View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

تاثیر کیتوزان جیره بر بافت شناسی روده، ترکیب بدن و مقاومت در برابر استرس های شوری و حرارتی در بچه ماهیان سفید (*Rutilus frisii kutum*, Kamenskii 1901)

معصومه کمالی نجف آباد *، محمدرضا ایمانپور، وحید تقی‌زاده و علیرضا عالیشاهی

گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۸/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۲۹

چکیده

این پژوهش به منظور ارزیابی تأثیر کیتوزان جیره بر بافت‌شناسی روده، ترکیب بدن و مقاومت به تنش‌های شوری و حرارتی در بچه‌ماهیان سفید انجام شد. این تحقیق با استفاده از طرح کاملاً تصادفی شامل سطوح صفر، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ گرم کیتوزان به ازای هر کیلوگرم جیره تجاری ماهی سفید با سه تکرار طراحی شد. بچه‌ماهیان سفید با میانگین وزنی ۰/۱۵±۱/۷۶ گرم به مدت ۸ هفته با جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند. در پایان دوره آزمایش، از روده ماهیان مقاطع بافتی با برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد. برای ارزیابی مقاومت به استرس‌های شوری و حرارتی، بچه‌ماهیان تحت شوری‌های ۱۱ و ۱۳ ppt و دماهای ۳۰ و ۳۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و نرخ بازماندگی محاسبه شد. مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که ارتفاع پرز روده در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۱ گرم بر کیلوگرم کیتوزان، به طور قابل توجهی به میزان ۳۱۹/۹۳ µm نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ($P<0/05$). آنالیز بیوشیمیایی ترکیب بدن در تمام گروه‌ها اختلاف معنی‌داری نداشت ($P>0/05$). میزان بازماندگی ماهیان پس از تنش شوری ۱۱ و ۱۳ ppt از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($P>0/05$)، اما میزان بازماندگی ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۱ گرم بر کیلوگرم کیتوزان، پس از تنش حرارتی ۳۴ درجه سانتی‌گراد به طور قابل توجهی به ۷۰٪ افزایش یافت ($P<0/05$). نتایج این بررسی حاکی از آن است که کیتوزان در سطح ۱ گرم برکیلوگرم در جیره می‌تواند بر میزان بازماندگی و مقاومت بچه‌ماهیان سفید در برابر استرس حرارتی و همچنین ارتفاع پرز روده موثر واقع شود.

واژه های کلیدی: کیتوزان، بافت شناسی روده، ترکیب بدن، استرس، بچه‌ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*)

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: masume.kamali91@yahoo.com

۱. مقدمه

ماهی سفید با نام علمی (*Rutilus frisii kutum*) از خانواده کپور ماهیان، یکی از مهم‌ترین و با ارزش‌ترین ماهیان استخوانی تجاری و اقتصادی دریای خزر است (Holchik, 1995). این ماهی، تنها در دریای خزر وجود دارد و زیست‌گاه اصلی آن بخش جنوبی دریای خزر به خصوص سواحل ایران است (Razavi Sayad, 1995). آمار صید ماهی سفید در سواحل ایرانی دریای خزر نشان می‌دهد که این ماهی، رقم عمده صید صیادان منطقه را تشکیل می‌دهد. این میزان صید سالانه حاصل رهاکرد میلیون‌ها بچه‌ماهی توسط کارگاه‌های تکثیر و پرورش شیلات ایران است؛ لذا جهت بازسازی ذخایر این ماهی پس از تکثیر و پرورش لارو این ماهی با کیفیت خوب، نرخ بقا و رشد بالاتر می‌تواند موفقیت زندگی بچه ماهیان را پس از رهاسازی و ورود به دریا تضمین نموده و درصد بازماندگی را افزایش دهد (Fallahi et al, 2004). آلودگی‌های زیست‌محیطی، صید بیش از حد ذخایر، کاهش ضریب بازگشت بچه‌ماهیان رهاسازی شده و همچنین کاهش میانگین وزن متوسط مولدین در ده ساله‌ی اخیر از عوامل متعددی است که میزان ذخایر ماهی سفید را به شدت تحت تاثیر قرار داده‌است (Emadi, 1986). بدین جهت پرورش این گونه از طریق فرموله کردن غذای مناسب اهمیت پیدا کرده‌است (Neverian et al, 2004).

استفاده از محرک‌های ایمنی در ماهی می‌تواند مقاومت ماهی را در برابر شرایط نامساعد محیطی و عوامل بیماری‌زا در مقایسه با روش‌های دیگر درمانی بهبود ببخشد (Sakai, 1999). کیتوزان خواص رشد و تحریک کننده سیستم ایمنی در حیوانات آبزی با حلالیت کیتین در آب و دیگر حلال‌های مشابه دارد (Romeran et al, 2002). Meshkini و همکاران (2012) در تحقیق خود گزارش دادند که کیتوزان دارای خواص تحریک کننده سیستم ایمنی در گونه‌های مختلف ماهیان است.

کیتوزان به‌عنوان محرک ایمنی در جیره غذایی آزادماهیان برای محافظت در برابر بیماری‌های باکتریایی توسط (Anderson a nd Siwicki, 1994)، و همچنین اثر آن بر افزایش انفجار تنفسی و فعالیت فاگوسیتوز در ماهی سیم سرطلایی (*Sparus Auratus*) توسط (Cuesta) و همکاران (2003) بررسی شده‌است.

کیتوزان الیگوساکارید یک نوع الیگوساکاریدی است که از هیدرولیز آنزیمی و شیمیایی کیتوزان به‌دست-آمده‌است (Kim and Rajapakse, 2005). در واقع، برخی مطالعات در رابطه با کیتوزان‌الیگوساکارید بر روی جوجه‌های گوشتی در گزارش‌های (Li et al, 2007) و یا ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) در بررسی-های (Hoffman et al, 1997) انجام شده و اثرات مفیدی بر روی عملکرد رشد، ایمنی و پروفیل خون گزارش شده‌است. Khambualai و همکاران (2009) عملکرد رشد و بافت‌شناسی روده در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با کیتوزان در جیره غذایی را تا سن ۷ هفته‌گی جوجه‌ها مورد مطالعه قرار دادند.

