Archive of SID

اثرات سطوح مختلف ویتامین C در جیره غذایی بر عملکرد رشد، فعالیت آنزیم‌های هضمی و برخی فاکتورهای استرسی خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تحت سمیت تحت کشندهٔ سم مالاتیون

سینا جوانمردی، کامران رضایی توابع*، سعید مرادی، لیلا سادات بیات غیاثی

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

*نویسنده مسئول: krtavabe@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۲۷

چکیده

تحقیق حاضر با هدف بررسی اثرات تغذیه‌ای ویتامین C بر بهبود وضعیت رشد، متابولیک و فاکتورهای استرسی خون در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت استرس ناشی از سمیت تحت‌کشنده مالاتیون انجام گردید. در این آزمایش ماهی‌ها به مدت ۲۸ روز در معرض ۲۵ درصد غلظت LC_{50} ۹۶ ساعته سم مالاتیون قرار گرفتند و در طی این مدت با سطوح مختلف ویتامین C (صفر، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم جیرهٔ غذایی) تغذیه شدند. در پایان نتایج حاصل از بررسی شاخص‌های رشد افزایش معنی‌داری در میزان افزایش وزن و همچنین ضریب رشد ویژه ماهیان تغذیه شده با بیشترین سطح ویتامینی (۹۰۰ میلی گرم) نشان داد ($P<0/05$). ضریب تبدیل غذایی نیز در ماهیان تحت تیمار، کاهش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها نشان داد. در مورد آنزیم‌های هضمی به‌جز افزایش فعالیت آنزیم لیپاز در تیمارهای تغذیه شده با سطوح ۶۰۰ و ۹۰۰ میلی‌گرم ویتامین C که فعالیت این آنزیم به ترتیب به صورت معنی‌داری افزایش یافت، فعالیت سایر آنزیم‌ها تحت غلظت‌های متفاوت ویتامین در جیره تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. از شاخص‌های استرسی خون سطح گلوکز در تیمار شاهد در مقایسه با سایر تیمارها به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. سطح کورتیزول خون نیز در تیمار ۹۰۰ میلی‌گرم ویتامین C در جیره، به شکل معنی‌داری از سایر تیمارها کمتر بود. نتایج بیان‌گر این است که ویتامین C به‌عنوان یک عامل ضد استرس و آنتی اکسیدان، استرس وارده به ماهی را کاهش می‌دهد و سبب بهبود وضعیت متابولیک و عملکرد رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان شود.

واژگان کلیدی: سم ارگانوفسفره، اسید آسکوربیک، آنزیم‌های هضمی، عامل ضد استرس، قزل‌آلای رنگین‌کمان.

مقدمه

آبزی‌پروری در کنار رشد قابل توجهی که داشته، همواره با مشکلاتی روبرو بوده است که از آن جمله می‌توان به تغییرات کیفیت آب، شیوع بیماری‌ها و مشکلات تغذیه‌ای اشاره کرد (Sinyakov *et al.*, 2002). هر گونه تغییری در آب محیط اطراف آبزیان، به‌طور مستقیم و غیرمستقیم وضعیت تغذیه‌ای، متابولیکی و دفعی آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. کیفیت آب در پرورش ماهی نقش تعیین کننده‌ای داشته و در آبزی‌پروری معمولاً آبی دارای کیفیت مطلوب محسوب می‌شود که بقا و رشد آبزیان را تأمین نماید (براتی زاده و همکاران، ۱۳۹۶). سموم شیمیایی آفت‌کش در حال حاضر به‌عنوان یکی از آلاینده‌های محیط‌زیست، به‌ویژه بوم‌سازگان‌های آبی محسوب می‌شوند (Banaee *et al.*, 2011). بسیاری از این سموم به روش‌های گوناگون به منابع آب‌های سطحی وارد می‌شوند و به بدن موجودات آبزی از جمله ماهیان می‌رسند (ابراهیم زاده و همکاران، ۱۳۸۳). مالاتیون یکی از مهم‌ترین سموم ارگانوفسفره است که به‌عنوان آفت‌کش، جهت مبارزه با آفات نباتی، مورد استفاده قرار گرفته و مشکلاتی برای محیط زیست در سراسر دنیا به وجود آورده است. در ایران نیز این سم یکی از آفت‌کش‌های پرمصرف می‌باشد (غفاری‌فارسانی و همکاران، ۱۳۹۵). بیشترین موارد استفاده از این سم مربوط به سم‌پاشی باغات، مرکبات و شالیزارها می‌باشد (شیری و همکاران، ۱۳۹۳). اثرات منفی مالاتیون بر پارامترهای رشد، پارامترهای خونی، توانایی شنا و کاهش برخی پارامترهای بیوشیمیایی (گلیکوژن، کلسترول و پروتئین خون) و همچنین آسیب اکسیداتیوی آن بر

www.SID.ir

Archive of SID

ماهیان گزارش شده است (Yonar *et al*., 2014).

