نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۰، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷، ص. ۳۱۰-۲۹۷

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 10, No. 2, Summer 2018, p. 297-310

مقایسه تأثیر استفاده از پودر کرم توبیفکس (*Tubifex tubifex*) پرورشی و تجاری در جیره غذایی بر شاخص‌های رشد و ایمنی ماهی آنجل (*Pterophylum scalare*) قبل و بعد از تنش هوا

محسن برخوردار[۱]- رضا ولی‌زاده[۲*]- امید صفری[۳]- محمدرضا احمدی[۴]- عباسعلی ناصریان[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۲۳

چکیده

کرم توبیفکس (*Tubifex tubifex*) یکی از انواع غذاهای زنده در صنعت آبزی‌پروری است که با توجه به ارزش غذایی فراوان آن از لحاظ پروتئین، چربی خام، انواع اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب ضروری (W6 و W3) و استفاده این ماده غذایی در غذای ماهیان زینتی باعث بهینه‌سازی روند رشد، بازماندگی زیاد و بهبود سیستم ایمنی فراهم می‌شود.در این تحقیق اثر استفاده از پودر کرم توبیفکس پرورشی، توبیفکس تجاری و غذای پلت بر عملکرد رشد و شاخص‌های ایمنی ماهی آنجل در طول مدت ۶۳ روز بررسی شد. ماهیان در سه تیمار و سه تکرار با تراکم ۱۵ قطعه در۹ آکواریوم ۲۰ لیتری با متوسط وزن اولیه بچه ماهیان به مقدار۰/۲۱±۱۹/۵۵ گرم ذخیره‌سازی و به‌صورت کاملاً تصادفی توزیع شدند. غذادهی به‌صورت روزانه در سه نوبت ۷ صبح، ۱۳ ظهر و ۲۰ شب و به میزان ۳ درصد وزن بدن انجام گرفت. نتایج در انتهای دوره پرورش نشان داد که تغذیه غذای حاوی پودر کرم توبیفکس پرورشی باعث رشد بیشتر (۰/۰۲±۱/۸۰درصد وزن بدن در روز) نسبت به غذای حاوی توبیفکس تجاری (۳۱٪+) و غذای حاوی پلت (۲۷٪+) شد ($p<0/05$). وزن نهایی ماهیان تغذیه شده با غذای حاوی پودر توبیفکس پرورشی به‌طور معنی‌داری به میزان ۳۰ درصد و ۲۶ درصد نسبت به ماهیان تغذیه شده با غذای حاوی توبیفکس تجاری و غذای حاوی پلت بیشتر بود. تغذیه غذای حاوی پودر توبیفکس پرورشی با ضریب تبدیل بهتر (۰/۰۳±۱/۴۴) و به‌ترتیب ۱۱ درصد و ۱۹ درصد نسبت به تغذیه غذای حاوی پلت و غذای حاوی توبیفکس تجاری همراه بود ($p<0/05$). ایمونوگلوبین کل، لیزوزیم و فعالیت کمپلمان بعد از تنش هوا در تیمار تغذیه غذای حاوی پودر توبیفکس پرورشی به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. همچنین میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی (آمیلاز، پروتئاز و لیپاز) در ماهیان تغذیه شده با پودر کرم توبیفکس پرورشی بیشتر بود. مقدار دو آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در تیمار حاوی پودر کرم توبیفکس پرورشی نسبت به دو تیمار دیگر کمتر بود ($p<0/05$). بر اساس نتایج به‌دست آمده می‌توان گفت که تغذیه ماهی آنجل با غذای حاوی پودر کرم توبیفکس پرورشی به‌ویژه در زمان شروع تغذیه فعال می‌تواند باعث بهبود رشد و برخی شاخص‌های ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی شود.

واژه‌های کلیدی: ایمنی، تنش هوا، کرم توبیفکس، ماهی آنجل (*Pterophyllum scalare*)

مقدمه

تکثیر و پرورش ماهیان زینتی یکی از بخش‌های کارآمد صنعت آبزی‌پروری به‌ویژه در مقیاس تجاری محسوب می‌شود (۴۷). صنعت آبزی‌پروری زینتی تجاری در جهان با حجم معاملات حدود ۹ میلیارد دلار، سالانه حدود ۸ درصد رشد داشته که بر اساس طبقه‌بندی سازمان کشاورزی خواروبار جهانی بیشترین ارزش افزوده را در بین فعالیت‌های شیلاتی دارد (۵۴).

ماهی آنجل[5] متعلق به خانواده سیچلایدها از گونه‌های مشهور در صنعت آبزی‌پروری ماهیان زینتی است (۱۰).

این ماهی بومی رودخانه آمازون است و با توجه به سازگاری

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، پردیس بین‌الملل دانشگاه فردوسی مشهد
۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استادیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیطزیست، دانشگاه فردوسی مشهد
۴- استاد، گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران
(*- نویسنده مسئول: Email: valizadeh@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/ijasr.v10i2.64868

5- *Pterophyllum scalare*

مناسب در سرتاسر جهان قابلیت اقتصادی بزرگی را به‌وجود آورده است (۷۰). این ماهیان همه چیزخوارند و از غذاهای زنده نظیر دافنی، ناپلی آرتمیا، انواع کرم‌ها و مانند آن‌ها تغذیه می‌کنند (۳). یکی از چالش‌های مهم آبزی‌پروری، تهیه غذای متناسب با نیاز ماهی است و استفاده از غذای زنده در جیره غذایی آبزیان علاوه بر تأمین نیازهای غذایی می‌تواند در پشگیری و کنترل بیماری‌های آنها، تنظیم و تحریک سیستم ایمنی اهمیت فراوانی داشته باشد. با توجه به تعداد و تنوع گونه‌های ماهیان و نیز مطالعات فراوان در خصوص بیماری‌های ویروسی و باکتریایی هنوز اطلاعات زیادی در خصوص توانایی دستگاه گوارش لارو ماهیان برای هضم پلت‌های خشک نیز وجود ندارد (۶۹). با توجه به میزان تلفات لاروها در ۳۰-۲۰روز اولیه (۲۱) یعنی زمان شروع تغذیه فعال، استفاده از غذای زنده در دوران لاروی، در مواردی موجب افزایش بقاء و مقاومت در برابر بیماری‌ها شده و باعث رشد بهتر اندام‌های جنسی و عملکرد آن گردیده است (۴۰). از آن‌جایی‌که کمبود مواد مغذی موجب اختلال در ترکیبات سیستم ایمنی همانند میزان لیزوزیم و ایمونوگلوبولین می‌شود و کارایی سیستم دفاعی ماهیان را کاهش می‌دهد، استفاده از غذای زنده و مواد غذایی ضروری به‌عنوان یکی از راهکارهای بهبود سیستم دفاعی ماهیان پیشنهاد شده است (۲۹). البته استفاده از غذای زنده در جیره غذایی ماهیان مستلزم صرف هزینه است و با مشکلاتی همراه می‌باشد، اما با این حال با جیره‌نویسی صحیح می‌توان تولید لارو، دفعات تخم‌ریزی، بازماندگی، کیفیت و برخی شاخص‌های ایمنی آبزیان را افزایش داد.

کرم توبیفکس[1] از خانواده توبیفیسیده[2] یکی از ماکرو زئو بنتوزها و از انواع غذاهای زنده برای ماهیان است. منطقه وفور آن در اطراف کشورهای بریتانیا و ایرلند می‌باشد (۶۲). این کرم با محتوی پروتئین خام زیاد، انواع اسیدهای آمینه، چربی‌های ضروری، چربی خام و هم‌آوری زیاد، قابلیت تحمل خوبی در برابر تغییرات فیزیکوشیمیایی آب در نقاط مختلف دارد (۲۲).

نتایج تحقیقات در خصوص تغذیه ماهی آنجل با آرتمیا اورمیانا[3] همراه با استفاده از اسید چرب غیر اشباع نشان داد استفاده از این غذا به‌طور معنی‌داری باعث بهبود توانایی تولیدمثلی (درصد لقاح، افزایش هم‌آوری و درصد تفریخ) و میزان بازماندگی لاروها نسبت به تغذیه غذای کنستانتره می‌شود (۴۸). در گزارش دیگری استفاده از آرتمیا در جیره غذایی مولدین ماهی آنجل نسبت به تغذیه غذای کنستانتره سبب افزایش لقاح گردید (۶۵). در آزمایشی بازماندگی لاروها در مولدین تغذیه شده با غذای غنی شده آرتمیا با اسیدهای چرب غیر اشباع و اسید اسکوربیک نسبت به غذای کنستانتره و غنی نشده بهبود یافت (۱۹). یکی از رویکردهای صنعت آبزی‌پروری استفاده از افزودنی‌های غذایی با کیفیت در جیره غذایی آبزیان می‌باشد و استفاده از این ترکیبات زمانی تأثیرگذار است که بتواند در زمان بروز تنش مقاومت گونه آبزی را در برابر شرایط تنش‌زا افزایش دهد. در آبزی‌پروری نوین با توجه به کمبود منابع آبی افزایش تراکم پرورشی می‌تواند تنش زیادی به ماهیان وارد نماید، بنابراین جهت جلوگیری از مشکلاتی نظیر کاهش رشد، بروز بیماری و تلفات احتمالی ناشی از تنش، ملاحظات در خصوص مدیریت تغذیه را بیشتر می‌نماید که باید تحقیقات کاربردی در زمینه‌های مختلف تکثیر و پرورش ماهیان آکواریومی از جمله کارایی رشد، افزایش مقاومت و پاسخ ایمنی انجام گیرد. متخصصین معتقدند آن دسته از جیره‌های غذایی که سبب رشد و بازماندگی بیشتر ماهیان می‌گردند مقاومت ماهیان را در برابر تنش‌ها نیز افزایش می‌دهند (۴۴).