از آنجایی که ماهی سفید دریای خزر یک گونه با ارزش و اقتصادی برای آبزی‌پروری است و دانش شرایط پرورش آن و مقاومت در برابر استرس بسیار کمیاب و ضروری است لذا با توجه به موارد فوق، تحقیق حاضر با هدف بررسی اثرات سطوح متفاوت کیتوزان در جیره غذایی بچه‌ماهیان سفید و اثرات آن بر بافت دستگاه گوارش، مورفومتری روده و همچنین ترکیب بدن و مقاومت در برابر استرس‌ها در طول دوره پرورش جهت افزایش بقا در زمان رهاسازی و مقاومت به تنش‌های محیطی به منظور افزایش بازگشت شیلاتی آنها انجام شد.

۲. مواد و روش‌ها

این آزمایش در تابستان ۱۳۹۲ به مدت ۸ هفته اجرا شد. برای این منظور بچه‌ماهیان سفید از مرکز تکثیر و پرورش ماهی کلمه سیجوال (بندر ترکمن) تهیه و به مرکز آبزی‌پروری شهید ناصر فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند. برای سازگاری اولیه بچه‌ماهیان به مدت ۳ هفته با غذای تجاری (جدول ۱) تغذیه شدند. بچه‌ماهیان با وزن متوسط ۱/۷۶±۰/۱۵ گرم در ۱۵ آکواریوم ۷۰ لیتری که با حدود ۴۰ لیتر آب لوله‌کشی پر شده بودند، با تراکم ۳۵ عدد در هر آکواریوم ذخیره سازی شدند. روزانه ۸۰ درصد آب آکواریوم‌ها تعویض می‌شد. جهت تامین هوادهی و نیاز اکسیژنی ماهیان به هر یک از آکواریوم‌ها یک سنگ هوا که به منبع هواده متصل بود نصب گردید. فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب مانند درجه حرارت، شوری، pH و اکسیژن محلول به صورت روزانه با استفاده از دستگاه (Water Checker-U10, HURIBA, Japan) اندازه‌گیری می‌شد.

این تحقیق با استفاده از طرح کاملا تصادفی شامل پنج سطح صفر، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ گرم کیتوزان به ازای هر کیلوگرم جیره تجاری ماهی سفید در پنج تیمار به ترتیب (گروه اول (شاهد)، تیمار دوم، تیمار سوم، تیمار چهارم و تیمار پنجم) و با سه تکرار بر طبق روش (Meshkini) و همکاران (2012) طراحی شد.

کیتوزان پلیمر دی گلوکزآمین با نام علمی *(Poly(β-D(1-4)-2-amino-2-deoxy-α-glucan)* پس از دی استیله شدن از کیتین با نام شیمیایی (*Poly(β-D(1-4)-N-acetly-glucosamine*) بدست می‌آید (Goorge and Roberts, 1992). کیتین ماده‌ای سخت با ساختار کریستالی و سفید رنگ است که به مقدار زیاد در پوسته سطحی سخت‌پوستان و حشرات و دیواره سلولی قارچ‌ها وجود دارد. منبع اصلی تولید صنعتی کیتین در دنیا، ضایعات پوسته حاصل از صنایع فرآوری میگو و خرچنگ است (Shahidi and synwieki, 1991). غالبا کیتوزان را به عنوان ماده کیتینی با درصد استیلاسیون بالای۵۰ درصد می‌شناسند. کیتوزان‌های تجاری معمولا درصد دی‌استیلاسیون بیش از ۷۰ درصد و وزن مولکولی بین ۱۰ هزار تا ۱/۲ میلیون دالتون دارند (Benjakul et al, 2000).

فرمولاسیون جیره پایه و تجزیه ترکیب تقریبی آن بر طبق روش (AOAC, 1990) در (جدول۱) نشان-داده‌شده‌است. جیره پایه به عنوان جیره شاهد استفاده شد. کیتوزان با درجه دی استیلاسیون (DD) ۹۰٪ و وزن مولکولی (Mw) ۱۰ کیلو دالتون (وزن مولکولی کم) مطابق روش (Alishahi et al, 2011) تهیه شد. چهار جیره آزمایشی به مکمل حاوی ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ گرم کیتوزان به ازای هر کیلوگرم جیره اضافه شد. ۰/۷۵ گرم ژلاتین به ازای هر کیلوگرم غذا به جیره‌های آزمایشی و همچنین به جیره شاهد هم اضافه شد تا شرایط مشابهی با سایر جیره‌ها داشته‌باشد. بعد از اسپری کردن کیتوزان بر روی جیره، پلیت‌ها در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت خشک و سپس در یخچال نگهداری شدند. برای آگاهی از عملکرد جیره‌های غذایی و چگونگی رشد ماهیان، در ابتدا و هر دو هفته یک بار و همچنین در انتهای دوره پرورش، ماهیان زیست سنجی شدند. تغذیه بچه‌ماهیان در تیمارهای شاهد و آزمایشی بر اساس ۳٪ وزن بدن آنها محاسبه شده و روزانه در ۳ نوبت به مدت ۸ هفته به آنها غذا داده شد.

جدول ۱. ترکیبات شیمیایی جیره تجاری ماهی سفید

تجزیه تقریبی جیره	درصد ماده خشک
ماده خشک	۸۲/۴۶
پروتئین خام	۴۲/۳۹
چربی خام	۱۷/۱۹
خاکستر	۶/۵۶
فیبر	۵/۱

در انتهای دوره آزمایش، تغذیه ماهیان قطع شد و پس از ۲۴ ساعت از هر تیمار، به تعداد ۴ عدد ماهی با میانگین وزنی حدود ۴ گرم از آکواریوم‌ها برداشت شد و با عصاره گل میخک با غلظت ۱۵۰ppm بیهوش شدند سپس به‌وسیله اسکالپل تیز محوطه شکمی ماهی برش داده شد و بافت روده به طور کامل از سایر اندام‌های درونی جدا شد. نمونه‌های بافت روده بلافاصله در فرمالین ۱۰٪ جهت تثبیت غوطه‌ور و بعد از ۲۴ ساعت فرمالین تعویض شد؛ سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شد. برای تهیه مقاطع میکروسکوپی از بافت‌ها برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد و سپس رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین - ائوزین طبق روش (Vechklang et al, 2011) انجام شد. از میکروسکوپ نوری اینورت دارای دوربین برای مطالعه و عکس برداری از مقاطع تهیه شده، استفاده گردید سپس از بخش‌های مختلف اسلاید با استفاده از نرم افزار Digimaizer پارامترهای ارتفاع و عرض پرزها در حدود ۵ تکرار اندازه گیری و سپس میانگین گرفته‌شد.

