی ترکیبات و پیوندهای موجود در مواد آلی و معدنی است. Altuntas و همکاران (۲۰۱۷) روش‌های مختلف مبتنی بر DNA و طیف‌سنجی را برای تشخیص گوشت گونه‌های مختلف بررسی کرده‌اند. Giorgini و همکاران (۲۰۱۸) از FTIR به عنوان مکمل روش بافت‌شناسی سنتی برای بررسی ساختار لوله گوارش قزل آلا استفاده کردند. آنها بیان می‌کنند که بافت‌شناسی زمان‌بر بوده و اطلاعات جامعی در مورد ساختار مولکول‌های زیستی نمونه نمی‌دهد، در حالی که FTIR یک روش سریع است که در عین حال به ماده خاصی برای نشان‌گذاری مولکول‌های مورد بررسی (مانند روش‌های ELISA یا RIA) نیاز ندارد. هر طیف FTIR می‌تواند یک اثر انگشت منحصر به فرد را بیان کند، که اجازه می‌دهد تا از طیف‌سنجی FTIR در طبقه‌بندی نمونه‌های مختلف یا شناسایی نمونه‌های ناشناخته استفاده شود (de Luca et al. 2011). این فرض که هر گونه دارای یک ترکیب شیمیایی منحصر به فرد است، امکان استفاده سودمند از طیف‌سنجی FTIR برای اهداف طبقه‌بندی را فراهم می‌کند (Ong et al. 2020).

آگاهی از ترکیب رژیم غذایی در تحقیقات بوم‌شناسی آبزیان اهمیت بسیار دارد. ترکیب رژیم غذایی هم نشان می‌دهد که آبزیان از کجا غذای خود را تأمین می‌کنند، و هم اینکه نشان‌دهنده رقبای غذایی بالقوه و روابط شکارچی-شکار است. در نتیجه، به درک ساختار اکوسیستم و پویایی جمعیت کمک می‌کنند. به همین دلیل، مقالات متعددی در مورد رژیم غذایی وجود دارد که بسیاری از آنها بر اساس تجزیه و تحلیل محتویات معده هستند (Ahlbeck et al. 2012). از طرف دیگر، با توجه به اهمیت تغذیه در رشد و نمو آبزیان پرورشی، تهیه خوراک مطلوب و به صرفه از نظر اقتصادی، برای پرورش‌دهندگان به یکی از مسائل اصلی فرآیند پرورش تبدیل شده است (Sunde et al. 2004). از این رو، روش‌های مختلفی برای بررسی رژیم غذایی ماهی‌ها ارائه شده است که به طور کلی در این روش‌ها اقلام غذایی داخل لوله گوارش شناسایی شده و بر اساس تعداد، توده زنده یا فراوانی گزارش می‌شوند (Ahlbeck et al. 2012). همه این روش‌ها مستلزم کشتن ماهی، خارج کردن محتویات و بررسی آن زیر میکروسکوپ است. کشتن ماهی‌های حفاظت شده و در معرض خطر انقراض، و همچنین کشتن ماهیان پرورشی با ارزش می‌تواند چالش برانگیز باشد.

در مطالعات قبلی نشان داده شده است که نشانگرهای بیوشیمیایی مانند ایزوتوپ‌های پایدار توده کربن و نیتروژن، ترکیب اسیدهای چرب و ترکیب عناصر معدنی/کمیاب به طور مؤثر مواد آلی حاصل از کشاورزی را از دیگر منابع تفکیک می‌کند. نشانگر(هایی) که به خوبی در مواد مدفوع نسبت به خوراک حفظ می‌شود، می‌تواند امکان دهد که از مدفوع برای ردیابی خوراک استفاده شود. در واقع، اگر تغییرات در ترکیب نشانگر بین نمونه‌های خوراک و مدفوع قابل پیش‌بینی باشد، می‌توان ترکیب خوراک را تنها بر اساس علائم نشانگر در مدفوع ماهی استنباط کرد. بنابراین، درک اینکه چگونه این نشانگرها در مدفوع ماهی به خوبی حفظ شده و قابل پیش‌بینی هستند، به انتخاب آن نشانگرها و تعیین مناسب‌ترین آنها برای کاربردهای خاص کمک می‌کند (Elvines et al. 2023).

آزمایش برای سازگاری با شرایط محیطی نگهداری و با غذای کنسانتره تغذیه شدند. سپس ماهیان بر اساس طرح کاملاً تصادفی در ۵ تیمار و ۳ تکرار به ازای هر تیمار، در ۱۵ عدد مخزن فایبرگلاس ۱۲۰ لیتری مجهز به هوادهی توزیع شد.

برای مشخص کردن قدرت تفکیک روش مورد استفاده بین غذاهای مختلف با منشأ حیوانی و گیاهی و یا ترکیب آنها، پنج نوع غذای متفاوت استفاده شد. ماهیان گروه شاهد با غذای کنسانتره کپور معمولی (تجاری)، تیمار دوم با گاماروس، تیمار سوم با کرم خونی، تیمار چهارم با ترکیب گاماروس-کرم خونی به نسبت مساوی و تیمار پنجم با گندم تغذیه شدند. به ازای هر مخزن ۱۲۰ لیتری، ۱۰ عدد ماهی در نظر گرفته شد. طول دوره پرورش ۱۰ روز بود. در طی دوره، ماهیان به میزان دو وعده در روز غذادهی شد. حدود ۷ ساعت پس از آخرین غذادهی، ماهیان با استفاده از پودر گل میخک آسان‌کشی و بلافاصله مدفوع ماهیان از قسمت انتهایی روده جمع‌آوری و قبل از انجماد خشک و همگن کردن، برای ارسال برای سنجش FTIR، در نیتروژن مایع (مخزن ازت) نگهداری شد (Elvines et al. 2023). نمونه‌های مدفوع جمع‌آوری شده و همگن شده، به تفکیک تیمارها و تکرارها با استفاده از دستگاه FTIR (Tensor II, Bruker, Germany) سنجش شد. همچنین، جیره‌های مورد استفاده برای تغذیه ماهیان با همین روش سنجش شد.

