مجله علمی شیلات ایران ۳۱(۵) ۵۳-٦٦ (DOI): 10.22092/ISFJ.2023.128391

مقاله علمی – پژوهشی:

اثر حفاظتی مکمل ویتامینی E و C در کاهش آثار روغن ماهی اکسید شده بر شاخص‌های رشد، خون‌شناسی و بیوشیمیایی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

مجتبی پوراحد انزابی[۱]، کوروش سروی مغانلو*[۱]، احمد ایمانی[۱]، راحله طهماسبی[۲]

*k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir

۱- گروه شیلات و آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۲- گروه شیمی تجزیه، کروماتوگرافی جهاد دانشگاهی، واحد ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ دریافت: مهر ۱٤۰۱ تاریخ پذیرش: آذر ۱٤۰۱

چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر حفاظتی ویتامین‌های E و C در کاهش آثار روغن ماهی اکسید شده جیره غذایی، بر شاخص‌های رشد، خون‌شناسی و بیوشیمیایی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام گرفت. بدین منظور، ۲۴۰ عدد بچه‌ماهی با میانگین وزنی ۷۵/۲۵±۱۲/۰ گرم در ۴ تیمار آزمایشی شامل تیمار ۱: جیره‌های غذایی حاوی روغن ماهی تازه، تیمار ۲: روغن ماهی اکسید شده، تیمار ۳: روغن ماهی اکسید شده به همراه سطح کم مکمل ویتامینی (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E، ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C) و تیمار ۴: روغن ماهی اکسید شده به‌همراه سطح زیاد مکمل ویتامینی (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E، ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C)، به مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. در پایان دوره آزمایش، شاخص‌های نرخ رشد ویژه (SGR)، درصد افزایش وزن بدن (%WG) و ضریب تبدیل غذایی (FCR) محاسبه شدند. همچنین شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی سرم (کلسترول، تری‌گلیسیرید، HDL و LDL) مورد سنجش قرار گرفتند. بر اساس نتایج حاصله، در تیمارهای ۲، ۳ و ۴ شاخص‌های SGR و %WG کاهش و FCR افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). تعداد گلبول‌های سفید (WBC)، تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، هموگلوبین (Hb) و هماتوکریت (Htc) در تیمارهای ۲، ۳ و ۴ افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). همچنین تری‌گلیسیرید و HDL به‌ترتیب در تیمارهای ۳ و ۴ افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). همچنین برای شاخص‌های کلسترول و LDL سرم، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف وجود نداشت ($p>۰/۰۵$). در نهایت، نتیجه‌گیری شد که روغن ماهی اکسید شده اثرات سوء بر شاخص‌های رشد، خون‌شناسی و بیوشیمیایی دارد و مکمل ویتامینی در کاهش این اثرات بر فراسنجه‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی موثر است.

لغات کلیدی: روغن ماهی اکسید شده، ویتامین‌های E و C، شاخص‌های رشد، فراسنجه‌های خونی و بیوشیمیایی، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

*نویسنده مسئول

مقدمه

تغذیه ماهیان پرورشی با جیره غذایی با کیفیت از اهمیت بالایی برخوردار است و رشد بهینه و کاهش هزینه تولید را به‌دنبال خواهد داشت (Bureau *et al*., 2006). کیفیت مناسب جیره غذایی به تازگی مواد خام اولیه از جمله منابع پروتئینی و چربی آن بستگی دارد (Hardy and Castro, 1994). روغن ماهی از اجزاء مهم جیره غذایی آبزیان به‌ویژه ماهیان گوشت‌خوار محسوب می‌شود و شرایط نگهداری نامناسب و عدم رعایت استانداردهای کیفی آن می‌تواند کیفیت جیره تولیدی را تحت تأثیر قرار دهد (Denis *et al*., 1998). این محصول به دلیل داشتن اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه[1] در برابر فساد اکسیداتیو بسیار حساس است و ویژگی‌های کیفی آن طی مدت زمان نگهداری در اثر فساد باکتریایی و اکسیداتیو کاهش می‌یابد (Hultin, 1994; Mexis *et al*., 2009). ترکیبات فرار حاصل از شکسته‌شدن، واکنش اکسیداتیو و واکنش هیدرولیتیک چربی‌ها (هیدروپراکسیدها، آلدئیدها، کتون‌ها، اسیدهای چرب) بر بو، طعم، رنگ، بافت، ارزش غذایی و به طور کلی، کیفیت ماهی اثر سوء می‌گذارد (Hras *et al*., 2000; Sakanaka *et al*., 2005). تغذیه با جیره حاوی روغن ماهی اکسید شده، رشد و سیستم ایمنی ماهیان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در مطالعه نجفی حاجی‌پور و همکاران (۱۴۰۰) رشد نهایی و نرخ رشد ویژه در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با جیره حاوی روغن اکسید شده کاهش یافت. حسن‌پور و همکاران (۱۳۹۵) نیز مشابه همین نتایج را گزارش کردند که تغذیه تاس‌ماهیان هیبرید (*Huso huso* ♂ × *Acipenser ruthenus* ♀) با جیره حاوی روغن ماهی اکسید شده در برخی شاخص‌های رشد و بیوشیمیایی کاهش نشان داد. همچنین Fotagne-Dicharvy و همکاران (۲۰۱۴) کاهش عملکرد سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) تغذیه شده با روغن ماهی اکسید شده را عنوان کردند. در اثر ورود اکسیژن، رادیکال‌های آزاد اسیدچرب آلوکسی، کتون‌ها و آلدهیدها تولید شده و باعث آسیب رساندن به اجزاء سلولی مانند اسیدهای چرب، پروتئین‌ها و DNA می‌شود. این مشکلات در جیره‌هایی که به مقدار کافی آنتی‌اکسیدان ندارند، بیشتر دیده می‌شود (Diaz *et al*., 2010). اگرچه ماهیان دارای سیستم دفاع آنتی اکسیدانی هستند که نقش حذف رادیکال‌های آزاد را برعهده دارند، اما ظرفیت سلول‌ها برای تولید این گونه آنزیم‌ها محدود است و با قرارگرفتن ماهیان در معرض عوامل استرس‌زا، عملکرد آنها دچار چالش جدی می‌شود (Halliwell and Gutteridge, 1990). از سویی، مقادیر ناکافی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی جیره غذایی ممکن است باعث کاهش این سیستم دفاعی و افزایش حساسیت به استرس اکسیداتیو شود (Mohebii *et al*., 2012). در چنین شرایطی، افزودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی از جمله ویتامین‌ها به جیره غذایی، اثرات ضد اکسیداتیو خود را اعمال می‌کنند (Attia and El- Demerdash, 2002) به‌طوری‌که بررسی اثرات حفاظتی ویتامین‌های E و C در مواجهه با سم دیازینون در مطالعه علی و همکاران (۱۳۹۳) نشان داد که این ویتامین‌ها در بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان موثر بود. آنتی‌اکسیدان‌های ویتامینی وظیفه حفاظت خارجی از سلول‌ها را در برابر رادیکال‌های آزاد به‌عهده دارند. این دسته از آنتی‌اکسیدان‌ها شامل ویتامین E به عنوان یک ترکیب زیستی محلول در چربی و نیز آنتی‌اکسیدان اصلی محلول در آب (ویتامین C) هستند (Adams and Best, 2002).