همچنین در پایان دوره آزمایش از هر تیمار ۵ قطعه ماهی به طور تصادفی انتخاب و برای تعیین ترکیب تقریبی لاشه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شدند سپس آنالیز تقریبی ترکیب بدن ماهیان با روش‌های استاندارد بر طبق روش (AOAC, 1990) انجام شد؛ پروتئین کل با استفاده از دستگاه کجلدال (مدل Gerhardt, VAP-40)، چربی با استفاده از دستگاه سوکسله (مدل Gerhardt, SE-416)، رطوبت با استفاده از آون (مدل WT-binder, 7200) در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت و خاکستر با استفاده از کوره الکتریکی (مدل Naberther, B170) در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت اندازه‌گیری شد.

پس از اتمام دوره غذادهی در روز ۵۷، به منظور ارزیابی مقاومت به استرس شوری تعداد ۵ عدد ماهی به صورت کاملا تصادفی از هر تکرار گرفته شد و به مدت ۴۸ ساعت در مخازن جداگانه با هوادهی مناسب در معرض تنش شوری قرار گرفت (Jalali et al, 2008). به این منظور برای ایجاد شرایط طبیعی که آب رودخانه گرگان رود، محل طبیعی رهاسازی بچه‌ماهیان سفید است و دارای شوری ۱۰/۸ گرم در لیتر و آب منطقه خلیج گرگان دارای شوری ۱۳/۱ گرم در لیتر است (Akrami et al, 2009)، آب مخازن با شوری ۱۱ و ۱۳ ppt برای ایجاد شرایط طبیعی با آب دریا، آماده شد. مقاومت و ماندگاری بچه‌ماهیان پس از دوره زمانی ۴۸ ساعت تعیین گردید. دمای طبیعی آب در زمان استرس شوری ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. همچنین برای ارزیابی مقاومت در برابر استرس حرارتی، تعداد ۵ عدد ماهی به صورت کاملا تصادفی از هر تکرار گرفته شد و به مدت ۱۲ ساعت در مخازن جداگانه با هوادهی مناسب در معرض تنش حرارتی قرار گرفت. برای هر یک از تیمارهای آزمایشی آکواریوم‌های ۷۰ لیتری با حجم آبگیری ۲۰ لیتر با سه تکرار در نظر گرفته‌شد. سپس بچه‌ماهیان به طور جداگانه در آکواریوم‌های مربوط به همان تیمار توزیع شده و تحت دماهای ۳۰ و ۳۴ درجه سانتی‌گراد که این دما قبل از معرفی بچه‌ماهیان به آکواریوم‌ها توسط بخاری‌های الکتریکی آکواریومی (مدل ماهیران) (قرار داده شده در آب) ایجاد شده بود، قرار گرفتند (Ahmadifar et al, 2011). مقاومت و ماندگاری بچه‌ماهیان پس از دوره زمانی ۱۲ ساعت تعیین گردید. شوری طبیعی آب در زمان استرس حرارتی ۰/۲ گرم در لیتر بود. درصد بقا ماهیان پس از هر یک از چهار آزمایش استرس طبق رابطه زیر محاسبه شد :

$$\text{درصد بازماندگی} = \frac{\text{تعداد ماهیان مرده تحت استرس} - \text{تعداد ماهیان در آغاز استرس}}{\text{تعداد ماهیان در آغاز استرس}} \times 100$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک-طرفه با استفاده از آزمون دانکن و با کمک نرم افزارهای SPSS (نسخه ۱۶) و Excel انجام پذیرفت و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند و سطح اطمینان ۹۵ درصد به عنوان معیار معنی‌دار بودن اختلاف از نظر آماری در نظر گرفته‌شد.

۳. نتایج

میانگین مقادیر اندازه‌گیری شده اکسیژن محلول، درجه حرارت، pH و شوری در آکواریوم‌های پرورش طی روزهای مختلف در جدول ۲ نشان داده‌شده‌است.

مقایسه میانگین برخی پارامترهای مورفولوژیکی نظیر ارتفاع پرز، عرض پرز روده در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج حاصل شده نشان داد در ارتفاع پرز روده در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری وجود دارد ($P<۰/۰۵$). اما ضخامت پرز روده در هیچ کدام از گروه ماهیان آزمایشی تغذیه شده با کیتوزان در جیره و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P>۰/۰۵$)(شکل های ۱تا ۵).

یافته‌های حاصل از آنالیز بیوشیمیایی ترکیب بدن بچه‌ماهیان سفید هر تیمار آزمایشی در پایان دوره پرورش ۸ هفته‌ای در جدول ۴ نشان‌داده‌شده‌است. نتایج نشان داد که در مقادیر پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت حاصل از آنالیز بیوشیمیایی ترکیب بدن بچه ماهیان تغذیه شده با سطوح متفاوت کیتوزان اختلاف معنی‌داری بین تیمارها و گروه شاهد مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$).

جدول ۲. میانگین و انحراف معیار مقادیر اندازه‌گیری شده اکسیژن محلول، درجه حرارت، pH و شوری در آکواریوم های پرورش

اکسیژن محلول(mg/lit)	دمای آب(°C)	pH	شوری(ppt)
۵/۹±۰/۰۶	۲۵/۵۳±۰/۱۱	۷/۷۱±۰/۱	۰/۲±۰

* اعداد به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.

جدول ۳. مقایسه (میانگین ± انحراف معیار) صفات مورفولوژیکی روده بچه‌ماهیان سفید تغذیه شده با سطوح متفاوت کیتوزان در جیره (گرم بر کیلوگرم)

بافت روده	شاهد	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲
ارتفاع پرز روده(µm)	۲۷۱/۱۵ ± ۹/۹۰ ^{b}	۳۱۱/۹۸ ± ۲۷/۶۱ ^{ab}	۳۱۶/۹۳ ± ۲۴/۸۸ ^{a}	۳۱۹/۹۳ ± ۲۴/۸۸ ^{a}	۳۱۳/۰۹ ±۱۹/۵۱ ^{a}
ضخامت پرز روده (µm)	۱۱۰/۱۴ ± ۲۸/۷۴ ^{a}	۱۱۵/۱۵ ± ۵۶/۷۳ ^{a}	۹۳/۳۵ ± ۱۸/۳۵ ^{a}	۱۱۸/۷۸ ± ۹/۰۴ ^{a}	۱۱۰/۵۱ ±۱۰/۹۰ ^{a}

* حروف مشابه در یک ردیف اختلاف معنی‌داری ندارند. ($P>۰/۰۵$).

