



مقاله پژوهشی

تأثیر محافظت‌کنندگی مکمل‌های تغذیه‌ای ویتامین E و نانوسلنیوم بر
کارایی رشد و شاخص‌های خون‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان
(*Oncorhynchus mykiss*) در مواجهه با غلظت زیر کشنده آمونیاک

عافی‌ناظر^۱، محمد هرسیج^{۲*}، سیده آیناز شیرنگی^۳، حسین آدینه^۲

تاریخ دریافت: بهمن ۹۷

تاریخ پذیرش: مرداد ۹۸

چکیده

این مطالعه به منظور بهبود پاسخ‌های فیزیولوژیکی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تنش مزمن آمونیاک، به عنوان یک عامل بازدارنده در سیستم‌های بازگردشی آب پرورش ماهی، با استفاده از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی انجام شد. ۱۵۰ قطعه ماهی (میانگین وزن اولیه ۸۴/۱۰±۸/۴۰ گرم) در ۵ تیمار آزمایشی و هر یک با سه تکرار به مدت ۶۰ روز مورد بررسی قرار گرفتند. تیمارها شامل ماهیان تغذیه شده با جیره پایه و بدون تنش آمونیاک (C⁻)، با جیره پایه همراه با تنش آمونیاک (C⁺)، با جیره دارای مکمل ویتامین E و تحت تنش آمونیاک (E)، با جیره دارای مکمل نانوسلنیوم و تحت تنش آمونیاک (Se) و ماهیان با جیره دارای مکمل ویتامین E همراه نانوسلنیوم تحت تنش آمونیاک (E+Se) بود. بعد از ۳۰ روز تغذیه با مکمل‌ها، ماهیان در معرض آمونیاک (NH₄OH: ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) به مدت ۳۰ روز قرار گرفتند و شاخص‌های رشد و خون در روزهای ۴۴ و ۶۰ آزمایش مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد تغذیه ماهیان با E+Se باعث افزایش شاخص‌های رشد و کاهش آمونیاک پلاسما در مقایسه با دیگر تیمارهای آزمایشی شد. ماهیان تغذیه شده با مکمل‌های E+Se دارای بیشترین تعداد گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت بودند در حالی که تعداد گلبول‌های سفید نسبت به تیمار C⁻ تفاوت معنی‌دار نداشت. این نتایج اثرات هم‌افزایی افزودن مکمل‌های E+Se را در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که می‌تواند خسارات ناشی از آلودگی‌های آمونیاکی را جبران کند.

واژگان کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، تنش آمونیاک، مکمل غذایی، رشد، شاخص‌های خونی.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران.

۲- استادیار گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران.

۳- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران.

* نویسنده مسئول: m_harsij80@yahoo.com

مقدمه

غلظت آسیب‌رسان آمونیاک و افزایش آن معمولاً در سیستم‌های متراکم و فوق متراکم پرورش ماهی یا سیستم‌های بازگردشی آب، آکواریوم‌ها و هنگام انتقال ماهی قابل مشاهده است (Motnikar et al., 1998; Wickins and Lee, 2002; Shin et al., 2016). مقادیر زیر حد و غیرکشنده این ماده اگرچه ایجاد تلفات نمی‌کند اما قادر است توازن بین ماهی و محیط را بر هم زند و موجب پاسخ‌های تنشی در ماهیان شود (Bonga, 1997). از جمله این پاسخ‌های تنش مزمن می‌توان به کاهش رشد، رفتار غیرعادی، سرکوب سیستم ایمنی، تغییر تعداد گلبول‌های سفید، کاهش توانایی هموگلوبین خون در انتقال اکسیژن و تضعیف مقاومت در برابر بیماری و حتی مرگ اشاره کرد (Wickins and Lee, 2002; Ndong et al., 2007; Aksakal et al., 2011; Li et al., 2013). در دو دهه گذشته تلاش‌هایی برای درک ارتباط بین تغذیه، پاسخ ایمنی و مقاومت به بیماری‌ها در ماهیان پرورشی صورت گرفته و مواد مغذی مختلفی برای کم کردن تنش و یا تقویت ایمنی ماهیان استفاده شده است. سطوح بالای ویتامین‌های آنتی‌اکسیدانی در جیره‌های ماهیان (بیشتر از سطح مورد نیاز برای رشد)

قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به عنوان تنها گونه مهم سردآبی پرورشی کشور از اهمیت ویژه‌ای در برنامه‌ریزی‌های پژوهشی و اجرایی برخوردار است. ایران یکی از بزرگ‌ترین تولیدکنندگان این گونه سردآبی در جهان است و در رده چهارمین تولیدکننده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در دنیا قرار دارد (Harlioglu and Farhadi, 2017). با وجود افزایش تقاضا و گرایش مصرف‌کنندگان به ماهیان پرورشی در صنعت آبی‌پروری، ماهیان اغلب با تغییرات ناگهانی در دمای محیط، ازدحام، انتقال، ذخیره‌سازی، کاهش کیفیت آب و عفونت‌های باکتریایی و ویروسی روبه‌رو می‌شوند (Mahanand et al., 2013). امروزه برخی کارگاه‌های پرورش ماهیان سردآبی اقدام به بازگشت بخشی از آب خروجی (بدون به کار گرفتن بیوفیلتر) می‌کنند. از این رو، تجمع آمونیاک در استخر اجتناب‌ناپذیر و مشکل‌زا می‌شود. غلظت بالای آمونیاک یکی از عوامل اصلی است که موجب تنش ماهیان و شروع بیماری‌ها می‌شود. آمونیاک به عنوان محصول نهایی کاتابولیسم پروتئین در اکثر ماهیان استخوانی تولید می‌شود و از طریق آبشش‌ها به محیط دفع می‌شود. در نتیجه، شرایط مواجهه با

اما مسیر اصلی جذب آن از طریق غذا است (Han et al., 2011). یکی از روش‌های افزایش دسترسی زیستی به سلنیوم به کارگیری نانوذرات سلنیوم در جیره غذایی است (Zhou et al., 2009) که امروزه به دلیل سمیت کم و قابلیت زیاد دسترسی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. از خواص منحصر به فرد نانوذرات سلنیوم می‌توان به نسبت سطح به حجم بالا، افزایش فعالیت سطحی، ضریب بالای کاتالیزوری و میزان جذب بیشتر اشاره کرد (Zhang et al., 2008; Rezvanfar et al., 2013). همچنین می‌توان به مطالعه قابلیت اثر ویتامین E، Se و ترکیب این دو بر کاهش تنش‌های زیست‌محیطی از جمله تراکم و افزایش غلظت فلزات سنگین بر بعضی از گونه‌های ماهیان اشاره کرد. در تمامی موارد مطالعه شده، افزودن ویتامین E و Se به عنوان مکمل غذایی باعث افزایش رشد و بهبود سلامت ماهیان مورد مطالعه شد (طهماسبی، ۱۳۹۳؛ Naderi et al., Elgaml et al., 2015). در ماهیانی مانند کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، آزادماهی اطلس (*Salmo salar*) و کلمه خزر (*Rutilus caspicus*) در مواجهه با تنش آمونیاک شاخص‌های خونی از جمله تعداد گلبول‌های

پاسخ ایمنی را در آزاد ماهیان تحریک می‌کند (Verlhac et al., 1996) و موجب بهبود مقاومت به بیماری‌ها می‌شود (Navarre and Halver, 1989).

ویتامین E (α -توکوفرول) ویتامین محلول در چربی است که در بخش خارجی غشای سلولی و اندامک‌های سلول‌ها حضور دارد و به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در جیره غذایی استفاده می‌شود. وجود این ویتامین برای محافظت از لیپوپروتئین‌های موجود در سلول ضروری است (Hamre, 2011) که از پراکسیداسیون لیپید غشای سلولی جلوگیری می‌کند (Di Giulio and Meyer, 2008). در نتیجه، باعث حفظ کیفیت گوشت، ایمنی و مقاومت طبیعی گلبول قرمز خون به همولیز شدن می‌شود (Halver, 2003). سلنیوم (Se) یک ریزمغذی ضروری در جیره غذایی ماهیان برای حفظ رشد طبیعی و فعالیت‌های زیستی است (Hamilton, 2004) به طوری که از سلول‌ها و غشا آن‌ها در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند. کمبود سلنیوم می‌تواند باعث کاهش رشد، از بین رفتن اشتها، افزایش مرگ و میر و آسیب سلول و غشا آن شود. از طرف دیگر میزان مازاد سلنیوم در غذا سمیت ایجاد می‌کند. این ریزمغذی می‌تواند به طور مستقیم از آب در بدن ذخیره می‌شود،

آنتی‌اکسیدان زیستی عمل می‌کنند، به حفاظت از غشا سلول در برابر آسیب‌های اکسیداتیو کمک می‌کنند و باعث بهبود رشد و سلامت فیزیولوژیکی در ماهیان و دیگر جانوران می‌شوند، بنابراین شناسایی اثرات هم‌افزایی (سینرژی) ویتامین E و Se در جهت بهبود پاسخ‌های ماهیان نسبت به تنش مزمن آمونیاک بسیار سودمند است. در نتیجه بدین منظور پژوهش حاضر انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش و شرایط نگهداری ماهیان

تعداد ۱۵۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با میانگین وزن $8/40 \pm 0/84$ گرم از مزرعه پرورش ماهی واقع در شهرستان مینودشت (استان گلستان) در اسفند ۱۳۹۶ تهیه و به آزمایشگاه مهندسی آبزیان دانشگاه گنبد کاووس منتقل شد. پس از سازگاری با محیط جدید به مدت ۱۴ روز و غذاهای با جیره پایه تجاری (فرادانه، ایران؛ جدول ۱)، در ۱۵ مخزن پلاستیکی ۵۰ لیتری ذخیره‌سازی شدند.

