فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی 27، جلد 7، شماره 4، پائیز93، صفحه 21 تا 31

بررسی اثرات کمبود مکمل متیونین و لیزین بر عملکرد رشد، شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی فیل ماهی جوان پرورشی *(Huso huso)*

محمود محسني، حمیدرضا پورعلی، رضوان ا... کاظمی، میرحامد سید حسنی
موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر. رشت. ایران. **mahmoudmohseni@yahoo.com**

تاریخ دریافت: 93/6/28 **تاریخ پذیرش: 93/8/10**

چکیده

زمینه و هدف: دانش و داشتن اطلاعات در مورد اسیدهای آمینه ضروری (EAA) مورد نیاز ماهیان اهمیت زیادی در ارزیابی کیفیت مواد غذایی به دست آمده از منابع مختلف پروتئین، فرمول‌بندی آن‌ها در جیره غذایی، کاهش هزینه‌های غذا و بهینه سازی مصرف پروتئین در ماهی دارد. آزمایش رشدی به منظور بررسی اثرات مکمل های لیزین و متیونین بر عملکرد رشد و شاخص‌های خونی فیل ماهی جوان (*Huso huso*) پرورشی تغذیه شده با جیره محتوی پروتئین سویا، طراحی و اجرا گردید.

روش کار: تعداد 240 عدد بچه فیل ماهی با وزن متوسط 4/64 ± 144/6 گرم در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی متعادل با یکی از 4 جیره غذایی هم نیتروژن (42 درصد پروتئین خام) و هم کالری(19/8 مگاژول انرژی خام در هر کیلوگرم جیره) به ترتیب شامل جیره شاهد(بر پایه پروتئین سویا، بدون لیزین و متیونین)، جیره 2(فقط مکمل لیزین)، جیره 3(فقط مکمل متیونین) و جیره 4(حاوی مکمل های لیزین و متیونین) با 3 تکرار برای هر تیمار در حوضچه‌های فایبرگلاس 500 لیتری در شرایط یکسان پرورشی به مدت 12 هفته تغذیه شدند. مکمل لیزین و متیونین به جیره پایه محتوی 344 گرم بر کیلوگرم کنجاله سویا به مقدار 12/02 و 12/94 گرم بر کیلوگرم ماده خشک جیره اضافه شد.

یافته ها: شاخص‌های رشد، غلظت هموگلوبین، مقدار گلبول سفید و توتال پروتئین خون ماهیانی که از محتوی مکمل لیزین+متیونین تغذیه کرده بودند، به‌طور معنی داری از ماهیان تغذیه شده از سایر تیمارها مناسب‌تر بود. هیچ‌گونه اختلاف معنی داری در شاخص‌های فوق الذکر در ماهیانی که از جیره های 3 و 4 تغذیه کرده بودند، مشاهده نشد. شاخص‌های رشد، شاخص خونی و بیوشیمیایی در ماهیانی که از جیره شاهد تغذیه کرده بودند، به‌طور معنی داری پائین‌تر از ماهیانی بود که از جیره های محتوی لیزین، متیونین یا ترکیب لیزین، متیونین تغذیه کرده بودند.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن بود که جیره پایه محتوی 344 گرم بر کیلوگرم کنجاله سویا همراه با اسیدهای آمینه لیزین و متیونین می تواند به میزان40٪ بدون تاثیر منفی بر عملکرد رشد، شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی جایگزین آرد ماهی در جیره غذایی فیلماهی جوان پرورشی گردد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین سویا، فیل ماهی، لیزین، متیونین، شاخص خونی و بیوشیمیایی.

مقدمه

تولید خاویار طبیعی در دهه اخیر با کاهش چشمگیری همراه بوده است. اغلب متخصصین علوم شیلاتی معتقدند تنها راه حفظ ذخایر فعلی، توسعه تکثیر مصنوعی و پرورش این ماهیان در شرایط کنترل شده بوده و با توجه به تجارب پرورش تاسماهیان از سال 1369 درکشور، توسعه تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری به منظور تولید گوشت و خاویار آن‌طور که شایسته ابعاد اکولوژیک و اقتصادی آن‌ها می‌باشد هنوز توسعه نیافته است. در چنین شرایطی به موازات حمایت از ذخایر ماهیان خاویاری حوضه دریای خزر، توجه به پرورش تجاری این ماهیان که بدون شک گامی در جهت حفاظت از ذخایر و تنوع بیولوژیکی آن‌ها در طبیعت خواهد بود، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. پرورش فیل ماهی *(Huso huso)* صنعت نسبتاً جدیدی در ایران به

