تأثیر اسیدآسکوربیک در جیره‌ی غذایی بر میزان کلاژن استخوان و ترکیب بدن بچه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)

هومن رجبی‌اسلامی[۱*] و نرگس عرب[۲]

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۵

چکیده

پژوهش حاضر برای ارزیابی سطح مناسب اسید آسکوربیک در جیره‌ی غذایی بر میزان کلاژن استخوان و ترکیبات بدن بچه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) انجام شد. پنج جیره‌ی غذایی با مقادیر ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک در کیلوگرم غذا برای تیمارهای مختلف آزمایشی آماده گردید. تعداد ۶۰۰ قطعه بچه ماهی آزاد دریای خزر نیز با وزن ۰/۶±۹/۶ گرم تهیه و به صورت تصادفی در پنج تیمار با سه تکرار (۴۰ قطعه ماهی برای هر تیمار) توزیع گردید. ماهیان به مدت ۹ هفته توسط جیره‌های غذایی تغذیه و میزان کلاژن همراه با ترکیب بدن بچه ماهیان آزمایشی بین تیمارهای آزمایشی مقایسه شدند. نتایج بیانگر اختلاف معنی‌داری در وزن نهایی، میزان کلاژن استخوان و در آنالیز لاشه‌ی بچه ماهیان آزاد دریای خزر بود ($p<۰/۰۵$). افزایش اسید آسکوربیک در جیره‌ی غذایی باعث افزایش معنی‌دار وزن نهایی ماهیان شده ($p<۰/۰۵$) و به بالاترین میزان (۳/۵۲±۲۹/۷۴ گرم) در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک رسید. بیش‌ترین مقدار کلاژن در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک در هر کیلوگرم غذا مشاهده شد، که میزان آن با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). بیش‌ترین میزان تجمع چربی و خاکستر نیز در تیمار حاوی ۵۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک به دست آمد. میزان بهینه‌ی اسید آسکوربیک برای تجمع کلاژن و سنتز پروتئین در عضله‌ی بچه ماهی آزاد دریای خزر بر اساس آزمون پاسخ به سطح به ترتیب برابر با ۲۴۷/۵۴ و ۲۵۰/۵۵ میلی‌گرم اسید آسکوربیک در هر کیلوگرم جیره‌ی غذایی به دست آمد.

کلمات کلیدی: اسید آسکوربیک، بچه ماهی آزاد دریای خزر، رشد، کلاژن استخوان، آنالیز لاشه

مقدمه

اسید آسکوربیک یکی از ویتامین‌های ضروری است که در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی حیوانات نقش دارد (Ai et al. 2006, Eo and Lee 2008, Nelson and Cox 2005). عدم سنتز آنزیم L-gulonolactone oxidase در اغلب آبزیان به عنوان کاتالیزور تبدیل L-glunolactone به اسید آسکوربیک و ناپایداری آن در بافت‌های ذخیره‌ساز موجب وابستگی بسیاری از ماهیان استخوانی به منابع خارجی این ویتامین از طریق ترکیبات غذایی گردیده است (Dabrowski 2001).

اسید آسکوربیک در بهبود عملکرد ایمنی (Chen et al. 2004, Lin and Shiau 2005)، مقاومت در برابر استرس (Henrique et al. 1998, Chen et al. 2004)، اکسیداسیون چربی‌ها (Shiau and Hsu 1999, Xie and Niu 2006) و شنای گله‌ای (Koshio et al. 1997) ماهیان تأثیرگذار است. اسید آسکوربیک هم‌چنین در سوخت و ساز آهن و بهبود عملکرد ویتامین D نقش دارد و همراه با ترشحات بافت آدرنال از استرس‌های محیطی می‌کاهد (Lovell 1989, Navarre and Halver 1989). این ویتامین در تعدادی از فرآیندهای بیوشیمیایی مانند ساخت کلاژن نیز به عنوان یکی از اجزای اصلی غشای بافت

[۱*] استادیار گروه شیلات، دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاداسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

E-mail: rajabi.h@srbiau.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه شیلات، دانشکده‌ی کشاورزی و منابع‌طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

پیوندی در فلس‌ها، بافت غضروفی و استخوان‌ها نقش دارد و عامل پیوستگی میوتم‌ها و یکپارچگی عضلات با تشکیل بافت هم‌بند می‌باشد (McDowell 1989, Oikawa et al. 2008).

علایم کمبود اسید آسکوربیک شامل تأخیر در رشد، تغییر شکل ستون مهره‌ها، حرکات غیرطبیعی در اندام‌هایی نظیر آبشش و باله‌ها، تشکیل رنگ‌دانه‌های غیرطبیعی، افزایش شکنندگی مویرگی، کاهش پاسخ ایمنی، تأخیر در بهبود زخم و کاهش عملکرد تولیدمثلی در گونه‌های مختلف ماهیان گزارش شده است (Adunni and Aro 2009, Falahatkar et al. 2011, Ibiyo et al. 2007, Xie and Niu 2006).

ماهی آزاد دریای خزر با نام علمی *Salmo trutta caspius* (Kessler 1877) از جمله گونه‌های بومی دریاچه خزر می‌باشد که برای تخم‌ریزی به رودخانه‌های آب شیرین منتهی به این دریاچه شامل کرگان‌رود، سردآبرود، بابل‌رود، سفیدرود، تنکابن، شفارود و آستارا چای مهاجرت می‌کند (Berg 1949, Kiabi et al. 1999). کیفیت مناسب گوشت و ارزش اقتصادی همراه با اهمیت ژنتیکی ماهی آزاد دریای خزر به دلیل جایگاه تکاملی آن در خانواده آزاد ماهیان، زمینه‌ی مطالعات مختلفی در مورد این گونه گردیده است (عبدلی و نادری ۱۳۸۷، Kazanchof 1981, Naghdi Tabrizi et al. 2011, Sourinejad et al. 2010). آلودگی‌های مختلف دریاچه‌ی خزر و رودخانه‌های منتهی به آن، تخریب مکان‌های طبیعی تخم‌ریزی، انسداد مسیرهای مهاجرتی به سبب احداث پل‌ها و سدها و صید بی‌رویه طی سال‌های اخیر باعث شده که بقای نسل این ماهی با ارزش شیلاتی در معرض خطر قرار گیرد (Kiabi et al. 1999).

مطالعات مختلفی در زمینه‌ی تغذیه (صابر و همکاران ۱۳۸۴، Sotoudeh et al. 2011) و البته بازسازی ذخایر (زمانی و همکاران ۱۳۸۶، رهبر و همکاران ۱۳۸۸، Niksirat and Abdoli 2009, Sarvi et al. 2006) روی ماهی آزاد دریای خزر صورت گرفته است، هرچند تحقیق مدونی در خصوص نقش ویتامین‌ها بر ترکیب لاشه‌ی این ماهی صورت نگرفته است. در پژوهش حاضر بر این اساس به مطالعه‌ی اثر اسید آسکوربیک در جیره‌ی غذایی بر میزان کلاژن استخوان و ترکیبات لاشه‌ی بچه ماهی آزاد خزر به عنوان یک گونه استراتژیک و تجاری در دریای خزر پرداخته شد.

