# مقایسه‌ی تجویز خوراکی غلظت‌های مختلف جلبک *دونالیلا سالینا* *Dunaliella salina* بر میزان کاروتنوئید پوست و رنگ ماهی سورم (*Heros serverus*)

مجتبی علیشاهی[۱*] و مسعود کرمی‌فر[۲]

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱/۲۹


## چکیده

رنگ ماهی به عنوان یکی از شاخص‌های مهم در بازارپسندی و یکی از فاکتورهای تجاری در آبزی پروری به شمار می‌رود. در این تحقیق اثر تجویز خوراکی غلظت‌های مختلف جلبک *دونالیلا سالینا* بر میزان بتاکاروتن پوست، رنگ پوست و باله‌های ماهی سورم (*H.serverus*) مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور تعداد ۱۸۰ قطعه ماهی با میانگین وزن (۲۷±۰/۵g) به ۴ تیمار در ۳ تکرار تقسیم شدند: تیمار اول با غذای پایه فاقد جلبک دونالیلا (G1) و سه تیمار دیگر به ترتیب با غلظت ۵۰ (G2)، ۱۰۰ (G3) و ۲۰۰ (G4) میلی‌گرم جلبک *دونالیلا سالینا* در کیلوگرم خوراک، تغذیه شدند. بعد از ۶ هفته تغذیه از ماهی‌های هر تیمار عکس دیجیتال و نمونه‌ی پوست تهیه گردید. میزان بتاکاروتن پوست و شاخص‌های رنگ (L*, a*, b*, Hue, Chroma E* و ΔE) بین تیمارها مقایسه گردیدند. نتایج نشان داد که میزان بتاکاروتن در تمامی تیمارها افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت (P<۰/۰۵) و بیش‌ترین میزان بتاکاروتن برابر ۴/۰۶±۰/۴۵ mg/kg مربوط به تیمار G4 بود. در ناحیه‌ی تنه و باله شاخص‌های (L*, b*, Chroma) تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد (P>۰/۰۵). در ناحیه‌ی تنه شاخص‌های (E*, ΔE, a*) افزایش و شاخص Hue کاهش معنی‌داری در تیمارهای (G3) و (G4) نسبت به تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). در ناحیه‌ی باله‌ها شاخص‌های E* و a* در تیمارهای (G3) و (G4) افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت (P<۰/۰۵). میزان شاخص ΔE در تمامی تیمارها افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت (P<۰/۰۵)، که بیش‌ترین میزان افزایش مربوط به تیمار (G4) بود. شاخص Hue در تیمار (G4) کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). با توجه به قیمت مناسب، در دسترس بودن و امکان تولید وسیع، از این جلبک می‌توان به عنوان یک منبع کاروتنوئید و ماده‌ای برای بهبود رنگ در ماهی استفاده نمود.


**کلمات کلیدی:** جلبک *دونالیلا سالینا*، ماهی سورم، رنگ پوست، بتا کاروتن

## مقدمه

امروزه رنگ ماهی به عنوان یکی از فاکتورهای مهم در بازار پسندی است که در تعیین قیمت ماهی، پذیرش مشتری و میزان فروش نقش بسزایی دارا است، به گونه‌ای که رنگ ماهی را بر اساس درخواست بازار با انواع کاروتنوئیدهای طبیعی یا سنتزی تنظیم می‌نمایند (Kop and Durmaz, 2008). تنها منبع رنگی موجودات آبزی مواد غذایی موجود در محیط زیست طبیعی آن‌ها می‌باشد (Miki 1991, Kop and durmaz, 2008). ماهی‌ها معمولاً قادر به سنتز کاروتنوئید مورد نیاز خود، برای ایجاد رنگ مناسب نیستند و باید به همراه خوراک، این مواد به خوراک ماهی اضافه گردد (Gourveia et al. 2003). در برخی ماهیان خوراکی مثل آزاد ماهیان، رنگ ماهی (پوست و عضله) در بازار پسندی ماهی نقش زیادی داشته به طوری که علیرغم قیمت بالای آستاگزانتین، اکثر تولید کنندگان آزاد ماهی در اروپا با استفاده از این ماده باعث ایجاد طیف‌های رنگ نارنجی و حتی قرمز در ماهی می‌گردند (Torrissen et al. 1989). با توجه به نقش کاروتنوئیدها در رشد، تحریک ایمنی، رنگ، خواص

[۱*] دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز E-mail: alishahimoj@gmail.com (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] دانش‌آموخته‌ی دکترای حرفه‌ای، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی، استفاده از منابع کاروتنوئیدها مانند رنگ‌دانه‌های سنتتیک (آستاگزانتین، کانتازانتین) و طبیعی (جلبک، خزه و مخمر) در آبزیان پرورشی و زینتی رواج زیادی یافته است (Wang et al. 2006, Tim et al. 2007, Supamattaya et al. 2005, Nakano et al. 1999, Kalinowski et al. 2005).

دونالیلا یک جلبک سبز تک یاخته‌ای، متحرک و فاقد دیواره‌ی سلولی است، این جلبک حاوی رنگدانه‌ی بتاکاروتن، اسیدهای حلال، مواد محرک ایمنی مانند فیکوسیانین، پلی‌ساکاریدها، آهن و روی است (Cowan et al. 1992, Giordano et al. 2000). هم‌چنین حاوی مقادیری ویتامین C و ویتامین E نیز می‌باشد (Hosseini-Tafreshi and Shariati 2009). یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد این جلبک، توانایی تولید و تجمع مقادیر زیاد بتاکاروتن تحت شرایطی نظیر شوری زیاد، شدت نور بالا و محدودیت مواد غذایی است که منجر به نارنجی شدن رنگ سلول و سوسپانسیون جلبکی می‌شود (Ben-Amotz and Shaish 1992). ماهی سوروم از خانواده‌ی سیچلیده (Cichlidae) و از جنس *هروس* (Heros) می‌باشد. این ماهی بومی امریکای مرکزی است ولی در هر نوع شرایطی مطابق با شرایط اقلیمی آن نواحی قادر به زندگی خواهد بود. ماهی سوروم از گونه‌های پر طرفدار در میان ماهیان آکواریومی محسوب می‌شود. این ماهی با مناطق دارای پوشش گیاهی در ارتباط است و از بی مهرگان کوچک و مواد گیاهی تغذیه می‌کند.