سفید و قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین کاهش یافت (مازندرانی و همکاران، ۱۳۹۴؛ Knoph and Thorud, Stoskopf, 1993). مطالعات خون‌شناسی بیان می‌کند که ویژگی‌های گلبول‌های قرمز شاخصی مهم و قابل اعتماد از اثر منابع مختلف تنش است (Rehulka, 2000, 2002). از طرف دیگر، تعداد و انواع گلبول‌های سفید خون در مواجهه با عامل تنش‌زا دستخوش تغییر می‌شود (Clauss et al., 2008).

با وجود مطالعات بسیاری در زمینه پاسخ‌های فیزیوبیوشیمیایی مرتبط با سمیت حاد آمونیاک، تاکنون اطلاعات اندکی در زمینه چگونگی برهم‌کنش تنش آمونیاک مزمن و وضعیت تغذیه‌ای در ماهیان وجود دارد. نظر به این که، نوع تغذیه می‌تواند در توانایی ماهیان در مواجهه با خطر آمونیاک تاثیرگذار باشد و باعث افزایش مصرف اکسیژن شود، به دنبال تغذیه، ماهیان با هجوم وسیعی از آمونیاک به داخل پلاسمای خون خود نیز مواجهه می‌شوند. از آنجا که هر دو ریزمغذی ویتامین E و Se به عنوان

جدول ۱: ترکیب تقریبی خوراک اکستروود ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

ترکیبات (%)	دوره آغازین		دوره پیش‌پروراری	
	SFT ₃ (وزن ۸-۱۵ گرم)	FFT ₁ (وزن ۱۵-۲۵ گرم)	FFT ₂ (وزن ۵۰-۲۵ گرم)	FFT ₁ (وزن ۱۵-۲۵ گرم)
پروتئین خام	۴۶-۵۰	۴۰-۴۴	۴۰-۴۴	۴۰-۴۴
چربی خام	۱۱-۱۵	۱۲-۱۶	۱۲-۱۶	۱۲-۱۶
فیبر خام	۱/۵-۳	۲-۴	۲-۴	۲-۴
خاکستر	۹-۱۳	۷-۱۱	۷-۱۱	۷-۱۱
رطوبت	۵-۱۱	۵-۱۱	۵-۱۱	۵-۱۱
فسفر	۱-۱/۵	۱-۱/۵	۱-۱/۵	۱-۱/۵

SFT₃: غذای آغازین شماره ۳؛ FFT₁: غذای بچه ماهی شماره ۱؛ FFT₂: غذای بچه ماهی شماره ۲.

آمونیاک (شاهد مثبت، C⁺)، ماهیان تغذیه شده با جیره مکمل ویتامین E و تحت تنش آمونیاک (E)، ماهیان تغذیه شده با جیره مکمل نانوسلنیوم و تحت تنش آمونیاک (Se) و ماهیان تغذیه شده با جیره مکمل ویتامین E به همراه نانوسلنیوم و تحت تنش آمونیاک (E+Se) بود.

آماده‌سازی جیره آزمایشی

بر اساس مطالعات انجام شده مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم ویتامین E (α-Tocopherol Acetate, Sigma, آلمان) و ۱ میلی‌گرم نانوسلنیوم (به شکل محلول کلوئیدی قرمز رنگ، با خلوص ۹۹ درصد و اندازه ذرات ۴۰۰ نانومتر با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم نانوسلنیوم در لیتر آب؛ کیمیاگران فردوس، ایران) به جیره پایه

برای تامین آب، آب شهر در مخزن ۶۰۰ لیتری ذخیره‌سازی می‌شد و پس از ۲۴ ساعت هوادهی و کلرزدایی، به صورت ثقلی وارد مخزن ۸۰ لیتری شده، سپس از طریق لوله تقسیم آب، به طور مساوی بین مخازن پرورش ماهی توزیع می‌شد. کل دوره آزمایش ۶۰ روز به طول انجامید که شامل دو دوره ۳۰ روزه بود: دوره اول (۳۰ روز اول) تغذیه بدون تنش آمونیاکی و دوره دوم (روز ۳۱ تا ۶۰) تغذیه با تنش آمونیاکی. در این آزمایش ۵ تیمار هر یک با سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی طراحی شد. تیمارها شامل تیمار ماهیان تغذیه شده با جیره پایه و بدون تنش آمونیاک (شاهد منفی، C⁻)، ماهیان تغذیه شده با جیره پایه همراه با تنش

دقیق آمونیاک کل با در نظر گرفتن دما و pH، میزان آمونیاک یونیزه شده (NH_4^+) و آمونیاک مولکولی (NH_3) بر اساس جدول استاندارد (Emerson et al., 1975) به طور دقیق محاسبه شد. ۱۰ درصد غلظت نیمه کشنده آمونیاک کل برای ماهیان قزل‌آلا در حدود ۰/۲ میلی‌گرم تعیین شد (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۹۶).

محلول آمونیاک مورد نیاز به صورت روزانه بعد از تعویض آب (۱۰ درصد) به محیط پرورش (به استثنای گروه C⁻) اضافه می‌شد. میزان آمونیاک هر روزه توسط دستگاه فتومتر (7500, Palintest Ltd, انگلستان) اندازه‌گیری و تا پایان دوره در یک مقدار ثابت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر حفظ شد. نرخ مرگ و میر ماهیان در تیمارهای مختلف به طور روزانه ثبت شد.

شاخص‌های کیفیت آب شامل دما با دماسنج، اکسیژن با دستگاه اکسیژن‌متر (HACH, آمریکا) و pH با pH متر (827, Metrohm, سوئیس) طی دوره پرورش ماهیان به صورت منظم اندازه‌گیری و ثبت شد. میانگین دمای آب 17 ± 1 درجه سانتی‌گراد و اکسیژن محلول $8/5 \pm 0/2$ میلی‌گرم در لیتر بود. میزان pH در حدود ۷/۵-۷ ثابت نگه داشته شد. بدین منظور، از هیدروکلریک اسید (HCl) ۰/۴ نرمال

اضافه شد (Kucukbay et al., 2009; Rider et al., 2009). به این ترتیب که برای افزودن ویتامین E از روغن سویا به میزان ۲ درصد جیره و برای افزودن نانوذرات سلنیوم از آب استریل شده استفاده شد. به منظور یکسان‌سازی به همه تیمارها روغن و آب با نسبت‌های بالا اضافه شد. جیره گروه‌های شاهد (C^+ و C^-) بدون اضافه کردن ویتامین E یا نانوذرات سلنیوم آماده شد. پلت‌ها با قرارگیری در اتاق با دمای حدود ۲۷ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد و تا زمان استفاده برای تغذیه ماهیان در یخچال نگهداری شد. غذادهی روزانه به میزان ۳ درصد وزن بدن ماهیان و در ۳ نوبت انجام شد (علیزاده و همکاران، ۱۳۹۵).

تنش مزمن آمونیاک کل

به منظور مواجهه با آمونیاک کل (NH_3) و NH_4^+ از محلول هیدروکسید آمونیوم (NH_4OH) (Merck, آلمان) استفاده شد. برای انتخاب غلظت زیر کشنده آمونیاک، ابتدا در یک آزمایش اولیه، میزان حساسیت ماهیان به آمونیاک غلظت نیمه کشنده (LC_{50}) تعیین شد. این قسمت از آزمایش به مدت ۹۶ ساعت (۴ روز) به طول انجامید و تلفات در ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بررسی و ثبت شد. پس از محاسبه

درصد بازماندگی (SR) از رابطه‌های ۱ تا ۴ محاسبه شد و مورد بررسی قرار گرفت (Turchini et al., 2003).

رابطه ۱:

$$WG (g) = W_f - W_i$$

W_i : وزن اولیه (گرم); W_f : وزن نهایی (گرم).

رابطه ۲:

$$SGR (\%/day) = [(LnW_f - LnW_i) / t] \times 100$$

W_i : وزن اولیه (گرم); W_f : وزن نهایی (گرم); t : روزهای پرورش (روز).

رابطه ۳:

$$FCR = F / (WG)$$

F : وزن خشک غذای مصرفی (گرم); WG : افزایش وزن تر (گرم).

رابطه ۴:

$$SR (\%) = [N_f / N_i] \times 100$$

N_i : تعداد ماهیان در آغاز هر دوره; N_f : تعداد ماهیان باقی مانده در پایان هر دوره.

سنجش غلظت آمونیاک پلاسما

به منظور سنجش آمونیاک خون از کیت تجاری (Biorex، انگلستان) و دستگاه آنالیزر (Mindray، Bs-480، آمریکا) استفاده شد. مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر از نمونه با ۱۰۰ میکرو لیتر از ترکیب استاندارد مخلوط و جذب نوری آن پس از ۳۰ ثانیه در طول موج ۳۴۰ نانومتر

و سدیم هیدروکسید (NaOH) ۰/۴ نرمال استفاده شد.

