شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۶۹، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵

صفحات ۳۲۲-۳۰۹

اثر مکمل غذایی آستاگزانتین بر پاسخ استرس تراکم و عملکرد ماهی طلال *(Rastrelliger kanagurta)*

پریا اکبری*[۱] فاطمه ربانی‌نژاد[۲]

۱. *استادیار گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران*

۲. *دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۲۷ تاریخ تصویب:۱۳۹۵/۸/۱۵

چکیده

تحقیق حاضر به‌منظور بررسی اثر سطوح غذایی آستاگزانتین بر عملکرد تولید و مقاومت در برابر استرس تراکم ماهی طلال صورت گرفت. در این مطالعه، تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی طلال با میانگین وزنی ۰/۰۱±۷/۱۴ گرم در یک طرح کاملا تصادفی با ۴ تیمار آزمایشی و ۳ تکرار (با تعداد ۱۰ قطعه در هر تکرار) که شامل تیمار آزمایشی شاهد (بدون استفاده از آستاگزانتین) و در تیمارهای آزمایشی ۲، ۳و ۴ میزان استفاده از این مکمل به ترتیب ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا بود مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از ۶۰ روز تغذیه، هر تیمار در معرض استرس تراکم به‌مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که ۲۴ ساعت بعد از شروع استرس تراکم، افزایش معنی‌داری در میزان پروتئین و فعالیت لیزوزیم و کاهش معنی‌داری در فعالیت آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینو ترانسفراز (به استثنای تیمار ۴) درتیمارهای حاوی آستاگزانتین در مقایسه با تیمار کنترل مشاهده شد ($P<0/05$). ۲۴ ساعت بعد از شروع استرس تراکم، کمترین میزان کورتیزول و گلوکز در تیمار ۳ مشاهده شد که با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری داشت ($P<0/05$). بالاترین وزن نهایی، ضریب رشد ویژه، شاخص وضعیت و غذای دریافتی وکمترین ضریب تبدیل غذا در تیمار ۲ و ۳ مشاهده شدکه با تیمار شاهد دارای تفاوت معنی‌دار بود ($P<0/05$). در مجموع بر اساس نتایج این تحقیق، افزودن ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مکمل غذایی آستاگزانتین به جیره غذایی ماهی طلال به‌منظور بهبود شاخص‌های رشد و مقاومت در برابر استرس پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: ماهی طلال، آستاگزانتین، استرس، آلانین آمینو ترانسفراز، کورتیزول.

* نویسنده مسوول: تلفن: ۹۸۵۴۳۱۲۷۲۳۴۰۰ + ایمیل: paria.akbary@gmail.com

۱. مقدمه

صنعت آبزی‌پروری جهانی از دو دهه گذشته تاکنون رشد قابل توجهی داشته و در تامین پروتئین مورد نیاز جامعه نقش مهمی را ایفاء می‌کند. آبزی-پروری متراکم که مبتنی بر تغذیه دستی است، به-صورت روز افزون در حال گسترش است. ایران نیز از جمله کشورهایی است که طی دهه گذشته بیشترین میزان رشد آبزی‌پروری را در جهان داشته است (Tafi *et al.*, 2013). لذا بهبود شناخت ما از احتیاجات غذایی گونه ماهی و میگو و تقویت سیستم ایمنی آن‌ها در برابر استرس ناشی از تراکم بالا در افزایش تولیدات آبزی‌پروری نقش مهمی داشته است (Liu *et al.*, 2016).

استرس حاصل از تغییرات ناگهانی تراکم، درجه حرارت، اکسیژن، دستکاری، حمل و انتقال، عفونت‌های ویروسی و باکتریایی و کیفیت نامطلوب مواد غذایی منجر به‌هم زدن تعادل فیزیولوژیکی بدن موجودات زنده با محیط زندگی آن‌ها شده که در نهایت باعث تهدید سلامت و رشد ماهی می‌گردد (Wendelaar Bonga, 1997). استرس بیش از اندازه منجر به تضعیف سیستم ایمنی، اختلال عملکرد فیزیولوژیکی، افزایش احتمال ابتلا به بیماری و درنهایت مرگ موجود می‌شود (Jeney *et al.*, 1997).

وضعیت تغذیه‌ای یکی از عوامل موثر بر توانایی موجود در مقابله با عوامل بیماری‌زا محسوب می‌شود. از آن‌جایی‌که ماهیان همانند دیگر حیوانات قادر به سنتز کارتنوئیدها در بدن خود نیستند لذا نیاز آن‌ها از طریق رژیم غذایی‌شان تأمین می‌شوند. کارتنوئید-هانقش مهمی در سلامت موجودات، از طریق خنثی سازی رادیکال‌های آزاد تولیدی ناشی از فعالیت طبیعی سلول‌ها و استرس‌های محیطی وارد بر آن‌ها ایفاء می-کنند (Chew *et al.*, 1999). آستاگزانتین (3/3 dihydroxy- diketo-B,B- carotene) مهم‌ترین رنگدانه کارتنوئیدی موجود درحیوانات آبزی است (Guerin *et al.*, 2003). این رنگدانه یک ریز مغذی اصلی و مهم در جیره غذایی آبزیان محسوب می‌شود که عملکردهای زیستی مهمی از جمله جلوگیری از اکسید شدن اسیدهای چرب غیر اشباع را به عهده دارد (Hussein *et al.*, 2006). اخیراً از رنگدانه‌ها به‌منظور بهبود سطح ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی و رشد در آبزی‌پروری استفاده شده است (Liu *et al.*, 2016).

ماهی طلال با نام علمی *Rastrelliger Kanagurta* از جمله ماهیان استخوانی با ارزش جهان و متعلق به خانواده تن ماهیان، از گسترده‌ترین گونه‌ها در سراسر جهان می‌باشد. اغلب در آب‌های گرم با حداقل دمای ۱۷ درجه سانتی‌گراد زندگی و پراکنش این ماهی در سواحل غربی اقیانوس آرام، هند، مالزی، فیلیپین، آفریقای جنوبی، شرق مدیترانه، خلیج فارس و دریای عمان و غیره می‌باشد (Nazan *et al.*, 2008). هر گونه فعالیت علمی در جهت کاهش مشکلات موجود در روند حفظ ذخایر این گونه ارزشمند از اهمیت بالایی برخوردار است، چرا که نتیجه آن به‌طور مستقیم در افزایش تولید پروتئین حیوانی و رونق بیشتر آبزی‌پروری در دنیا متجلی خواهد شد (Hasan, 2002).

تحقیقات متعدد نقش آستاگزانتین بر رشد میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) (Ahmadi *et al.*, 2008)، فیل ماهی (*Huso huso*) (Farhangi *et al.*, 2013)، ماهی آزاد اطلس (*Salmo salar*) (Christiansen *et al.*, 1994)، گربه ماهی زرد (*Pelteobagrus fulvidraco*) (Liu *et al.*, 2016) و قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (Rehulka, 2000) و پارامترهای بیوشیمیایی خون در مواجهه با استرس میگوی پاسفید غربی (Merchie *et al.*, 1998; Farhangi *et al.*, 2013) ، قزل‌آلای رنگین کمان (Nakano *et al.*, 1999) و گربه‌ماهی زرد (Liu *et al.*, 2016) را تایید می‌نماید. به‌عنوان مثال، Liu و همکاران (۲۰۱۶) با بررسی اثر آستاگزانتین روی رشد و مقاومت در برابر استرس در گربه‌ماهی زرد گزارش کردند که استفاده از ۸۰ میلی‌گرم آستاگزانتین در هر کیلوگرم جیره غذایی ماهی گربه‌ماهی زرد تاثیر معنی-داری بر روی شاخص‌های رشد ایجاد نکرد. در حالی‌که منجر به افزایش معنی‌دار میزان پروتئین سرم و کاهش معنی‌دار فعالیت لیزوزیم، گلوکز، آلانین آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و آسپارتات آمینو ترانسفراز بعد از مواجهه با تنش تراکم در مقایسه با گروه شاهد شد. هم‌چنین تحقیق انجام شده توسط

Nakano و همکاران (۱۹۹۹) نشان داد که استفاده از مخمر قرمز (*Phaffia rhodozyma*) (سرشار از آستاگزانتین) در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان منجر به کاهش معنی‌داری میزان فعالیت آلانین آمینو ترانسفراز، اسپارتات آمینو ترانسفراز در در طول استرس در مقایسه با گروه کنترل گردد.