پارامترهای خون‌شناسی و خصوصیات بیوشیمیایی سرم از جمله شاخص‌های مهم وضعیت محیط داخلی بدن ماهیان است و تغییرات در این پارامترها نشان‌دهنده تغییرات در متابولیسم و فرآیندهای بیوشیمیایی موجود زنده است که در واقع این تغییرات می‌تواند ناشی از اثرات آلاینده‌های مختلف باشد و این تغییرات ما را قادر به مطالعه مکانیسم‌های اثرات این مواد می‌سازد. بنابراین خون ماهی می‌تواند در مدیریت پرورش و تحقیقات مربوط به بیماری به‌عنوان یک شاخص بالقوه تغییرات فیزیولوژیک و آسیب‌شناسی مورد استفاده قرار گیرد (Kaya *et al*., 2015). استفاده از ویتامین C در جیره غذایی یا آب مخازن نگهداری باعث ایجاد ایمنی غیر اختصاصی در آبزیان شده و اثرات مخرب حاصل از استرس را در آنها کاهش می‌دهد (Varlhac and Gabaudan, 2003). همچنین این ویتامین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان نقش بسیار مهمی در حفاظت از دیواره سلولی دارد (Sandnes *et al*., 1996). استفاده از ویتامین C در تغذیه آبزیان زینتی و پرورشی با اهدافی چون افزایش رشد، افزایش ضریب ایمنی بدن، افزایش قابلیت تنظیم اسمزی، افزایش کیفیت و کمیت هماوری انجام می‌گیرد. ویتامین C نقش مهمی نیز در بهبود پارامترهای ایمنی، افزایش مقاومت در برابر استرس و بیماری‌ها، تنظیم برخی توانایی‌های رفتاری ماهی (حرکت گله‌ای) ایفا می‌کند (Arab and Rajabi Islami., 2015). این ویتامین در ساختن کلاژن که مهم‌ترین پروتئین در ساختار بافت‌های پیوندی موجودات است نیز نقش مهمی دارد (Terovaa *et al*., 1998).

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) یکی از ماهیان پرتولید در صنعت آبزی-پروری است که با توجه به کیفیت گوشت و بازار-پسندی به‌عنوان یک گونه ارزشمند در میان ماهیان سردآبی پرورشی محسوب می‌شود (Hebb *et al*., 2003). با توجه به اهمیت اقتصادی این ماهی در ایران، گسترش آن در اکثر نقاط کشور و پرورش آن در منابع آبی مختلف که احتمالاً تحت تأثیر فاضلاب‌های کشاورزی و ورود سم مالاتیون هستند، تحقیق حاضر با هدف بررسی اثرات تغذیه‌ای ویتامین C بر بهبود وضعیت رشد، متابولیک و فاکتورهای استرسی خون در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت استرس ناشی از سمیت تحت‌کشنده مالاتیون انجام گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و شرایط نگهداری: تعداد ۱۸۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن ۴±۴۲ از یک مرکز پرورشی خصوصی در روستای برغان واقع در استان البرز تهیه گردید. ماهی‌ها به کارگاه تکثیر و پرورش آبزیان دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران (کرج) انتقال داده شدند و پس از بررسی‌های ظاهری و اطمینان از سلامت ظاهری به‌منظور سازگاری با شرایط محیطی جدید به مدت یک هفته در مخازن ۱۰۰۰ لیتری فایبرگلاس در فضای آزاد با دورهٔ نور طبیعی و تعویض آب روزانه ۲۰ درصد نگهداری شدند که در طی این مدت با غذای تجاری قزل‌آلای رنگین-کمان (شرکت ساخت غذای آبزیان فرادانه، شهرکرد، ایران؛ ۳۹ درصد پروتئین، ۱۱ درصد چربی و ۱۵ درصد کربوهیدرات) طی دو نوبت در روز راس ساعت ۷:۰۰ و ۱۹:۰۰ به میزان ۲٪ وزن بدن تغذیه شدند. پس از پایان دوره سازگاری، جهت شروع آزمایش ماهی‌ها به طور تصادفی در ۱۲ تانک فایبرگلاسی ۲۰۰ لیتری توزیع شدند (هر تانک ۱۵ قطعه ماهی) و تحت اثر تیمارهای آزمایش قرار گرفتند.

مواد شیمیایی: سم مالاتیون مورد استفاده به صورت مایع امولسیون شونده با خلوص ۵۷٪ از شرکت اکسیر کشاورزی (برند Agroxir) تهیه شد و مورد استفاده قرار گرفت. همچنین اسید آسکوربیک (پوشش داده شده) با خلوص ۹۶ درصد از شرکت Merck آلمان تهیه گردید.

آماده‌سازی جیره: جهت تهیه جیره آزمایشی، ویتامین C در سطوح ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ میلی‌گرم در

www.SID.ir

Archive of SID

هر کیلوگرم به جیره افزوده شد. ویتامین C پس از مخلوط شدن اولیه با جیره، توسط همزن به‌مدت ۳۰ دقیقه مخلوط و سپس به آن آب اضافه و مجدداً به مدت ۱۵ دقیقه مخلوط شدند. سپس مخلوط جیره‌ها با استفاده از چرخ گوشت مخلوط شدند و سپس در خشک‌کن در دمای ۵۵ درجه خشک شدند و در نهایت پس از بسته‌بندی در دمای ۱۸- نگهداری شدند.

طرح آزمایش: غلظت تحت‌کشنده انتخابی جهت انجام آزمایش بر اساس مقدار LC_{50} ۹۶ ساعته سم مالاتیون برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود. بر اساس گزارش سازمان فائو در سال ۲۰۱۳ به نقل از Gries و Purghart (۲۰۰۱) میزان LC_{50} ۹۶ ساعته سم مالاتیون در دمای ۱±۱۶ درجه سانتی‌گراد برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ۰/۱۸ میلی‌گرم بر لیتر عنوان شده است؛ بنابراین ماهی‌ها در معرض ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر (تقریباً یک چهارم مقدار LC_{50} ۹۶ ساعته) از سم مالاتیون به مدت ۲۸ روز قرار گرفتند (Mohapatra *et al.*, 2012). در طی مدت آزمایش مخازن دائماً هوادهی می‌شدند و آزمایشات بر اساس راهنمای استاندارد O.E.C.D (۱۹۸۴) به‌صورت نیمه استاتیک (تعویض روزانه ۲۰٪ آب) صورت گرفت. پس از هر بار تعویض آب غلظت سم در آب به مقدار اولیه تنظیم گردید. فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب نیز روزانه مورد سنجش قرار می‌گرفت و به طور میانگین میزان اسیدیته ۷/۳، اکسیژن محلول ۸/۶، دما ۱۴/۵ و سختی کل ۱۸۵ میلی‌گرم بر لیتر بود. آزمایش شامل ۴ تیمار آزمایشی در ۳ تکرار بود و به‌طور کلی شامل ۱۲ مخزن و درون هر مخزن ۱۵ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان قرار گرفت. ماهیان به ۴ گروه زیر تقسیم شدند:

