فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۳۱، جلد ۸، شماره ۴، پائیز۹۴، صفحه ۴۹ تا ۵۹

بررسی مقایسه ای تیمار ویتامین D_3 و کلسیم بر شاخص های رشد و سیستم ایمنی بچه تاسماهی ایرانی(*Acipenser persicus*)

مجتبی قدرتی[۱]، عباسعلی زمینی [۲]، حمیدرضا پورعلی [۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات،لاهیجان. ایران.
Mojtaba_Ghodrati68@yahoo.com

۲- استادیار و عضو هیئت علمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، لاهیجان. ایران.

۳- مربی و عضو هیئت علمی، موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، لاهیجان. ایران.

تاریخ دریافت: ۹٤/٤/٦ تاریخ پذیرش:۹٤/۸/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: رشد یکی از پیچیده ترین پدیده هایی است که کمیت، کیفیت و مواد تشکیل دهنده غذا در آن موثر اند. در این بین برای کاهش خطر بیماری ها، بایستی سطح مقاومت ماهیان به عفونت ها را از طریق تحریک های ایمنی بدن مثل ویتامین ها افزایش داد. از آن جا که سطوح غیرعادی ویتامین D و کلسیم یک عامل تصادفی در بسیاری از بیماری هاست، پس چرخه غذا، رشد و سیستم ایمنی، چرخه ای زنجیروار می باشد که کاهش یا افزایش در یکی از این موارد نتیجه مستقیم در دیگر عوامل می گذارد. هدف از انجام این تحقیق، بررسی وجود ارتباط هم جهت بین فاکتورهای رشد با سیستم ایمنی بچه تاسماهیان در طول ۸ هفته بوده است.

روش کار: این پژوهش در پاییز۱۳۹۳ با همکاری موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر در بخش تکثیر و پرورش بر روی۶۰ عدد بچه ماهی با میانگین وزنی ۱۸/۵٦ گرم در ۱۵ حوضچه ۵۰ لیتری با تراکم ٤ عدد انجام گردید. این تحقیق در٤ تیمار با غلظت های(تیمار ۱- کلسیم ٦ gr/kg، تیمار ۲- ویتامین D_3 در سطح ۳۰۰۰ IU ، تیمار ۳- کلسیم ۱۲gr/kg، تیمار ٤- ویتامین D_3 IU ۳۰۰۰ و کلسیم ٦ gr/kg)غذایی و ۱ گروه شاهد(بدون افزودنی) با ۳ تکرار، صورت پذیرفت. بیومتری و اندازه گیری شاخص های رشد هر دو هفته یک بار انجام گردید و اندازه گیری پارامترهای خونی فقط در پایان دوره بین گروه های آزمایشی و شاهد انجام شد.

یافته ها: تحقیق حاضر نشان داد که کلیه فاکتورهای رشد در پایان دوره، در تیمار های ۱ و ۲ بیش از سایر تیمارها بوده و اختلاف آماری معنی دار مشاهده شد($P\leq ۰/۰۵$). هم چنین در پایان دوره ویتامین D_3 خون، گلبول های سفید و نوتروفیل ها اختلاف آماری معناداری با سایر تیمارها داشت($P\leq ۰/۰۵$).

نتیجه گیری: پس می توان نتیجه گرفت رشد بهینه هم سو با افزایش قدرت سیستم ایمنی پدید آمده است.

واژه های کلیدی: بچه تاسماهیان ایران(*Acipenser persicus*) ، ویتامینD_3 و کلسیم، فاکتورهای رشد، سیستم ایمنی.

مقدمه

کشور ایران با داشتن آب و هوای مناسب، رودخانه-ها، تالاب ها، دریاچه ها و غیره مناطقی مستعد و قابل استفاده برای پرورش آبزیان را دارد(۲۳). از آن جا که تکثیر و پرورش آبزیان به منظور تولید و تامین بخشی از پروتئین جامعه، عامل خودکفایی اقتصادی است، صنعت-آبزی پروری مورد توجه دولت ها و نهاد های مربوطه با هدف راه اندازی سیستم های علمی و صنعتی می-باشد(۲۲). با توجه به این که روند صنعتی شدن در ایران بسیار سریع و در خور توجه است، پس امیدست در آینده روش های علمی تر جایگزین روش های سنتی و غیر علمی گردد که لازمه آن، انجام تحقیقات بیشتری در زمینه گونه های مختلف آبزیان است(۲۷). پرورش آبزیان نه تنها نسبت به دامپروری دارای مزیت های بیشتری است، بلکه در بین بهره برداری های شیلاتی نیز فعالیتی ممتاز به شمار می رود زیرا در این کار نه تنها نظارت کامل انسان بر تاسیسات پرورشی آبزیان حاکم است بلکه تاسیسات مربوط به این گونه فعالیت ها به دلیل استقرار در آب های داخلی تحت تاثیر تجاوز سیاست-