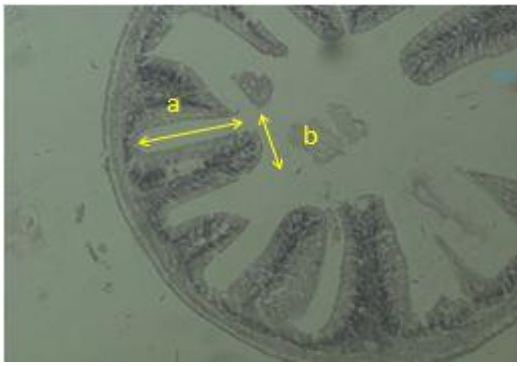
جدول ۴. میانگین ترکیبات بدن بچه‌ماهیان سفید (برحسب درصد ماده خشک) نسبت به اثر سطوح مختلف کیتوزان در جیره (گرم بر کیلوگرم)

ترکیبات بدن	شاهد	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲
رطوبت	۶۹/۷۹±۱/۱۷^{a}	۶۹/۰۲±۱/۰۵^{a}	۷۱/۰۷±۲/۴۸^{a}	۶۹/۷۸±۱/۱۰^{a}	۶۹/۹۱±۲/۰۰^{a}
پروتئین	۱۶/۵۳±۰/۵۸^{a}	۱۷/۱۹±۱/۷۶^{a}	۱۶/۲۴±۱/۶۰^{a}	۱۶/۵۲±۰/۵۱^{a}	۱۶/۳۸±۰/۳۸^{a}
چربی	۱۱/۸۵±۲/۱۱^{a}	۱۲/۷۴±۱/۲۵^{a}	۱۱/۵۰±۱/۱۳^{a}	۱۰/۰۹±۲/۱۵^{a}	۱۲/۸۶±۱/۴۱^{a}
خاکستر	۲/۲۸±۰/۳۷^{a}	۲/۳۵±۰/۴۰^{a}	۲/۱۸±۰/۳۳^{a}	۲/۲۹±۰/۲۵^{a}	۲/۴۶±۰/۲۸^{a}

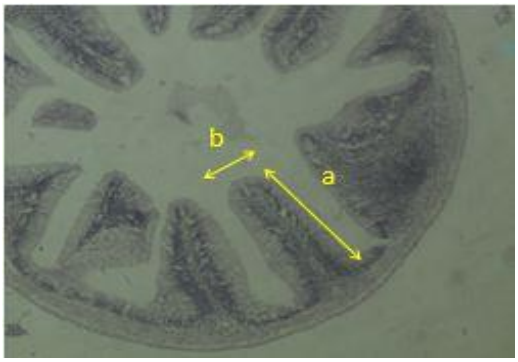
* اعدادی که در هر ردیف دارای حروف غیرمشابه هستند اختلاف معنی داری دارند ($P<۰/۰۵$).

میزان مرگ و میر و مقاومت ماهیان در تیمارهای آزمایشی پس از گذشت ۴۸ ساعت استرس شوری تفاوت قابل توجهی را نشان نداد ($P>۰/۰۵$) (جدول ۵) (شکل ۶ و ۷). میزان مرگ و میر و مقاومت ماهیان در

تیمارهای آزمایشی پس از گذشت ۱۲ ساعت استرس حرارتی ۳۴ درجه سانتی‌گراد تفاوت قابل توجهی را نشان داد ($P<۰/۰۵$)، به طوری که بیشترین درصد بقا در دمای ۳۴ درجه در تیمار چهارم (۱ گرم کیتوزان به ازای هر کیلوگرم جیره) مشاهده‌شد و گروه شاهد و تیمار دوم (۰/۲۵ گرم کیتوزان به ازای هر کیلوگرم جیره) ۱۰۰ درصد تلفات مشاهده شد. ولی در آب با درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد تنها تیمار پنجم (۲ گرم کیتوزان به ازای هر کیلوگرم جیره) کمترین درصد بقا و سایر تیمارها ۱۰۰ درصد بقا مشاهده شد (شکل ۸ و ۹) .

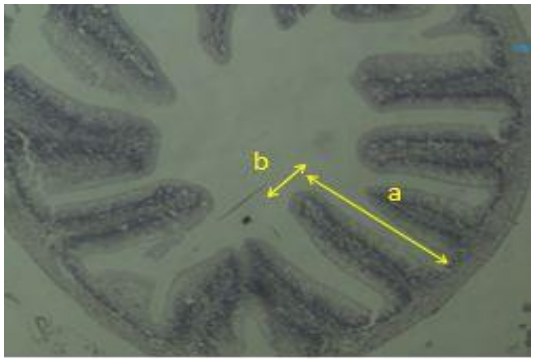


شکل ۱. بافت روده در بچه‌ماهیان سفید گروه شاهد

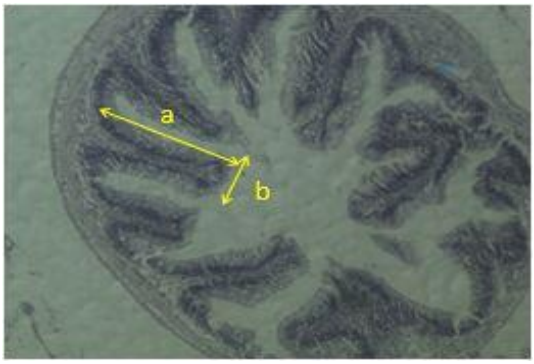


شکل۲. بافت روده در بچه‌ماهیان سفید تیمار دوم

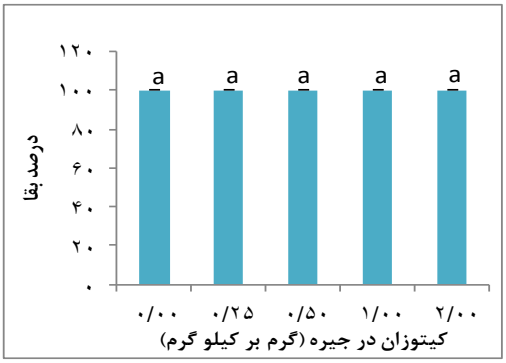
شکل۳. بافت روده در بچه‌ماهیان سفید تیمار سوم



