فصلنامه علوم تکثیر و آبزی‌پروری/ سال چهارم/ شماره یازدهم/ زمستان ۹۵/ صفحات ۲۰-۱۱

بررسی رژیم غذایی فسفولیپیدها بر روی برخی از پارامترهای خونی بچه ماهی فیل *(Huso huso)*

محمودرضا ابراهیم‌نژاد[۱]، چی رس بن سعد*[۲]، عبدالمحمد عابدیان کناری[۳]

چکیده

این تحقیق به منظور تعیین تأثیر سطوح مختلف فسفولیپیدها phospholipids (PL) در رژیم غذایی بر پارامترهای خون بچه ماهی خاویاری (فیل ماهی) انجام گردید. بچه ماهیان با رژیم غذایی فرموله شده در چهار سطح مختلف رژیم غذایی PL: (D1) ۰، (D2) ۲، (D3) ۴ و (D4) ۶٪ تغذیه شدند. در پایان دوره آزمایش (۵۶ روز)، نتایج آزمایش نشان داد که تفاوت معنی‌داری در متوسط غلظت هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) مشاهده گردید($P <0.05$). رژیم غذایی D2 (۲٪ PL) بالاترین MCHC به میزان ۳۳,۳ g / dl بود. تفاوت معنی داری در دیگر پارامترهای خونی مانند: گلبول‌های قرمز خون (RBC)، هماتوکریت (HCT)، متوسط گلبول قرمز (MCH)، متوسط حجم گلبول قرمز (MCV)، و گلبول‌های سفید خون (WBC) وجود نداشت($P> 0.05$). بالاترین میزان RBC در تیمار D2 بمیزان ۱/۰۷ (cells/l) و کمترین در تیمار D1 بمیزان ۰/۸۶ (cells/l) مشاهده گردید. بالاترین و پائین‌ترین میزان درصد هماتوکریت به ترتیب (تیمارD3) و (تیمار D1) بمیزان ۲۶/۳۳ و ۲۵/۰۰ ٪ بود. بالاترین و پائین ترین میزان میانگین حجم گلبول به ترتیب (تیمارD1) و (تیمار D2) بود. همچنین اندازه گیری گلبول‌های سفید خون فیل ماهی مانند لنفوسیت ها، مونوسیت، نوتروفیل، ائوزینوفیل با سطوح مختلف فسفولیپیدها در رژیم غذایی نشان داد که تفاوت معنی‌داری ($P> 0.05$) در میان تیمارها وجود ندارد. بالاترین میزان درصد لنفوسیت و مونوسیت در تغذیه ماهی D2 رژیم غذایی با مقادیر ۷۱/۶۷٪ و ۳/۶۷٪ بدست آمد. در حالی که بالاترین میزان نوتروفیل، ائوزینوفیل ماهیان در تیمار D1 و D4 بمیزان ۲۱/۳۳ درصد و ۸/۳۳ درصد بوده است. در نتیجه این تحقیق نشان داد اضافه کردن فسفولیپیدها در رژیم غذایی می تواند تأثیر قابل توجهی در برخی از فاکتور های خونی بچه ماهیان خاویاری فیل ماهی نداشته است.

کلید واژه: فسفولیپیدها، تغذیه، هماتولوژی، فیل ماهی (*Huso huso*).

تاریخ وصول: ۱۳۹۵/۲/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۱۵

۱- گروه آبزی پروری، اداره کل شیلات مازندران، بابلسر، ایران

۲- گروه آبزی پروری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پوترا مالزی، استان سردانگ، مالزی (نویسنده مسؤول)
Cheroos.saad@gmail.com

۳- گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

ماهیان خاویاری از خانواده Acipenseridae که از صد میلیون سال پیش در دوره ژوراسیک می-زیستند. این ماهیان به عنوان فسیل زنده معروف بوده که از زمان‌های دور با تکامل نژادی تا این زمان باقی مانده‌اند. ماهیان خاویاری از ۲۷ گونه و زیر گونه تشکیل شده اند که ۶ گونه از آن مختص دریای کاسپین می‌باشد(حدود ۹۳٪ از ماهیان خاویاری جهان در دریای کاسپین وجود دارند). فیل ماهی در دریای آدریاتیک، دریای کاسپین و دریای مدیترانه وجود دارد. این گونه در دریای کاسپین از شمال، میانه و جنوب پراکنده می باشد. بلوگا در جنوب دریای کاسپین از جمعیت زیادی برخوردار می باشد. با وجود دارا بودن دهان بزرگ نسبت به گونه‌های دیگر متمایز است. علاوه براین پره های آبششی در این گونه به هم متصل بوده و چین خوردگی خط جانبی نزدیک گلو می‌باشد(Keyvan, 2002).