در حال حاضر موفقیت در آبزی‌پروری منوط به کنترل تولید مثل، شناخت درست از زیست‌شناسی مزارع پرورش ماهی، نوآوری در روش کار و بهبود کیفیت جیره‌های غذایی می‌باشد (۳۳). از اصول کلی آبزی‌پروری داشتن کمترین هزینه و بیشترین بازده می‌باشد که دستیابی به منابع مناسب از راهکارهای مهم محسوب می‌شود (۵۰). لذا با توجه به اینکه عمده هزینه‌های تولید مربوط به تغذیه است و بخش پروتئینی بیشترین قسمت را شامل می‌شود (۳۲) بررسی ارزش غذایی کرم توبیفکس پرورشی با هدف بهبود عملکرد رشد، افزایش سیستم ایمنی، بقاء، کاهش هزینه‌های پرورشی و سرانجام افزایش بهره‌وری که به‌طور عمده مربوط به تهیه غذای مناسب است، از اهمیت به‌سزایی برخوردار می‌باشد. پرورش کرم توبیفکس در کشور ما به‌صورت انبوه وجود ندارد و ترکیبات شیمیایی کرم توبیفکس به‌صورت تجاری و به دلیل واردات این نوع کرم، دقیق مشخص نیست و همچنین در دسترس نبودن این نوع کرم به‌صورت دائم و نیز افزایش قیمت تمام شده آن به‌صورت تجاری و از همه مهم‌تر آلوده نبودن کرم‌های تولید شده در غذای تجاری ضرورت مقایسه و مطالعه غذای پرورشی و تجاری توبیفکس را فراهم نمود. بنابراین هدف آزمایش حاضر بررسی مقایسه‌ای اثر استفاده از پودرکرم توبیفکس پرورشی، تجاری و پلت در جیره غذایی ماهی آنجلبر فاکتورهای رشد و ایمنی بود.

مواد و روش‌ها

تهیه جیره‌های آزمایشی

جیره‌های آزمایشی شامل ۳ جیره ۱) جیره شاهد به‌صورت پلت (بیومار) و تهیه شده از شرکت ماهیران ۲) جیره حاوی کرم توبیفکس تجاری از شرکت ماهیران به‌صورت منجمد خشک شده و ۳) جیره حاوی پودر کرم توبیفکس پرورشی تولید شده در شرایط آزمایشگاهی به‌صورت منجمد خشک بود (جدول ۱).

1- *Tubifex tubifex*
2- *Tubificidae*
3- *Urmiana Artemia*

جدول ۱- ترکیب شیمیایی جیره های آزمایشی حاوی غذای پلت، پودر کرم توبیفکس پرورشی و تجاری (٪)

Table1- Chemical composition of the experimental diets containing pelleted, commercial or produced tubifex powder (%)

Parameters (%)	جیره‌های آزمایشی Experimental diet		
	شاهد The control (pelleted)	حاوی پودر توبیفکس تجاری Containing commercial tubifex powder	حاوی پودر تولید شده توبیفکس Containing produced tubifex powder
پروتئین خام Crude protein (CP)	60	58	69
عصاره اتری Ether extract	22	17	11.07
خاکستر Ash	9.6	11	5.6

تهیه ماهیان و شرایط انجام آزمایش

تعداد ۱۳۵ عدد بچه ماهی آنجل[1] از یک کارگاه تکثیر و پرورش در شهرستان مشهد و از یک مولد به‌دست آمده بودند با میانگین وزنی ۰/۲۱s ± ۱۹/۵۵ گرم به مدت ۶۳ روز مورد آزمایش قرار گرفتند. ماهی‌ها پس از توزین، به ۹ عدد آکواریوم ۲۰ لیتری به ابعاد ۰/۲۵×۰/۳×۰/۳ متر و با تراکم ۱۵ عدد به‌طور تصادفی انتقال یافتند. آزمایش اصلی پس از ۷ روز سازگاری و تأمین شرایط یکنواخت نگهداری شروع گردید. آب آکواریوم‌ها از آب شهری پس از نگهداری به مدت یک هفته در مخزن ۲۲۰ لیتری، تامین شد. اکسیژن مورد نیاز همه تیمارها به‌وسیله پمپی با توان خروجی ۴۵ وات انجام گرفت. از دماسنج خودکار جهت کنترل دما و جلوگیری از تغییرات درجه حرارت آب و هوا استفاده شد.

اکسیژن و pH آب به‌وسیله دستگاه قابل حمل و به‌صورت روزانه ثبت گردید. میانگین دمای آب در طول مدت آزمایش ۱±۲۷ درجه سانتی‌گراد، میانگین pH آب ۰/۱± ۷/۵ و میانگین اکسیژن محلول آب ۰/۳۵±۷/۶۸ میلی‌گرم بر لیتر بود. طول مدت روشنایی ۱۴ ساعت و تاریکی ۱۰ساعت در نظر گرفته شد. غذادهی ماهیان به میزان ۳ درصد وزن بدن و با ترازوی با دقت (۰/۰۰۱±) گرم و روزانه در سه نوبت (۷ صبح، ۱۳ ظهر و ۲۰ شب) انجام شد. همچنین در روزهای ۱، ۳۱ و ۶۳ آزمایش زیست‌سنجی ماهیان انجام گرفت.

آنالیز شیمیایی

در پایان دوره آزمایش پس از قطع غذادهی به مدت ۲۴ ساعت آنالیز شیمیایی انواع جیره‌های غذایی و نیز لاشه ماهیان آزمایشی انجام شد. پروتئین خام ازطریق تعیین نیتروژن کل (N×۶/۲۵) به روش کجلدال و با استفاده از دستگاه کجلدال نیمه‌اتوماتیک مدل (BAP 40) ساخت آلمان، چربی خام ازطریق حل کردن چربی در اتر و تعیین مقدار آن به‌وسیله دستگاه سوکسله اتوماتیک مدل (BOHR) ساخت آلمان، خاکستر از طریق قرار دادن نمونه در کوره الکتریکی در دمای ۵۵۰درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت اندازه‌گیری شد (۵).

ارزیابی شاخص‌های تغذیه‌ای، رشد و بقاء

طول و وزن ماهیان به‌عنوان شاخص‌های زیست‌سنجی به‌ترتیب به‌وسیله کولیس با دقت (۰/۱ میلی‌متر) و ترازو با (دقت ۰/۰۰۱±) گرم صورت گرفت. با توجه به نتایج به‌دست آمده از زیست‌سنجی در پایان دوره آزمایش معیارهای مربوط به شاخص‌های رشد، تغذیه و بقاء از رابطه‌های زیر محاسبه گردید (۳۰).

۱- نرخ رشد ویژه = نرخ رشد ویژه (درصد در روز)

$$\left[\frac{(\text{لگاریتم طبیعی وزن اولیه})-(\text{لگاریتم طبیعی وزن ثانویه})}{\text{طول دوره آزمایش (روز)}}\right]\times 100$$

۲- ضریب تبدیل غذایی = افزایش وزن بدن (گرم)/مقدار غذای خورده شده (گرم) = ضریب تبدیل غذایی

۳- میزان بقاء

$$\text{بقاء میزان (درصد)} = \left(\frac{\text{تعداد نهایی ماهیان}}{\text{تعداد اولیه ماهیان}}\right)\times 100$$

آزمون تنش

در انتهای دوره آزمایش از هر تکرار تعداد ۵ نمونه ماهی گرفته شد و هرکدام از ماهی‌ها به مدت ۵ دقیقه به‌وسیله تور در معرض هوا و تنش کمبود اکسیژن (تنش هوا) قرار گرفتند (۴). پس از تنش، ماهی‌ها بلافاصله به داخل آکواریوم‌ها انتقال یافتند. سپس بعد از ۳ ساعت نگهداری داخل آکواریوم‌ها، ماهی‌هایی که تحت شرایط تنش قرار داشتند مجدداً جمع‌آوری، تلفات ثبت و نمونه‌ها در درجه حرارت

1- *Pterophyllum scalare*

۱۸- درجه سانتی‌گراد جهت انجام آزمایشات مربوط به خون‌گیری نگهداری شدند.