ماهیان پرورشی در محیط اسارت از شرایط طبیعی بیولوژیکی و فیزیکی وشیمیایی مطلوب زندگی بهره‌مند نبوده و محکوم به ادامه زندگی در شرایط موجود می‌باشند که نامساعد بوده و باعث کاهش مقاومت بدن آن‌ها در برابر بیماری‌های گوناگون می‌شود لذا به نظر می‌رسد که استفاده از آستاگزانتین می‌تواند نقش مهمی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، تنظیم پاسخ ایمنی و مقاومت در برابر بیماری داشته باشد (Liu *et al.*, 2016). از آن‌جایی‌که گزارشات کمی در زمینه اثر آستاگزانتین بر ایمنی غیر اختصاصی و فاکتورهای بیوشیمیایی خون آبزیان در مواجهه با استرس‌های محیطی صورت گرفته است. لذا این تحقیق، به بررسی اثر آستاگزانتین بر رشد و مقاومت در مواجهه با تنش تراکم در ماهی طلال می‌پردازد.

۲. مواد و روشها

۱.۲. ماهی

این پژوهش در اواخر آذرماه ۱۳۹۴ در کارگاه تکثیر و پرورش ماهی موسسه تحقیقات شیلات چابهار انجام شد. ۱۲۰ قطعه ماهی طلال از سواحل چابهار به‌کمک صیاد توسط تور پره صید و به محل آزمایش، انتقال داده شد.

۲.۲. طراحی آزمایش و شرایط تغذیه

پس از طی مرحله سازگاری به‌مدت دو هفته و اطمینان از سلامتی آن‌ها، ماهی‌ها با میانگین وزنی ۷/۱۴±۰/۰۱ گرم و میانگین طولی ۴/۷۸±۰/۷۸ سانتی‌متر شمارش شده و با تراکم ۱۰ قطعه به ۱۲ مخزن ۶۰ لیتری منتقل شدند. در طول دوره، پارامترهای آب اندازه‌گیری شد. به‌طور میانگین در کل دوره درجه حرارت آب ۱/۳۴±۲۸/۸درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۰/۸۲± ۶/۹۵ میلی‌گرم بر لیتر و pH آب ۷/۵±۰/۳ بود. در طی دوره آزمایش نوری به‌صورت ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت: بود. به‌منظور هوادهی و نیاز اکسیژن ماهی‌ها به هر یک ازمخزن‌ها یک سنگ هوا که به منبع هواده متصل بود نصب گردید. تیمار ۱ به‌عنوان گروه شاهد تنها از غذای کنسانتره (ساخت شرکت ۲۱ بیضاء شیراز) استفاده نمود بقیه تیمارها به‌ترتیب با ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا تغذیه شدند. ابتدا مقدار غذا را برای کل دوره ۸ هفته برای هر تیمار محاسبه شد، سپس سطوح مشخص آستاگزانتین تهیه شده از شرکت نانوشیمی یاخته تهران که از جلبک (*Haematococcus pluvialis*) با درجه خلوص ۱/۵ درصد تهیه و جداسازی شده بود را به‌همراه ۷۵ میلی‌لیتر امولسی‌فایر Tween 80 (Sigma Aldrich, USA) و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب به سطح غذا اسپری شدند. پس از ۴۸ ساعت جیره های خشک جمع‌آوری و در نایلون های مجزا در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (شکل۳-۴) . تیمار شاهد تنها با ۷۵ میلی‌لیتر امولسی فایر و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب اسپری گردید (Merchie *et al.*,1998). پس از تهیه جیره‌های غذایی میزان رطوبت، خاکستر، پروتئین خام و چربی خام به‌روش استاندارد تعیین شد (Peterson *et al.*, 1999) (جدول ۱).

برای تعیین میزان غذای روزانه، ابتدا وزن توده زنده (بیوماس) هر مخزن محاسبه گردید. بیوماس از حاصل‌ضرب متوسط وزن ماهی‌های موجود در هر مخزن در تعداد ماهی به‌دست آمد و با تقسیم ۳ درصد بیوماس بر عدد ۲ (تعداد وعده‌های غذایی) (۸ صبح و ۱۶ عصر) مقدار غذایی که در هر وعده در اختیار ماهی‌های هر مخزن قرار گرفت محاسبه شد. در زمان غذا-دهی، ارتفاع آب را به ۸ سانتی‌متر رسانده و به‌مدت ۲۰ دقیقه سطح آب را در همین ارتفاع نگه داشته (سهولت دسترسی ماهی‌ها به مواد غذایی) و پس از ۲۰ دقیقه سطح آب تا ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر بالا برده شد. به‌منظور خروج بقایای مواد غذایی و دفعی هر روز یک‌بار قبل از غذادهی کف مخزن‌ها سیفون شد تلفات هر مخزن، روزانه شمارش و ثبت گردید.

جدول۱. ترکیب شیمیایی تیمارهای غذایی (میانگین± خطای معیار) مورد آزمایش

ترکیب تقریبی(٪)	تیمارهای غذایی (میلی‌گرم آستاگزانتین به ازای هر کیلوگرم جیره)			
	۰	۵۰	۱۰۰	۱۵۰
پروتئین خام	۴۳/۳۸±۲/۲۴	۴۳/۲۰±۴/۳۶	۴۲/۹۲±۳/۵۲	۴۳/۲۳±۵/۴۳
چربی خام	۱۲/۱۴±۰/۷۰	۱۲/۵۱±۰/۸۷	۱۲/۱۱±۰/۳۹	۱۲/۴۷±۰/۷۹
خاکستر خام	۱۱/۲۱±۰/۱۷	۱۲/۰۱±۰/۵۰	۱۱/۹۳±۰/۳۶	۱۱/۹۸±۰/۱۶
رطوبت	۷/۲۱±۰/۷۳	۶/۷۸±۰/۶۱	۶/۶۰±۰/۶۵	۶/۷۸±۰/۴۸

۳.۲. زیست سنجی و بررسی پارامترهای رشد و تغذیه

به‌منظور اندازه‌گیری شاخص‌های رشد، در انتهای آزمایش، وزن (با دقت۰/۰۱ گرم) و طول (با دقت ۱ میلی‌متر) ماهی‌های هر مخزن ثبت گردید. با استفاده از داده‌های حاصل از زیست سنجی‌ها، افزایش وزن بدن، ضریب رشد ویژه، شاخص وضعیت (Bai, 2001)، ضریب تبدیل غذایی (Lim et al., 2000)، نسبت بازدهی پروتئین و درصد بقاء (Wahli et al., 2003) تعیین شد.

وزن نهایی (Ln) = ضریب رشد ویژه (درصد بر روز)
× طول دوره پرورش / (وزن اولیه (گرم) Ln -(گرم)
۱۰۰

/غذای مصرف شده (گرم) = ضریب تبدیل غذایی
افزایش وزن به‌دست آمده (گرم)

افزایش وزن به‌دست آمده = نسبت بازدهی پروتئین
میزان پروتئین مصرفی (گرم)/(گرم)

طول (سانتی /وزن مرطوب (گرم) =شاخص وضعیت
۱۰۰ ×۳(متر))

(وزن اولیه =افزایش وزن به‌دست آمده (درصد)
۱۰۰ × وزن اولیه /(گرم) -وزن نهایی (گرم))

۱۰۰× تعداد /تعداد اولیه ماهی =نرخ بقاء (درصد)
نهایی ماهی

۴.۲. مواجهه با تنش تراکم

در روز ۶۰ آزمایش، بعد از زیست سنجی تراکم ماهی در هر مخزن به ۳۰ قطعه در هر تکرار رسید (ماهی‌های موجود در یک تکرار هر تیمار به دو مخزن دیگر انتقال داده شد). سپس پس از ۲۴ ساعت به منظور تعیین فاکتورهای بیوشیمیایی خون و ایمنی غیر اختصاصی نمونه‌برداری صورت گرفت (Oliveira et al.,2012).