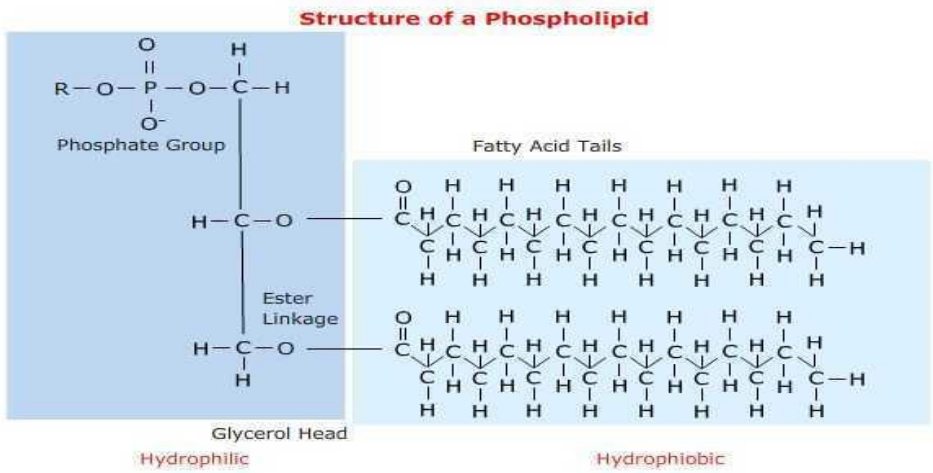
شکل ۱. ماهی خاویاری بلوگا (*Huso huso* Linnaeus, 1758)

صید بیش از حد و غیرمجاز فیل ماهی در دریای کاسپین و دهانه رودخانه ها بزرگترین تحدیدبرای نابودی نسل این ماهی می باشد. این فعالیت های غیرمجاز موجب نابودی مولدینی که برای تکثیر به سمت رودخانه حرکت می کنند می گردد. کشور ایران بمنظور حل این چالش بزرگ هرساله از ماهیان مولد صید شده از دریا تکثیر نموده و بچه ماهیان تولیدی را بمنظور حفظ ذخایر این ماهی به دریای کاسپین رهاسازی می نماید. همچنین جهت کاهش فشار صید این ماهی در دریا، حفظ ذخایر، تولید گوشت و خاویار باکیفیت، درآمدزایی و اشتغال اقدام به پرورش این ماهی در محیط محصور نموده است. دراین راستا یکی از بیشترین هزینه نهاده های تولید تامین خوراک این گونه ماهیان می باشد. لذا تامین خوراک با کیفیت از نقش و اهمیت بسزایی در توجیه اقتصادی تولید این گونه برخوردار می باشد. درتهیه خوراک یکی از منابع مهم تأمین انرژی چربی می‌باشد که از منابع روغن ماهی در سطح وسیع استفاده می گردد (Caballero *et al.*, 2002).

Archive of SID

www.SID.ir

تأمین انرژی توسط چربی نقش مهم و حساسی در رشد لارو ماهیان ایفاء می‌کند (Rainuzzo *et al.*, 1997). فسفولیپید یکی از ترکیبات چربی بوده که در غشاء سلولی موجود می‌باشد. فسفولیپید دو اسید چرب متصل به گلیسرول و یک گروه فسفات را در موقعیت سوم دارد. گروه‌های فسفات حامل یک بار منفی است. گروه‌های کوچک‌تر اضافی به گروه فسفات متصل شده است. قسمت انتهایی اسید چرب آبگریز هستند، اما گروه فسفات و شاخه پیوست آن آبدوست می باشد (Tocher, 2003) .