طول موج نمودارهای طیف‌سنجی FTIR به صورت بصری مقایسه شد. دسته‌بندی مؤلفه‌های اصلی با استفاده از آزمون تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) توسط نرم‌افزار MATLAB بررسی شد.

نتایج

درجه حرارت آب در طی دوره آزمایش 25 ± 0.5 درجه سانتی‌گراد، pH 8 ± 0.3 و شوری 2 ± 0.2 گرم در لیتر اندازه‌گیری شد.

نتایج حاصل از طیف‌سنجی FTIR

ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) یکی از ماهیانی است که در سال‌های اخیر به طور گسترده با استقبال پرورش دهندگان ماهی مواجه شده است. محبوبیت ماهی تیلاپیای نیل به دلیل مقبولیت آن در بازار، سرعت رشد سریع، مقاومت در برابر بیماری‌ها و توانایی رشد با طیف وسیعی از رژیم‌های غذایی است (El-Sayed, 2020)، بنابراین، به عنوان یک ماهی آزمایشگاهی، انواع غذاهای با منشأ حیوانی و گیاهی را مصرف می‌کند. استفاده از برخی غذاهای ارزان‌قیمت مانند ضایعات کشتارگاهی ممکن است از نظر بهداشتی مورد تأیید سازمان‌های مسئول (مانند اداره دامپزشکی) نباشد. از طرفی، اگر بتوان فقط با استفاده از مدفوع ماهی نوع غذای مصرف شده را تعیین کرد، نیاز به کشتن ماهی نیست و در طبیعت برای تعیین جیره طبیعی آبزیان فقط نمونه‌گیری از مدفوع کفایت خواهد کرد. بنابراین، هدف پژوهش حاضر این بود که برای اولین بار با استفاده از روش طیف‌سنجی FTIR غذاهای مختلف و تغییر ترکیب آن در لوله گوارش بررسی شده و امکان تعیین شاخصی برای شناسایی غذای مصرف‌شده با استفاده از ترکیب مدفوع حاصل از آن در ماهی تیلاپیای ارزیابی شود.

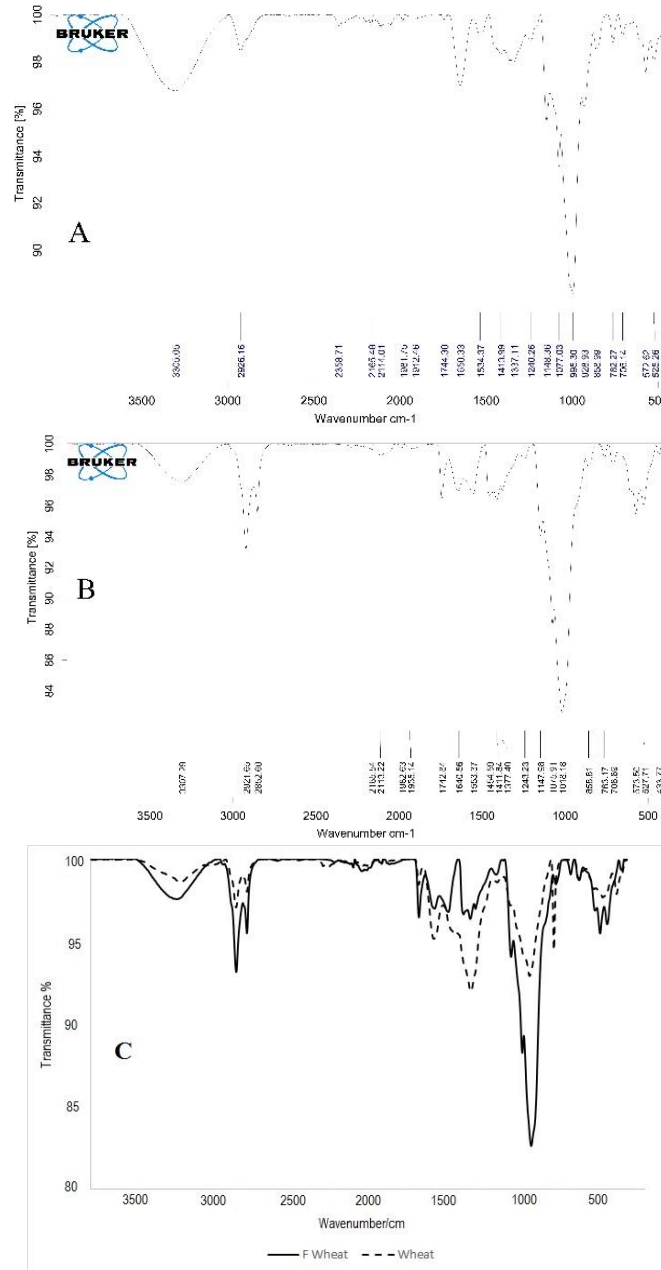
مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در سال ۱۴۰۲ در آزمایشگاه شیلات و تکثیر آبزیان گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی واقع در دانشگاه صنعتی خاتم الانبیای بهبهان و سنجش نمونه‌ها در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه شیراز انجام شد. فراسنجه‌های اکسیژن، دما، و pH آب به طور روزانه با استفاده از دستگاه چندفراسنجه‌ای قابل حمل آب (مدل PCD650) اندازه‌گیری و ثبت شد.

ابتدا مخازن پرورش ماهی ضدعفونی و شست و شو داده شد. سپس مخازن پرورش آبگیری، و دستگاه هوادهی کارگاه راه‌اندازی شد. یک هفته پس از آبگیری مخازن و هوادهی و کلرزدایی، تعداد ۱۵۰ قطعه بچه ماهی تیلاپیای نیل با میانگین وزن تقریبی ۳۰-۲۰ گرم از مراکز خصوصی پرورش ماهی واقع در استان خوزستان خریداری و به کارگاه پرورش آبزیان منتقل شد. ماهیان به مدت یک هفته قبل از شروع

مقایسه راحت تر طیف هر غذا و مدفوع حاصل از آن دو طیف در یک نمودار نیز نشان داده شده است.