تجزیه‌های بیوشیمیایی

نحوه سنجش آنزیم‌های گوارشی

در انتهای دوره آزمایش پس از کالبدشکافی ماهی دستگاه گوارش خارج و بخش روده‌ای ماهی شناسایی و روده جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی استخراج شد. سپس وزن مشخصی از روده در آب مقطر (با نسبت وزنی به حجمی ۵ به۱) همگن و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور g ×۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد در ادامه مایع رویی چربی‌زدایی شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس فعالیت تریپسین با استفاده از سوبسترای بنزویل- آرژنین- پی- نیترو آنیلیدو و با کمک منحنی استاندارد شده محلول تریپسین گاوی (۳۸)، آمیلاز با استفاده از نشاسته به‌عنوان سوبسترا و از طریق رنگ‌سنجی (۶۶) و لیپاز با استفاده از سوبسترای امولسیون روغن زیتون- صمغ عربی و به طریق تیتراسیون (۶۷) اندازه‌گیری شد. یک واحد تریپسین، برابر با یک میکرو مول تیروزین آزاد شده در مدت یک دقیقه به ازای هر گرم پروتئین، یک واحد لیپاز برابر با یک میکرومول اسید چرب آزاد شده در مدت یک دقیقه به ازای هر گرم پروتئین آلبومین گاوی و یک واحد آمیلاز برابر با یک میکرو مول مالتوز آزاد شده در مدت یک دقیقه به ازای هر گرم پروتئین آلبومین گاوی در نظر گرفته شده است. اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی آلانین ترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) به روش آنزیماتیک کینتیک (۶۳) انجام گرفت.

فراسنجه‌های ایمنولوژیکی

در انتهای دوره غذادهی (بعد از ۶۳ روز) و همچنین بعد از آزمون تنش، ماهیان به مدت ۲۴ ساعت قطع غذا شدند و سپس به‌طور تصادفی نمونه خون از پنج عدد ماهی آنجل (از هر تیمار سه تکرار) گرفته شد. بدین منظور پس از بیهوشی توسط اسانس گل میخک، خون از ورید ناحیه ساقه دمی با سرنگ‌های حاوی فنوکسی اتانول تهیه گردید. سرم نمونه‌های خون پس از سانتریفوژ در دور ۳۶۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جمع‌آوری شد و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای تجزیه و تحلیل فراسنجه‌های ایمونولوژیکی در فریزر نگهداری شد.

ایمونوگلوبولین کل

برای سنجش ایمنوگلوبولین کل از هر تکرار تعداد ۵ عدد ماهی نمونه‌برداری شد و سپس پروتئین محلول قبل و بعد از رسوب با پلی‌اتیلن گلیکول به‌عنوان مقدار ایمنوگلوبولین کل در نظر گرفته شد (۶۱).

فعالیت لیزوزیم

فعالیت لیزوزیم نمونه‌های خونی از طریق لیزکردن باکتری‌های گرم مثبت ایزولتیکوس میکروکوس که لیزوزیم به آن حساس است تعیین گردید (۲۰). میزان استاندارد لیزوزیم سفیده‌ی تخم‌مرغ از صفر تا ۱۴ میلی‌گرم در ML^{-1} (۰/۱ تامیون نیترات فسفات در pH=۵/۸ و نمونه سرم رقیق شده (۲۵µl) در داخل چاهک‌های صفحات پلیت در سه قسمت قرار داده شد. مقدار ۱۷۵ میلی‌لیتر از محلول لیزوزیم به نمونه‌های بافر به هرکدام اضافه و سریعاً عمل مخلوط انجام گرفت. اندازه‌گیری تغییرات کدورت به مدت ۵ دقیقه در دمای اطاق، هر ۳۰ ثانیه با استفاده از صفحات ۴۵۰ میکرو اندازه‌گیری شد. سپس مقایسه فعالیت لیزوزیم نمونه‌ها با نمونه استاندارد توسط یک سیستم نرم‌افزاری (ساخت شرکت بیومتالیک نیوجرسی) سنجش شد.

فعالیت کمپلمان

گلبول‌های قرمز خون سه مرتبه با بافر اتیلن گلیکول تترا استیک اسید- منیزیوم ژلاتین ورونالشسته شد و تعداد سلول‌های‌های آن به کمک لام نئوبار در هر میلی‌لیتر بافر 2×10^{8}cell/ml تنظیم شد. ابتدا دانسیته نوری لیز درصد گلبول‌های قرمز خونی با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون فوق به ۳/۴ میلی‌لیتر آب مقطر تعیین گردید. سپس نمونه‌های سرم با بافر فوق رقیق شدند. سپس به همه نمونه‌ها ۱۰۰ میکرو لیتر گلبول قرمز خونی اضافه گردید. مخلوط فوق به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. لوله‌ها با دور g×۱۶۰۰به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و دانسیته نوری محلول رویی با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۴ نانومتر محاسبه گردید. برای محاسبه میزان فعالیت راه میانبر سیستم کمپلمان با استفاده از کاغذ شطرنجی منحنی لیز رسم شد. طبق تعریف حجمی از سرم که سبب ۵۰ درصد همولیز شود فعالیت کمپلمان نمونه به‌دست آمد (۱۶ و ۶۸).

فراسنجه‌های میکروبی

نمونه‌گیری تصادفی از ۵ قطعه ماهی به‌ازای هر تکرار انجام گرفت، به طوری که نمونه‌ها پس از انتقال زنده به آزمایشگاه با کلرید بنزالکونیوم (یک درصد برای ۶۰ دقیقه) شستشو داده شده و سپس با اسکالپل شکافته و روده برداشته شد و با کلرید سدیم (۰/۹M/V) با استفاده از دستگاه هموژنایزر همگن گردید و با سرعت× ۵۰۰۰g در۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد، از نمونه آماده شده به مقدار ۱۰۰میکرولیتر روی پلت محتوی آگار (*PCA; Merck Co*) جهت شاخص (*TVC*) و همچنین آگار (*MRS; Merck Co*) جهت شاخص (*LAB*) هر کدام با سه تکرار قرار داده شد. پلت‌ها در

شرایط انکوباسیون و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز نگهداری و برای پلت‌های محتوی ۳۰۰-۳۰ کلنی محاسبه گردید (۵۶).

تجزیه آماری

در ابتدا آزمون نرمالیتی به‌وسیله آزمون *Shapior-Wilk* انجام شد. تجزیه و تحلیل روی داده‌های مربوط به تغییرات معیارهای رشد، فاکتورهای تغذیه‌ای و بیوشیمیایی ماهیان از طریق آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه و مقایسه میانگین بین تیمارها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. در ابتدا اطلاعات خام در محیط اکسل مورد پردازش و در نهایت وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از آنالیز ترکیب شیمیایی لاشه ماهیان آنجل نشان داد بیشترین پروتئین خام به مقدار ۳/ ۶۹ مربوط به تیمار غذای حاوی توبیفکس پرورشی و کمترین آن مربوط به غذای حاوی توبیفکس تجاری است. جدول ۲ میزان درصد پروتئین خام، چربی خام و خاکستر لاشه ماهیان آنجل را در سه تیمار غذایی در پایان دوره آزمایشی به تفکیک نشان می‌دهد.

جدول ۲- ترکیب شیمیایی (برحسب ماده خشک) لاشه ماهیان آنجل در سه تیمار آزمایشی در انتهای دوره (پس از ۶۳ روز غذادهی)

Table 2- Chemical composition of angel carcass allocated to the experimental treatments (at the end of experimental period (63 days)

متغیر Parameter (%)	Experimental diet		
	شاهد The control (pelleted)	حاوی پودر توبیفیکس تجاری Containing commercial tubifex powder	حاوی پودر تولید شده توبیفیکس Containing produced tubifex powder
پروتئین خام Crude protein(CP)	67.2	64.8	69.3
چربی خام Ether extract	14.5	16.2	13.4
خاکستر Ash	18.3	19	17.3

