فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۳۶، جلد ۱۰، شماره ۱، زمستان۹۵، صفحه ۶۷ تا ۷۷

تاثیر متقابل ویتامین C و اسیدفولیک بر فاکتورهای خونی و ایمنی بچه ماهی شیپ(*Acipenser nudiventris*)

میثم نادری[۱]، حسین خارا[۱]، محمد علی یزدانی ساداتی[۲]
۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان. ایران. h.khara1974@yahoo.com
۲-موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج جهاد کشاورزی، رشت. ایران.

تاریخ دریافت:۹٤/۱۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۸

چکیده

زمینه و هدف: وجود ویتامین ها در جیره غذایی برای بقاء، رشد و تولید مثل طبیعی ماهیان ضروری است. نیازهای مربوط به ویتامین ها در جیره غذایی تحت تاثیر اندازه، سن، میزان رشد، شرایط فیزیولوژیک، وضعیت سلامتی، ترکیب غذایی جیره و غیره می-باشد. به همین دلیل، این مطالعه به منظور تعیین تاثیر سطوح مختلف ویتامین های C و اسید فولیک بر فاکتورهای خونی و ایمنی بچه ماهی شیپ انجام گرفته است.

روش کار: آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٦ تیمار(هر یک با سه تکرار) شامل تیمار شاهد(فاقد مکمل های ویتامین C و اسید فولیک)، تیمار ۱(ویتامین C mg/kg ۲۰۰ + اسید فولیک mg/kg ۱/۵)، تیمار ۲(ویتامین C mg/kg ۲۰۰ + اسید فولیک mg/kg ۳/۵)، تیمار ۳(ویتامین C mg/kg ۲۰۰ + اسید فولیک mg/kg ۵/۵)، تیمار ٤(اسید فولیک mg/kg ۳/۵) ، تیمار ۵(ویتامین C mg/kg ۲۰۰) و تیمار ٦(فاقد ویتامین C و اسید فولیک) بودند. این تحقیق به مدت ۸ هفته انجام شد. پس از عادت دهی ماهیان با غذای دستی، تعداد ۱۰ عدد ماهی شیپ(۱/٦٦ ± ۳۱/۸ گرم) به هر یک از هجده تانک(به حجم آبی ۵۰۰ لیتر) در نظر گرفته شده منتقل شدند. در پایان زمان تیمار شاخص های خونی(گلبول قرمز، گلبول سفید، هموگلوبین، هماتوکریت) و شاخص های ایمنی(لیزوزیم، ایمونوگلوبولین کل(Total IgM) و ایمونوگلوبولین(IgM)) در آن ها اندازه گیری گردید.

یافته ها: نتایج مشخص نمودند که افزایش سطح ویتامین اسید فولیک و سطح ثابت ویتامین C در جیره غذایی بر روی شاخص‌های خونی بدن ماهیان شیپ پرورشی تاثیر گذار است و سطح ویتامین C به تنهایی باعث افزایش شاخص های ایمنی اندازه گیری شده می‌باشد، به طوری که میزان گلبول قرمز، گلبول سفید، هموگلوبین، هماتوکریت در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی(ویتامین C mg/kg ۲۰۰+ اسید فولیک mg/kg ۵/۵) در بالاترین میزان و سطح فعالیت لیزوزیم، Total IgM و IgM در ماهیان تغذیه شده با جیره(ویتامین C mg/kg ۲۰۰) در مقایسه با سایر تیمارها به طور معنی داری در سطح بالاتری قرار داشت(P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می دهد که افزودن مکمل ویتامینی اسید فولیک ۵/۵ میلی گرم با ویتامین C ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم باعث بهبود شاخص های خونی و به کاربردن ویتامین C به میزان ۲۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم به تنهایی باعث افزایش شاخص‌های ایمنی می شود.

واژه های کلیدی: ماهی شیپ(*Acipenser nudiventris*)، اسید فولیک، ویتامین C، شاخص های خونی، شاخص های سیستم ایمنی.

مقدمه

ماهی شیپ *Acipenser nudiventris* Lovetsky (1828) از تاس ماهیان بیشتر وابسته به آب های جنوبی دریای خزر در بخش های رود کورا، ارس و سفید رود می باشد(۱۱). در دریای خزر کم ترین تعداد را در بین همه گونه های اقتصادی ماهیان مهاجر خاویاری دارد و حدوداً ۱ درصد از کل صید ماهیان خاویاری در دریای

خزر را شامل می شود(۴۸). پرورش ماهیان خاویاری در کشور به سرعت رو به توسعه می باشد، از مهم ترین مسائل در پرورش ماهیان، توجه به امر غذا و تغذیه آن ها می باشد به طوری که در آبزی پروری این مقوله بیش از ۵۰ درصد هزینه های جاری یک مزرعه پرورش آبزیان را در بر می گیرد. یکی از اقلام غذایی که از نظر کمی جزء ناچیز اما از نظر کیفی جزء ضروری و مهم جیره آبزیان تلقی می شود، ویتامین ها هستند که از ترکیبات آلی پیچیده ای تشکیل شده اند و جزو پروتئین ها، چربی‌ها، کربوهیدرات ها، مواد معدنی و آب نمی-باشند(۲۶، ۲۵، ۲۴). این ترکیبات در طبیعت توسط تک یاخته ای ها، سلول های گیاهی و سلول های برخی از جانوران ساخته می شوند(۲۸، ۲۰). یکی از ویتامین های بسیار مهم محلول در آب ویتامین C($C_6H_8O_6$) است که به نام اسید آسکوربیک نیز شناخته می شود(۲۷، ۲۱). ویتامین C در حفظ استحکام بافت پیوندی، رگ های خونی و بافت های زخمی نقش حیاتی را ایفا می-کند(۲۰). هم چنین این ماده مقاومت بدن در مقابل عفونت ها و مسمومیت ها را افزایش می دهد(۱۵). نیز اسیدفولیک یکی دیگر از ویتامین های محلول در آب می باشد، که می تواند نقش‌های متعددی را ایفا کند. بعد از جذب، اسید فولیک به چندین شکل کوآنزیمی فعال شامل تتراهیدروفولیک اسید تغییر می یابد. این کوآنزیم-ها واحدهای منفرد کربن را از یک ترکیب به ترکیب دیگر انتقال می دهند و در تشکیل هم(پروتئین حاوی آهن در هموگلوبین)، تشکیل تیروزین از فنیل آلانین، تشکیل اسید گلوتامیک از هیستیدین، ساخت کولین از اتانول امین و تشکیل متیونین از هموسیستئین دخالت دارند(۳۳). محققینی هم چون شفایی پور و همکاران(۲۰۱۱) تأثیر سطوح مختلف ویتامین C و اسید فولیک را بر روی قزل آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* را مورد بررسی قرار دادند(۴۲). John و Mahajan در سال ۱۹۷۹ کاهش نرخ رشد و کاهش تعداد اریتروسیت ها را در ماهی روهو بعد از ۱۵ هفته تغذیه با جیره ناکافی از اسید فولیک پیدا کردند(۱۵). فلاحتکار(۱۳۸۶) ساخت اسید آسکوربیک در سه گونه از ماهیان خاویاری(*Acipen seriformes*) را مورد بررسی قرار دادند(۵). Duncan and Lovell(۱۹۹۴) در تحقیقی اثر ویتامین C را روی نیازمندی به فولات(اسید فولیک) گربه ماهی کانالی(*Ictalurus punctatus*) بررسی کردند(۱۷). Maeland and Waagbo(۱۹۹۸) مطالعاتی در مورد نیاز آزاد ماهیان به ویتامین C انجام دادند(۳۵). Marros و همکاران در سال ۲۰۰۹ پاسخ های خونی و عملکرد رشد تیلاپیا(*Oreochromis niloticus*) با جیره غذایی شامل اسید فولیک را بررسی کردند(۳۸). Verlhac و همکاران(۱۹۹۶) دریافتند که ماهی قزل آلای رنگین کمان(*Oncorhynchus mykiss*) هنگامی که با جیره‌های حاوی مکمل های ویتامین C با سطوح ۴۰۰۰ mg/kg تغذیه شوند، افزایش تعداد لکوسیت های سیار مشاهده شد(۵۱). Shiau and Huang در سال ۲۰۰۱، اسید فولیک مورد نیاز رژیم غذایی میگوی *Penaeus monodon* را اندازه گیری کردند(۴۶، ۴۵). از سوی دیگر به علت عدم وجود مطالعه ای در زمینه نیازهای تغذیه ای ویتامینی جیره غذایی ماهیان شیپ پرورشی و هم چنین اثر سینرژیسم ویتامین C و B_9(اسید فولیک)، در مطالعه حاضر تأثیر ویتامین های C و اسید فولیک جیزه غذایی بر روی روند رشد ماهی شیپ پرورشی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