www.SID.ir

های بیگانه قرار نمی گیرد(۲۱). در حال حاضرصنعت آبزی پروری در زمینه بچه تاسماهی ایرانی در سطوح مختلف توسعه پیداکرده است اما با مشکلاتی هم چون تلفات در زمان شروع تغذیه فعال روبرو است(۱۰). مشکلاتی از قبیل افت کیفیت آب جهت پرورش، تغذیه ناکافی، تراکم بیش از حد و پایین بودن اکسیژن محلول منجر به بروز استرس، کاهش رشد و بروز تلفات را در پی خواهد داشت(۳۷). نیاز آبزی پروری متراکم به غذاهای دارای ارزش غذایی مکمل، سبب تحقیقات گسترده در زمینه تغذیه آبزیان شده است. توسعه و تکامل غذاهای فرموله برای ماهیان خاویاری، جایگاه مهمی در رشد صنعت تولید خوراک های آبزیان یافته است(۱۶). زندگی ماهیان به محیط آبی وابسته بوده و مکانیسم‌های خاصی برای ادامه زندگی در این محیط حیاتی یافته‌اند و از آن جا که ارتباط ماهیان با این محیط از طریق پوست و آبشش برقرار می شود، کوچک ترین عدم تعادلی، منجر به استرس و مستعد شدن در بروز بیماری و تلفات می گردد(۱۲). در این بین ویتامین ها و مواد معدنی اغلب موجب تسریع فعالیت های زیستی شده و برای رشد طبیعی، تولید مثل و حفظ شرایط طبیعی و متابولیسم صحیح بدن ضروری اند که فقدان هر کدام از ویتامین ها و مواد معدنی در جیره غذایی منجر به بروز بیماری خاص می شود(۳۲). لذا برای کاهش خطر بیماری ها، بایستی سطح مقاومت ماهیان به عفونت ها افزایش یابد که می توان از تحریک های ایمنی بدن مثل ویتامین ها همراه با مواد معدنی استفاده کرد زیرا در سیستم های پرورش ماهی، افزودن ویتامین ها به همراه مواد معدنی به دلیل تاثیرگذاری در سیستم ایمنی بدن نقشی حیاتی ایفا کرده و نهایتاً رشدی مطلوب تر را نتیجه می دهند. از آن جا که استفاده از محرک های ایمنی روشی جدید برای کنترل بیماری هاست پس نیاز به تحقیقات بیشتر امری ضروری به نظر می رسد(۳۳). دلایل بهبود رشد به نقش مواد معدنی و ویتامین ها در رشد و استحکام استخوان‌ها، کاهش بروز ناهنجاری های استخوانی، رشد و تغذیه بهتر آبزی، سلامت ماهی، تغذیه و فعالیت آنزیمی مناسب تر، هضم بهتر مواد غذایی، نفوذپذیری بالای روده و افزایش جذب مواد مغذی بر می‌گردد(۲۹). پس کمبود این ویتامین در بدن می تواند منجر به انواع بیماری ها، متوقف شدن رشد و یا حتی مرگ شود. معمولاً رشد حیوانات بدین صورت تعریف می‌گردد: افزایش وزن بدن در فواصل معین زمانی بر اساس ویژگی های گونه ای(۲۸)، این جمله نشان می دهد که میزان رشد در مراحل مختلف برای هر یک از گونه ها ویژگی‌های خاصی دارد. حداکثر رشد، از نقطه نظر افزایش وزن و اندازه، بر اساس میزان تغذیه و مطلوب بودن رژیم غذایی تعیین می شود. رشد واقعی در حقیقت به مفهوم افزایش بافت های ساختاری، نظیر عضلات و استخوان ها و سایر اندام ها است(۳۲). ویتامین D تقریباً از ۱۰ ترکیب استرولی متفاوت با فعالیت ویتامینی ساخته شده است، در حالی که از نظر عملکردی فقط دو ترکیب از آن ها دارای اهمیت می باشد: ارگوکلسیفرول یا D_2 و کول کلسیفرول یا D_3 که ماهیان تنها قادر به استفاده از ویتامین D_3 می باشند(۳۲). هم چنین ویتامین ها نقش عمده ای در متابولیسم مواد غذائی و تقویت سیستم ایمنی ماهیان داشته و در شکل گیری بافت های بدن نقش دارند(۳۶). در چند دهۀ گذشته مشخص شده که سیستم غدد درون ریز ویتامین D نقش مهمی در فرآیندهای بیولوژیکی دیگر ایفا می کند که علاوه بر هموستازی کلسیم و فسفات، با عملکرد ماهیچه ها، بیماری های خود ایمنی و فیزیولوژی قلبی- عروقی مربوط می-شود(۲۴). کلسیم و منیزیم دارای فرآیند متابولیسم مشابه و سازنده در بافت های استخوانی می باشند. کلسیم و فسفر به طور مستقیم در توسعه و نگهداری سیستم اسکلت بدن و فرآیندهای فیزیولوژیک شرکت می

Archive of SID

www.SID.ir

کنند(۲۷). کلسیم علاوه بر شرکت در ساختمان استخوان ها، در فرآیندهای فیزیولوژیک پایه ای چون انعقاد خون، انتقالات عصبی- عضلانی، حفظ تونوس طبیعی و تحریک پذیری عضلات قلبی و اسکلتی نیز نقش حیاتی دارد. از منابع تامین کننده کلسیم در جیره ماهیان، پودر استخوان، کربنات کلسیم، آهک آسیاب شده، فتو کلسیم فسفات، دی کلسیم فسفات و سولفات کلسیم می باشد. کمبود کلسیم حتی با وجود فسفر کافی جیره باعث غیرطبیعی شدن استخوان می شود(۱۴). بررسی ها نشان داده که سیستم ایمنی در ماهیان استخوانی شباهت زیادی با پستانداران دارد و از آن جا که پرورش ماهیان به صورت متراکم، منجر به افزایش احتمال ابتلا به بیماری های عفونی در تمام مراحل پرورش می شود مطالعه سیستم ایمنی به حفظ سلامت آن ها در طول دوره پرورش کمک می کند(۳۰). علم خون شناسی ماهیان از دهه ۸۰ میلادی به طور جدی آغاز و تا امروز روند پیشرفت قابل توجهی را گذرانده اما چون هر گونه از ماهیان دارای الگوی خاص خونی اند و هر عامل استرس زایی بر میزان این فاکتورها تاثیر به سزا دارد، کار در این زمینه با مشکلات متعددی روبرو بوده است که از سرعت این تحقیقات می کاهد(۳). از نمونه کارهای مشابهی که در زمینه ویتامین D و کلسیم در ماهیان انجام شده است می‌توان به تحقیقات: دهقان زاده و همکاران ۱۳۹۲(ماهی قزل آلای رنگین کمان)(۴)، Kalantarai ۲۰۱۳(ماهی قزل آلای رنگین کمان)، Gupta۲۰۰۴(ماهی *Catla* *Catla*)(۱۷)، Delbert۲۰۰۳(ماهی تیلاپیا)، Furuichi۲۰۰۰(عقرب ماهی)، اشاره کرد که متاسفانه در زمینه سیستم ایمنی در ماهیان، تحقیقات مشابه کمتر دیده شده است. در راستای تحقیق حاضر می توان به این پرسش اشاره کرد که آیا استفاده از مقادیر مختلف ویتامین D و کلسیم تاثیری بر رشد وافزایش سیستم ایمنی بدن بچه ماهیان دارد؟ در این تحقیق در نظر است با افزودن کلسیم و ویتامین D_3 مازاد موجود در جیره غذایی، ارتباط متقابل بین رشد با سیستم ایمنی بچه تاسماهی ایرانی در مقایسه با تیمار شاهد، مورد مقایسه و بررسی قرار گیرد.