طیف FTIR به دست آمده از نمونه‌های غذا (گندم، کرم خونی، گاماروس و غذای کنسانتره) و مدفوع حاصل از ۵ تیمار مختلف در شکل‌های ۱ تا ۶ ارائه شده است. برای

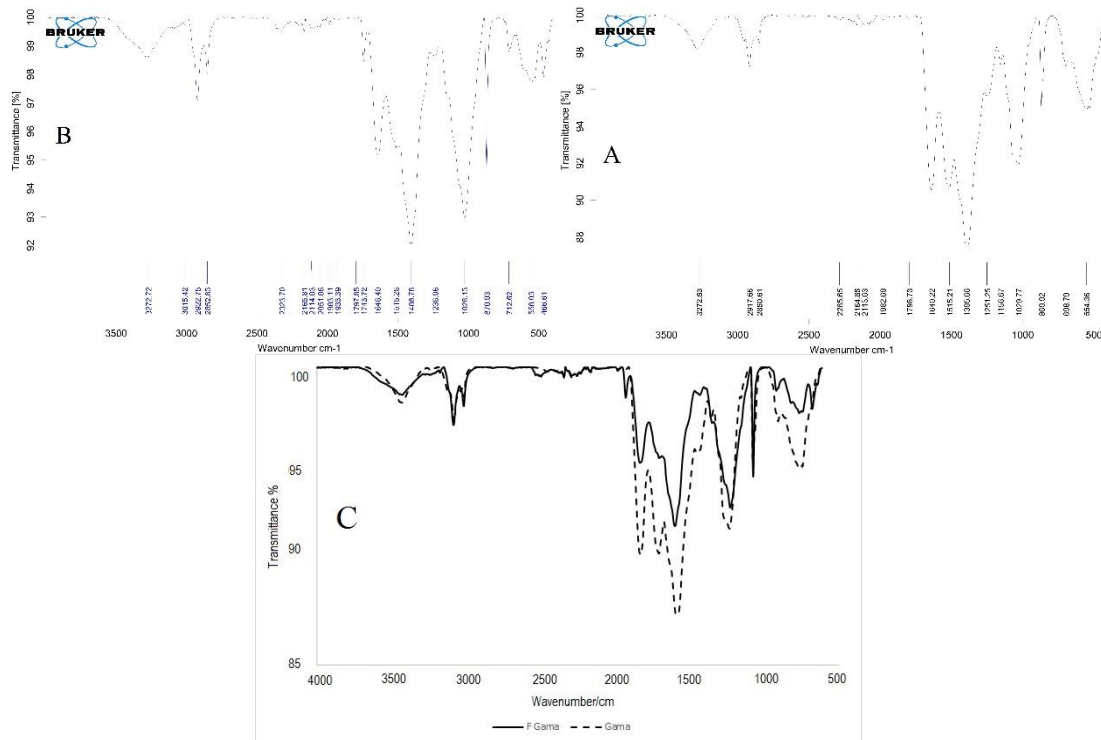


شکل ۱ طیف FTIR گندم (A)، مدفوع حاصل (B) و مقایسه دو طیف (C) در ماهی تیلاپیا. (Wheat = گندم، حرف F نشان‌دهنده مدفوع می‌باشد).

Figure 1 FTIR spectra of wheat (A), feces (B) and comparison of two spectra (C) in Tilapia. The letter F indicates the feces.

پیک مربوط به مدفوع بیشتر است. اما در محدوده ۱۴۰۰ تا ۱۵۵۰ که مربوط به پروتئین‌ها و ۱۶۵۰ که مربوط به اسیدهای چرب است، پیک مربوط به گندم قوی‌تر است.

در طیف گندم، طول موج حدود ۹۵۰ قوی دیده می‌شود، در حالی که در مدفوع این طول موج تقویت شده است. این طول موج نشان‌دهنده چربی‌های ترانس است. همچنین در طول موج حدود ۲۹۲۰ که نشان‌دهنده کربوهیدرات‌هاست،

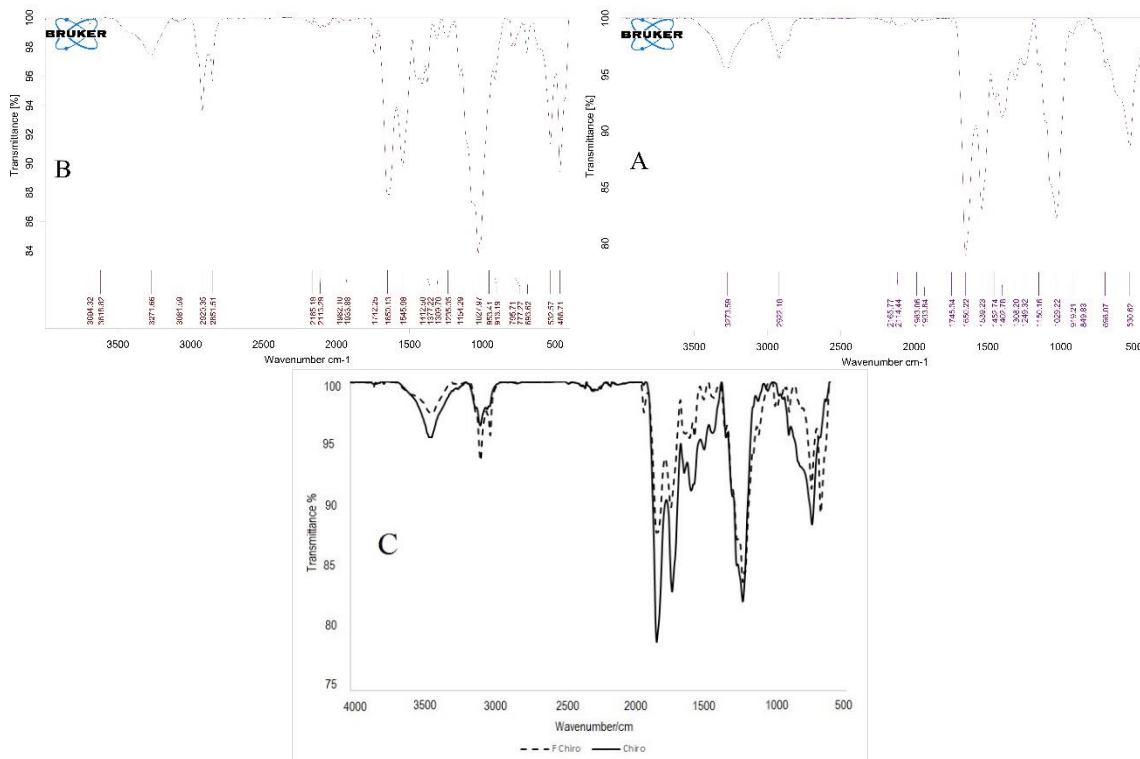


شکل ۲ طیف FTIR گاماروس (A)، مدفوع حاصل (B) و مقایسه دو طیف (C) در ماهی تیلاپیا. (Gama = گاماروس، حرف F نشان‌دهنده مدفوع می‌باشد).