در این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف جلبک *دونالیلا سالینا* بر میزان بتا کاروتن پوست و رنگ پوست و باله‌های ماهی سوروم مقایسه گردید.

## مواد و روش کار

### تهیه‌ی جلبک

جلبک *دونالیلا سالینای* جداسازی شده از دریاچه‌ی ارومیه (Dunaliella M1) که به روش‌های مولکولی جنس و گونه‌ی آن به اثبات رسیده بود در بیوراکتورهای نوری (photobioreactor) ۱۴ لیتری شرکت زیست فن آور البرز (ایران) با محیط کشت جانسون تغییر یافته (modified Jonson medium) کشت داده شد (Hejazi et al. 2010). غلظت نمک محیط کشت به ۱/۵ درصد رسانده شد. میزان نور بیوراکتور با استفاده از دستگاه Osram lamps (SPOT R80 NATURA E27/ESW) به میزان $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ ۴۰۰ تنظیم گردید. دمای بیوراکتور در حد ۲۵±۰/۵°C و pH آن ۷/۵±۰/۳ ثابت گردید. هفت روز پس از کشت جلبک و تولید بیوماس مناسب در بیوراکتور، به منظور افزایش میزان تولید بتاکاروتن، استرس شوری و نوری برای القای تولید بتاکاروتن بیش‌تر در دونالیلا انجام شد. به این منظور میزان شوری و میزان نور بیوراکتور به ترتیب به ۳ درصد و $۲۰۰۰\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$، افزایش داده شد. کشت جلبک در بیوراکتور به مدت ۸ روز بعد از شروع استرس نیز ادامه یافت و جلبک‌ها به رنگ نارنجی در آمدند، جلبک‌های حاصل با سانتریفوژ در ۴۰۰g جداسازی و با دستگاه لیوفیلیزاتور، لیوفیلیزه شده و در یخچال ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان انجام تحقیق نگهداری گردیدند.

### تیماربندی ماهی‌ها

تعداد ۱۸۰ قطعه ماهی سورم با میانگین وزنی ۲۱±۰/۳۵g متوسط بدون در نظر گرفتن جنسیت از یکی از مراکز تکثیر ماهیان زینتی در شهرستان اهواز خریداری گردید و پس از انتقال به سالن آکواریوم دانکشده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، ماهی‌ها به مدت یک ماه برای سازش پیداکردن با محیط جدید پرورش داده شدند. سپس ماهی‌ها با میانگین وزن (۲۷±۰/۵g) به طور تصادفی به سه تیمار هر یک در سه تکرار و در نه آکواریوم (هر آکواریوم شامل ۱۵ قطعه ماهی) به شرح زیر تقسیم شدند:

تیمار اول (G1): شاهد بدون افزودنی غذایی

تیمار دوم (G2): تغذیه شده با خوراک حاوی ۵۰mg/kg پودر جلبک دونالیلا

تیمار سوم (G3): تغذیه شده با خوراک حاوی ۱۰۰mg/kg پودر جلبک دونالیلا

تیمار چهارم (G4) : تغذیه شده با خوراک حاوی ۲۰۰mg/kg پودر جلبک دونالیلا

**تهیه‌ی خوراک‌های تحقیق**

برای تهیه‌ی خوراک هر تیمار، خوراک استاندارد ساخت شرکت Biomar تولید کشور فرانسه مخصوص ماهیان آکواریومی استفاده گردید. در مورد هر تیمار ۱۰۰g خوراک با اضافه نمودن آب مقطر به صورت خمیر درآورده شد. سپس، به ترتیب میزان‌های ۵mg، ۱۰mg و ۲۰mg میلی‌گرم پودر جلبک دونالیلا (تهیه شده در پژوهشکده‌ی بیوتکنولوژی شمال غرب کشور) با خمیر خوراک‌های مربوطه مخلوط و در دستگاه مخلوط کن الکتریکی به صورت کاملاً همگن در آمد. این خوراک‌ها با استفاده از چرخ گوشت به صورت پلت‌هایی با اندازه‌ی مناسب درآورده شد و بعد از ۱ ساعت قرار دادن در هود ۴۰°C، تا زمان مصرف به فریزر ۲۰°C- منتقل گردید. ماهی‌ها با خوراک در نظر گرفته شده برای هر تیمار به صورت روزانه با ۳ درصد وزن زنده و در دو نوبت به مدت ۶ هفته تغذیه گردیدند.

**اندازه‌گیری بتا کاروتن**

برای اندازه‌گیری بتا کاروتن از روش توصیه شده توسط Suzuki و Katoh در سال ۱۹۹۰ استفاده شد.

**تهیه‌ی عکس دیجیتال در شرایط یکسان**

در انتهای دوره از ۵ ماهی در هر تیمار پس از بیهوش نمودن ماهی توسط ماده‌ی بیهوشی MS222 با دوز ۱۰۰mg/L، عکس دیجیتال گرفته شد. به این منظور یک جعبه‌ی کاملاً تاریک به ابعاد ۳۰×۴۰×۳۰cm تدارک دیده شد و با دو لامپ ۴۰W نور یکسانی در حد ۵۰۰lx در داخل محفظه ایجاد گردید و با دوربین دیجیتال Canon مدل SD210 و با رعایت فاصله‌ی نمونه از دوربین از همه‌ی نمونه‌ها عکس دیجیتال تهیه گردید. برای بررسی کمی رنگ پوست ماهی بین تیمارها از روش توصیه شده توسط Yam و همکارش در سال ۲۰۰۴ استفاده گردید. این روش مبتنی بر پردازش تصویر گرفته شده با دوربین دیجیتال با میزان نور و شرایط کاملاً مشابه با استفاده از نرم‌افزار Adobe Photoshop بود.