گروه ۰ (کنترل): جیره تجاری بدون هیچ گونه افزودنی – ماهی در معرض آب حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر مالاتیون

گروه ۱: جیره غذایی حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C – ماهی در معرض آب حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر مالاتیون

گروه ۲: جیره غذایی حاوی ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C - ماهی در معرض آب حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر مالاتیون

گروه ۳: جیره غذایی حاوی ۹۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C - ماهی در معرض آب حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر مالاتیون

روش‌های سنجش

الف) عملکرد رشد و بقا: در پایان دوره ۲۸ روزه آزمایش، غذادهی برای مدت ۲۴ ساعت متوقف گردید و پس از آن تمام ماهیان هر مخزن برداشت شدند و جهت آرام‌سازی به‌مدت ۵ دقیقه در محلول۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پودر گل میخک قرار گرفتند (اکبری و همکاران، ۱۳۹۵). در انتها وزن و طول تمام ماهی‌ها اندازه‌گیری و عملکردهای رشد و بقا توسط فرمول‌های زیر محاسبه گردید (Kitabayashi *et al.*, 1971):

درصد افزایش وزن (گرم) = [میانگین وزن اولیه ÷ (میانگین وزن اولیه-میانگین وزن نهایی)] × ۱۰۰

ضریب رشد ویژه (درصد در روز) = (لگاریتم طبیعی وزن نهایی –لگاریتم طبیعی وزن اولیه) × ۱۰۰÷ تعداد روزها

نرخ تبدیل غذایی = گرم غذای خورده شده ÷ گرم افزایش وزن

نرخ کارایی پروتئین= گرم افزایش وزن ÷ گرم پروتئین دریافتی

درصد بقا = (تعداد نهایی ماهیان ÷ تعداد اولیه ماهیان) × ۱۰۰

ب) میزان فعالیت آنزیم‌های هضمی روده: جهت سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های هضمی روده، در انتهای دوره آزمایش ۴ قطعه ماهی از هر مخزن برداشت گردید و مطابق با قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی بلافاصله بیهوش شدند. سپس بلافاصله عمل تشریح آغاز شد و قسمتی از اواسط روده هر ماهی جداسازی گردید. نمونه‌ها با مقدار کافی محلول نمکی ۰/۸ درصد جهت به‌دست آوردن ترکیب ۱۰ درصد وزنی همگن شدند. ترکیب حاصله با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس میزان فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین به روش

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- تاثیر سطوح مختلف ویتامین C در جیره، بر عملکرد رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان قرار گرفته در معرض سم مالاتیون.

تیمارها	وزن اولیه (گرم)	وزن نهایی (گرم)	درصد افزایش وزن	نرخ رشد ویژه (درصد در روز)	نرخ تبدیل غذایی	نرخ کارایی پروتئین	درصد بقا
شاهد	۴۲/۰۴ ± ۰/۰۱	۵۴/۰۹ ± ۰/۱۹ ^{a}	۲۸/۶۶ ± ۳/۵۲ ^{a}	۰/۳۹ ± ۰/۰۷^{a}	۱/۴۹ ± ۰/۱۵ ^{b}	۲/۱۱ ± ۰/۲۶ ^{a}	۹۸/۳۳ ± ۲/۸۸
۱	۴۲/۱۹ ± ۰/۰۵	۵۱/۲۲ ± ۱/۸۲ ^{a}	۲۱/۴ ± ۵/۶۱ ^{a}	۰/۳ ± ۰/۰۵^{a}	۱/۴۹ ± ۰/۰۹^{b}	۲/۰۵ ± ۰/۱۴ ^{a}	۹۶/۶۶ ± ۵/۷
۲	۴۲/۰۷ ± ۰/۰۲	۶۰/۴۱ ± ۳/۴۱ ^{a}	۳۳/۱ ± ۷/۲۳ ^{a}	۰/۶۶ ± ۰/۱۱^{ab}	۱/۴۱ ± ۰/۰۹ ^{ab}	۲/۳۱ ± ۰/۵^{b}	۱۰۰
۳	۴۱/۹۶ ± ۰/۰۱	۷۳/۸۵ ± ۱/۹۸^{b}	۵۶ ± ۶/۳۸ ^{b}	۰/۷۸ ± ۰/۱^{b}	۱/۳۴ ± ۰/۱۳ ^{a}	۲/۴۸ ± ۰/۲^{c}	۹۶/۶۶ ± ۲/۸۸

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

Hummel (۱۹۹۵) با افزودن محلول حاصله به بستری از کازئین و بررسی میزان هضم کازئین صورت گرفت. لیپاز به‌روش Furne و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از روغن زیتون خالص به‌عنوان بستر و سنجش میزان هضم روغن زیتون توسط محلول حاصل از بافت روده انجام شد. آمیلاز نیز به روش Refstie و همکاران (۲۰۰۶) با استفاده از بستر نشاسته‌ای محاسبه گردید.