۵.۲. خون‌گیری از ماهی

برای سنجش پارامترهای بیوشیمیایی (گلوکز، پروتئین تام، آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینوفسفاتاز و اسپارتات آمینو فسفاتاز) و ایمنی غیر اختصاصی (لیزوزیم) قبل و ۲۴ ساعت بعد از استرس تراکم، به‌صورت تصادفی از ۹ قطعه ماهی هر تیمار پس از بیهوشی با عصاره گل میخک (۲ گرم بر لیتر) خون‌گیری از قلب با استفاده از سوزن و سرنگ صورت گرفت و سپس برای جلوگیری از همولیز شدن خون هنگام ریختن آن در میکروتیوب ۲ میلی‌لیتر ، سوزن از سرنگ جدا شد. پس از آن سرنگ حاوی خون وارد میکروتیوب مورد نظر شد و از جداره میکروتیوب خون در داخل آن ریخته شد سپس با دور ۳۰۰۰ بر دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ (Hettich مدل DV200، ساخت کشور ژاپن) و سرم آن جدا گردید و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Harikrishnan et al., 2012).

۶.۲. تعیین برخی فاکتورهای بیوشیمیایی خون

مقدار پروتئین سرم با استفاده از کیت تشخیصی شرکت پارس آزمون مورد سنجش قرار گرفت. در داخل یک لوله آزمایش، میزان ۱/۹ میلی‌لیتر از محلول ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم و ۰/۱ میلی‌لیتر سرم خون و در داخل لوله آزمایش دیگر ۱/۹ میلی‌لیتر از محلول ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم و ۰/۱ میلی‌لیتر استاندارد (۸ گرم بر دسی‌لیتر آلبومین سرم گاویرا در کلرید سدیم ۰/۸۵ درصد تهیه کرده) ریخته شد. همچنین به‌منظور تهیه

بلانک، ۲ میلی‌لیتر از محلول ۰/۸۵درصد کلرید سدیم را در یک لوله آزمایش دیگر ریخته و ۵ میلی‌لیتر معرف بیوره (۳ گرم سولفات مس، ۱۲ گرم تارتارات مضاعف سدیم- پتاسیم را در یک لیتر آب مقطر حل کرده) را به هر یک از لوله‌ها اضافه و مخلوط گردید و سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در حرارت آزمایشگاه قرار گرفت و جذب نوری لوله های نمونه و استاندارد را در مقابل بلانک در طول موج ۵۵۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (WPAS2000-UV/VIS, Cambridge, UK) قرائت شد. و میزان پروتئین بر حسب گرم بر دسی‌لیتر محاسبه گردید (Burtis et al., 1994).

برای سنجش گلوکز، لوله نمونه یا استاندارد محتوی ۱۰ میکرولیتر به‌همراه ۱۰۰۰ میکرولیتر آنزیمی، (توسط آنزیم گلوکز اکسیداز و پراکسیداز) و لوله بلانک محتوی ۱۰ میکرولیتر به‌همراه ۱۰۰۰ میکرولیترآماده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۳۷° درجه سانتی‌گراد قرارگرفته و در ادامه جذب نوری لوله‌های تست و استاندارد در طول موج ۵۲۰ نانومتر در مقابل بلانک قرائت گردید (Trinder, 1969).

میزان کورتیزول بر اساس روش توصیه شده توسط Pickering و Pottinger (۱۹۸۳) صورت گرفت. کیت سنجش کورتیزول از شرکت پادگین طب خریداری شد. در این روش ۱۰۰ میکرولیتر از سرم با ۴۰۰ میکرولیتر اتانول به‌خوبی مخلوط گردید سپس با دور ۳۰۰۰ بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس ۳۰۰ میکرولیتر مایع رویی مخلوط به‌همراه ۵۰ میکرولیتر کورتیزول حل شده در اتانول به لوله پلی پروپیلن (۳/۵ میلی‌لیتر) منتقل شد و تحت شرایط خلاء در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد الکل آن تبخیر گردید و ۱۰۰ میکرولیتر آلبومین سرم گاوی (۱ درصد آلبومین سرم گاوی و ۹ درصد نمک) و آنتی‌سرم (آنتی سرم خرگوش به همراه ۲۱ کورتیزول تری‌گلوبین با BSA-saline رقیق شده به منظور باند شدن ۵۰ درصد کورتیزول نشان‌دار) به آن اضافه شد و به‌مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفته تا سرد گردد و با محاسبه کسری ۵۰ میکرولیتر محلول، ۷۵ میکرولیتر سوسپانسیون سرد زغال چوب- دکستران (۵ درصد زغال چوب، ۵ درصد دکستران، ۹ درصد نمک) به محلول باقی‌مانده در لوله پلی‌پروپیلن اضافه شد و پس از مخلوط شدن به‌مدت ۲۰ دقیقه بر روی یخ انکوبه (خوابانده) شد. سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در دور ۲۰۰۰ بر دقیقه به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. و ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی برای سنجش تشکیل باند کورتیزول با آنتی‌سرم برداشته شد. دامنه استاندارد ۷۰۰ -۰ پیکوگرم/تیوب برای رسم منحنی استاندارد در نظر گرفته شد. و میزان کورتیزول بر اساس نانوگرم بر میلی‌لیتر بیان شد.

بر اساس تست آلکالین فسفاتاز توسط پارانیتروفنیل فسفات (Fettman et al., 1992) و در طول موج ۴۰۵ نانومتر تعیین گردید.

سنجش آلانین آمینو ترانسفراز بر اساس روش Liu و همکاران (۲۰۱۶) با کمی تغییرات صورت گرفت. ۱ میلی‌لیتر سوبسترا (۰۵۸۴/ گرم۰ اسید آلفا گلوتاریک، ۵/۳۲ گرم اسید دی- ال آسپارتیک، ۴۰ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۱ نرمال ، بافر فسفات، کلروفرم) به دو کووت اضافه و درجه حرارت کووت‌ها به ۳۷ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. ۰/۲ میلی‌لیتر سرم را به‌داخل کووت تست و ۲۰ میلی‌لیتر آب را به‌داخل کووت بلانک ریخته و محتویات کووت را به‌خوبی مخلوط کرده و یک ساعت در بن ماری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از ۵ دقیقه جذب نوری لوله بلانک در طول موج ۵۰۵ نانومتر روی ۰/۲۵ تنظیم شد و جذب نوری کووت تست قرائت گردید. و جهت سنجش از منحنی کالیبراسیون استفاده شد.

سنجش اسپارتات آمینو ترانسفراز بر اساس روش Liu و همکاران (۲۰۱۶) صورت گرفت. به استثنای سوبسترا همانند سنجش آلانین آمینو ترانسفراز بود. سوبسترای آن شامل ۰/۰۲۹۲ گرم اسید آلفاکتوگلوتاریک، ۱/۷۸ از دی- ال آلانین، ۲۰ میلی-لیتر آب مقطر و حجم محلول با بافر فسفات (pH ۷/۴) به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

سنجش فعالیت لیزوزیم سرم نمونه‌ها، بر اساس روش توصیه شده توسط Ellis (۱۹۹۰) توسط سوسپانسیون میکرو کوکوس لیزو دیکتیکوس (Micrococcus lysodeikticus) (محصول سیگما) صورت گرفت.