ویتامین E (توکوفرول) با فرمول مولکولی ($C_{22}H_{50}O_2$) یکی از چهار ویتامین محلول در چربی است که برای عملکرد طبیعی سلول‌ها ضروری است و موجب افزایش حیات و دوام گلبول‌های قرمز خون می‌شود و نقش اساسی در تنفس سلولی ایفاء می‌کند. این ویتامین با اتصال به لیپوپروتئین‌های غشاء سلول از اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع موجود در ساختمان غشاء سلول جلوگیری می‌کند (فاطمی، ۱۳۹۵).

[1] Polyunsaturated fatty acid

ویتامین C (ال- آسکوربات)، با فرمول مولکولی ($C_6H_8O_6$) یکی از ویتامین‌های بسیار مهم محلول در آب است که به نام اسید آسکوربیک نیز شناخته می‌شود. با توجه به این‌که ماهیان به دلیل فقدان آنزیم ال- گلونولاکتون اکسیداز نمی‌توانند گلوکز را به اسیدآسکوربیک تبدیل کنند، بایستی ویتامین C به جیره غذایی اضافه گردد (Ibiyo *et al.*, 2007). این ویتامین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی زیستی در واکنش‌های هیدروکسیلاز، در سلول و بافت عمل می‌کند و می‌تواند مقاومت سلول‌ها را در برابر عوامل اکسیدکننده ارتقاء دهد (Verlhac *et al.*, 1996). از دیگر عملکرد آن می‌توان به افزایش قدرت دفاعی ماهیان به‌ویژه در دوره‌های مصرف طولانی با حفظ میزان هموگلوبین، افزایش تعداد سلول‌های لنفوسیت و ذخیره در گلبول‌های سفید اشاره نمود (Azad *et al.*, 2007; Oikawa *et al.*, 2008).

با توجه به حساسیت بالای روغن ماهی در برابر اکسیداسیون حین فرآیند تولید و نگهداری که منجر به کاهش کیفیت این محصول می‌گردد و این‌که پیش‌تر تاثیر حفاظتی ویتامین‌های آنتی‌اکسیدانی بر عملکرد و وضعیت فیزیولوژیک ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به اثبات رسیده است، تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر حفاظتی مکمل ویتامینی E و C در کاهش آثار فساد اکسیداتیو روغن ماهی بر شاخص‌های رشد، خون‌شناسی و بیوشیمیایی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان طراحی و اجرا شد.

مواد و روش کار

تهیه ماهی و شرایط انجام آزمایش

تعداد ۲۴۰ عدد بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بامیانگین وزنی ۰/۲۵±۱۲/۷۵ گرم از یک کارگاه حد واسط در استان آذربایجان‌غربی تهیه شده و به سالن تکثیر و پرورش پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه منتقل شدند. ماهی‌ها پس از گذراندن دو هفته دوره سازگاری با محیط جدید، با تراکم ۲۰ عدد به صورت تصادفی در مخازن ۳۰۰ لیتری در قالب ۴ تیمار و ۳ تکرار ذخیره شدند. منبع تامین آب جهت پرورش بچه‌ماهیان آب چاه با دبی ۰/۵ لیتر در ثانیه برای کل مخازن و با میانگین دمایی ۰/۵± ۱۵ درجه سانتی‌گراد بود. به منظور ساخت جیره، اقلام اولیه تهیه شده و بخشی از روغن ماهی خریداری شده به منظور حفظ تازگی در فریزر ۲۰- و بخشی نیز جهت اکسید شدن در آون با دمای ۵۰ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۶ روز توأم با هوادهی (Fotagne-Dicharvy *et al.*, 2014) نگهداری شد. پس از این مرحله، شاخص‌های تیوباربیتوریک اسید (TBA) و پراکساید (PV) به منظور مشخص نمودن درجه اکسیداسیون روغن ماهی تازه و اکسید شده، سنجش شدند (جعفرپور و همکاران، ۱۳۹۶؛ Egan *et al.*, 1981; AOAC, 2005). مقدار TBA برای روغن ماهی تازه و اکسید شده به‌ترتیب ۰/۱۵ و ۱/۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم مالون دی‌آلدهید و مقدار PV برای روغن ماهی تازه و اکسید شده به‌ترتیب ۱۰۰/۹ و ۱۴۹/۵ میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم به‌دست آمد. در ادامه، اقلام غذایی با درصدهای مشخص (جدول ۱) به همراه سطوح مختلف ویتامین‌های E و C جهت تنظیم و تهیه جیره‌های غذایی آزمایشی (جدول ۲) استفاده شد.

جدول ۱: ترکیب اقلام جیره غذایی پایه (NRC, 1993)

Table 1: Basic diet composition

ردیف	اقلام اولیه	درصد در جیره
۱	آرد گندم	۱۱
۲	آرد سویا	۲۰
۳	گلوتن گندم	۱۱
۴	پودر ماهی	۳۵
۵	مخمر	۱۰
۶	روغن ماهی	۱۰
۷	کولین کلراید	۱
۸	مکمل معدنی و ویتامینی	۲

جهت تأمین حداقل نیاز ماهیان به ویتامین‌ها در جیره پایه ۱ درصد از مکمل ویتامینی استفاده شد که حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C بود. جیره‌های تولیدی پس از آنالیز تقریبی جیره پایه (جدول ۳) با ثبت تیمار و تاریخ ساخت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و به مدت ۸ هفته جهت تغذیه ماهیان استفاده گردید. غذادهی روزانه ماهیان به صورت ۳ درصد وزن بدن و در سه نوبت انجام و مقدار

مصرف غذای روزانه برحسب گرم یادداشت شد (Hung *et al*, 2008).

جدول ۲: تیمارهای آزمایشی
Table 2: Experimental treatments

تیمار	کیفیت روغن ماهی	ویتامین E (میلی‌گرم بر کیلوگرم جیره غذایی)	ویتامین C (میلی‌گرم بر کیلوگرم جیره غذایی)
۱	تازه	۱۰۰ (پایه)	۱۵۰ (پایه)
۲	اکسید شده	۱۰۰ (پایه)	۱۵۰ (پایه)
۳	اکسید شده	۱۰۰ (پایه) +۱۰۰ (مکمل)	۱۵۰ (پایه) +۲۰۰ (مکمل)
۴	اکسید شده	۱۰۰ (پایه) +۲۰۰ (مکمل)	۱۵۰ (پایه) +۴۰۰ (مکمل)

جدول ۳: آنالیز تقریبی جیره غذایی پایه
Table 3: Basic diet analysis

شاخص	پروتئین خام	چربی خام	خاکستر	رطوبت
درصد	۴۲/۲	۱۸/۱	<۱۰	<۱۱

محاسبه شاخص‌های رشد

ماهیان در پایان دوره پرورش جهت بررسی تغییرات شاخص‌های رشد زیست‌سنجی شدند. با استفاده از داده‌های مربوط به وزن و مقدار غذای خورده شده، شاخص‌های نرخ رشد ویژه (SGR)، درصد افزایش وزن بدن (WG) و ضریب تبدیل غذا (FCR) براساس روابط ذیل محاسبه شدند (Hamza *et al*., 2008):