Figure 2 FTIR spectra of Gammarus (A), feces (B) and comparison of two spectra (C) in Tilapia. Gama = gammarus, the letter F indicates feces.

به استرها است و ۱۴۰۰ تا ۱۵۵۰ (پروتئین‌ها) و همچنین ۱۶۵۰ (اسیدهای چرب) پیک مشخصی دیده می‌شود.

در طیف گاماروس در مقایسه با گندم به طور کلی تطابق بیشتری از نظر الگوی پیک‌های نمودار گاماروس و مدفوع آن دیده می‌شود. در محدوده ۱۰۰۰ تا ۱۱۵۰ پیک مربوط

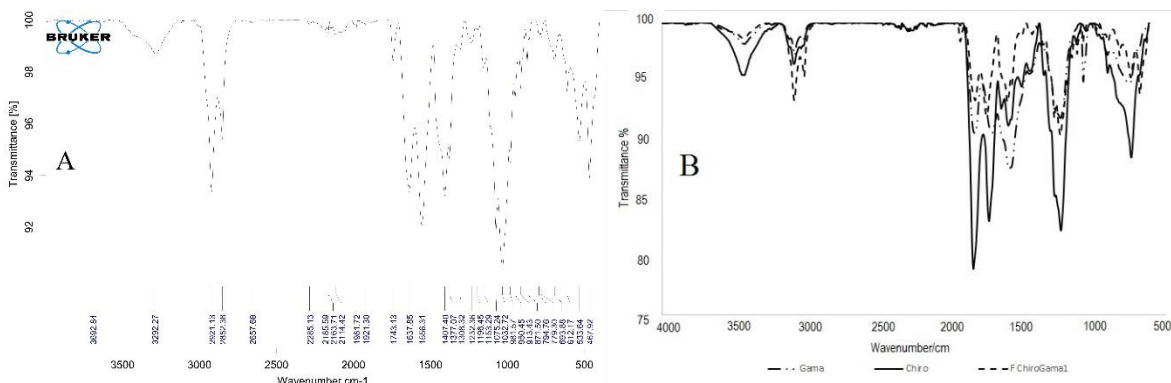


شکل ۳ طیف FTIR کرم خونی (A)، مدفوع حاصل (B) و مقایسه دو طیف (C) در ماهی تیلاپیا. Chiro = کرم خونی، حرف F نشان‌دهنده مدفوع حاصل از آن است.

Figure 3 FTIR spectra of bloodworm (A), feces (B) and comparison of two spectra (C) in Tilapia Chiro = bloodworm, the letter F indicates the resulting feces.

مشخصی دیده می‌شود. همچنین، شدت پیک‌ها در کرم خونی قوی‌تر از مدفوع آن است.

در مورد کرم خونی نیز مانند گاماروس الگوی طیف غذا و مدفوع حاصل از آن بسیار شبیه است. در اینجا نیز در محدوده ۱۰۰۰-۱۱۵۰، ۱۶۵۰ و ۱۵۴۰ پیک‌های کاملاً

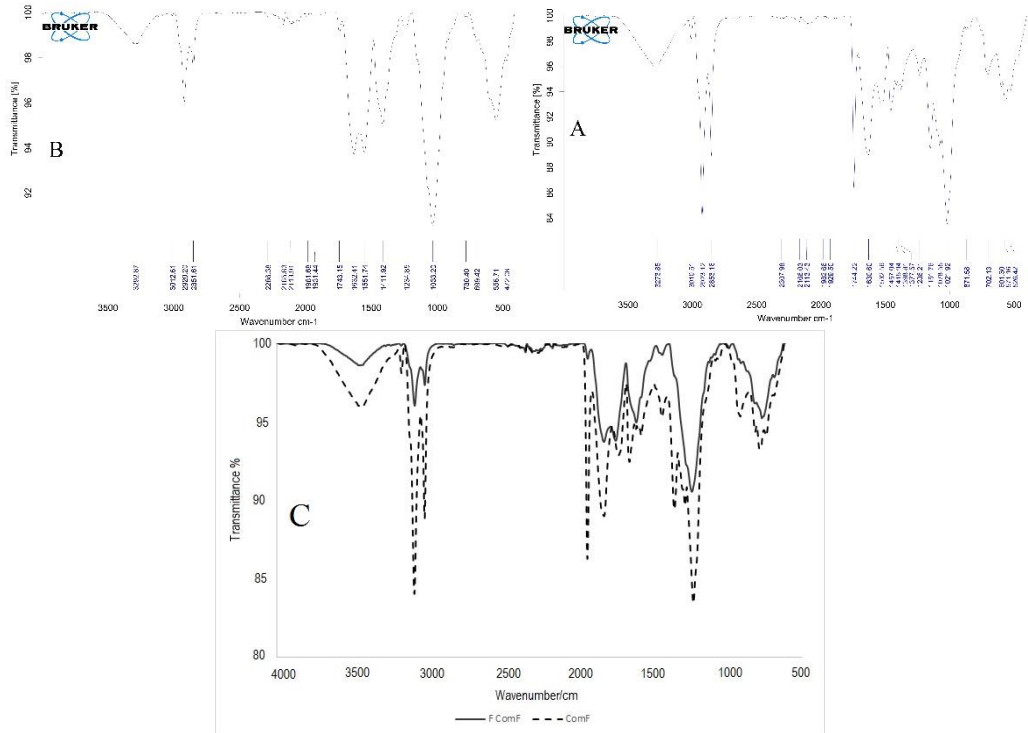


شکل ۴ طیف FTIR مدفوع حاصل از تغذیه مخلوط گاماروس-کرم خونی (A) و مقایسه گاماروس، کرم خونی و مدفوع حاصل (B) در ماهی تیلاپیا. Chiro = کرم خونی، Gama = گاماروس، حرف F نشان‌دهنده مدفوع حاصل می‌باشد.