نمونه‌برداری از ماهیان

به منظور بررسی شاخص‌های رشد و همچنین سنجش شاخص‌های خونی تعداد ۶ قطعه ماهی از هر تیمار در روزهای ۴۴ (۱۴ روز پس از اعمال تنش آمونیاک) و ۶۰ (۳۰ روز پس از اعمال تنش آمونیاک) آزمایش نمونه‌برداری شد. بدین منظور، ۲۴ ساعت قبل از خون‌گیری غذادهی قطع شد و ماهیان با عصاره گل میخک با غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر بیهوش شدند (Gholipour Kanani et al., 2011) و زیست‌سنجی از ماهیان به صورت انفرادی انجام شد.

برای شمارش تعداد گلبول‌های سفید و قرمز و سنجش میزان هموگلوبین، هماتوکریت و همچنین آمونیاک خون، خون‌گیری از سیاهرگ ساقه دمی هر ماهی توسط سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتری انجام شد.

عملکرد رشد و تغذیه

در هر بار نمونه‌برداری شاخص‌های رشد ماهیان شامل افزایش وزن (WG)، ضریب رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذا (FCR) و

برای شمارش تعداد گلبول‌های قرمز نیز از محلول رقیق کننده نات-هریک و لام نئوبار استفاده شد و در نهایت تعداد گلبول‌های قرمز با استفاده از رابطه ۷ محاسبه شد (Decie and Lewis, 1991).

رابطه ۷:

$$RBC (1/mm^3) = (\Sigma R_i \times 5) \times D \times A$$

ΣR_i : مجموعه گلبول‌های قرمز شمارش شده در پنج خانه متوسط (شامل چهار خانه متوسط حاشیه‌ای و یک خانه مرکزی) از خانه بزرگ مرکزی لام نئوبار؛ D: ضریب رقت (۲۰۰ برابر)؛ A: ضریب ارتفاع لامل از لام نئوبار (۱۰).

سنجش هموگلوبین به روش سیان مت‌هموگلوبین با استفاده از کیت تجاری (زیست‌شیمی، ایران) صورت گرفت. جذب نوری نمونه‌ها توسط اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد و مقدار هموگلوبین (Hb) از رابطه ۸ محاسبه شد (Decie and Lewis, 1991).

رابطه ۸:

$$Hb (g/dL) = A_{bs.T} \times 36.8$$

$A_{bs.T}$: جذب نوری نمونه.

میزان هماتوکریت (Hct) به روش میکروهماتوکریت اندازه‌گیری شد. بدین صورت

خوانده شد. بعد از دو دقیقه جذب نوری دوباره خوانده شد و بر اساس رابطه ۵ غلظت آمونیاک محاسبه شد (Knoph and Olsen, 1994).

رابطه ۵:

$$C_{NH_3} (\mu g/dL) = [A_s / A_{St}] \times C_{St}$$

A_s : اختلاف جذب نمونه؛ A_{St} : اختلاف جذب استاندارد؛ C_{St} : غلظت استاندارد (میکروگرم در دسی‌لیتر).

سنجش شاخص‌های خونی

در مطالعه حاضر شاخص‌های خون‌شناسی شامل تعداد گلبول‌های سفید و قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین سنجیده شد.

شمارش تعداد کل گلبول‌های سفید با استفاده از محلول رقیق کننده نات-هریک و لام نئوبار (هموسیتومتر) صورت گرفت. سپس تعداد گلبول‌های سفید (WBC) در میلی‌متر مکعب خون با استفاده از رابطه ۶ محاسبه شد (Decie and Lewis, 1991).

رابطه ۶:

$$WBC (1/mm^3) = (\Sigma W_i / 4) \times D \times A$$

ΣW_i : مجموعه گلبول‌های سفید شمارش شده در چهار خانه بزرگ حاشیه‌ای لام نئوبار؛ D: ضریب رقت (۲۰ برابر)؛ A: ضریب ارتفاع لامل از لام نئوبار (۱۰).

تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی تأثیر مکمل‌ها بر تنش آمونیاک در روزهای ۱۴ و ۳۰ تنش به طور جداگانه از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و برای مقایسه میانگین گروه‌های آزمایشی از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) استفاده شد. تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS Statistics نسخه ۲۲ انجام شد و نتایج به دست آمده به صورت میانگین \pm خطای استاندارد بیان شدند. نمودارها نیز در نرم‌افزار Microsoft Excel 2010 رسم شدند.

نتایج

عملکرد رشد و بازماندگی

در تمام طول دوره آزمایش ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده در تیمارهای حاوی ویتامین E و مخلوط ویتامین E و سلنیوم (E+Se) به طور معنی‌داری نسبت به سایر ماهیان وزن نهایی و افزایش وزن بیشتری داشتند ($P < 0.05$ ، جدول ۲)، اما در ماهیانی که در جیره غذایی آن‌ها از ویتامین E استفاده نشده بود، افزایش وزن محسوسی در هر دو مرحله نمونه‌برداری مشاهده نشد ($P > 0.05$ ، جدول ۲). با افزایش مدت زمان قرارگیری ماهیان در

که از لوله موئین هپارینه برای نمونه‌برداری خون استفاده شد. لوله‌های موئین حاوی خون به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس درصد هماتوکریت با استفاده از خط‌کش مخصوص خوانده شد (Decie and Lewis, 1991).

پس از اندازه‌گیری تعداد گلبول‌های قرمز و مقدار هموگلوبین و هماتوکریت، از آن‌ها برای محاسبه شاخص‌های گلبول قرمز شامل حجم متوسط گلبولی (Mean Corpuscular Volume: MCV)، وزن هموگلوبین داخل گلبولی (Mean Corpuscular Hemoglobin: MCH)، درصد هموگلوبین داخل گلبولی (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration: MCHC) طبق رابطه‌های ۹ تا ۱۱ استفاده شد (Klinger et al., 1996).

رابطه ۷:

$$MCV (\text{fL}) = [\text{Hct} / \text{RBC (per million)}] \times 10$$

رابطه ۸:

$$MCH (\text{pg}) = [\text{Hb} / \text{RBC (per million)}] \times 10$$

رابطه ۹:

$$MCHC (\%) = (\text{Hb} / \text{Hct}) \times 100$$

معرض آمونیاک مقادیر افزایش وزن به طور محسوس کاهش یافت. در دو دوره زمانی بیشترین مقدار افزایش وزن در تیمار E+Se و کمترین مقدار آن در تیمار C⁺ (شاهد مثبت) مشاهده شد ($P < 0.05$ ، جدول ۲).
 افزایش وزن، در ماهیان تیمارهای E و E+Se نسبت به سایر ماهیان بیشتر بود (به ترتیب $2/75 \pm 0/07$ و $2/80 \pm 0/05$ درصد در روز)، اما طی دوره دوم نمونه برداری، تنها ماهیان گروه C⁻ (شاهد منفی) به طور معنی داری بالاترین نرخ رشد ویژه ($1/37 \pm 0/09$ درصد در روز) را داشتند. ($P < 0.05$ ، جدول ۲).
 نتایج به دست آمده از محاسبه نرخ رشد ویژه (SGR) طی دوره اول نمونه برداری (روز ۱۴) مشابه نتایج به دست آمده از وزن نهایی و

جدول ۲: بررسی شاخص های رشد، تغذیه و میزان بازماندگی در ماهی قزل آالی رنگین کمان در تیمارهای مختلف تحت تنش آمونیاک با غلظت زیر کشنده (میانگین \pm خطای استاندارد)

زمان تنش	تیمار	وزن نهایی (g)	افزایش وزن (g)	نرخ رشد ویژه (%/day)	ضریب تبدیل غذا	بازماندگی (%)
روز ۱۴ تنش با آمونیاک (روز ۴۴ آزمایش)	C ⁻	31/15 ± 0/82 ^b	22/82 ± 0/30 ^b	2/34 ± 0/05 ^b	1/25 ± 0/01 ^a	100/00 ± 0/00 ^a
	C ⁺	31/01 ± 0/62 ^b	21/70 ± 0/28 ^b	2/18 ± 0/03 ^b	1/29 ± 0/03 ^a	80/00 ± 0/00 ^c
	E	40/11 ± 0/41 ^a	31/51 ± 0/48 ^a	2/75 ± 0/07 ^a	1/16 ± 0/02 ^b	96/66 ± 5/77 ^a
	Se	31/00 ± 0/76 ^b	22/32 ± 1/17 ^b	2/35 ± 0/07 ^b	1/27 ± 0/03 ^a	86/66 ± 5/77 ^{bc}
	E+Se	42/15 ± 1/31 ^a	33/21 ± 0/50 ^a	2/80 ± 0/05 ^a	1/08 ± 0/03 ^b	93/33 ± 5/77 ^{ab}
روز ۳۰ تنش با آمونیاک (روز ۶۰ آزمایش)	C ⁻	47/64 ± 0/57 ^{ab}	13/94 ± 0/91 ^a	1/37 ± 0/09 ^a	1/28 ± 0/00 ^b	96/66 ± 5/77 ^a
	C ⁺	39/00 ± 0/21 ^b	8/06 ± 0/22 ^b	0/81 ± 0/03 ^b	1/52 ± 0/02 ^{ab}	66/66 ± 5/77 ^c
	E	54/19 ± 0/42 ^a	14/04 ± 0/78 ^a	1/01 ± 0/06 ^b	1/53 ± 0/12 ^{ab}	93/33 ± 5/77 ^a
	Se	39/53 ± 0/95 ^b	8/72 ± 0/35 ^a	0/86 ± 0/07 ^b	1/66 ± 0/03 ^a	76/66 ± 5/77 ^{bc}
	E+Se	56/20 ± 1/05 ^a	15/33 ± 0/29 ^a	1/03 ± 0/02 ^b	1/69 ± 0/17 ^a	90/00 ± 0/00 ^{ab}

در هر ستون، وجود حروف غیرمشابه بیانگر وجود اختلاف معنی دار است ($P < 0.05$).