مواد و روش کار

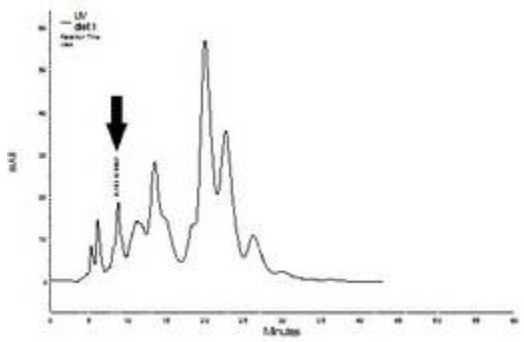
تهیه‌ی جیره‌ی غذایی

غذای پایه برای رشد بهینه‌ی بچه ماهی آزاد دریای خزر به عنوان تیمار شاهد در این تحقیق شامل ترکیبی از پودر ماهی، روغن ماهی، کنجاله‌ی سویا، آرد گندم، پودر آب پنیر خشک، پودر گاماروس همراه با مکمل‌های ویتامینه و معدنی بود که بر اساس پیشنهاد صابر و همکاران در سال ۱۳۸۴ با کمی تغییرات شامل حذف ویتامین C از جیره‌ی غذایی پایه تهیه شد. سایر تیمارهای آزمایشی نیز با افزودن ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک با فرمول شیمیایی L-ascorbyl-2-polyphosphate (ساخت شرکت SAMP، چین) به عنوان پایدارترین شکل ساختمانی از این ویتامین به هر کیلوگرم از غذای پایه آماده شدند.

اجزای جامد مواد اولیه هر یک از جیره‌های غذایی با کمک یک آسیاب صنعتی طی یک ساعت به پودر تبدیل و بر اساس فرمول پیشنهادی به دقت با یکدیگر مخلوط شدند. خمیر به دست آمده در ادامه به دستگاه پلت‌ساز منتقل و به اندازه‌های مناسب ۲ میلی‌متر تبدیل شد. پلت‌ها با کمک یک پنکه صنعتی به مدت یک ساعت در معرض هوای محیط خشک شدند. فرآیند آماده‌سازی غذا برای جلوگیری از تخریب اسید آسکوربیک جیره هر سه هفته یک بار انجام گرفت. غذای آماده شده تا شروع آزمایش در فریزر با دمای ۱۲- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. میزان رطوبت، چربی، پروتئین و خاکستر هر یک از جیره‌های غذایی مورد سنجش قرار گرفت (AOAC 1990).

آنالیز اسید آسکوربیک موجود در جیره‌ی غذایی

میزان اسید آسکوربیک هر یک از جیره‌های غذایی با توجه به احتمال حضور اسید آسکوربیک در اجزای مختلف جیره‌ی غذایی پیش از شروع آزمایش با خرد نمودن ۱ تا ۳ گرم از غذاهای آماده شده طبق روش Shiau و Hsu در سال ۱۹۹۹ با برخی تغییرات اندازه‌گیری شد. نمونه‌های خرد شده غذا با ۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم، ۳۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۵ درصد و ۱۲ قسمت در میلیون دی‌تی‌تریتول[1] به مدت ۲۵ دقیقه مخلوط و ۲۵ دقیقه ثابت باقی ماندند. سپس ۳۰ میلی‌لیتر از فاز فوقانی محلول جدا و به مدت ۳۰ دقیقه با شتاب گرانشی ۲۷۳۹×g سانتریفیوژ شد. فاز فوقانی مایع در ادامه از فیلتر سرنگی با چشمه ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد و میزان اسید آسکوربیک در ۲۰ میکرولیتر از نمونه توسط دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC) مجهز به ستون C18 مشخص گردید. فاز متحرک دستگاه HPLC شامل اسید فسفریک ۰/۰۵ مولار بود که pH آن برابر ۳ تنظیم و با سرعت ۰/۶ میلی‌لیتر در دقیقه از ستون عبور داده شد. سیال خروجی توسط آشکارساز UV در طول موج ۲۵۴ نانومتر مورد پایش قرارگرفت. لازم به ذکر است که غلظت‌های استاندارد اسید آسکوربیک (شرکت SAMP، چین) پیش از نمونه‌های اصلی به دستگاه HPLC تزریق و منحنی استاندارد رسم شد (شکل ۱).



شکل ۱: نمونه‌ای از کروماتوگرام تهیه شده برای یکی از جیره‌های غذایی همراه با Retention Time که با فلش مشخص شده است.

طراحی تحقیق

تعداد ۶۰۰ قطعه بچه ماهی آزاد دریای خزر با وزن ابتدایی ۰/۶±۹/۶ گرم به صورت تصادفی از مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی کشور، تنکابن، استان مازندران تهیه و به مزرعه قزل کوثر در جاده‌ی دو هزار تنکابن منتقل گردیدند. ماهیان پس از انتقال برای سازگاری با شرایط کارگاهی به مدت ۲ هفته به غذای دستی ساخت کارخانه بهپرور تهران عادت داده شدند.

آب مصرفی طی دوره‌ی آزمایشی از یک چشمه با دبی ۶ لیتر بر ثانیه تأمین گردید. تغییرات دمایی آب چشمه در طول آزمایش بسیار کم و دارای میانگینی برابر ۹/۹ درجه‌ی سانتی‌گراد بود. میانگین اکسیژن محلول نیز در طول دوره‌ی آزمایش برابر ۱۰/۲ میلی‌گرم در لیتر بود. هم‌چنین میانگین pH در طول دوره‌ی آزمایش در محدوده‌ی خنثی قرار داشت و هدایت الکتریکی با میانگین ۲۴۹/۷ میکروموس بر سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. آب چشمه مورد استفاده طی ۹ هفته آزمایش شرایط مناسبی برای رشد بچه ماهی آزاد دریای خزر داشت.

آزمایش در پنج استخر کانالی (raceway) به ابعاد (۰/۸×۱×۵ متر) انجام گرفت که هر یک از استخرها توسط توری‌های پارچه‌ای با چشمه ریز به سه قسمت مساوی (در مجموع ۱۵ فضای آزمایشی) تقسیم گردیدند. بلوک‌ها به شکل تصادفی به پنج تیمار شامل تیمار شاهد (بدون اضافه کردن ویتامین C) و مقادیر ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم غذا، هر یک با سه تکرار تقسیم گردیدند. سپس بچه ماهیان به تعداد مساوی ۴۰ عدد به صورت تصادفی در هر یک از فضای آزمایشی توزیع و روزانه در سه نوبت با غذای مربوط به هر تیمار برای نه هفته متوالی در حد سیری غذادهی شدند. گفتنی است که مصرف غذا توسط بچه ماهیان بسیار سریع بود و غذایی در آب باقی نماند.

1- Dithithreitol

وزن نهایی، کلاژن استخوان و ترکیبات بدن بچه ماهیان آزاد دریای خزر با نمونه‌برداری در هفته‌ی نهم آزمایش تعیین گردید و بین تیمارهای آزمایشی مقایسه شدند. غذادهی به ماهیان یک روز پیش از زیست‌سنجی قطع و میزان وزن و طول کل پس از بی‌هوشی با ۲۵۰ قسمت در میلیون اسانس گل میخک (سلطانی و همکاران ۱۳۸۰) به ترتیب توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم و کولیس دیجیتال با دقت ۰/۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. سپس پنج نمونه ماهی از هر ۱۵ فضای آزمایشی به صورت کاملاً تصادفی برای اندازه‌گیری میزان کلاژن استخوان و ترکیبات بدن بچه‌ماهیان آزاد دریای خزر انتخاب شدند.