Figure 4 FTIR spectrum of feces obtained from feeding of the mixture of Gammarus and bloodworm (A) and comparison of Gammarus, bloodworm and feces (B) in Tilapia. Chiro = bloodworm, Gama = Gammarus, the letter F indicates the resulting feces.

بجز در محدوده ۲۹۲۰ (کربوهیدرات‌ها). همچنین، الگوی طیفی دو قلم ماده غذایی، کرم خونی و گاماروس، تا حد زیادی در طول موج‌های شاخص ذکر شده مطابقت دارند.

در این تصویر طیف مربوط به گاماروس و کرم خونی به عنوان غذا با مدفوع حاصل از تغذیه مخلوط آنها مقایسه شده است. در اغلب طول موج‌هایی که در تصاویر قبل بیان شده، مدفوع نسبت به مواد غذایی شدت کمتری نشان می‌دهد،

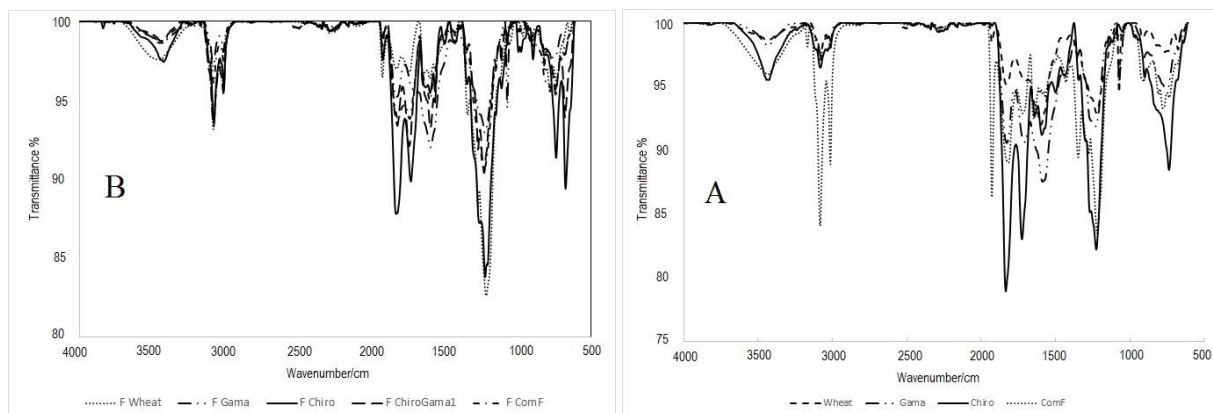


شکل ۵ طیف FTIR غذای کنسانتره (A)، مدفوع حاصل (B) و مقایسه دو طیف (C) در ماهی تیلاپیا. (ComF = غذای کنسانتره (تجاری)، حرف F نشان‌دهنده مدفوع حاصل از آن می‌باشد)

Figure 5 FTIR spectra of formulated feed (A), feces (B) and comparison of two spectra (C) in Tilapia. ComF = formulated (commercial) feed, the letter F indicates the resulting feces.

استرها، پروتئین، اسیدهای چرب و کربوهیدرات‌ها این پیک‌ها متمایز هستند.

در غذای کنسانتره تنوع پیک‌ها بیشتر است و در محدوده‌های متنوعی پیک دیده می‌شود. ولی در محدوده



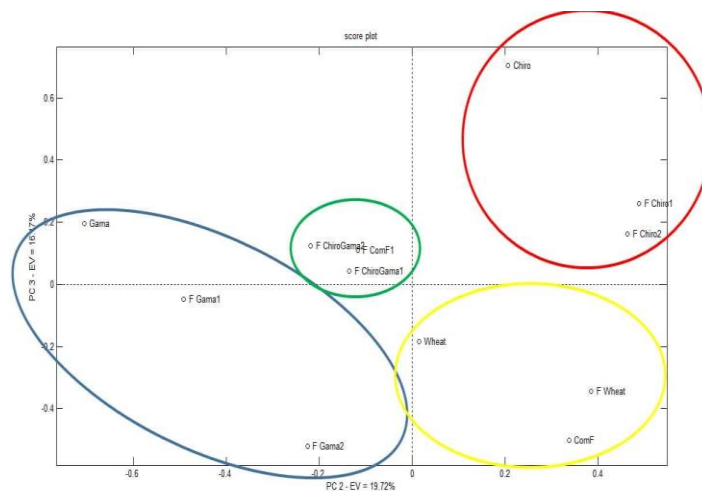
شکل ۶ مقایسه طیف FTIR غذای مختلف (A) و مدفوع حاصل (B) در ماهی تیلاپیا. (Chiro = کرم خونی، Gama = گاماروس، Wheat = گندم، ComF = غذای کنسانتره (تجاری))، حرف F نشان‌دهنده مدفوع حاصل از آن می‌باشد).

Figure 6 Comparison of FTIR spectra of different feed (A) and feces (B) in Tilapia. Chiro = bloodworm, Gama = Gammarus, Wheat = wheat, ComF = formulated (commercial) feed, the letter F indicates the resulting feces.

نتایج آزمون PCA

نتایج آزمون PCA در شکل ۷ نشان داده شده است. گاماروس و مدفوع حاصل از آن در یک گروه، کرم خونی و مدفوع حاصل از آن در یک گروه، مدفوع حاصل از گاماروس و کرم خونی به همراه یک تکرار از مدفوع غذای کنسانتره تجاری در یک گروه و بین دو گروه قبلی، و گندم و مدفوع آن و تکرار دیگر غذای کنسانتره در یک گروه قرار گرفته‌اند. تفکیک گاماروس، کرم خونی، گندم و مدفوع حاصل از تغذیه مجزای آنها به خوبی انجام شده است. غذای کنسانتره به خوبی قابل تفکیک نیست.