مواد و روش ها

این پژوهش به مدت ۶۰ روز در موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر واقع در ۲۵ کیلومتری شهر رشت و در مجاورت سد سنگر، در جوار رودخانه سفید رود صورت گرفت. بچه تاسماهیان ایرانی پس از ۱۰ روز عادت دهی به غذای دستی، به تعداد ۶۰ عدد در ۱۵ حوضچه ۵۰ لیتری نگه داری شدند. هر یک از مخازن با ۵۰ لیتر آب تازه پر شد و روزانه ۷۰ درصد آب از طریق برداشت ضایعات باقی مانده در کف تعویض می گردید. در این بررسی، به منظور تغذیه لاروها یک نوع غذای تهیه شده از جیره پایه، برگرفته از فرمولاسیون غذایی ارائه شده توسط پورعلی و همکاران در سال ۱۳۸۲ استفاده گردید(جدول ۱)(۲). برای انجام این تحقیق حدود ۱۰۰ گرم ویتامین D_3 پودری با درجه خلوص ۱۰۰درصد با مارک DSM(روش سوئیس) و ۴۰۰ گرم کربنات کلسیم از شرکت خوراک آبزیان کیمیاگران تغذیه شهرکرد تهیه شد. برای آماده سازی تیمارها پس از محاسبات انجام شده، مقدار ویتامین D_3 و کلسیم برای هر تیمار توسط ترازوی A&D دیجیتال سری GH با دقت یک صد هزارم گرم اندازه گیری شد. مقادیر ویتامین D_3 و کلسیم برای هر تیمار، در ۱۰۰ سی سی الکل اتیلیک طبی ۹۶ درصد(ساخت شرکت کیمیا الکل زنجان) با فرمول C_2H_5OH حل شد و با ۹۰۰ سی سی آب مقطر مورد رقیق سازی قرار گرفت و بر روی یک کیلوگرم غذا در فضای باز و در معرض جریان هوا و در سایه مورد اسپری قرار گرفت تا آب مخلوط شده به غذا به آرامی تبخیر گردد. این آزمایشات در تیمارهای (تیمار۱- کلسیم gr/kg ۶، تیمار ۲- ویتامین D_3 در سطح

Archive of SID

www.SID.ir

۳۰۰۰ IU، تیمار ۳- کلسیم ۱۲gr/kg، تیمار ۴- ویتامین D_3 ۳۰۰۰ IU و کلسیم ۶ gr/kg) به همراه تیمار شاهد(بدون افزودنی) صورت پذیرفت. دلیل استفاده از ویتامین D_3 در این تحقیق، به نقش کارکردهای دیگری مثل بیماری های خود ایمنی و کارکرد سیستم ایمنی که در رشد موثر هستند، بر می گردد و از آن جا که نیاز این ماهی به این ویتامین در حدود ۲۴۰۰واحد بین المللی است(۳۶) و در گذشته بر روی گونه های دیگر با غلظت‌های ۲۰۰ تا ۲۴۰۰ واحد بین المللی مورد بررسی قرار گرفته است(۹، ۸)، سعی شده با افزایش غلظت ویتامینی، اثرات احتمالی بر رشد و هم چنین در صورت امکان، محدوده مناسب برای بچه تاسماهی ایرانی به این ویتامین با شرایط آب و هوایی ایران سنجیده شود. برای آگاهی از میزان رشد بچه ماهیان در طول دوره پرورش، برای کاهش استرس احتمالی و اثرات منفی ناشی از دستکاری های فیزیکی، اقدام به زیست سنجی با فواصل زمانی دو هفته ای گردید. بدین منظور برای اندازه گیری وزن، کل بچه ماهیان هر تانک صید و به ظرف هایی حاوی آب منتقل شدند. در نهایت پس از کسر وزن مقادیر اندازه گیری شده از وزن ظرف و آب، وزن بچه ماهیان محاسبه شد. وزن زیست توده زنده مبنایی برای محاسبه مقدار غذای دو هفته آینده بود. لازم به ذکر است که محاسبه طول بچه ماهیان بر اساس میانگین وزن ۵ عدد بچه ماهی و بر اساس صید تصادفی از هر تانک صورت پذیرفت و پس از انجام مراحل بیهوشی با عصاره پودر گل میخک با غلظت ۰/۵گرم در لیتر و خشک کردن بدن آن ها با کمک پارچه تنظیف، طول کل آن ها بر روی تخته بیومتری اندازه گیری شد(۱۰). هم چنین میزان غذای پلت مورد نیاز روزانه برای تمامی تیمارها بر اساس نتایج زیست سنجی و میانگین وزنی بچه ماهیان هر یک از تانک های پرورش و متناسب با دمای آب و اشتهای ماهیان مطابق ۵ درصد وزن بدن برای هر روز محاسبه گردید و روزانه در چهار نوبت(ساعت های ۸،۱۲،۱۷،۲۱) غذا دهی شدند. فاکتورهای رشد که در این تحقیق انجام گرفت شامل موارد ذیل می باشد(۳۱):

۱- اندازه گیری درصد بقا(Survival rate)

۲- اندازه گیری افزایش وزن بدن(Weight gain)

۳- اندازه گیری نرخ رشد ویژه(Specific growth rate)

۴- اندازه گیری میانگین رشد روزانه(Average Daily growth)

۵- اندازه گیری درصد افزایش وزن(Body Weight Initial)

۷- اندازه گیری طول نهایی بدن

۸-اندازه گیری وزن نهایی

به منظور خونگیری، در پایان دوره ۲ ماهی از هر تکرار در ساعت ۸ صبح که از قبل ۲۴ ساعت قطع غذا شده بودند به طور تصادفی صید و پس از خشک کردن توسط پارچه تنظیف، از طریق قطع ساقه دمی، یک میلی لیتر خون از هر تیمار درون لوله ویال اپندورف آغشته به ماده ضد انعقاد خون هپارین ریخته شد. نمونه ها در یک کلمن حاوی یخ خشک به آزمایشگاه هماتولوژی دکتر فدایی در رشت منتقل و گلبول های سفید خون، ویتامین D_3خون، کلسیم خون، ایمونوگلبولین کل مورد اندازه-گیری قرار گرفت. اندازه گیری کلسیم خون بر اساس میلی گرم کلسیم در دسی لیتر به روش کالریمتریک و روش دو محلوله با استفاده از دستگاه اتو آنالیزور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام شده است به گونه ای که در مجاورت متیل تیمول بلو ایجاد رنگ نموده که غلظت آن متناسب با مقدار یون کلسیم در محیط می-باشد(۱۵). اندازه گیری ویتامین D خون نیز با کیت تجاری Euroimmin به روش ELISA(25-OH Vitamin D ELISA Test instruction) بر اساس نانو گرم ویتامین D_3 در میلی لیتر انجام شد(۱۱).