شمار می‌آید و اطلاعات در مورد مدیریت مناسب پرورش و نیازمندی‌های غذایی این گونه محدود است. در پرورش تاسماهیان 50 تا 60 درصد هزینه پرورش، مربوط به غذا می‌باشد، بنابراین غذا یکی از فاکتورهای بسیار مهم در مدیریت پرورش محسوب می شود. در جیره غذایی تاسماهیان خصوصاً گونه فیل ماهی(با توجه به گوشتخوار بودن آن) پروتئین یک ترکیب بسیار مهم در جیره غذایی بوده و تعیین احتیاجات پروتئینی، اولین گام در جهت توسعه در رسیدن به یک غذای کم هزینه و موثر در رشد تاسماهیان است(2). پروتئین‌ها مواد اصلی تشکیل دهنده بافت‌های ماهیان می باشند و حدود 65 ـ 75 درصد از کل ماده خشک بدن را شامل می‌شوند. ماهیان پروتئین را برای به‌دست آوردن اسیدهای آمینه مصرف می‌کنند. پروتئین در بدن هیدرولیز شده و اسیدهای آمینه را آزاد می‌کنند، اسیدهای آمینه از روده جذب شده و به‌وسیله خون بین بافت‌ها و اندام‌های بدن پخش می‌گردد(20). آرد ماهی به دلیل ارزش غذایی بالا و خوش طعم بودن، هنوز به‌عنوان یک منبع اساسی تأمین کننده پروتئین در غذای فرموله شده ماهیان به‌کار می‌رود. تولید آرد ماهی نیز در بعضی از نقاط جهان محلی است، اما گران شدن و تهیه نمودن آن در بسیاری از نقاط جهان در آینده، آن را به معضلی جدی برای آبزی‌پروری تبدیل خواهد نمود(11). در حال حاضر نیز به دلیل قیمت بالای آرد ماهی، تحقیقات گسترده ای به منظور جایگزینی تمام یا حداقل بخشی از سایر منابع پروتئینی گیاهی به‌جای آرد ماهی صورت گرفته است(9). از این رو با توجه به نقش تغذیه در آبزی‌پروری و توسعه پذیرش جیره غذایی ماهیان باید اذعان داشت که پرورش موفق ماهیان نیاز به استفاده از خوراک کامل، کارآمد با ترکیب بهینه دارد که بایستی تمام ترکیبات تغذیه ای ضروری، مانند پروتئین ها، کربوهیدرات ها، چربی ها، ویتامین ها و مواد معدنی را برای ماهی فراهم می کند تا اجازه رشد سریع و سالم به آن‌ها داده شود(8، 7، 3).

ایران دارای منابع پروتئین گیاهی غنی از جمله کنجاله سویا، ذرت، کانولا، کنجد و آفتابگردان جهت تغذیه آبزیان می باشد. هر چند کنجاله سویا به دلیل پروتئین بالا و قابلیت دسترسی از گزینه های مطلوب جهت جایگزینی به‌جای پودر ماهی در آبزیان به‌شمار می رود(25). اما، الحاق سطوح زیاد آرد سویا به‌جای آرد ماهی در تغذیه ماهی به‌دلیل متوازن نبودن مواد مغذی(سطوح اسیدهای آمینه ضروری مانند لیزین و متیونین، انرژی و مواد مغذی)، قابلیت هضم پایین آن، کاهش مطلوبیت و خوشمزگی غذا، مقادیر بالا بازدارنده های رشد مانند تریپسین و لکتین (29) منجر به کاهش رشد و کارآیی غذا در ماهیان خواهد شد(13، 5، 4). اضافه نمودن جاذب‌های شیمیایی در غذای فرموله شده ماهی اهمیت بسیاری داشته و امروزه در آبزی‌پروری بسیار گسترش یافته است. ترکیبات فوق سبب افزایش بهبود کیفیت غذای مصرفی، به حداقل رسانیدن زمان غذاگیری ماهی، کاهش زمان ماندن غذا در آب و در نتیجه سبب کاهش و از بین رفتن مواد مغذی موجود در غذا گشته و به تبع آن آلودگی آب نیز به حداقل خواهد رسید(32). دانش و داشتن اطلاعات در مورد اسیدهای آمینه ضروری (EAA) ماهیان اهمیت زیادی در ارزیابی کیفیت مواد غذایی به دست آمده از منابع مختلف پروتئین، فرمول‌بندی آن‌ها در جیره غذایی، کاهش هزینه‌های غذا و بهینه سازی مصرف پروتئین در ماهی دارد(22، 19). لیزین اسیدهای آمینه ضروری مهم در تعیین پروتئین مورد نیاز و صرفه‌جویی در مصرف پروتئین است(16)، به نحوی که جزء اسیدهای آمینه محدود کننده در پروتئین آرد غلات که نقش کلیدی در فرمول‌بندی درست جیره‌های غذایی دارد به شمار می رود(30، 26 ،21). علاوه بر موارد ذکر شده، لیزین جاذب غذایی است که با اضافه نمودن آن به جیره غذایی ماهیان و ایجاد طعم

مناسب، می‌تواند اثرات سودمندی در مصرف مواد غذایی و رشد ماهی داشته باشد(24). متیونین یک اسید آمینه ضروری در مهره داران خشکی است و ماهیان نیز جهت رشد مطلوب و انجام دادن وظایف متابولیکی به این اسید آمینه نیاز دارند، به گونه ای که در ماهیان متیونین اولین اسید آمینه محدود کننده در پروتئین گیاهی است. کمبود متیونین در بسیاری از گونه های ماهیان موجب کاهش رشد و کارایی غذا، بروز آب مروارید می گردد(14). جیره غذایی بر اساس پروتئین سویا برای فیلماهیان پرورشی نیاز به مکمل های متیونین و لیزین به منظور افزایش روند رشد، کارایی غذا و جلب بچه فیلماهیان به غذای فرموله شده را دارد، ولی این امر در فیلماهیان مورد بررسی و مطالعه قرار نگرفته است. بنابراین، در این مطالعه تاثیر متیونین و لیزین بر پلت های غذایی حاوی پروتئین پایه سویا بر روند رشد، کارایی غذا و شاخص-های خونی و بیوشیمیایی فیل ماهی پرورشی (*Huso huso*) به منظور امکان معرفی جیره غذایی بهینه (حداقل ضریب تبدیل غذا و قیمت تمام شده غذا) طراحی و انجام شد.