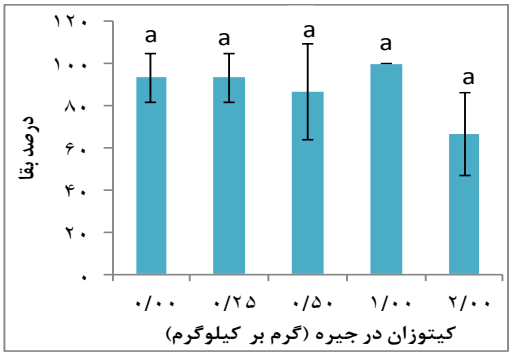
شکل۴. بافت روده در بچه‌ماهیان سفید تیمار چهارم



شکل۵. بافت روده در بچه‌ماهیان سفید تیمار پنجم
a: ارتفاع پرز، b: عرض پرز (هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمائی×۱۰۰)



شکل ۶. بازماندگی بچه‌ماهیان پس از تنش شوری ۱۱ ppt

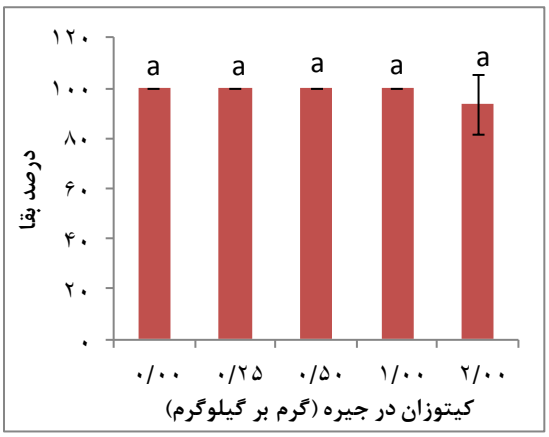


شکل ۷. بازماندگی بچه‌ماهیان پس از تنش شوری ۱۳ ppt

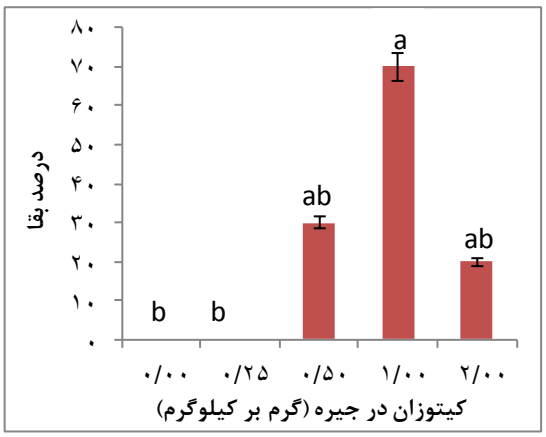
جدول ۵. درصد بازماندگی (میانگین ± انحراف معیار) تحت استرس های شوری و حرارتی در بچه‌ماهیان سفید تغذیه شده با سطوح متفاوت کیتوزان در جیره

آزمایش‌های استرسی / درصد بقا پس از تنش	شاهد	تیمار دوم	تیمار سوم	تیمار چهارم	تیمار پنجم
تنش شوری ۱۱ ppt	۱۰۰ ± ۰^{a}	۱۰۰ ± ۰^{a}	۱۰۰ ± ۰^{a}	۱۰۰ ± ۰^{a}	۱۰۰ ± ۰^{a}
تنش شوری ۱۳ ppt	۹۳/۳۳ ± ۱۱/۵۴^{a}	۹۳/۳۳ ± ۱۱/۵۴^{a}	۸۶/۶۶ ± ۲۳/۰۹^{a}	۱۰۰ ± ۰^{a}	۶۶/۶۶ ± ۱۹/۷۱^{a}
تنش حرارتی ۳۰°C	۱۰۰ ± ۰^{a}	۱۰۰ ± ۰^{a}	۱۰۰ ± ۰^{a}	۱۰۰ ± ۰^{a}	۹۳/۳۳ ± ۱۱/۵۴^{a}
تنش حرارتی ۳۴°C	۰^{b}	۰^{b}	۳۰/۰ ± ۱۱/۴۲^{ab}	۷۰/۰ ±۱۴/۱۴^{a}	۲۰/۰ ± ۱۲/۲۸^{ab}

* حروف مشابه در یک ردیف اختلاف معنی‌داری ندارند. (P>۰/۰۵).



شکل ۸. درصد بقا بچه‌ماهیان پس از تنش حرارتی ۳۰°c



شکل ۹. درصد بقا بچه‌ماهیان پس از تنش حرارتی ۳۴ °c

۴. بحث و نتیجه‌گیری

امروزه افزودن محرک‌های ایمنی به غذاها برای افزایش میزان مقاومت در برابر ابتلا به بیماری‌ها و کاهش میزان مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، رایج شده است که این افزودنی‌ها موجب فعال شدن گلبول سفید و افزایش سلامت روده گردیده و به وفور در پرورش ماکیان و سایر دام‌های پرورشی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Sado et al, 2008). تا به امروز، مطالعات زیادی در مورد استفاده از محرک‌های ایمنی در آبزی‌پروری انجام شده‌است. به عنوان مثال، برخی از مواد مانند گلوکان (Chen and Ainsworth, 1992)، لاکتوفرین (Sakai, 1999)، لوامیزول (Kajita et al, 1990)، کیتین و کیتوزان (Geng et al, 2011) به طور موفقیت آمیزی پاسخ ایمنی ماهی را افزایش می‌دهد. تحریک سیستم ایمنی مقاومت ماهی را در برابر شرایط نامطلوب از جمله تنش‌های محیطی و بیماری بهبود می‌بخشد. در این مطالعه اثر کیتوزان به عنوان یک محرک ایمنی بر بافت شناسی روده، ترکیب بدن و مقاومت در برابر استرس های شوری و حرارتی در بچه‌ماهیان سفید مورد سنجش قرارگرفت.