ج) شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون: در انتهای دوره آزمایش پس از محاسبه عملکرد رشدی و میزان فعالیت آنزیم‌های هضمی روده، جهت اندازه‌گیری پروتئین کل، گلوکز تعداد ۳ ماهی از هر تیمار پس از بی‌هوشی کامل به وسیله قرار گیری در محلول ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پودر گل میخک، خون‌گیری از ساقه دمی آن‌ها توسط سرنگ‌های استریل ۲ میلی‌لیتری انجام شد. نمونه‌ها پس از ۶ ساعت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و لخته شدن کامل، با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۷ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ، سپس لایه سرم توسط سمپلر از روی نمونه‌ها برداشته، و نمونه‌های سرم توسط دستگاه سنجش‌گر خودکار شاخص‌های بیوشیمیایی (شرکت هیتاچی، ساخت کشور ژاپن) و کیت‌های ضمیمه‌ای (شرکت پارس آزمون، ساخت ایران) مورد ارزیابی قرار گرفت. کورتیزول نیز به‌روش الایزا توسط کیت‌های تجاری (شرکت آی بی ال، ساخت کشور آلمان) اندازه‌گیری شد.

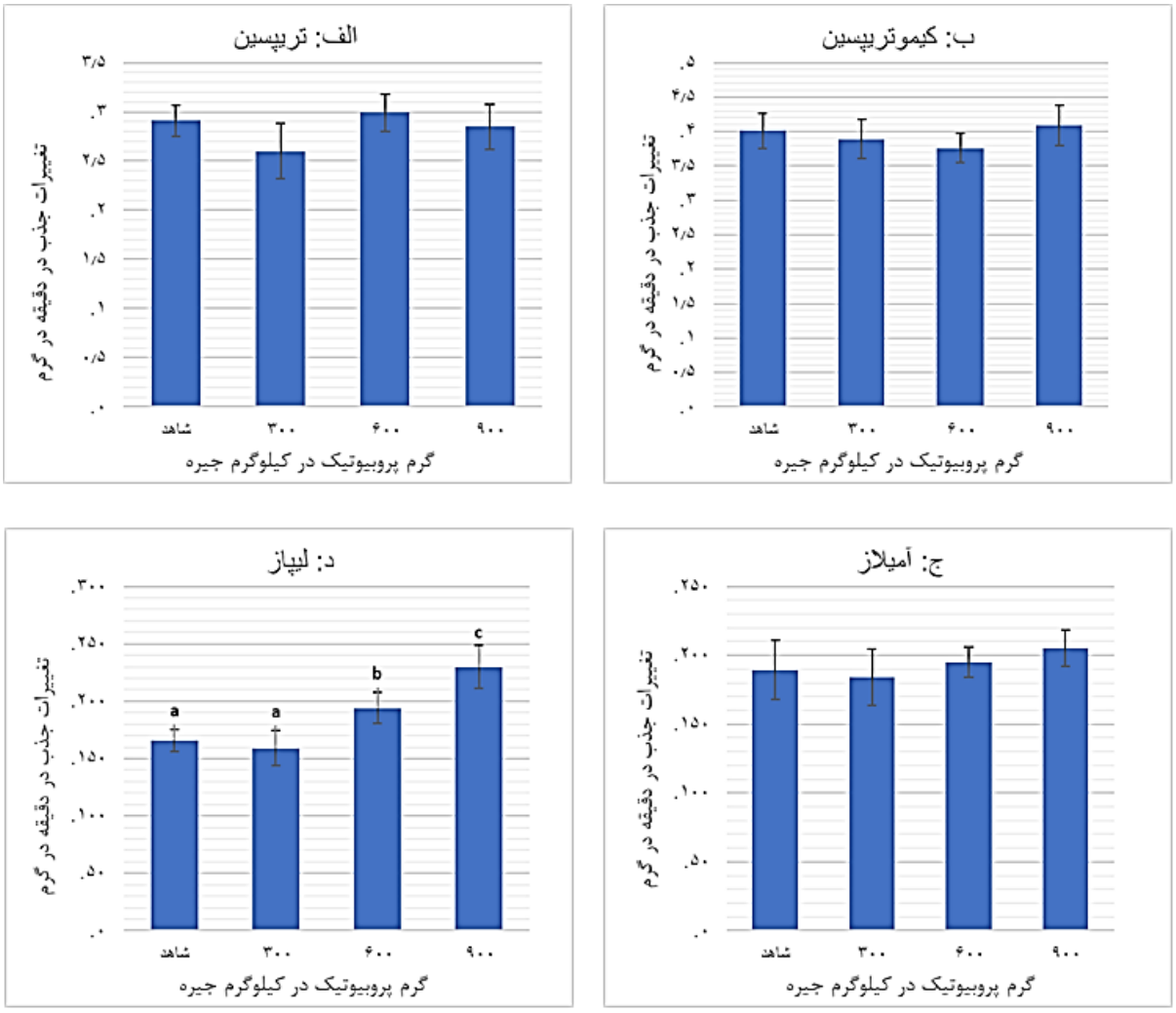
تحلیل‌های آماری: نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون کلموگروف-اسمیرنوف بررسی شد و سپس با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA مورد بررسی قرار گرفت. همچنین از آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح معنی‌داری (P≥۰/۰۵) برای مقایسه‌ی میانگین بین تیمارها استفاده شد. تمام داده‌های موجود در این مقاله به صورت میانگین±انحراف معیار ارائه گردید و جهت انجام تمام تجزیه و تحلیل‌های آماری، از نرم‌افزار تحت ویندوز SPSS نسخه ۲۴ استفاده گردید.