**اندازه‌گیری شاخص‌های رنگ پوست**

شاخص‌های رنگ در دو ناحیه که شامل: ناحیه‌ی تنه (A) و باله‌ها (B) بود، مورد بررسی قرار گرفت. مناطق در نظر گرفته شده برای بررسی شاخص‌های رنگ بر اساس منابع موجود و از نقاط مشترک در بین تمام ماهی‌ها انتخاب گردید. نقاط انتخاب شده در ناحیه‌ی تنه از سمت راست تنه‌ی ماهی‌ها و با فاصله‌ی مساوی از هم بودند. سعی شد نقاط با پراکندگی مناسبی انتخاب شوند که پراکنش مناسبی در کل تنه داشته باشند. آنالیز عکس گرفته شده توسط نرم‌افزار Adobe Photoshop CS5 انجام گردید. این نرم‌افزار رنگ را بر اساس سه شاخص کمی و به صورت سه محور بیان می‌نماید که شامل مقادیر $L^*$ (۰=روشنایی و ۱۰۰ = تیرگی)، $a^*$ (مقادیر مثبت معادل رنگ قرمز و مقادیر منفی معادل رنگ سبز) و $b^*$ (مقادیر مثبت معادل رنگ زرد و مقادیر منفی معادل رنگ آبی) می‌باشند (حیدری و همکاران ۱۳۹۱). مزیت این سیستم رنگ CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) در این است که ترتیب آن تقریباً با فضای سه بعدی رنگ که اجزای آن بر اساس درک بصری رنگ نهاده شده، یکسان می‌باشد (Salehy et al. 2007).

میزان کروما (بیان کننده‌ی شفافیت و کدورت رنگ است، مقادیر بیش‌تر نشان دهنده‌ی شفافیت بیش‌تر است) از طریق فرمول $C_{ab}=(a^{*2}+b^{*2})^{0.5}$ و میزان زاویه‌ی هیو (شاخص خلوص رنگ است و به چگونگی درک و مشاهده‌ی رنگ یک شیء اشاره دارد (آبی، سبز، زرد، نارنجی، قرمز و غیره) از طریق نرم‌افزار ( Adobe

Photoshop CS5) اندازه‌گیری گردید. هم‌چنین شاخص تغییر رنگ کلی (ΔE) که تفاوت تغییر رنگ بین دو شیء و یا یک شیء را قبل و بعد از پروسه‌ی آزمایشی نشان می‌دهد، با استفاده از رابطه‌ی زیر محاسبه گردید: $(\Delta E)=(\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2}$. در بعضی مطالعات $\Delta E<2.7$ را غیرقابل تشخیص با چشم انسان می‌دانند ولی بعضی دیگر $\Delta E<1$ را غیرقابل تشخیص، $1<\Delta E<2$ را به عنوان تغییر رنگ کم و $\Delta E>3.7$ را قابل تشخیص توسط چشم انسان می‌دانند (Diler and Dilek 2002, Doolan et al. 2005, Edge et al. 1997, Giordano et al. 2000).

رابطه‌ی $(\Delta E)=(\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2}$ ترکیب مقایسه‌ای از سه شاخص رنگی را نشان می‌دهد. متناوباً برای بررسی فاکتور قرمزی نسبت به شفافیت و زردی، می‌توان معادله‌ی فوق را به صورت زیر بازنویسی کرد:

$E^*= a/b + a/L$

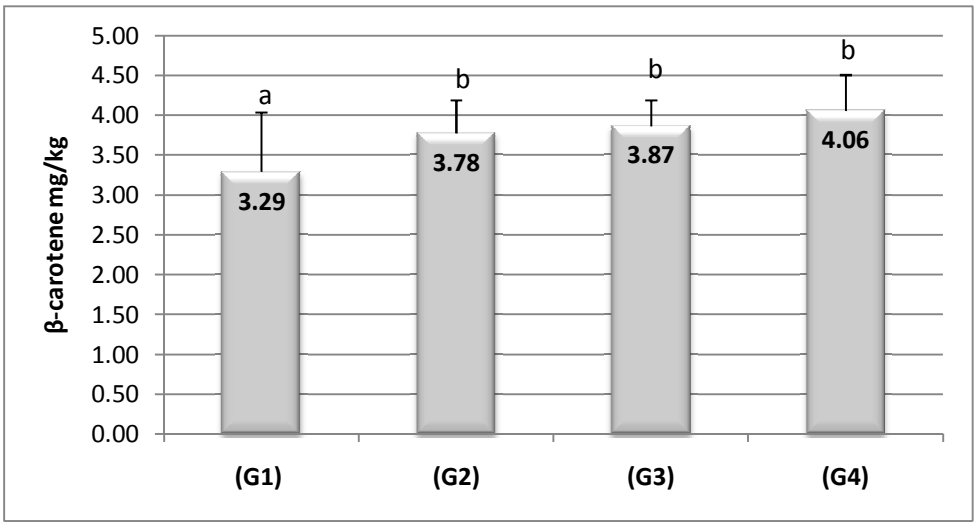
آنالیز داده‌ها

از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. از تست آنوای یک طرفه و تست تکمیلی دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین هر تیمار در هر آزمایش با بقیه‌ی تیمارها استفاده گردید.