در شکل ۶ طیف مربوط به چهار نوع ماده غذایی و مدفوع حاصل از آنها مقایسه شده است. دیده می‌شود که مواد غذایی مختلف در محدوده خاصی پیک قوی‌تری دارند. برای مثال، کرم خونی در محدوده ۱۵۴۰ (پروتئین) و ۱۶۵۰ (اسید چرب) پیک قوی‌تر دارد، در حالی که غذای کنسانتره در محدوده ۲۹۲۰ (کربوهیدرات‌ها) به طور مشخص پیک قوی‌تری نشان می‌دهد. تفاوتی که در مورد مقایسه طیف مدفوع حاصل از غذاهای مختلف دیده می‌شود، این است که پس از هضم و جذب، انواع مدفوع طیف یکنواخت‌تری نشان می‌دهند. در عین حال دیده می‌شود که در مدفوع کرم خونی نیز اسیدهای چرب (۱۶۵۰) بیشتر است.



شکل ۷ آزمون PCA همه نمونه‌های غذا و مدفوع حاصل در ماهی تیلاپیا (Chiro = کرم خونی، Gama = گاماروس، Wheat = گندم، Com = غذای کنسانتره (تجاری)، حرف F نشان‌دهنده مدفوع حاصل از آن می‌باشد).

Figure 7 PCA analysis of all feeds and feces samples in Tilapia (Chiro = bloodworm, Gama = Gammarus, Wheat = wheat, ComF = formulated (commercial) feed, the letter F indicates the resulting feces).

بحث

کامل بررسی کردند. در این پژوهش مشخص شد که اگرچه در اغلب مواد مغذی (مثل اسیدهای چرب، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و مواد معدنی) نسبت اجزاء در امتداد لوله گوارش حفظ می‌شود، ولی برخی از آنها مانند اسیدهای چرب بهتر از بقیه باقی می‌مانند. در واقع، در فرآیند هضم و جذب به نسبت تقریباً یکسان از اسیدهای چرب مختلف استفاده می‌شود و در نهایت پس از این فرآیند نسبت آنها مثل ابتدای لوله گوارش است و فقط مقدار آن کمتر شده است. با توجه به این پژوهش شاید بتوان برای یافتن تفاوت و شباهت بین غذاهای مختلف و همچنین ردیابی آن‌ها از این دسته از مواد مغذی استفاده بیشتری کرد. البته اگرچه Elvines و همکاران (۲۰۲۳) تأیید می‌کنند که در دیگر آزادماهیان نیز تغییرات مواد مغذی در امتداد لوله گوارش شبیه به آزاد ماهی چینوک خواهد بود، ولی در ماهیان دیگر و خوراک‌های متنوع مورد استفاده باید این موضوع بررسی شود.

طول موج‌های کلیدی در سنجش FTIR که می‌توانند برای شناسایی گروه‌های عاملی مختلف و انواع پیوندها در چربی‌ها و اسیدهای چرب استفاده شوند به صورت زیر است (Skoog et al. 2016; Mallick, 2023):

۱- کشش کربونیل C=O: تری گلیسریدها و اسیدهای چرب آزاد: ارتعاش کششی استر کربونیل معمولاً در حدود ۱۷۳۵ بر سانتی‌متر ظاهر می‌شود.

اسیدهای کربوکسیلیک: کشش کربونیل در اسیدهای کربوکسیلیک حدود ۱۷۰۰ بر سانتی‌متر ظاهر می‌شود.

۲- کشش C-H: گروه‌های متیلن (-CH₂-): ارتعاشات کششی متقارن و نامتقارن گروه‌های متیلن در حدود ۲۹۲۵-۲۸۵۰ بر سانتی‌متر ظاهر می‌شود (کشش متقارن:

۲۸۵۰ بر سانتی‌متر و کشش نامتقارن: ۲۹۲۵ بر سانتی‌متر)

گروه‌های متیل (-CH₃): ارتعاشات کشش متقارن و نامتقارن گروه‌های متیل در طول موج‌های کمی بیشتر

برای درک بهتر وضعیت تغذیه‌ای ماهی و نوع غذای مصرف شده برای تغذیه آریزان پرورشی یا وحشی، باید ترکیب محتویات لوله گوارش ماهی سنجش شود. به این منظور باید ماهی کشته و محتویات لوله گوارش آن در آزمایشگاه بررسی شود. در پرورش تجاری ماهی‌ها برای کاهش هزینه‌های تولید، بیشتر پرورش‌دهندگان ماهی سعی می‌کنند که از مواد خوراکی با دسترسی محلی برای تکمیل جیره غذایی ماهیان خود استفاده کنند (Mmanda et al. 2020). در مواردی ممکن است پرورش‌دهندگان از غذاهایی استفاده کنند که از نظر فرهنگ عامه مردم مورد پسند نباشد، یا از نظر بهداشتی و سازمان‌های مربوط مانند سازمان دامپزشکی یا سازمان بهداشت مورد تأیید نباشد. در این موارد ممکن است برخی پرورش‌دهندگان دست به تقلب و فریب‌کاری بزنند و از غذاهای غیرمجاز استفاده کنند.

اگر بتوان با استفاده از مدفوع، نوع خوراک یا اقلام غذایی مصرف شده توسط ماهی را مشخص کرد، نیاز به کشتن ماهی چه در ماهیان پرورشی و چه در طبیعت نیست و با نمونه‌برداری از داخل لوله گوارش (بیوپسی) توسط یک سوند می‌توان به مدفوع دسترسی پیدا کرد. به این ترتیب در محیط پرورشی بدون از دست رفتن ماهی و فقط با برداشت نمونه مدفوع، نوع غذای خورده شده توسط ماهی را می‌توان مشخص کرد و در طبیعت نیز از کشتن ماهی‌ها به‌خصوص ماهیانی که در معرض خطر انقراض قرار دارند، جلوگیری خواهد شد. برای رسیدن به این هدف باید به دنبال ترکیباتی بود که در امتداد لوله گوارش تغییر کمتری کنند و نسبت آنها در ابتدا و انتهای لوله گوارش تغییر چندانی نکند و بتوان از آنها به عنوان اثر انگشت استفاده کرد. Elvines و همکاران (۲۰۲۳) ترکیب مدفوع ماهی آزاد چینوک (*Oncorhynchus tshawytscha*) نگهداری شده در روش مدار بسته و تغذیه شده با غذای کنسانتره را به طور