۱۰۰× ((روز) طول دوره پرورش/ (لگاریتم طبیعی وزن اولیه – لگاریتم طبیعی وزن نهایی)) = نرخ رشد ویژه

(۱۰۰× (وزن اولیه/((گرم) وزن اولیه – (گرم) وزن نهایی) = درصد افزایش وزن بدن

(گرم) مقدار غذای خشک داده شده/ (گرم) افزایش وزن = ضریب تبدیل غذایی

سنجش شاخص‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی

در پایان دوره آزمایشی و پس از بیهوشی ماهیان بامحلول پودر گل میخک با غلظت ۲۵۰ قسمت در میلیون با استفاده از سرنگ آغشته به هپارین از ساقه دمی خون‌گیری به‌عمل آمد (Akhlaghi and Mirab Brojerdi, 1997). سپس خون‌ها به میکروتیوب‌های ۱/۵ سی‌سی انتقال داده شده و در دمای یخچال نگهداری شدند. تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) با استفاده از محلول هایم و توسط ملانژور به روش توصیه شده Lewis و همکاران (۲۰۰۶)، مقدار هموگلوبین (Hb) از روش استاندارد سیانومت هموگلوبین و بر اساس روش Blaxhall و Daisley (۱۹۷۳) و میزان درصد هماتوکریت (%Htc) نیز با استفاده از میکروهماتوکریت و به روش توصیه شده Rehulka (۲۰۰۰) به‌دست آمد. همچنین حجم متوسط سلولی (MCV)، حجم متوسط هموگلوبین (MCH) و متوسط غلظت هموگلوبین (MCHC) بر اساس روش توصیه شده Lewis و همکاران (۲۰۰۶) بر اساس روابط ذیل محاسبه شدند:

تعداد گلبول‌های قرمز بر حسب میلیون/(هماتوکریت × ۱۰) = MCV

تعداد گلبول‌های قرمز بر حسب میلیون/(هموگلوبین × ۱۰) = MCH

هماتوکریت/(هموگلوبین × ۱۰) = MCHC

شمارش گلبول‌های سفید به کمک ملانژور و لام نئوبار انجام گرفت و در نهایت پس از مراحل رنگ‌آمیزی به‌وسیله گیمسا، تعداد هر یک از سلول‌ها در شمارش افتراقی گلبول‌های سفید (نوتروفیل، مونوسیت، لنفوسیت و ائوزینوفیل) به صورت جداگانه محاسبه شد (Lewis *et al.*, 2006). جهت سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی پس از بی‌هوشی ماهیان، خون‌گیری از ساقه دمی انجام شد. در ادامه پس از اینکه خون‌ها لخته شدند، با استفاده از سانتریفیوژ (۳۵۰۰ دور در ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) سرم به دست آمده جداسازی و به میکروتیوب منتقل و تا انجام آزمایش در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Klontz, 1994). اندازه‌گیری تری‌گلیسیرید به روش آنزیمی لیپاز (Lipase/GPO-PAP) و کلسترول و کلسترول چگالی بالا (HDL) به روش کلسترول اکسیداز[1] انجام گرفت (Borges *et al.*, 2004). کلسترول کم چگالی (LDL) نیز با استفاده از فرمول ارائه شده از Friedewald و همکاران (۱۹۷۲) محاسبه شد:

LDL = کلسترول - (HDL + ۱/۵ تری‌گلیسیرید)

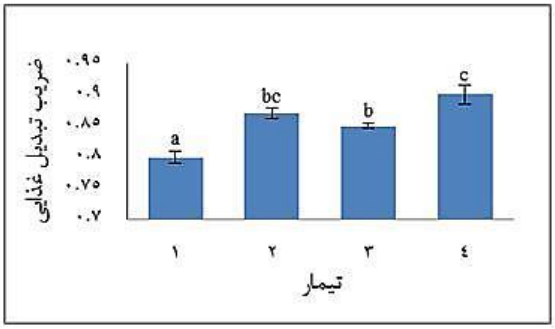
روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

پژوهش حاضر به صورت یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس‌ها به‌ترتیب با استفاده از آزمون‌های کولموگروف- اسمیرنوف و لون بررسی شد. برای آنالیز داده‌ها از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و با توجه به نرمال بودن داده‌ها برای مقایسه میانگین تیمارهای مختلف از آزمون توکی استفاده و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه گردیدند. حداقل سطح معنی‌دار بودن آزمون‌ها، ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. برای انجام آنالیزهای آماری از نرم افزار SPSS و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

شاخص‌های رشد

نتایج شاخص‌های رشد در شکل‌های ۱ الی ۳ نشان داده شده است. بر اساس نتایج شاخص ضریب تبدیل غذایی، تیمار ۱ با تیمارهای ۲، ۳ و ۴ اختلاف معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). همچنین تیمار ۴ در مقایسه با تیمارهای ۱ و ۳ دارای اختلاف معنی‌داری بود ($p<۰/۰۵$) و کمترین و بالاترین ضریب تبدیل غذایی به ترتیب در تیمارهای ۱ و ۴ مشاهده شد. نتایج مربوط به شاخص‌های نرخ رشد ویژه و درصد افزایش وزن بدن نیز نشان داد که تیمار ۱ با تیمارهای ۲، ۳ و ۴ دارای اختلاف معنی‌داری بود ($p<۰/۰۵$). کمترین و بالاترین نرخ رشد ویژه و درصد افزایش وزن بدن به ترتیب در تیمارهای ۴ و ۱ مشاهده شد.



شکل ۱: تغییرات شاخص ضریب تبدیل غذایی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف پرورشی

۱: جیره حاوی روغن ماهی تازه، ۲: جیره حاوی روغن ماهی اکسید شده، ۳: جیره حاوی روغن ماهی اکسید شده، ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C، ۴: جیره حاوی روغن ماهی اکسید شده، ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C

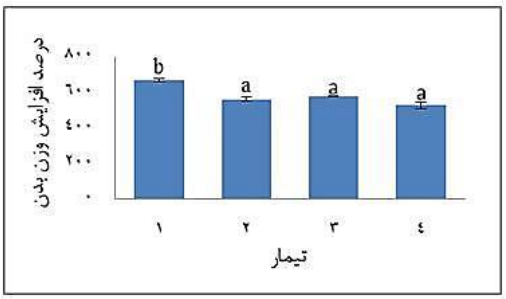
Figure 1: Food Conversion Ratio of rainbow trout in different treatments

1: A diet containing fresh fish oil Fresh fish oil, 2: A diet containing oxidized fish oil, 3: A diet containing oxidized fish oil, 100 mg/kg vitamin E, 200 mg/kg vitamin C, 4: A diet containing oxidized fish oil, 200 mg/kg vitamin E, 400 mg/kg vitamin C

[1] Cholestrol oxidase

شاخص‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی

نتایج آزمون مقایسه میانگین‌های مربوط به شاخص‌های خون‌شناسی (جدول ۴) نشان داد که تعداد گلبول‌های سفید (WBC)، تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) و هموگلوبین (Hb) در تیمار ۱، با تیمارهای ۲، ۳ و ۴ اختلاف معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$).