## نتایج

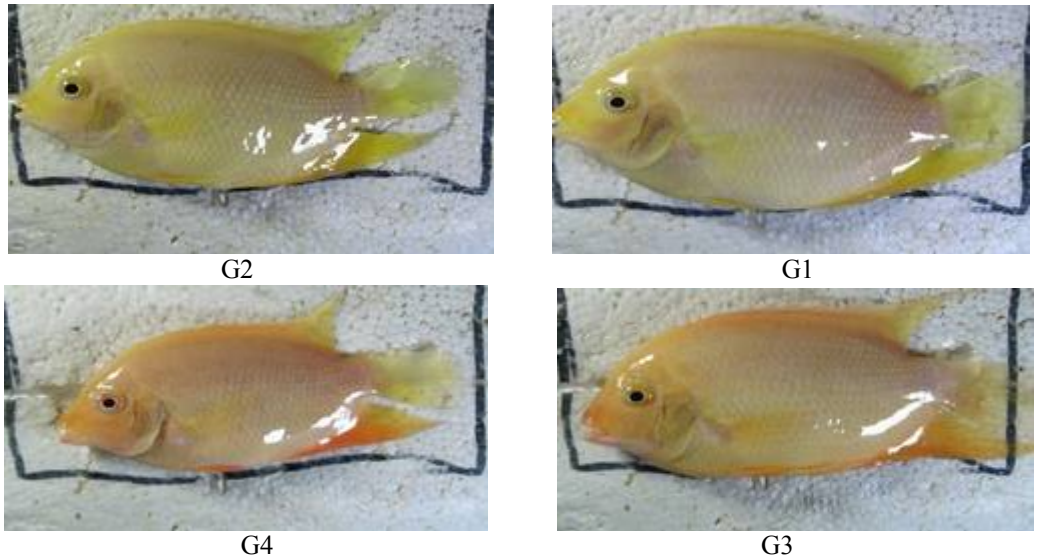
### بررسی میزان بتا کاروتن

نتایج مربوط به میزان بتا کاروتن پوست تیمارهای مورد بررسی در نمودار ۱ آورده شده است. میزان بتاکاروتن در تمامی تیمارها افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد (G1) نشان داد (P<۰/۰۵) و بیش‌ترین میزان بتاکاروتن مربوط به تیمار (G4) و برابر (۴/۰۶ ±۰/۴۵mg/kg) بود.




**نمودار ۱: میزان بتاکاروتن تیمارهای مورد بررسی (Mean±SD) G1: شاهد، G2: تغذیه شده با خوراک حاوی 50 mg/kg دونالیلا، G3: 100 mg/kg دونالیلا، G4: 200 mg/kg دونالیلا. حروف غیر همنام لاتین نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در بین گروه‌ها می‌باشد.**

### بررسی شاخص‌های رنگ




**تصویر ۱: مقایسه‌ی تغییر رنگ در تیمارهای تغذیه شده با خوراک معمولی (G1)، خوراک غنی شده با دونالیلا به ترتیب ۵۰ (G2) ، ۱۰۰ (G3)، ۲۰۰ (G4) میلی‌گرم در کیلوگرم**

### ناحیه‌ی تنه

طبق جدول ۱ شاخص‌های رنگ شامل ( L*, b*, Chroma) در ناحیه‌ی تنه تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها را نشان نداد (P>۰/۰۵). ولی شاخص‌های ( a*, ΔE, E*) در تیمارهای تغذیه شده توسط غلظت‌های ۱۰۰mg/kg (G3) و ۲۰۰mg/kg (G4) جلبک دونالیلا افزایش معنی‌داری نسبت به دو تیمار دیگر را نشان داد (P<۰/۰۵)، هم‌چنین میزان شاخص Hue در تیمارهای (G3) و (G4) کاهش معنی‌داری نسبت به دو تیمار دیگر را نشان داد (P<۰/۰۵)، که بیش‌ترین کاهش مربوط به تیمار (G4) و برابر با (۳۵/۵۹±۵/۰۲) بود.

**جدول ۱: تغییرات میانگین ± انحراف معیار شاخص‌های رنگ ناحیه‌ی تنه**

| | G1 | G2 | G3 | G4 |
|---|---|---|---|---|
| L* | ۵۶/۴۵±۴/۶۲ a | ۵۸/۲۵±۳/۱۱ a | ۵۴/۸۹±۳/۹۸ a | ۵۶/۴۵±۴/۲۸ a |
| a* | ۲/۲۱±۱/۴۷ a | ۳/۰۴±۱/۵۵ a | ۴/۹۱±۲/۰۳ b | ۵/۷۶±۲/۲۹ b |
| b* | ۲۹/۵۱±۲/۶۷ a | ۲۶/۰۸±۲/۶۵ a | ۲۶/۱۲±۳/۱۸ a | ۲۸/۶۸±۴/۶۹ a |
| Hue | ۴۳/۳۲±۴/۰۳ a | ۴۳/۱۰±۴/۰۲ a | ۳۹/۵۲±۳/۳۲ b | ۳۵/۵۹±۵/۰۲ b |
| Chroma | ۲۹/۷۷±۲/۵۳ a | ۲۴/۲۱±۴/۵۵ a | ۲۶/۶۷±۳/۳۲ a | ۲۹/۴۶±۴/۰۴ a |
| ΔE | ۲/۵۶±۰/۵۶ a | ۲/۹۶±۰/۸۵ a | ۳/۷۲±۱/۰۳ b | ۵/۶۵±۱/۶۱ b |
| E* | ۰/۱۸±۰۰/۱۱ a | ۰/۱۹±۰/۰۹ a | ۰/۲۸±۰/۱۳ b | ۰/۳۲±۰/۱۷ b |

G1: شاهد، G2: ۵۰ mg/kg دونالیلا، G3: ۱۰۰mg/kg دونالیلا، G4: ۲۰۰mg/kg دونالیلا.

حروف غیر همنام در هر ستون نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ در بین گروه‌ها می‌باشد.