C⁻: ماهیان تغذیه شده با جیره پایه و بدون تنش آمونیاک؛ C⁺: ماهیان تغذیه شده با جیره پایه و با تنش آمونیاک؛ E: ماهیان تغذیه شده با ویتامین E و با تنش آمونیاک؛ Se: ماهیان تغذیه شده با نانوسلنیوم و با تنش آمونیاک؛ E+Se: ماهیان تغذیه شده با ویتامین E و نانوسلنیوم و با تنش آمونیاک.

آمونیاک پلاسماي خون خود را پايين نگه دارند، اما سطح آمونیاک در پلاسماي خون اين ماهيان به طور معنی‌داری بالاتر از گروه C⁻ بود ($P < 0.05$ ، شکل ۱). در روز ۳۰ پس از تنش همانند نتایج به دست آمده در روز ۱۴، تنها ماهيان تغذیه شده با مکمل E+Se توانستند سطح آمونیاک پلاسماي خون خود را در سطح آمونیاک پلاسماي ماهيان گروه C⁻ حفظ کنند (شکل ۱).

سنجش شاخص‌های خونی

تعداد گلبول سفید (WBC) در تیمار C⁻ و E+Se در کل دوره آزمایشی در سطحی مشابه هم تقریباً ثابت باقی ماند، در صورتی که ماهيان در تیمارهای دیگر تعداد گلبول‌های سفید خود را نسبت به آن دو تیمار به طور معنی‌داری افزایش دادند. در هر دو نمونه‌برداری ماهيان گروه C⁺ دارای بالاترین تعداد گلبول سفید بودند ($P < 0.05$ ، شکل ۲-الف).

تعداد گلبول قرمز (RBC) طی دوره اول آزمایش در ماهيان گروه E+Se افزایش معنی‌داری نسبت به گروه‌های دیگر نشان داد ($P < 0.05$). اما طی دوره دوم نمونه‌برداری تعداد گلبول‌های قرمز در این تیمار کمتر شد، با این وجود نسبت به تیمارهای دیگر تحت تنش

کمترین ضریب تبدیل غذایی (FCR) برای ماهيان تغذیه شده با جیره‌های حاوی E و E+Se طی دوره اول نمونه‌برداری مشاهده شد ($P < 0.05$ ، جدول ۲).

همواره ماهيان گروه C⁻ در تمام طول دوره آزمایش بیشترین بازماندگی را نشان دادند. ماهيان گروه E و E+Se در تمام طول آزمایش پس از ماهيان گروه C⁻ دارای بالاترین بازماندگی بودند ($P < 0.05$ ، جدول ۲).

غلظت آمونیاک در خون

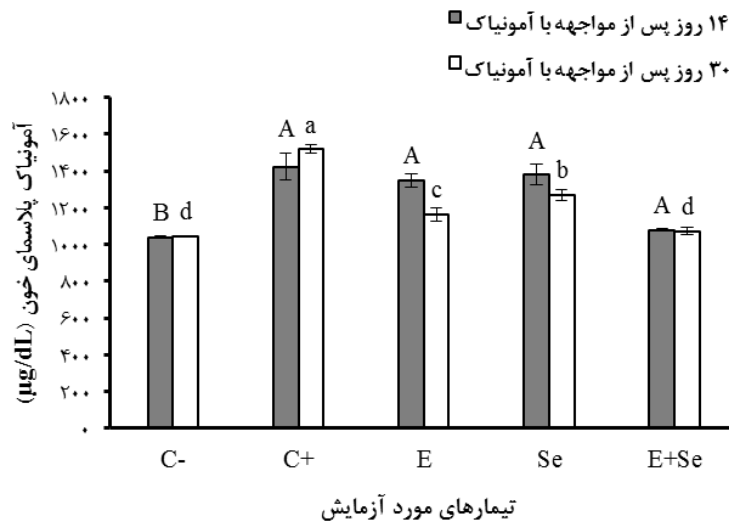
نتایج نشان داد که میزان آمونیاک در پلاسماي خون ماهيان قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تنش آمونیاک (تیمارهای C⁺، E و Se)، به استثنای ماهيان تیمار E+Se، پس از ۱۴ روز نسبت به گروه C⁻ به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد ($P < 0.05$ ، شکل ۱). بیشترین میزان آمونیاک پلاسما در ماهيان گروه C⁺ مشاهده شد. تنها ماهيان تیمار E+Se توانستند میزان آمونیاک خود را در سطحی مشابه گروه C⁻ نگه دارند و افزایش آمونیاک در پلاسماي این گروه از ماهيان مشاهده نشد. در بازه زمانی روز ۱۴ تا ۳۰ تنش روزهای (۴۴ تا ۶۰ آزمایش) ماهيان تغذیه شده با مکمل‌های ویتامین E، Se هر یک به طور جداگانه، توانستند تا حدی میزان

حالی که ماهیان گروه C⁺ همواره دارای کمترین میزان هموگلوبین بودند (شکل ۲-ج).

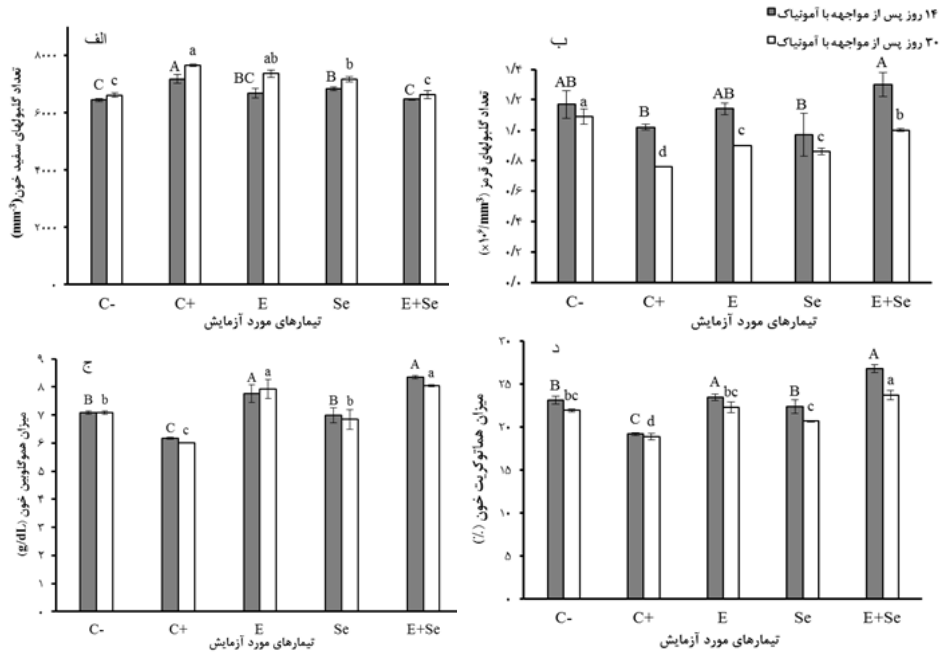
درصد هماتوکریت طی دوره اول آزمایش در ماهیان گروه E و E+Se نسبت به گروه ماهیان C⁻ به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$ ، شکل ۲-د).

آمونیاک تعداد گلبول‌های قرمز بیشتری در آن‌ها مشاهده شد (شکل ۲-ب).