مواد و روش ها

جیره‌های غذایی و نحوه تهیه آن

به منظور تهیه جیره های غذایی، ابتدا ترکیبات غذایی مورد نیاز جهت آنالیز به آزمایشگاه(آنالیز غذایی مرکز تحقیقات علوم دامی کشور و موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر) منتقل گردید تا بر اساس اطلاعات صحیح از ترکیب مواد اولیه نسبت به تنظیم جیره‌ها اقدام گردد(جدول 1). ترکیبات اسید آمینه پودر سویا، جیره بدون مکمل و جیره پایه در جدول 2 نشان داده شده است. مکمل لیزین و متیونین به جیره پایه محتوی 344 گرم بر کیلوگرم کنجاله سویا به مقدار 12/02 و 12/94 گرم بر کیلوگرم ماده خشک جیره اضافه شد. جیره شاهد(بدون مکمل لیزین و متیونین) و مابقی جیره های آزمایشی(جیره های 1 تا 3) با استفاده از پودر ماهی کیلکا عمل‌آوری شده در دمای پائین و کنجاله سویا به‌عنوان منبع پروتئینی، روغن ذرت و روغن ماهی کیلکا (به نسبت مساوی) به‌عنوان منبع چربی و آرد گندم به‌عنوان منبع کربوهیدرات، چهار جیره آزمایشی ایزوکالریک(4315 کیلوکالری انرژی قابل هضم بر کیلوگرم جیره)، 12/3% چربی خام و با پروتئین خام یکسان(42 درصد پروتئین) فرموله شدند. پس از تنظیم و تعیین درصد هر یک از اجزای سازنده جیره‌ها، اقدام به ترکیب و آماده سازی آن‌ها توسط دستگاه پلت زن CPM شد. پلت‌ها به قطر 4 میلی‌متر تهیه و به مدت 24 ساعت در دستگاه خشک‌کن در دمای 30 درجه سانتی‌گراد به منظور کاهش رطوبت به میزان 9 تا 10% قرار داده شدند. جیره‌ها پس از خشک‌شدن، بسته بندی، شماره‌گذاری شده و تا زمان مصرف در دمای منفی 18 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. یک ساعت قبل از مصرف و توزیع غذا، جیره‌ها خارج و پس از متعادل شدن با دمای اتاق با استفاده از ترازوی دیجیتال توزین و در اختیار ماهیان قرار گرفتند.

مکمل ویتامینی

ویتامین A I.U.1200000 ، ویتامین D_3 400000 I.U.، ویتامین E 50 گرم، ویتامین K_3 0/8 گرم، ویتامین B_1 2/5 گرم، ویتامین B_2 4 گرم، ویتامین B_6 2/5 گرم، ویتامین B_{12} 8 میلی گرم، نیاسین 35 میلی گرم، کلسیم پنتونات 10 میلی گرم، ویتامین B_9 1 گرم، بیوتین 150 میلی گرم، اینوزیتول 50 گرم، ویتامین C 30گرم.

مکمل معدنی (میلی گرم بر کیلوگرم وزن)

1گرم سولفات منیزیم آبدار، 26 گرم آهن ($FeC6H5O7·5H2O$)، 12/5گرم سولفات روی آبدار، 4/2 گرم سولفات مس آبدار، 480میلی‌گرم کلریدکبالت آبدار، 1 گرم پریدید پتاسیم، 2 گرم سلنیم، 12 گرم کلرید کولین ($C5H14CINO$).

تهیه ماهیان و نحوه پرورش

تعداد 240 عدد بچه فیل ماهی با وزن متوسط 4/64 ± 144/6 گرم به طور تصادفی در 12 وان فایبرگلاس 2000 لیتری (قطر 105 سانتی متر، 53 سانتی متر ارتفاع و حجم آب 2000 لیتر) در فضای سرپوشیده مجهز به سیستم هوادهی، تخلیه آب مرکزی و شیرهای تنظیم آب(به صورت فواره‌ای) با دبی آب 4/75 لیتر در دقیقه(آب رودخانه سفیدرود) در موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر به‌مدت 12 هفته پرورش داده شدند.

جدول 1- اجزای غذایی و ترکیب شیمیایی جیره های آزمایشی

ترکیبات غذایی	مقادیر (گرم بر کیلوگرم ماده خشک)
آرد ماهی	280
گلوتن گندم	85
کنجاله سویا	344
آرد گندم	80
دکسترین	39
متیونین	0
لیزین	0
روغن (گیاهی + جانوری)	117
مکمل ویتامینی	20
مکمل معدنی	5
Cr_2O_3	0
سلولز	30

آنالیز تقریبی جیره های آزمایشی (گرم بر کیلوگرم ماده خشک)

	جیره شاهد	جیره 1	جیره 2	جیره 3
رطوبت	103	100	101	104
پروتئین خام	426	424	422	423
چربی خام	145	142	143	141
خاکستر	112	107	111	109
فیبر	25	24	25	25
انرژی خام ($kJ\ g^{-1}$)	19/8	20/1	19/9	19/8
کلسیم	17	17/1	17	17
فسفر	11/4	11/4	11/4	11/3
لیزین	12/53	34/55	12/53	34/55
متیونین	6/56	6/56	19/5	19/5
نسبت پروتئین به انرژی ($mg\ kg^{-1}$)	21/5	21/1	21/6	21/7

هر جیره به 3 وان فایبرگلاس داده شد. ماهیان 4 بار در روز در ساعات 8،14،20 و 2 صبح تا حد سیرابی به-صورت دستی غذادهی شدند. به‌منظور کاهش استرس، 12 ساعت قبل و بعد از زیست سنجی، غذادهی ماهیان قطع می‌گردید. جهت زیست سنجی، ماهیان توسط محلول 200 پی پی ام پودرگل میخک بیهوش می‌شدند (1).