آنالیز ترکیب لاشه

ترکیب لاشه‌ی بچه ماهیان آزاد دریای خزر در انتهای هفته‌ی نهم طبق روش‌های پیشنهادی AOAC (AOAC 1990) مشخص شد. رطوبت لاشه با استفاده از آون در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت تعیین گردید. میزان پروتئین بافت با اندازه‌گیری نیتروژن (N×6.25) طبق روش کلدال اندازه‌گیری شد. چربی بافت عضلانی نیز بر اساس روش سوکسله توسط n-Hexan استخراج شد. میزان خاکستر نمونه نیز با قرار دادن وزن مشخصی از بافت عضله در کوره‌ی الکتریکی در دمای ۵۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت اندازه‌گیری شد. میزان رطوبت، پروتئین، چربی و خاکستر بافت در انتهای هفته‌ی نهم آزمایش بر حسب گرم در صد گرم بافت عضلانی طبق فرمول‌های زیر محاسبه شدند:

$$\text{ضریب رشد ویژه } (SGR) = \frac{\text{لگاریتم میانگین وزن اولیه} - \text{لگاریتم میانگین وزن نهایی}}{\text{دوره پرورش به روز}} \times ۱۰۰$$

$$\text{ضریب تبدیل غذایی} (FCR) = \frac{\text{افزایش وزن بدن}}{\text{مقدار غذای خورده شده}}$$

$$\text{ضریب چاقی} (CF) = \frac{\text{وزن}}{(\text{طول کل})^3} \times ۱۰۰$$

$$\text{رطوبت} = \text{وزن خشک (گرم)} - \text{وزن تر (گرم)}$$

$$\text{درصد نیتروژن} = \frac{\text{حجم اسید مصرفی (میلی‌لیتر)} \times \text{نرمالیته اسید} \times ۱۴ \times ۱۰۰}{\text{وزن نمونه (گرم)} \times ۱۰۰۰}$$

$$\text{میزان پروتئین} = \text{درصد نیتروژن} \times \text{فاکتور پروتئین}$$

$$\text{میزان چربی} = \frac{\text{وزن بالن} - (\text{وزن نمونه} + \text{وزن بالن}) \text{(گرم)}}{\text{وزن نمونه (گرم)}} \times ۱۰۰$$

$$\text{میزان خاکستر} = \frac{\text{وزن کروزه (گرم)} - (\text{وزن کروزه} + \text{خاکستر}) \text{(گرم)}}{\text{وزن نمونه (گرم)}} \times ۱۰۰$$

$$\text{نرخ کارایی پروتئین} = \frac{\text{افزایش وزن بدن (گرم)}}{\text{میزان پروتئین جیره غذایی (گرم)}} \times ۱۰۰$$

اندازه‌گیری میزان کلاژن استخوان

ستون مهره‌های بچه‌ماهیان برای تعیین مقدار کلاژن بر اساس روش Wilson و Poe در سال ۱۹۷۳ با برخی اصلاحات جدا و به مدت ۱۲ دقیقه در آب ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد برای تفکیک باقیمانده‌ی گوشت از روی مهره‌ها جوشانده شد. استخوان‌ها سپس در محلول ۰/۱ مولار سود سوزآور به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند تا از هم جدا شوند. تمام مهره‌های متعلق به هر ماهی به صورت جداگانه در آون با دمای ۱۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت خشک شدند. میزان ۰/۵ گرم از ستون مهره‌های هر ماهی داخل ۱۰ میلی‌لیتر سود سوزآور ۰/۱ مولار برای مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. این فرآیند با سه تکرار برای مهره‌های هر ماهی انجام پذیرفت. محلول به دست آمده در ادامه فیلتر شد و حلال‌ها دور ریخته شدند. باقی‌مانده‌های استخوان با ۰/۵ مول EDTA در pH برابر ۷/۵ مخلوط و برای ۴۸ ساعت در دمای ۲ درجه‌ی سانتی‌گراد روی دستگاه لرزاننده[1] قرار گرفتند. محلول EDTA در فواصل زمانی ۶ ساعته تعویض شد. باقیمانده‌ی استخوان‌ها به ترتیب پس از شستشو با آب مقطر و استون به مدت ۱ ساعت در مخلوط یک به یک (۱:۱) اتانول به اتر عصاره‌گیری شدند. حلال‌ها پس از عصاره‌گیری نهایی حذف و بخش حل نشدنی کلاژن به مدت ۱ ساعت در آون با دمای ۱۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد خشک و وزن گردید. نتایج در انتها به صورت میانگین وزن کلاژن استخوان پنج ماهی از هر تیمار محاسبه و به صورت درصد ارایه گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تحلیل یافته‌ها توسط نرم‌افزار SPSS-16 صورت گرفت. اختلاف بین میانگین‌ها پس از تأیید نرمال بودن توزیع داده‌ها از طریق آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) تعیین و محل اختلافات توسط آزمون Tukey's HSD مشخص گردید. سطح اطمینان کم‌تر از ۵ درصد نیز به عنوان سطح اختلاف معنی‌داری میان تیمارها برای تمام متغیرهای آزمایشی مشخص شد. نمودارها به کمک نرم‌افزارهای SigmaPlot رسم شدند. هم‌چنین سطح بهینه‌ی اسید آسکوربیک برای سنتز کلاژن استخوان و پروتئین موجود در عضله‌ی بچه ماهی آزاد دریای خزر بر اساس آزمون پاسخ به سطح پیشنهادی توسط Robbins و همکاران در سال ۱۹۷۹ تعیین گردید.

نتایج

آنالیز جیره‌ی غذایی

یافته‌های حاصل از این پژوهش تفاوت معنی‌داری را در میزان رطوبت، پروتئین، چربی و خاکستر در جیره‌ی غذایی بین تیمارهای آزمایشی نشان نداد (جدول ۱). هم‌چنین آنالیز اسید آسکوربیک در جیره‌های غذایی متعلق به تیمارهای شاهد، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک در هر کیلوگرم غذا نشان داد که تیمار شاهد در این پژوهش بدون اضافه کردن اسید آسکوربیک دارای ۹/۸ میلی‌گرم اسید آسکوربیک در هر کیلوگرم غذا بود (جدول ۱). با توجه به اینکه برخی از جیره‌های آزمایشی دارای مقادیر کم‌تر و یا بیش‌تری از اسید آسکوربیک بودند، تیمارها بر اساس میزان اسید آسکوربیک اضافه شده به هر جیره‌ی غذایی نام‌گذاری شدند.

1- Shaker

جدول ۱: نتایج آنالیز جیره‌های غذایی (میانگین±خطای استاندارد) ماهی آزاد دریای خزر طی ۹ هفته آزمایش با جیره‌ی غذایی حاوی مقادیر مختلف اسید آسکوربیک

شاخص / گروه	رطوبت (گرم در صد گرم وزن تر)	پروتئین (گرم در صد گرم وزن خشک)	چربی (گرم در صد گرم وزن خشک)	خاکستر (گرم در صد گرم وزن خشک)	اسید آسکوربیک (گرم در صد گرم وزن خشک)
شاهد	۵/۲۳±۰/۳۵	۴۹/۶±۰/۲۵	۱۵/۰۱±۰/۵۷	۱۷/۴۰±۰/۱۳	a ۹/۸±۲/۶
۵۰ میلی‌گرم	۵/۵۷±۰/۳۲	۴۹/۷±۰/۲۴	۱۴/۸۰±۰/۴۸	۱۷/۳۳±۰/۰۹	b ۴۳/۸±۳/۱
۱۰۰ میلی‌گرم	۵/۵۶±۰/۲۸	۴۹/۶±۰/۳۱	۱۵/۲۰±۰/۳۵	۱۷/۵۶±۰/۱۴	c ۸۹/۴±۳/۷
۲۰۰ میلی‌گرم	۵/۶۲±۰/۳۰	۴۹/۵±۰/۲۳	۱۴/۸۸±۰/۴۳	۱۷/۴۳±۰/۱۸	d ۱۸۸/۵±۱۹/۴
۴۰۰ میلی‌گرم	۵/۶۴±۰/۳۲	۴۹/۶±۰/۴۹	۱۴/۹۳±۰/۳۹	۱۷/۷۸±۰/۱۷	e ۳۸۴/۲±۲۶/۵

- حروف مشابه روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار میان تیمارها است.

میزان بقای ماهیان در تمامی تیمارهای آزمایشی برابر ۱۰۰ درصد به دست آمد و هیچ تلفاتی در تیمارهای ماهیان طی آزمایش و حتی هنگام سازگاری به وضعیت کارگاهی دیده نشد. هم‌چنین طی ۹ هفته دوره‌ی پرورش علائم ظاهری ناشی از کمبود اسید آسکوربیک مانند انحنای ستون فقرات و شنای نامتعارف در هیچ یک از بچه ماهیان آزاد دریای خزر مشاهده نگردید. نتایج این پژوهش نشان داد که در نهمین هفته‌ی آزمایش میزان ۲۰۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک در هر کیلوگرم غذا باعث افزایش معنی‌دار رشد در مقایسه با تیمارهای شاهد و ۵۰ میلی‌گرم شده است ($p<۰/۰۵$)، در حالی که تفاوت معنی‌داری در میزان رشد ماهیان بین تیمارهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در هفته‌ی نهم مشاهده نشد (جدول ۲).