نتایج

عملکرد رشد و بقا: در پایان دوره ۲۸ روزه آزمایش، عملکرد رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد سنجش قرار گرفت (جدول ۱). وزن نهایی و درصد افزایش وزن در ماهیان تحت تیمار ۳ نسبت به سایر تیمارها به شکل معنی‌داری بیشتر بود (P<۰/۰۵) درحالی‌که در تیمارهای (شاهد)، ۱ و ۲ اختلاف معنی‌داری از نظر وزن نهایی مشاهده نگردید. نرخ رشد ویژه در تیمارهای ۰ و ۱ و ۲ از نظر آماری برابر بود اما با افزایش سطوح ویتامین C جیره، در تیمار ۳ به شکل معنی‌داری افزایش یافت. ضریب تبدیل غذایی کمترین میزان خود را در تیمار ۳ نشان داد هم‌چنین ضریب کارایی پروتئین در تیمارهای ۰ و ۱ در کمترین حد بود و در تیمارهای ۲ و ۳ به ترتیب افزایش یافت. ماهی‌ها از نظر درصد بقا در طی دوره ۲۸ روزه آزمایش هیچگونه اختلاف معنی‌داری را در هیچ‌یک از تیمارها نشان ندادند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱ - تأثیر سطوح مختلف ویتامین C در جیره، بر فعالیت آنزیم‌های هضمی روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان قرار گرفته در معرض سم مالاتیون (حروف متفاوت روی هر ستون بیان‌گر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها ($P<۰/۰۵$) است).

جدول ۲- تاثیر سطوح مختلف ویتامین C در جیره، بر شاخص‌های خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان قرار گرفته در معرض سم مالاتیون.

تیمارها	پروتئین کل (گرم بر دسی‌لیتر)	گلوکز (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	کورتیزول (میکروگرم بر دسی‌لیتر)
شاهد	۴/۵۳ ± ۱/۹	۹۷/۵۳ ± ۴/۷^{b}	۳۲۳/۰۳ ± ۲۲/۲۸^{b}
۱	۴/۳۴ ± ۰/۱۱	۶۵/۹۲ ± ۴/۱^{a}	۳۱۱/۱۷ ± ۲۹/۲^{b}
۲	۴/۶۵ ± ۰/۱۹	۶۷/۳۸ ± ۱۲/۱^{a}	۲۹۹/۶۳ ± ۱۳/۳۸^{b}
۳	۴/۵۹ ± ۰/۱۱	۶۴/۸۲ ± ۴/۱^{a}	۱۹۲ ± ۱۸/۳^{a}

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P<۰/۰۵$).

فعالیت آنزیم‌های هضمی: دوره ۲۸ روزه تغذیه ماهیان توسط جیره حاوی سطوح مختلف ویتامین C تغییراتی را در میزان فعالیت برخی از آنزیم‌های هضمی روده به وجود آورد (شکل ۱). میزان فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین در روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت اثر هیچ‌کدام از تیمارهای ویتامین C در جیره، تغییرات معنی‌داری را نشان نداد. میزان فعالیت آنزیم لیپاز در دو تیمار ۰ و ۱ از نظر آماری برابر بود اما در تیمارهای ۲ و ۳ فعالیت این آنزیم به‌ترتیب افزایش یافت. فعالیت آنزیم آمیلاز نیز از تغییرات سطوح ویتامین C در جیره اثر معنی-داری نداشت و همواره در تمامی تیمارها از نظر

www.SID.ir

Archive of SID

آماری مقداری ثابت بود.

شاخص‌های استرسی خون: در پایان دوره ۲۸ روزه آزمایش برخی از شاخص‌های سرم خون که به شکلی بیانگر میزان استرس ناشی از قرارگیری ماهی در معرض سم مالاتیون بود بررسی و اندازه‌گیری شد (جدول ۲). پروتئین کل سرم خون هیچ تغییر معنی-داری را در هیچ‌یک از تیمارها نشان نداد. میزان گلوکز خون در تیمار شاهد دارای بیشترین میزان بود اما در تیمارهای ۱ و ۲ و ۳ از تیمار شاهد کمتر بود. میزان کورتیزول خون در سه تیمار ۰ و ۱ و ۲ تفاوت معنی‌داری نداشت اما در تیمار ۳ به شکل معنی‌داری از سایر تیمارها کمتر بود.

بحث

فعالیت ضد استرسی ویتامین C، به عنوان یک آنتی اکسیدان، به خوبی شناخته شده است. اغلب گونه‌های ماهی نمی‌توانند ویتامین C تولید کنند و برای تامین نیازشان، به منابع خارجی نیاز دارند. نیاز به ویتامین C برای رشد طبیعی و بقا در ماهی، نسبتاً کم است، اما با این حال، تحت شرایط استرسی در ماهی سطح بالایی از این ویتامین مورد نیاز می‌باشد (Sarma *et al.*, 2009). این تحقیق با هدف ارزیابی اثر بهبود دهندگی ویتامین C در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان قرارگرفته در معرض حشره‌کش مالاتیون به‌عنوان یک آلاینده محیطی که اثرات مخرب بر رشد و پارامترهای متابولیک ماهی دارد (Yonar *et al.*, 2014)، با تجزیه و تحلیل عملکرد رشد، بقا و فعالیت آنزیم‌های هضمی صورت پذیرفت. در راستای آگاهی از اثرات سطوح مختلف ویتامین C بر وضعیت رشدی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت سمیت تحت کشنده مالاتیون نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش سطوح ویتامین C، افزایش قابل توجهی در فاکتورهای رشدی ماهی قزل آلای رنگین‌کمان قرار گرفته در معرض سم مالاتیون مشاهده شد و این افزایش در بعضی از تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بود. با توجه به این که میزان افزایش وزن با افزایش دوز ویتامین رابطه‌ی مستقیمی نشان داد، این موضوع نشان دهنده‌ی افزایش سطوح مورد نیاز این ویتامین جهت رشد طبیعی تحت شرایط استرسی می باشد و با نتایج آزمایش Sarma و همکاران (۲۰۰۹) که نشان دهنده‌ی افزایش سطوح مورد نیاز این ویتامین جهت رشد طبیعی تحت شرایط استرسی است هم خوانی دارد. همچنین در تحقیقی مشابه که توسط Narra و همکاران (۲۰۱۵) صورت گرفت نشان داده شد که مصرف میزان ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن ویتامین C در جیره خوراکی ماهی *Clarias batrachus* تحت سمیت کلرپریفوس می‌تواند رشد و بقا را به میزان قابل توجهی بهبود بخشد که با نتایج آزمایش حاضر همخوانی داشت.