مراحل انجام این تحقیق از اول خرداد ماه تا پایان تیر ماه ۱۳۹۱ در بخش تکثیر و پرورش موسسه بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان واقع در ۲۵ کیلومتری شهر رشت و در مجاورت سد سنگر در جوار رودخانه سفید

رود انجام شد. جهت انجام عملیات پرورش از ۱۸ عدد وان فایبر گلاس به حجم آبی ۵۰۰ لیتر در کنار یک دیگر استفاده شد. تعداد ۱۸۰ ماهی شیپ با وزن متوسط ۰/۵±۳۲ گرم که از نظر شرایط ظاهری سالم بودند از بین ماهیان موجود در مخازن نگهداری بخش تکثیر و پرورش موسسه تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری انتخاب شده و در هر وان ۱۰ عدد ماهی رهاسازی گردید. با انجام محاسبات آماری پس از انجام بیومتری مشخص شد که هیچ گونه اختلاف معنی داری از نظر وزن و طول در این ماهیان در تمامی وان ها وجود ندارد. طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی(Completely Randomized Design) انجام گردید(۱). بدین صورت که تیمار ۱(ویتامین C ۲۰۰ + اسید فولیک ۱/۵)، تیمار ۲(ویتامین C ۲۰۰ + اسید فولیک ۳/۵)، تیمار ۳(ویتامین C ۲۰۰ + اسید فولیک ۵/۵)، تیمار ۴(اسید فولیک ۳/۵)، تیمار ۵(ویتامین C ۲۰۰) و تیمار ۶(فاقد ویتامین C و اسید فولیک)(جدول ۱) مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به مطالعات انجام گرفته بر روی فیل ماهی(۴،۳) ، تاس ماهی هیبرید(۳۷)، تاس ماهی سیبری(۳۴)، تاس ماهی دریاچه ای(۳۲)، دوز ویتامین C ۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم از غذا در نظر گرفته شد(۸، ۷). در مورد انتخاب غلظت اسید فولیک نیز به تحقیقات دانشمندانی که روی تیلاپیا(۴۱)، هامور(۳۲)، گربه ماهی سبز(۲۰)، گربه ماهی کانالی(۱۶) و قزل آلای رنگین کمان استناد گردید(۴۰).

آنالیز جیره غذایی

در ابتدا جیره ساخته شده بدون مکمل ویتامینی برای اندازه گیری ویتامینC و اسید فولیک به آزمایشگاه تخصصی ویرومید فرستاده و با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع(HPLC)(مدل CECIL-1100 SERES) اندازه گیری انجام شد(۱۳). مقدار ویتامین C و اسید فولیک حاصل از آنالیز غذایی توسط دستگاه HPLC: ویتامین C ۳/۹(mg/kg)، اسید فولیک ۱ (mg/kg) و در هنگام ساختن جیره تیمار های مختلف این مقدار از ویتامین C و اسید فولیک از غلظت مورد نظر کاسته شد. آنالیز پروتئین و خاکستر به ترتیب با دستگاه کجلدال مدل BAP40 ساخت آلمان و به روش AOAC, 1990 و آنالیز چربی و رطوبت به ترتیب با دستگاه سنجش چربی سوکسله مدل BOHR ساخت آلمان و آون، در آزمایشگاه دکتر میر اعلمی انجام شد(۲).

نحوه ساخت غذا

کلیه ترکیبات با استفاده از دستگاه آسیاب کاملاً به صورت پودر در آمده و به مدت ۲۰ دقیقه با استفاده از دستگاه میکسر با یک دیگر مخلوط شدند. سپس به مخلوط نمک، مکمل ویتامینی فاقد ویتامین C و اسید فولیک، مکمل معدنی، ویتامین C و اسید فولیک اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه با یک دیگر مخلوط گردیدند(۳۱). ویتامین C:(stay C 35) ال-اسکوربیل-۲- پلی فسفات(ساخت شرکت Science)، اسید فولیک: اسید فولیک ساخت شرکت Dae jung chemical,Korea با خلوص ۹۶ درصد به صورت خشک به غذا اضافه می شد(۵). روغن ماهی افزوده و مجدداً به مدت ۱۵ دقیقه با یک دیگر مخلوط و با استفاده از دستگاه چرخ گوشت به صورت پلت هایی با طول ۴ میلی متر و قطر ۲ میلی متر تهیه شدند. پلت ها دستگاه خشک کن به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، خشک و پس از خشک شدن در پلاستیک های پلی اتیلنی مشکی بسته بندی و شماره گذاری گردید.

زیست سنجی

زیست سنجی ماهیان در طول ۸ هفته پرورش هر ۲۱ روز یک بار(در مجموع ۳ بار) به منظور اندازه گیری طول کل و وزن در تمام تیمارها و تکرارها از کلیه ماهیان به صورت فردی انجام شده و اطلاعات حاصله در فرم-های مخصوص ثبت و به منظور کاهش استرس شروع

زیست سنجی ماهیان ۲۴ ساعت قبل و ۱۲ ساعت بعد از بیومتری تغذیه آن ها قطع شده، ماهیان توسط محلول ۳۰۰-۲۰۰ PPM پودر گل میخک بیهوش شدند. بعد از طی دوره پرورش(۸ هفته) و ۲۴ ساعت بعد از آخرین بیومتری ۳۰ درصد از جمعیت ماهیان در هر تیمار به طور تصادفی انتخاب و با سرنگ ۳ سی سی از ساقه دمی نمونه خون تهیه و جهت اندازه گیری شاخص های خونی(گلبول قرمز، گلبول سفید، هموگلوبین، هماتوکریت) و فاکتورهای ایمنی(لیزوزیم،Total IgM و IgM) به آزمایشگاه ارسال گردید. لازم به ذکر است در هنگام خون گیری از مواد بیهوش کننده به علت احتمال تاثیر بر روی سطوح شاخص های خونی استفاده نگردید(۵۰، ۴۹).

روش اندازه گیری فاکتورهای خونی و ایمنی

شمارش گلبول های قرمز(RBC): با استفاده از پیپت ملانژور قرمز، با رقت ۱ به ۲۰۰، ماده رقیق کننده ریس، لام شمارش نئوبار(در ۵ خانه مرکزی لام شمارش شده و در عدد ۱۰۰۰۰ ضرب می گردد)(۳۰، ۶، ۳).

شمارش گلبول های سفید (WBC): با استفاده از پیپت ملانژور سفید، با رقت ۱ به ۲۰، ماده رقیق کننده ریس، لام شمارش نئوبار(در ۴ خانه مخصوص گلبول های سفید شمارش شده در عدد ۵۰ ضرب می گردد)(۳۰، ۶، ۳).