۷.۲. تجزیه و تحلیل آماری

شیوه نمونه برداری از ماهی‌ها به‌صورت تصادفی و تجزیه وتحلیل آماری داده‌های حاصل از پایان دوره آزمایش با استفاده از طرح کاملا تصادفی بود. جهت تجزیه و تحلیل داده‌های تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از اندازه‌گیری شاخص‌های رشد، پارامترهای بیوشیمیایی با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک-طرفه (ANOVA) و جهت مقایسه میانگین‌ها (میانگین± خطای معیار) ازپس آزمون مقایسه چند دامنه‌ای دانکن با سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد (p=۰/۰۵). برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS 16 در محیط ویندوز XP استفاده گردید. با استفاده از تست کالموگراف اسمیرنوف نرمال بودن داده‌ها بررسی شد. هم‌چنین به‌منظور بررسی برابری واریانس‌ها از تست لون استفاده شد و کلیه داده‌هایی که بر حسب درصد بودند در ابتدا از آنها لگاریتم طبیعی گرفته شد (Ln). جهت مقایسه میانگین پارامترهای بیوشیمیایی قبل و بعد از استرس تراکم از آزمون مقایسه میانگین دو جامعه آماری مستقل (Independent two sample t- test) استفاده شد. جهت مقایسه میانگین ها از آزمون دانکن در سطح معنی دار ۵٪ استفاده شد. بسته نرم افزاری مورد استفاده SPSS بود. رسم نمودار در محیط Excel (2013) انجام شد.

۳. نتایج

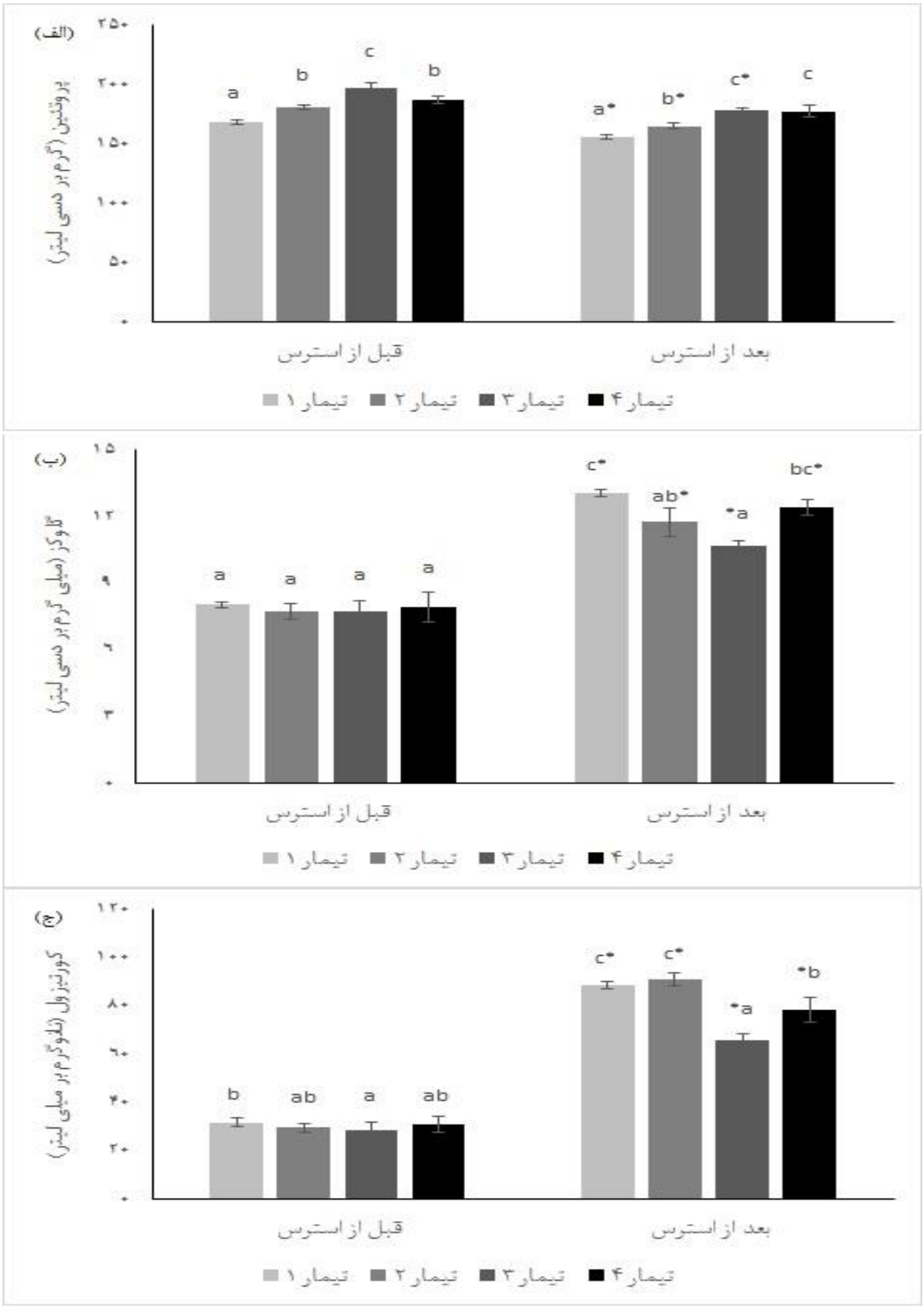
۱.۳. شاخص رشد

نتایج مربوط به شاخص‌های رشد، تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش در جدول ۲ آورده شده است. ماهی‌ها از میانگین وزن اولیه ۷/۱۴ گرم به دامنه میانگین وزن نهایی ۲۰/۳۵ گرم الی ۲۶/۵۶ گرم در طول دوره ۶۰ روزه آزمایش رسیدند. نتایج نشان داد که تیمار ۲و۳ افزایش معنی‌داری را در میانگین وزن نهایی، ضریب رشد ویژه، شاخص وضعیت و کاهش معنی‌داری را در ضریب تبدیل غذایی در مقایسه با تیمار شاهد و تیمار ۴ نشان دادند (P<۰/۰۵) در حالی-که بین تیمار ۲ و ۳ این تفاوت معنی‌داری نبود (P>۰/۰۵). بیشترین افزایش وزن به‌دست آمده و نسبت بازدهی پروتئین در تیمار ۳ مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد (P<۰/۰۵). میزان بقاء نیز در بین تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵). هم‌چنین در کلیه شاخص‌های رشد بین تیمارهای تغذیه شده با آستاگزانتین و تیمار شاهد تفاوت معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۵).