در این بررسی کیتوزان در جیره غذایی افزایش قابل توجهی در اندازه ارتفاع پرز روده ماهیان تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد داشته‌است که این نتیجه گیری با نتایج Kumari و همکاران (2013) همخوانی دارد به طوری که آنها نیز طی بررسی خود که برای افزایش اثر بخشی و ایمنی تریپسین خارجی از طریق

نانوکپسوله کردن در کیتوزان بر پارامترهای وابسته به بافت روده ماهی کپور هندی روهو (*Labeo rohita*) انجام گرفت، مشاهده‌کردند پرزهای سالم روده در ظاهر با ویژگی‌های مورفولوژیکی در ماهیان تغذیه شده با تریپسین نانوکپسوله شده با کیتوزان نسبت به تریپسین ساده بهبود یافت و پرزهای روده طویل‌تر شده‌بود. اما در این بررسی تفاوت قابل توجهی در اندازه ضخامت پرز روده بین تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد مشاهده نشد که با نتایج حاصل از این مطالعه همخوانی دارد. اگرچه عوامل مختلفی از جمله اجزای تغذیه‌ای، استرس و بیماری مورفولوژی روده را تحت تاثیر قرار می‌دهد، از همین‌رو مورفولوژی روده‌ای بر فیزیولوژی و متابولیسم از جذب مواد غذایی تاثیر دارد. سطح روده به‌وسیله ویژگی‌های مورفولوژیکی عمده مانند ارتفاع پرزها و ضخامت اپیتلیوم، تاثیر مصرف و جذب تعیین می‌شود و در نتیجه بر استفاده خالص از مواد مغذی در رژیم غذایی تاثیر می‌گذارد. افزایش در ارتفاع پرزها و کاهش در ضخامت اپیتلیوم فرآیند جذب را تسهیل می‌کند (Blomberg et al. 1993). Khambualai و همکاران (2009) در مطالعه خود بر عملکرد کیتوزان در جیره غذایی بر بافت‌شناسی روده در جوجه‌های گوشتی تفاوت قابل توجهی در ارتفاع پرزهای روده، منطقه پرزها، مساحت سلول مشاهده نکردند؛ همچنین Heidarieh و همکاران (2012) تاثیر ارگوسان در جیره بر بافت‌شناسی روده ماهی قزل آلای رنگین کمان را بررسی و بیان کردند که طول و ضخامت پرزهای روده ماهی در بین گروه‌های آزمایشی و گروه شاهد تغییر چندانی نداشت.

نتایج این تحقیق در مقادیر پروتئین، رطوبت، خاکستر و چربی حاصل از آنالیز بیوشیمیایی ترکیب بدن ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف کیتوزان اختلاف معنی‌داری نشان نداد. Shiau & Yu (1999) طی بررسی‌های خود مبنی بر اثر کیتین و کیتوزان بر رشد و مواد مغذی قابل هضم با جیره‌های حاوی فیبر در ماهی تیلاپیا بیان کردند که چربی و ماده خشک قابل هضم در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی کیتین از ماهیان تغذیه شده با جیره شاهد کمتر بود. همچنین در تحقیقی دیگر توسط Niu و همکاران (2013) محتویات چربی‌های عضلانی بدن میگوی ببری سبز (*Penaeus monodon*) با افزایش سطح کیتوزان در جیره غذایی کاهش یافت که با نتایج این تحقیق مطابقت ندارد.

در بررسی حاضر، مقاومت در برابر استرس شوری نتایج متفاوتی را در بین تیمارهای آزمایشی تغذیه شده با سطوح مختلف کیتوزان و گروه شاهد در پی نداشت. این نتایج با مطالعات Akrami و همکاران (2009) که به بررسی اثر پربیوتیک مانان الیگوساکارید بر مقاومت به تنش شوری در بچه‌ماهیان سفید پرداختند، مطابقت دارد. در طی این بررسی، میزان مرگ و میر و مقاومت ماهیان در تیمارهای آزمایشی پس از گذشت ۴۸ ساعت استرس شوری، با آب خلیج گرگان با شوری ۱۳/۱ گرم در لیتر و آب رودخانه گرگان‌رود با شوری ۱۰/۸ گرم در لیتر تفاوت قابل توجهی را نشان نداد. مقاومت در برابر استرس شوری تحت تاثیر عواملی مانند میزان شوری، عوامل محیطی، گونه، دست‌کاری، اندازه، سن، مراحل مختلف زیستی و شرایط تغذیه‌ای قرار دارد(clark, 1982). این احتمال هم وجود دارد که میزان تنش‌های شوری برای ماهی سفید کم بوده و روی بقای این ماهی تاثیری نداشته است شاید اگر میزان تنش‌های شوری بالاتر می‌بود اثر کیتوزان به عنوان محرک ایمنی بهتر نشان داده‌می‌شد.

در این تحقیق در تنش حرارتی ۳۴ درجه سانتی-گراد میزان بازماندگی بین تیمارهای آزمایشی و شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P<۰/۰۵$) به طوری که بیشترین میزان بازماندگی ماهیان پس از گذشت ۱۲ ساعت در تنش حرارتی ۳۴ درجه سانتی‌گراد با اختلاف

معنی‌داری در ماهیان تغذیه شده با ۱ گرم کیتوزان به ازای هر کیلوگرم جیره مشاهده شد ($P<0/05$). Ahmadifar و همکاران (2011) طی بررسی روی اثرات تغذیه با آرتمیا ارومیانا (*Artemia urmiana*) غنی شده با ارگوسان بر مقاومت در برابر استرس حرارتی در لارو تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) بیان کردند که درصد بازماندگی در گروه‌های مختلف آزمایشی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری طی استرس-های حرارتی ۳۰ و ۳۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت داشت که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد؛ اما در این مطالعه در استرس حرارتی ۳۰ درجه سانتی‌گراد تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی پس از گذشت ۱۲ ساعت مشاهده نشد. در مجموع اختلاف موجود در نتایج این تحقیق با یافته‌های دیگر محققان را احتمالا بتوان به نوع گونه پرورشی، اندازه، سن گونه پرورشی، طول دوره پرورش، شرایط محیطی، رفتارهای تغذیه‌ای، خصوصیات فیزیولوژیک، نوع مواد اولیه به کار رفته در تهیه جیره و کمیت و کیفیت آنها، فرمولاسیون جیره‌های غذایی، درجه خلوص کیتوزان و میزان مورد استفاده آن در جیره، نحوه اضافه کردن آن به جیره مرتبط دانست.