جدول 2-آنالیز آرد ماهی، کنجاله سویا و جیره شاهد (گرم بر کیلوگرم ماده خشک)

ترکیب	پودر ماهی	کنجاله سویا	جیره شاهد
هیستیدین	14/1	11/1	6/29
ایزولوسین	27/4	17/8	5/72
لیزین	49/2	7/2	12/53
لوسین	49/1	30/6	30/1
متیونین	18/1	6/1	6/56
فنیل الانین	25/5	24/1	13/7
آرژنین	37/7	30/6	21/7
گلایسین	36/2	26/4	23/5
تیروزین	25/3	17	12/7
سرین	24/1	7/9	20/4
سیستئین	6	5	5/52

آنالیز اجزا و جیره غذایی

آنالیز تقریبی ترکیبات، مواد اولیه و جیره‌های آزمایشی بر اساس روش های استاندارد(AOAC) جیره انجام شد. پروفیل آمینواسیدهای جیره های غذایی و نیز کنجاله سویا با استفاده از دستگاه HPLC به روش اسپکتروفتومتری تعیین گردید. نمونه جیره‌ها در 105 درجه سانتی گراد به مدت 6 ساعت تا رسیدن به یک وزن ثابت، برای اندازه‌گیری رطوبت خشک شدند. پروتئین با برآورد نیتروژن کل (N×6/25) با استفاده از روش کجلدال استخراج، چربی با روش سوکسله با استفاده از حلال کلروفروم با نقطه جوش 50 تا 60 درجه سانتی گراد به مدت 4 تا 6 ساعت استخراج، میزان انرژی موجود در ترکیبات غذایی به وسیله بمب کالریمتر و خاکستر با سوزاندن در کوره الکتریکی 550 درجه سانتی گراد به مدت 9 ساعت اندازه‌گیری شدند.

آزمایش های خون شناسی و بیوشیمیایی خون

از انتهای باله مخرجی و در زیر ساقه دمی حدود 500 میکرولیتر خون به وسیله سرنگ گرفته و پس از ریختن در ظرف 1/5 سی سی اپندورف آغشته به ماده ضد انعقاد هپارین و مخلوط شدن، از آن گسترش تهیه شد و برخی از شاخص های خونی در نمونه ها اندازه گیری گردید. تعداد گلبول های قرمز (RBC) و تعداد گلبول های سفید (WBC) در میلی متر مکعب خون به وسیله محلول رقیق کننده رنگی و لام هموسیتومتر محاسبه و درصد هماتوکریت به روش سانتریفیوژ میکرو هماتوکریت و هموگلوبین به روش اسپکتروفتومتریک محاسبه گردید. از فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون نیز میزان گلوکز، پروتئین کل، آلبومین، تری گلیسیرید، کلسترول، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) مورد بررسی قرار گرفتند.

تعیین شاخص های رشد و کبدی

استفاده از اطلاعات زیست سنجی هر وان،

فاکتورهای محاسباتی شامل شاخص رشد ویژه (SGR%/day)، درصد افزایش وزن بدن(BWI%)، کارایی غذا FE)، نسبت بازده پروتئین (PER) و شاخص کبدی(HIS %) محاسبه شد.

$$S.G.R= (Ln\ Wt - LnW_0)/t \times 100$$

$$\%BWI=100 \times (BWf-Bwi)/BWi$$

BWi و BWf: متوسط وزن اولیه و نهایی در هر مخزن

n: تعداد روزهای پرورش، BW:وزن (gr)، TL: طول (cm)

TF(Total feed intake):

$$FE= (BWf - BWi)/TF \times 100$$

PER = Wet weight gain in (g) / Protein intake in (g)

$$\%HSI = Liver\ weight/body\ weight \times 100$$

شاخص وزن بدن$WG=(Bi - Bf)/ Bif \times 100$

میانگین وزن اولیه در هر تیمار= B_i

میانگین وزن نهایی در هر تیمار= B_f

تحلیل آماری

تحقیق حاضر در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی متعادل در سه تکرار روی بچه فیل ماهیان مورد بررسی قرار گرفت. پس از کنترل همگنی واریانس و نرمال بودن داده ها به وسیله آزمون Kolmogorov-Smirnov، نتایج به وسیله آزمون چند دامنه دانکن با سطح اطمینان 95% بررسی شد. اختلاف معنی دار آماری با سطح $P< 0/05$ در نظر گرفته شد. داده های این مطالعه به‌صورت Mean ± SD نشان داده شده است.

نتایج

الف: شاخص های رشد

پارامترهای کیفی آب هیچ گونه اختلاف معنی‌داری را در طول دوره پرورش نسبت به یک دیگر نشان ندادند ($P \geq 0/05$). هم چنین در طول دوره پرورش، هیچ گونه مرگ و میری مشاهده نشد. در پایان 12 هفته پرورش، شاخص‌های وزن نهایی، درصد افزایش وزن بدن، شاخص رشد ویژه، نسبت بازده پروتئین، ضریب چاقی و ضریب تبدیل غذایی ماهی هایی که از جیره 3 محتوی مکمل لیزین + متیونین تغذیه کرده بودند، به طور معنی داری ($P\leq 0/05$) از ماهیان تغذیه شده از سایر جیره ها بالاتر بود(جدول 3). هیچ گونه اختلاف معنی داری در شاخص های فوق الذکر در ماهیانی که از جیره های 2 و 3 به ترتیب شامل فقط لیزین یا فقط متیونین تغذیه کرده بودند، مشاهده نشد. ولی شاخص های رشد در ماهیانی از جیره شاهد تغذیه کرده بودند، به طور معنی داری پائین تر از ماهیانی بود که از جیره های محتوی لیزین، متیونین یا ترکیب لیزین، متیونین تغذیه کرده بودند.