شکل ۲. ساختار فسفولیپیدها

در اوایل دهه۱۹۸۰ تحقیقاتی درخصوص جایگزین کردن غذاهای زنده برای لارو ماهی های دریایی انجام شده است (Kanazawa *et al.*, 1985) مشاهده کردند فسفولیپیدها برای رشد و بقاء لارو مانند ها Ayu *(Plecoglossus altivelis)* و ماهی دریایی (Pagrus) مناسب می باشد. تأثیرسطوح مختلف فسفولیپیدها (PL) بر رشد بچه ماهیان خاویاری (فیل–huso) با چهار سطح PL، ۰٪ ، ۲٪ ، ۴٪ و ۶٪ تغذیه شدند که پس از ۸ هفته تحقیق نتایج نشان داد عملکرد ۴٪ فسفولیپیدها از رشد بالایی برخوردار بوده است(Ebrahimnezhadarabi et al., 2011)).

هدف از این تحقیق با توجه به تأثیر فسفولیپید بر روی رشد بچه فیل ماهی آیا برروی برخی از پارامترهای خونی بچه ماهی فیل موثر می باشد؟ و چه سطحی از فسفولیپید در رژیم غذایی این ماهی اثر مفید یا مضر دارند؟

www.SID.ir

۲- مواد و روش‌ها

این تحقیق در تاریخ ۳ خرداد لغایت ۲۷ تیر سال ۱۳۸۸ در مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی گرگان انجام گردید۱۲ تانک فایبرگلاس (۴تیمار و ۳ تکرار) هرکدام به ظرفیت ۲۰۰ لیتر تهیه گردید. ابتدا تانک‌ها بوسیله هیپوکلرید سدیم ضدعفونی شده و تعداد ۷۲۰ قطعه بچه ماهی فیل با میانگین وزن ۰/۱±۴/۵ گرم بصورت رندمی شمارش و در تانک‌ها بصورت مساوی توزیع گردید.. رژیم غذایی ماهی براساس جدول شماره ۱ با استفاده از پودر ماهی که منبع اصلی پروتئین غذایی که دارای ۴۵٪ پروتئین ، چربی ۱۵٪ و۲۱ کیلوژول برگرم انرژی خام وبا اضافه کردن رژیم غذایی فسفولیپید سویا تصفیه شده از شرکت برگاپور در چهار سطح ۰ ،۲ ، ۴ ، ۶ درصد با کاهش روغن سویا انجام گردید.

جدول ۱. ترکیب رژیم غذایی و آنالیز بیوشیمیایی غذایی کنستانتره بچه فیل ماهی بر حسب درصد در اجرای این تحقیق

ترکیب غذایی	درصد مواد غذایی			
	D1(0%PL)	D2(2%PL)	D3(4%PL)	D4 (6%PL)
آرد ماهی	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰
آرد گندم	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰
روغن ماهی	۵	۵	۵	۵
روغن سویا	۶	۴	۲	۰
فسفولیپید	۰	۲	۴	۶
ملاس چغندر	۲/۳	۲/۳	۲/۳	۲/۳
مکمل ویتامینه	۲	۲	۲	۲
مکمل مواد معدنی	۳	۳	۳	۳
آنتی اکسیدان	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲
فسفات کلسیم	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
مجموع	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
آنالیز بیوشیمیایی غذایی کنستانتره				
ماده خشک	۹۰/۳	۹۰/۱	۹۰/۹	۹۰/۹
پروتئین	۴۴/۹۴	۴۵/۹۴	۴۵/۲۱	۴۵/۱
چربی	۱۴/۷	۱۵/۱	۱۵/۳	۱۵/۵
خاکستر	۱۳/۵۸	۱۳/۵۲	۱۳/۸۴	۱۳/۴
انرژی خام ($kJ\ g^{-1}$)	۲۱/۰۱	۲۱/۱۸	۲۱/۱۰	۲۱/۲۳

Archive of SID

www.SID.ir

– رژیم غذایی فرموله شده بر اساس نیاز غذایی طبیعی ماهی خاویاری تهیه گردید و هر گروه از ماهیان بر مبنای سیری تغذیه شدند. پس از مشاهده اولین امتناع از غذا، غذا دهی قطع و میزان غذای مصرفی ثبت گردید(Hosseini, et al., 2010) .