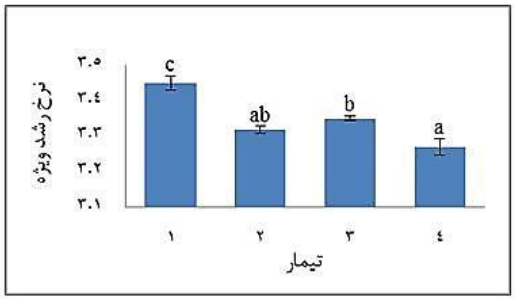


شکل ۲: تغییرات شاخص درصد افزایش وزن بدن ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف پرورشی

۱: جیره حاوی روغن ماهی تازه، ۲: جیره حاوی روغن ماهی اکسید شده، ۳: جیره حاوی روغن ماهی اکسید شده، ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C، ۴: جیره حاوی روغن ماهی اکسید شده، ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C

Figure 2: Weight Gain% of rainbow trout in different treatments

1: A diet containing fresh fish oil Fresh fish oil, 2: A diet containing oxidized fish oil, 3: A diet containing oxidized fish oil, 100 mg/kg vitamin E, 200 mg/kg vitamin C, 4: A diet containing oxidized fish oil, 200 mg/kg vitamin E, 400 mg/kg vitamin C



شکل ۳: تغییرات نرخ رشد ویژه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف پرورشی

۱: جیره حاوی روغن ماهی تازه، ۲: جیره حاوی روغن ماهی اکسید شده، ۳: جیره حاوی روغن ماهی اکسید شده، ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C، ۴: جیره حاوی روغن ماهی اکسید شده، ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C

Figure 3: Specific Growth Rate of rainbow trout in different treatments

1: A diet containing fresh fish oil Fresh fish oil, 2: A diet containing oxidized fish oil, 3: A diet containing oxidized fish oil, 100 mg/kg vitamin E, 200 mg/kg vitamin C, 4: A diet containing oxidized fish oil, 200 mg/kg vitamin E, 400 mg/kg vitamin C

جدول ۴: مقایسه شاخص‌های خون‌شناسی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان برای تیمارهای مختلف پرورشی (Mean ± SE, n=3)

۱: جیره حاوی روغن ماهی تازه، ۲: جیره حاوی روغن ماهی اکسید شده، ۳: جیره حاوی روغن ماهی اکسید شده، ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C، ۴: جیره حاوی روغن ماهی اکسید شده، ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C

Table 4: Hematological indices of rainbow trout in different treatments

1: A diet containing fresh fish oil Fresh fish oil, 2: A diet containing oxidized fish oil, 3: A diet containing oxidized fish oil, 100 mg/kg vitamin E, 200 mg/kg vitamin C, 4: A diet containing oxidized fish oil, 200 mg/kg vitamin E, 400 mg/kg vitamin C

شاخص	تیمار			
	۱	۲	۳	۴
WBC (میلی‌متر ^{۳} × ۱۰^{۳})	۴/۶±۰/۴۷^{a}	۶/۶±۰/۳۹^{b}	۷/۶±۰/۱۲^{bc}	۸/۸±۰/۱۸^{c}
RBC (میلی‌متر ^{۳} × ۱۰^{۶})	۱/۳±۰/۰۳^{a}	۱/۴±۰/۰۳^{b}	۱/۵±۰/۰۳^{bc}	۱/۶±۰/۰۲^{c}
Hb (گرم بر دسی‌لیتر)	۷/۲±۰/۱۶^{a}	۸/۱±۰/۱۴^{b}	۸/۶±۰/۱۳^{bc}	۹/۲±۰/۱۷^{c}
Htc (درصد)	۳۶/۳±۰/۶۷^{a}	۴۰/۳±۰/۸۸^{b}	۴۳/۳±۰/۸۸^{b}	۴۷±۰/۵۸^{c}
MCV (فمتولیتر)	۲۷۸±۱/۱۵^{a}	۲۷۶/۳±۲/۰۳^{a}	۲۸۳±۲/۰۸^{ab}	۲۸۶±۰/۵۸^{b}

شاخص	تیمار			
	۱	۲	۳	۴
MCH (پیکوگرم)	۵۵/۴±۰/۰۶	۵۵/۶±۰/۰۹	۵۶/۳±۰/۴۷	۵۶/۲±۰/۴۳
MCHC (گرم بر دسی‌لیتر)	۱۹/۹±۰/۱	۲۰/۱±۰/۱	۱۹/۶±۰/۳	۱۹/۶±۰/۱
نوتروفیل (درصد)	$۱۳±۰/۶^{a}$	$۱۶±۰/۶^{ab}$	$۱۵/۷±۱/۲^{ab}$	$۱۷±۰/۶^{b}$
لنفوسیت (درصد)	$۸۱/۷±۰/۳^{b}$	$۷۹/۷±۰/۳^{ab}$	$۷۹±۱/۲^{ab}$	$۷۷/۳±۰/۷^{a}$
مونوسیت (درصد)	۵±۰/۶	۳/۷±۰/۳	۴/۷±۰/۳	۵/۳±۰/۳
ائوزینوفیل (درصد)	۰/۳±۰/۳	۰/۷±۰/۳	۰/۷±۰/۷	۰/۳±۰/۳

همچنین تیمار ۲ در مقایسه با تیمار ۴ دارای اختلاف معنی‌داری بود ($p<۰/۰۵$). کمترین و بالاترین WBC، RBC و Hb به‌ترتیب در تیمارهای ۱ و ۴ مشاهده شد. همچنین درصد هماتوکریت (Htc%) در تیمار ۱ با تیمارهای ۲، ۳ و ۴ و در تیمار ۲ و ۳ با تیمار ۴ اختلاف معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). کمترین و بالاترین Htc% به‌ترتیب در تیمارهای ۱ و ۴ مشاهده شد. نتایج مربوط به شمارش افتراقی لنفوسیت و نوتروفیل نیز نشان داد که تیمار ۱ با تیمار ۴ و برای حجم متوسط گلبولی (MCV) تیمارهای ۱ و ۲ با تیمار ۴ اختلاف معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). این نتایج برای شاخص‌های هموگلوبین متوسط گلبولی (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC)، مونوسیت و ائوزینوفیل اختلاف معنی‌داری را بین تیمارها نشان نداد ($p>۰/۰۵$).

نتایج آزمون مقایسه میانگین‌های مربوط به شاخص‌های بیوشیمیایی (جدول ۵) نشان داد که تری‌گلیسیرید در تیمارهای ۱، ۲ و ۴ با تیمار ۳ دارای اختلاف معنی‌داری بودند ($p<۰/۰۵$). کمترین و بالاترین میزان تری‌گلیسیرید به‌ترتیب در تیمارهای ۴ که حاوی سطح بالای مکمل ویتامینی و ۳ که حاوی سطح پایین مکمل ویتامینی بود، مشاهده شد. همچنین شاخص HDL تیمار ۱ با تیمار ۴ اختلاف معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). کمترین و بیشترین میزان HDL به‌ترتیب در تیمارهای ۱ و ۴ مشاهده شد. اگرچه نتایج آزمون مقایسه میانگین‌های مربوط به شاخص‌های کلسترول و LDL اختلاف بین تیمارها را نشان نداد ($p>۰/۰۵$)، اما کمترین و بیشترین میزان کلسترول به‌ترتیب در تیمارهای ۲ و ۳ مشاهده شد. برای شاخص LDL نیز کمترین میزان در تیمارهای ۲ و ۴ و بیشترین آن در تیمار ۱ مشاهده شد.