از دیگر فاکتورهای مهم و تاثیرگذار بر صنعت آبزی‌پروری به ویژه از حیث اقتصاد پرورش، FCR می‌باشد که در این تحقیق با توجه به این که در تیمار ۳ (بیشترین دوز ویتامین) کاهش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها نشان داد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که حضور این ویتامین در سطوح مناسب در جیره ماهی علاوه بر کاهش هزینه، سبب کاهش آلودگی آب محیط پرورش به‌جهت کاهش میزان غذادهی نیز خواهد شد که این موضوع در ماهیان تحت استرس به سبب اختلال در وضعیت متابولیکی آن‌ها اهمیت بیشتری می‌یابد. فاکتور دیگری که در این تحقیق مورد ارزیابی قرار گرفت، میزان بقا بود که اختلاف معنی‌داری در بین تیمارها مشاهده نشد چرا که این میزان از غلظت سم در آب محیط پرورش ماهی در طی مدت زمان آزمایش که ۲۸ روز بوده در محدوده تحمل ماهی بود و چندان مرگ و میری رخ نداد که با شرایط آزمایش Mohapatra و همکاران (۲۰۱۲) همخوانی داشت، به‌طوری که ۳۳ درصد غلظت Lc_{50} ۹۶ سم ارگانوفسفره فنوالرات به‌مدت ۲۸ روز برای ماهی *Labeo rohita* مرگ و میری در پی نداشت.

در تحقیق حاضر نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های هضمی روده شامل تریپسین،

www.SID.ir

Archive of SID

کیموتریپسین، لیپاز و آمیلاز پس از یک دوره ۲۸ روزه تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با جیره حاوی سطوح مختلف ویتامین C تحت سمیت زیرکشنده‌ی مالاتیون نشان داد که به‌جز افزایش در فعالیت آنزیم لیپاز که در تیمارهای ۲ و ۳ فعالیت این آنزیم به ترتیب به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت، فعالیت سایر آنزیم‌ها تحت غلظت‌های متفاوت ویتامینی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. در این مورد گمان بر این است که از آن‌جایی که لیپاز توسط سلول‌های جدار روده هم ترشح می‌شود (Church *et al*., 1988) و یکی از عمده محل‌های اثر گذاری مالاتیون غشاهای مخاطی می‌باشد (Kim *et al*., 2015) بنابراین ایجاد اختلال در فعالیت لیپاز در تیمار شاهد با توجه به محل ترشح آن که از سلول‌های جدار روده می‌باشد نسبت به سایر آنزیم‌ها بیشتر مورد انتظار می‌باشد. آزمایشی دیگر در مورد اثرگذاری حشره‌کش دلتامترین بر روی فعالیت آنزیم لیپاز در ماهی گوپی (*Poecilia reticulate*) صورت گرفت که نتایج نشان‌دهنده‌ی این بود که دلتامترین فعالیت لیپاز را مهار می‌کند (Gunes and Yerli., 2011). افزایش گلوکز خون در ماهی‌ها، تحت شرایط نامساعد مشاهده می‌شود و این رویداد به موجود کمک می‌کند تا با رساندن انرژی به اندام‌های حیاتی جوابگوی این افزایش تقاضای انرژی باشد. ارزیابی سطح قند خون به‌عنوان یک نشانگر ثانویه از پاسخ استرسی به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد (Banaee *et al*., 2011). در تحقیق حاضر سطح گلوکز خون در تیمار شاهد با سایر تیمارها که تحت غلظت‌های متفاوت ویتامینی بودند به‌طور معنی‌داری بیشتر بود که نشان دهنده این موضوع است که سم مالاتیون به عنوان یک عامل استرس‌زا عمل کرده و از طرف دیگر ویتامین C به‌عنوان یک عامل ضد استرس توانسته است استرس وارده به ماهی را تقلیل دهد. نتایج آزمایشی دیگر نشان داد که میزان ۲۰۰ میلی‌گرم ویتامین C در جیره، به‌طور معنی‌داری سطح گلوکز خون را در مواجه با سم کلرپریفوس کاهش داد (Narra *et al*., 2015).

قرارگیری ماهی در موقعیت‌های مختلف استرس-زا، مانند تغییرات محیطی منجر به ایجاد یک‌سری تغییرات در جهت سازگارسازی می‌شود. این وقایع هماهنگ با محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- اینترنالال (HPI) روی می‌دهد. محصول نهایی فعال‌سازی محور HPI، گلوکوکورتیکوئید کورتیزول است که تنظیم کننده متابولیسم و تنظیمات یونی لازم برای مقابله با استرس است. قرار گرفتن در معرض آلودگی‌های محیطی ممکن است سبب اختلال در محور استرسی شده و متعاقبا پاسخ استرسی را تحت تاثیر قرار دهد (Koakoski *et al*., 2014). در تحقیق حاضر با افزایش سطوح ویتامین میزان کورتیزول خون روند نزولی داشت و در تیمار ۳ سطح کوتیزول خون با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت. این نتایج با نتایج تحقیق Hamed (۲۰۱۵) هم‌خوانی داشت که در آن سطح کورتیزل پلاسمای تیلاپیای نیل تحت سمیت مالاتیون افزایش نشان داد. در تحقیقی که توسط El-Gawad و Hamid (۲۰۱۴) بر روی ماهی تیلاپیا صورت گرفت نیز ویتامین C میزان کورتیزول پلاسما را تحت سمیت فنیتروتیون به‌میزان قابل توجهی کاهش داد. تغییر در میزان پروتئین کل پلاسما نسبت به محدوده‌ی پایه‌ای به‌عنوان یک شاخص در سنجش میزان سلامت، استرس و وضعیت بدنی آبزی به‌کار برده می‌شد (جادی و همکاران، ۱۳۹۴). در این مورد تغییر معنی‌داری بین تیمارها دیده نشد بر خلاف آزمایش Narra و همکاران (۲۰۱۵) که ویتامین C توانست میزان پروتئین خون گربه ماهی راه‌رونده (*Clarias batrachus*) را تحت سمیت کلرپریفوس به‌طور قابل توجهی افزایش داده تا در واقع از تجزیه آنزیمی آن جهت تامین انرژی بکاهد.