Archive of SID

www.SID.ir

ایمونوگلبولین(Igm) در این آزمایش بر اساس روش سیویکی و اندرسون محاسبه شده است(۳۵). لام گسترش خونی به مدت ۵ دقیقه در جریان هوا، خشک و با متانول به مدت ۳ تا ۵ دقیقه تثبیت شد. از محلول گیمسا جهت رنگ آمیزی و مشاهده لام ها زیر میکروسکوپ برای شناسایی انواع گلبول های سفید و تعداد و درصدشان استفاده گردید(۶). در نهایت، به منظور بررسی توزیع نرمال داده ها در گروه ها از آزمون شاپیرو ویلک (Shapiro-Wilk) و رسم نمودار هیستوگرام استفاده شد. در صورت نرمال بودن داده ها به منظور مقایسه آماری بین گروه ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (Oneway ANOVA) و پس از انجام آزمون تست آزمون واریانس هموژنی(Test of Homogeneity of Variances) جهت مقایسه گروه ها با یک دیگر از آزمون دانکن، در صورت نرمال نبودن داده ها جهت مقایسه تیمارها از آزمون کروسکال والیس(Kruskal-Wallis) و به منظور مقایسه بین گروه‌ها از آزمون من ویتنی(Mann-Whitney) استفاده شد. لازم به ذکر است که تمامی داده ها پارامتریک بوده اند به جز داده‌های ائوزونوفیل که از آزمون کروسکال والیس برای بررسی آن استفاده گردید. کلیه آنالیز های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و جهت رسم نمودار ها از نرم افزار Excel ۲۰۱۰ استفاده شد.

جدول ۱- جدول مشخصات فیزیکی و آنالیز خوراک

میزان پروتئین	میزان چربی	میزان فیبر	میزان کربوهیدرات	میزان رطوبت	سایز خوراک
۴۶٪	۱۵٪	زیر ۱۰٪	۱۵٪	۱۰٪	۱/۵ میلی متر

نتایج

مقایسه میانگین میزان وزن نهایی، طول نهایی، افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه، رشد روزانه، درصد افزایش وزن بدن در شاهد و تیمارهای مختلف در پایان دوره به منظور مقایسه دو به دو گروها با یک دیگر نشان داد که تیمار ۱ و تیمار۲ بیش از شاهد، تیمار ۳و۴ بوده و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار مشاهده گردید ($P\leq ۰/۰۵$)(جدول ۲).

جدول ۲- اثر تیمار های مختلف بر میانگین وزن نهایی، طول نهایی، افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه، میانگین رشد روزانه، درصد افزایش وزن بدن

شاخص های رشد	تیمار های غذا دهی				
	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	شاهد
وزن نهایی	۷۸±۶/۷^{a}	۶۴/۵۹±۴/۱^{ab}	۳۵±۲/۳^{c}	۲۴±۳/۴^{c}	۵۱/۸۵±۳/۹^{b}
طول نهایی	۲۸±۶/۴^{a}	۲۷/۲۶±۳/۸^{a}	۲۳±۴/۲^{bc}	۲۰/۳۱±۶/۶^{c}	۲۵/۳۲±۵/۳^{ab}
افزایش وزن بدن	۶۰/۶۷±۶/۷^{a}	۴۵/۹۳±۴/۱^{ab}	۱۵/۸±۳/۴^{c}	۵/۸±۳/۸^{c}	۳۲/۴۵±۵/۲^{b}
نرخ رشد ویژه	۲/۳±۰/۴^{a}	۲/۲±۰/۱^{ab}	۰/۷±۰/۳^{c}	۰/۱±۰/۲^{c}	۱/۳±۰/۶^{b}
میانگین رشدروزانه	۱/۰۸±۰/۳۲^{a}	۰/۸۲±۰/۲۶^{ab}	۰/۲۸±۰/۱۵^{c}	۰/۱±۰/۱۲^{c}	۰/۵۷±۰/۲۲^{b}
درصد افزایش وزن	۳۵۰/۰۸±۱۱۴^{a}	۲۴۶/۱۴۱±۳۲^{b}	۸۲/۲۹±۳۳^{cd}	۳۱/۸۶±۴۰^{d}	۱۶۷/۲۶±۱۰۱^{bc}

*میانگین ± خطای معیار (X±SE)

**حروف مشترک در جدول مقایسه میانگین ها در هر سطر نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار و حروف غیر مشترک نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین میانگین داده ها در سطح ۹۵ درصد می باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

مقایسه میانگین میزان ویتامین D_3 خون در شاهد و تیمارهای مختلف در پایان دوره به منظور مقایسه دو به دو گروه ها با یک دیگر نشان داد که ویتامین D_3 خون بچه ماهیان در شاهد، تیمار ۲ و ۴ کمتر از سایر تیمارها بوده و در تیمار ۱ و ۳ از بیشترین مقدار برخوردار بوده و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار بین شاهد، تیمار ۲و۴ با تیمار ۱ و ۳ مشاهده گردید(P≤۰/۰۵)(جدول ۳). میانگین میزان کلسیم خون در شاهد و تیمارهای مختلف در پایان دوره به منظور مقایسه دو به دو گروه ها با یک دیگر نشان داد که میزان کلسیم در خون ماهیان مورد بررسی، بین تیمارها اختلاف معنی داری وجود دارد (P≥۰/۰۵)(جدول ۳). میانگین تعداد گلبول سفید خون در شاهد و تیمارهای مختلف در پایان دوره در مقایسه دو به دو گروه ها با یک دیگر نشان داد که میزان گلبول‌های سفید خون بچه ماهیان در تیمار۱، ۲ و ۴ بیش از سایر تیمار ها و شاهد بوده و اختلاف معنی داری با تیمار شاهد(که از کمترین مقدار برخوردار بوده است) و تیمار ۳ مشاهده گردید(P≤۰/۰۵)(جدول ۳) . با مشاهده میانگین ایمونوگلبولین(Igm) خون در شاهد و تیمارهای مختلف در پایان دوره، مقایسه دو به دو گروه ها با یک دیگر نشان داد که میزان ایمونوگلبولین کل خون بچه ماهیان به ترتیب در تیمارشاهد، تیمار ۱، تیمار ۲ و تیمار ۳ بیشتر از تیمار ۴ بوده و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار مشاهده گردید(P≤۰/۰۵)(جدول ۳). در نهایت مقایسه میانگین میزان، لنفوسیت، مونوسیت خون در شاهد و تیمارهای مختلف در پایان دوره در مقایسه دو به دو گروه ها با یک دیگر نشان داد که بین تیمار ها اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد(P≥۰/۰۵)(جدول ۳).