اندازه گیری هماتوکریت (HCT): دو سوم لوله میکرو هماتوکریت را از خون پرکرده، پس از مسدود نمودن انتهای لوله با خمیر هماتوکریت، لوله را با سانتریفیوژ با دور ۷۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده و با خط کش مخصوص، میزان آن برحسب درصد قرائت گردید(۳۰).

اندازه گیری هموگلوبین (Hb): اندازه گیری آن به روش سیان مت یا سیانید هموگلوبین و با اسپکتروفتومتر با طول موج ۵۴۰nm بر حسب گرم در دسی لیتر انجام شد(۳۰، ۶، ۳).

اندازه گیری ایمونوگلوبولینM(IgM): با استفاده از روش Immunoturbidimetric، IgM موجود در سرم خون با آنتی بادی های پلی کلونال موجود در محلول-های تامپون تشکیل کمپلکس داده و باعث کدر شدن محلول می شوند. شدت کدورت ایجاد شده با مقدار IgM رابطه مستقیم داشته و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر(مدلVIS-2100 ساخت شرکت Unico آمریکا) در طول موج ۳۴۰ نانومتر با بلانک(آب مقطر) خوانده شد(۲۹، ۲).

اندازه گیری لیزوزیم: برای اندازه گیری سطوح لیزوزیم در سرم خون، ۵۷/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری *Micrococcus lysodeikticus*(سیگما)(معادل مقدار ۰/۳۷۵میلی گرم در میلی لیتر از بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار با pH برابر ۶/۲) با ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه-های سرم مخلوط و جذب نوری پس از ۱۵ و ۱۸۰ ثانیه به روش طیف سنجی وبا استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۷۰ نانومتر قرائت شد. بافر فسفات سدیم به عنوان بلانک استفاده شد(۱۸).

اندازه گیری غلظت ایمونوگلوبولین کل: ۰/۲میلی لیتر از هر نمونه سرم با ۰/۱ میلی لیتر از محلول پلی اتیلن گلیکول ۳۲٪ مخلوط و برای مدت ۲ ساعت برای پایین آوردن مولکول ایمونوگلوبولین انکوباسیون شد. رسوب ایمونوگلوبولین توسط سانتریفیوژ در ۵۰۰۰ دور در ۴ درجه سانتی گراد برداشت گردید. پروتئین کل در مایع شناور اندازه گیری، مقدار ایمونوگلوبولین به صورت(میلی گرم در هر میلی لیتر) بیان شد(۴۷، ۹).

پردازش آماری داده ها

برای رسم نمودارها از برنامه Excel و جهت تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS استفاده گردید. به طوری که با توجه به نرمال بودن داده ها(آزمون

Shapiro-wilk) آزمون های تجزیه واریانس یک طرفه(Oneway ANOVA) در سطح اطمینان ۹۵٪ و دانکن(Duncan) به کارگرفته شدند و در مواقعی که داده ها نرمال نبودند، از آزمون ناپارامتری کروسکال – والیس(Kruskal-Wallis) جهت مقایسه تیمارها، و از آزمون من– ویتنی(Mann-Whitney) برای مقایسه جفتی بین تیمارها استفاده شد.

نتایج

نتایج مربوط به میانگین درجه حرارت، اکسیژن و pH در جدول۳ آمده است. در میزان اکسیژن محلول، درجه حرارت و pH در بین تیمار های مختلف اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد($P>0/05$) و مقادیر آن ها نزدیک به شرایط عادی پرورش بودند.

جدول۱- ترکیبات جیره های غذایی مورد استفاده در آزمایش

ترکیبات جیره	تیمار					
	۱	۲	۳	۴	۵	۶
آرد ماهی (٪)	۵۴/۰	۵۴/۰	۵۴/۰	۵۴/۰	۵۴/۰	۵۴/۰
آرد گندم (٪)	۱۸/۰	۱۸/۰	۱۸/۰	۱۸/۰	۱۸/۰	۱۸/۰
شیر خشک (٪)	۶/۰	۶/۰	۶/۰	۶/۰	۶/۰	۶/۰
کنجاله سویا (٪)	۷/۰	۷/۰	۷/۰	۷/۰	۷/۰	۷/۰
روغن ماهی(٪)	۴/۰	۴/۰	۴/۰	۴/۰	۴/۰	۴/۰
گلوتن ذرت (٪)	۵/۰	۵/۰	۵/۰	۵/۰	۵/۰	۵/۰
مخمر (٪)	۳/۰	۳/۰	۳/۰	۳/۰	۳/۰	۳/۰
مخلوط مواد معدنی[۱] (٪)	۱/۳	۱/۳	۱/۳	۱/۳	۱/۳	۱/۳
مخلوط مواد ویتامینی[۲] (٪)	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷
اسید فولیک[۳] (mg/kg)	۱/۵	۳/۵	۵/۵	۳/۵	۰	۰
ویتامین C[۴] (mg/kg)	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۰	۲۰۰	۰

۱ مخلوط مواد معدنی(هر گرم شامل) :

Iron, 5 mg ; Zinc, 15mg ; Copper, 3 mg ; Manganese, 20 mg ; Calcium lactate, 327 mg ; Nacl, 43.5 mg ; Potassium Iodate, 0.3 mg

۲ مخلوط مواد ویتامینی(هرگرم شامل) :

Vitamin A , 5000 I.U ; Vitamin D_3 , 500 I.U; Vitamin E , 3 mg; Vitamin K_3 , 1.5 mg ; Vitamin B_2 , 1 mg ; Ca.pantothenate , 4 mg ; Vitamin B_3 , 15 mg , Vitamin B_6 , 0.3 mg.

۳اسید فولیک : ساخت شرکت Dae jung chemical. Korea با خلوص ۹۶ درصد.

۴ ویتامین C : stay-C ساخت شرکت Science. ال-اسکوربیل-۲- پلی فسفات.

جدول۲- ترکیبات تقریبی جیره پایه

	رطوبت	خاکستر	پروتئین	چربی	فیبر
ترکیبات تقریبی (٪)	۱۴/۲ ± ۰/۲	۲۰/۷± ۱۰/۰	۴۹/۰ ± ۰/۸	۱۴/۱ ± ۰/۲	۲/۰ ± ۰/۱

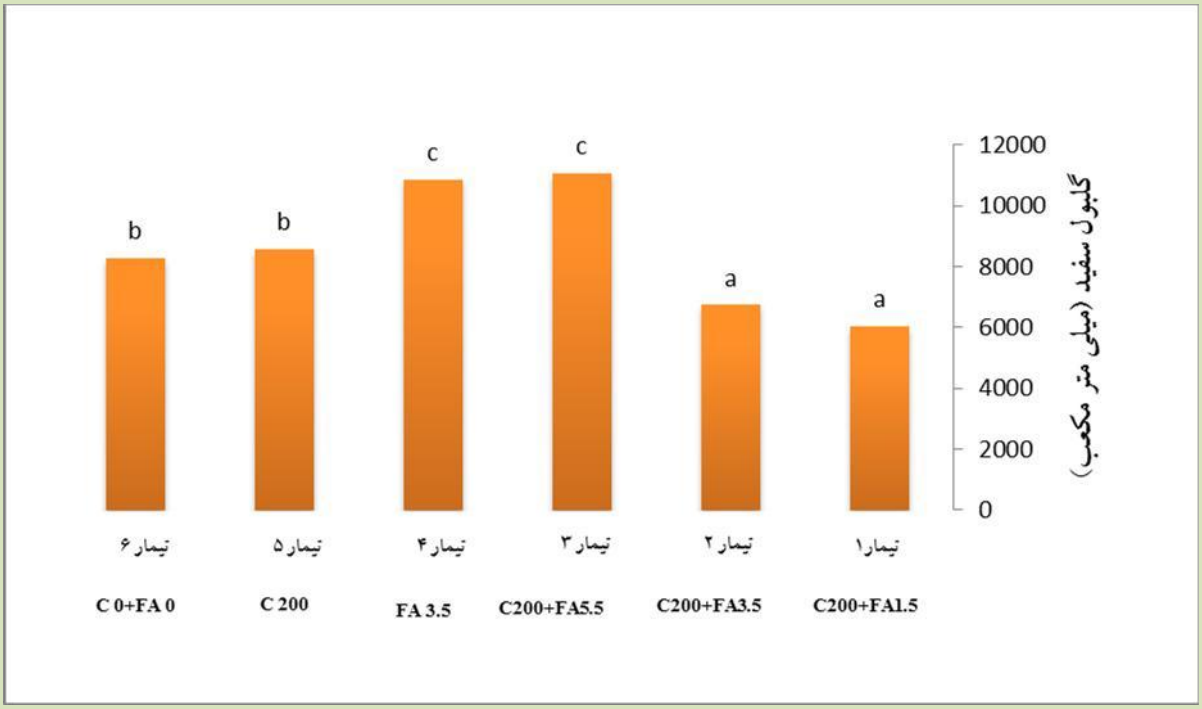
جدول ۳- فاکتورهای فیزیکوشیمیایی اندازه گیری شده در طول مدت پرورش