با توجه به نتایج حاصل از تحقیق حاضر استفاده از ویتامین C در جیرهٔ غذایی به منظور بهبود پارامترهای رشدی، وضعیت متابولیک ماهی و متعاقباً کاهش ضریب تبدیل غذایی ماهیان قزل‌آلای رنگین-

www.SID.ir

Archive of SID

کمانی که در معرض استرس ناشی از سمیت زیرکشنده‌ی مالاتیون موثر بود. ویتامین C به‌عنوان یک عامل ضد استرس و آنتی اکسیدان، استرس وارده به ماهی را کاهش داده و سبب بهبود وضعیت متابولیک و عملکرد رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان گردید و بر اساس نتایج به‌دست آمده ۹۰۰ میلی‌گرم ویتامین C در جیره، بهترین عملکرد رشد و شرایط استرسی ماهی نشان داد. از این رو پیشنهاد می‌گردد پرورش دهندگانی که منبع آبی مورد استفاده‌ی آن‌ها جهت پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دچار آلودگی به این سم می‌باشد، جهت مقابله با اثرات مخرب آن از این ویتامین به‌میزان ۹۰۰ میلی‌گرم ویتامین C در جیرهٔ غذایی استفاده نمایند.

تشکر و قدردانی

نگارندگان این مقاله علمی-پژوهشی وظیفهٔ خود می‌دانند که از تمامی مسئولین و اساتید گروه شیلات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و همچنین دکتر مایک فرینسکو جهت نقطه نظرات علمی ایشان، صمیمانه مراتب تقدیر و تشکر ویژهٔ خود را به عمل آورند.

منابع

ابراهیم‌زاده، م.ع.، کرمی، م.، گلرخ، م. ۱۳۸۳. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کولین استراز در مغز ماهی سفید در انواع دریائی و پرورشی به عنوان شاخصی از میزان سلامتی این ماهی ها. *مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد*، ۶(۳)، ۳۳-۳۸.

براتی زاده، ص.، پیغان، ر.، راضی جلالی، م. ۱۳۹۶. بررسی تأثیر متقابل فیلتراسیون (فیلتر کربن، زئولیت و فیلتراسیون ساده) و تراکم ماهی ماکرو (*Labidochromis caeruleus*) بر میزان رشد و مواد نیتروژنی آب. *مجله دامپزشکی ایران*، ۱۳ (۳).

جادیهٔ ی.، موحدی‌نیا، ع.، صفاهیه، ع.، دژندیان، س.، حلاجیان، ع. ۱۳۹۴. مطالعه اثرات تحت کشندگی آفت کش دیازینون بر برخی پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون بچه ماهی سیم دریای خزر. *مجله پژوهش-های جانوری*، ۲۸(۳)، ۲۷۴-۲۸۱

عرب، ن.، رجبی اسلامی، ه.، شمسایی مهرجان، م. ۱۳۹۲. تاثیر ویتامین C در میزان بقا و شاخص‌های رشد بچه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*). *نشریه شیلات (مجله منابع طبیعی ایران)*، ۶۶ (۳)، ۳۳۱-۳۴۶

غفاری فارسانی، ح.، پورباقر، ه.، فرحمند، ح. ۱۳۹۵. اثر سم مالاتیون بر شکستگی DNA در بافت کبد و آبشش ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از روش میانگین وزنی. نشریه *شیلات (مجله منابع طبیعی ایران)*، ۶۹ (۱)، ۸۹-۹۹

میرواقفی ع.ر.، خشنودی‌فر خ.، شیری ن. ۱۳۹۳. تعیین درجه سمیت مالاتیون و بررسی اثرات آن روی برخی شاخص های خونی بچه ماهیان کپور وحشی دریای خزر (*Cyprinus carpio*). *فصلنامه علمی پژوهشی علوم و فنون شیلات*، ۳ (۲)، ۱-۱۱.

میرواقفی ع.ر.، فرحمند ح.، رفیعی غ.ر.، بنایی م. ۱۳۹۱. بررسی مشخصه‌های بیوشیمیایی خون وآسیب‌شناسی بافتی در مسمومیت تجربی با دیازینون در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). نشریه *شیلات (مجله منابع طبیعی ایران)*، ۶۵(۲)، ۱۱۹-۱۳۳.

Arab N., Rajabi Islami H. 2015. Effects of dietary ascorbic acid on growth performance, body composition, and some immunological parameters of Caspian brown trout, Salmo trutta caspius. *Journal of the World Aquaculture Society*, 46(5), 505-518.

Banaee M., Sureda A., Mirvaghefi A.R., Ahmadi K. 2011. Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99(1), 1-6.

Church D.C., Pond W.G. 1988. *Basic animal nutrition and feeding*. John Wiley & Sons.

El-Gawad E.A.A., Hamid O.M.A. 2014. Effect of vitamin C dietary supplementation in reducing the alterations induced by fenitrothion in *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(3), 787-

www.SID.ir

Archive of SID

Sandnes K., Ulgenes Y., Braekkan O.R., Utne F. 1994. The effect of ascorbic acid supplementation in broodstock feed on reproduction of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 43, 167-177.