مقدار هموگلوبین در تیمارهای E و E+Se در تمام طول دوره آزمایش نسبت به گروه C⁻ به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$ ، در

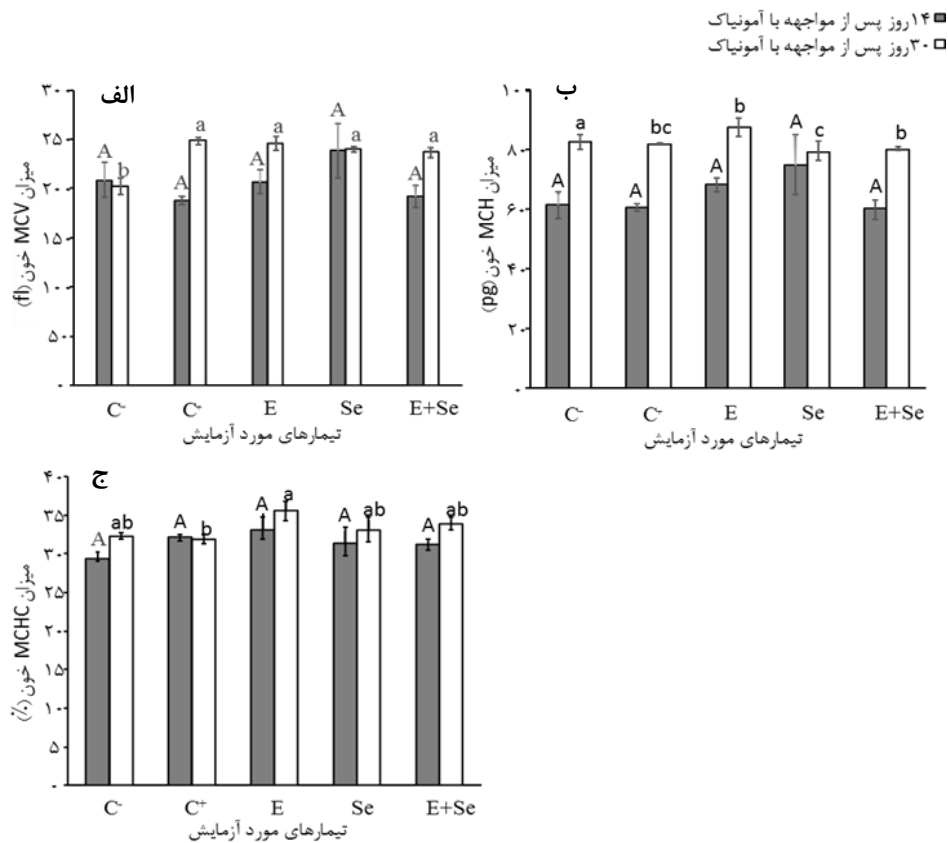


شکل ۱: بررسی میزان غلظت آمونیاک در پلاسماي خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف تحت تنش آمونیاک با غلظت زیر کشنده (میانگین \pm خطای استاندارد). حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در هر دوره نمونه‌برداری است. C⁻: ماهیان تغذیه شده با جیره پایه و بدون تنش آمونیاک؛ C⁺: ماهیان تغذیه شده با جیره پایه و با تنش آمونیاک؛ E: ماهیان تغذیه شده با ویتامین E و با تنش آمونیاک؛ Se: ماهیان تغذیه شده با نانوسلنیوم و با تنش آمونیاک؛ E+Se: ماهیان تغذیه شده با ویتامین E و نانوسلنیوم و با تنش آمونیاک.



شکل ۲: پارامترهای خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف تحت تنش آمونیاک با غلظت زیر کشنده (میانگین \pm خطای استاندارد). الف) تعداد گلبول‌های سفید خون. ب) تعداد گلبول‌های قرمز خون. ج) میزان هموگلوبین. د) میزان هماتوکریت. حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در هر دوره نمونه‌برداری است. C⁻: ماهیان تغذیه شده با جیره پایه و بدون تنش آمونیاک؛ C⁺: ماهیان تغذیه شده با جیره پایه و با تنش آمونیاک؛ E: ماهیان تغذیه شده با ویتامین E و با تنش آمونیاک؛ Se: ماهیان تغذیه شده با نانوسلنیوم و با تنش آمونیاک؛ E+Se: ماهیان تغذیه شده با ویتامین E و نانوسلنیوم و با تنش آمونیاک.

میزان MCV طی دوره اول نمونه‌برداری در نمونه‌برداری در تمامی تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه C⁻ افزایش یافت ($P < 0.05$ ، شکل ۳-الف).
 تمامی تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه C⁻ تغییر نکرد ($P > 0.05$)، اما در طول دوره دوم



شکل ۳: شاخص‌های خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف تحت تنش آمونیاک با غلظت زیر کشنده (میانگین \pm خطای استاندارد). الف) شاخص MCV. ب) شاخص MCH. ج) شاخص MCHC. د) میزان هماتوکریت. حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در هر دوره نمونه‌برداری است. C⁻: ماهیان تغذیه شده با جیره پایه و بدون تنش آمونیاک؛ C⁺: ماهیان تغذیه شده با جیره پایه و با تنش آمونیاک؛ E: ماهیان تغذیه شده با ویتامین E و با تنش آمونیاک؛ Se: ماهیان تغذیه شده با نانوسلنیوم و با تنش آمونیاک؛ E+Se: ماهیان تغذیه شده با ویتامین E و نانوسلنیوم و با تنش آمونیاک.

میزان MCH در مرحله اول نمونه‌برداری بین تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$), در حالی که در مرحله دوم نمونه‌برداری در تیمارهای E و E+Se نسبت به گروه‌های آزمایشی دیگر در بالاترین مقدار مشاهده شد ($P < 0.05$, شکل ۳-ب). درصد غلظت هموگلوبین قرمز (MCHC) در مرحله اول نمونه‌برداری بین تیمارهای مختلف تفاوت

گرفت و بهبود شاخص‌های رشد و ضریب تبدیل غذایی در ماهیانی که با ویتامین E و E+Se تغذیه کرده بودند دیده شد، اما رشد ماهیان تغذیه شده با نانوذرات سلنیوم و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت (طهماسبی، ۱۳۹۳). در همین راستا، بادکنک‌ماهی (*Takifugu obscurus*) تغذیه شده با ویتامین E تحت تنش آمونیاک، افزایش وزن و نرخ رشد ویژه بهتری نشان را داد (Cheng et al., 2015). در مطالعه حاضر، بهترین میزان SGR و FCR طی دوره اول نمونه‌برداری در ماهیان گروه E و E+Se مشاهده شد اما در انتهای دوره آزمایش ماهیان گروه C⁻ از نظر این دو شاخص مطلوب‌ترین وضعیت را داشتند. رشد بیشتر ماهیان گروه C⁻ نسبت به ماهیان تغذیه شده با E+Se را می‌توان به این دلیل دانست که ماهیان گروه E+Se به دلیل قرار گرفتن در معرض آمونیاک و ترشح هورمون‌های کورتیکواستروئیدی انرژی خود را برای تطابق خود با تغییرات فیزیولوژیکی ایجاد شده صرف کردند. به علاوه، مشاهده شده است که استفاده از سلنیوم به میزان ۱ و ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره ماهی *Pangasianodon hypophthalmus* تحت تنش باکتری *Aeromonas veronii* باعث افزایش رشد و بقا

معنی‌داری را نشان نداد ($P > 0.05$ ، شکل ۳-ج)، اما در دوره دوم بیشترین میزان آن در تیمار E مشاهده شد.

بحث

با توجه به این که بیشترین افزایش وزن در انتهای دوره آزمایش در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تیمارهای E+Se (۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین E و ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوسلنیوم) و E (ویتامین E) مشاهده شد و همچنین ماهیان گروه E+Se بیشترین بازماندگی را پس از گروه C⁻ (شاهد منفی، تغذیه شده با جیره بدون مکمل و بدون مواجهه با تنش آمونیاک) داشتند، می‌توان گفت عملکرد رشد در ماهیان گروه‌های E و به ویژه E+Se بهتر بود. موافق با نتایج مطالعه حاضر، در گونه‌ای از گربه‌ماهی (*Pelteobagrus vachelli*) تغذیه شده با ۴۰۰ میلی‌گرم ویتامین E در کیلوگرم غذا و تحت تنش با میزان آمونیاک بالا، عملکرد رشد و پاسخ ایمنی بالاتری مشاهده شد (Li et al., 2013). در مطالعه دیگری، تاثیر ویتامین E به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا و نانوسلنیوم به میزان ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا به صورت جداگانه و ترکیبی در ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) مورد مطالعه قرار

عنوان یک کوفاکتور آنزیم‌های خانواده گلوکاتایون پراکسیداز، با کاتالیز کردن واکنش کاهش پراکسیدها شامل پراکسید هیدروژن میزان پراکسیداسیون چربی را کاهش می‌دهد و از ماهیان در برابر تنش‌های محیطی مانند افزایش آمونیاک حفاظت می‌کند. به طور کلی در مسمومیت مزمن با آمونیاک (مقادیر کمتر از حد کشنده) معمولاً میزان رشد و درصد بقای ماهیان کاهش می‌یابد و ماهیان نسبت به عوامل عفونی حساس‌تر می‌شوند (Soderberg, 1985; Ghasemi et al., 2018). در همین راستا در مطالعه حاضر ماهیان گروه C^+ (شاهد مثبت، تغذیه شده با جیره بدون مکمل و مواجه شده با تنش آمونیاک) دارای کمترین بازماندگی و پایین‌ترین شاخص‌های رشد بودند. حضور ماهی به مدت طولانی در مواجهه با آمونیاک و محصولات جانبی آن یعنی نیتريت و نیترات منجر به افزایش مصرف اکسیژن، تنفس سریع‌تر ماهی و جلوگیری از رشد سریع ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود (Blackburn and Clarke, 1990). از طرف دیگر پیش‌تر تایید شده بود که برای بهبود وضعیت رشد و تغذیه می‌توان از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی در جیره غذایی استفاده کرد (Kucukbay et al., 2009; Hamre, 2011).