ماه	دما	اکسیژن	pH
خرداد	۲۰/۳ ± ۰/۲	۶/۹ ± ۰/۵	۷/۱ ± ۰/۱
تیر	۲۱/۲ ± ۰/۱	۶/۷ ± ۰/۳	۷/۲ ± ۰/۱

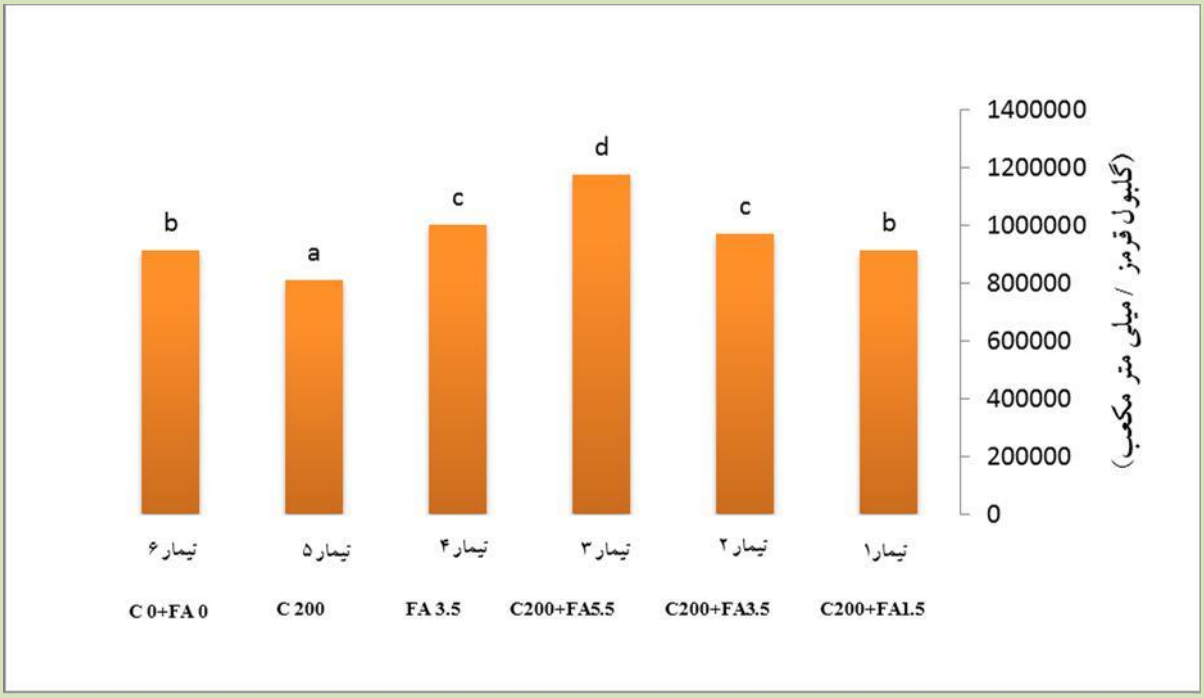
نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش سطح ویتامین اسید فولیک و سطح ثابت ویتامین C در تیمارها شاخص-های خونی اندازه گیری شده به طور معنی داری افزایش یافت. ماهیان تغذیه شده از جیره شامل ۵/۵ میلی گرم

اسید فولیک + ۲۰۰ میلی گرم ویتامین C دارای بیشترین میزان گلبول قرمز، گلبول سفید، هموگلوبین، هماتوکریت به ترتیب با مقادیر(۸۵۴۵۶/۱ ±۱۱۷۴۳۳۳/۳ میلی متر مکعب)، (۸۲۷/۶ ± ۱۱۰۶۶/۷میلی متر مکعب)، (۰/۶۹ ±۸/۸گرم در دسی لیتر)، (۲/۷۳ ±۴۳/۲۲درصد) دارا بودند که بر اساس آزمون کروسکال – والیساختلاف معنی دار آماری مشاهده شد(P<۰/۰۵)(نمودارهای ۱–۴).

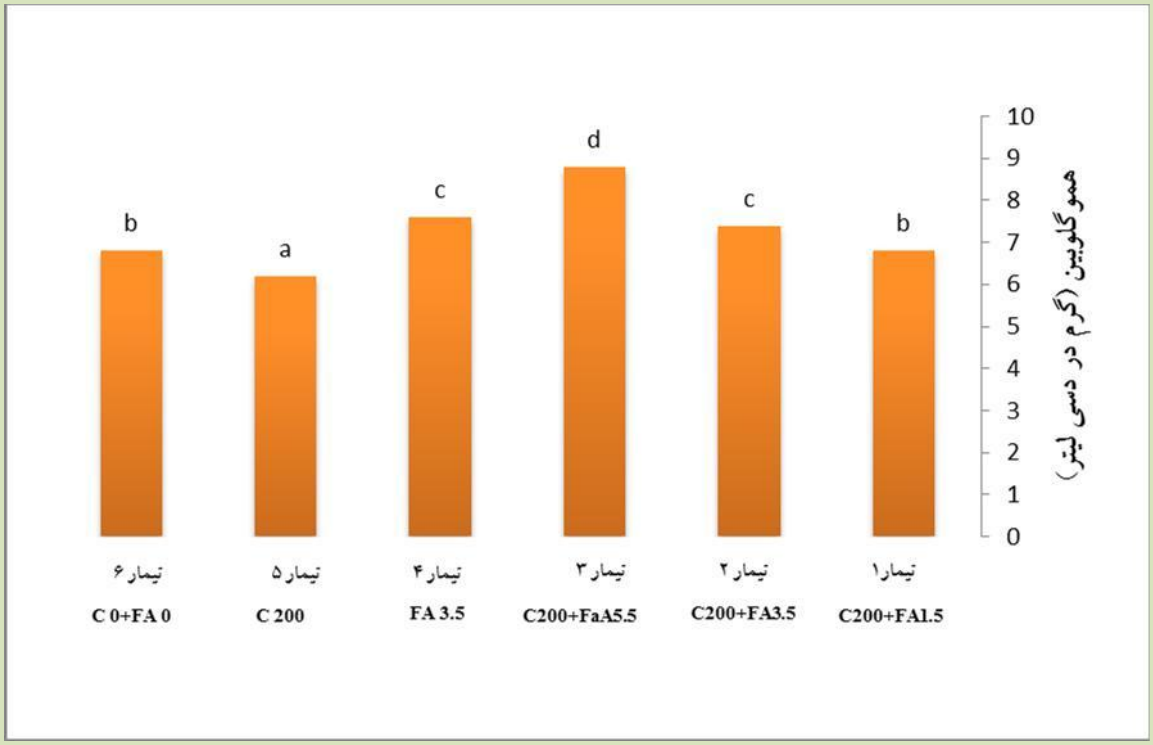
نتایج این بررسی نشان داد که فاکتورهای ایمنی اندازه گیری شده نظیر فعالیت لیزوزیم، ایمونوگلوبولین M و ایمونوگلوبولین کل در ماهیان تغذیه شه با جیره غذایی ویتامین C ۲۰۰ میلی گرم از مقادیر بیشتری برخوردار بودند، اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد(P<۰/۰۵)(نمودارهای ۵–۷).