جدول ۵: مقایسه شاخص‌های بیوشیمیایی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان برای تیمارهای مختلف پرورشی (Mean ± SE, n=3)
۱: جیره حاوی روغن ماهی تازه، ۲: جیره حاوی روغن ماهی اکسید شده، ۳: جیره حاوی روغن ماهی اکسید شده، ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C، ۴: جیره حاوی روغن ماهی اکسید شده، ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C

Table 5: Biochemical indices of rainbow trout in different treatments
1: A diet containing fresh fish oil Fresh fish oil, 2: A diet containing oxidized fish oil, 3: A diet containing oxidized fish oil, 100 mg/kg vitamin E, 200 mg/kg vitamin C, 4: A diet containing oxidized fish oil, 200 mg/kg vitamin E, 400 mg/kg vitamin C

شاخص	تیمار			
	۱	۲	۳	۴
کلسترول (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	۳۵۳/۷±۱/۵	۳۴۸±۱/۷	۳۵۸/۷±۴/۱	۳۵۳/۷±۱/۵
تری‌گلیسیرید (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	$۲۳۰/۳±۴/۶^{a}$	$۲۱۵/۷±۴/۶^{a}$	$۲۶۰±۳/۱^{b}$	$۲۱۳±۳/۲^{a}$
HDL (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	$۳۳/۲±۰/۴^{a}$	$۳۵/۳±۰/۸^{ab}$	$۳۷/۸±۲/۵^{ab}$	$۳۹/۹±۰/۳^{b}$
LDL (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	۱۳۴±۰/۶	۱۳۱/۷±۰/۳	۱۳۳/۷±۰/۹	۱۳۱/۷±۰/۳

بحث

کیفیت پایین جیره غذایی در ماهیان پرورشی می‌تواند به کیفیت مواد خام اولیه، از جمله روغن ماهی مربوط گردد. این محصول به دلیل داشتن اسیدهای چرب، در برابر فساد اکسیداتیو و باکتریایی بسیار حساس است و طی مدت زمان نگهداری دچار کاهش کیفیت می‌شود (Hultin, 1994; Mexis *et al*., 2009). ترکیبات فرار حاصل از واکنش‌های اکسیداتیو و هیدرولیتیک چربی‌ها بر فیزیولوژی آبزیان تاثیر می‌گذارد (Hras *et al*., 2000; Sakanaka *et al*., 2005).

در تحقیق حاضر، شاخص‌های مرتبط با رشد تحت تاثیر روغن ماهی اکسید شده قرار گرفت به‌طوری‌که ضریب تبدیل غذایی در همه گروه‌های حاوی روغن اکسید شده افزایش یافت. شاخص‌های نرخ رشد ویژه و درصد افزایش وزن بدن نیز در گروه‌های حاوی روغن اکسید شده در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت. روغن اکسید شده جیره غذایی با اثر بر فیزیولوژی ماهیان و آسیب رساندن به اجزاء سلولی، رشد آنها را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Diaz *et al*., 2010). نتایج مطالعات Chen و همکاران (۲۰۱۳) بر ماهی باس دهان بزرگ (*Micropterus salmoide*)، نجفی حاجی‌پور و همکاران (۱۴۰۰) بر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*)، حسن‌پور و همکاران (۱۳۹۵) بر تاس‌ماهی هیبرید (*H. huso* ♂ × *A. ruthenus* ♀) و Laohabanjong و همکاران (۲۰۰۹) بر میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*)، نشان‌دهنده تاثیر روغن ماهی اکسید شده جیره غذایی بر شاخص‌های رشد است که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی دارند. از سویی، نتایج مطالعات Le و همکاران (۲۰۱۳)، Khan و همکاران (۲۰۱۷) و Izquierdo و همکاران (۲۰۱۹) به‌ترتیب بر شاه ماهی (*Seriola lalandi*)، ماهی ماهزر (*Tor putitora*) و ماهی سیم دریایی (*Sparus aurata*) نشان داد که ویتامین‌های آنتی‌اکسیدانی E و C با جلوگیری از شکل‌گیری رادیکال‌های آزاد باعث بهبودی کارایی تغذیه و شاخص‌های رشد شدند. اما در تحقیق حاضر شاخص‌های رشد تحت تاثیر این ویتامین‌ها قرار نگرفت و گروه‌های حاوی مکمل ویتامینی با گروه حاوی روغن اکسید شده (فاقد مکمل ویتامینی) اختلاف معنی‌داری نداشتند. مشابه همین نتایج افزودن ویتامین E به جیره حاوی روغن اکسید شده در مطالعه Wang و همکاران (۲۰۱۶) تاثیری بر اکثر شاخص‌های رشد ماهی *Larmichthys crocea* نداشت. همچنین در مطالعه نجفی حاجی‌پور و همکاران (۱۴۰۰) نیز افزودن ویتامین E به میزان ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم جیره غذایی تاثیری در بهبود شاخص‌های رشد در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) تغذیه شده با روغن ماهی اکسید شده نداشت. در برخی پژوهش‌ها مشخص گردید که مکمل ویتامینی به‌تنهایی قادر به بهبود شاخص‌های رشد در مواجهه با روغن ماهی اکسید شده نبوده است و حضور هم‌زمان ویتامین‌ها به همراه آنتی‌اکسیدان‌های معدنی مانند سلنیوم را پیشنهاد داده‌اند (Chen *et al*., 2013). همچنین طول دوره پرورشی از دیگر عوامل موثر شناخته شده است به‌طوری‌که در مطالعه فلاحتکار و همکاران (۱۳۸۵) افزودن سطوح مختلف ویتامین C به جیره فیل‌ماهیان جوان (*H. huso*) نشان داد که تا انتهای هفته چهارم پرورشی باعث بهبود شاخص‌های رشد شد، اما در انتهای هفته هشتم پرورشی تاثیری بر این شاخص‌ها نداشت. تصور بر این است که در گونه‌های مختلف ماهیان مقدار افزودن ویتامین‌ها به جیره غذایی و نیز طول دوره پرورشی، از عوامل موثر تاثیر مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی بر بهبود شاخص‌های رشد باشد.