**ناحیه باله**

طبق جدول ۲ میزان شاخص‌های رنگ شامل (L*, b*, Chroma) در ناحیه‌ی باله‌ها تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها را نشان نداد (P>۰/۰۵). میزان شاخص a* در تیمارهای (G3) و (G4) افزایش معنی‌داری نسبت به دو تیمار دیگر (G1) و (G2) را نشان داد (P<۰/۰۵). هم‌چنین تیمار (G4) افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار (G3) را نشان داد (P<۰/۰۵). مقدار شاخص Hue فقط در تیمار (G4) افزایش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها یافته بود (P<۰/۰۵) ولی در تیمارهای (G2) و (G3) با وجود افزایش، تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد مشاهده نشد (P>۰/۰۵). شاخص ΔE در تمامی تیمارهای تغذیه شده با جلبک دونالیلا افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد یافت (P<۰/۰۵)، هم‌چنین تیمار (G4) افزایش معنی‌داری نسبت به دو تیمار (G2) و (G3) داشت (P<۰/۰۵). شاخص E* در تیمارهای (G3) و (G4) افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵)، هم‌چنین تیمار (G4) افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار (G3) را نشان داد (P<۰/۰۵).

**جدول ۲: تغییرات میانگین ± انحراف معیار شاخص‌های رنگ ناحیه‌ی باله‌ها**

| . | G1 | G2 | G3 | G4 |
|---|---|---|---|---|
| L* | ۵۵/۱۶±۴/۴۸ a | ۵۵/۴۴±۲/۸۵ a | ۵۳/۲۳±۴/۷۵ a | ۵۳/۷۹±۳/۳۲ a |
| a* | ۱/۵۵±۰/۸۶ a | ۱/۷۰±۱/۰۱ a | ۴/۵۱±۲/۳۴ b | ۶/۵۵±۴/۰۹ c |
| b* | ۴۳/۲۰±۲/۳۴ a | ۳۸/۶۹±۳/۰۰ a | ۳۹/۰۷±۳/۳۳ a | ۳۹/۴۴±۳/۸۹ a |
| Hue | ۵۰/۷۴±۴/۶۴ a | ۴۹/۵۰±۳/۲۸ a | ۴۵/۲۰±۳/۹۲ a | ۳۹/۶۰±۳/۲۸ b |
| Chroma | ۴۳/۴۱±۳/۰۰ a | ۳۷/۹۲±۵/۲۹ a | ۳۹/۴۱±۳/۱۵ a | ۴۰/۴۲±۲/۶۲ a |
| ΔE | ۲/۴۶±۱/۲۶ a | ۵/۶۳±۲/۸۶ b | ۷/۲۹±۲/۵۹ b | ۷/۷۱±۳/۸۲ c |
| E* | ۰/۰۳±۰/۰۲ a | ۰/۰۷±۰/۰۱ a | ۰/۲۰±۰/۰۳ b | ۰/۲۹±۰/۰۸ c |

G1: شاهد، G2: ۵۰mg/kg دونالیلا، G3: ۱۰۰mg/kg دونالیلا، G4: ۲۰۰mg/kg دونالیلا.

حروف غیرهمنام در هر ستون نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ در بین گروه‌ها می‌باشد.

**بحث**

رنگ ماهی در صنعت آبزی‌پروری ارزش بالایی در بازارپسندی، ارزش اقتصادی و قیمت ماهی دارد (Shahidi et al. 1998). استفاده از منابع طبیعی و سنتتیک کاروتنوئیدها به منظور تأثیر روی رشد، ایمنی و رنگ ماهی اخیراً بیش‌تر مورد توجه محققین واقع شده است (Ingle et al. 2006). از طرفی، به دلیل عدم توانایی ماهی‌ها در سنتز کامل بتاکاروتن‌های مورد نیاز خود، افزودن این ماده به جیره‌ی ماهی‌ها برای جبران کمبود کاروتنوئیدها معمول است. کاروتنوئیدها در پوست در قسمت زانتوفورها تجمع می‌یابند (Goodwin 1984, Gourveia et al. 2003). میزان توسعه‌ی رنگ به مقدار و نوع کاروتنوئید به کار برده شده بستگی دارد. در تحقیقی که در آبزی‌پروری روی جلبک دونالیلا و آستاگزانتین صورت گرفته، می‌توان جلبک دونالیلا را به عنوان جایگزین آستاگزانتین که یک رنگدانه‌ی سنتتیک است استفاده نمود (علیشاهی و همکاران ۱۳۹۳).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که می‌توان از مقادیر کم دونالیلا به منظور ایجاد رنگ در ماهی استفاده نمود. تجویز خوراکی *دونالیلا سالینا* (که یکی از منابع طبیعی بتاکاروتن می‌باشد) به میزان ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در

کیلوگرم باعث افزایش معنی‌دار میزان بتاکاروتن پوست نسبت به تیمار شاهد می‌گردند (P<۰/۰۵). در بسیاری از تحقیقات گزارش شده است که استفاده از جیره‌های حاوی آستاگزانتین که یک بتاکاروتن صناعی است باعث افزایش بتاکاروتن پوست می‌گردد که این اثر به طور معنی‌داری بیش‌تر از منابع طبیعی بتاکاروتن می‌باشد (Baker et al. 2002, Torrissen et al. 1989). در تحقیقات دیگری در ماهی سیم طلایی رنگدانه‌های آستاگزانتین، کانتازانتین و رنگدانه‌های حاصل از مواد طبیعی باعث افزایش نسبی میزان کاروتنوئیدهای پوست و عضله گردیده‌اند (Booth et al. 2004).