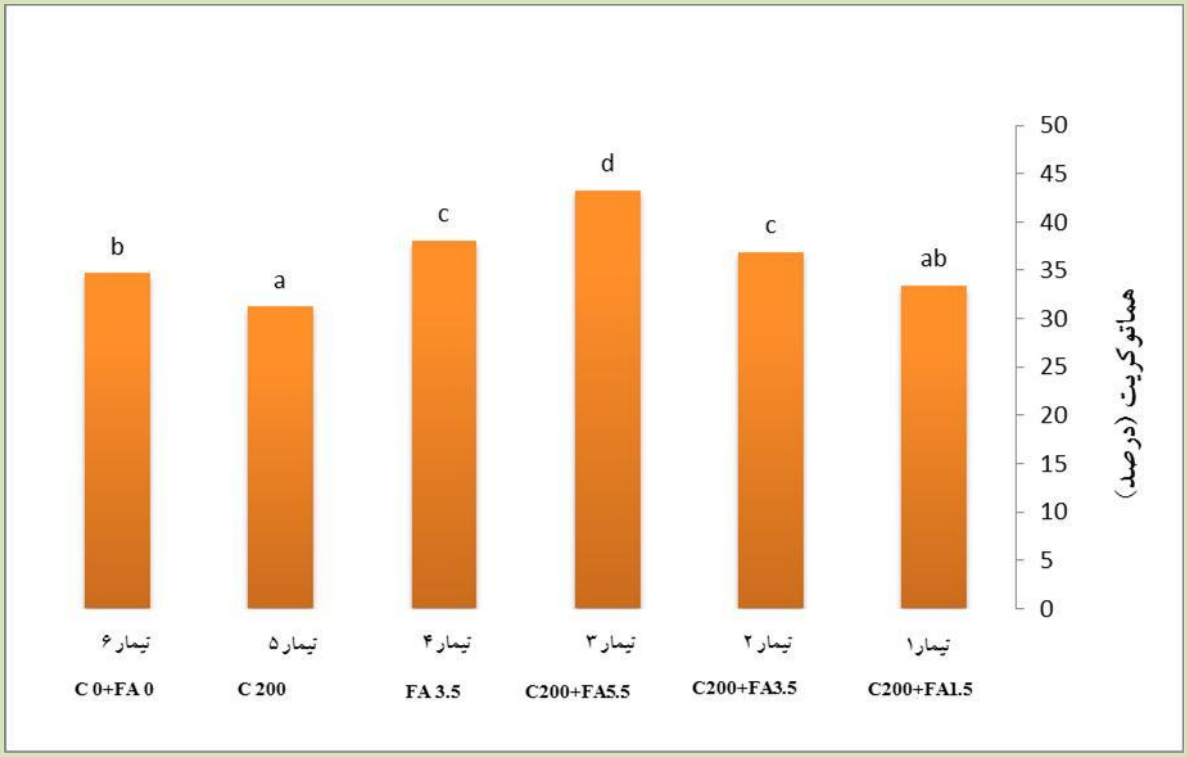
نمودار۱- اثر سطوح مختلف ویتامین های C و اسید فولیک بر میانگین تعداد گلبول های سفید (WBC) در تیمارهای مختلف



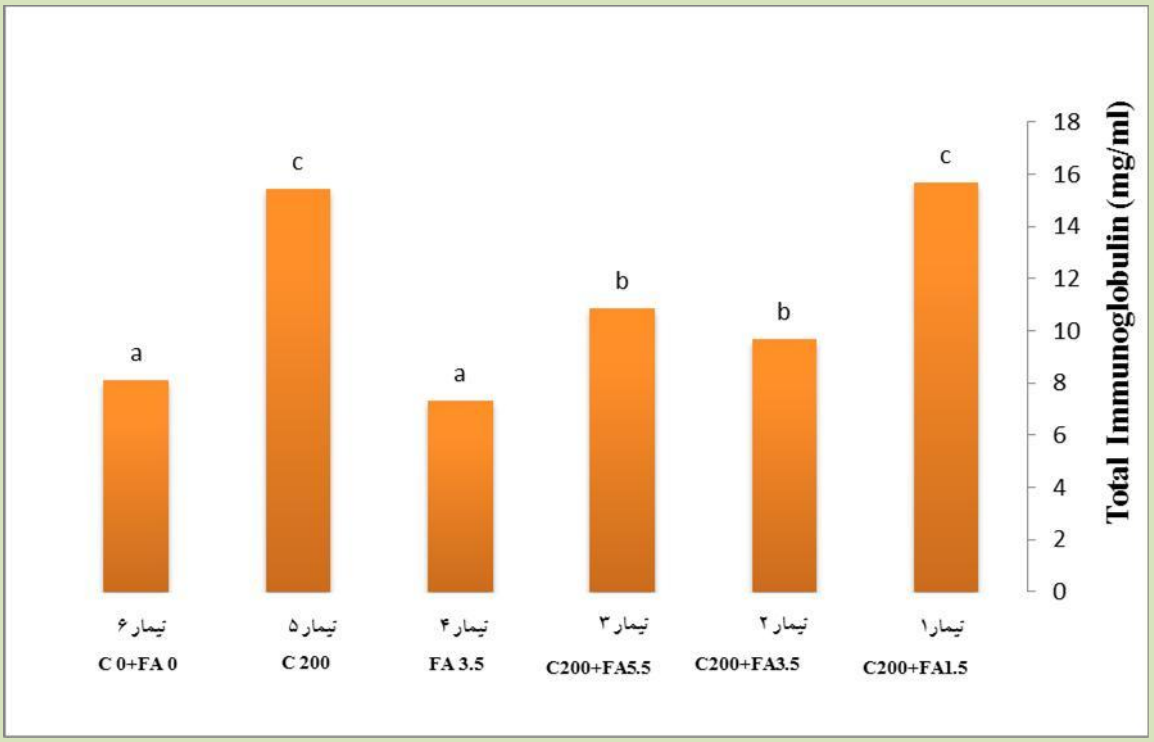
نمودار۲- اثرسطوح مختلف ویتامین های C و اسید فولیک بر میانگین تعداد گلبول های قرمز(RBC) در تیمارهای مختلف