در مقایسه با تیمارهای شاهد بدون مصرف سلنیوم شد (Kumar and Singh, 2019). در راستای مطالعه حاضر که تاثیر هم‌افزایی ویتامین E با نانوسلنیوم را تایید می‌کند، مطالعات دیگری نیز اثر هم‌افزایی نانوسلنیوم با ویتامین E و ویتامین‌های دیگر را تایید کردند (Khan et al., 2017). در مطالعه‌ای مشاهده شد که غنی‌سازی غذای ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) با ویتامین‌های E و C و سلنیوم باعث افزایش وزن در ماهی شد (Kim and Mahan, 2003). رشد بیشتر ماهیان تغذیه شده با ویتامین‌های E و C به همراه سلنیوم در این مطالعه می‌تواند بیانگر اثرات مفید ریزمغذی‌ها در بهبود شاخص‌های رشد ماهی باشد (Martins et al., 2008; Khan et al., 2016). نتایج به دست آمده از مطالعات Nazari و همکاران (۲۰۱۷) نشان داده است که عملکرد رشد در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سلنیوم بهتر از گروه‌های شاهد بدون سلنیوم بود. چون سلنیوم یک ترکیب ساختاری همراه با خواص آنتی‌اکسیدانی فیزیولوژیک است، به عنوان بهبود دهنده رشد عمل می‌کند و باعث جلوگیری از تجمع چربی در کبد ماهیان می‌شود (Talas et al., 2007; Orun et al, 2011). سلنیوم به

با توجه به نتایج به دست آمده از سنجش آمونیاک در پلاسمای خون ماهیان مورد مطالعه، به جز ماهیان تیمار E+Se و گروه C⁻، این شاخص در سایر تیمارهای مورد آزمایش به طور معنی‌داری افزایش یافت. تنها ماهیان تغذیه شده با مکمل E+Se توانستند سطح آمونیاک پلاسمای خون خود را تا انتهای دوره آزمایش در سطح آمونیاک پلاسمای ماهیان گروه C⁻ حفظ کنند. هنگامی که غلظت آمونیاک غیریونیزه (NH₃) در آب افزایش می‌یابد، به دلیل آن که اکثر غشاهای زیستی نسبت به NH₃ نفوذپذیر هستند، آمونیاک می‌تواند از طریق غشای سلولی آبشش انتشار یافته، وارد سلول‌ها شود و همچنین چون دفع آن از بدن ماهی کاهش می‌یابد، در نتیجه سطح آمونیاک در پلاسمای خون بالا می‌رود (Randall and Tsui, 2002). آمونیاک باعث ایجاد تنش در ماهی می‌شود که شاخص آن افزایش آدرنالین، نورآدرنالین و کورتیکواستروئیدهای پلاسما است. به همین دلیل افزایش آمونیاک می‌تواند باعث کاهش فعالیت سیستم ایمنی و کاهش تمایل ماهی به غذا شود که خود عاملی برای مستعد شدن ماهی نسبت به بیماری‌های مختلف است (Jeney et al., 1992). در مطالعه حاضر نیز میزان آمونیاک پلاسمای خون در ماهیان گروه C⁺ در انتهای دوره آزمایش نسبت به ماهیان گروه‌های دیگر بالاتر بود.

مطالعات خون‌شناسی انجام شده در مورد اثرات تغذیه‌ای (Rehulka, 2000)، بیماری‌های عفونی و آلاینده‌ها (Rehulka, 2002) بیان می‌کند که تغییرات سلول‌های خونی شاخصی مهم و قابل اعتماد از اثر منابع مختلف تنش هستند که در تعیین سلامت و بیماری ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرند (Houston and Rupert, 1997; Dorafshan et al., 2007). گلبول‌های سفید خون شاخص بازده استفاده از ویتامین‌ها و مکمل‌ها هستند. معمولاً گلبول‌های سفید در سیستم ایمنی دخالت دارند و در مواجهه با عامل تنش‌زا، تعداد و درصد انواع آن‌ها دستخوش تغییر می‌شود (Clauss et al., 2008) ویتامین E به عنوان یک آنتی‌اکسیدان بالقوه و مهم از گلبول‌های سفید خون محافظت می‌کند (Sahoo and Mukherjee, 2002). غنی‌سازی غذا با سلنیوم نیز باعث افزایش تولید گلبول‌های سفید خون می‌شود (Martins et al., 2008; Khan et al., 2016). تعداد گلبول‌های سفید در ماهیان قرار گرفته در معرض آمونیاک به استثنا گروه E+Se به طور معنی‌داری نسبت به گروه ماهیان C⁻ بالاتر بود. در این بین ماهیان گروه C⁺ همواره در تمام

نمونه‌برداری در ماهیان تیمار E و E+Se بیشترین مقدار را داشت و کمترین مقدار آن در ماهیان C⁺ مشاهده شد. در مطالعه‌ای، به کار بردن توام ویتامین C و سلنیوم باعث ارتقای شاخص‌های خونی از جمله افزایش تعداد گلبول‌های قرمز میزان هموگلوبین و درصد هماتوکریت در ماهی *Tor putitora* (Hamilton, 1822) شد، به طوری که اثبات شد این دو ریزمغذی باعث مقاومت و یکپارچگی سلول‌های خونی می‌شوند و طی متابولیسم طبیعی و شرایط تنش‌زا مانع همولیز آن‌ها می‌شوند (Khan et al., 2017). در مطالعه‌ای روی ماهی کپور معمولی در مواجهه با آمونیاک، میزان هموگلوبین آن‌ها به طور چشم‌گیری کاهش یافت که می‌تواند به دلیل افزایش مصرف اکسیژن باشد (Tilak et al., 2002). از طرف دیگر، پژوهشگران گزارش کردند که ویتامین E از اکسیداسیون PUFA (اسیدهای چرب غیراشباعی با چند پیوند دوگانه) در غشای گلبول‌های قرمز خون جلوگیری می‌کند و دارای پتانسیل بالقوه‌ای برای حفاظت سلول‌ها در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو است، به طوری که باعث تحریک اریتروپوئیزیس می‌شود و سطح هموگلوبین خون را نیز افزایش می‌دهد (Jelkmann et al., 1997). همچنین در

طول دوره آزمایش بالاترین تعداد گلبول سفید را نشان دادند. این شاخص تنها در ماهیان گروه E+Se در سطحی مشابه گروه C⁻ تقریباً ثابت باقی ماند. برخلاف نتایج به دست آمده از شمارش گلبول‌های سفید در گروه C⁺ ماهیان این گروه دارای کمترین تعداد گلبول‌های قرمز در تمام طول دوره آزمایش بودند. با وجود این که افزودن آمونیاک موجب کاهش تعداد گلبول‌های قرمز در بازه ۱۴ تا ۳۰ روز پس از قرار گرفتن در معرض تنش آمونیاک شد، تنها ماهیان گروه E+Se دارای بالاترین تعداد گلبول‌قرمز در انتهای دوره آزمایش بودند. کاهش تعداد گلبول‌های قرمز می‌تواند ناشی از کاهش تولید گلبول‌های قرمز خون باشد و یا در اثر عوامل مختلف چون عوامل عفونی، مسمومیت با آلاینده‌های زیست‌محیطی و عوامل تنش‌زا به ویژه کمبود اکسیژن ایجاد شود (Elahee and Bhagwant, 2007). بیشترین تعداد گلبول‌های سفید و کمترین تعداد گلبول‌های قرمز در ماهیان گروه C⁺ را می‌توان به دلیل بیشترین غلظت آمونیاک مشاهده شده در خون این ماهیان دانست که متعاقباً سبب افزایش ترشح هورمون کورتیزول می‌شود. میزان هموگلوبین و هماتوکریت در هر دو مرحله

افزایش یافت. در حالی که مقدار MCH و MCHC در بین تیمارهای مختلف تفاوت قابل ملاحظه‌ای را نشان نداد. در مطالعه روی ماهی کلمه خزری مشاهده شد که با افزایش غلظت آمونیاک مقادیر هماتوکریت و هموگلوبین کاهش یافت، اما تغییری در سایر شاخص‌های خونی مانند MCV، MCH و MCHC مشاهده نشد (مازندرانی و همکاران، ۱۳۹۴). در نتیجه، عدم تغییر در این شاخص‌ها در مواجهه با آمونیاک می‌تواند به این علت باشد که غلظت‌های حاد آمونیاک در بچه‌ماهیان کلمه طی ۳۰ روز مواجهه، شرایط التهابی ایجاد نکرد. در مطالعه دیگری که روی ماهی کپور معمولی انجام شد در اثر قرار گرفتن این ماهی در معرض آمونیاک، میزان MCV، MCH و MCHC کاهش یافت و دلیل آن را افزایش گلبول‌های نابالغ در اثر سم وارد شده به بدن این ماهیان دانستند (Dorafshan et al., 2010). در بررسی Shin و همکاران (۲۰۱۶)، قرار دادن صخره‌ماهی (*Sebastes schlegelii*) در معرض آمونیاک و افزایش دما باعث کاهش معنی‌دار تعداد گلبول‌های قرمز و سفید، هموگلوبین، هماتوکریت، MCV، MCH و MCHC شد. در مطالعه حاضر، دلیل افزایش MCV را در مرحله دوم (روز ۳۰ تنش) در تیمارهای مواجهه شده

مطالعه دیگری نشان داده شده است که ویتامین E می‌تواند به عنوان یک عامل اریتروپوئیتیک با استفاده از کاهش میزان حساسیت گلبول‌های قرمز، برای کاهش همولیز گلبول‌های قرمز نابالغ مورد استفاده قرار گیرد (Jilani and Iqbal, 2011). در مطالعه‌ای، طی بررسی تأثیر غلظت‌های افزایشی فلز نیکل بر گربه‌ماهی (*Silurus glanis*)، کاهش معنی‌داری در تعداد گلبول‌های سفید و قرمز این ماهیان مشاهده شد. در این مطالعه، علت کاهش گلبول‌های قرمز خون، افزایش هورمون کورتیزول به هنگام قرارگیری در معرض نیکل عنوان شد (Sobecka, 2001). Thangam و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای روی سمیت آمونیاک بر شاخص‌های خونی کپور معمولی آب شیرین گزارش کردند که تعداد گلبول‌های قرمز و سفید این ماهی در طی ۷ تا ۳۵ روز قرارگرفتن در معرض غلظت زیر کشنده آمونیاک به طور معنی‌داری کاهش یافت.