شاخص‌های رنگ شامل (L*, b*, Chroma) در ناحیه‌ی تنه و باله‌ها تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها را نشان نداد (P>۰/۰۵) که نشان می‌دهد جلبک دونالیلا بر روی شفافیت و میزان رنگ زرد و کدورت اثر قابل ملاحظه‌ای نداشته است. شاخص‌های (a*, ΔE, E*) در ناحیه‌ی تنه در تیمارهای تغذیه شده توسط غلظت‌های ۱۰۰mg/kg (G3) و ۲۰۰mg/kg (G4) جلبک دونالیلا افزایش معنی‌داری نسبت به دو تیمار دیگر را نشان داد (P<۰/۰۵). هم‌چنین میزان شاخص Hue در تیمارهای (G3) و (G4) کاهش معنی‌داری نسبت به دو تیمار دیگر را نشان داد (P<۰/۰۵). بنابراین رنگ تنه‌ی ماهی هنگام تغذیه توسط غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم دونالیلا به رنگ قرمز متمایل می‌شود. هم‌چنین افزایش E* نشان می‌دهد که رنگ قرمز بیش‌تر از رنگ زرد (b*) و شفافیت (L*) تحت تأثیر واقع شده است. بررسی ΔE نشان می‌دهد که تغذیه‌ی تیمارها با میزان ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم (G2) دونالیلا اگرچه باعث تغییر رنگ ماهی می‌شود ولی این تغییر رنگ توسط چشم انسان قابل تشخیص نمی‌باشد و بسیار جزئی است. احتمال داده می‌شود که با افزایش طول دوره‌ی تغذیه، تغییر رنگ مورد نظر در ماهی ایجاد شود.

در ناحیه‌ی باله‌ها میزان شاخص a* در تیمارهای (G3) و (G4) افزایش معنی‌داری نسبت به دو تیمار دیگر (G1) و (G2) را نشان داد (P<۰/۰۵). مقدار شاخص Hue فقط در تیمار (G4) کاهش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها را نشان داد (P<۰/۰۵). شاخص ΔE در تمامی تیمارهای تغذیه شده با جلبک دونالیلا افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد یافت (P<۰/۰۵). شاخص E* در تیمارهای (G3) و (G4) افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵) . بنابراین رنگ باله‌ها به رنگ قرمز متمایل شده است و میزان تغییر رنگ قرمز نسبت به سایر رنگ‌ها افزایش قابل قبولی داشته است به گونه‌ای که این تغییر رنگ از طریق چشم انسان قابل تشخیص می‌باشد. البته رنگ باله‌ها در دوزهای پایین (G2) اگرچه افزایش یافته است ولی توسط چشم انسان قابل تشخیص نیست. تغییر رنگ ماهی نشان می‌دهد که تغییر رنگ ناشی از تجمع کاروتنوئیدها در پوست می‌باشد و هرچه میزان غلظت کاروتنوئید بیش‌تر باشد رنگ ماهی بیش‌تر به طیف قرمز گرایش می‌یابد. Yasir و Qin در سال ۲۰۱۰ ایجاد رنگ قرمز را به دنبال افزودن انواع کاروتنوئیدها (آستاگزانتین، بتاکاروتن، کانتازانتین، زاگزانتین) به خوراک دلقک ماهیان *Amphiprion cuvier, Amphiprion ocellaris* گزارش نمودند. Kop و Durmaz در سال ۲۰۰۸ تغییر رنگ پوست ماهی سیکلید را تحت تأثیر رنگدانه‌های طبیعی مانند جلبک قرمز تک سلولی *P. cruentum* و آستاگزانتین گزارش نمودند. هم‌چنین تغذیه‌ی ماهی *Pagrus pagrus* توسط غذای حاوی بتاکاروتن باعث افزایش میزان شاخص a* شد ولی میزان شاخص L* تغییری نکرده است (Kalinowski et al. 2007). افزایش مقدار a* و b* و کاهش میزان H° با افزودن منابع طبیعی کاروتنوئیدها (شامل میکروجلبک‌ها و باکتری‌های حاوی کاروتن) در تحقیقات مختلفی گزارش شده است (Choubert et al. 2006, 2009, Ingle et al. 2006). البته Teimouri و همکاران در سال ۲۰۱۳ کاهش میزان L* را در گوشت ماهی قزل آلا گزارش نمودند که با نتایج تحقیق جاری و تحقیقات Choubert و همکاران در سال‌های ۲۰۰۶ و ۲۰۰۹ هم‌خوانی ندارد. آن‌ها بالا

بودن محتوای چربی بافت را باعث این کاهش دانستند. Watanabe و Vassallo-Agius در سال ۲۰۰۳ نیز علیرغم بهبود شاخص‌های *a و *b در ماهی قزل آلا بعد از تجویز آستاگزانتین کاهش *L را به دلیل کاهش میزان چربی بافت گزارش نمودند. Gourveia و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که تغذیه‌ی ماهی کپور زینتی Koi تغذیه شده با خوراک حاوی جلبک *Arthrospira maxima* باعث افزایش محتوای کاروتنوئید پوست ماهی و افزایش رنگ قرمز و نارنجی پوست می‌گردد و این افزایش بیش‌تر از برخی کاروتنوئیدهای صناعی است.