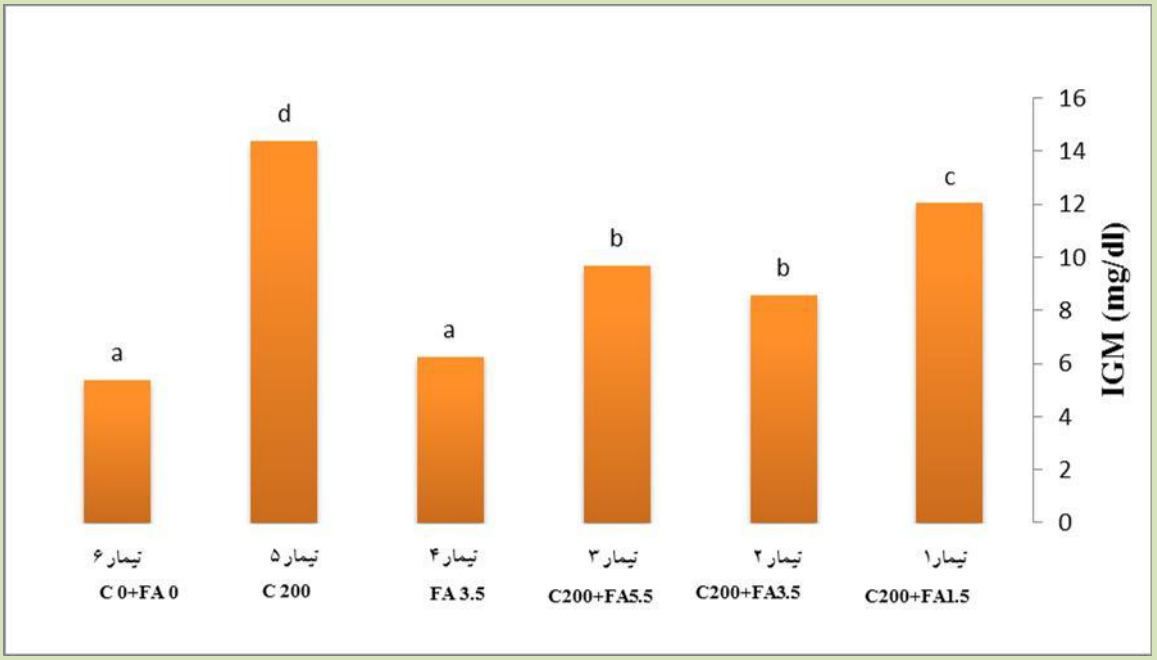
نمودار۳- اثرسطوح مختلف ویتامین های C و اسید فولیک بر میانگین تغییرات هموگلوبین خون در تیمارهای مختلف



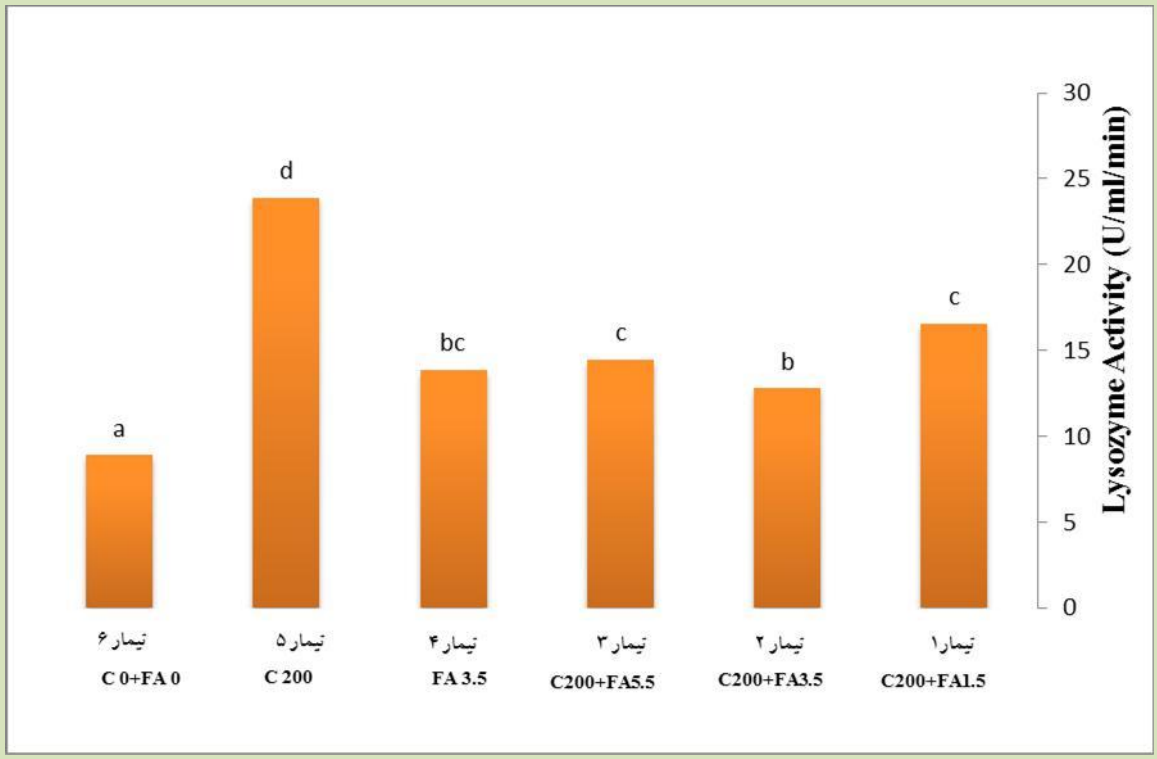
نمودار٤- اثرسطوح مختلف ویتامین های C و اسید فولیک بر میانگین میزان هماتوکریت در تیمارهای مختلف



نمودار۵- اثرسطوح مختلف ویتامین های C و اسید فولیک بر میانگین مقادیر Total Immunoglobulin در تیمارهای مختلف



نمودار٦- اثر سطوح مختلف ویتامین های C و اسید فولیک بر میانگین IgM در تیمارهای مختلف



نمودار۷- اثر سطوح مختلف ویتامین های C و اسید فولیک بر میانگین فعالیت لیزوزیم در تیمارهای مختلف

بحث و نتیجه گیری

مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات ضد نتایج حاصل از بررسی حاضر در انتهای هفته هشتم نشان داد که میزان فاکتورهای خونی تفاوت معنی داری را بین تیمارهای مختلف دارد. بیشترین میزان گلبول قرمز، گلبول سفید، هموگلوبین و هماتوکریت در تیمار ۳(اسید فولیک ۵/۵ + ویتامین C ۲۰۰ میلی گرم) و کمترین میزان آن ها در تیمارهای فاقد اسید فولیک یا با سطح کمتر اسید فولیک دیده شد. بنابراین نقش مثبت اسید فولیک بر روی خون سازی ثابت گردید(۱۰)، هم چنین در تیمارهای ترکیبی روند افزایش پارامترهای خونی نسبت به تیمارهای انفرادی مشاهده شد بنابراین می توان به اندرکنش متقابل مثبتی بین سطوح مختلف اسید فولیک جیره و سطح مطلوب ویتامین C جیره دست یافت. فولات(اسید فولیک) برای حمل گروه های تک کربنه برای واکنش های متیلاسیون و ساخت اسید مورد نیاز است(۱۹). بنابراین کمبود فولات مانع ساخت DNA و تقسیم سلولی می شوند که بیشتر بر روی سلول های خون‌ساز و نئوپلاسما به دلیل تقسیم سلولی سریع اثر می-کند. آنان دریافتند که بیشترین میزان لکوسیت ها، لنفوسیت ها و گلبول های قرمز در گربه ماهی کانال تغذیه شده با جیره ۴/۰ mg/kg اسید فولیک می باشد. هم چنین رگرسیون خطی نشان داد که افزایش در هماتوکریت، RBC، WBC و کاهش MCV با افزایش اسید فولیک جیره غذایی امکان پذیر است(۱۷). Lim and Klesius نیز به تاثیر مثبت اسید فولیک در جیره غذایی ماهی تیلاپیای(*Oreochromis niloticus*) تغذیه شده با سطح ۵ میلی گرم نسبت به ۱ میلی گرم بر روی فاکتورهای خونی، رسیدند(۳۲). در مواردی که کم-خونی ناشی از کمبود ویتامین B_{12} وجود دارد، استفاده از مقادیر بالای اسید فولیک، سلول خونی قرمز را به میزان طبیعی در خواهد آورد(۲۳، ۱۴). گزارش شده است که کمبود اسید فولیک و ویتامین B_{12} به صورت توام سبب کم خونی شدیدی در ماهی روهو(*Labeo rohita* Ham) می شود که نشان می دهد اسید فولیک و ویتامین B_{12}نقش مکمل در سوخت و ساز ماهیان دارند(۳۶).