در مرحله اول نمونه‌برداری (روز ۱۴ مواجهه با آمونیاک) تفاوت چندانی در میزان شاخص‌های MCV، MCH و MCHC مشاهده نشد، اما در مرحله دوم نمونه‌برداری (روز ۳۰ مواجهه با آمونیاک) مقدار MCV در ماهیانی که در مواجهه با آمونیاک قرار داشتند،

گیرند به طور مثبتی اثر هم را تقویت می‌کنند و تا حدود زیادی خسارات وارد شده از طریق آلاینده‌های محیطی مانند آمونیاک را جبران می‌کنند.

از این رو پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آینده به بررسی میزان مصرف انرژی طی سازگاری در برابر تنش آمونیاک در این ماهیان پرداخته شود. همچنین می‌توان اثرات تلفیقی ویتامین E و نانوسلنیوم را در مواجهه با آلاینده‌های محیطی و بیماری‌های رایج در سیستم‌های پرورش مدار بسته مورد مطالعه قرار داد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشگاه گنبدکاووس به جهت حمایت مالی برای انجام این پژوهش قدردانی می‌شود. همچنین از استاد محترم جناب آقای دکتر حمیدرضا جوشقانی مدیر و موسس آزمایشگاه کاوش گرگان و همچنین خانم‌ها مهندس رحیمه رضوی و مهندس زینب صداقت و جناب آقای مهندس محمد خادمی سپاسگزاری می‌گردد.

با آمونیاک، می‌توان این طور در نظر گرفت که در اثر افزایش آمونیاک محیط و آمونیاک پلاسمای خون، مصرف اکسیژن در ماهیان افزایش یافت و با کمبود اکسیژن مواجهه شدند. با توجه به کاهش تعداد گلبول‌های قرمز، این ماهیان برای مبارزه با آن تعداد گلبول‌های قرمز خود را افزایش داده تا بتوانند کمبود اکسیژن را تحمل کنند.

در مجموع، ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره دارای ویتامین E و ترکیب E+Se مقاومت بیشتری را در مواجهه با آمونیاک نشان دادند و در پایان دوره آزمایش تقریباً تمامی شاخص‌های مورد بررسی در سطحی مشابه یا بهتر از گروه شاهد بودند. گروه‌های دیگر ماهیان با وجود این که تلاش کردند خود را با محیط جدید سازگار کنند، اما این تلاش با مصرف انرژی زیادی همراه شد و تا پایان دوره آزمایش رشد کمتری داشتند. در نتیجه، دستاوردهای مطالعه حاضر تایید می‌کند زمانی که هر دو مکمل آنتی‌اکسیدانی ویتامین E و سلنیوم با غلظت مشخص به عنوان ریزمغذی در غذای ماهی مورد استفاده قرار

منابع

- ابراهیمی ع.، علی‌شیری م. و ملکی‌پور پ. ۱۳۹۶. تعیین غلظت کشنده آمونیاک و محدوده قابل تحمل pH برای ماهی گورخری. مجله بوم‌شناسی آبزیان، ۷(۲): ۱۴۵-۱۵۲.
- طهماسبی د. ۱۳۹۳. تغذیه با جیره حاوی ویتامین (E)، آلفا توکوفرول استات و نانوذرات سلنیوم بر شاخص‌های رشد، بقا، ترکیب لاشه و میزان آنزیم گلوکاتایون پروکسیداز و مالون‌دی‌آلدهید کل بدن در ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*). پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۱۱۴ ص.
- علیزاده م.، خانجانی م.ح.، انصاری ر. و رفیعی‌پور ا. ۱۳۹۵. بررسی ذخیره
- Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Aquatic Toxicology*, 164: 61-71.
- Clauss T.M., Dove A.D.M. and Arnold J.E. 2008. Hematologic disorders of fish. *Veterinary Clinic of North America Exotic Animal Practice*, 11(3): 445-462.
- Dorafshan S., Kalbassi M.R., Pourkazemi M., Amiri B.M. and Karimi S.S. 2007. Effect of triploidy on the Caspian salmon *Salmo trutta caspius* hematology. *Fish Physiology and Biochemistry*, 34(3): 195-200.
- Aksakal E., Ekinci D., Erdogan O., Beydemir S., Alim Z. and Ceyhan S.B. 2011. Increasing stocking density causes inhibition of metabolic-antioxidant enzymes and elevates mRNA levels of heat shock protein 70 in rainbow trout. *Livestock Science*, 141: 69-75.
- Blackburn J. and Clarke W.C. 1990. Lack of density effect on growth and smolt quality in zero-age coho salmon. *Aquacultural Engineering*, 9(2): 121-130.
- Bonga S.W. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77: 591-625.
- Cheng C., Yang F.F., Ling R.Z., Liao S.A. and Wang A.L. 2015. ویتامین‌های A و E در تخم مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تحت تاثیر سطوح مختلف آستاگزانتین مصنوعی و جلبکی (*Haematococcus pluvialis*). مجله علمی شیلات ایران، ۴(۲۵): ۲۷-۳۹.
- مازندرانی م.، سوداگر م. و ذکریایی ح. ۱۳۹۴. اثر مواجهه طولانی مدت غلظت‌های تحت کشنده آمونیاک غیریونیزه بر شاخص‌های رشد و خون‌شناسی بچه ماهیان کلمه خزری (*Rutilus caspicus*). نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی، ۳(۱): ۵۳-۶۴.

- Dorafshan S., Kalbassi M.R., Karimi S.S. and Rahimi K. 2010.** Study of some haematological indices of diploid and triploid rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Yakhteh Medical Journal*, 11(4): 442–447.
- Decie S.I.V. and Lewis S.M. 1991.** *Practical Hematology*. Churchill Livingstone, UK. 629P.
- Di Giulio R.T. and Meyer J.N. 2008.** Reactive oxygen species and oxidative stress. P: 273–324. In: Di Giulio R.T. and Hinton D.E. (Eds.). *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, Boca Raton.
- Elahee K.B. and Bhagwant S. 2007.** Hematological and gill histopathological parameters of three tropical fish species from a polluted lagoon on the west coast of Mauritius. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 68(3): 361–371.
- Elgaml S.A., Khalil R., Hashish E. and El-Murr A. 2015.** Protective effects of selenium and alpha-tocopherol against lead induced hepatic and renal toxicity in *Oreochromis niloticus*. *Journal of Aquaculture*, 6: 61–71.
- Emerson K., Russo R.C., Lund R.E. and Thurston R.V. 1975.** Aqueous ammonia equilibrium calculations: Effect of pH and temperature. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 32(12): 2379–2383.
- Ghasemi Z., Sourinejad I., Kazemian H. and Rohani S. 2018.** Application of zeolites in aquaculture industry: A review. *Reviews in Aquaculture*, 10(1): 75–95.
- Gholipour Kanani H., Mirzargar S. S., Soltani M., Ahmadi M., Arabshahifar A., Bahona A. and Yousefi P. 2011.** Anesthetic effect of tricaine methanesulfonate, clove oil and electroanesthesia on lysozyme activity of *Oncorhynchus mykiss*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 10: 393–402.
- Halver J.E. 2003.** The vitamins. P: 61–141. In: Halver J.E. and Hardy R.W. (Eds.). *Fish Nutrition*. Academic Press, USA.
- Hamilton S.J. 2004.** Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Science of the Total Environment*, 326: 1–31.
- Hamre K. 2011.** Metabolism, interactions, requirements and functions of vitamin E in fish. *Aquaculture Nutrition*, 17(1): 98–115.
- Han D., Xie S., Liu M., Xiao X., Liu H., Zhu X. and Yang Y. 2011.** The effects of dietary selenium on growth performances, oxidative stress and tissue selenium concentration of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Aquaculture Nutrition*, 17: 741–749.