Sarma K., Pal A.K., Sahu N.P., Ayyappan S., Baruah K. 2009. Dietary high protein and vitamin C mitigates endosulfan toxicity in the spotted murrel, *Channa punctatus* (Bloch, 1793). *Science of the Total Environment*, 407(12), 3668-3673.

Simon L.M., Laszlo K., Kotorman M., Vertesi A., Bagi K., Nemcsok J. 1999. Effects of synthetic pyrethroids and methidation on activities of some digestive enzymes in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 34(5), 819-828.

Sinyakov M.S., Dror M., Zhevelev H.M., Margel S., Avtalion R.R. 2002. Natural antibodies and their significance in active immunization and protection against a defined pathogen in fish, *Vaccine*, 20(31), 3668-3674.

Sweilum M.A. 2006. Effect of sublethal toxicity of some pesticides on growth parameters, haematological properties and total production of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) and water quality of ponds. *Aquaculture Research*, 37(11), 1079-1089.

Terova, G., Saroglia, M., Papp, Z.G., Cecchini, S. 1998. Dynamics of collagen indicating amino acids, in embryos and larvae of sea bass (Dicentrarchus labrax) and gilthead sea bream (Sparus aurata), originated from broodstocks fed with different vitamin C content in the diet. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 121(2), 111-118.

TRC: O.E.C.D. 1984. Guideline for testing if chemical section 2 on biotic systemmms. 39 P.Animal Nutrition Report. Report No. 63305, P: 38.

Yonar S.M., Ural M.Ş., Silici S., Yonar M.E. 2014. Malathion-induced changes in the haematological profile, the immune response, and the oxidative/antioxidant status of *Cyprinus carpio*: Protective role of propolis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 102, 202-209.

796.

Gries T., Purghart V. 2001. Malathion technical: acute immobilisation test with daphnids (*Daphnia magna*) under flow-through conditions. AG. Study, 1005, 115.

Gunes E., Yerli S.V. 2011. Effects of deltamethrin on lipase activity in guppies (*Poecilia reticulata*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11(3), 473-476.

Hamed H.S. 2015. Impact of a short-term malathion exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): the protective role of selenium. *International Journal of Environmental Monitoring and Analysis*, 3, 30-37.

Hebb C.D., Castell J.D., Anderson D.M., Batt J. 2003. Growth and feed conversion of juvenile winter flounder (*Pleuronectes americanus*) in relation to different protein-to-lipid levels in isocaloric diets, *Aquaculture*, 221 (1), 439 - 449.

Kaya H., Çelik E.Ş., Yılmaz S., Tulgar A., Akbulut M., Demir N. 2015. Hematological, serum biochemical, and immunological responses in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to phosalone. *Comparative Clinical Pathology*, 24.

Kitabayashi, K., Kurata, H., Shudo, K., Nakamura, K., Ishikawa, S ,.1971 .Studies of formula feed fokuruma prawn: I. On therelationship among glucosamine, phosphorus and calcium. *Bulletin of Tokai Regional Fisheries Research Laboratory*, 65, 91-107.

Koakoski G., Quevedo R. M., Ferreira D., Oliveira T.A., da Rosa J.G.S., de Abreu M.S., Fagundes M. 2014. Agrichemicals chronically inhibit the cortisol response to stress in fish. *Chemosphere*, 112, 85-91.

Mohapatra S., Chakraborty T., Prusty A. K., Kumar K., Prasad K.P., Mohanta K.N. 2012. Fenvalerate induced stress mitigation by dietary supplementation of multispecies probiotic mixture in a tropical freshwater fish, Labeo rohita (Hamilton). *Pesticide biochemistry and physiology*, 104(1), 28-37.

Narra M.R., Rajender K., Reddy R.R., Rao J.V., Begum G. 2015. The role of vitamin C as antioxidant in protection of biochemical and haematological stress induced by chlorpyrifos in freshwater fish (*Clarias batrachus*). *Chemosphere*, 132, 172-178.

www.SID.ir

Archive of SID

Effects of different levels of dietary vitamin C on growth performance, digestive enzymes activity and blood stress factors of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under sub-lethal toxicity of malathion

Sina Javanmardi, Kamran Rezaei Tavabe*, Saeed Moradi, Leila sadat Bayat Ghiasi

Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Tehran University, Karaj, Iran.
*Corresponding author: krtavabe@ut.ac.ir

Received: 2018/1/6 Accepted: 2018/3/18

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of dietary vitamin C (ascorbic acid) on growth performances, digestive enzymes activity and blood stress factors in rainbow trout affected by the toxicity of malathion in water. In this experiment, the fish were subjected to ¼ concentrations of Lc_{50} 96h of malathion for 28 days and during this period, fish were fed with different levels of vitamin C (0, 300, 600 and 900 mg / kg of Feed). At the end of experiment, the results of the study of growth performances showed a significant increase (P<0.05) in weight gain (WG) and specific growth rate (SGR) of fish fed with the highest vitamin level (900 mg/kg diet). Food conversion ratio (FCR) in fish under the aforementioned treatment showed a significant decrease compared to other treatments. In the case of digestive enzymes activity, lipase enzyme activity increased significantly in treatments of 600 and 900 mg/kg vitamin C in diet respectively. However, the activity of other enzymes did not differ significantly in vitamin C different concentrations in the diet (P>0.05). Blood stress indices showed that glucose level was significantly higher in control treatment (0 m/kg) compared to other treatments and blood cortisol levels were significantly lower in the treatment of 900 mg/kg vitamin C in the diet. Finally, the results indicate that vitamin C as an anti-stress agent has been able to reduce stress in fish and improve the metabolic status and consequently the growth performance of rainbow trout.

Keywords: Organophosphate, Ascorbic acid, Weight gain, Rainbow trout.

www.SID.ir