

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

محمودرضا ابراهیم‌نژاد^۱، چی رس بن سعد^{۲*}، عبدالمحمد عابدیان کناری^۳

چکیده

این تحقیق به منظور تعیین تأثیر سطوح مختلف فسفولیپیدها (PL) phospholipids 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 33.3 g/dl بود. تفاوت معنی‌داری 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 11.07 (cells/l) و کمترین در تیمار D1 بمیزان 0.86 (cells/l) مشاهده گردید. بالاترین و پائین‌ترین میزان درصد هماتوکریت به ترتیب (تیمار D3) و (تیمار D1) بمیزان $26/33$ و $25/00$ ٪ بود. بالاترین و پائین‌ترین میزان میانگین حجم گلبول به ترتیب (تیمار D1) و (تیمار D2) بود. همچنین اندازه گیری گلبول‌های سفید خون فیل ماهی مانند لنفوسیت‌ها، 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 $71/67$ ٪ و $3/67$ ٪ بدست آمد. در حالی که بالاترین میزان نوتروفیل، ائوزینوفیل ماهیان در تیمار D1 و D4 بمیزان $21/33$ درصد و $8/33$ درصد بوده است. در نتیجه این تحقیق نشان داد اضافه کردن فسفولیپیدها در رژیم غذایی می‌تواند تأثیر قابل توجهی در برخی از فاکتورهای 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 آبی‌پروری، اداره کل شیلات مازندران، بابلسر، ایران

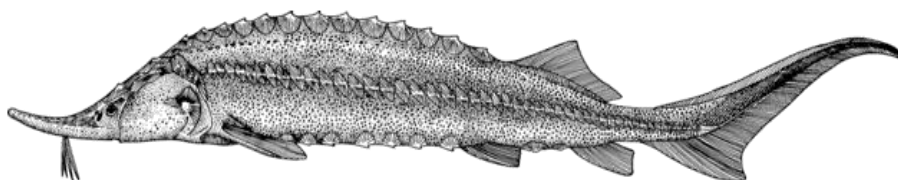
۲- گروه آبی‌پروری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پوترا مالزی، استان سردانگ، مالزی (نویسنده مسؤول)

Cheroos.saad@gmail.com

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

۱- مقدمه

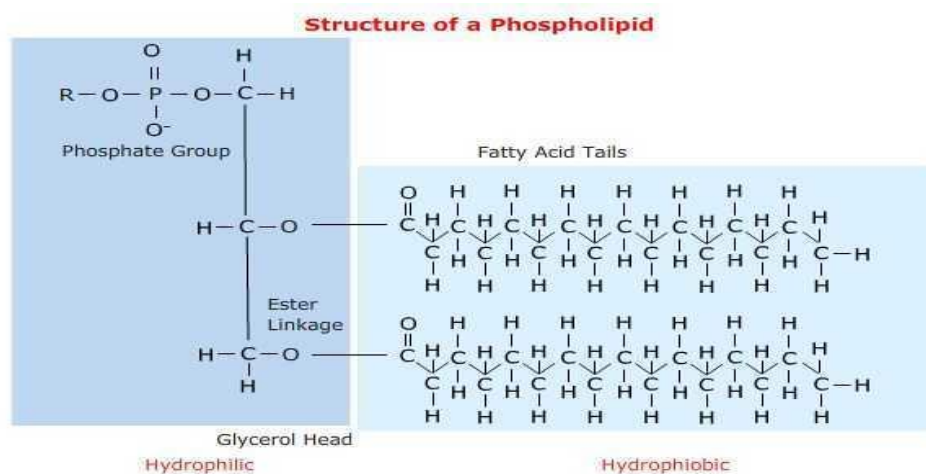
ماهیان خاویاری از خانواده Acipenseridae که از صد میلیون سال پیش در دوره ژوراسیک می‌زیستند. این ماهیان به عنوان فسیل زنده معروف بوده که از زمان‌های دور با تکامل نژادی تا این زمان باقی مانده‌اند. ماهیان خاویاری از ۲۷ گونه و زیر گونه تشکیل شده اند که ۶ گونه از آن مختص دریای کاسپین می‌باشد (حدود ۹۳٪ از ماهیان 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 می‌باشد. بلوگا در جنوب دریای کاسپین از جمعیت زیادی برخوردار می‌باشد. با وجود دارا بودن دهان بزرگ نسبت به گونه‌های دیگر متمایز است. علاوه بر این پره‌های 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 رودخانه‌ها بزرگترین تحدید برای نابودی نسل این ماهی می‌باشد. این فعالیت‌های غیرمجاز موجب نابودی مولدینی که برای تکثیر به سمت رودخانه حرکت می‌کنند می‌گردد. 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 می‌نماید. 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. در این راستا یکی از بیشترین هزینه نهاده‌های تولید تامین خوراک این گونه ماهیان می‌باشد. لذا تامین خوراک با کیفیت از نقش و اهمیت بسزایی در توجیه اقتصادی تولید این گونه برخوردار می‌باشد. در تهیه خوراک یکی از منابع مهم تأمین انرژی چربی می‌باشد که از منابع روغن ماهی در سطح وسیع استفاده می‌گردد (Caballero et al., 2002).

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 می‌باشد (Tocher, 2003).