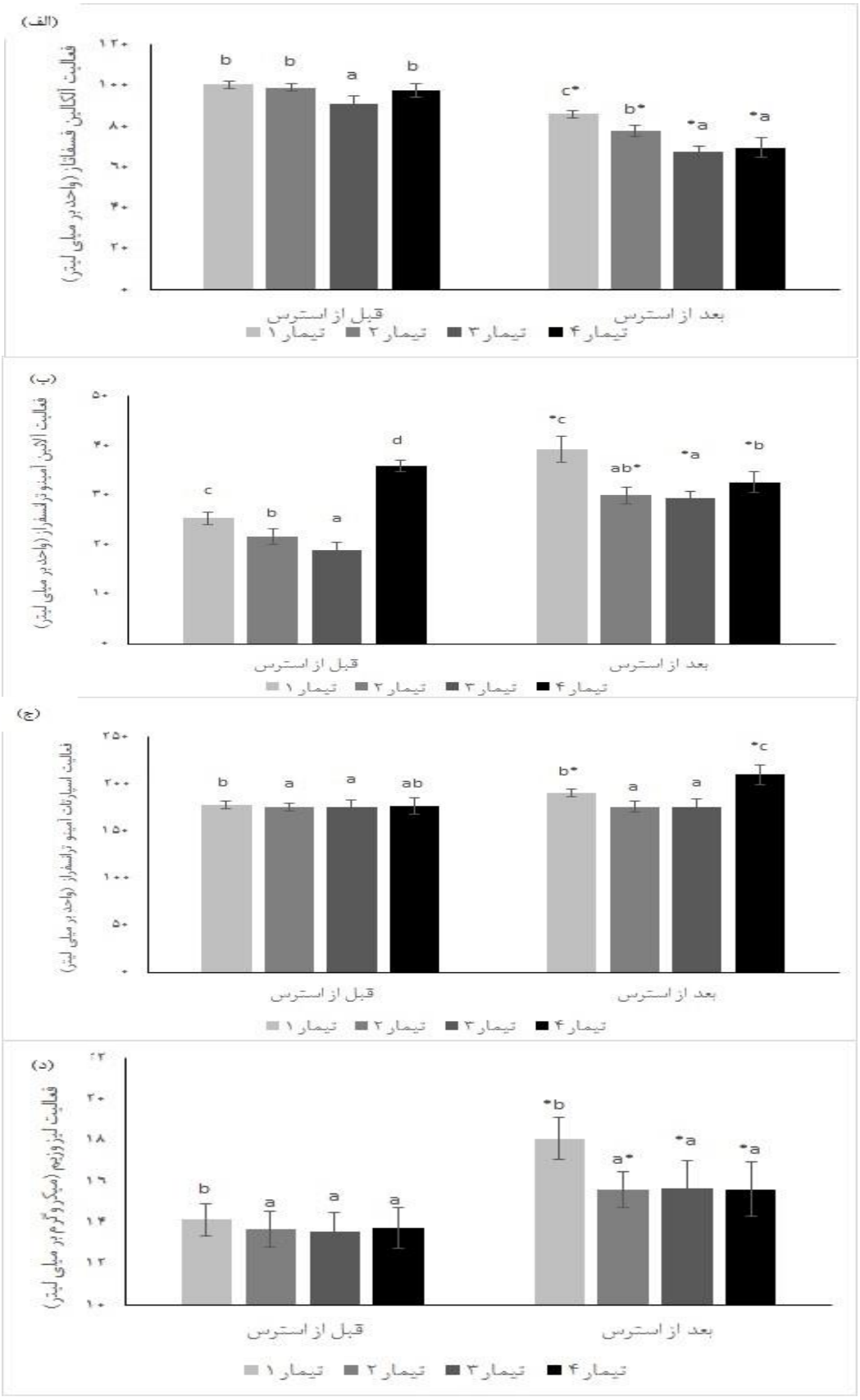
جدول ۲. مقایسه میانگین عملکرد رشد و مصرف غذایی بین تیمارهای تغذیه‌شده با سطوح مختلف فسفولیپید طی دوره پرورش

شاخص	تیمار			
	۱	۲	۳	۴
وزن اولیه (گرم)	۷/۱۵ ±۰/۰۳ a	۷/۱۶ ±۰/۰۲ a	۷/۱۴ ±۰/۰۲ a	۷/۱۰ ±۰/۰۲ a
وزن نهایی (گرم)	۲۰/۳۵ ±۰/۳۳ a	۲۵/۴۵ ±۰/۲۰ c	۲۶/۵۶ ±۰/۶۶ c	۲۳/۴۶ ±۰/۴۰ b
درصد افزایش وزن	۱۸۴/۷۶ ±۱/۳۳ a	۲۵۵/۳۷ ±۳/۳۳ c	۲۷۱/۱۹ ±۹/۳۱ d	۲۳۰/۱۶ ±۵/۶۳ b
ضریب رشد ویژه	۱/۷۴ ±۰/۰ a	۲/۱۱ ±۰/۰۱ c	۲/۱۷ ±۰/۰۵ c	۱/۹۸ ±۰/۰۲ b
ضریب تبدیل غذا	۲/۵۸ ±۰/۱۰ c	۲/۰۵ ±۰/۰۱ a	۱/۹۸ ±۰/۰۷ a	۲/۲۲ ±۰/۰۳ b
نسبت بازدهی پروتئین	۴/۲۵ ±۰/۰۳ a	۵/۸۸ ±۰/۰۶ c	۶/۲۶ ±۰/۲۱ d	۵/۳۰ ±۰/۱۲ b
شاخص وضعیت	۰/۹۲ ±۰ a	۱/۱۵ ±۰/۰۲ c	۱/۲۰ ±۰/۰۳ c	۱/۰۶ ±۰/۰۱ b
بقاء (درصد)	۹۸/۰ ±۰ a	۹۹/۴۵ ±۰/۲۳ a	۱۰۰ ±۰/۰ a	۹۶/۳۲ ±۰/۳۶ a

حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی دار در سطح p<۰/۰۵ بین تیمارهای مختلف است. تیمار۱: تیمار شاهد، تیمار ۲-۴ به ترتیب حاوی ۱۰۰،۵۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم آستاگزانتین در هر کیلوگرم جیره غذا است.



شکل ۱. میانگین و خطای معیار پروتئین (الف)، گلوکز (ب) و کورتیزول (ج) سرم خون ماهی طلال در تیمار¬های مختلف قبل و بعد از استرس تراکم (۲۴ ساعت، با سه تکرار). حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است. و علامت ستاره نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار پارامترها قبل و بعد از استرس می‌باشد. تیمار۱: تیمار شاهد، تیمار ۲-۴ به‌ترتیب حاوی ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا است.



شکل ۲. میانگین و خطای معیار فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز (الف)، آلانین آمینوترانسفراز (ب)، آسپارتات آمینو ترانسفراز (ج) و لیزوزیم (د) سرم خون ماهی طلال در تیمارهای مختلف قبل و بعد از استرس تراکم (۲۴ ساعت، با سه تکرار). حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است. و علامت ستاره نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار پارامترها قبل و بعد از استرس می‌باشد. تیمار۱: تیمار شاهد، تیمار ۲-۴ به‌ترتیب حاوی ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا است.

۱.۳. پارامترهای بیوشیمیایی خون

تغییرات میانگین (± خطای معیار) پروتئین، گلوکز و کورتیزول سرم خون ماهی طلال در تیمارهای مختلف، قبل و بعد از استرس تراکم (۲۴ ساعت)، در شکل ۱ نشان داده شده است. طبق شکل۱، الف، میزان پروتئین قبل از استرس در تیمارهای تغذیه شده با آستاگزانتین اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵) و بیشترین میزان پروتئین در (تیمار ۳) مشاهده شد و بین تیمارهای ۲ و ۴ این اختلاف معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). بعد از استرس (۲۴ ساعت) نیز میزان پروتئین در تیمارهای تغذیه شده با آستاگزانتین افزایش معنی‌داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵) و بیشترین میزان آن در تیمار ۳ و ۴ مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با تیمار ۲ نشان داد (P<۰/۰۵). هم‌چنین اختلاف معنی‌داری بین میزان پروتئین قبل و بعد از استرس در تیمارها (به استثنای تیمار۴) مشاهده شد (P<۰/۰۵). قبل از استرس، میزان گلوکز در بین تیمار-ها اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵) در حالی‌که پس از استرس، کاهش معنی‌داری در میزان گلوکز تیمار ۳ در مقایسه با تیمار شاهد و تیمار ۴ مشاهده شد (P<۰/۰۵). از نظر عددی بیشترین میزان گلوکز در تیمار شاهد مشاهده شد که اختلاف معنی-داری را در مقایسه با تیمار ۴ نشان نداد (P>۰/۰۵) (شکل ۱، ب). هم‌چنین بین میزان گلوگز قبل و بعد از استرس در کلیه تیمارها این اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). طبق شکل۱، ج کمترین میزان کورتیزول قبل و بعد از استرس در تیمار ۳ مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). هم‌چنین تفاوت معنی‌داری بین میزان کورتیزول قبل و بعد از استرس، در کلیه تیمارها مشاهده شد (P<۰/۰۵).