جدول ۲: نتایج فاکتورهای رشد (میانگین±خطای استاندارد) ماهی آزاد دریای خزر پس از ۹ هفته آزمایش با جیره‌ی غذایی حاوی مقادیر مختلف اسید آسکوربیک

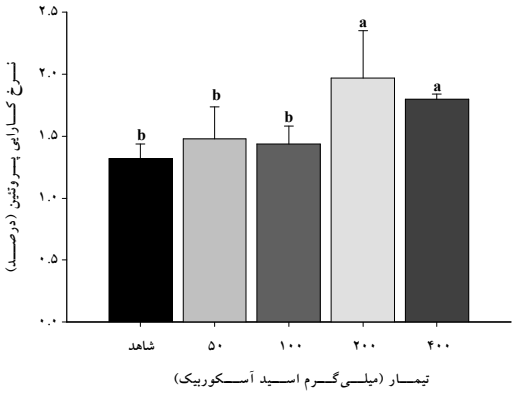
شاخص / گروه	وزن نهایی (گرم)	ضریب رشد ویژه (درصد در روز)	ضریب تبدیل غذایی	ضریب چاقی (درصد)
شاهد	b ۰/۷۵±۲۲/۶۴	b ۰/۵۹±۰/۰۳	a ۱/۵۲±۰/۰۲	۱/۰۰±۰/۰۴
۵۰ میلی‌گرم	b ۲/۴۲±۲۵/۴۹	b ۰/۶۴±۰/۱۱	a ۱/۴۹±۰/۴۶	۱/۰۰±۰/۰۲
۱۰۰ میلی‌گرم	ab ۲/۰۴±۲۶/۲۱	ab ۰/۶۸±۰/۰۳	a ۱/۲۳±۰/۱۶	۱/۰۲±۰/۰۵
۲۰۰ میلی‌گرم	a ۳/۵۲±۲۹/۷۴	a ۰/۷۷±۰/۰۲	b ۰/۹۹±۰/۰۲	۱/۰۳±۰/۰۴
۴۰۰ میلی‌گرم	a ۱/۵۳±۲۷/۶۷	a ۰/۷۲±۰/۰۳	ab ۱/۱۳±۰/۱۶	۱/۰۲ ±۰/۰۳

– حروف مشابه روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار میان تیمارها است.

هم‌چنین ضریب رشد ویژه‌ی ماهیان در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک به شکل معنی‌داری بیش از تیمار شاهد و البته تیمار ۵۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک در هر کیلوگرم از جیره‌ی غذایی بود ($p<۰/۰۵$). با وجود این، تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک در هر کیلوگرم جیره‌ی غذایی از لحاظ میزان ضریب رشد ویژه به دست نیامد ($p>۰/۰۵$). یافته‌های تقریباً مشابهی نیز در مورد ضریب

تبدیل غذایی به دست آمد، به طوری که کم‌ترین و بیش‌ترین میزان این متغیر به ترتیب در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک در هر کیلوگرم جیره‌ی غذایی و تیمار شاهد به دست آمد. البته یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که ضریب چاقی ماهی آزاد دریای خزر به شکل معنی‌داری تحت تأثیر میزان اسید آسکوربیک جیره‌ی غذایی قرار ندارد ($p>0/05$).

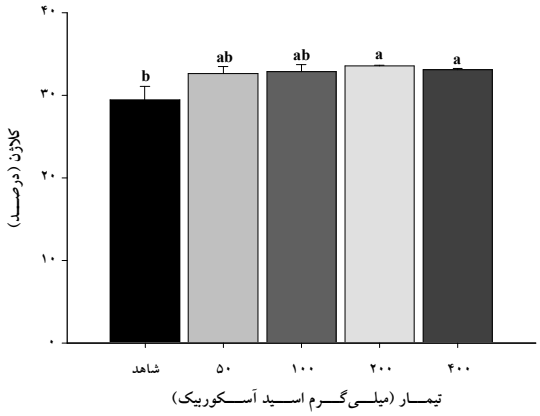
نرخ کارایی پروتئین در تیمارهای مختلف دارای تفاوت معنی‌داری بود. کم‌ترین میزان نرخ کارایی پروتئین در تیمار شاهد به میزان ۱/۳۲±۰/۱۲ مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با تیمار ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک در کیلوگرم غذا نداشت (شکل ۲). اختلاف معنی‌داری در میزان نرخ کارایی پروتئین بین تیمارهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک در کیلوگرم غذا دیده نشد، هرچند که تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک در کیلوگرم غذا بیش‌ترین میزان کارایی پروتئین را با ۱/۹۷±۰/۳۸ درصد داشت.



شکل ۲ : درصد تغییرات نرخ کارایی پروتئین (میانگین±خطای استاندارد) بچه ماهی آزاد دریای خزر پس از نه هفته تغذیه با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر مختلف اسید آسکوربیک.

– حروف مشابه روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در میان تیمارهاست.

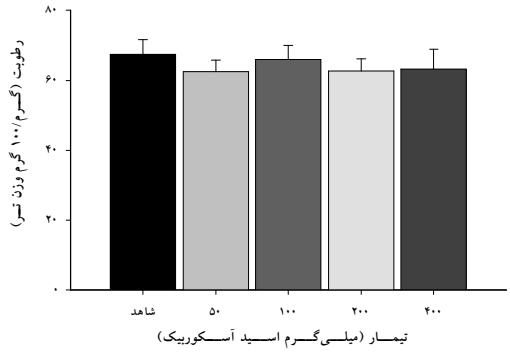
میزان کلاژن استخوان نیز دارای تفاوت معنی‌داری در بین تیمارهای مختلف بود ($p<0/05$)، به طوری که تیمار شاهد و ۲۰۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک در کیلوگرم غذا به ترتیب با ۱/۶۷±۲۹/۴۲ و ۰/۱۲±۳۳/۵۴ درصد دارای کم‌ترین و بیش‌ترین میزان کلاژن در هفته‌ی نهم آزمایش بودند (شکل ۳). البته تفاوت معنی‌داری در میزان کلاژن استخوان بین تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک با تیمارهای ۵۰، ۱۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک در هر کیلوگرم از جیره‌ی غذایی وجود نداشت.



شکل ۳: میزان کلاژن (میانگین±خطای استاندارد) استخوان ماهی آزاد دریای خزر بر حسب درصد پس از نه هفته تغذیه با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر مختلف اسید آسکوربیک.

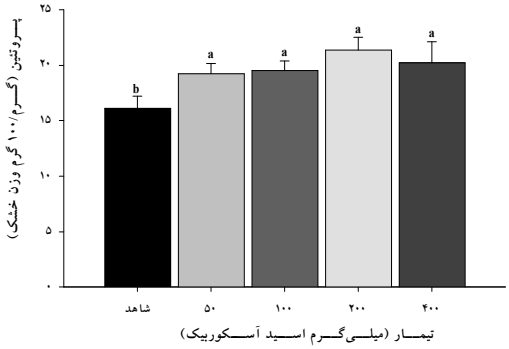
– حروف مشابه روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در میان تیمارهاست.

نتایج حاصل از این پژوهش عدم تفاوت معنی‌داری در میزان رطوبت بافت عضلانی پس از نه هفته آزمایش در میان تیمارهای آزمایشی بود ($p>0/05$). بیش‌ترین میزان رطوبت با ۰/۳۵±۶۷/۳۸ گرم در صد گرم وزن تر در تیمار شاهد و کم‌ترین میزان آن نیز با ۳/۱۳±۶۲/۴۴ گرم در صد گرم وزن تر در تیمار ۵۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک در هر کیلوگرم از جیره‌ی غذایی به دست آمد (شکل ۴).