Butterworth و همکاران وضعیت بیماری "کم خونی" را در گربه ماهی کانالی با کاهش اسید فولیک در غذا در ارتباط می دانند(۱۲). با توجه به نتایج کسب شده مشخص گردید که مقدار کل ایمونوگلوبولین در تیمار ۱ و ۵ از سایر تیمارها به طور معنی داری بیشتر بوده، هم چنین مقدار ایمونوگلوبولین M و فعالیت لیزوزیم در تیمار ۵ به طور معنی داری نسبت به تیمارهای دیگر بیشتر می باشد. کمترین میزان کل ایمونوگلوبولین، ایمونوگلوبولین M و فعالیت لیزوزیم در تیمار شاهد مشاهده شد. عدم حضور ویتامین C و اسید فولیک در جیره غذایی میزان فاکتورهای ایمنی را کاهش می دهد، نتایج نشان داد که فاکتورهای ایمنی در تیمار انفرادی ویتامین C و تیمار ویتامین C با غلظت کم اسید فولیک نتایج بهتری را نشان داد، از این رو در بحث فاکتورهای ایمنی اثر متقابل مثبتی در غلظت بالای اسید فولیک و سطح ثابت ویتامین C دیده نشد. این امر اثر مثبت ویتامین C بر فاکتورهای ایمنی را به اثبات می رساند. مطالعات دیگری نیز اثرات مثبت ویتامین C بر روی فاکتورهای ایمنی را نشان می دهد. از آن جایی که ویتامین C در تولید تولید اسید فولیک به شکل فعال متابولیک تتراهیدروفولیک اسید موثر است(۲۲، ۲۱). با افزایش میزان اسید فولیک جیره، ویتامین C به عنوان یک آگونیست عمل کرده و مسیر سنتز تترا هیدروفولیک اسید را شدت می بخشد که این عمل را با کمک NADPH+ انجام می دهد، بدین صورت که عامل H+ را از NADPH+ گرفته و دی هیدرو فولیک اسید را تبدیل به تتراهیدروفولیک اسید، شکل قابل دسترس ماهی تبدیل می نماید(۳۹). نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که غلظت مناسب اسید فولیک در جیره غذایی بچه ماهی شیپ، نقش بسزایی در رشد و افزایش شاخص های خونی بدن نظیر گلبول قرمز، گلبول سفید، هموگلوبین و هماتوکریت ایفا می کند به طوری که مخلوط ۵/۵ میلی گرم اسید فولیک و ۲۰۰ میلی گرم ویتامین C در جیره موجب افزایش شاخص های خونی می گردد و توصیه می شودکه این مقادیر در جیره غذایی تجاری ماهیان خاویاری اضافه گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله بر خود لازم می دانم از همکاری صمیمانه پرسنل زحمت کش موسسه تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان به ویژه همکاران بخش تکثیر و پرورش آن مرکز در اجرای این تحقیق قدردانی نمایم.

منابع

۱–پروانه، و. ۱۳۷۷. کنترل کیفی و آزمایش های شیمیایی مواد غذایی. انتشارات دانشگاه تهران. چاپ چهارم.

۲–سقا، ح.ر.، سروش نیا. م. ۱۳۸۲. کتاب جامع تجهیزات و فراوردهای آزمایشگاهی. انتشارات کتاب میر. ۲۶۸۷ صفحه.

۳–عامری مهابادی، م. ۱۳۷۸. روش های آزمایشگاهی هماتولوژی دامپزشکی. انتشارات دانشگاه تهران. ۱۲۶ صفحه.

٤–فلاحتکار،ب. ۱۳۸۴. اثرات ویتامین C جیره بر برخی شاخص های هماتولوژیک، بیوشیمیایی و رشددر فیلماهی (*Huso huso*) پایان نامه دکتری تخصصی شیلات، دانشگاه تربیت مدرس نور.۸۶ ص.

۵–فلاحتکار، ب. ۱۳۸۴. ساخت اسید اسکوربیک در سه گون از ماهیان خاویاری (*Acipen seriformes*) و نقش آن در پارامترهای کمی رشد. مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۰، شماره ۱، صفحات ۱۳۷–۱۲۸.

۶–مجابی، ع.، حیدر نژاد، الف. ۱۳۸۲. خون شناسی دامپزشکی و روش های آزمایشگاهی. انتشارات سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی. ۲۱۴ صفحه.

7.Adams, C.R. (1978). Vitamin product forms for animal feeds. In "Vitamin Nutrition Update-Seminar Series 2." RCD 5483/1078. Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, New Jersey.

8.Affonso, E.G., Silva, E.C., Tavares-Dias, M., Menezes, G.C., Carvalho,S.M., Nunes, E.S.S.

(2007). Effect of high level of dietary vitamin C on the blood responses of matrinxa (*Bryconamazonicus*). ComprativeBiochemistry and Physiology, 147; 383-388.
9.Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S., Okamoto, N., Watanabe, T. (2000). Effect of dietary h carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. FisheriesScience, 660; 1068-1075.
10. Bailey, SW., Ayling, JE. (2009). "The extremely slow and variable activity of dihydrofolate reductase in human liver and its implications for high folic acid intake". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(36); 15424–9.
11. Berg, S.L. (1984). Freshwater fishes of the USSR and adjacent countries. Jerusalem, 1;504.
12. Butterworth, C.E., Jr., Plumb, J.A., Grizzle, J.M. (1986). Abnormal folate metabolism in feed related anemia of cultured channel catfish. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 181; 49-58.
13. Chimezie, A., Ibukun, A., Teddy, E., Francis, O. (2008). HPLC analysis of nicotinamide, pyridoxine, riboflavin and thiamin in some selected food products in Nigeria. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2(2); 29-036.
14. Cowey, C. B., Woodward, B. (1993). The dietary requirement of young rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) for folic acid. Journal of Nutrition, 123; 1594–1600.
15. Dabrowski, K. (2001). Ascorbic acid in aquatic organisms. CRC press. Boca Raton, 288p.
16. Duncan, P. L., Lovell, R. T. (1994). Influence of vitamin C on the folate requirement of channel catfish, *Ictalurus punctatus* for growth, haematopoiesis and resistance to *Edwardsiella ictaluri* infection. Aquaculture, 127; 233–244.
17. Duncan, P. L., Lovell, R. T., Butterworth, C. E., Freeberg, L. F., Tamura, T. (1993). Dietary folaterequirement determined for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Journal of Nutrition, 123;1888–1897.
18. Ellis, A.E. (1990). Lysozyme assays. In: techniques in fish immunology. Stolen, J.S., Fletcher, D.P., Anderson, B.S. and Van Muiswinkel, W.B. (eds). SOS Publication, USA, pp.101-103.
19. Figueiredo, JC.; Grau, MV.; Haile, RW.; Sandler, RS.; Summers, RW., Bresalier, RS. (2009). "Folic acid and risk of prostate cancer: results from a randomized clinical trial". Journal of the National Cancer Institute, 101(6); 432–5.
20. Halver, J.E. (1980). The vitamins in ADCP(eds). Fish feed technology, ROMs, FAO, ADCD/REP/80/11-65-1-108P.
21. Halver, J.E. (1998). The vitamins. In: Fish nutrition, Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds). Academic press. 62-141.
22. Halver, J.E. 2002. The vitamins. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds), Fish Nutrition. Academic Press, San Diego, CA, pp.61-141.
23. Hien, D.V., Doolgindachbaporn, S. (2011). Effect of niacin and folic acid in feed rations on growth and live weights of Green catfish (*Mystus nemurus* Valenciennes 1840).
24. Hung .S.S.O. (1991). Hand book of nutrition requirement of finfish, CRS press. 153- 160.
25. Hung, S.S.O., Deng, D.F. (2002). Sturgeon , *Acipenser spp.*, In:Webster, C. D., Lim , C., (Eds.),Nutrient reguirements and feedingof finfish for aquaculture, CABIpublishing , 344 – 357 .
26. Kamen, B. (1997). "Folate and antifolate pharmacology". Seminars in oncology, 24; S18–30–9.
Keefe, T., 2001. Ascorbic acid and stable ascorbate estres as sources of vitamin C in Aquaculture Feeds. ASA Technical Bulletin Vol. AQ48. 1-9.
27. Kashiwada, K., Kanazawa, A., Techima, S. (1971). Studies on the productio of B vitamins by intestinal bacteria of carp. Mem. Fac. Fish. Kagoshima, 20; 185–189.
28. Khoshbavar-Rostami, H.A., Soltani, M., Hassan, H.M.D. (2007). Immune responses of great sturgeon (*Huso huso*) to Aeromonas hydropholia bacterin. Journal of Fish Biology, 70; 1931-1938.
29. Klontz, G.W. (1994). Fish hematology. In: Techniques in fish immunology. Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Rowley, A.F., Kelikoff, T.C., Kaatari, S.L. and Smith S.A. (eds). Vol. 3. SOS Publications, Fair Haven, New Jersey, USA.pp.121-132.
30. Lee, K-J., Dabrowski, K. (2003). Intraction between vitamins C and E affects their tissue concentrations, growth, lipid oxidation, and deficiency symptoms in yellow perch(*Perca flavescens*). Br J Nutr, 89; 89e596.
31. Lim, C., Klesius, P.H. (2001). Influence of dietary levels of folic acid on growth response and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*to *Streptococcus iniae*. In: Sixth Asian Fisheries Forum Book of Abstracts (ed. by S.C. Chen, R.J. Kuo, C.T.Wu, P.C. Wang & F.Z.