جدول۳- اثر تیمار های مختلف بر میانگین فاکتور های خون

تیمار های غذا دهی

فاکتورهای خون	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	شاهد
ویتامین D_3	۱۰/۵۵±۰/۴۵^{a}	۸/۳±۰/۲^{b}	۱۱/۳۵±۰/۲۵^{a}	۷/۱۵±۰/۳۵^{b}	۸/۱۵±۰/۱۵^{b}
کلسیم	۸/۳±۰/۶	۸/۳±۰/۲	۷/۶±۰/۳	۶/۶۵±۰/۱۵	۸/۸±۰/۱
گلبول سفید	۱۰۶۵۰±۱۵۰^{a}	۱۱۱۰۰±۱۰۰^{a}	۹۴۵۰±۲۵۰^{b}	۱۱۰۰۰±۱۰۰^{a}	۸۲۰۰±۳۰۰^{c}
ایمونوگلوبین	۱۸±۰^{a}	۱۶/۳۵±۰/۵۵^{a}	۱۷/۶±۱/۴^{a}	۱۱/۷۵±۳/۲۵^{b}	۱۱/۷۵±۰/۳^{a}
لنفوسیت	۶۳±۱	۶۳/۵±۲/۵	۶۲/۵±۱/۵	۶۱/۵±۰/۵	۶۶±۱
مونوسیت	۳/۵±۰/۵	۴±۱	۳/۵±۰/۵	۴/۵±۰/۵	۴±۱

*میانگین ± خطای معیار (X±SE)

**حروف مشترک در جدول مقایسه میانگین ها در هر سطر نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار و حروف غیر مشترک نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین میانگین داده ها در سطح ۹۵ درصد(P≤۰/۰۵) می باشد.

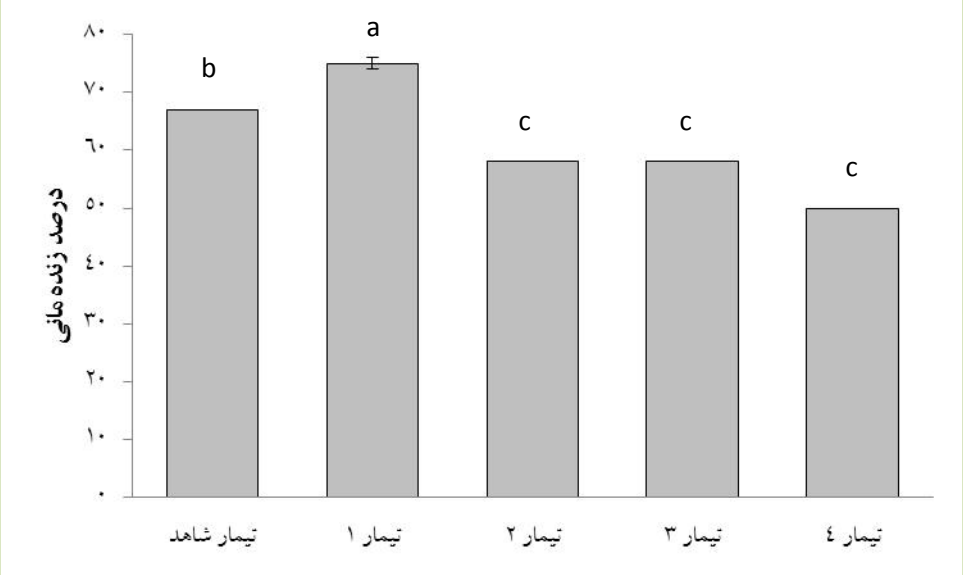
مقایسه میانگین درصد بقا در شاهد و تیمارهای مختلف در پایان دوره به منظور مقایسه دو به دو گروه ها با یک دیگر نشان داد که میزان زنده مانی بچه ماهیان در تیمار۱ و شاهد بیش از سایر تیمارها بوده است و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار با تیمار ۲،۳و۴ مشاهده گردید (P≤۰/۰۵)(نمودار۱).

بحث و نتیجه گیری

در سراسر دنیا تهیه جیره های غذایی تاسماهیان هر کشور وابسته به صنعت آبزی پروری خاص همان اقلیم می باشد. متخصصین آبزی پروری به منظور دست‌یابی به فرمولاسیون جیره غذایی استاندارد برای ماهیان خاویاری، مطابق با نیازهای تغذیه‌ای آن ها در طی مراحل مختلف رشد مطالعات ویژه ای انجام داده اند(۲، ۱).

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۱- میانگین میزان درصد زنده مانی تیمار ها در پایان دوره

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار می باشد

متاسفانه تاکنون در زمینه تاثیر مواد معدنی به خصوص کلسیم پژوهش چندانی در ماهیان خاویاری صورت نگرفته است البته بر روی سایر گونه ها کارهای متعددی صورت گرفته است. از سویی در این مطالعه اثر ویتامین D_3 نیز مورد بررسی قرار گرفته که در این زمینه نیز کار پژوهشی ویژه ای صورت نگرفته است. بنابراین مقایسه نتایج این تحقیق با نتایج پژوهش های دیگر تا حد امکان و بر اساس موجودی منابع انجام پذیرفته است. آبزی پروری، به کارگیری تکنیک های ذخیره یا نگهداری، تغذیه، نور، دما، محافظت در برابر شکارچیان و پیشگیری در مقابل عوامل بیماری ساز، برای بالا بردن تولید با تکیه بر دانشی کاملاً تخصصی بوده و مطالعه و شناخت شرایط زیستی موجود و وجود مواد تغذیه ای برای شبیه سازی محیط طبیعی لازمه موفقیت در این راه می باشد(۲۰). در تامین تمامی ترکیبات غذایی مورد نیاز در حد لازم، به کارگیری مقادیر متعادلی از آن ها برای دستیابی به رشد مناسب که افزایش فاکتورهای رشد را سبب شود، ضروری است. بنابراین برای این منظور، فرمولاسیون صحیح و تولید مناسب غذاهای مصنوعی و یافتن روابط موثر در رشد، امری ضروری می باشد(۵).