جدول 3- تاثیر تیمارهای متفاوت بر روی میانگین وزن ثانویه (گرم:W_2)، وزن کسب شده (WG)، شاخص رشد ویژه (SGR: درصد در روز)، ضریب تبدیل غذا(FCR) و کارایی پروتئین(PER) بچه فیلماهیان پرورشی

تیمار / شاخص ها	جیره های آزمایشی			
	شاهد	1(مکمل لیزین)	2(مکمل متیونین)	3(مکمل لیزین + متیونین)
وزن نهایی (گرم)	647/3±11/4^c	785/3±2/3^b	798/3±4/81^b	814/3±4/79^a
وزن کسب شده (گرم/ماهی)	22/9±0/6^c	30/5±0/2^b	30/1±0/6^b	35/5±0/7^a
وزن کسب شده (درصد)	344/6±8/2^c	454/9±3/5^b	451/9±3/6^b	484/2±7/8^a
شاخص رشد ویژه	1/45±0/03^c	2/45±0/01^b	2/44±0/03^b	2/75±0/03^a
ضریب تبدیل غذا	2/37±0/05^a	1/71±0/03^b	1/73±0/04^b	1/48±0/03^c
ضریب چاقی	0/41±0/09^c	0/56±0/06^b	0/59±0/09^b	0/63±0/04^a
نسبت بازده پروتئین	1/04±0/02^c	1/53±0/03^b	1/52±0/04^b	1/69±0/04^a

حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهاست ($P\leq 0/05$).

ب: شاخص های خونی و آنزیم های کبدی

خصوصیات خونی و سرمی در جدول 4 نشان داده شده است، مقدار بالاتر شاخص های هماتولوژیکی در ماهیانی که از جیره 3 محتوی مکمل لیزین + متیونین تغذیه کرده بودند مشاهده گردید که به طور معنی داری از شاخص‌های خونی ماهیانی که از جیره شاهد تغذیه نموده بودند، بیشتر بود. اضافه نمودن مکمل لیزین + متیونین به جیره غذایی منجر به افزایش معنی دار مقادیر هماتوکریت، هموگلوبین، گلبول قرمز، گلوکز، کلسترول و پروتئین کل خون نسبت به ماهیان تغذیه شده با تیمار شاهد شد. داده‌های ارائه شده بیانگر تاثیر معنی‌دار سطوح لیزین و متیونین جیره بر مقادیر متوسط آنزیم های آلانین‌آمینوترانسفراز(ALT) و آسپارتات‌آمینوترانسفراز (AST) است($P\leq 0/05$)، به طوری که با افزودن مکمل لیزین و متیونین به صورت مجزا یا تلفیقی به جیره غذایی ماهیان، میزان آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز به طور معنی‌داری کاهش می یابد.

جدول 4- تاثیر تیمار های مختلف غذایی بر روی میانگین شاخص های خونی و آنزیم های کبدی فیل ماهیان

تیمار / شاخص ها	جیره های آزمایشی			
	شاهد	1 (مکمل لیزین)	2(مکمل متیونین)	3 (مکمل لیزین + متیونین)
هماتوکریت (درصد)	$20/1\pm0/23^{b}$	$21/1\pm0/34^{ab}$	$21/1\pm0/49^{ab}$	$22/1\pm0/43^{a}$
هموگلوبین (درصد)	$4/64\pm0/08^{c}$	$5/79\pm0/11^{b}$	$5/91\pm0/10^{b}$	$6/48\pm0/12^{a}$
گلبول قرمز (تعداد × 10^6)	$60/1\pm0/86^{c}$	$63/9\pm0/75^{b}$	$64/7\pm0/67^{ab}$	$66/9\pm0/74^{a}$
گلبول سفید (تعداد × 10^3)	$24/4\pm0/31^{a}$	$23/7\pm0/34^{a}$	$23/2\pm0/46^{a}$	$21/8\pm0/23^{b}$
گلوکز(میلی گرم در لیتر)	$3/43\pm0/15^{b}$	$4/24\pm0/09^{a}$	$4/43\pm0/13^{a}$	$4/76\pm0/23^{a}$
پروتئین کل (گرم/ لیتر)	$17/8\pm0/89^{c}$	$21/9\pm0/76^{b}$	$21/6\pm0/38^{b}$	$23/1\pm0/68^{a}$
کلسترول (میلی گرم/ دسی لیتر)	$22/3\pm1/3^{c}$	$24/8\pm1/1^{b}$	$25/1\pm1/2^{ab}$	$25/7\pm1/3^{a}$
تری گلیسیرید(میلی گرم/ دسی لیتر)	$143/8\pm4/1^{b}$	$153/5\pm2/4^{ab}$	$152/1\pm1/9^{ab}$	$155/7\pm2/1^{a}$
آسپارتات آمینوترانسفراز	$199/9\pm2/4^{a}$	$177/9\pm2/8^{b}$	$174/9\pm2/1^{b}$	$169/9\pm1/8^{b}$

اعداد با حروف مشابه دارای اختلاف معنی دار آماری نیستند ($P\leq 0/05$).