– ماهیان روزانه در ۵ مرحله در ساعات: ۰۸:۰۰، ۱۱:۰۰، ۱۳:۰۰، ۱۵:۰۰ و ۱۸:۰۰ غذادهی گردید.

شکل ۳. ترکیب فسفولیپید

Phospholipids complex contains	(۷۳%)
Phosphatidylcholine	۲۲-۲۴
phosphatidylinosithol	۱۳-۱۶
phosphatidylethanolamine	۱۸-۲۰
phosphatidic acid	۷-۱۳
companion lipids contains:	(٪۱۶)
glycolipids	۷-۱۱
Sterols, tocopherols	۳-۵
Triglycerides	۲
Carbohydrates content	۳-۸
Water	۱

۳- بررسی هماتولوژی

در پایان این تحقیق (۸ هفته) تعداد ۳ قطعه بچه ماهی بلوکا بصورت رندم از هر تانک جهت انجام آزمایش پارامترهای خونی مانند مجموع گلبول سفید، مجموع گلبول قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین، میانگین گویچه‌های خونی، حجم گلبولهای سفید خون انجام گردید. در ابتدا بچه ماهیان بوسیله پودرگل میخک بمیزان ۳۰ppm بیهوش گردید (Velisek *et al*., 2005). نمونه خون از طریق برش ساقه دمی دریافت گردید که پس از قرار دادن آن در لوله های حاوی محلول جلوگیری از انعقاد خون (اتیل ایندیامیک

Archive of SID
www.SID.ir

تترااسید) می ریزیم. تجزیه و تحلیل ترکیب خون براساس روش (Hrubec *et al.*, 2001) انجام گردید. گلبول‌های خونی شامل نیتروفیل، منوسیتس، لمفوسیتس و ائوزینوفیل اندازه‌گیری گردید. هماتوکریت با استفاده از لوله موئینه در یک سانتریفوژ میکروهماتوکریت با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه بمدت ۵ دقیقه انجام گردید (Morris and Davey, 1996).

سلول‌های قرمز خون (گلبول قرمز) و سلولهای سفید خون (لکوسیت) به روش (Blaxhall and Daisley, 1973) اندازه گیری گردید. غلظت هموگلوبین(Hb) به روش اسپکتروفوتومتر انجام شد(Houston, 1990). به منظور تعیین شاخص‌های خونی دیگر مانند (MCV,MCH,MCHC) ازفرمول زیر به روش(Dacie and Lewis, 2001) بهره برداری شد.

i) MCV (nm3) = Hct (%) × 10/RBC (10^6 mL)
ii) MCH (pg cell-1) = Hb (g L-1)/RBC (10^6 mL) ×10
iii) MCHC (g dL-1) = Hb (g dL-1)/Hct (%)

۴- نتیجه

در جدول شماره ۲ پارامترهای خونی حاصل از فیل ماهی را نشان می دهد.

جدول ۲: پارامترهای خونی حاصل از فیل ماهی با استفاده از سطوح مختلف فسفولیپید در رژیم غذایی در مدت ۸ هفته

پارامترهای خونی	درصد مواد غذایی			
	D1(0%PL)	D2(2%PL)	D3(4%PL)	D4 (6%PL)
RBC(×10^6 cell/µl)	0.86±0.12^a	1.07±0.07^a	1.04±0.09^a	1.01±0.05^a
Hct (%)	25.00±1^a	26.00±1.53^a	26.33±1.20^a	26.00±1.53^a
Hb (g/dl)	7.67±0.24^a	8.64±0.44^a	8.57±0.62^a	8.57±0.52^a
MCH (pg)	92.57±12.03^a	77.27±9.41^a	84.83±13.21^a	85.10±7.71^a
MCV (fl)	300.83±35.64^a	232.60±30.25^a	259.57±33.51^a	258.60±24.23^a
MCHC (g/dl)	30.70±0.38^b	33.30±0.87^a	32.43±0.90^{ab}	32.90±0.38^{ab}
WBC (cell/µl)	23500±1171.89^a	25866.67±845.25^a	22633.33±1266.67^a	23000±901.85^a