زیرا ممکن است جیره های موجود به اندازه کافی جهت تامین کامل نیازهای غذایی ماهیان متعادل نشده باشد(۳۶). بچه ماهیان در پایان دوره آزمایش در این تحقیق، بیشترین اوزان را در تیمار ۱ و ۲ داشته اند و نتایج یافته ها حکایت از افزایش وزن نهایی دارد. نتایج تحقیق حاضر با نتایجی که در سال ۱۹۹۳ روی تیلاپیا(۳۴) و سال ۱۹۸۰ توسط Andrews و همکاران روی گربه ماهی(۷) انجام شده منطبق است. تحقیق O'Connel و Gatlin در سال ۱۹۹۴ روی تیلاپیای آبی از ترکیب مقادیر جیره های کلسیمی و ویتامین D، اثبات کرد جیره های فاقد ویتامین D از وزن نهایی کمتری برخوردار می شوند که با نتایج تحقیق حاضر یکسان است(۲۶). با عنایت به دستیابی مناسب‌ترین راندمان از نظر افزایش توده زنده نهایی، طول کل، وزن نهاییW_f، میانگین افزایش وزن بدن، میانگین رشد روزانهADG، درصد افزایش وزن بدنBWI، افزایش وزن بدنWG، نرخ رشد ویژهSGR ، در پایان دوره بررسی سایر تیمارها مشخص نمود که افزایش کلسیم جیره تا ۱۲ گرم در کیلو گرم و افزایش ویتامین D_3 تا ۳۰۰۰ IU واحد بین المللی در جیره غذایی تاسماهی ایرانی ضرروتی ندارد. از نظر بررسی

Archive of SID

www.SID.ir

اقتصادی هم می توان با موازنه نمودن جیره غذایی با میزان ۶ گرم در کیلو گرم کلسیم(نتایج تیمار شماره ۱) و حداکثر ۳۰۰۰ IU واحد بین المللی ویتامین D_3(نتایج تیمار ۲)، جیره مناسب با حداقل هزینه و بیشترین درصد تاثیر در ارتقای شاخص‌های رشد و سیستم ایمنی فراهم نمود. بررسی درصد بازماندگی در بچه ماهیان در این تحقیق، حکایت از وجود درصد زنده مانی بالاتری در تیمار۱ با میزان ۶ گرم در کیلو گرم کلسیم و ویتامین D_3(بدون افزودنی) در قیاس با سایر تیمارها دارد. بنابراین افزایش کلسیم در جیره غذایی، درصد زنده مانی را افزایش داده و استدلالی بر نقش آن بر سلامت موجود زنده می‌باشد. اگرچه در تحقیق حاضر در بالاترین غلظت با کاهش درصد زنده مانی مواجه شده ایم که می تواند به دلیل دستکاری ها و آسیب های فیزیکی و شرایط کارگاهی باشد. بررسی کلسیم خون در بچه تاسماهیان مورد آزمایش در تحقیق حاضر نشان داد که میزان کلسیم خون ماهیان در تیمارهای شاهد، تیمار۱ و تیمار۲ بیشتر از همه تیمارها است. تیمار ۴ دارای کمترین مقدار بوده و تیمار ۳ و ۴ از تیمار شاهد کمتر می باشد. میزان کلسیم خون تحت تاثیر وجود کلسیم و ویتامین D_3 در جیره می باشد. با وجود ویتامین D_3 در جیره باعث افزایش کلسیم در خون شده است. تحقیق حاضر که برروی بچه تاسماهیان ایرانی انجام شد با نتایج دهقان زاده و همکاران در سال ۱۳۹۲ که بر روی ماهی انگشت قد قزل آلا انجام شد در تطابق است(۴). بررسی سطوح ویتامینD_3 خون در تحقیق انجام شده در بچه تاسماهیان ایرانی نشان داد که دوگروه از تاسماهیان به طور معنی دار تفکیک شده اند به گروهی با مقادیر کلسیم مشخص(بدون افزودن ویتامین D_3) که بیشترین ویتامین D_3 را در خون ماهیان دارند. تیمار ۱و۳ و گروه دوم که شامل شاهد و تیمار ۲و۴ که به طور معنی داری مقدار کمتری ویتامین D_3 در خون دارند. به نظر می رسد یک واکنش متقابل بین ویتامین D_3 با متابولیسم کلسیم وجود دارد. این موضوع می تواند به طور مستقیم، فسفر و متابولیسم کلسیم استخوان ها ربط داشته باشد(۳۸)، که با نتایج Barnett و همکاران در سال ۱۹۸۲ و دهقان زاده و همکاران در سال ۱۳۹۲ که بر روی قزل آلای رنگین کمان انجام شد اختلاف دارد(۹،۸). شاید دلیل آن را پس از گذشت چندین سال بتوان در پیشرفت ابزارهای اندازه گیری و درصد خطای پایین و جیره های غذایی و ترکیبات غذایی در زمان حال دانست. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق می توان اظهار نمود اضافه نمودن کلسیم و ویتامین D_3 می‌تواند بر سیستم ایمنی غیر اختصاصی تاثیر مثبت گذاشته به طوری که افزایش لیزوزیم در تیمار ۳ و۴ نسبت به گروه شاهد و سایر تیمارها مشهود می باشد. افزایش نوتروفیل نیز در تمامی تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد با اختلاف معنی دار آماری روبرو شده است. همین امر نیز روند افزایشی گلبول های سفید را در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد نشان می دهد. که در نهایت می توان نتیجه گرفت افزودن مقادیر مختلف کلسیم، ویتامین D_3 در جیره غذایی بچه تاسماهیان ایرانی سبب بهبود ایمنی غیر اختصاصی در این ماهیان گردیده است. بدن هر موجود زنده زمانی که با کمبود ویتامین D_3 مواجه شود معمولاً ضعیف شده و قدرت کافی برای دفاع در مقابل باکتری ها و ویروس ها را نخواهد داشت(۲۵). گلبول های سفید در سیستم دفاعی و ایمنی بدن دخالت داشته و در برابر عوامل گوناگون بیماری زا موجود در بدن ماهی مقاومت کرده و پاسخ ایمنی مختلفی بوجود می آورند. وظیفه اصلی گلبول سفید تولید پادتن بوده و تمامی گرانولوسیت ها و مونوسیت ها با بیگانه خواری ذرات خارجی به مبارزه با عوامل بیماری زا می پردازند(۶)، که به طبع افزایش این سلول ها اثرات مثبت در فاکتورهای رشد خواهد گذاشت. لازم به ذکر است که در زمینه