بحث و نتیجه گیری

شاخص های وزن نهایی، درصد افزایش وزن بدن، شاخص رشد ویژه، نسبت بازده پروتئین، ضریب چاقی و ضریب تبدیل غذایی ماهی هایی که از جیره 3 محتوی مکمل لیزین + متیونین تغذیه کرده بودند، به طور معنی داری ($P\leq 0/05$) از ماهیان تغذیه شده از سایر جیره ها بیشتر بود. نتایج مطالعات Takagi و همکاران(2001) مشابه یافته های حاضربوده و در آن بیان شده که ماهیان سیم قرمز دریایی(*Pagrus major*) تغذیه شده با جیره کنسانتره سویا مکمل شده با متیونین و لیزین از روند رشد و کارایی غذایی بالاتری نسبت به ماهیان تغذیه شده با جیره بدون متیونین و لیزین برخوردار بودند(28). Ai و همکاران (2005) دریافتند که امکان جایگزین نمودن 53 درصد کنجاله سویا به همراه مکمل متیونین در جیره غذایی گربه ماهی(*Silurus meridionalis*) امکان پذیر است(6). تحقیقات انجام شده روی قزل آلای رنگین کمان(*Onchorhynchus mykiss*) نشان داده که آرد سویا منبع پروتئینی مناسبی برای ماهیان گوشتخوار بوده و امکان جایگزین نمودن بخشی از آن به همراه مکمل متیونین و لیزین به جای پودر ماهی وجود دارد(32). نتایج یافته های تحقیقاتی حاکی از آن بود که ماهیان گوشتخوار می توانند از سویا به عنوان یک منبع پروتئینی بهره برداری کنند، 40 درصد از آرد ماهی در جیره غذایی قزل‌آلای رنگین کمان و باس دریایی و 100

درصد آرد ماهی در جیره غذایی گربه ماهی پرورشی از آرد سویا جایگزین شد و نه تنها تاثیر نامطلوبی بر روند رشد و پارامترهای فیزیولوژیک گونه های مذکور نداشته بلکه هر گروه از پارامترهای رشد مناسب برخوردار بودند، اما باید اذعان نمود که در بسیاری از گونه های پرورشی، جایگزینی بیش از 50 درصد آرد ماهی با آرد سویا و سایر منابع پروتئین گیاهی، نرخ رشد کاهش یافته و موجب کاهش قابلیت سیستم ایمنی غیراختصاصی و وخیم‌ترشدن تغییرات پاتولوژیک روده بزرگ می شود(31). فیلماهیان تغذیه شده با جیره‌ای بر پایه ی آرد سویا با مکمل سازی جداگانه لیزین یا متیونین به طور معنی‌داری دارای شاخص‌های خونی ضعیف‌تری نسبت به ماهی های تغذیه شده با متیونین و لیزین بودند. هر چند مکمل سازی جداگانه اسیدآمینه باعث بهبود عملکرد شاخص خونی نسبت به ماهی های تیمار شاهد بود و می توان اذعان نمود که مکمل کردن لیزین و متیونین با هم نسبت به مکمل کردن مجزای لیزین یا متیونین در جیره پایه جهت حصول به عملکرد بهینه و بهبود شرایط بیوشیمایی خون لازم و ضروری است. به طور کلی اتفاق نظر محققین بر این است که فاکتورهای خونی و سرمی ماهیان در گونه‌های مختلف با هم تفاوت داشته، ارتباط و وابستگی زیادی با شرایط محیطی، تغذیه ای، سن وغیره دارد. بافت خون شاخص مهمی برای وضعیت فیزیولوژیک اندام های بدن در تشخیص سلامت یا بیماری و کنترل روند زیستی موجودات زنده بوده و تجزیه و تحلیل شاخص های خونی راهنمای ارزشمندی در سنجش وضعیت زیستی آبزیان می باشد. از آنجا که پارامترهای خونی شرایط نامناسب ماهی را بسیار سریع‌تر از سایر پارامترهایی که معمولاً اندازه گیری می شوند، نشان می‌دهند و نیز از آنجا که این پارامترها به تغییرات محیطی سریعاً پاسخ می دهند از آن ها به طور وسیعی برای توصیف وضعیت سلامت ماهی و ارزیابی پاسخ های استرس و سازش های فیزیولوژیک موجود استفاده می‌شود. در پستانداران مثل انسان، اثرات کاهش دهنده سطح کلسترول خون با مصرف سویا کاملاً ثابت شده است. مدارک مستندی نیز در رابطه با اثرات کاهش دهنده کلسترول خون در ماهی هایی که با جیره های دارای پروتئین گیاهی تغذیه شده اند وجود دارد(10). به-علاوه، میزان تحمل گونه‌های متداول پرورشی به بازدارنده‌های موجود در کنجاله سویا متفاوت است. بازدارنده پروتئاز، یک ماده ضدغذایی بسیار شایع است که دو گروه شامل بازدارنده تریپسین و دیگری بازدارنده پروتئاز Bowman-Birk آن در کنجاله سویا وجود دارد(23). نتایج بررسی ها در رابطه با گونه ماهی آزاد آتلانتیک نشان داد که افزایش مقادیر کنجاله سویا به میزان 30 تا 40 درصد تأثیر منفی در روند رشد نداشته است. اگر به یک آلترناتیو پروتئینی مناسب به جای پودر ماهی و تعیین پتانسیل آن در آبزی‌پروری پرداخته شود باید به تاثیر پروتئین جایگزین بر کارکرد سیستم ایمنی و پایداری ماهی تغذیه شده در مقابل بیماری ها توجه شود، به همین دلیل کارخانجات تولید کننده غذا و پرورش دهندگان همواره در مورد الحاق منابع پروتئین جانشین به دلیل تاثیر منفی آن ها بر شاخص های ایمنی آبزی مورد نظر در شک و تردید می باشند، هر چند به اثبات رسیده که رشد ماهی تغذیه شده با این منابع روند خوبی داشته است(12). در آزمایش حاضر تری گلیسیرید و کلسترول پلاسمای ماهیان تغذیه شده با مکمل های لیزین و متیونین دارای اختلاف معنی دار آماری با تیمار شاهد بود. تری گلیسیرید سرم به عنوان یک نشان گر کوتاه مدت در مورد وضعیت تغذیه به کار می رود. در جایگزین نمودن پروتئین آلترناتیو گیاهی و جانوری، افزایش چربی کل هم‌زمان با افزایش تری گلیسیرید پلاسما در ماهیان نشان دهنده متابولیسم بالای چربی و جواب مثبت به پروتئین آلترناتیو است، هر چند متابولیسم