تفاوت معنی‌داری در شاخص MCHC (میانگین غلظت هموگلوبین گلبول قرمز خون) مشاهده شده است($P\leq 0/05$). اما در دیگر پارامترهای خون از جمله سلول قرمز خون (RBC) ، هماتوکریت HCT، هموگلوبین (HB)، متوسط حجم گلبول قرمز (MCV)، گلبول سفید خون (WBC) تأثیر قابل توجهی در

Archive of SID
www.SID.ir

سطوح مختلف از خود نشان نداده است($P\geq0/05$). تغذیه ماهیان با رژیم غذایی D2 (PL= %۲) بمیـزان ۳۳/۳ گرم بر دسی لیتر بیشترین میزان MCHC را نشان داد. در اندازه‌گیری از گلبولهای سفید خون فیـل ماهی در استفاده از سطوح مختلف فسفولیپید هیچگونه تفاوت معنی‌داری ($P\geq0/05$) مشاهده نگردیـد، امـا بیشترین میزان در لمفوسیتس، نیتروفیل، منوسیتس و ائوزینوفیل بترتیـب در D2 ، D1 ، D2 و D4 نشـان داده شده است (جدول شماره ۳).

۵- بحث و بررسی

فاکتورهای خونی یکی از معیارهای فیزیولوژی در یک موجود زنده می‌باشد، بنابراین این فاکتورها می توانند تحت تأثیر رژیم غذایی قرار گیرند (Waagb *et al*. 1998; Klinger *et al*. 1996; Kumar *et al*. 2005) برخی از محققان تاثیر استرس‌های مختلف را بر روی فاکتورهای خونی مطالعه نمودند.

یکی از تحقیقات انجام‌شده توسط (Silveira-Coffiny *et al*., 2004) و همکاران در سال ۲۰۰۴، تأثیر استرس های مختلف بر روی فاکتورهای خونی ماهی اوروس بوده است که نتایج بدست‌آمده نشان از کم‌خونی میکروسایتیک توسط باکتری‌های عفونت‌زا و تغییر شکل اریتروسیت تحت محیط نیتریت بدست آمده است که این وضعیت در پایان دوره مورد مطالعه ما که تأثیر سطوح مختلف فسفولیپید بر عوامل خونی بوده مشابه می‌باشد که این عامل بر روی فاکتور خونی MCHC مؤثر بوده است ، و بر دیگر عوامل خونی WBC، MCV، MCH تأثیر بسزایی ایجاد نکرده است.

در پایان تحقیقات ما در رژیم غذایی بمیزان ۲٪ فسفولیپید بالاترین سطح در WBC ، MCV ، MCH ، RBC و HB را از خود نشان داده است. تاکنون در خصوص بررسی هماتولوژی فیل ماهی که یک گونه باارزش می‌باشد مطالعه اندکی انجام شد.

نتایج بدست‌آمده در این تحقیق تفاوت آماری بین شاخص‌های خونی تیمارها وجود ندارد. هماتولوژی به عنوان شاخص سلامت در تعدادی از گونه‌های ماهی برای شناسایی تغییرات فیزیولوژیکی تحت عوامل استرس‌های مختلف مانند قرار گرفتن در معرض آلاینده‌ها، بیماری‌ها، فلزات، رژیم غذایی و کمبود اکسیژن را نشان می‌دهد(Blaxhall, 1972; Duthie and Tort, 1985; Morgan and Iwama, 1997) این تحقیق مشابه مطالعه انجام شده توسط (Subhadra *et al*, 2006; Montero *et*

Archive of SID

www.SID.ir

al., 2003) بترتیب روی باس دهان بزرگ (*Micropterus salmoides*) ماهی سیم سرطلایی (*Sparus aurata*) نشان داد که جایگزینی روغن ماهی با روغن گیاهی هیچ تاثیری روی پارامترهای خونی ندارد.

بنابراین داده های تحقیق بدست آمده با مطالعات انجام شده مطابقت دارد و در نتیجه این تحقیق نشان داد اضافه‌کردن فسفولیپیدها در رژیم غذایی می‌تواند تأثیر قابل توجهی در برخی از فاکتور های خونی بچه ماهیان خاویاری فیل ماهی نداشته است.