تغییرات میانگین (± خطای معیار) فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینو ترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز و لیزوزیم سرم خون ماهی طلال در تیمارهای مختلف قبل و بعد از استرس تراکم (۲۴ ساعت)، در شکل۲ نشان داده شده است. طبق شکل ۲، الف، فعالیت آلکالین فسفاتاز قبل از استرس در تیمار ۳ اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با بقیه تیمارها نشان داد (P<۰/۰۵) در حالی‌که تیمار ۲ و ۴ اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان نداد (P>۰/۰۵). قبل از استرس، فعالیت آلانین آمینوترانسفراز در تیمار ۴ افزایش معنی‌داری را در مقایسه با تیمار نشان داد (P<۰/۰۵). کمترین فعالیت آلانین آمینوترانسفراز قبل و بعد از استرس در تیمار ۳ مشاهده شد. بعد از استرس، فعالیت آلانین آمینوترانسفراز در تیمارهای تغذیه شده با آستاگزانتین کمتر از تیمار شاهد بود و تفاوت معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان دادند (P<۰/۰۵). هم‌چنین بعد از استرس فعالیت آلانین آمینو ترانسفراز در کلیه تیمارها افزایش معنی‌داری را در مقایسه با قبل استرس نشان داد (P<۰/۰۵) (شکل۲، ب). طبق شکل۲ ج، فعالیت آسپارتات آمینو ترانسفراز قبل از استرس در تیمار ۲و ۳ کاهش معنی‌داری را در مقایسه با تیمار ۴ و تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵) بعد از استرس، فعالیت آسپارتات آمینو ترانسفراز در تیمار شاهد و تیمار ۴ اختلاف معنی‌داری را با فعالیت آن قبل از استرس نشان داد (P<۰/۰۵) و تیمار ۲ و ۳ کمترین فعالیت آسپارتات آمینو ترانسفراز را بعد از استرس نشان دادند که تفاوت معنی‌داری را با تیمار ۴ و تیمار شاهد نشان دادند (P<۰/۰۵). بعد از استرس، با افزایش غلظت آستاگزانتین در جیره غذایی، فعالیت آلکالین فسفاتاز کاهش معنی‌داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵) و بین تیمارهای ۳ و ۴ این اختلاف معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). هم‌چنین فعالیت آلکالین فسفاتاز در کلیه تیمارها بعد از استرس، کاهش معنی-داری را در مقایسه با قبل از استرس نشان داد (P<۰/۰۵). فعالیت لیزوزیم قبل و بعد از استرس در تیمارهای تغذیه شده با آستاگزانتین کاهش معنی‌داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵) در حالی‌که بین تیمارهای تغذیه شده با آستاگزانتین این اختلاف معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). هم‌چنین در کلیه تیمارها، اختلاف معنی‌داری بین فعالیت لیزوزیم قبل و بعد از استرس مشاهده شد (P<۰/۰۵) (شکل۲، د).

۴. بحث و نتیجه گیری

تغییرات شاخص‌های رشد در بین تیمارهای مختلف در این تحقیق، نشان داد که اضافه نمودن

مقادیر مختلف مکمل آستاگزانتین به جیره غذایی، منجر به بهبود عملکرد رشد و تغذیه در مقایسه با تیمار شاهد شد. بیشترین نسبت بازدهی پروتئین و افزایش وزن به‌دست آمده در تیمار تغذیه شده با ۱۰۰ میلی-گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد درحالی‌که از نظر وزن نهایی، ضریب رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و شاخص وضعیت بین تیمارهای تغذیه شده با ۵۰ و۱۰۰ میلی‌گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد که با نتایج به‌دست آمده از تحقیقات صورت گرفته بر روی ماهی آزاد اطلس (*Salmo salar*) تغذیه شده با ۴۰ میلی‌گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا (Christiansen et al., 1994)، تاس ماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*) تغذیه شده با ۱۰۰ میلی‌گرم آستاگزانتین طبیعی بر کیلوگرم غذا (Ilyasov and Golovin, 2003)، میگوی پاسفید غربی تغذیه شده با ۱۰۰ میلی‌گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا (Ahmadi et al., 2008) و میگوی مونودون (*Penaus monodon*) تغذیه شده با ۱ درصد آستاگزانتین (Niu et al., 2009) همخوانی داشت. می‌توان گفت که آستاگزانتین نقش موثری را به‌عنوان واسطه در سوخت و ساز بدن، تسریع در هضم و جذب بدن، افزایش بهروری مواد غذایی، و در نتیجه عملکرد رشد موجودات آبزی ایفاء می‌نماید (Niu et al., 2009). هر چند نتایج حاصل از این تحقیق با تحقیقات صورت گرفته بر روی فیل‌ماهی تغذیه شده با آستاگزانتین طبیعی (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا) (Faghani et al., 2013) و گربه‌ماهی زرد تغذیه شده با ۸۰ میلی‌گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا (Liu et al., 2016) و میگو کروما (*Marsupenaeus japonicas*) تغذیه شده با ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا (Chein and Jeng, 1992) همخوانی نداشت که دلیل مغایرت نتایج را می‌توان عادات غذایی مختلف، اختلاف فرمولاسیون غذایی ماهیان و اختلاف طعم و مزه مطلوب در گونه‌های مختلف ماهیان دانست (Liu et al., 2016). هم‌چنین با تغییر سطوح مکمل آستاگزانتین در این آزمایش، افزایش وزن به‌دست آمده و نسبت بازدهی پروتئین روند کاهشی معنی‌داری را نشان دادند که با نتایج حاصل از تحقیق احمدی و همکاران (۲۰۰۸) همخوانی داشت. Ahmadi و همکاران (۲۰۰۸) با بررسی اثر سطوح مختلف آستاگزانتین (۰، ۵۰، ۱۰۰ و۱۵۰ میلی‌گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا) بر عملکرد رشد ماهی میگوی پا سفید غربی نشان دادند که بیشترین میزان وزن نهایی و ضریب رشد ویژه، در تیمار تغذیه شده با ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا مشاهده شد. کاهش وزن بدن در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذارا می‌توان به اثر بازدارندگی رنگدانه آستاگزانتین نسبت داد برخلاف خاصیت آنتی اکسیدانی استاگزانتین، استفاده بیش از حد آن در جیره غذایی می‌تواند اثرات سمی و طعم تلخ را ایجاد کرده و منجر به کاهش رشد گردد (Beutner et al., 2001;Liu et al., 2016) مصرف بیش از حد استاگزانتین باعث تولید انواع اکسیژن فعال شده که در نهایت منجر به شکستن زنجیره DNA و تخریب سلول‌ها می‌شود (Beutner et al., 2001). هرچند استفاده از غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا بر بقاء تاثیر معنی‌داری نداشت.

ماهی‌های تحت اسارت به‌طور مداوم تحت تاثیر استرس‌های مختلف نظیر دمای محیط، تراکم، پارامتر-های فیزیکی و شیمیایی، حمل و نقل و ذخیره سازی قرار می‌گیرند (Oliveira et al., 2012;Liu et al., 2016). همانند سایر مهره‌داران، استرس‌های محیطی تاثیر مهمی بر تعادل دینامیکی ماهی داشته و هنگامی-که ماهی در طول دوره پرورش تحت تاثیر استرس مداوم قرار گیرد با تحریک محور بخش قشری فوق کلیه-هیپوفیز-هیپوتالاموس سطح کورتیزول خون افزایش می‌یابد (Xie et al., 2008). لذا افزایش سطح کورتیزول خون به‌عنوان سیگنال هوشمند در ماهی تحت استرس می‌تواند در نظر گرفته شود (Xie et al., 2008). نتایج حاصل از این تحقیق، نشان داد که سطح کورتیزول خون ماهی طلال قبل از استرس تراکم در کلیه تیمارها کمتر از سطح کورتیزول خون ماهی ۲۴ ساعت بعد از استرس بود که با نتایج به‌دست آمده از تحقیقات صورت گرفته بر روی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (Xie et al., 2008) و گربه-ماهی زرد (Liu et al., 2016) تحت تاثیر استرس تراکم همخوانی داشت. هم‌چنین سطح کورتیزول خون

در تیمارهای تغذیه شده با ۱۰۰ و۱۵۰ میلی‌گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا بعد از استرس کاهش معنی‌داری را در مقایسه با شاهد نشان داد Liu و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که استفاده از ۸۰ میلی-گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا منجر به کاهش معنی‌دار کورتیزول خون گربه‌ماهی زرد ۱۲ و۲۴ ساعت بعد از شروع استرس تراکم شد که با نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی داشت که این موضوع نشان می-دهد که استفاده از آستاگزانتین می‌تواند سطح کورتیزول خون ماهی تحت استرس را بهبود بخشد (Liu et al., 2016).