- Harlioglu M.M. and Farhadi A. 2017.** Iranian fisheries status: An update (2004-2014). *Fisheries and Aquaculture Journal*, 8(192): 1–8.
- Houston A.H. and Rupert R. 1997.** Immediate response of hemoglobin system of gold fish (*Carassius auratus*) to temperature change. *Canadian Journal of Zoology*, 54: 173–174.
- Jelkmann W., Pagel H., Hellwig T. and Fandrey J. 1997.** Effects of antioxidant vitamins on renal and hepatic erythropoietin production. *Kidney International*, 51: 497–501.
- Jeney Z.S., Nemcsok J., Jeney G. and Olah J. 1992.** Acute effect of sublethal ammonia concentrations on common carp. II. Effect of ammonia on blood plasma transaminases (GOT, GPT), G1DH enzyme activity, and ATP value. *Aquaculture*, 104(1-2): 149–156.
- Jilani T. and Iqbal M.P. 2011.** Vitamin E supplementation enhances hemoglobin and erythropoietin levels in mildly anemic adults. *Acta Haematologica*, 119: 45–47.
- Khan K., Zuberi A., Nazir N., Ullah I. and Jamil Z. 2017.** Synergistic effects of dietary nano selenium and vitamin C on growth, feeding, and physiological parameters of mahseer fish (*Tor putitora*). *Aquaculture Reports*, 5: 70–75.
- Khan K.U., Zuberi A., Nazir S., Fernandes J.B.K., Jamil Z. and Sarwar H. 2016.** Effects of dietary selenium nanoparticles on physiological and biochemical aspects of juvenile *Tor putitora*, Turkish. *Journal of Zoology*, 40: 704–712.
- Kim Y.Y. and Mahan D.C. 2003.** Biological aspects of selenium in farm animals. *Asian-Australas Journal of Animal Science*, 16: 435–444.
- Klinger R.C., Blaer V.S. and Echevarria C. 1996.** Effects of dietary lipid on the hematology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 147: 225–233.
- Knoph M.B. and Olsen Y.A. 1994.** Subacute toxicity of ammonia to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater: Effects on water and salt balance, plasma cortisol and plasma ammonia levels. *Aquatic Toxicology*, 30(4): 295–310.
- Knoph M.B. and Thorud K. 1996.** Toxicity of ammonia to Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater-effects on plasma osmolality, ion, ammonia, urea and glucose levels and hematologic parameters. *Comparative Biochemistry Physiology A*, 113(4): 375–381.
- Kucukbay F., Yazlak H., Karaca I., Sahin N., Tuzcu M., Cakmak M. and Sahin K. 2009.** The effects of dietary organic or inorganic selenium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under

- crowding conditions. *Aquaculture Nutrition*, 15: 569–576.
- Kumar N. and Singh N.P. 2019.** Effect of dietary selenium on immuno-biochemical plasticity and resistance against *Aeromonas veronii* biovar *sobria* in fish reared under multiple stressors. *Fish and Shellfish Immunology*, 84: 38–47.
- Li M., Chen L., Qin J.G., Li E., Yu N. and Du Z. 2013.** Growth performance, antioxidant status and immune response in darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli* fed different PUFA/vitamin E dietary levels and exposed to high or low ammonia. *Aquaculture*, 406: 18–27.
- Mahanand S.S., Moulick S. and Rao P.S. 2013.** Optimum formulation of feed for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), with biofloc as a component. *Aquaculture International*, 21(2): 347–360.
- Martins M.L., Miyazaki D.M.Y., Moraes F.R.D., Ghiraldelli L., Adamante W.D.B. and Mourino J.L.P. 2008.** Vitamin C and E supplemented diet influences the acute inflammatory response in Nile tilapia. *Ciencia Rural*, 38(1): 213–218.
- Motnikar S., Marsan R. and Tetreault F. 1998.** Conditioning green sea urchins in tanks: Water quality tolerance limits. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada*, 98(2): 96–98.
- Naderi M., Keyvanshokooha S., Salatia A.P. and Ghaedi A. 2015.** Combined or individual effects of dietary vitamin E and selenium nanoparticles on humoral immune status and serum parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under high stocking density. *Aquaculture*, 474: 40–47.
- Navarre O. and Halver J.E. 1989.** Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. *Aquaculture*, 79: 207–221.
- Nazari K., Shamsaie M., Eila N., Kamali A. and Sharifpour I. 2017.** The effects of different dietary levels of organic and inorganic selenium on some growth performance and proximate composition of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 16(1): 238–251.
- Ndong D., Chen Y.Y., Lin Y.H., Vaseeharan B. and Chen J.C. 2007.** The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures. *Fish and Shellfish Immunology*, 22: 686–694.
- Orun I., Talas Z.S. and Alkan A. 2011.** Modulating effect of selenium on gills of fish exposed to heavy metals. *Fresenius Environmental Bulletin*, 20: 104–108.

- Randall D.J. and Tsui T.K. 2002.** Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin*, 45: 17–23.
- Rehulka J. 2000.** Influence of astaxanthin on growth rate, condition and some blood indices of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 190: 27–47.
- Rehulka J. 2002.** Aeromonas causes severe skin lesions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Clinical pathology, hematology and biochemistry. *Acta Veterinaria Brno*, 71: 351–360.
- Rezvanfar M.A., Shahverdi A.R., Ahmadi A., Baeri M., Mohammadirad A. and Abdollahi M. 2013.** Protection of cisplatin-induced spermatotoxicity, DNA damage and chromatin abnormality by selenium nano-particles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 266: 356–365.
- Rider S.A., Davies S.J., Jha A.N., Fisher A.A., Knight J. and Sweetman J.W. 2009.** Supra-nutritional dietary intake of selenite and selenium yeast in normal and stressed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Implications on selenium status and health responses. *Aquaculture*, 295: 282–291.
- Shin K.W., Kiml S., Kiml J., Hwang S.D. and Kang J. 2016.** Toxic effects of ammonia exposure on growth performance, hematological parameters, and plasma components in rockfish, *Sebastes schlegelii*, during thermal stress. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 19: 44–52.
- Sobecka E. 2001.** Changes in the iron leveling the organs and tissues of wells catfish, *Silurs glanis* L., Caused by nickel. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 31(2): 127–143.
- Soderberg R.W. 1985.** Histopathology of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, exposed to diurnally fluctuating unionized ammonia levels in static water ponds. *Journal of Fish Diseases*, 8(1): 57–64.
- Stoskopf M.K. 1993.** *Fish Medicine*. W.B. Saunders Co. Philadelphia. 882P.
- Talas Z.S., Orun I., Ozdemir I., Erdogan K., Alkan A. and Yilmaz I. 2007.** Antioxidative role of selenium against the toxic effect of heavy metals (Cd^{2+} , Cr^{3+}) on liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Fish Physiology and Biochemistry*, 34: 217–222.
- Thangam Y., Perumayee M., Jayaprakash S., Umavathi S. and Basheer S.K. 2014.** Studies of ammonia toxicity on haematological parameters to freshwater fish *Cyprinus carpio* (common carp). *International Journal of Current Microbiology*

- and Applied Sciences, 3(12): 535–542.
- Tilak K.S., Lakshmi S.J. and Susan T.A. 2002.** The toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to the fish, *Catla catla* (Hamilton). Journal of Environmental Biology, 23: 147–149.
- Turchini G.M., Mentasti T., Froyland L., Orban E., Caprino F., Moretti V.M. and Valfre F. 2003.** Effects of alternative dietary lipid sources on performance, tissue chemical composition, mitochondrial fatty acid oxidation capabilities and sensory characteristics in brown trout. Aquaculture, 225(1-4): 251–267.
- Verlhac V., Gabaudan J., Obach A., Schuep W. and Hole R. 1996.** Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 143(2): 123–133.
- Wickins J.F. and Lee D.O.C. 2002.** Candidates for cultivation. P: 70–97. In: Wickins J.F. and Lee D.O.C. Crustacean Farming, Ranching and Culture. Blackwell Science, UK.
- Zhang J., Wang X. and Xu T. 2008.** Elemental selenium at nano size (Nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: Comparison with selenomethionine in mice. Toxicological Sciences, 1: 52–22.
- Zhou X., Wang Y., Gu Q. and Li W. 2009.** Effects of different dietary selenium sources (selenium nanoparticle and selenomethionine) on growth performance, muscle composition and glutathione peroxidase enzyme activity of crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). Aquaculture, 291: 78–81.



Research Paper

Protective effect of dietary vitamin E and nano-selenium supplementations on growth performance and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sublethal level of ammonia

Afieh Nazer¹, Mohammad Harsij^{2*}, Seyedeh Ainaz Shirangi³, Hossein Adineh²

Received: February 2019

Accepted: August 2019

Abstract

This study was performed to improve the physiological responses of rainbow trout to chronic stress of ammonia, as an inhibiting factor in recirculating aquaculture system, by using dietary antioxidant. 150 fish (initial mean weight of 8.4 ± 0.84 g) were investigated in five treatments, each with three replicates for 60 days including fish fed with no supplemented food without ammonia exposure (C^-), without supplemented food but with ammonia exposure (C^+), with supplementation of vitamin E and ammonia exposure, with supplementation of nano-selenium and ammonia exposure (Se) and with supplementation of combined vitamin E and nano-selenium with ammonia exposure (E+Se). After 30 days of feeding with supplements, the fish were exposed to the ammonia (NH_4OH : 0.2 ppm) for 30 days. Growth and hematological parameters were studied at days of 44 and 60. Results showed that feeding fishes with E+Se increased the growth parameters and reduced plasma ammonia compared to other treatments. Fish fed with E+Se had the highest RBC, hemoglobin and hematocrit levels while WBC was not significant compared to C^- group. These results indicated the synergistic effects of dietary E+Se supplement in rainbow trout fish, it could compensate the imposed damaged by ammonia pollutions.

Key words: *Oncorhynchus mykiss*, Ammonia Stress, Dietary Supplementation, Growth, Hematological Parameters.

1- M.Sc. Student in Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad-Kavous University, Gonbad-Kavous, Iran.

2- Assistant Professor in Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad-Kavous University, Gonbad-Kavous, Iran.

3- Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Science and Engineering, Gonbad-Kavous University, Gonbad-Kavous, Iran.

*Corresponding Author: m_harsij80@yahoo.com