شکل ۴: میزان رطوبت (میانگین±خطای استاندارد) عضله‌ی ماهی آزاد دریای خزر بر حسب گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر پس از نه هفته تغذیه با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر مختلف اسید آسکوربیک.

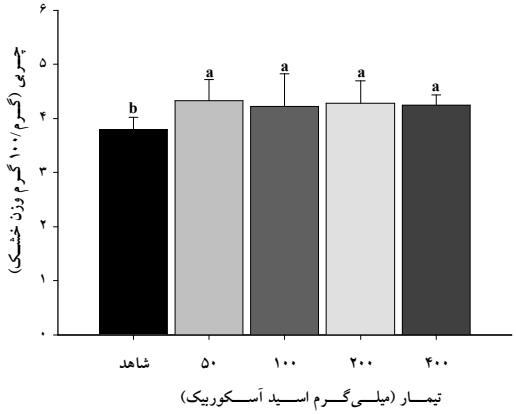
میزان پروتئین در بین تیمارهای مختلف دارای اختلاف معنی‌داری بود (p<۰/۰۵). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد کم‌ترین میزان پروتئین در هفته‌ی نهم به تیمار شاهد تعلق داشت که دارای اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارهای آزمایشی بود (شکل ۵). علی‌رغم اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای حاوی اسید آسکوربیک (p>۰/۰۵)، یک روند افزایشی در میزان پروتئین با افزایش میزان اسید آسکوربیک تا ۲۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم از جیره‌ی غذایی به ثبت رسید.



شکل ۵: میزان پروتئین (میانگین±خطای استاندارد) عضله‌ی ماهی آزاد دریای خزر بر حسب گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک پس از نه هفته تغذیه با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر مختلف اسید آسکوربیک.

– حروف مشابه روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در میان تیمارهاست.

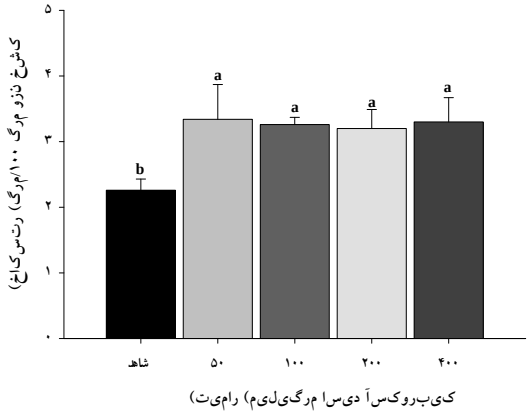
پس از نه هفته تفاوت معنی‌داری نیز در میزان چربی آزمایش به دست آمد. مقدار تجمع چربی در بافت عضله‌ی ماهی آزاد تحت تأثیر تیمار شاهد با ۰/۲۲±۳/۸۰ گرم در صد گرم وزن خشک به کم‌ترین میزان در مقایسه با سایر تیمارها رسید (p<۰/۰۵). بیش‌ترین میزان تجمع چربی نیز با ۰/۳۹±۴/۳۳ گرم در صد گرم در تیمار حاوی ۵۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک به دست آمد که البته دارای اختلاف معنی‌داری (p<۰/۰۵) با دیگر تیمارهای حاوی اسید آسکوربیک نبود (شکل ۶).



شکل ۶: میزان چربی (میانگین±خطای استاندارد) عضله‌ی ماهی آزاد دریای خزر بر حسب گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک پس از نه هفته تغذیه با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر مختلف اسید آسکوربیک.

– حروف مشابه روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در میان تیمارهاست.

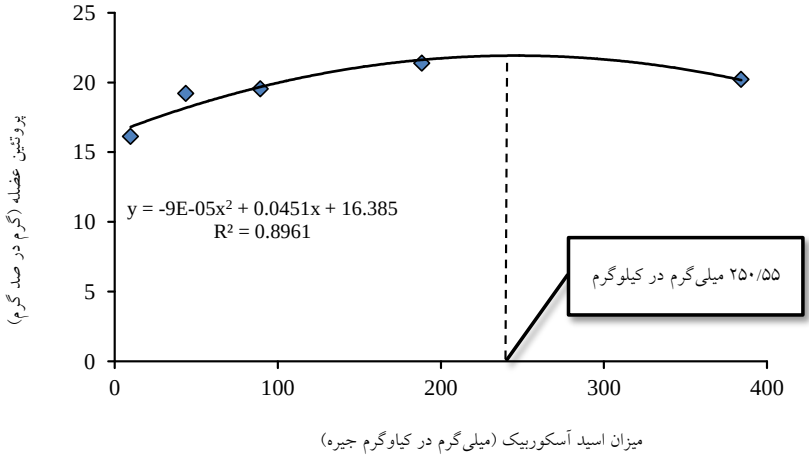
یافته‌های حاصل از آنالیز خاکستر میان تیمارهای آزمایشی حاوی مقادیر مختلف اسید آسکوربیک در شکل ۷ ارایه گردیده است. کم‌ترین مقدار خاکستر پس از ۹ هفته آزمایش با ۰/۱۷±۲/۲۶ گرم در صد گرم وزن خشک در تیمار شاهد به دست آمد که البته میزان آن با افزودن اسید آسکوربیک به جیره‌ی غذایی به شکل معنی‌داری افزایش یافت (p<۰/۰۵)، هرچند که تفاوت معنی‌داری در میان تیمارهای دارای اسید آسکوربیک پس از ۹ هفته آزمایش دیده نشد (p<۰/۰۵).



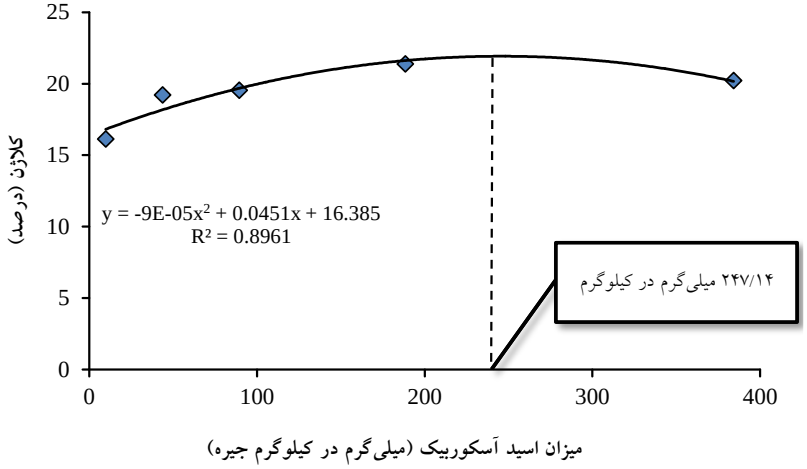
شکل ۷: میزان خاکستر (میانگین± خطای استاندارد) عضله‌ی ماهی آزاد دریای خزر بر حسب گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک پس از نه هفته تغذیه با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر مختلف اسید آسکوربیک

– حروف مشابه روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در میان تیمارهاست.

نتایج آزمون پاسخ به سطح برای تعیین میزان بهینه‌ی اسید آسکوربیک نیز نشان داد که میزان پروتئین عضله‌ی ماهی در مقایسه با مقدار اسید آسکوربیک در جیره‌ی غذایی از معادله y=-9E-05x2+0.0451x+16.385 با شیب R^2=0.896 تبعیت می‌کند (شکل ۸). حداکثر میزان اسید آسکوربیک مورد نیاز برای پروتئین بافت بچه ماهی آزاد دریای خزر بر این اساس با ۲۵۰/۵۵ میلی‌گرم اسید آسکوربیک در هر کیلوگرم از جیره‌ی غذایی به دست آمد. میزان کلاژن استخوان نیز در مقایسه با مقدار اسید آسکوربیک در جیره‌ی غذایی از معادله‌ی y=-7E-05x2+0.0346x+30.066 با شیب R^2=0.749 تبعیت نمود (شکل ۹). مقدار ۲۴۷/۵۴ میلی‌گرم اسید آسکوربیک در کیلوگرم از جیره‌ی غذایی بر این اساس به عنوان مقدار مناسب اسید آسکوربیک برای تجمع بهینه‌ی کلاژن در استخوان‌ها حاصل گردید.