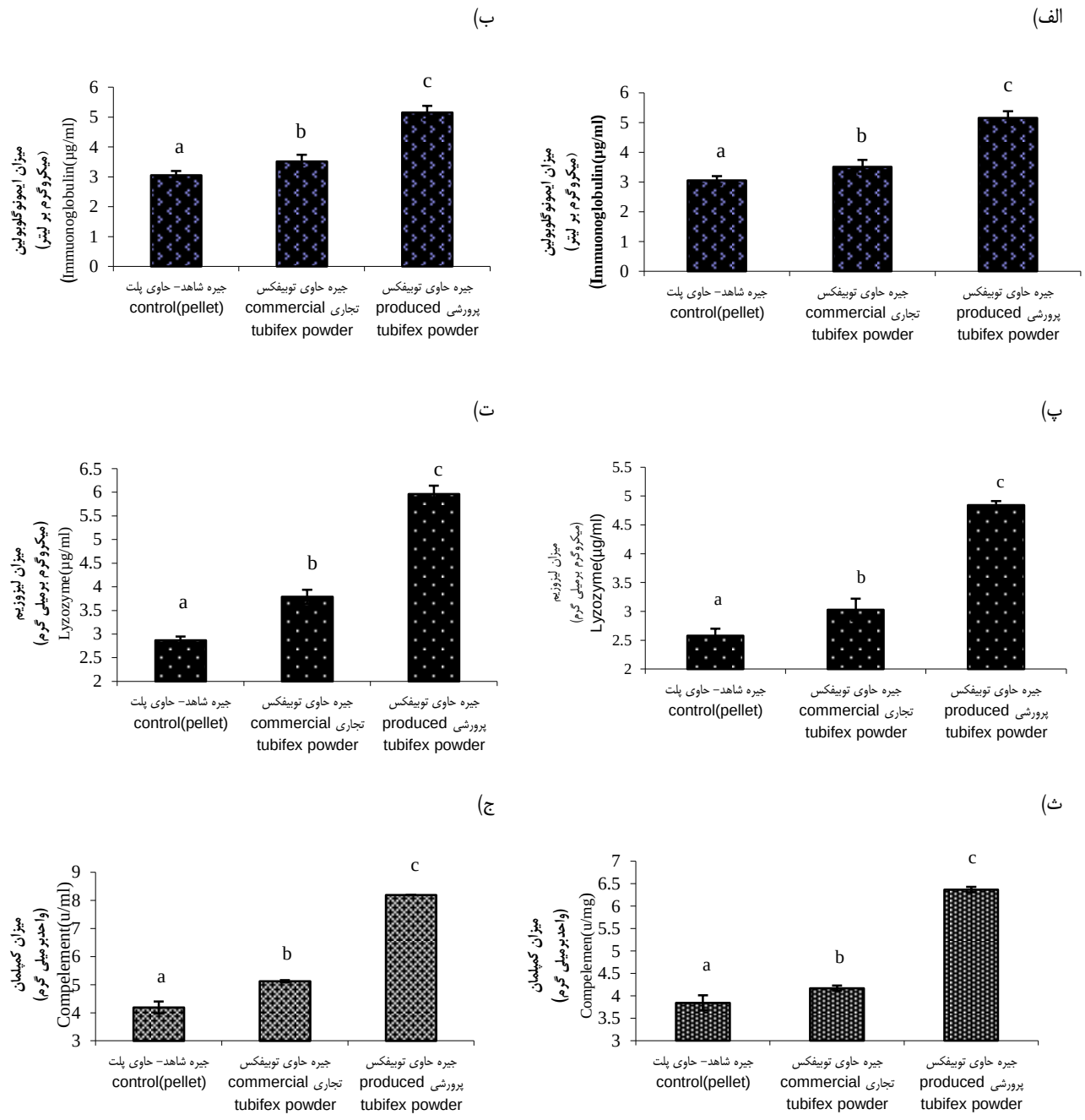
بیشترین میزان وزن نهایی کل (۳۵/۰۳ گرم) در ماهیان آنجل تغذیه شده با جیره غذایی حاوی پودر توبیفکس پرورشی و کمترین آن (۲۹/۰۴ گرم) در ماهیان آنجل تغذیه شده با جیره غذایی حاوی پلت مشاهده گردید. در این رابطه استفاده از جیره غذایی حاوی توبیفکس پلت باعث افزایش ۴/۵ درصدی وزن نهایی نسبت به جیره غذایی حاوی تجاری در ماهیان آنجل آزمایشی شد. هرچند که وزن نهایی ماهیان آنجل تغذیه شده با جیره غذایی حاوی توبیفکس تجاری ۳۰ درصد از تیمار حاوی پودر توبیفکس پرورشی کمتر بود ($p<۰/۰۵$). جدول ۳ نتایج حاصل از میانگین برخی شاخص‌های رشد و میزان بقاء به تفکیک تیمارهای آزمایشی و در انتهای دوره آزمایشی را نشان می‌دهد.

طول کل نهایی نیز در جیره غذایی حاوی پودر توبیفکس پرورشی به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) به میزان ۱۴درصد از توبیفکس پلت و از غذای حاوی تجاری به میزان ۱۵/۵ درصد بیشتر بود. میزان رشد ویژه نیز در غذای حاوی پودر توبیفکس پرورشی از غذای حاوی تجاری و پلت به‌ترتیب ۳۱ و ۲۶/۷ درصد بیشتر بود ($p<۰/۰۵$).ضریب تبدیل جیره حاوی پودر توبیفکس پرورشی به‌ترتیب ۱۹ و ۱۱ درصد کمتر از جیره حاوی توبیفکس تجاری و غذای حاوی پلت بود ($p<۰/۰۵$). بقاء ماهیان آزمایشی در جیره غذایی حاوی پودر توبیفکس پرورشی نسبت به توبیفکس تجاری ۱۱درصد بیشتر بود ($p<۰/۰۵$) اما نسبت به جیره غذایی شاهد درصد بقاء معنی‌دار نبود.

شاخص‌های ایمنی

میزان فعالیت فراسنجه‌های ایمنی شامل ایمونوگلوبولین کل در ماهیان تغذیه شده با غذای حاوی توبیفکس پرورشی به‌طور معنی‌داری از دیگر تیمارهای آزمایشی بیشتر بود (شکل ۱) و لیزوزیم به‌عنوان یکی از مهمترین فاکتورها در مقاومت طبیعی ماهیان نیز بعد از تنش هوا در تیمار حاوی پودر توبیفکس پرورشی میزان بیشتری را نسبت به دو تیمار دیگر نشان داد (شکل ۱) و همچنین میزان کمپلمان نیز در تیمار حاوی پودر توبیفکس پرورشی بعد از تنش هوا به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ($p<۰/۰۵$) (شکل ۱).

نتایج مطالعات حاضر نشان داد ماهیانی که از غذای حاوی پودر توبیفکس پرورشی در طول دوره آزمایش استفاده کرده بودند از افزایش وزن، میزان رشد ویژه، درصد بازماندگی زیادتر و نیز ضریب تبدیل بهتری برخوردار بودند ($p<۰/۰۵$) و ماهیان تغذیه شده از غذای شاهد (پلت) نسبت به جیره غذایی حاوی توبیفکس تجاری افزایش وزن، رشد، درصد بازماندگی بیشتری داشتند.



شکل ٤- مقایسه میانگین (±انحراف معیار) نسبت باکتری‌های لاکتو باسیلوس به تعداد کل باکتری‌های دستگاه گوارش در ماهی آنجل تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی بعد از ۶۳ روز غذادهی در سه تکرار (P<۰/۰۵).

Figure 4- The men (± se) ratio of lactobacillus bacteria to total viable count in the digestive tract in angel fish fed with experimental diet at the end of experimental period (63 day)

جدول ۳- میانگین (± انحراف معیار) وزن (گرم)، طول (میلی‌متر)، میزان رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و میزان بقاء در ماهی آنجل تغذیه شده با جیره‌های غذایی آزمایشی طی ۶۳ روز (n=۳)

Table 3- Mean (± se) of body weight, length, growth feed efficiency and survival of angel fish allocated to the experimental treatments (during 63 days of the experimental period)

متغیر Parameter	Experimental diet: شاهد The control (pelleted)	حاوی پودر توبیفیکس تجاری Containing commercial tubifex powder	حاوی پودر تولید شده توبیفیکس Containing produced tubifex powder
طول اولیه Initial length (mm)	23.15±1.03	23.25±0.97	23.29±0.71
وزن نهایی Final body weight (gr)	0.45±0.03[a]	0.43±0.03[a]	0.61±0.01[b]
طول نهایی Final length (mm)	33.04±0.73[a]	31.25±0.62[a]	39.03± 0.93[b]
نرخ رشد ویژه Specific growth rate (%bw/day)	1.32±0.06[a]	1.24±0.13[a]	1.80±0.02[b]
ضریب تبدیل غذایی Feed efficiency	1.61±0.15[b]	1.77±0.20[b]	1.44±0.03[a]
نرخ بقاء Survival rate (%)	97.78±3.85[b]	88.89±3.85[a]	100±0.01[b]

میانگین های هرردیف باحروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی دار می باشند.($P<0.05$)

* Means within some row with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).