افزایش سطح هورمون کورتیزول خون منجر به تولید قند و مصرف گلیکوژن کبد می‌گردد لذا به‌منظور تامین انرژی در طول استرس، گلوکز خون به‌طور ناگهانی افزایش می‌یابد (Liu et al., 2016). تعدادی از محققین معتقد هستند که سنجش سطح گلوکز خون شاخص مهمی برای ارزیابی ماهیان در شرایط تحت استرس می‌باشد (Hsieh et al., 2003). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تغییرات میزان گلوکز خون قبل از استرس در بین تیمارها معنی‌دار نبود اما میزان گلوکز خون در کلیه تیمارها بعد از استرس افزایش یافت که با تحقیق صورت گرفته توسط Xie و همکاران (۲۰۰۸) همخوانی داشت. هم‌چنین کمترین میزان گلوکز خون بعد از استرس در تیمار تغذیه شده با ۱۰۰ میلی‌گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را با تیمار حاوی ۵۰ میلی‌گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا نشان نداد که با نتایج به‌دست آمده از تحقیق Liu و همکاران (۲۰۱۶) همخوانی داشت.

پروتئین سرم منجر به ثبات pH، فشار اسمری و انتقال بیلی روبین، اسیدهای چرب، کلسترول و فسفاتید می‌شود (Liu et al., 2016). هم‌چنین آنزیم آلکالین فسفاتاز نقش مهمی در تنظیم برخی از عملکردهای اساسی ارگانیزم‌های زنده بازی می‌نماید. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که استفاده از آستاگزانتین در جیره غذایی ماهی طلال منجر به افزایش معنی‌دار پروتئین سرم و کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتار ۲۴ ساعت بعد از شروع استرس تراکم شد و میزان پروتئین و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در بین کلیه تیمارها بعد از استرس تفاوت معنی‌داری با میزان خود قبل از استرس نشان دادند که با نتایج به‌دست آمده از تحقیق صورت گرفته بر روی گربه‌ماهی تغذیه شده با ۸۰ میلی‌گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا همخوانی داشت (Liu et al., 2016) که این موضوع نشان می‌دهد که استفاده از مکمل آستاگزانتین در جیره غذایی (علی الخصوص غلظت ۸۰ میلی‌گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا منجربه بهبود میزان پروتئین و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز می‌گردد.

آنزیم‌های آلانین آمینو ترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز در میتوکندری حیوانات آبزی حضور داشته و سطح فعالیت آن‌ها شاخص مهمی برای تشخیص عملکرد هضم و آسیب‌های کبد ماهی می-باشد (Liu et al., 2016). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که قبل از استرس، فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در تیمار شاهد افزایش معنی‌داری را در مقایسه با تیمارهای تغذیه شده با ۵۰ و۱۰۰ میلی‌گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا نشان داد که با نتایج بدست آمده توسط Liu و همکاران (۲۰۱۶) همخوانی داشت آن‌ها نشان دادند که استفاده از ۸۰ میلی‌گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا در جیره غذایی گربه‌ماهی روگاهی منجر به کاهش معنی‌دار این آنزیم شد. کمترین میزان فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز ۲۴ ساعت بعد از شروع استرس، در تیمار تغذیه شده با ۱۰۰ میلی‌گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را با تیمار حاوی ۵۰ میلی-گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا نشان نداد هم‌چنین بعد از ۲۴ ساعت از شروع استرس تراکم فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در کلیه تیمارها در مقایسه با فعالیت این آنزیم قبل از استرس افزایش یافت Nakano و همکاران (۱۹۹۹) نیز نشان دادند که استفاده از آستاگزانتین در جیره غذایی منجر به کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز خون ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در مقایسه با تیمار شاهد بعد از مواجهه با استرس اکسیداتیو گردید که با نتایج به‌دست آمده از این تحقیق همخوانی‌داشت.

فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز خون ماهی طلال قبل از استرس در بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری را نشان نداد در حالی‌که ۲۴ ساعت بعد از شروع استرس تراکم در تیمارهای تغذیه شده با

آستاگزانتین کاهش معنی‌داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد که با نتایج به‌دست آمده از تحقیقات Nakano و همکاران (۱۹۹۹) و Liu و همکاران (۲۰۱۶) همخوانی داشت افزایش فعالیت آنزیم‌های آلانین آمینو ترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز در تیمار تغذیه شده با ۱۵۰ میلی‌گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا در مقایسه با تیمارهای تغذیه شده با ۵۰ و۱۰۰ میلی‌گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا بعد از استرس حاکی از آن است که استفاده از سطح ۱۵۰ میلی‌گرم آستاگزانتین بر کیلوگرم غذا می‌تواند سلامت ماهی را تهدید نماید.

افزایش غلظت کورتیزول خون تحت تاثیر شرایط استرس منجر به سرکوب سیستم ایمنی حیوانات آبزی شود (Liu et al., 2016) که به نوبه خود پارامترهای بیوشیمیایی خون از قبیل فعالیت لیزوزیم، محتوی پروتئین و فعالیت آلکالین فسفاتاز را تحت تاثیر قرار می‌دهد. لیزوزیم یکی از پارامترهای دفاع غیر اختصاصی ذاتی مهم می باشد همچنین از دسته آنزیم‌های باکتریسیدال مهم از ایمنی ذاتی است که در زمان عفونت با باکتری گرم مثبت همچنین در شرایط استرس زا به عنوان یک پروتئین فاز حاد عمل می کند و نقش عملکردی آن در مبارزه با عفونتهای مختلف ماهیان گزارش شده است (Swain and Nayak 2009.). مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از آستاگزانتین قبل از استرس منجر به کاهش معنی‌دار فعالیت لیزوزیم در مقایسه با تیمار شاهد شد هر چند فعالیت لیزوزیم بعد از استرس در کلیه تیمارها افزایش معنی‌داری را در مقایسه با فعالیت خود قبل از استرس نشان داد اما فعالیت لیزوزیم در تیمارهای تغذیه شده با آستاگزانتین کمتر از فعالیت لیزوزیم در تیمار شاهد بود که با نتایج بدست آمده از تحقیقات صورت گرفته بر روی گربه ماهی زرد (Liu et al., 2016) و ماهی شبه شوریده (*Pseudosciaena crocea*) (Niu et al., 2014) همخوانی داشت . کاهش فعالیت لیزوزیم در تیمارهای تغذیه شده با آستاگزانتین حاکی از آن است که آستاگزانتین دارای خواص ضد باکتری، ضد التهابی، و آنتی اکسیدانی قوی‌تری در مقایسه با تنظیم فعالیت لیزوزیم می‌باشد (Li et al., 2014). هر چند عواملی نظیر وضعیت فیزیولوژیکی ماهی و احتیاجات غذایی مختلف می‌تواند بر فعالیت لیزوزیم بعد از استرس تاثیر گذار باشد که تحقیقات وسیع‌تری در این زمینه لازم به نظر می‌رسد.

درکل نتایج به‌دست آمده از عملکرد رشد و برخی پارامترهای بیوشیمیایی خون بعد از مواجهه با استرس تراکم نشان داد که استفاده از سطوح mg/kg ۱۰۰ آستاگزانتین در جیره غذایی ماهی طلال منجر به افزایش وزن به‌دست آمده، نسبت بازدهی پروتئین و پروتئین تام، کاهش گلوکز، کورتیزول، آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و آسپارتات آمیتو ترانسفراز شد که بهینه‌ترین سطح به منظور مقاومت ماهی در برابر استرس و افزایش عملکرد تولید در رژیم غذایی ماهی طلال پیشنهاد می‌گردد.