شکل ۸: میزان بهینه‌ی اسید آسکوربیک مورد نیاز در جیره‌ی غذایی برای افزایش پروتئین عضله در بچه ماهی آزاد دریای خزر پس از نه هفته آزمایش



شکل ۹: میزان بهینه‌ی اسید آسکوربیک مورد نیاز در جیره‌ی غذایی برای افزایش کلاژن استخوان در بچه ماهی آزاد دریای خزر پس از نه هفته آزمایش

بحث و نتیجه‌گیری

ماهی آزاد دریای خزر از گونه‌های دارای ارزش بالای اقتصادی دریاچه‌ی خزر می‌باشد که ذخایر طبیعی آن به دلیل صید بی‌رویه و انواع آلودگی‌های زیست‌محیطی از بین رفته است (وثوقی و مستجیر ۱۳۸۳). تکثیر مصنوعی و رهاسازی به آب‌های طبیعی از جمله راهکارهای مؤثر برای جلوگیری از انقراض این گونه ارزشمند است. وزن رهاسازی یکی از عوامل تأثیرگذار در میزان بازگشت شیلاتی آزادماهیان به حساب می‌آید، به طوری که ماهیانی با وزن بالاتر به دلیل قدرت بقای بیش‌تر با سرعت بالاتری از شکار به شکارچی تبدیل می‌شوند (Bergenius et al. 2002) و در نتیجه از میزان و امکان مهاجرت بیش‌تری به رودخانه‌ها برخوردار هستند (Baranikova 1979).

پژوهش حاضر نشان داد که اسید آسکوربیک به عنوان یکی از ویتامین‌های ضروری جیره‌ی غذایی موجب افزایش رشد بچه ماهیان آزاد دریای خزر می‌گردد. وزن نهایی بچه ماهیان در تیمار شاهد به شکل معنی‌داری کم‌تر از سایر تیمارها بود که بیانگر تأثیر مستقیم اسید آسکوربیک بر رشد ماهی آزاد دریای خزر است. اسید آسکوربیک یک کوآنزیم ضروری در اکسیداسیون اسید آمینه‌ای نظیر تایروزین و فنیل آلانین است (Brander and Pugh 1977)، بنابراین افزایش وزن نهایی بچه ماهیان می‌تواند در نتیجه‌ی سوخت و ساز بهتر اسیدهای آمینه و در نتیجه سنتز پروتئین‌هایی باشد که در نهایت موجب افزایش وزن لاشه و وزن بدن می‌گردد (عرب و همکاران ۱۳۹۲، Brander and Pugh 1977, Faramarzi 2012). افزایش معنی‌دار محتوای پروتئین در بچه ماهیان آزاد دریای خزری که با مقادیر مختلف اسید آسکوربیک تغذیه شده بودند نیز بیانگر تأثیر این ویتامین محلول در آب بر سنتز پروتئین‌ها است، به طوری که بیش‌ترین میزان پروتئین بافت عضلانی در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک در کیلوگرم غذا مشاهده شد که دارای تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد بود. مشاهده‌ی چنین افزایشی در مورد سایر ماهیان نظیر تیلاپیا (Soliman et al. 1994) نیز اثبات می‌کند که اسید آسکوربیک یک کوآنزیم ضروری برای اکسیداسیون آمینواسیدهای تایروزین و فنیل آلانین است.

کلاژن در حدود ۲۵ تا ۳۰ درصد پروتئین کل موجود در بدن حیوانات را به خود اختصاص می‌دهد (Bornsterin and Traub 1979). اسید آسکوربیک با تأثیر بر سنتز کلاژن به عنوان یک پروتئین ساختمانی می‌تواند

باعث سنتز بیش‌تر بافت‌ها و در نتیجه وزن بالاتر ماهیان گردد (Terova et al. 1998). علائم کلاسیک کمبود اسید آسکوربیک در ماهیان شبیه علائم بیماری اسکوروی در مهره‌داران پیشرفته‌تر بوده که به صورت ناهنجاری‌های اسکلتی و غضروفی، شکنندگی عروق، عدم التیام زخم‌ها، کاهش رشد و افزایش درصد تلفات نمایان می‌گردد (Ai et al. 2006, Cahu et al. 2003, Dabrowski et al. 1988, Ibiyo et al. 2007)، البته بسیاری از این عوارض ناشی از نقص در تولید کلاژن و به دنبال آن اختلال تولید غضروف در بسیاری از بافت‌هاست (Halver et al. 1975). بسیاری از ماهیان در نبود اسید آسکوربیک به علت اختلال در تولید غضروف دچار ناهنجاری‌های اسکلتی مانند لوردوزیس و اسکولیوزیس می‌گردند (Adewolu and Aro 2009, Ibiyo et al. 2007). عدم بروز این ناهنجاری‌ها در ماهیان آزاد دریای خزر را می‌توان به وجود حداقل میزانی از ویتامین C در جیره‌ی غذایی برای پاسخ‌گوی نیازهای اولیه ماهی دانست. بیش‌ترین میزان کلاژن در ماهیانی دیده شد که از جیره‌ی غذایی حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک در هر کیلوگرم غذا تغذیه کرده بودند، با وجود این تولید معمول کلاژن در استخوان بچه ماهیان آزاد دریای خزر نیازمند حداقل ۵۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک در هر کیلوگرم غذا می‌باشد.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که اسید آسکوربیک بر میزان رطوبت گوشت علی‌رغم وجود یک روند افزایشی مؤثر نمی‌باشد؛ هرچند مقدار پروتئین، خاکستر و چربی لاشه در تیمارهای حاوی اسید آسکوربیک به شکل معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). هم‌چنین میزان چربی در بدن بچه ماهیان تغذیه شده با جیره‌ی شاهد پس از ۹ هفته آزمایش به ۰/۲۲±۳/۸۰ گرم در صد گرم رسید که کم‌ترین میزان تجمع چربی در بین سایر تیمارها بود. کاهش میزان چربی ماهیان در تیمار شاهد را می‌توان به مصرف بیش‌تر چربی به عنوان منبع انرژی برای مقابله با استرس‌های محیط پرورشی در مقایسه با تیمارهای حاوی اسید آسکوربیک نسبت داد (Adewolu and Aro 2009). هم‌چنین رشد بیش‌تر ماهیان در تیمارهای حاوی مقادیر مختلف اسید آسکوربیک می‌تواند به تغییر جهت ذخیره‌سازی انرژی به سمت سنتز بافت‌ها ناشی از استفاده‌ی بهینه اسیدهای آمینه ارتباط داد (Rebouche 1991).

میزان خاکستر در تحقیق حاضر دارای تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی بود، به طوری که با افزایش میزان اسید آسکوربیک شاهد افزایش تجمع خاکستر در بافت عضلانی بودیم. افزایش میزان خاکستر در تیمارهای حاوی اسید آسکوربیک بیانگر تأثیر این ویتامین در سوخت و ساز آهن، مس، روی، منگنز و کادمیوم است (Dabrowski 2001). اسید آسکوربیک موجب تسهیل جذب روی و آهن و نیز موجب کاهش دفع مس و سلنیوم می‌گردد (Andersen et al. 1998). هم‌چنین اثرات غیرمستقیم اسید آسکوربیک جیره‌ی غذایی بر کلسیم و متابولیسم استخوان از طریق تبدیل ویتامین D به شکل فعال آن یعنی دهیدروکسی ویتامین D_3 را نمی‌توان نادیده گرفت (Darias et al. 2011, Weiser et al. 1992). اسید آسکوربیک یکی از اجزای اصلی در سوخت و ساز آهن و فعالیت ویتامین D است (Darias et al. 2011, Lall 2000)، بنابراین مقادیر بیشتر خاکستر در ماهیانی با جیره‌ی حاوی مقادیر بالاتر اسید آسکوربیک را می‌توان به سوخت و ساز بهتر بدن و در نتیجه تجمع بیش‌تر عناصر معدنی در ماهی آزاد دریای خزر نسبت داد (Dabrowski 2001, Lovell 1989, Navarre and Halver 1989).