بررسی روند تغییرات فراسنجه‌های خون‌شناسی مطالعه حاضر نشان داد که تعداد گلبول‌های سفید، تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و درصد هماتوکریت در همه گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد افزایش داشت. محققین افزایش این شاخص‌ها را در مواجهه با عوامل تنش‌زا (جیره‌های فاسد یا آلوده) در ماهیان گزارش کرده‌اند (Van der Oost *et al*., 2003; Campbell *et al*., 2005; Davis *et al*., 2008). در مطالعه نجفی حاجی‌پور و همکاران (۱۴۰۰) نیز برخی از شاخص‌های خونی در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) تغذیه شده با جیره حاوی روغن اکسید شده افزایش یافت که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. از مهم‌ترین بررسی‌های سلامت فیزیولوژیک ماهیان، سنجش شاخص‌های خونی

بوده که مرتبط با نوع تغذیه، گونه ماهی و عوامل محیطی است و می‌توان با ارزیابی این شاخص‌ها به شرایط تغذیه‌ای ماهیان پی برد (Fanouraki *et al*., 2007). افزایش تعداد گلبول‌های قرمز و به تبع آن افزایش هموگلوبین و هماتوکریت در مواجهه با تنش‌های تغذیه‌ای و محیطی جهت جبران کمبود انتشار اکسیژنی به بافت‌ها دیده می‌شود (Van der Oost *et al*., 2003). از سویی، نتایج این مطالعه بیانگر آن است که در گروه‌های تغذیه شده با مکمل ویتامینی نیز افزایش این شاخص‌ها مشاهده می‌شود. بررسی‌های قبلی نشان دادند که استفاده از ویتامین‌ها در جیره غذایی ماهیان باعث افزایش شاخص‌های خونی می‌شود. نتایج مطالعات Yildirim-Aksoy و همکاران (۲۰۰۸) بر گربه ماهی *Ictalurus punctatus*، Pimpimol و همکاران (۲۰۱۲) بر گربه‌ماهی *Pangasianodon gigas* و Nsonga و همکاران (۲۰۰۹) بر ماهی تیلاپیا (*Oreochromis karongae*) نشان داد که شاخص‌های خونی در گروه‌هایی که با مکمل‌های ویتامینی تغذیه شدند، افزایش یافت. نتایج این مطالعات با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی دارند. افزایش جذب آهن با حضور ویتامین C از دلایل تغییرات شاخص‌های خونی در برخی مطالعات بیان شد (Xie and Niu, 2006; Ibiyo *et al*., 2007). برخی منابع نیز افزایش این شاخص‌ها را تاثیر عوامل تغذیه‌ای مانند ویتامین‌ها و ریزمغذی‌ها بر مکانیسم Erythropoiesis (آزاد شدن اریتروسیت‌ها از بافت‌های خون‌ساز) و کاهش حجم پلاسما عنوان کردند (Yildirim-Aksoy *et al*., 2008).

بررسی شاخص‌های بیوشیمیایی مطالعه حاضر نشان داد که کلسترول، تری‌گلیسیرید و LDL سرم خون در ماهیان تغذیه شده با روغن ماهی اکسید شده کاهش یافت و در ماهیانی که همراه با روغن ماهی اکسید شده از مکمل ویتامینی نیز تغذیه شدند، افزایش داشت. اگرچه روند این تغییرات معنی‌دار نبود اما در گروهی که حاوی سطح کم مکمل ویتامینی بود، بالاترین سطح این شاخص‌ها ثبت شد. برای شاخص HDL روند تغییرات متفاوت بود به‌طوری‌که این شاخص در گروه‌هایی که حاوی روغن اکسید شده و مکمل ویتامینی بود، روند افزایشی داشت. با توجه به این‌که سطوح غلظت این شاخص‌ها به عنوان یکی از مؤلفه‌های وضعیت سلامت ماهیان مطرح هستند، می‌توان کاهش تری‌گلیسیرید و افزایش کلسترول چگالی بالا (HDL) را در گروه‌هایی که از مکمل ویتامینی سطح بیشینه تغذیه شدند، به خواص آنتی‌اکسیدانی ویتامین‌ها نسبت داد (Gul *et al*., 2011). مطالعات متعددی از تاثیر انواع آنتی‌اکسیدان‌ها بر غلظت این شاخص‌ها در ماهیان ارائه شد که با نتایج تحقیق حاضر هم‌سو هستند (Otunola *et al*., 2010; Talpur *et al*., 2013). کاهش شرایط استرسی به‌وسیله آنتی‌اکسیدان‌ها منجر به کاهش گلوکز پلاسما می‌شود. در ادامه هورمون‌های اپی‌نفرین و گلوکاکون باعث فعال شدن گلوکونئوژنز و لیپولیز می‌شوند و تجزیه تری‌گلیسیرید اتفاق می‌افتد و غلظت آن کاهش می‌یابد. سپس اسیدهای چرب آزاد شده وارد گردش خون می‌شوند و در فرآیند چرخه اسید سیتریک انرژی تولید می‌کنند. ادامه این روند منجر به تولید کلسترول چگالی بالا می‌گردد (Larsson and Lewander, 1973; Palmegiano *et al*., 1993). البته در مطالعه حاضر، تری‌گلیسیرید سرم در ماهیان تغذیه شده با سطح پایین مکمل ویتامینی افزایش یافت. برخی محققین افزایش سطح تری‌گلیسیرید سرم خون ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی مکمل آنتی‌اکسیدانی را به نقش‌های احتمالی آنها در تأمین انرژی مورد نیاز در زمان تنش نسبت دادند (Harsij *et al*., 2020). به‌نظر می‌رسد، به دنبال افزایش سطح آنتی‌اکسیدانی جیره غذایی و کاهش شرایط استرس اکسیداتیو، غلظت تری‌گلیسیرید سرم نیز کاهش می‌یابد (Gul *et al*., 2011).

به طور کلی، با توجه به نتایج به‌دست آمده از این آزمایش می‌توان چنین بیان نمود که روغن ماهی اکسید شده اثرات سوء بر شاخص‌های رشد، خون‌شناسی و بیوشیمیایی دارد. همچنین استفاده از مکمل ویتامینی در کاهش اثرات روغن ماهی اکسید شده، بر شاخص‌های خونی و برخی شاخص‌های بیوشمیایی موثر است.

منابع

جعفرپور، س.ع.، شریفی، ا.، حسینی، م.ه.، ۱۳۹۶. بررسی ثبات و کنترل نرخ اکسایش روغن ماهی

قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در نانو کپسول‌های حاوی اسانس میخک (*Syzygium aromaticum*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۶(۶): ۶۹-۵۷. Doi: 115688.2018.ISFJ/22092.1

حسن‌پور، س.، سلاطی، ا.، فلاحتکار، ب. و محمدی آذرم، ح.، ۱۳۹۵. اثرات تغذیه با روغن ماهی اکسید شده بر رشد و متابولیسم چربی در تاس‌ماهی هیبرید (*Huso huso* ♂ × *Acipenser ruthenus* ♀). مجله علوم و فنون دریایی، ۲: ۸۸-۷۸. Doi: 10.22113/JMST.2016.41156

علی، م.، میروافقی، ع.، پورباقر، ه. و اسدی، ف. ۱۳۹۳. مطالعه اثر مکمل‌های ویتامین E، سلنیوم و C بر فعالیت دفاع آنتی‌اکسیدانی و شاخص پراکسیداسیون لیپید قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مواجهه با غلظت تحت حاد دیازینون. نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی، ۱: ۹۲-۷۵.

فاطمی، ح.، ۱۳۹۵. شیمی مواد غذایی. انتشارات شرکت سهامی انتشار، چاپ شانزدهم، ۴۸۰ صفحه.

فلاحتکار، ب.، سلطانی، م.، ابطحی، ب.، کلباسی، م.ر.، پورکاظمی، م. و یاسمی، م.، ۱۳۸۵. تاثیر ویتامین C بر برخی پارامترهای رشد، نرخ بازماندگی و شاخص کبدی در فیل‌ماهیان (*Huso huso*) جوان پرورشی. پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان، ۷۲: ۱۰۳-۹۸.