Sun و همکاران در سال ۲۰۱۲ بهبود رنگ و افزایش طیف رنگ قرمز پوست را در ماهی کپور Koi بعد از تجویز خوراکی میکروجلبک *Spirulina platensis* و باکتری فتوسنتز کننده *Rhodopseudamonas palustris* را گزارش کردند. این محققین رنگ ایجاد شده در پوست ماهی کپور کوی به دنبال این دو افزودنی را قابل مقایسه با افزودن آستاگزانتین دانستند. که با نتایج تحقیق جاری تطابق دارد. Tongsiri و همکاران در سال ۲۰۱۰ نیز با افزودن جلبک اسپیرولینا پلانتزیس به خوراک گربه ماهی، افزایش رنگ قرمز و زرد در پوست و فیله‌ی ماهی را گزارش نمودند که ارتباط مستقیمی با میزان کاروتنوئید پوست و فیله‌ی ماهی داشت. رنگ سیم قرمز و سرخو استرالیایی شدیداً تحت تأثیر خوراک‌های حاوی کاروتنوئید واقع شده و رنگ پوست و عضله‌ی آن‌ها به رنگ قرمز می‌گراید (Booth et al. 2004). همچنین اثر جلبک دونالیلا بر رنگ پوست و گوشت ماهی مورد بررسی قرار گرفته و نشان داده شد که بتاکاروتن، باعث افزایش رنگدانه در پوست و گوشت ماهی می‌گردد (Wang et al. 2006). هم‌چنین احتمال داده می‌شود که با افزایش طول دوره‌ی تغذیه بتوان از دوزهای پایین‌تر دونالیلا برای ایجاد رنگ در ماهی استفاده نمود.

با توجه به بازارپسندی بیش‌تر رنگ قرمز پوست و گوشت بسیاری از ماهیان زینتی و خوراکی و قیمت بالای کاروتنوئیدهای صناعی مثل آستاگزانتین، جلبک *دونالیلا سالینا* که بومی دریاچه‌ی ارومیه است و تولید زی‌توده آن نسبتاً ساده، امکان‌پذیر و ارزان است، در دوزهای پایین نیز توانایی ایجاد طیف رنگ قرمز را در ماهی دارا می‌باشد.

## تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز و از محل پژوهانه نگارندگان انجام گرفت. از همکاری جناب آقای دکتر مهدی زارعی و مهرزاد مصباح در مراحل انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

## منابع

حیدری، بیژن؛ وفایی، فریبرز و ترکان، علی (۱۳۹۱). بررسی تأثیر پخت مکرر بر رنگ سرامیک‌های دندانی و رنگ‌پذیری آن‌ها در مواجهه با محلول‌های رنگ‌زا. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان، دوره ۱۹ شماره ۲ صفحات ۵۸-۶۴.

علیشاهی، مجتبی؛ کرمی‌فر، مسعود؛ مصباح، مهرزاد و زارعی، مهدی (۱۳۹۳). مقایسه‌ی اثر آستاگزانتین و جلبک *دونالیلا سالینا* *Dunaliella salina* بر میزان کاروتنوئید پوست، پراکسیداسیون لیپیدها در ماهی سورم (*Heros serverus*). مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۹، ۱، ۱۰۱-۹۵.

Ajuyah, A.O.; Ahn, D.U.; Hardin, R.T. and Sim, J.S. (1993). Dietary antioxidants and storage affect chemical characteristics of omega-3 fatty acids enriched broiler chicken meats. Journal of Food Sciences. 58: 43-46.

Alishahi, M.; Karamifar, M.; Mesbah, M. and Zarei, M. (2014). Hemato-immunological responses of *Heros severus* fed diets supplemented with different levels of *Dunaliella salina* Fish Physiology and Biochemistry, 40: 57-65.

Baker, R.T.M.; Pfeiffer, A.M.; Schöner, F.J. and Smith-Lemmon, L. (2002). Pigmenting efficacy of astaxanthin and canthaxanthin in fresh-water reared Atlantic salmon, (*Salmo salar*). Animal Feed Sciences and Technology, 99: 97-106.

Ben-Amotz, A. and Shaish, A. (1992). Biosynthesis β-carotene. In: Dunaliella physiology, biochemistry and biotechnology. (Eds. Avron,M.and Ben-Amotz, A.) CRC Press, Boca Raton. Pp: 205-216.

Booth, M.A; Warner-Smith, R.J; Allan, G. and Glencross, B.D. (2004). Effect of dietary astaxanthin source and light manipulation on the skin colour of Australian snapper *Pagrus auratus* (BlochN and Schneider, (1801). Aquaculture Research 35: 458-464.

Bowden, T.J.; Thompson, K.D. Morgan, A.L.; Gratacap, R. and Nikoskelainen, S. (2007). Seasonal variation and immune response: A fish perspective. Fish Shellfish Immunol. 22: 697-706.

Choubert, G.; Mendes-Pinto, M.M. and Morais, R. (2006). Pigmenting efficacy of astaxanthin fed to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: effect of dietary astaxanthin and lipid sources. Aquaculture 257, 429-436.

Choubert, G.; Cravedi, J.P. and Laurentie, M. (2009). Effect of alternate distribution of astaxanthin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle pigmentation. Aquaculture 286, 100-104.

Cowan, A.K.; Rose, P.D. and Horne L.G. (1992). *Dunaliella salina* –A model system for the studying the response of plant cells to stress . Journal of Experimental Botany, 43: 1535-1547.

Diler, I. and Dilek, K. (2002). Significance of pigmentation and use in aquaculture. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 2: 97-99.

Doolan, B.J.; Allan, G.L.; Booth, M.A. and Jones, P.L. (2004). Improving skin colour in farmed snapper, Pagrus auratus. World Aquaculture, Nusa Dua, Bali, Indonesia. 9-13.

Edge, R.; McGarvey, D.J. and Truscott, T.G. (1997). The carotenoid as antioxidants a Review. Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology. 41(3): 189-200.

Giordano, M.; Pezzoni, V. and Hell, R. (2000). Strategies for the allocation of resources under sulfur limitation in the green alge *Dunaliella salina*. Plant Physiol. 124: 857-864.

Goodwin, T.W. (1984). The biochemistery of carotenoids, vol. 2. Animals, 2nd.Eds. Chapman & Hall, London. Pp: 224.

Gourveia, L.; Rema, P.; Pereira, O. and Empis, J. (2003). Colouring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass. Aquaculture Nutrition. 9 (2): 123-129.