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که اسید آسکوربیک دارای تأثیر معنی‌داری بر میزان کلاژن و ترکیب لاشه‌ی بدن در بچه ماهی آزاد دریای خزر می‌گذارد. ترکیب ۲۳ اسید آمینه‌ی ضروری در بدن ماهیان علاوه بر سنتز پروتئین‌ها و آنزیم‌های مختلف می‌تواند با سرعت به گلوکز تبدیل شود و به عنوان مهم‌ترین منبع انرژی در

فعالیت‌های حیاتی مختلف استفاده شوند (Cho 1983). تحقیقات نشان می‌دهد که اسید آسکوربیک به عنوان یک کوفاکتور در سنتز اسیدهای آمینه فنیل‌آلانین، لیزین، تایروزین، پرولین و متیونین نقش دارد، بنابراین رشد بیش‌تر بچه ماهیان آزاد دریای خزر در تیمارهای حاوی اسید آسکوربیک را می‌توان در تأیید یافته‌های عرب و همکاران در سال ۱۳۹۲ به سنتز بیشتر پروتئین‌ها نسبت داد. میزان بهینه‌ی اسید آسکوربیک مورد نیاز برای سنتز پروتئین و کلاژن در بافت بچه ماهی آزاد دریای خزر بر اساس آزمون پاسخ به سطح در تحقیق حاضر به ترتیب برابر ۲۵۰/۵۰ و ۲۴۷/۵۴ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا به دست آمد که بیانگر تأثیر اسید آسکوربیک بر سنتز بیشتر بافت‌ها و در نتیجه افزایش وزن نهایی بچه ماهیان می‌باشد.

منابع

سلطانی، مهدی؛ امیدبیگی، رضا؛ رضوانی‌گیل‌کلایی سهراب؛ مهرابی، محمدرضا و چیت‌ساز، حسین (۱۳۸۰). مطالعه‌ی اثرات هوشبری اسانس و عصاره‌ی گل میخک در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت شرایط کیفی آب، مجله‌ی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره‌ی ۴، صفحات ۸۵-۸۹.

رهبر، مینا؛ نظامی‌بلوچی، شعبانعلی؛ خارا، حسین؛ رضوانی، مصطفی؛ شمس‌پور، سمیه؛ کامکار، مریم و موحد، رشیده (۱۳۸۸). تعیین رابطه‌ی سن مولدین نر با عوامل کارایی تکثیر مصنوعی در ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)، مجله‌ی علوم زیستی لاهیجان، دوره‌ی ۳، صفحات ۲۱-۲۸.

زمانی، عباس؛ حاجی‌مرادلو، عبدالمجید؛ مدنی، رسول و گلچین‌مهر، فریبا (۱۳۸۶). مقایسه‌ی فعالیت برخی آنزیم‌های گوارشی در معده، ضمائم پیلوریک و روده‌ی ماهیان یک‌تابستانه و دوتابستانه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)، مجله‌ی علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دوره‌ی ۳، صفحات ۷۳-۸۰ .

صابر، علی؛ عابدیان‌کناری، عبدالمحمد و سیف‌آبادی، سیدجعفر (۱۳۸۴). تأثیر سطوح متفاوت پروتئین و انرژی جیره‌ی غذایی بر رشد و ترکیب بدن ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)، مجله‌ی علوم دریایی ایران، دوره‌ی ۴، صفحات ۴۵-۵۴.

عبدلی، اصغر و نادری، مهدی (۱۳۸۷). تنوع زیستی ماهیان حوضه‌ی جنوبی دریای خزر، انتشارات علمی آبزیان، تهران، ۲۴۲ صفحه.

عرب، نرگس؛ رجبی‌اسلامی، هومن و شمسایی‌مهرجان، مهدی (۱۳۹۲). تأثیر ویتامین C بر میزان بقاء و شاخص‌های رشد بچه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)، مجله‌ی شیلات دانشگاه تهران، دوره‌ی ۶۴، شماره‌ی ۳، صفحات ۲۴۳- ۲۵۲.

وثوقی، غلامحسین و مستجیر، بهزاد (۱۳۸۳). ماهیان آب شیرین، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۳۱۷ صفحه.

Adewolu, M.A. and Aro, O.O. (2009). Growth, feed utilization and hematology of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) fingerlings fed diets containing different levels of vitamin C. American Journal of Applied Science Publication, 6: 1675-1681.

Ai, Q.; Mai, K.; Tan, B.; Xu, W.; Zhang, W.; Ma, H. et al. (2006). Effects of dietary vitamin C on survival, growth, and immunity of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. Aquaculture, 261: 327-336.

Andersen, F.; Lygren, B.; Maage, A. and Waagbø, R. (1998). Interaction between two dietary levels of iron and two forms of ascorbic acid and the effect growth, antioxidant status and some non-specific immune parameters in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. Aquaculture, 161, 437-451.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1990). Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists International. Washington DC, p: 1263.

Baranikova, L.A. (1979). Sturgeon culture and problems of today. In: Berdichevskiy L.S., (Ed.), Biological Basis of Sturgeon Culture Development in the USSR. Nauka. Moskva, pp: 49-58.

Berg, L.S. (1949). Freshwater fishes of the USSR and adjacent countries. Izdatelstvo akademii Nauk SSSR, Moskva Leningrad, pp: 175-283.

Bergenius, M.A.; Meekan, M.G.; Robertson, R.D. and McCormick, M.I. (2002). Larval growth predicts the recruitment success of a coral reef fish. Oecologia, 131: 521-525.

Bornstein, P. and Traub, W. (1979). The chemistry and biology of collagen. In: Neurath H. and Hill R.L. (eds.) The Proteins, vol. 4. Academic Press, New York. Pp: 411-632.

Brander, G.C. and Pugh, D.M. (1977). Veterinary applied pharmacology and therapeutics. The English language book Society and Bailliere Tindall. London, p: 536.

Cahu, Ch.; Zambonino Infante, J. and Takeuchi, T. (2003). Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. Aquaculture, 227: 245–258.

Chen, R.; Lochmann, R.; Goodwin, A.; Praveen, K.; Dabrowski, K. and Lee, K.J. (2004). Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentration and response to heat stress in juvenile Golden Shiner (*Notemigomus crysoleucas*). Aquaculture, 227: 245–258.

Cho, C.Y. (1983). Nutrition and fish health. In: Meyer F.P., Warren J.W. and Carey T.G., (eds.) A guide to integrated fish health management in the great lakes basin. Great Lakes Fishery Commission, Ann Arbor, Mich. Spec. Pub, pp: 63-73.

Dabrowski, K. (2001). Ascorbic acid in aquatic organisms. CRC press. Boca Raton, Florida, 288 P.

Dabrowski K., Hinterleitner S., Sturmbauer C., El-Fiky N. and Wieser W. (1988). Do carp larvae require vitamin C? Aquaculture, 72: 295-306.

Darias, M.J.; Mazurais, D.; Koumoundouros, G.; Cahu, C.L. and Zambonino-Infante, J.L. (2011). Overview of vitamin D and C requirements in fish and their influence on the skeletal system. Aquaculture, 315: 49–60.