نجفی حاجی‌پور، ا.، حسینی، س.و.، فرحمند، ح.، مجازی امیری، ب. و سلطانی، م.، ۱۴۰۰. اثر پروتئین هیدرولیز شده، ویتامین E و روغن اکسید شده بر عملکرد رشد، شاخص‌های خون‌شناسی و کیفیت لاشه‌ی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله منابع طبیعی ایران، ۷۴(۱): ۱۵-۱.

Adams, A.K. and Best, T.M., 2002. The role of antioxidants in exercise and disease prevention. The *Physician and Sports Medicine*, 30(5): 37-44. Doi: 10.3810/psm.2002.05.281

Akhlaghi, M. and Mirab Brojerdi, M., 1997. Investigating the effect of anesthetizing clove in fish and determining its LC50. *Journal of Veterinary Research*, 54(2): 49-52.

AOAC, 2005. Official methods of analysis of association of official agriculture chemists. 18th ed, Washington, Gaithersburg. 25 P.

Attia, A.M. and El-Demerdash, F.M., 2002. Potent protective effects of melatonin on cypermethrin induced oxidative damage in rats in vivo. *Journal Pest Control Environmental Science*, 10: 91–104.

Azad, I.S., Dayal, J.S., Poornia, M. and Ali, S.A., 2007. Supra dietary level of vitamins C and E enhance antibody production and immune memory in juvenile milkfish, *Chanos chanos* to formalin-killed *Vibrio vulnificus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 23: 154-163. Doi: 10.10116/J.FSI.2006.09.014

Blaxhall, P.C and Daisley, K.W., 1973. Routine hematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, (5): 771-781. Doi: 10.1111/j.1095-8649.1973.tb04510.x

Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F. and Wassermann, G.F., 2004. Hematologic and Serum biochemical values for jundia (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 30:21-25. Doi: 10.1007/s10695-004-5000-1

Bureau, D.P., Hua, K. and Cho, C.Y., 2006. Effects of feeding level on growth and nutrient composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss walbaum*) growing from 150 to 600 g. *Aquaculture Research*,

37(11): 1090- 1098. Doi: 10.1111/j.1365-2109.2006.01532.x

Campbell, H.A., Handy, R.D. and Sims, D.W., 2005. Shifts in a fish's resource holding power during a contactpaired interaction: the influence of a copper contaminated diet in rainbow trout. *Physiological and Biochemical Zoology*, 78: 706-714. Doi: 10.1086/432146.

Chen, Y.J., Liu, Y.J., Tian, L.X., Niu, J., Liang, G.Y., Yang, H.J., Yuan, Y. and Zhang, Y.Q., 2013. Effect of dietary vitamin E and selenium supplementation on growth, body composition, and antioxidant defense mechanism in juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoide*) fed oxidized fish oil. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39:593–604. Doi: 10.1007/s10695-012-9722-1

Davis, A.K., Maney, D.L. and Maerz, J.C., 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*, 22(5): 760-772. Doi: 10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x

Denis, R.M., Ma, I.A., Cruz-Suarez., L.E., Cusin, M. and Pike, A.I.H., 1998. Raw material freshness, a quality criterion for fish meal fed to shrimp. *Aquaculture*, 165: 95-109. Doi: 10.1016/S0044-8486(98)00229-4

Diaz, M.E., Furne, M., Trenzado, C.E., GarcíaGallego, M., Domezain, A. and Sanz, A., 2010. Antioxidant defences in the first life phases of the sturgeon *Acipenser naccarii*. *Aquaculture*, 307: 123-129. Doi: 10.1016/J.aquaculture.2010.06.026

Egan, H., Kirk. R.S., Sawyer, R. and Pearson, D., 1981. Pearson's chemical analysis of foods. Churchill Livingstone, 9th ed, PP 150-153.

Fanouraki, B. P., Divanach, M. and Pavlidis, M., 2007. Baseline values for acute and chronic stress indicators in sexually immature red progy (*Pargrus pagrus*). *Aquaculture*, 265: 294-304. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.01.006

Fotagne-Dicharvy, S., Lataillade, E., Surget, A., Larroquet, L., Cluzeaud, M. and Kaushik, S., 2014. Antioxidant defense system is altered by dietary oxidized lipid in first-feeding rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 424-425: 220-227. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.01.009

Friedewald, W.T., Levy, R.I. and Fredrickson, D.S., 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 18(6): 499–502. Doi: 10.1093/clinchem/18.6.499

Gul Y., Gao Z.X., Qian X.Q. and Wang W.M., 2011. Haematological and serum biochemical characterization and comparison of wild and cultured northern snakehead (*Channa argus* Cantor, 1842). *Journal of Applied Ichthyology*, 27(1): 122–128. Doi: 10.1111/j.1439-0426.2010.01565.x

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and*

Biophysics Journal, 280(1): 1–8. Doi: 10.1016/0003-9861(90)90510-6

Hamza, N., Mhetli, M., Ben, I., Cahu, C. and Kestemont, P., 2008. Effect of dietary phospholipid levels on performance, enzyme activities and fatty acid composition of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *Aquaculture*, 275(1-4): 274–282. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.01.014

Hardy, R.W. and Castro, E., 1994. Characteristics of the Chilean salmonid feed industry. *Aquaculture*, 124: 307-320. Doi: 10.1016/0044-8486(94)90404-9

Harsij, M., Gholipour Kanani, H. and Adineh, H., 2020. Effects of antioxidant supplementation (nano selenium, vitamin C and E) on growth performance, blood biochemistry, immune status and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under sub-lethal ammonia exposure. *Aquaculture*, 521: 734942. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.734942

Hras, A.R., Hadolin, M., Knez, Z. and Bauman, D., 2000. Comparison of antioxidative and synergistic effect of rosemary extract with αtochopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry*, 71: 229-233. Doi: 29.157.852

Hultin, H.O., 1994. Oxidation of lipids in seafoods, in Seafoods: Chemistry, Processing, Technology and Quality, ed by Shahidi F and Botta JR. Blackie Academic and Professional, Glasgow, UK. pp 49–74.

Hung, S.S.Y., Fu, C.H.L., Higgs, D.A., Blfry, S.K., Schulte, P.M. and Brauner, C.J., 2008. Effects of dietary canola oil level on growth performance, fatty acid composition and ionoregulatory development of spring Chinook salmon parr, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Aquaculture*, 274:109-117. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.11.011

Ibiyo, L.M.O., Atteh, J.O., Omotosho, J.S. and Madu, C.T., 2007. Vitamin C (ascorbic acid) requirments of *heterobranchus longifilis* fingerling. Journal of *Biotechnology*, 16: 1567. Doi: 10.5897/AJB2007.000-2225

Izquierdo, M., Dominguez, D., Jimenez, J.I., Saleh, R., Hernandez-Cruz, C.M., Zamorano, M.J. and Hamre, K., 2019. Interaction between taurine, vitamin E and vitamin C in microdiets for gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, 498: 246–253. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.07.010

Khan, K.U., Zuberi, A., Nazir, S., Ullah, I., Jamil, Z. and Sarwar, H., 2017. Synergistic effects of dietary nano selenium and vitamin C on growth, feeding, and physiological parameters of mahseer fish (*Tor putitora*). *Aquaculture Reports*, 5: 70–75. Doi: 10.1016/j.aqrep.2017.01.002

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. 21–132.