Archive of SID

www.SID.ir

تاثیرات ویتامین D_3 بر روی گلبول های سفید خون در ماهیان تحقیق مشابهی مشاهده نگردید. بررسی سطوح ایمونوگلبولین ماهیان در تحقیق انجام شده نشان داد که این دو عامل نه تنها اثر هم‌افزایی(Synergism) ندارند بلکه اثر آنتاگونیستی دارند، بررسی شاخص وزن نهایی رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی نیز نتیجه را تایید می نماید و با توجه به نتایج رشد می توان گفت کلسیم و ویتامین D_3 با هم اثر آنتاگونیستی در ماهی دارند. به طور کلی اساس سیستم ایمنی اختصاصی بر این است که ماهیان را به طور انفرادی قادر به بقا و حفظ تعادل داخلی خودشان در محیط می نماید(۲۰). از آن جا که ماهی بدون مصرف غذای مناسب، سلامت خود را از دست می دهد، جیره‌های نامناسب باعث کاهش تولید و نهایتاً بروز بیماری می‌گردد(۳۲). چون سطوح غیرعادی ویتامین D یک عامل تصادفی در بسیاری از بیماری هاست پس چرخه غذا، رشد و سیستم ایمنی، چرخه ای زنجیروار بوده و کاهش یا افزایش در یکی از این موارد نتیجه مستقیم در دیگر عوامل برجا می گذارد(۱۸). در پایان می توان اذعان نمود که رشد یکی از پیچیده ترین پدیده هایی است که نمی توان تنها با پیگیری یک فاکتور به چگونگی آن پی برد، بلکه عواملی مثل کمیت و کفیت غذا و مواد تشکیل دهنده غذا، در زمره عوامل موثر در رشد هستند(۱۳). همچنین بهبود افزایش مقادیر نوتروفیل-ها و گلبول های سفید نهایتاً می توانند شرایط رشد بهتر را در آبزی سبب گردند که در تحقیق حاضر، سایر تیمارها در قیاس با تیمار شاهد شرایط بهتری از این موارد را دارا بوده اند و هیچ گونه ناهنجاری در ماهیان مشاهده نگردید. لذا می توان نتیجه گرفت بین عملکرد رشد و سیستم ایمنی ارتباطی مستقیم پدید آمده است که زمانی که سیستم ایمنی افزایش یافته به طبع رشد بهتر حاصل شده است. در پایان با توجه به این که کمبود ویتامین D و کلسیم در سراسر جهان یک مشکل با اثرات بهداشتی جدی است(۱۹) لذا حفظ منابع تامین کننده ویتامین D و کلسیم حائز اهمیت می باشد. در این بین ماهی، ماده غذایی مهمی در این زمینه بوده و بایستی تولید بهتری با نرخ تلفات کمتر در لارو بچه تاسماهی ایرانی در جهت بهینه سازی وضعیت تغذیه با استفاده از کلسیم و ویتامین D_3 در جیره روزانه و انتقال به بدن در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری با غلظت میزان ۶ گرم در کیلو گرم کلسیم یا ۳۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D_3 صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

از ریاست محترم و کارکنان موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر به دلیل در اختیار قرار دادن امکانات و محل اجرای آزمایشات و از جناب آقای دکتر یزدانی، مهندس یگانه و مهندس پورغلام به دلیل در اختیار قرار دادن تجربیات چندین ساله خود سپاسگزاری می نمائیم .

منابع

۱-پورعلی فشتمی، ح. ر.، محسنی، م. ، عاشوری، ع. b۱۳۹۰. پرورش گوشتی تاسماهی ایرانی(*Acipense persicus*) و تاسماهی روسی(*Acipenser gueldenstadti*) در وان فایبرگلاس. مجموعه مقالات همایش ارمنستان در سال ۲۰۱۱. ص ۱۴۱.

۲-پورعلی فشتمی، ح.ر.، یزدانی، م. ع.، پیکران مانا، ن.، حسنی، ح.، محسنی ، م.، نظامی، ا. a۱۳۹۱. بیوتکنیک پرورش ماهیان خاویاری در آب شیرین و لب شور. دنیای آبزیان. شماره ۲۵. سال نهم. صفحات ۳۰-۲۱.

۳جمالزاده، ح.ر.، کیوان، الف.، جمیلی، ش.، عریان، ش.، سعیدی، ع.الف.۱۳۸۰. بررسی فاکتورهای خونی آزاد ماهی دریای خزر. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال. دانشکده علوم و فنون دریایی. گروه بیولوژی دریا.

Archive of SID

www.SID.ir

٤–دهقان زاده، س.، زمینی، ع.، خارا، حسین.۱۳۹۰. تاثیرات اضافه نمودن ویتامین D در جیره غذایی بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان بر روی سیستم ایمنی و فاکتورهای خونی. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان. ۳۳-۴۴.

5.Afshar mazandaran, N. (2002). Scientific guide of nutrition and food and drug aquaculture inputs in Iran. Publication by Nourbakhsh, pp;216.

6.Abdollah Mashaee, M. (2007). Physiological functions in Aquaculture of fish. First Edition. Publication by Daryasar, pp; 128.

7.Andrews, J.W., Takeshi, M., Page, J.W. (1980). Effects of dietary chollecalciferol and ergocalciferol on catfish. Aquaculture,19; 49-54.