فهرست منابع

1. **Blaxhall, P. and Daisley, K. (1973)**. Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology, 5*(6), 771-781.
2. **Blaxhall, P., (1972).** The haematological assessment of the health of freshwater fish. *Journal of Fish Biology, 4*(4), 593-604.
3. **Duthie, G. and Tort, L., (1985**). Effects of dorsal aortic cannulation on the respiration and haematology of mediterranean living Scyliorhinus canicula L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 81*(4), 879-883.
4. **Hosseini, S. V., Kenari, A. A., Regenstein, J. M., Rezaei, M., Nazari, R. M., Moghaddasi, M., Kaboli, S. A. and Grant, A. A. M. (2010**). Effects of Alternative Dietary Lipid Sources on Growth Performance and Fatty Acid Composition of Beluga Sturgeon, Huso huso, Juveniles. *JOURNAL OF THE WORLD AQUACULTURE SOCIETY, 41*(4).
5. **Hrubec, T., Smith, S. and Robertson, J. (2001**). Age Related Changes in Hematology and Plasma Chemistry Values of Hybrid Striped Bass (Morone chrysops× Morone saxatilis). *Veterinary Clinical Pathology, 30*(1), 8-15.
6. **Kanazawa, A., Teshima, S. and Sakamoto, M. (1985**). Effects of dietary lipids, fatty acids, and phospholipids on growth and survival of prawn (Penaeus japonicus) larvae. *Aquaculture, 50*(1-2), 39-49.
7. **Keyvan, A. (2002)**. Introduction to culture biotechnology of Acipenseridea, Azad University, pp: 59-157.

Archive of SID

www.SID.ir

8. **Klinger, R., Blazer, V. and Echevarria, C. (1996).** Effects of dietary lipid on the hematology of channel catfish, Ictalurus punctatus. *Aquaculture, 147*(3-4), 225-233.

9. **Kumar, S.Sahu, N.P., Pal., A.K., Choudhury, D., Yengkokpam, S. and Mukhejee, S. C. (2005**). Effect of dietry carbohydrate on heamatology, espiratory burst activity and histological changes in *L.rohita* juvenils. Fish and Shellfish Immunology 19,331-344.

10. **M. Ebrahimnezhadarabi, C.R. Saad, S.A. Harmin, Satar, M. K. A. and Kenari, A. A. (2011)**. Effects of Phospholipids in Diet on Growth of Sturgeon Fish (Huso-huso) Juveniles. *Journal of Fisheries and Aquatic Science, 6*(2).

11. **Montero, D., Kalinowski, T., Obach, A., Robaina, L., Tort, L., Caballero, M. and Izquierdo, M. (2003**). Vegetable lipid sources for gilthead seabream (Sparus aurata): effects on fish health. *Aquaculture, 225*(1-4), 353-370.

12.**Morgan, J. and Iwama, G. (1997).** *Measurements of stressed states in the field*.

Morris, M. and Davey, F. 1996. Basic examination of blood. *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*, 549-559.

13.**Rainuzzo, J., Reitan, K. and Olsen, Y. (1997)**. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture, 155*(1-4), 103-115.

14.**Silveira-Coffigny, R., Prieto-Trujillo, A. and Ascencio-Valle, F. (2004)**. Effects of different stressors in haematological variables in cultured *Oreochromis aureus* S. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 139*(4), 245-250.

15. **Subhadra, B., Lochmann, R., Rawles, S. and Chen, R. (2006)**. Effect of dietary lipid source on the growth, tissue composition and hematological parameters of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture, 255*(1-4), 210-222.

16.**Tocher, D. (2003).** Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science, 11*(2), 107-184.

17. **Velisek J., Svobodova Z. and Piackova V. (2005**). Effect of clove oil anaesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Veterinaria Brno*, 74, 139–146.

Archive of SID

www.SID.ir

18. **Waagbø, R., Sandnes, K., Lie, O. and Roem, A. (1998)**. Effects of inositol supplementation on growth, chemical composition and blood chemistry in *Atlantic salmon, Salmo salar* L., fry. *Aquaculture Nutrition, 4*(1), 53-59.

Archive of SID

www.SID.ir