Laohabanjong, R., Tantikitt, C., Benjakul, S., Supamattaya, K. and Boonyaratpalin, M., 2009. Lipid oxidation in fish meal stored under different conditions on growth, feed efficiency and hepatopancreatic cells of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 286: 283-289.

Larsson A. and Lewander K., 1973. Metabolic effects of starvation in the eel, *Anguilla anguilla* L. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 44: 367–374. Doi: 10.1016/0300-9629(73)90489-1

Le, K.T., Fotedar, R. and Partridge, G., 2013. Selenium and vitamin E interaction in the nutrition of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*), physiological and immune responses. *Aquaculture Nutrition*, 20(3): 303–313. Doi: 10.1111/anu.12079

Lewis, S., Bain, B. and Bates, I., 2006. Dacie and Lewis Practical Hematology. Tenth Edition. Philadelphia, PA. Churchill Livingstone, Elsevier. 722p. Doi: 10.1016/B0-44-306660-4/50007-6

Mexis, S.F., Chouliara, E. and Kontominas, M.G., 2009. Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf life extension of rainbow trout fillets stored at degrees C. *Food Microbiology*, 26(6): 598-605. Doi: 10.1016/j.fm.2009.04.002

Mohebii, A., Nematollahi, A., Ebrahimi, D.E. and Goodarzian, A.F., 2012. Influence of dietary garlic (*Allium sativum*) on the antioxidative status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*, 43(8): 1184–1193. Doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.02922.x

NRC (national research council), 1993. Nutrient requirements of fish. National Academy press, Washington, D.C., USA.

Nsonga, A.R., Kangombe, J., Mfitilodze, W., Soko, C.K. and Mtethiwa, A.H., 2009. Effect of varying levels of dietary vitamin c (Ascorbic acid) on growth, survival and hematology of juvenile Tilapia, *Oreochromis karongae* (Trewavas 1941) reared in aquaria. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, 13 (2): 17-23. Doi: 10.14210/bjast.v13n2.p17-23

Oikawa, D., Ando, H., Mishiro, K. and Furuse, M., 2008. Dietary Hydroxyproline improves collagen contents of the fillet in Tiger Puffer (*Takifugu rubripes*). *Journal of Fisheries International*, 3(2): 49-51. Doi: jfish.2008.49.51

Otunola, G.A., Oloyede, O.B., Oladiji, A.T. and Afolayan, A.J., 2010. Comparative analysis of the chemical composition of three spices *Alium sativum* L., *Zingiber officinale* Rosocoe and *Capsicum frutescens* L. commonly consumed in Nigeria. *Africa Biotechnology*, 9(41): 6927-6931. Doi: 10.5897/AJB10.183

Palmegiano, G.M., Bianchini, M., Boccignone, M., Forneris, G., Sicuro, B. and Zoccarato, I., 1993. Effects of starvation and meal timing on fatty acid composition in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Rivista Italian Aquaculture*, 28: 5–11.

Pimpimol, T., Phoonsamran, K. and Chitmanat, C., 2012. Effect of dietary vitamin C supplementation on the blood

parameters of Mekong Giant Catfish (*Pangasianodon gigas*). *International Journal of Agriculture & Biology*, 14 (2): 256-260.

Rehulka, J., 2000. Influence of astaxanthin on growth rate, condition and some blood indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 190: 27-47. Doi: 10.1016/S0044-8486(00)00383-5

Sakanaka, S., Tachibana, Y. and Okada, Y., 2005. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (Kakinoha-cha). *Food Chemistry*, 89(4): 569-575. Doi: 10.1016/j.foodchem.2004.03.013

Talpur, A.D., Ikhwanuddin, M. and Ambok Bolong, A., 2013. Nutritional effects on ginger (*Zingiber officinal* Rosocoe) on immune response of Asian sea bass (*Lates cacarifer*) and disease resistance against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*, 400-401: 46-52. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.02.043

Van der Oost, R., Beyer, J. and Vermeulen, N.P.E, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, Environ. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 13: 57-149. Doi: 10.1016/s1382-6689(02)00126-6

Verlhac, V., Gabaudan, J., Obach, A., Schüep, W. and Hole, R., 1996. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 143: 123-133. Doi: 10.1016/0044-8486(95)01238-9

Wang, J., Xu, H., Zuo, R., Mai, K., Xu, W. and Ai, Q., 2016. Effects of oxidized dietary fish oil and high-dose vitamin E supplementation on growth performance, feed utilization and antioxidant defense enzyme activities of juvenile large yellow croaker (*Larmichthys crocea*). *British Journal of Nutrition*, 115: 1531-1538. Doi: 10.1017/S0007114516000398

Xie, Z. and Niu, C., 2006. Dietary ascorbic acid requirement of juvenile ayu (*Plecoglossusaltivelis*). *Aquaculture Nutrition*, 12: 151-156. Doi: 10.1111/j.1365-2095.2006.00395.x

Yildirim-Aksoy, M., Lim, C., Li, M.H. and Klesius, P.H., 2008. Interaction between dietary levels of vitamins C and E on growth and immune responses in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Aquaculture Research*, 39(11): 1198-1209. Doi: 10.1111/j.1365-2109.2008.01984.x.

The protective effect of vitamin E and C supplements on reducing the effects of oxidized fish oil on growth, hematological and biochemical indices in rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*)

Pourahad Anzabi M.[1]; Sarvi Moghanlou K.[1*]; Imani A.[1]; Tahmasebi R.[2]

*k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir

1- Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Urmia, Urmia, Iran.
2- Department of Chromatography, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research, Urmia, Iran.

Abstract

The present study aimed to evaluate the protective effect of vitamins E and C on reducing the effects of dietary oxidized fish oil on the growth, hematological and biochemical indices of rainbow trout fry. For this purpose, 240 fries with an average weight of 12.75±0.25 g were fed with 4 treatments including, treatment 1: a diet containing fresh fish oil, treatment 2: a diet with oxidized fish oil, treatment 3: a diet containing oxidized fish oil along with the low level of vitamin supplements (100 mg/kg vitamin E, 200 mg/kg vitamin C) and treatment 4: a diet with oxidized fish oil along with the high level of vitamin supplement (200 mg/kg vitamin E, 400 mg/kg vitamin C) for 60 days. At the end of the trial, the indices of specific growth rate (SGR), weight gain percentage (WG), and food conversion ratio (FCR) were calculated. Also, the hematological and serum biochemical parameters: cholesterol, triglyceride, high density lipoprotein (HDL), and low density lipoprotein (LDL) were measured. Based on the obtained results, the SGR and WG, were decreased in 2, 3 and 4 treatments and the FCR was increased ($p<0.05$). The white blood cells (WBC), red blood cells (RBC), hemoglobin (Hb), and hematocrit (Htc) levels were increased in 2, 3, and 4 treatments ($p<0.05$). The triglyceride and HDL contents were increased in 3 and 4 treatments, respectively ($p<0.05$). Also, there were not significant differences between different treatments for serum cholesterol and LDL indices ($p>0.05$). Finally, it was concluded that oxidized fish oil has adverse effects on growth, hematological and biochemical indices, and the vitamin supplements are effective in reducing these effects on the hematological and biochemical parameters.

Keywords: Oxidized fish oil, Vitamins E and C, Growth indices, Hematological and biochemical parameters, Rainbow trout

*Corresponding author