کلسترول در پستانداران و ماهی با هم متفاوت است، اما گزارش شده که جایگزینی منابع پروتئین گیاهی به دلیل افزایش ترشح نمک های صفراوی مانع از جذب کلسترول و یا منجر به جذب و بازگیری در دیواره روده شده و بدین ترتیب کاهش کلسترول یا هایپوکلسترومی رخ می دهد(15). غلظت گلوکز خون در مطالعه حاضر از تیمارهای غذایی تاثیر پذیرفت. غلظت گلوکز خون در ماهیانی که از تیمار شاهد تغذیه شده بودند، نتایج مشابهی از ماهیان تغذیه شده از جیره های حاوی پودر سویا و گلوتن ذرت گزارش شده است (17). غلظت توتال پروتئین در خون به عنوان یک شاخص جهت بررسی سلامت وضعیت تغذیه ای ماهی به کار گرفته می شود، هم چنین کاهش معنی دار توتال پروتئین خون در جایگزینی پروتئین های گیاهی دلالت بر عدم کارایی تغذیه و اختلال در کاهش پروتئین در کبد دارد(18). در آزمایش حاضر عدم اضافه نمودن مکمل لیزین و متیونین در جیره محتوی سطوح بالای کنجاله سویا تاثیر معنی دار پروتئین کل سرم خون، آنزیم های آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینوترانسفراز(AST) ماهیان داشت که نشان دهنده عدم تطابق پذیری مناسب فیلماهی به پروتئین آلترناتیو است. آنزیم های ALT و AST یکی از دو هزار آنزیمی هستند که در کبد وجود دارند و کاتابولیسم آمینواسید در کبد و انتقال گروه های آمینواسید از آلفا آمینواسیدها به آلفا کتواسیدها دارند. افزایش آنزیم های ALT و AST در خون حاصل از بافت های آسیب دیده در کبد است. میزان AST با انسداد مجرای صفراوی و بیماری زوال دهنده کبد(Intrahepatic Infiltrative Disease) بالا می رود و ALT هنگامی که سلول های کبد تخریب می‌شود به خون نشت می‌کند(13). هم چنین میزان آنزیم ALT به طور قابل توجهی در کبد آسیب دیده که به حالت بحرانی رسیده است افزایش می یابد(27). با توجه به نتایج مطالعه حاضر می توان اذعان نمود که فیلماهی جوان پرورشی(*Huso huso*) می تواند به طور موثری از مکمل اسید آمینه لیزین(L-lysin) به میزان 12/02 گرم در کیلوگرم جیره و متیونین(DL-metionine) به میزان 12/94 گرم در کیلوگرم در جیره محتوی 344 گرم در کیلوگرم کنجاله سویا برای کارایی رشد بهتر، کارایی غذا، ترکیب لاشه و شرایط بیوشیمیایی خون استفاده نمود. به علاوه موضوع مشابه باید با سایر منابع پروتئین گیاهی مثل کنجاله کتان، کنجاله آفتابگردان و کانولا مطالعه شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی استانداری استان گیلان در قالب پروژه مطالعه پرورش گوشتی فیل ماهی (*Huso huso*) با استفاده از جیره‌های مختلف غذایی در موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر اجرا گردید. از کلیه همکارانی که طی مراحل اجرایی پروژه از حمایت‌های بی‌دریغ آنان بهره‌مند شدیم، صمیمانه تشکر می‌گردد.

منابع

1-محسنی، م.، بهمنی، م.، پورعلی، ح.، کاظمی.، پورکاظمی، م. 1384. گزارش نهایی پروژه تشکیل و پرورش گله های مولد از مولدین پرورش یافته در کارگاه های تکثیر و پرورش (فاز اول: بیوتکنیک پرورش گوشتی فیلماهی). انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری. موسسه تحقیقات و آموزش شیلات ایران. صفحه 133.

2-محسنی، م.، پورکاظمی، م.، بهمنی، م.، پورعلی، ح.، کاظمی، ر.، علیزاده، م. 1385. گزارش نهایی پروژه تعیین احتیاجات غذایی فیلماهی از مرحله لاروی تا مرحله عرضه به بازار. انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری. موسسه تحقیقات و آموزش شیلات ایران. صفحه 224.

3-محسنی، م.، بهمنی، م.، پورعلی، ح.، کاظمی، ر.، حلاجیان، ع. 1390. گزارش نهایی پروژه مطالعه امکان تولید

گوشت، خاویار و بچه ماهی از تاسماهیان پرورشی(تاسماهی ایرانی، فیل ماهی، شیپ و ازون برون). انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری. موسسه تحقیقات و آموزش شیلات ایران. صفحه 131.

4.Ahmed, I., Khan, M.A. (2004). Dietary lysine requirement of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). Aquaculture, 235; 499–511.

5.Ahmed, I., Khan, M.A., Jafri, A.K. (2003). Dietary methionine requirement of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). Aquac. Int., 11; 449–462.

6.Ai, Q.H., Ai, Q.H., Xie, X.J. (2005). Effects of replacement of fish meal by soybean meal and supplementation of methionine in fish meal/soybean meal-based diets on growth performance of the southern catfish Silurus meridionalis. J. World Aquaculture Soc, 36(4); 498-507.