Meshkini و همکاران (2012) گزارش دادند که ماهی قزل آلای رنگین کمان با ۰/۲۵٪ کیتوزان در رژیم غذایی خود به طور قابل توجهی میزان مرگ و میر کمتر را در استرس‌های شوری، حرارتی و هایپوکسی نسبت به گروه‌های دیگر و کنترل نشان‌داد. بررسی‌های مختلفی توسط Niu و همکاران (2013) صورت گرفته است که بیان می‌کند کیتوزان در جیره غذایی بر بقا و مقاومت به استرس اکسیداتیو (اکسایشی) میگوی ببری سبز موثر بوده است. به طوری که بقا میگوها با جیره های غذایی حاوی کیتوزان بالاتر از سایر گروه ها بود که مطابق با نتیجه این مطالعه نشان می‌دهد کیتوزان به طور موثری سبب افزایش بقا در برابر تنش‌های محیطی در ماهی و میگو شده‌است. در مطالعه حاضر به نظر می-رسد چون بخش عمده‌ای از جذب مواد غذایی در پرزهای روده انجام می‌گیرد. افزایش طول پرزها باعث جذب بیشتر غذا شده است. بنابراین در ماهیان تغذیه شده با ۱ گرم بر کیلوگرم کیتوزان در جیره که طول پرز روده بیشتر شده، کیتوزان به عنوان یک محرک ایمنی جذب بیشتر داشته و باعث افزایش بقا ماهیان در برابر استرس حرارتی ۳۴ درجه سانتی‌گراد شده‌است.

با توجه به نتایج این بررسی کیتوزان به عنوان یک محرک ایمنی در سطح ۱ گرم بر کیلوگرم در جیره می تواند میزان بازماندگی و مقاومت بچه‌ماهیان سفید را در برابر استرس حرارتی ۳۴ درجه سانتی‌گراد و همچنین ارتفاع پرز روده را به صورت معنی‌داری افزایش دهد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کارکنان مرکز تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی سیجوال و همچنین مسئولین محترم آزمایشگاه آبزی‌پروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و کلیه کسانی که به نحوی در انجام این تحقیق همکاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌کنیم.

منابع

Ahmadifar, E., Shahriyari, A., Akrami R. 2011. Effects of *Artemia urmiana* nauplii bioencapsulated with Ergosan on growth factors, survival rate and stress resistance of Persian sturgeon (*Acipense persicus* Bordin, 1897) larvae. *Iranian Journal of Biology*, 24(4): 507-516.

Akrami, R., Karimabadi, A., Mohammad Zadeh, H. and Ahmadifar, E. 2009. Effect of prebiotic Manan oligosacarid on growth, body composition and salinity stress resistance in Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*). *Journal of Marine Sciences*, 8(4): 47-57.

Alishahi, A., Mirvaghefi, A., Tehrani, M. R., Farahmand, H., Koshio, S., Dorkoosh, F. A., et al. 2011. Chitosan nanoparticle to carry vitamin C through the gastrointestinal tract and induce the non-specific immunity system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Carbohydrat Polymers*, 86: 142– 146.

Anderson, D. P. and Siwicki, A. K. 1994. Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion. *Progressive Fish Culturist*, 56: 258–261.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1990. Official method of analysis AOAC. Washington DC, USA 1263P.

Benjakul, S., Viessanguan, W., Tanaka, M., Ishizaki, S., Suthdham, R. and Sugpech, O. 2000. Effect of chitin and chitosan on gelling properties of surimi from barred gar fish (*Hemiraphus far*.), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(1): 102-108.

Blomberg, L., Krivan, H. C., Cohen, P. S. and Conway, P. L. 1993. Piglet ileal mucus protein and glycolipid (galactosylceramide) receptors specific for *Escherichia coli* K88 fimbriae. *Infection and Immunity*, 61(6): 2526–2531.

Chen, D. and Ainsworth, A. J. 1992. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, Ictalurus punctatus Rafineque. *Journal of Fish Diseases*, 15: 295-304.

Clarke, W. 1982. Evaluation of the seawater challenge test as an index of marine survival. *Aquaculture*, 28: 177-183.

Cuesta, A., Esteban, M. A. and Meseguer, J. 2003. In vitro effect of chitin particles on the innate cellular immune system of gillhead seabream (*Sparus aurata L.*). *Fish and Shellfish Immunology*, 15: 1–11.

Emadi, H. 1986. Caspian kutum, past and present situation in the northern Iranian waters. *Iranian Fisheries Research Organization*, Pp9-16.

Fallahi, M., Daghigh Roohi, J., Nahrevar, M. R., Moradi chafi, M., Sarpanah, A. 2004. The role of rotifer (*Brachionus plicatilis*) in increasing survival of *Rutilus frisii kutum* larvae and its comparison by concentrated food. *Pajouhesh and Sazandegi*, 63: 66-71.

Geng, X., Dong, X. H., Tan, B. P., Yang, Q. H., Chi, S. Y., Liu, H. Y., et al. 2011. Effects of dietary chitosan and Bacillus subtilis on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Fish and Shellfish Immunology*, 31(3), 400-406.

Goorge, A. and Roberts, F. 1992. Chitin chemistry. In senior lecture in Dyeing Nottingham Polytechnic. The Macmilan press LTD, London, UK, Pp 349.

Heidarieh, M., Mirvaghefi, A. R., Akbari, M., Farahmand, H., Sheikhzadeh, N., Shahbazfar, A. A., et al. 2012. Effect of dietary Ergosan on growth performance, digestive enzymes, intestinal histology, hematological parameters and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(4): 1169-1174.

Hoffman, J., Johansen, A., Steiro, K., Gildberg, A., Stenberg, E. and Bøgwald, J. 1997. Chitooligosaccharides stimulate Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, head kidney leukocytes to enhanced superoxide anion production in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1 (118B): 105–115.

Holchik, J. 1995 . New fata on the ecology of kutum, *Rutilus frissi kutum* (Nordman, 1840) From the Caspian Sea. *Ecology of Fresh Water Fish*, 4: 175-179.

Jalali, M. A., Hosseini, S. A., Imanpour, M. R. and Alimohammadi, S. A. 2008. Effects of *Artemia urmiana* enriched with vitamin E and unsaturated fatty acids on the growth, survival and resistance to salinity in larvae beluga (*Huso huso*). *Iranian Journal of Fisheries*, 7: 49-58.

Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S. and Kobayashi, M. 1990. The immune-modulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathology*, 25: 93-98.