۵. تقدیر و تشکر

بدین وسیله از همکاری ریاست و پرسنل محترم انستیتو موسسه تحقیقات شیلات چابهار و کارشناس محترم آزمایشگاه شبکه دامپزشکی چابهار خانم ناصری تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

Ahmadi, S., Farhangi, M., Rafii, G.R., Ghaednia, B., 2008. Effect of different levels of astaxsnthin on growth parameters and survival in Litopenaeus vannamei. *Journal of Marine Sciences and Technology* 1-2, 1-12.

Bai, S.C., 2001 Requirements of L-ascorbic acid in a viviparous marine teleost, Korean rochfish (Sebaster Schlegeli) In: Ascorbic acid in aquatic organism. Dabrowski, K., (Eds.) CRC press, 69-85.

Beutner, S., Bloedorn, B., Frixel, S., Blanco, I.H., Hoffman, T., Martin, H., 2001. Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of β-carotene in antioxidant functions. *Journal of the Science of Food Agriculture* 81, 559-568.

Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Brund, D.E., 1994 Tietz Textbook of Clinical Chemistry (5thed.). W. B. Sunders Company. Philadelphia. USA.560P.

Chein, Y.H., Jeng, S.C., 1992. Pigmentation of kuruma prawn, *Penaeus japonicus* bate, by various pigment sources and levels and feeding regimes. *Aquaculture* 102, 333-346.

Chew, B.P., Wong, M.W., Park, J.S., Wong, T.S., 1999. Dietary b-carotene and astaxanthin but not canthaxanthin stimulate splenocyte func-

-tion in mice. Anticancer Research 19 5223-5227.Christiansen, R., Lie, Torrissen, J., 1994. Effect of astaxanthin and vitamin A on growth and survival during first feeding of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture and Fisheries Management* 25, 903-914.

Ellis, A.E., 1990. Lysozyme Assays: In Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson BS,Van Muiswinkel WB, editors. Techniques in: Fish Immunology. Fair Haven, NJ: SOS Publications; PP. 101-103.

Faghani, T., Soltani, M., Shamsae, M., Matinfar, A., 2013. The effect of dietary natural Astaxanthin (*Haematococcus pluvialis*) on the growth parameters, carcases and liver chemical composition injuvenile beluga (*Huso huso Linnaeus*, 1758). *Journal of Marine Biology*, Islamic Azad University, Ahvaz Branch 5 69-78.

Farhangi, M., Ahmadi, S., Rafii, G.R., ghaednia, B., Taghavi, R., 2013. Effect of different levels of dietary astaxantin on biochemical parameters and non- specific immune in *Litopenaeus vannamei* against low oxygen stress. *Journal of Marine Sciences and Technology* 2, 103-114.

Fettman, M.J., Coble, J.M., Hamar, D.W., 1992 Effect of dietary phosphoric acid supplementation on acid- base balance and mineral and bone metabolism in adult cats. *American Journal of Veterinary Research* 53, 2125-2135.

Guerin, M., Huntley, M.E., Olaizola, M., 2003. *Haematococcus astaxanthin*: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnology* 21, 210-216.

Harikrishnan, R., Kim, J., Balasundaram, C., Heo, M., 2012 Immunomodulatory effects of chitin and chitosan enriched diets in *Epinephelus bruneus* against *Vibrio alginolyticus* infection. *Aquaculture* 326, 46-52.

Hasan, M.R., 2002. Nutrition and feeding for sustainable Aquaculture development in the third millennium. FAO Reports.

Hsieh, S.L., Chen, Y.N., Kuo, C.M., 2003. Physiological responses, desaturase activity and fatty acid composition in milkfish (*Chanos chanos*) under cold acclimation. *Aquaculture* 220, 903-918.

Hussein, G., Sankawa, U., Goto, H., Matsumoto, K., Watanabe, H., 2006. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *Journal of Natural Products* 69, 443-449.

Ilyasov, Y., Golovin, P., 2003. The effect of NatuRose on growth, survival and physiological state of two-year-old marketable sturgeons. On file at Cyanotech Corporation.

Jeney, G., Galeotti, M., Volpatti, D., Jeney, Z., Anderson, D.P., 1997. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture* 154, 1-15.

Li, M., Wu, W., Zhou, P., Xie, F., Zhou, Q., Mai, K., 2014. Comparison effect of dietary astaxanthin and *Haematococcus pluvialison* growth performance, antioxidant status and immune response of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture* 434, 227-232.

Lim, C., Klesius, P.H., Li, M.H., Robinson, E.H., 2000. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, haematoloy, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture* 185 313-327.

Liu, F., Shi, H., Guo, Q., Yu, Y., Wang, A., Lv, F., Shen, W., 2016. Effects of astaxanthin and emodin on the growth, stress resistance and disease resistance of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Fish and Shellfish Immunology* 51, 125-135.

Merchie, G., Kontara, E., Lavens, P., Robles, R., Kurmaly, K., Sorgeloos, P., 1998. Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture Research* 29, 579-589.

Nakano, T., Kanmuri, T., Sato, M., Takeuchi, M., 1999. Effect of astaxanthin rich red yeast (*Phaffia rhodozyma*) on oxidative stress in rainbow trout. *Biochimica et Biophysca Acta* 426 119-125.

Nazan, D., Yener, A., Rikap, Y., 2008 Ovary maturation stages and histological investigation of ovary of the Zebrafish (*Danio rerio*). *Brazilian Archive Biology and Technology* 151, 1-10.

Niu, J., Tian, L.X., Liu, Y.J., Yang, H.J., Ye, C.X., Gao, W., Mai, K.S., 2009. Effect of dietary astaxanthin on growth, survival and stress tolerance of post-larval shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of World Aquaculture Society* 40 795-802.

Niu, J., Wen, H., Li, C., Liu, Y., Tian, L., Chen, X., 2014. Comparison effect of dietary astaxanthin and b-carotene in the presence and absence of cholesterol supplementation on growth performance, antioxidant capacity and gene expression of *Penaeus monodon* under normoxia and hypoxia condition. *Aquaculture* 422-423, 8-17.

Oliveira, E.G., Pinheiro, A.B., Oliveira, V.Q., Silva, A.R.M., Moraes, M.G., Rocha, I.R.C.B., 2012. Effects of stocking density on the performance of juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*) in cages. *Aquaculture* 370-371 96-101.

Peterson, D.S., Harris, D.J., Rayner, J.C., Blakeney, A.B., Choct, M., 1999. Methods for the analysis of premium livestock grains. *Australian Journal of Agriculture Researches* 50, 775- 787.

Pickering, A.D., Pottinger, P., 1983. Seasonal and diet changes in plasma cortisol levels of the brown trout, *Salmo trutta* L. *General and Comparative Endocrinology* 49, 232-239.

Rehulka, J., 2000. Influence of astaxanthin on growth rate, condition, and some blood indices of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss. Aquaculture* 190 27-47.

Swain, P., Nayak, S.K., 2009. Role of maternally

derived immunity in fish. *Fish and Shellfish Immunology* 27, 89-99.

Tafi, A.A., Meshkini, S., Tukmechi, A., 2013. Effects of Chitosan on some immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and enhance resistance against a pathogenic *Aeromonas hydrophila* fallowing experimental infection. *Zoology Researches Journal* 26, 468-477.

Trinder, P., 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annuals of Clinical Biochemistry* 6, 24-27.

Wahli, T., Verlhac, V., Griling, P., Gabaudan, J., Aebischer, C., 2003. Influence of dietary vitamin C on the wound healing process in rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*) *Aquaculture* 225, 371-386.

Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiology Review* 77, 591-625

Xie, J., Liu, B., Zhou, Q., Su, Y., He, Y., Pan, L., Ge, X., Xu, P., 2008. Effects of anthraquinone extract from rhubarb Rheum officinale Bail on the crowding stress response and growth of common carp *Cyprinus carpio* var. Jian. *Aquaculture* 281, 5-11.