به طوری که اثرات استفاده از کرم شیرونومیده تجاری بر فراسنجه‌های رشد در بچه ماهی جوئل[1](۳۶) و مطالعه اثر تغذیه‌ای جیره بیومار، دل گوساله، کرم فشرده (توبیفکس تجاری)، کرم خونی، گاماروس و آرتمیا بر پارامترهای رشد و بازماندگی در ماهی سوروم[1] (۴۹) نیز نتایج مشابهی را ارائه نمودند و همچنین طبق مطالعات دیگری نتایج حاصل از اثرات بررسی تأثیر تغذیه با لارو شیرونومیده و غذای کنسانتره بر راندمان رشد، بقاء و رسیدگی جنسی ماهی رزی بارب[2] (۵۴) و اثرات کرم‌های کم تار[3] بر رشد و بازماندگی ماهیان خاویاری (۳۹) و همچنین افزایش رشد ماهی فلاندر[4] تحت تأثیر اسیدهای چرب غیر اشباع (۱۷) با نتایج حاصل از این مطالعه مشابهت داشت. با توجه به اینکه ماهیان در محیطی زیست می‌نمایند که به صورت دائم در حال تغذیه و رقابت می‌باشند و نیز به جهت تراکم بالای محیط پرورشی ماهیان در معرض تنش‌های بسیار زیادی می‌باشند بنابراین مقابله با تنش و سازگار کردن اعمال فیزیولوژیکی بدن ضروری به نظر می‌رسد. در این تحقیق پس از نگه داشتن ماهیان در معرض تنش کمبود اکسیژن، نتایج نشان داد که در تیمار ماهیان تغذیه شده با غذای حاوی پودر توبیفکس پرورشی در مقایسه با تیمارهای دیگر هیچ‌گونه تلفاتی مشاهده نشد و دلیل آن می‌تواند نقش مهم اسیدهای چرب غیر اشباع در تنظیم رشد و نیازمندی‌های انرژی جهت پاسخ به تنش کمبود اکسیژن (۲)، افزایش مقاومت در برابر شرایط محیطی (۷)، رنگ‌پذیری و شکل ظاهری بهتر لاروها به‌دلیل فراهم نمودن پیش‌درآمدهایی جهت تولید ایکوزانوئیدها باشد (۳۷). در مطالعاتی اثر آرتمیای غنی شده با اسیدهای چرب غیر اشباع بر میزان تلفات لارو ماهی کفال خاکستری که در معرض تنش هوا قرار گرفته بودند نتایج نشان داد که بازماندگی لاروهای تغذیه شده با آرتمیای غنی شده با اسیدهای چرب غیر اشباع بالای ۸۰ درصد بوده است (۴). در مطالعات مشابه دیگر محققان نشان دادند مقاومت لاروها در برابر تنش‌های محیطی با تغذیه از آرتمیای غنی شده در ماهی قزل‌آلا به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد و غذای کنسانتره بیشتر است (۶) و همچنین نتایج مطالعه تغذیه لارو بچه ماهی آنجل[5] با آرتمیای غنی شده با اسید چرب غیراشباع نسبت به آرتمیای غنی شده با اسیدهای چرب غیر اشباع نشان داد لاروهای ماهی آنجل به‌طور معنی‌داری دارای مقاومت و بازماندگی بیشتر نسبت به تنش‌های محیطی از جمله pH می‌باشد (۲۳). یکی از خواص مهم کرم توبیفکس داشتن اسیدهای چرب غیر اشباع است (۲۲). ماهیان آب شیرین به‌دلیل نداشتن این چربی‌ها به اسیدهای چرب (n-۳ و n-۶) نیاز دارند (۴۱) و ماهیان باید اسیدهای چرب ضروری را از جیره غذایی دریافت نمایند (۱۵). از آنجایی‌که یکی از مباحث مهم در اقتصادی کردن پرورش آبزیان زینتی با توجه به هزینه‌های تولید غذاهای زنده، جلوگیری از آلودگی ثانویه و حفظ کیفیت آب، مطلوب

1- *Heros severus*
2- *Puntius conchonius*
3- *Oligochaeta*
4- *Limanda ferruginea*
5- *Peterophylum scalare*

کردن ضریب تبدیل غذایی و قابلیت هضم زیاد جیره می‌باشد، در این تحقیق ضریب تبدیل غذایی جیره حاوی پودر توبیفکس پرورشی از دو تیمار دیگر به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($p<0/05$). کاهش ضریب تبدیل، افزایش رشد و درصد بازماندگی زیاد می‌تواند به‌دلیل داشتن میزان زیاد پروتئین، اسیدهای چرب غیر اشباع (۲۵) و کاروتنوئید لازم به جهت نقش واسطه‌ای (۵۷) بر متابولیسم ماهیان در زمان شروع تغذیه فعال باشد. اگرچه در مطالعات آینده سنجش اسیدهای چرب و اسیدهای امینه جهت نتیجه‌گیری بهتر توصیه می‌شود.

لاروهای ماهیان از لحاظ تکامل فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی ناقص می‌باشد (۲۸) و از طرفی عدم توجه به اندازه لاروها، ابعاد دهان و عدم وجود آنزیم‌های گوارشی و از دست دادن برخی مواد مغذی غذایی پلت در آب هم می‌تواند از علل کاهش مقدار حاصل از عملکرد رشد غذای پلت نسبت به غذای توبیفکس پرورشی باشد و نتایج این تحقیق با نتایج افزایش بازماندگی لاروها با استفاده از غذای زنده پودر شده کرم نرئیس و به‌صورت ترکیب با پودر دافنی در مقایسه با غذای کنسانتره مطابقت داشت (۶۴).

آبزیان زینتی دارای تنوع گونه‌های زیادی می‌باشند بنابراین با افزایش بیماری‌های ماهیان و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها عوارضی همچون افزایش مقاومت باکتری‌ها، تخریب فلور میکروبی محیط‌زیست و نیز ایجاد هزینه‌های اضافی را برای آبزی پروران به‌دنبال دارد (۱۲) و از طرفی استفاده از مکمل‌های غذایی و غذای زنده باعث افزایش هضم و جذب در جیره غذایی آبزیان و همچنین بهبود سیستم ایمنی ماهیان می‌شود، لذا استفاده از پودر کرم توبیفکس پرورشی به‌عنوان غذای زنده، ضمن توجیه تکثیر و پرورش ماهیان آنجل، می‌تواند سبب کاهش یا محدودیت استفاده از مواد شیمیایی در محیط‌های پرورشی گردد.

یکی از شاخص‌های مهم سلامت ماهیان، اندازه‌گیری شاخص‌های خونی است. این شاخص‌ها به عوامل مختلفی همچون سن، جنس، تغذیه، عوامل محیطی و سایر خصوصیات فیزیولوژیکی ماهیان بستگی دارد (۲۷). در ماهیان سیستم ایمنی ذاتی یا غیر اختصاصی یک مکانیسم دفاعی اساسی در برابر عوامل بیماری‌زا محسوب می‌شود و با توجه به تراکم زیاد و آسیب‌پذیر بودن ماهیان تقویت این سیستم برای ماهیان بسیار مهم می‌باشد (۱۸). در مطالعه حاضر ماهیان آنجل تغذیه شده در جیره غذایی حاوی پودر توبیفکس پرورشی در شاخص‌های لیزوزیم و ایمونوگلوبولین افزایش معنی‌داری نسبت به دو جیره غذایی داشت. لیزوزیم به‌عنوان یکی از فاکتورهای مهم در مقاومت طبیعی ماهیان است (۴۵) که از اجزای ایمنی غیر اختصاصی بوده و موجب تخریب جداره باکتری‌ها و فعال‌سازی کمپلمان می‌شود (۱) که این امر باعث افزایش فعالیت بیگانه‌خواری، القاء و بهبود پاسخ‌های آنتی‌بادی در ماهی می‌شود (۴۴). ایمونوگلوبولین نیز نقش مهمی در ترشح آنتی‌بادی و افزایش سیستم ایمنی اکتسابی در ماهیان دارد (۲۹) و همچنین کمپلمان‌ها که نقش اساسی در ایمنی ذاتی و اکتسابی ماهیان دارد (۱۳)، بنابراین عملکرد رشد بهتر، درصد بازماندگی زیادتر، توانایی زیادتر تحمل شرایط تنش‌زا و نهایتاً بهبود سیستم ایمنی در تیمار غذایی حاوی توبیفکس پرورشی با افزایش میزان لیزوزیم و کمپلمان سرم توجیه می‌گردد. آمینو ترانسفرها آنزیم‌های کبدی با اهمیتی هستند که به‌عنوان شاخص فعالیت کبدی درخصوص وضعیت سلامت ماهیان شناخته شده (۵۵) و تحت تأثیر عواملی همچون فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب، تراکم، شرایط پرورش، نوع جیره مصرفی، سن، جنس و نیز وضعیت سلامت ماهیان فعالیت و ترشح می‌گردند (۱۱). آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز نقش مهمی در مراحل نهایی تجزیه پروتئین جهت تولید ATP ایفا می‌کنند (۵۰). افزایش سطح فعالیت این آنزیم‌ها، نقش مؤثری در استفاده از اسیدهای آمینه در فرآیند اکسیداسیون یا گلوکوژنز دارد (۵۳). لذا هرگونه آسیب خفیف، التهاب یا نکروز سلول‌های کبد موجب آزاد شدن این آنزیم‌ها از سلول‌های آسیب‌دیده شده و این سلول‌ها محتوایشان را که شامل آمینوترانسفرها است به طرف جریان خون رها کرده و موجب افزایش میزان آنها در سرم می‌گردند (۴۶). در مطالعه حاضر مقادیر آنزیم‌های سرمی ALT و AST تحت تأثیر غذای حاوی پودر توبیفکس پرورشی قرار گرفت به‌طوری‌که میزان این دو آنزیم در تیمار حاوی پودر توبیفکس پرورشی به‌طور معنی‌داری کمتر بود. لذا به نظر می‌رسد آسیب ناشی از ترکیبات اکسیداتیو در کبد ماهیان تیمار شاهد و تیمار حاوی توبیفکس تجاری سطح سرمی این آنزیم‌ها را زیاد نموده است که البته در تیمار حاوی پودر توبیفکس پرورشی مقدار این دو آنزیم کمتر از دو تیمار دیگر بود. درخصوص میزان این آنزیم ها تحت تاثیر کرم توبیفکس مطالعاتی صورت نپذیرفته است و بیشتر مطالعات درخصوص ماهیان پرورشی تحت‌تأثیر فصل، شوری انجام پذیرفته است (۵۲). یکی از راه‌های تشخیص محدودیت رشدلاروها، کاهش تلفات در زمان تغذیه فعال و طراحی جیره‌های غذایی نحوه تکامل سیستم آنزیمی به‌عنوان شاخصی از فعالیت‌های گوارشی و شرایط تغذیه‌ای لارو ماهیان می‌باشد (۲۸). وجود آنزیم‌های خارج سلولی از جمله لیپاز، آمیلاز و پروتئاز از طریق تحریک اشتها و افزایش متابولیسم میکروبی باعث افزایش سطح تغذیه در ماهیان می‌شود (۳۵). وجود اسیدهای چرب n-۳ در نیازمندی‌های انرژی جهت پاسخ به تنش کمبود اکسیژن نقش دارند (۲). اسیدهای چرب غیراشباع می‌تواند قابلیت هضم سایر چربی‌ها را تغییر دهد و علت آن عملکرد لیپاز گوارشی درخصوص تجزیه چربی می‌باشد و لیپاز گوارشی ماهی تمایل زیادی برای هضم چربی‌ها را دارد (۳۷). افزایش لیپاز در تیمار حاوی پودر توبیفکس پرورشی نیز می‌تواند به‌دلیل خواص اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در این تیمار باشد که نتایج آن با اثر اسیدهای چرب غیر اشباع بر لیپاز گوارشی قزل‌آلای قهوه‌ای خزر مطابقت