8.Barnett,B.J., Jones, G., Young Cho, C., Slinger, S.J. (1982). The biological activity of 25-Hydroxy chole calciferol and 1, 25 – Dihydroxy chole calciferol for *Rainbow trout*. Department of Nutrition,College of Biological Science.University of Guelphv Canada, 112; 2020-2026.

9.Barnett, B.J., Young Cho, C., Slinger, S.J. (1982). Relative biopotency of dietary ergocalciferol and cholecalciferol and the role of and requirement for vitamin D in *Rainbow Trout*. Department of Nutrition,College of biological Science.University of Guelph Canada, 112; 2011-2019.

10. Drummond Sedgwick, E. (2007). Trout Farming Handbook. Translated by: A.mashaee. Publication by daryasar, pp:208.

11. Euroimmun, AG., Stocker, W., Schlumberger, W. (2007). Alle *Beitrang zum* thema autoimmundiagnostik.In:Gressner A,Arndt T(Hrsg.)Springer Lexikon Klinische Chemie. Medizinische Lbordiagnostik von A-Z.Springer Medizin Verlang,Heidelberg 1.

12. Farahani, R. (2001). Diseases of rainbow trout.First Edition.Publication by naghsh mehr, pp; 35.

13. Forouzanfar, A. (2005). Reproduction and aquaculture of Salmon. First Edition.Iranian Fisheries Research Institute. pp:175.

14. Fuentes, J., Haond, C., Guerreiro, P., Silvam N., Powe, Deborah, Canario, A. (2007). Regulation of calcium balance in the sturgeon *Acipenser naccarii*: a role foe PTHrP. Am Physiol Regul Integr Comp Physiol, 293; 884-893.

15. Gindler, E. (1973). Chem Abstr,78; 25984.

16. Goddard, S. (2001). Feed management in intensive aquaculture. Translated by: Alizadeh and Dadgar. deputy of reproduction and aquaculture- general directorate of training and promotion. pp:190.

17. Gupta, A.K. (2004). .Effect of vitamin D diets on certain biological and biochemical profiles in the fingerling of catla catla .Department of Limnology and Fisheries و38(2); 97-100.

18. Heaney, RP., Davies, KM., Chen, TC., Holick, MF., Barger, MJ. (2003). Human serum 25-hydroxy chole calciferol response to extended oral dosing with chole calciferol. AM J Clin Uutr,77; 201-210.

19. Holick, MF., Chen, TC. (2008). Vitamin D deficiency: A worldwide problem with health consequences. AM J Clin Nutr, 87; 1080-1086.

20. Jafary,J. (1998). Parasites and diseases of freshwater fish. Iranian Fisheries Company, pp;576.

21. Keyvan, A. (2002). An introduction to biotechnology of strudeons propagation. First Editon. Publication by Islamic Azad University Of Lahijan, pp:270.

22. Miranda de Oliveira, A., De Assis Mendes, F., Leite Menezes, A.C., Luis Val, A. (1989). Effect of vitamin D supplementation on haematoligical parameters and weight gain of Tambaqui*(Colossoma macropomum).* J. Instituto Nacinal de Pesquisas da Amazonia, 113-118.

23. Moeinian, M.T. (2006). Carp and pond fish culture. First Editon.Puplication by University of Jahad Branch of Isfehan, 126.

24. Lock, EJ.,Waagb, R.,Wendlaar Bonga, S., Flik,G. (2010). The significance of vitamin D for fish:a review. Aquaculture Nutrition, 16; 100-116.

25. Niknam, M. (1381). Immune system and vitamin D. Articles on vitamin D disorders. Endocrinology and Metabolism Research Center, Tehran University of Medical Sciences, 6.

26.O'Connel, JP., Gatlin, DM. (1994). Effect of dietary calcium and vitamin D3 on weight gain mineral composition of the blue tilapia*(Oreochramis aureus)*in low calcium

Archive of SID

www.SID.ir

water. Department of Wildlife and Fisheries Sciences Texas A&M University System,College Station,USA,125;107-117.

27. Paul Cali, J., Bowers GN, JR.,Gambino, SR.,Gochman, N., Mather, A. (1973). Clin Chem., 10; 1208-13 .

28. Rimura, S., Lyama, S., Yamaguchi, Y., Hayashi, S., Fushimi, R., Amino, N. (1996). Clin Chem 42;1202-5 .

29. Salazar, Aj., Young, C.T. (1984). J. Food Science, 49; 209-211.

30. Scapigliati, G., Romano, N., Abelii, L. (1999). Monoclonal antibodies in fish immunology; identification, ontogeny and activity of T-and B-lymophocytes. Aquaculture, 172; 3-28.

31. Bisvas, S.P. (2000). Methods of studying the biology of fish. Translated by: A.valipoor and S.ABdolmaleki. Fisheries Research Centre of Guilan, 138.

32. Shepherd, J., Bromage, N. (2002). Intensive Fish farming-Vol1. Translated by: Sattari and motamed.Secend Edition. Publication by University of Guilan, 194.

33. Sobhana, K.S., Mohan, C.V., Shankar, K.M. (2002) .Effect of dietary vitamin C on the disease susceptibility and inflammatory response of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) to experimental infection of *Aeromonas hydrophila*. J. Aquaculture, 207; 255-238.

34. Shiau, S.Y., Hwang, J.Y. (1993). Vitamin D requeriment of juvenile hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* x *O.aureus*. Soc.Sci.Fish., 59(3); 553-558.

35. Siwicki, A. K., Anderson, D.P., Rumsey, G. K.(1993). Nonspecific defense mechanisms and disease resistance are enhanced in rainbow trout fed immunostimulants. In: Modulators of Fish Immune Responses.Models for Environmental Toxicology, Biomarkers, Immunostimulators,1; 93-113.

36. Webster, K.D., Lim, K. (2006). Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture.Translated by Ebrahimi,E.,beyraghdar,O.The University of Industry Isfahan, Jahad Branch - Center Publication, 292.

37. Winton, J.R.(2001). Fish health management.In: Wedemeyer,G.(ed).Fish hatchery management. 2nd edition. Bethesda, MD: American Fisheries Society, 1; 559-639.

38. lock, Y., Waagbo, R., Banga, S., Flik, G. (2009). The significance at vitamin D for fishia a review Aquaculture Nutriton,4(2); 127-131.

.

Archive of SID

www.SID.ir