شکل ۲. ساختار فسفولیپیدها

در اوایل دهه ۱۹۸۰ تحقیقاتی درخصوص جایگزین کردن غذاهای زنده برای لارو ماهی‌های دریایی انجام شده است (Kanazawa *et al.*, 1985) مشاهده کردند فسفولیپیدها برای رشد و بقا لارو مانند ها *Ayu (Plecoglossus altivelis)* و ماهی دریایی (*Pagrus*) مناسب می‌باشد. تأثیر سطوح مختلف فسفولیپیدها (PL) بر رشد بچه ماهیان خاویاری (فیل-هوسو) 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 بر روی برخی از پارامترهای خونی بچه ماهی فیل موثر می‌باشد؟ و چه سطحی از فسفولیپید در رژیم غذایی این ماهی اثر مفید یا مضر دارند؟

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 گردید ۱۲ تانک فایبرگلاس (۴ تیمار و ۳ تکرار) هر کدام به ظرفیت ۲۰۰ لیتر تهیه گردید. ابتدا تانک‌ها بوسیله هیپوکلرید سدیم ضدعفونی شده و تعداد ۷۲۰ قطعه بچه ماهی فیل با میانگین وزن $4/5 \pm 0/1$ 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٪ و ۲۱ کیلوژول بر گرم انرژی خام و با اضافه کردن رژیم غذایی فسفولیپید سویا تصفیه شده از شرکت برگا پور در چهار سطح ۰، ۲، ۴، ۶ درصد با کاهش روغن سویا انجام گردید.

جدول ۱. ترکیب رژیم غذایی و آنالیز بیوشیمیایی غذایی کنستانت‌تره 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 کنستانت‌تره				
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
(kJ g^{-1}) انرژی خام	۲۱/۰۱	۲۱/۱۸	۲۱/۱۰	۲۱/۲۳

- 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 غذای گردید.

شکل ۳. ترکیب فسفولیپید

Phospholipids complex contains	(%)
Phosphatidylcholine	۲۲-۲۴
phosphatidylinositol	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 پودر گل میخک بمیزان ۳۰ ppm 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

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

سلول های قرمز خون (گلبول قرمز) و سلول های 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 شاخص های خونی دیگر مانند (MCV, MCH, MCHC) از فرمول زیر به روش (Dacie and Lewis, 2001) بهره برداری شد.

$$i) \text{ MCV (nm}^3) = \text{Hct (\%)} \times 10 / \text{RBC (} 10^6 \text{ mL)}$$

$$ii) \text{ MCH (pg cell}^{-1}) = \text{Hb (g L}^{-1}) / \text{RBC (} 10^6 \text{ mL)} \times 10$$

$$iii) \text{ MCHC (g dL}^{-1}) = \text{Hb (g dL}^{-1}) / \text{Hct (\%)}$$

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($\times 10^6$ cell/ μ l)	0.86 \pm 0.12 ^a	1.07 \pm 0.07 ^a	1.04 \pm 0.09 ^a	1.01 \pm 0.05 ^a
Hct (%)	25.00 \pm 1 ^a	26.00 \pm 1.53 ^a	26.33 \pm 1.20 ^a	26.00 \pm 1.53 ^a
Hb (g/dl)	7.67 \pm 0.24 ^a	8.64 \pm 0.44 ^a	8.57 \pm 0.62 ^a	8.57 \pm 0.52 ^a
MCH (pg)	92.57 \pm 12.03 ^a	77.27 \pm 9.41 ^a	84.83 \pm 13.21 ^a	85.10 \pm 7.71 ^a
MCV (fl)	300.83 \pm 35.64 ^a	232.60 \pm 30.25 ^a	259.57 \pm 33.51 ^a	258.60 \pm 24.23 ^a
MCHC (g/dl)	30.70 \pm 0.38 ^b	33.30 \pm 0.87 ^a	32.43 \pm 0.90 ^{ab}	32.90 \pm 0.38 ^{ab}
WBC (cell/ μ l)	23500 \pm 1171.89 ^a	25866.67 \pm 845.25 ^a	22633.33 \pm 1266.67 ^a	23000 \pm 901.85 ^a

تفاوت معنی داری 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

سطوح مختلف از خود نشان نداده است ($P \geq 0/05$). تغذیه ماهیان با رژیم غذایی D2 (2% PL) بمیزان 33/3 گرم بر دسی لیتر بیشترین میزان MCHC را نشان داد. در اندازه‌گیری از گلبولهای سفید خون فیل ماهی در استفاده از سطوح مختلف فسفولیپید هیچگونه تفاوت معنی‌داری ($P \geq 0/05$) مشاهده نگردید، اما بیشترین میزان در لمفوسیتس، نیتروفیل، منوسیتس و ائوزینوفیل بترتیب در D1، D2، D3 و D4 نشان داده شده است (جدول شماره 3).

۵- بحث و بررسی

فاکتورهای خونی یکی از معیارهای فیزیولوژی در یک موجود زنده می‌باشد، بنابراین این فاکتورها می‌توانند تحت تأثیر رژیم غذایی قرار گیرند (Klinger et al. 1996; Kumar et al. 2005; Waagb et al. 1998). یکی از محققان تأثیر استرس‌های مختلف را بر روی فاکتورهای خونی مطالعه نمودند. یکی از تحقیقات انجام شده توسط (Silveira-Coffiny et al., 2004) و همکاران در سال 2004، تأثیر استرس‌های 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 نیتريت 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 2% 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 بارزش 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

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 اضافه کردن فسفولیپیدها در رژیم غذایی می‌تواند تأثیر قابل توجهی در برخی از فاکتورهای 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 *Acipenseridae*, Azad University, pp: 59-157.

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 dietary carbohydrate on hematology, respiratory 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.

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.