داشت (۵۹). محتوای بالای گلیکوژن و کربو هیدرات در غذای زنده ممکن است ساخت و ترشح آمیلاز را تحریک نمایدکه احتمالاً این امر می‌تواند عامل افزایش این آنزیم باشد که با نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی، آمیلاز و آلکالین فسفاتاز، درلارو ماهی سفید تغذیه شده از ناپلی آرتمیا مطابقت داشت (۳۴).

ارائه راهکارهای جدید برای بهبود فلور میکروبی دستگاه گوارش بسیار ضروری به نظر می‌رسد (۴۲). وجود باکتری‌های مفید در روده ماهیان از جمله لاکتو باسیل‌ها به جهت عملکرد آنها در تولید اسیدهای چرب، افزایش جذب مواد معدنی و ساخت ویتامین‌ها به‌ویژه خانواده B و نیز در کاهش یا محدود شدن باکتری‌های مضر روده‌ای از طریق رقابت غذایی یا رقابت در محل اتصال در روده مهم شمرده می‌شوند (۳۱). مطالعه حاضر فلور باکتریایی روده ماهیان تغذیه شده با غذای توبیفکس پرورشی اختلاف معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) را نسبت به دو تیمار دیگر نشان داد که در این تیمار اثرات مفید تعداد زیاد لاکتوباسیل‌ها در روده ماهیان به سبب وجود غذای زنده (۱۴) از دلایل ضریب تبدیل غذایی بهتر در تیمار حاوی پودر توبی فکس پرورشی می‌تواند باشد و همچنین افزایش میزان اسیدلاکتیک در روده نیز موجب کاهش pH محیط داخلی روده و موجب جذب مواد مغذی، مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا و نهایتاً افزایش رشد خواهد شد (۶۰). البته چنین اطلاعاتی در خصوص اثر پودر توبیفکس پرورشی روی سیستم‌های ایمنی ماهیان زینتی وجود ندارد.

نتیجه‌گیری کلی

تحقیقات نشان داد تهیه و به‌کارگیری کرم توبیفکس در محیط آزمایشگاه شامل مراحل اولیه تولید، جمع‌آوری (روش جداسازی و خالص‌سازی) ممکن است مشکلاتی را به همراه داشته باشد ولی از طرفی با توجه به این که بیشترین تلفات لاروها در زمان شروع تغذیه فعال و به دلیل تغییر در عادات غذایی اتفاق می‌افتد، به نظر می‌رسد با توجه به نتایج به‌دست آمده در خصوص شاخص‌های رشد و ایمنی در این تحقیق، تولید کرم توبیفکس پرورشی به صورت انبوه و استفاده از پودر این کرم به صورت مکمل در جیره غذایی ماهی در زمان شروع تغذیه فعال می‌تواند در عملکرد رشد، بازماندگی، وضعیت ظاهری و نیز ارتقاء کیفیت سیستم ایمنی ماهی تأثیر به‌سزایی داشته باشد. امروزه با توجه به شرایط محیط پرورشی ماهی از نظر تراکم، احتمال آلودگی و بیماری‌زایی و همچنین ایجاد توجیه اقتصادی تکثیر و پرورش ماهیان زینتی استفاده از کرم توبیفکس با کیفیت توصیه می‌گردد. در هر حال به نظر می‌رسد برای رسیدن به این مهم باید تحقیقات بیشتری به‌ویژه نوع ماهیان زینتی، سنین مختلف و ارتباط آنها با تغذیه زنده توبیفکس پرورشی صورت گیرد.

سپاسگزاری

در انجام این طرح از مساعدت و همکاری موثر معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد، ریاست مرکز تحقیقات و آموزش جهاد کشاورزی خراسان رضوی، مدیریت شیلات استان خراسان رضوی و کارشناسان شایسته تکثیر و پرورش آبزیان خراسان رضوی جناب آقایان مهندس نکویی و مهندس مهدیزاده برخوردار بودیم که بدین‌وسیله از مساعدت آنان تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Abedian Kenari, A., and M. K. Mirzakhani. 2005. Effects of Using Artemiaurmiana Enriched with n-3 HUFA in First Feeding of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Larvae. Caspian Journal of Environmental Sciences, 3: 123-129.
2. Adel, M., R. Safari, H. Monji, and M. Faraei. 2014. Influence of different level of Mentha piperita on growth, survival and fish larvae wihte carcass composition *(Rutilus frisii kutum*).Aquatic Ecology Journal, 5(1):95-102.
3. Agradi, E., G. Abrami, G. Serrini, D. Mckenzie, C. Bolis, and P. Bronzi. 1993. The role of dietary N-3 fatty acid and vitamin Esupplements in growth of sturgeon (*Acipenser naccarii*) Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 105: 187-195.
4. Agradi, E., G. Abrami, G. Serrini, D. Mckenzie, C. Bolis, and P. Bronzi. 1993. The role of dietaryN-3 fatty acid and vitamin Esupplements in growth of sturgeon (*Acipenser naccarii*) Comp. Biochemistry and Physiology, Part A 105: 187-195.
5. Ako, H., C. S. Tamani, P. Bass, and C. S. Lee. 1994. Enhancing the resistance tophysical stress in larvae of Mugical cephalus by the feeding of enriched *Artemia nauplii* Aquaculture, 122:81-90.
6. Alishahi, M., M. M. Ranjbar, M. Ghorbanpour, R. Peyghan, M. Mesbah, and M. Razi Jalali. 2010. Effects of dietary Aloe vera on some specific and nonspecific immunity in the common carp (*Cyprinus carpio*). International Journal of Veterinary Research, 4(3): 189-195.
7. AOAC, 1995. Official methods of analysis of AOAC, VOL.1,15THedn. the Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
8. Armando, A. 2009. Fecundity, growth, and survival off the angelfish pterophyllum scalar under laboratory