معدنی و ترکیبات متنوعی است که همه این مواد در کنار چربی‌ها و اسیدهای چرب طیف‌های خاص خود را ایجاد می‌کنند. گاهی اوقات وجود این طیف‌ها ممکن است برای تفکیک غذای خورده شده مفید باشد؛ مانند طیفی که در نمونه‌های این پژوهش در محدود حدود ۱۵۴۰ بر سانتی‌متر دیده می‌شود. این محدوده نشان‌دهنده پیوندهای N-H یا $C=N$ است و بر وجود پروتئین و پپتید در نمونه دلالت دارد. همان‌طور که دیده شد بیشترین مقدار در کرم خونی و کمترین مقدار در گندم ظاهر شده است. به همین شکل در طول موج حدود ۲۹۲۰ بر سانتی‌متر دیده می‌شود که غذای کنسانتره نسبت به دیگر غذاها پیک قوی‌تری نشان داده است. این طول موج نشان‌دهنده وجود عمدتاً کربوهیدرات‌هاست (به دلیل وجود گروه‌های متیل $(-CH_3)$ و متیلن $(-CH_2-)$ و آلکان‌ها). در عین حال، وجود طیف‌های متنوع ممکن است گیج کننده باشد. در این آزمایش غذای مصرف شده مشخص است و با آگاهی قبلی نسبت به نوع غذای مصرفی در مورد وجود تفاوت بین طیف‌ها بررسی انجام می‌شود، ولی اگر موضوع آزمایش کشف یک خوراک جدید باشد، وجود این طیف‌های متنوع ممکن است قضاوت را سخت کند. علاوه بر بررسی بصری طیف‌های به‌دست آمده می‌توان از روش‌های آماری برای سنجش کمی داده‌ها استفاده کرد. سنجش PCA داده‌ها نشان می‌دهد که بر اساس طول موج‌های شاخص می‌توان برخی از غذاهای استفاده شده و مدفوع حاصل از آن، مثل کرم خونی و گاماروس را به راحتی شناسایی کرد، اما در مورد غذای کنسانتره که ترکیبی از مواد مختلف با منشأ گیاهی و حیوانی است، نتایج چندان قابل تفکیک نیست. در شکل‌های مختلف هم دیده شد که پیدا کردن طول موج‌های شاخص برای این نوع غذا سخت‌تر است و در واقع، تنوع طول موج‌های مختلف کار تشخیص را سخت می‌کند. در مطالعات مختلف، این روش برای شناسایی گونه‌های مختلف گیاهی و جانوری استفاده شده است، از جمله گونه‌های باکتری (Curk et al. 1994; Pakbin et al. 2022)، گونه‌های مهاجم DNA (Han et al. 2018)، گونه‌های شته (Durak et al. 2022)، و گرده انواع درختان غان (Depciuch et

دیده می‌شود، در حدود ۲۹۵۰-۲۹۶۰ بر سانتی‌متر برای کشش نامتقارن.

۳- خمش C-H: خمش متیلن $(-CH_2-)$: حرکت قیچی گروه‌های متیلن در حدود ۱۴۶۵ بر سانتی‌متر ظاهر می‌شود.

خمش متیل $(-CH_3)$: حرکت خمشی گروه‌های متیل در حدود ۱۳۷۵-۱۳۸۰ بر سانتی‌متر ظاهر می‌شود.

۴- کشش C-O: برای استرها، ارتعاش کششی C-O در حدود ۱۱۷۰-۱۲۴۰ بر سانتی‌متر ظاهر می‌شود.

۵- پیوندهای دوگانه $C=C$: چربی‌های غیر اشباع و اسیدهای چرب: ارتعاش کششی پیوند $C=C$ در حدود ۱۶۷۰-۱۶۵۰ بر سانتی‌متر ظاهر می‌شود.

پیکربندی سیس (cis) پیوندهای دوگانه معمولاً یک ارتعاش متحرک در حدود ۷۰۰-۷۳۰ بر سانتی‌متر نشان می‌دهد.

۶- خم شدن خارج از صفحه $trans C=C$: برای پیوندهای دوگانه ترانس، خمش خارج از صفحه حدود ۹۶۰-۹۷۰ بر سانتی‌متر ظاهر می‌شود.

این نوارهای جذب مشخص امکان شناسایی و تمایز انواع مختلف چربی‌ها و اسیدهای چرب را فراهم می‌کند. به عنوان مثال، وجود و موقعیت نوار کششی $C=O$ می‌تواند بین تری گلیسرید و اسیدهای چرب آزاد تمایز قائل شود، در حالی که وجود پیوندهای دوگانه $C=C$ می‌تواند میزان اشباع نشدن اسیدهای چرب را نشان دهد. علاوه بر این، الگوها و شدت‌های خاص در این مناطق می‌تواند اطلاعات دقیقی در مورد ساختار و ترکیب نمونه چربی یا اسید چرب مورد سنجش ارائه دهد. به طور نمونه، مقایسه غذاهای مورد استفاده در این طول موج (حدود ۱۶۵۰) نشان می‌دهد که کرم خونی بیشترین و گندم کمترین میزان $C=C$ یعنی اسیدهای چرب غیر اشباع را دارد. از طرفی، با مقایسه همین طول موج‌ها بین غذای مشخص و مدفوع حاصل از آن می‌توان الگوهای مشخصی را یافت. اما همان‌طور که دیده می‌شود در اغلب موارد شدت طول موج کمتر شده است، به این معنی که غلظت ماده مورد نظر کاهش یافته است. در واقع مقداری از آن در خلال فرآیند هضم، جذب شده است.

از طرف دیگر هر غذایی که ماهی مصرف می‌کند، مخلوطی از مواد مغذی مختلف شامل پروتئین، کربوهیدرات، مواد

در طبیعت استفاده کرد و احتمالاً در این مورد شناسایی غذای خورده شده بر اساس طیف FTIR راحت‌تر خواهد بود، زیرا در طبیعت اقلام غذایی یکنواخت‌تر (گیاهی یا جانوری) مصرف می‌شوند و طیف به‌دست آمده پیچیدگی کمتری خواهد داشت. البته برای این منظور باید نمونه‌برداری زیادی انجام شود تا داده‌ها اعتبار کافی برای بررسی توسط روش‌های آماری چندمتغیره داشته باشند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از آقای دکتر صدرا سیدی برای کمک در مراحل انجام بخش پرورش و آقای دکتر سعید معصوم برای سنجش داده‌ها سپاسگزاری می‌کنند.