Su), p. 150 Asian Fisheries Society, Kaohsiung, Taiwan.
32. Lim, C., Webster, C. (2001). Nutrition and fish Health. Food Products Press (impact of the Haworth Press Inc.). New York, pp. 1-365.
33. Lin, Y.H., Lin, H.Y., Shiau, S. Y. (2011). Dietary folic acid requirment of grouper, *Epinephelus malabaricus,* and its effects on non-specific immune responses. Aquaculture, 317; 133-137.
34. Maeland, A., Waagbo, R. (1998). Examination of the qualitative ability of some cold water marine teleosts to synthesise ascorbic acid. Comp. Biochem. Physiol., 121; 249-255.
35. Mahajan, C.L., John, M.J. (1979). The physiological response of fishes to a deficiency of cyanocobalamin and folic acid. Journal of Fish Biology, 14; 127-133.
36. Moreau, R., Kaushik, S. J., Dabrowski, K. (1996). Ascorbic acid status as affected by dietary treatment in the Siberian sturgeon*(Acipenser baeri)*: tissue concentration , mobilization and L-gulonolactone oxidase activity. Fish Physiology And Biochemistry, 15; 431-438.
37. Moreau, R., Dabrowski, K., Sato, P. H. (1999). Renal L-gulono- 1, 4- lactone oxidase activity as affected by dietary ascorbic acid in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). Aquaculture, 180; 250-257.
38.NRC (National Research Council). (1993). Nutrient requirements of fish. National Academy Press, Washington, DC, USA.
39. Osborne, MJ., Schnell, J., Benkovic, SJ., Dyson, HJ., Wright, PE. (2001). "Backbone dynamics in dihydrofolate reductase complexes: role of loop flexibility in the catalytic mechanism". Biochemistry, 40(33); 98, 46–59.
40. Papp, Zs. Gy., Saroglia, M., Jeney. Zs., Jeney, G., Terova, G. (1999). Effects of dietary vitamin C on tissue ascorbic and collagen status in stutrgeon hybrids*(Acipenser ruthenus* × *Acipenser baeri)*. J.Appl. Ichthyol, 15; 258-260.
41. Shafaeipour,A. (2011). Effects of different levels of folic acid and vitamin C on Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J.Appl. Ichthyol, 32;45-55.
42. Shiau, S. Y., Huang, S. L. (2001). Dietary folic acid requirement for maximal growth of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. Aquaculture, 20;657-668.
43. Shiau,S-Y, Hsu, T-S. (1999). Quantification of vitamin C requirement for juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus*×*Oreochromis aureus*, with L-ascorbyl-2-monosulphate-Na and L –ascorbyl -2 – mono phosphate-Mg. Aquaculture, 17; 317e26.
44. Shiau, S. Y., Huang, S. Y. (2001a). Dietary folic acid requirement for maximum growth of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. Fisheries Science, 67; 655–659.
45. Shiau, S. Y., Huang, S. Y. (2001b). Dietary folic acid requirement determined for grass shrimp, *Penaeusmonodon*. Aquaculture, 20;339–347.
46. Siwicki, AK., Anderson, DP. (1993). Immunostimulation in fish: measuring the effects of stimulants by serological and immunological methods. Abstract symposium on fish immunology, Lysekil, Sweden.
47. Sokolov, L.I., Vasilier, V.P. (1989). *Acipenser nudiventris* Lovetsky, In: J. Holeik (ed). The fresh water fishes of Europe, Vol. 1, part II, General introduction to fishes. Acipenseriformes, AULA – verlag, wewsbaden, 206-226.
48. Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M. J., Montero, D., Robaina, L., Real, F. (2007). Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)fed mannan oligosaccharides. *Fish and Shellfish Immunology,* 23; 969-981.
49. Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M. J., Montero, D., Gines, R., Sweetman, J. (2010). Improved feed utilization, intestinal mucus production and immune parameters in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). *Aquaculture Nutrition*, 56; 65-69.
50. Verlhavc, V., Gabaudan, J., Obach, A., Schuep, W., Hole, R. (1996). Influence of dietary glucan and vitamin-c on nonspecific and specificimmune-responses of rainbow-trout(*Oncorhynchus Mikiss*). *Aquaculture*, 143(2); 123-133.

Effects Dietary Vitamin C and Folic Acid on Growth Performance, Hematological and Immunological Parameters of Juvenile Barbel Sturgeon *Acipenser nudiventris*

M. Naderi[1]; **H. Khara**[1], M. A.Yazdani Sadati[2]

1. Department of Fishery, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran. **h.khara1974@yahoo.com**

2.Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), International Sturgeon Research Institute, Rasht, Iran.

Received:2016.13. 3 **Accepted: 2017. 28. 1**

Abstract

Inroduction & Objective: This study was conducted to evaluate the effects of dietary vitamin C and Folic Acid on hematological and immunological parameters in juvenile Barbel sturgeon *Acipenser nudiventris*.

Material and Method: Six practical diets were formulated as follow; control: without supplementation, T_1; 200 mg ascorbic acid (AA), T_2: 3.5 mg Folic Acid (FA), T_3: 200 mg AA + 1.5 mg FA, T_4: 200 mg AA + 3.5 mg FA and T_5: 200 mg AA + 5.5 FA equivalent kg^{-1} diet. Each diet was fed to triplicate groups of juvenile Barbel sturgeon with initial body weight of 32 g in 785-L cylindrical fiberglass tank.

Results: White blood cell (WBC), red blood cell (RBC), haematocrit (Ht), haemoglobin (Hb), lymphocyte and MCV were significant. But total immunoglobulin (Ig) and IgM concentrations had significant differences between treatments. The activity of serum lysozyme was significantly influenced by the dietary AA and FA, fish fed the basal diet had lower lysozyme.

Conclusions: These results indicated that dietary vitamin C and folic acid (200 mg AA + 3.5 mg AF) did significantly influence on hematological and immunological parameters in juvenile Barbel sturgeon.

Keywords: *Acipenser nudiventris*, Vitamin C, Growth, Immun system, Hematological parameters