condition, 99(4): 741-746.
9. Avella, M. A., I. Olivotto, G. Gioacchini, F. Maradonna, and O. Carnevali. 2007. The role of fatty acids enrichments in the larviculture of false percula clownfish *Amphipriodocellaris*. Aquaculture, 273: 87-95.
10. Azari Takami, G., H. Mahmoodzadeh, and Z. Grailou. 2001. Survey of the stability of n-3highly nsaturated fatty acids following enrichment of Artemia by various oil and subsequent starvation. International Workshop on *Artemia.* Urmia-Iran. 12-1May. 13.
11. Azimirad, M., M. Meshkini, N. Ahmadifard, and S. H. Hoseinifar. 2016. The effects of feeding with symbiotic (*Pediococcus acidilactici and fructooligosaccharide*) enriched adult Artemia on skin mucus immune responses, stress resistance, intestinal microbiota and performance of angelfish (*pterophyllum scalare*). Fish and Shellfish Immunology, 54:516.
12. Bahmani, M., F. Askarian, A. Matinfar, A. Kousha, K. Khorshidi, and A. Shenavar. 2008**.** Diversity of Lactic Acid Bacteria in the Gastrointestinal Tracts of Reared Beluga (*Huso huso*) and Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*)**.** Journal of Fisheries and Aquatic Science, 3(5):302-311.
13. Blanchard, G., J. G. Makombu, and P. Kestemonte. 2008. Influence of different dietary18:3n-3/18:2n-6 on growth performance, fatty acid composition a hepatic ultrastructure in Eurasianperch, *Perca fluviatilis* L., Aquaculture, pp.144-150.
14. Boesen, H. T., K. Pedersen, J. Larsen, C. Koch, and A. E. Ellis. 1999. Vibrio anguillarum resistance trout (Oncorhynchus mykiss) serum: role of O-antigen structure of lipopoly-saccharide. Infection and Immunity, 67(1): 294-301.
15. Boshra, H. L. J., and J. O. Sunyer. 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. Fish and Shellfish Immunology, 20(2): 239.
16. Burr, G., and D. Gatlin. 2006. Microbial Ecology of the Gastrointestinal tract of Fish and the potential Application of prebiotics and probiotics in *Finfish Aquaculture*. Journal of the World Aquaculture Society, 36(4): 425-437.
17. Copeman, L. A., C. C. Parrish, J. A. Brown, and M. Harel. 2002. Effects of docosa hexaenoic eicosa pentaenoic, and arachidonicacids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limandaferruginea):* A live food enrichment experiment. Aquaculture, 210: 285-304.
18. Demers, N. E., and C. J. Bayne. 1997. The immediate effects of stress on hormones and plasmlysozyme in rainbow trout. Dev Comp Immunol, 21:363-73.
19. Dhert, P., L. Lim, W. Yen Chew, V. Dermaux, H. Nelis, and P. Sorgeloos. 2004. Vitamin C Enhancement of Stress Resistance of the Guppy (*Poecilia reticulata*) through Feeding with Supplement. Journal of the World Aquaculture Society, 33(1): 32-40.
20. Dixon, B., and R. J. M. Stet. 2001. The relationship between major histocompatibility receptors and in-nate immunity in *teleost fish*. Developmental and Comparative Immunology, 25: 683-700.
21. Dorjani, M., M. Mohammadizadeh khoshro, M. SHamsaeimehrjan, and Y. Abdollahtabar. 2014. Studying the effects of live food and commercial on growth and survival of azad fish larvae (*Salmotrutta caspiu*s), 2(2): 23-34.
22. Ebrahimi Dorche, E., M. R. Hemami, M. Nemati, and R. Sefaderani. 2009. Comparison of cultivated tubifex worm (*Tubifex tubifex*) in the bed of lettuce and cow manure. History of Biology in Iran, 22(1): 103-110.
23. Ebrahimi, E., N. Agh, and M. Yaghobi. 2015. Use of enriched of with LC - PUFA on survival and resistance to pH stress of anjel fish *(Peterophylum scalare*). Journal of Fisheries in Iran, 24 (2):77-86.
24. Farahi, A., and M. Sodagar. 2015. Effects of different levels of dietary immunogen prebiotic on reproductive indices of angel fish breeders (*Pterophyllum scalare*) and Evaluation of the survival of the larvae in the face of stress the sudden increase in temperature. Ornamental Aquatic Science Magazine, 2(4):1-9.
25. Farhangi, M., and C. G. Carter. 2001. Growth, physiological and immunological responses of rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*) to different dietary inclusion levels of dehulled lupin (*Lupinus angustifolius*). Aquaculture Research, 32(Supplemented 1): 329-340.
26. García-Alonso, J., C. T. Müller, and J. D. Hardege. 2008. Influence of food regimes anseasonality on fatty acid composition in the ragworm. Aquaticbiology, 4(5): 7-13.
27. Garsia-Ollua, M., and H. J. Gomez-Romero. 2005. Growth of angel fish (*pterophyllumscalare*) juveniles Fed inert diets. Avances en Investigacion Agropecuaria, 9(3):49-60.
28. Gazerani Farahani, Sh. 2009. The survey of amount of hematological factors in *Acipenseridaefamily*. Journal of Animal Biology, 2(1): 57-61. (In Persian).
29. Ghaedi, A., H. Hoseinzadeh Sahafi, and D. Zargham. 2015. Role of nutrition in improving fish immuno system Efficiency. Quarterly Journal of Ornamental Aquatic, 1(4):21-28.
30. Gisbert, E., G. Giménez, I. Fernández, Y. Kotzamanis, and A. Estévez. 2009. Development of digestive enzymes in common dentex, *Dentex dentex*, during early ontogeny. Aquaculture, 287: 381-387.
31. Hassantabar, F., H. Oraji, and S. S. Babaei. 2012. Studying the activity anzymes digestion of alkaline phosphatase, alkaline phosphatase and amylase, in larvae fish white (*Rutilus frisiikutum*) fed of artemianauplii. Research Science Animal Biology, 5(2):25-33.

32. Higgs, D. A., B. S. Dosanj, A. F. Prendergast, R. M. Beams, R. W. Hardy, W. Riley, and G. Deacon. 1995. Use of rapeseed/canola protein products in finfish diets. In: Sessa, D. J. & Lim. C. (Eds), Nutrition and Utilization technology in Aquaculture. AOAC Press, 22: 130-156.
33. Hoseinifar, S. H., Z. Roosta, A. Hajimoradloo, and F. Vakili. 2015. The effects of lactobacillus acidophilus as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resstance and growth performance of black swordtail (*xiphorushellri*). Fish and Shelfish Immunology, 42:533-538.
34. Irianto, A., and B. Austin. 2002. Use of probiotics to control furun-culosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Wal-baum). Journal of Fish Diseases, 25:333-342.
35. Jafari kenari, S. S., and B. Edhami. 2015. Comparison feed of diet biomar, shrimp, blood worm on growth performance, survival and parameter blood in larvae Joel (*Hemichromis bimaculatus*). Two Quarterly Reproduction Quarterly, 3(7):43-52.
36. Kakade, M. L., D. E. Hoffa, I. E. Leiner. 1973. Contribution of trypsin inhibitors to the deleterious effects of unheated soybeans fed to rats. Journal of Nutrition, 103: 1772-1778.
37. Koven W. M., R. J., Henderson, and J. R. Sargent. 1994. Lipid digestion in turbot (*Scophtalmus maximus*): I. Lipid class and fat ty acid composition of digesta from different segments of the digestive tract. Fish Physiology and Biochemistry, 13: 69- 79.
38. Lavens, P., and P. Sorgeloos. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO. Fisheries Technical paper, 181:295-361.
39. Lietz, D. M. 2004. Potential for aquatic oligochaetesas live food in commercial aquaculture. Hydrobiology, 155: 309-310.
40. Magnadottir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish and Shellfish Immunology, 20(2):137-151.
41. Mahious, A. S., and F. Ollevier. 2005. Probiotics and prebiotics in aquaculture: Review. 1st Regional Workshop on Techniques for Enrichment of Live Food for Use in Larviculture, 17-26.
42. Mahious, A. S., J. Van Loo, and F. Lieffrig. 2007. *Inulin* and *oligofructose* in aquaculture: A review. Aquaculture Europe, 14:326-327.
43. Mandal, B., A. Mukherjee, and S. Banerjee. 2010. Growth and Pigmentation Development efficiencies in fantail guppy, *Poecilia reticulate* fed with Cammercially available feeds. The Agriculture and Biology Journal of North America, 1(6):1264-1267.
44. Martinez-Porchas, M., M. Hernandez-Rodriguez, J. Davila-Ortiz, V. Vila-Cruz, and J. R. Ramos Enriquez. 2011. A preliminary study about the effect of benzo[α] pyrene (BaP) injection on the thermal behavior and plasmatic parameters of the Nile tilapia (*Oreochromisniloticus* L.) acclimated to different temperatures. Pan-American Journal of Aquatic Sciences, 6: 76-85.
45. Martino, R. C., J. E. P. Cyrino, L. Portz, and L. C. Trugo. 2002. Performance and fatty acid composition of surubim (Pseudoplatystoma coruscans) fed diets with animal and plant lipids. Aquaculture, 209:233-246.
46. Mauri, I., A. Romero, L. Acerete, S. Mackenzie, N. Roher, A. Callol, I. Cano, M. C. Alvarez, and L. Tort. 2011. Changes in complement responses in Gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) under crowding stress, plus viral and bacterial challenges. Fish and Shellfish Immunology, 30(1): 182-188.
47. Mohammadnejad shamoshaki, M., S. Heydari, and S. H. MousaviSabet. 2011. Nutritional comparison of Biomar, Celery, Compact worm, Blood worm, Gammarus and Artemia on growth and survival indices of severom fish (*Heros Severus*). Quarterly Journal Research, 3(3).
48. Mousavi sabet, H., H. Ershadilangroodi, and B. Falahatkar. 2009. The effect of Artemia Urmiana enriched with Non- Saturated Fattyacid and Ascorbic Acid on the productivity of reproductive angel fish production (Pterophyllum scalare). Naval Science and Marine Science, 1(1):61-69.
49. Neissi A., G. Rafiee, M. Nematollahi, and O. Safari, 2013. The effect of Pediococcus acidilactici bacteria used as probiotic supplement on the growth and non-specific immune responses of green terror, *Aequidens rivulatus*. Fish and Shellfish Immunology, 35: 1976-1980.
50. Petrović, S., B. Ozreti, and M. Krajnovic-Ozretic. 1996. Cytosolic aspartate aminotransferase from grey mullet (Mugil auratus Risso) red muscle: Isolation and properties. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 28(8): 873-881.
51. Rahmani Mazari, M. 2014. Evaluate the effects feed with Chirnomidae larvae and concentrate feed on the growth performance, feed efficiency, survival rate and maturation in rosy barb (*Puntius conchonius*). Master of Science.
52. Rajabipour, F., D. Shahsavani, A. Moghimi, S. Jamili, and N. Mashaii. 2009. Comparison of serum enzyme activity in great sturgeon, *Huso huso*, cultured in brackish and freshwater earth ponds in Iran. Comparative ClinicalPathology, 19: 301-305.
53. Rao, J. V. 2006. Toxic effects of novel organo phosphorus insecticide (*RPR-V*) on certain biochemical parameters of euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 86(2): 78-84.
54. Safari, O., D. Shahsavani, M. Paolucci, and M. M. S. Atash. 2014. Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements on the growth performance, nutrient digestibility, immune responses and stress resistance of juvenile narrow clawed crayfish, Astacus leptodactylus Eschscholtz, 182. Aquaculture, 432:

192-20.
55. Sales, J., and P. J. Janssens. 2003. Nutrition requirement of ornamental fish. Review, Aquatic Living Resources, 16: 533-540.
56. Schley, P. D., and C. J. Field. 2002. The immune-enhancing effects of dietary fibers and prebiotics. British Journal of Nutrition, 87: 221-230.
57. Segner, H., R. Rosch, H. Schmidt, and K. Von Poeppinghausen. 1989. Digestive enzymes in larval *Coregonus lavaretus* L. Journal of Fish Biology, 35: 249-63.
58. Shahsavani, D., M. Mohri, and H. Gholipour Kanani, 2010. Determination of normal values of some blood serum enzymes in *Acipenser stellatus* Pallas. Fish Physiology and Biochemistry, 36: 39-43.
59. Shalaby, A. 2005. The opposing effect of ascorbic acid (Vitamin C) on Ochratoxin toxicity in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. 6th International Symposiumon Tilapia in Aquacaculture, Philipines, 2(3): 150-157.
60. Siwicki, A. K., and D. P. Anderson, 1993. Immuno stimulation in fish: measuring the effects of stimulants by serological and immunological methods. Abstract Symposium on Fish Immunology, Lysekil, Sweden, 13:87-91.
61. Sotoudeh, E., A. Abedian Kenari, and M. Habibi Rezaei. 2011. Growth response, body composition and fatty acid profile of *Caspian brown trout*palm oil, and oleic acid-enriched sunflower oil as dietary lipid. Lipids, 35:633-664.
62. Stickney, R. 2000. Encyclopedia of aquaculture. John Wiley and Sons, Inc, United State of America, 1063p.
63. Tamaru, S., and H. Ako. 2003. Enrichment of Artemia for use in fresh water ornamental fish production. Center for Tropical and Subtropical Aquaculture Publication, 48p.
64. Tatina, M., Z. A. Pazhand., and M. GHaribkhani. 2010. The effect of using dafnia powder and nereis worm on food rations and some indices of Acipenser Persicus larvae. Journal of Sea Biology, 2(7):27-36.
65. Waley, K., and J. North. 1997. Haemolytic assays for whole complement activity and individual components. in: A. W. Dodds, and R. B. Sim, editors. Complement: a Practical Approach. Oxford University Press, Great Britain, 296 p.
66. Worthington, C. C. 1991[a]. Worthington enzyme manual related Biochemical. 3rd Edition. Freehold. New Jersey, 46(4): 38-42.
67. Worthington, C. C. 1991[b]. Worthington enzyme manual related Biochemical. 3rd Edition. Freehold. New Jersey, 34: 212-215.
68. Yufera, M., and M. J. Darias. 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. Aquaculture Journal, 268(1-4): 53-63.
69. Zilberga, D., R. Ofira, T. Rabinskib, and A. Diamantc. 2004. Morphological and genetic characterization of swimbladder non-inflation in angel fish *pterophyllum scalare* (cichlidae), Aquaculture, 230:13-27.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 10, No. 2, Summer 2018, p. 297-310

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۰، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷، ص. ۳۱۰-۲۹۷

Comparison of Cultivated Tubifex Worm (*Tubifex tubifex*) Powder and Commercial Tubifex Worm on Growth Performance and Immunity Indices in Angel Fish (*pterophylum scalare*) Resistance to Air exposure Challenge Stress

M. Barkhordar[1]- R. Valizadeh[2]- O. Safari[3]- M. R. Ahmadi[4]- A. A. Naserian[2]

Received: 03-06-2017
Accepted: 14-08-2017

Introduction The aquaculture industry in the world, with an 8-million-dollar transaction rate, has 8% growth annually. It also has the most value-added rate among different fishery activities based on the food and Agriculture Organization (FAO). The angelfish belonging to Cichlid family, is known as a famous species in this industry. This fish feeds on various live feedstuffs. Regarding the significance of suitable feedstuffs in aqua feed industry, the live feeds used to provide nutritional requirements, immunity tuning and stimulation will be of important. Tubifex worm, containing considerable crude protein, diverse sorts of amino acids and essential fatty acids, has a deserving role and checking the nutritional value of Tubifex worm with aim of improving the growth performance, boosting immune responses and survival rate, reducing expenditure cost and increasing productivity is so crucial. The objective of the current experiment was to compare the effect of the cultured and commercial Tubifex worm powder in the diet of juvenile angelfish on growth performance and immune responses.

Materials and methods The experimental rations included 3 rations: 1) control ration as pellet 2) commercial Tubifex powder as freeze-dried food and 3) the rations containing mass-produced Tubifex as freeze-dried food. One-hundred thirty five Angel fishes with an average initial weight of 0.2± 0.5 gr were tested for 63 days. The fishes were placed randomly into nine 920 liter-capacity of 15 fishes. The average temperature was (27±1˚C), pH (7.5±0.1) and dissolved oxygen (7.68±0.35) was regulated according to required conditions. The length of light-dark cycles was considered 14 and10 hours, respectively.The fishes were fed 3% body weight in three times a day (7, 13 and 20). Biometry was conducted at 1st, 31st and 63rd days and the criteria related to the growth performance, nutrient utilization efficiency and survival rate were computed.

At the end of the experimental period, five samples were taken from each aquarium, exposed to the air-challenge for 3 min and bleed 3 h after challenge. After that, biochemical analyses including trypsin, amylase and lipase were measured by using benzoyl-arginine p-nitroanilide substrate, starch and olive oil as substrate, respectively through titration method. At the end of the experimental period, total immunoglobulin, lysosome and complement, liver enzymes including ALT and AST were measured by kinetic enzymatic method and the microbial parameters including (plate count agar, and lactobacilus conut were measured. Chemical analysis of experimental diets including crude protein by Kjeldahl method, crude fat by Soxhelt extractor and ash by electrical furnace were measured. Normality Test of was done by Shapior-wilk test. Analysis of alterations in growth performance, nutritional and biochemical factors were done by one-way analysis of variance (ANOVA) and comparing means based on Duncan multiple test using SPSS software, version19.0.

Results and Discussion The highest rate of final weight (about 30%), initial length (about 14%) and the rate of special growth (about 27%) were belonged to the angel fishes fed on the diet containing cultured Tubifex. The activity of the immunity parameters including total immunoglobulin, lysosome as well as complement were also significantly higher in the treatment with the diets containing Tubifex after air exposure challenge. The activities of the lipase, protease and amylase increased in the culturing Tubifex treatment in compared with two other ones. The number of the intestinal lactobacillus indicated that the most colonies forming unit of lactobacillus was significantly higher in angel fish fed the diet containing cultured Tubifex treatment. The results indicated that the angel fishes fed on the cultured Tubifex showed higher weight increment, special growth rate, survival rate as well as better nutrient utilization efficiency which may be attributed to the existence of higher rate of protein, unsaturated fatty acids

Improvement of the immunity in fish fed the diet containing cultured Tubifex can be related to the role of

1- Ph.D. Student, Department of Animal Sciences, University of Mashhad, Mashhad, Iran
2- Professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
3- Assistant Professor, Department of Faculty of Natural Resources and Environment, University of Mashhad, Mashhad, Iran
4- Professor of Health and Aquatic Diseases. Department, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran
(*- Corresponding author email: valizadeh@um.ac.ir)

lysosome as an important factor in natural perseverance for fishes, immunoglobulin as an important factor in antibody secretion as well as complement which has a basic role in acquired natural immunity for the fishes. The enzymes ALT and ALP which have an important role in using amino acids in oxidation process The increase of intestinal LAB count in angel fish fed the cultured Tubifex can be enhanced absorbing nutrients, disease resistance and finally, higher growth performance Considering the higher mortality rate among the larvae in the first 20-30 days and the initial time of the active feeding because of changing the nutritional modes, use of Tubifex worm powder as a live food may be effective in better growth function, external form as well as promotion of immunity system for the fishes.

Conclusion Feeding the angel fishes on cultured Tubifex worm powder especially in the initial steps of the active feeding may result in improvement in growth performance and some specific and nonspecific immune responses.

Keywords: Tubifex Worm, Growth performance, Angel Fish (*pterophylum scalare*)