منابع

- Ahlbeck, I., Hansson, S., Hjerne, O. 2012. Evaluating fish diet analysis methods by individual-based modelling. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 69: 1184-1201. doi:10.1139/F2012-051.
- Altuntas, E.G., Deniz, E., Ayhan, B., Kezban Candogan, K. Duygu Ozel Demiralp, D.O. 2017. Identification of meat species by using molecular and spectroscopic techniques. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology* 5: 488-492. doi: 10.24925/turjaf.v5i5.488-492.1060.
- Cebi, N., Bekiroglu, H., Erarslan, A., Rodriguez-Saona, L. 2023. Rapid sensing: Hand-held and portable FTIR applications for on-site food quality control from farm to fork. *Molecules* 28: 3727. doi: 10.3390/ molecules28093727.
- Curk, M.C., Peladan, F., Hubert, J.C. 1994. Fourier Transform infrared (FTIR) spectroscopy for identifying *Lactobacillus* species. *FEMS*

Microbiology Letters 123: 241-248. doi: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb07231.x.

De Luca, M., Terouzi, W., Ioele, G., Kzaiber, F., Abdelkhalek, O., Tauler, R., Ragno, G. 2011. Derivative FTIR spectroscopy for cluster analysis and classification of Morocco olive oils. *Food Chemistry* 124: 1113-1118. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.07.010.

Depciuch, J., Kasprzyk, I., Drzymała, E., Parlinska-Wojtan, M. 2018. Identification of birch pollen species using FTIR spectroscopy. *Aerobiologia* 34: 525-538. doi: 10.1007/s10453-018-9528-4.

Durak, R., Ciak, B., Durak, T. 2022. Highly Efficient use of infrared spectroscopy (ATR-FTIR) to identify aphid species. *Biology* 11: 1-9. doi: 10.3390/biology11081232.

El-Sayed, A.F. 2020. *Tilapia Culture (Second Edition)*. Academic Press, 358p.

Elvines, D.M., MacLeod, C.K., Ross, D.J., Sabadel, A.J.M., Bury, S.J., Brown, J.C.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر به نظر می‌رسد که روش FTIR برای تفکیک دو نوع غذای مورد استفاده در آبی‌پروری یا کشف اینکه یک نوع غذای غیرمجاز مشخص (مثل ضایعات کشتارگاهی) استفاده شده است یا خیر، با استفاده از مدفوع ماهی، تا حد زیادی کاربردی و قابل اعتماد خواهد بود. از طرف دیگر، می‌توان از این روش برای شناسایی غذاهای خورده شده توسط ماهی

- S., White, C.A. 2023. Composition of Chinook salmon faecal wastes with implications for environmental management. *Aquaculture* 569: 739358. doi: 10.1016/j.aquaculture.2023.739358.
- Giorgini, E., Randazzo, B., Gioacchini, G., Cardinaletti, G., Vaccari, L., Tibaldi, E., Olivotto, I. 2018. New insights on the macromolecular building of rainbow trout (*O. mykiss*) intestine: FTIR imaging and histological correlative study. *Aquaculture* 497: 1-9. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.07.032.
- Han, Y., Jian, L., Yao, Y., Wang, X., Han, L., Liu, X. 2018. Insight into rapid DNA-specific identification of animal origin based on FTIR analysis: A case study. *Molecules* 23: 28-42. doi:10.3390/molecules23112842.
- Holden, C.A., Bailey, J.P., Taylor, J.E., Martin, F., Beckett, P., McAinsh, M. 2022. Know your enemy: Application of ATR-FTIR spectroscopy to invasive species control. *Plos One* 17: e0271370. doi: 10.1371/journal.pone.0261742.
- Mallick, P.K. 2023. *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 475p.
- MManda, F.P., Mulokozi, D.P., Lindberg, J.E., Norman Halden, A., Mtolera, M., Kitula, R. Lundh, T. 2020. Fish farming in Tanzania: The availability and nutritive value of local feed ingredients. *Journal of Applied Aquaculture* 32: 1-20. doi: 10.1080/10454438.2019.1708836.
- Ong, O.T.W., Kho, E.A., Esperança, P.M., Freebairn, C., Dowell, F.E., Devine, G.J., Churcher, T.S. 2020. Ability of near-infrared spectroscopy and chemometrics to predict the age of mosquitoes reared under different conditions. *Parasite Vectors* 13: 1-10. doi: 10.1186/s13071-020-04031-3.
- Pakbin, B., Zolghadr, L., Rafiei, S., Bruck, W.M., Bruck, T.B. 2022. FTIR differentiation based on genomic DNA for species identification of *Shigella* isolates from stool samples. *Scientific Reports* 12: 27-80. doi: 10.1038/s41598-022-06746-y.
- Rohman, A., Che Man, Y.B., Ismail, A., Puziah, H. 2011. FTIR spectroscopy combined with chemometrics for analysis of lard adulteration in some vegetable oils. *CyTA Journal of Food* 9: 96-101. doi: 10.1080/19476331003774639.
- Rohman, A., Nugroho, A., Lukitaningsih, E. 2014. Application of vibrational Spectroscopy in combination with chemometrics techniques for authentication of herbal medicine. *Applied Spectroscopy Reviews* 49: 603-613. doi: 10.1080/05704928.2014.882347.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R. 2016. *Principles of Instrumental Analysis*. Seventh Edition. Boston, USA. 1056p.
- Sunde, J., Eiane, S.A., Rustad, A., Jensen, H.B., Opstvedt, J., Nygard, E., Venturini, G., Rungruangsak-Torrissen, K. 2004. Effect of fish feed processing conditions on digestive protease activities, free amino acid pools, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition* 10: 261-277. doi: 10.1111/j.1365-2095.2004.00300.x.
- Wang, X., Chen, X., Qi, Z., Liu, X., Li, W., Wang, S. 2010. A study of *Ganoderma lucidum* spores by FTIR microspectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 91: 165-178. doi: 10.1016/j.saa.2012.02.004.