7.Aprodu, I., Vasile, A., Gurau, G., Ionescu, A., Paltenea, E. (2012). Evaluation of nutritional quality of the common carp (*Cyprinus carpio*) enriched in fatty acids. Food Technology, 36; 61-73.

8.Cho, S.H., Lee, S.M., Lee, J.H. (2005). Effect of dietary protein and lipid levels on growth and body composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) reared under optimum salinity and temperature conditions. Aquaculture Nutrition, 11; 235-240.

9.Coutinho, F., Peres, H., Guerreiro, I., Pousao-Ferreira, P., Oliva-Teles, A. (2012). Dietary protein requirement of Sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*, Cetti 1777) juveniles. Aquaculture, 35; 391-397.

10. De Francesco, M., Parisia, G. Medaleb, F., Lupia, P., Kaushik, S. J., Polia, B.M. (2004). Effect of long-term feeding with a plant protein mixture based diet on growth and body/fillet quality traits of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 236; 413-429.

11.FAO. (2012). The state of world fisheries and aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 210p.

12. Francis, G., Makkar, H.P.S., Becker, K. (2001). A ntinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. Aquaculture, 199; 197-227.

13. Gaber, M.M. (2006). Partial and complete replacement of fish meal by broad bean meal in feeds for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, L., fry. Aquac. Res., 37; 3–15.

14. Goff, J.B., Gatlin, D.M. (2004). Evaluation of different sulfur amino acid compounds in the diet of red drum, Sciaenops ocellatus, and sparing value of cystine for methionine. Aquaculture, 241; 465-477.

15. Kaushik, S.J., Coves, D., Dutto, G., Blanc, D. (2004). Almost total replacement of fishmeal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, Dicentrarchus labrax. Aquaculture, 230; 391-404.

16. Kim, J.D., Lall, S.P. (2001). Effects of dietary protein level on growth and utilization of protein and energy by juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). Aquaculture, 195; 311-319.

17. Kikuchi, K. (1999). Partial replacement of fishmeal with corn gluten meal in diets for Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. J. World Aquacult. Soc., 30(3); 357-363.

18. Kumar, V. P.S., Makkar, H.P.S., Amselgruber, W., Klaus Becker, K. (2010). Physiological, haematological and histopathological responses in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings fed with differently detoxified Jatropha curcas kernel meal. Food and Chemical Toxicology.

19. Mohseni, M., Sajjadi, M., Pourkazemi, M. (2007). Growth performance and body composition of sub yearling Persian sturgeon, (*Acipenser persicus*, Borodin, 1987), fed different dietary protein and lipid levels. Journal of Applied Icthyology, 23; 204-208.

20. Mohseni, M., Hassani, M.H., Pourali, F.H., Pourkazemi, M., Bai, S.C. (2011). The optimum dietary carbohydrate/lipid ratio can spare protein in growing beluga, *Huso huso*. Journal of Applied Icthyology, 27; 737-742.

21. Murillo-Gurrea, D.P., Coloso R.M., Bolongan, I.G., Serrrano, J.R. (2001). Lysine and arginine requirement of Juvenile Asian sea bass (*Lates calcarifer*). J. Appl. Ichthyol., 17; 49-53.

22. Marcouli, P., Alexis, M.N., Andriopoulou, A., Ilpopulou-Greor-Gudaki, J. (2006). Development of a reference diet for use in indispensable amino acid requirement studies off gilthead sea bream *Sparus aurata* L. Aquacult.Nutr., 10; 335-354.

23. Norton, G. (1991). Proteinase inhibitors. In: D،Mello, F.J.P., Duffus, C.M., Duffus, J.H. (Eds.), Toxic Substances in Crop plants. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Cambridge CB4 4WF, Cambridge, 68-106.

24. Polat, B., Beklevik, G. (1998). The importance of beanie and some attractive substance as fish feed additives. Chiam. Options Mediterraneennes, 217-220.

25. Sardar, M., Abid H.S., Randha W.A., Prabhakar, R. (2009). Effects of dietary lysine and methionine supplementation on growth, nutrient utilization, carcass compositions ansd haemato-biochemical status in Indian major carp, rohu (*Labeo rohita*) fed soy protein-based diet. Aquaculture Nutrition, 15; 229-346.

26. Small, B.C., Soares, J.R. (2000). Quantitative dietary lysine requirement of Juvenile stripped bass *Morone saxalitis.* Aquaculture, 6; 207-212.

27. Soltan, M**.** A**.**, Hanafy, M**.** A., Wafa, M**.** I**.** A. (2008). Effect of replacing fish meal by a mixture of different plant protein sources in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Diets. Global Veterinaria, 2; 157-164.

28. Takagi, S., Shimeno, S., Hosokawa, H., Ukawa, M. (2001). Effect of lysine and methionine supplementation to a soy protein concentrate diet for red sea bream Pagrus major. Fish. Sci., 67; 1088– 1096.

29. Tacon, G.J., Metian, M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. Aquaculture, 285; 146-158.

30. Tantikitti, C., Chimsung, N. (2001). Dietary lysine requirement of freshwater (*Mystus nimurus* Cuv. & Val). Aquac. Res., 32; 135-141.

31. Wang, Y., Li K., Han, H., Zheng, Z.X., Bureau, P.B. (2008). Potential of using a blend of rendered animal protein ingredient to replace fish meal in practical diets for Malabar grouper (*Epinephelus malabricus*). Aquaculture, 281; 113-117.

32. Webster, C.D., Lim, C.E. (2002). Nutriet requirement and feeding of finfish for aquaculture. CAB International, CABI publishing, pp; 418.

.

.

.