Falahatkar, B.; Dabrowski, K. and Arslan, M. (2011). Ascorbic acid turnover in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: Is there a vitamin enrichment effect during embryonic period on the juvenile fish "sensitivity" to deficiency? Aquaculture, 320:99-105.

Faramarzi, M. (2012). Effect of dietary vitamin C on growth and feeding parameters, carcass composition and survival rate of common carp (*Cyprinus carpio*). Global Veterinaria, 8: 507-510.

Halver, J.W.; Smith, R.R.; Tolbert, B.M. and Baker, E.M. (1975). Utilization of ascorbic acid in fish. Ann. New York. Academic Science, 258, 81–102.

Henrique, M.M.F.; Gomes, E.F.; Gouilou-Coustans, M.F.; Oliva-Teles, A. and Davies, S.J. (1998). Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of sea bream, *Sparus aurata*. Aquaculture, 161: 415–426.

Ibiyo, L.M.O.; Atteh, J.O.; Omotosho, J.S. and Madu, C.T. (2007). Vitamin C (ascorbic acid) requirements of *Heterobranchus longifilis* fingerlings. African Journal Biotechnology, 6: 1559-1567.

Kazanchof, A.N. (1981). Fishes of the Caspian Sea and its catchment. Translation by: Shariati l., (2004) the Iranian Fisheries Company. Iran, p: 171.

Kiabi, B.H.; Abdoli, A. and Naderi, M. (1999). Status of fish fauna in south Caspian basin of Iran. Zoology in the Middle East, 16: 57-65.

Koshio, S.; Sakakura, Y.; Iida, Y.; Tsukamoto, K.; Kida, T. et al. (1997). The effect of vitamin C intake on growth, survival and schooling behavior of amphi-dromous fish, Ayu (*Plecoglossus altivelis*). Fish Science, 63: 619–624.

Lall, S.P. (2000). Nutrition and health of fish. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22. Noviembre, 2000.

Lin, M.F. and Shiau, S.Y. (2005). Dietary L-ascorbic acid affects growth, nonspecific immune responses and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. Aquaculture, 244: 215-221.

Lovell, R.T. (1989). Vitamin C (ascorbic acid). In: Nutrition and Feeding of Fish. An AVI Book, Van Nostrand Reinhold Publication New York, pp: 54-60.

McDowell, L.R. (1989). Vitamins in Animal Nutrition. Academic Press Inc., New York, p: 486.

Moreau, R.; Dabrowski, K. and Sato, P.H. (1999). Renal L-gulono-1,4-lactone oxidase activity as affected by dietary ascorbic acid in lake sturgeon *Acipenser fulvescens*. Aquaculture, 180: 359–372.

Naghdi Tabrizi, E.; Khara, H.; Nezami, Sh.A.; Lorestani, R. and Shamspour, S. (2011). Broken eggs influence on fertilization capacity and viability of eggs, turbidity and pH of ovarian fluid and fertilization water in the endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius*. International Journal of Biology, 3: 161-166.

Navarre, O. and Halver, J. (1989). Disease resistance and humeral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. Aquaculture, 79: 207–221.

Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2005). Lehninger's principles of biochemistry. Freeman, W.H. and Company. New York, p: 1100.

Niksirat, H. and Abdoli, A. (2009). On the status of the critically endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius*, during recent decades in the southern Caspian Sea basin (Osteichthyes: Salmonidae). Zoology in the Middle East, 46: 55-60.

Oikawa, D.; Ando, H.; Mishiro, K.; Miyake, K. and Furuse, M. (2008). Dietary hydroxyproline improves collagen contents of the fillet in tiger puffer (*Takifugu rubripes*). Journal of Fisheries International, 3: 49-51.

Rebouche, CJ. (1991). Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. The American Journal of Clinical Nutrition, 54: 1147s-1152s.

Robbins, K.R.; Norton, H.W. and Baker, D.H. (1979). Estimation of nutrient requirements from growth data. Journal of Nutrition, 109: 1710-1714.

Sarvi, K.; Niksirat, H.; Mojazi Amiri, B.; Mirtorabi, S.M.; Rafiee, G.R. and Bakhtiyari, M. (2006). Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). Aquaculture, 256: 564–569.

Shiau, S.Y. and Hsu, T.S. (1999). Quantification of vitamin C requirement for juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus*×*Oreochromis aureus*, with L-ascorbyl-2 monophosphate-Na and L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg. Aquaculture, 175: 317-326.

Soliman, A.K.; Jauncey, K. and Roberts, R.J. (1994). Water-soluble vitamin requirements of tilapia: ascorbic acid (vitamin C) requirement of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Aquaculture Research, 25: 269-278.

Sotoudeh, E.; Abedian Kenari, A. and Habibi Rezaei, M. (2011). Growth response, body composition and fatty acid profile of Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) juvenile fed diets containing different levels of soybean phosphatidylcholine. Aquaculture International, 19: 611-623.

Sourinejad, I.; Kalbassi, M.R.; Pino-Querido, A.; Vera, M.; Bouza, C. and Martinez, P. (2010). Parentage assignment of progeny in mixed milt fertilization of Caspian brown trout *Salmo trutta caspius* using microsatellite DNA markers: Implications for conservation. African Journal of Biotechnology, 10: 5084-5090.

Terova, G.; Saroglia, M.; Papp, Z.G. and Cecchini, S. (1998). Dynamics of collagen indicating amino acids, in embryos and larvae of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*), originated from broodstocks fed with different vitamin C content in the diet. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 121, 111-118.

Weiser, H.; Schlachter, M.; Probst, H.P. and Kormann, A.W. (1992). The relevance of ascorbic acid for bone metabolism, in Ascorbic Acid in Domestic Animals. Proceedings of the 2nd Symposium (9th–12th October 1990), Wenk C., Fenster R. and Völker L. (Eds.). Kartause, Ittingen, Switzerland.

Wilson, R.P. and Poe, W.E. (1973). Impaired collagen formation in the scorbutic channel catfish. Journal of Nutrition, 103: 1359–1364.

Xie, Z. and Niu, C. (2006). Dietary ascorbic acid requirement of juvenile ayu (*Plecoglossus altivelis*). Aquaculture Nutrition, 12: 151-156.

Effect of dietary ascorbic acid on bone collagen and body composition of the Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) fingerlings

Rajabi Islami, H.[1] and Arab, N.[2]

Received: 08.10.2013 Accepted: 24.02.2014

Abstract

Ascorbic acid (AA) is known to perform numerous biochemical and physiological functions especially for teleost fish. A feeding trial with a total of six hundred Caspian brown trout fingerlings (9.6±0.6 g) was conducted to determine the effect of AA on bone collagen and body composition of the Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) as a valuable native teleost species. Five different diets containing 0, 50, 100, 200 and 400 mg kg^{-1} L-Ascorbyl-2-Polyphosphate were prepared as experimental treatments. Feeding of the fish was done in triplicates for 9 weeks in each treatment, each containing 40 Caspian brown trout fingerlings. The results showed significant differences in final weight, bone collagen and body composition of Caspian brown Trout fingerlings at the end of the feeding trial ($p<0.05$). Increase trends in AA amount of diets cause significant rise of weight ($p<0.05$), reaching to the final weight of 29.74±3.52 g at the 200 mg AA kg^{-1} treatment. Fish fed by 200 mg AA kg^{-1} diet had also the maximum amount of bone collagen; which had significant difference with control treatment ($p<0.05$). Besides, the highest ash content and fat concentrations were found in 50 mg kg^{-1} AA. Based on the broken line model, the optimum bone collagen and protein amounts were obtained at 247.54 and 250.55 mg AA kg^{-1} diet, respectively.

Key words: Ascorbic Acid, *Salmo trutta caspius,* Growth, Bone Collagen, Body Composition

1- Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Agricultural and Natural Resources, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- MSc. Graduated, Department of Fisheries, Faculty of Agricultural and Natural Resources, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Corresponding Author: Rajabi Islami, H., E-mail: rajabi.h@srbiau.ac.ir