Khambualai, O., Yamauchi, K., Tangtaweewipat, S. and Cheva-Isarakul, B. 2009. Growth performance and intestinal

histology in broiler chickens fed with dietary chitosan. *British Poultry Science*, 50(5): 592-597.

Kim, S. K. and Rajapakse, N. 2005. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrat Polymer*, 62(4): 357-368.

Kumari, R., Gupta, S., Singh, A., Ferosekhan, S., Kothari, D., Pal, A. K., et al. 2013. Chitosan Nanoencapsulated Exogenous Trypsin Biomimics Zymogen-Like Enzyme in Fish Gastrointestinal Tract. *PLOS ONE*, 8(9): e74743. www.plosone.org.

Li, X. J., Piao, X. S., Kim, S. W., Liu, P., Wang, L., Shen, Y. B., et al. 2007. Effects of chito-oligosaccharide supplementation on performance, nutrient digestibility, and serum composition in broiler chickens. *Poultry Science*, 86: 1107–1114.

Meshkini, S., Tafy, A. A., Tukmechi A. and Farhangpajuh, F. 2012. Effects of chitosan on hematological parameters and stress resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Research Forum*, 3(1): 49-54.

Neverian, H. A., Mostafazadeh, S., Toluei, M. H. 2004. A study on various protein levels on growth indices of *Rutilus frisii kutum*, Kamenskii 1901 Advanced fry. *Pajouhesh and Sazandegi*, 68: 61- 68.

Niu, J., Lin, H. Z., Jiang, S. G., Chen, X., Wu, K. C., Liu, Y. J., et al. 2013. Comparison of effect of chitin, chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine on growth performance, antioxidant defenses and oxidative stress status of *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 372-375: 1-8.

Razavi Sayad, B. 1995. *Rutilus frissii Kutum*. *Iranian Fisheries Research Institute*, 164 p.

Romeran, K., Thu, B. J. and Evensen, O. 2002. Immersion delivery of plasmid DNAII. A study of the potential of a chitosan based delivery system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Journal of Controlled Release*, 85: 215-225.

Sado, R. J., Bicudo A. J. D. A. and Cyrno, J. E. P. 2008. Feeding dietary mannan oligosaccharid to juvenile nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), has no effect on hematological parameters and showed decreased feed consumption. *Journal of the World Aquaculture Society*, 39: 821-826.

Sakai, M. 1999. Current research status of fish immune-stimulants. *Aquaculture*, 172: 63-92.

Shahidi, F. and synwieki, J. 1991. Isolation and characterization of nutrients and value added products from snow crab (*Chinocete sopilio*) and shrimp (*Pandalus boreqlis*) processing discards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(8): 1532-1572.

Shiau, S. Y. and Yu, Y. P. 1999. Dietary supplementation of chitin and chitosan depresses growth in Tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. auratus*. *Aquaculture*, 179: 439–446.

Vechklang, K., Boonanuntanasarn, S., Ponchunchoovong, S., Pirarat, N. and Wanapu, C. 2011. The potential for rice wine residual as an alternative protein source in a practical diet for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at the juvenile stage. *Aquaculture Nutrition*, 17: 685–694.

Effect of chitosan diet on intestinal histology, body composition and salinity and thermal stresses resistance in Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*, Kamenskii 1901) fingerlings

Masume Kamali Najaf Abad[1*], Mohammad Reza Imanpoor, Vahid Taqizadeh, and Alireza Alishahi

Department of Fishery, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Abstract

This study was conducted to evaluate the effect of the chitosan diet on the intestinal histology, body composition and resistance towards salinity and thermal stresses in Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*) fingerlings. This research, using a completely random design, consisted of 0.25, 0.5, 1, and 2 g levels of chitosan per kg for each commercial diet of the Caspian kutum in three repititions. The Kutum fingerlings, with an average weight of 1.76 ± 0.15 g, were fed with the experimental diets for 8 weeks. At the end of the experiment, tissue sections were prepared by cutting 5mm-thick samples from the intestinses of the fish. To evaluate the resistance to salinity and thermal stresses, the fingerlings were exposed to a salinity stress of 11 ppt and 13 ppt and temperatures of 30 °C and 34 °C, afterwhich the survival rate was calculated. Microscopic observations showed that the intestinal villi height in the fish fed with the diet containing 1 g kg^{-1} of chitosan significantly increased to 319.93 µm compared to the control group ($P<0.05$). The biochemical analysis of body composition had not significant difference throughout the groups ($P>0.05$). Fish survival rate after 11 ppt and 13 ppt salinity stress showed no statistically significant difference ($P>0.05$), but the survival rate of the fish fed with the diet containing 1g kg^{-1} of chitosan after experiencing the 34 °C thermal stress significantly increased to 70% ($P<0.05$). The results suggest that a chitosan level of 1g kg^{-1} in the diet can not only affect the survival rate and resistance of kutum fingerlings against thermal stress, but can also affect the height of the intestinal villi.

Keywords: Chitosan, Intestinal histology, body composition, Stress, *Rutilus frisii kutum*

Table 1. The chemical composition of commercial diet Caspian kutum.

Table 2. Mean and standard deviation of the measured values of dissolved oxygen, the temperature, pH and salinity in rearing aquarium.

Table 3. Compare (mean ± SD) intestinal morphological of Caspian kutum fed diets with different levels of chitosan (g kg^{-1}).

Table 4. Average body composition Caspian kutum (based on dry matter) than the effect of chitosan in diets (g kg^{-1}).

Table 5. Survival rates (mean ± SD) under the salinity and thermal stress in Caspian kutum fed diets with different levels of chitosan.

*Corresponding author, E-mail: masume.kamali91@yahoo.com

Figure 1. Intestinal tissue in Caspian kutum control.

Figure 2. Intestinal tissue in Caspian kutum second treatment.

Figure 3. Intestinal tissue in Caspian kutum third treatment.

Figure 4. Intestinal tissue in Caspian kutum fourth treatment.

Figure 5. Intestinal tissue in Caspian kutum Fifth treatment.

a: Villus length, b: Villus thickness (hematoxylin – eosin, Zoom × 100).

Figure 6. Kutum survival rate after 11 ppt salinity stress

Figure 7. Kutum survival rate after 13 ppt salinity stress

Figure 8. Kutum survival rate after 30°C thermal stress

Figure 9. Kutum survival rate after 34°C thermal stress