Hejazi, M.A.; Barzegari, A.; Gharajeh, N.H. and Hejazi, M.S. (2010). Introduction of a novel 18S rDNA gene arrangement along with distinct ITS region in the saline water microalga Dunaliella, Saline Systems. 6: 4.

Hosseini Tafreshi, A. and Shariati, M. (2009). Dunaliella biotechnology: methods and applications. . Jounal of Applied Microbiology. 107: 14-35.

Ingle, G.; Arredondo-Figueroa, J.L.; Ponce-Palafox, J.T.; Barriga, I. and Vernon-Carter, E.J. (2006). Comparison of red chilli (*Capsicum annuum*) oleoresin and astaxanthin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss)* fillet pigmentation. Aquaculture 258: 487-495.

Kalinowski, C.T.; Izquierdo, M.S.; Schuchardt, D. and Robaina, L.E. (2007). Dietary supplementation time with shrimp shell meal on red porgy (*Pagrus pagrus*) skin colour and carotenoid concentration. Aquaculture. 272: 451-457.

Kalinowski, C.T.; Robaina, L.; Fernandez-Palacios, H.; Schuchardt, D. and Izquierdo, M.S. (2005). Effect of different carotenoid sources and their dietary levels on red porgy (*Pagrus pagrus*) growth and skin colour. Aquaculture. 244: 223-231.

Kop, A. and Durmaz, Y. (2008). The effect of synthetic and natural pigments on the colour of the cichlids (*Cichlasoma severum* sp., Heckel 1840). Aquaculture. 16: 117-122.

Miki, W. (1991). Biological functions and activities of animal carotenoids. Pure & Applied Chemisrty. 63(1): 141-146.

Nakano, T.; Kanmuri, T.; Sato, M. and Takeuchi, M. (1999). Effect of astaxanthin rich red yeast (*Phaffia rhodozyma*) on oxidative stress in rainbow trout. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects. 1426 (1): 119-125.

Salehy, A.A.; Ghasemy, A. Banava, S. and Tehrani rad, A. (2007). Effect of polymerizations on the color of composites. Journal of Dental School, 25(3): 243-249.

Shahidi, F.; Metusalach, A. and Brown, J.A. (1998). Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition. 38, 1-67.

Supamattaya, K.; Kiriratnikom, S.; Boonyaratpalin, M. and Borowitzka, L. (2005). Effect of a Dunaliella extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture. 248: 207-216.

Sun, X.; Chang, Y.; Ye, Y.; Ma, Z.; Liang, Y. and Li, T. et al. (2012). The effect of dietary pigments on the coloration of Japanese ornamental carp (koi, *Cyprinus carpio*). Aquaculture, 342-343: 62-68.

Suzuki, J. and Katoh, N. (1990). A simple and cheap method for measuring serum vitamin A in cattle using only a spectrophotometer. The Japanese Journal of Veterinary Science, 52(6): 1281-1283.

Teimouri, M.; Keramat, A.A. and Yeganeh, S. (2013). The effects of *Spirulina platensis* meal as a feed supplement on growth performance and pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Aquaculture. 396-399: 14-19.

Tongsiri, S.; Mang-Amphan, K. and Peerapornpisal, Y. (2010). Effect of replacing fishmeal with spirulina on growth, carcass composition and pigment of the mekong giant catfish. Asian Journal of Agricultural Science 2, 106-110.

Torrissen, O.J.; Hardy, R.W. and Shearer, K.D. (1989). Pigmentation of salmonids carotenoid depositin and metabolism. Critical Reviews in Aquatic Science. 1: 209-225.

Wang, Y.J.; Huchien, Y. and Hugpan, C. (2006). Effects of dietary supplementation of carotenoids on survival, growth, pigmentation and antioxidant capacity of characins, (*Hyphessobry callistus* ). Aquaculture 261: 641-648.

Watanabe, T. and Vassallo-Agius, R. (2003). Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan. Aquaculture 227, 35-61.

Yam, K.L. and Papadakis, S.E. (2004). A Simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. Journal of Food Engineering. 61: 137-142.

Yasir, I. and Qin, Y.G. (2010). Effect of dietary carotenoids on skin color and pigments of false clownfish, *Amphiprion ocellaris*, cuvier. Journal of World Aquaclture Society, 41 (3): 308-318.

# Oral administration of different levels of *Dunaliella salina* on skin carotenoids and color of *Heros serverus*

Alishahi, M.[1] and Karamifar, M.[2]

Received: 19.07.2014 Accepted: 18.04.2015

**Abstract**

Fish color is one of the most important indicators of marketing process in aquaculture. In this study, the effect of food supplementation with different level of *Dunaliella salina* on skin carotenoid level, skin and fins coloration in *H. serverus* were investigated. One hundred and eighty *H. severus* weighing 27±0.5g were randomly divided to four groups in triplicate: Groups 1 (G1) were fed with basal diet, group 2 (G2), group 3 (G3) and group 4 (G4) fed with basal diet supplemented with 50, 100 and 200 mg $kg^{-1}$ *D.salina*, respectively. Following 6 weeks administration of experimental foods, digital photos were taken from each group and skin samples were taken after euthanasia. Skin beta carotene rate as well as skin and fins coloration pattern were compared among groups (a*, b*, Hue, L* and Chroma). Results showed that skin beta carotene rate significantly increased in G2, G3 and G4 in comparison with control ($P<0.05$), and the highest rate was 4.06±0.45 mg $kg^{-1}$ in G4. There was no significant difference recating to color indicators in skin area between the groups ($P>0.05$). In the fin area a* value significantly increased in G2 and G3 compare to control also Hue and b* value significantly decreased in G2 and G3 compare to control ($P<0.05$). Chroma value significantly increased in G3 compare to other groups ($P<0.05$). No significant difference were observed in L* value between the groups ($P>0.05$). Regarding to the availability and low cost of *D.salina* as well as possibility of its mass production, *D.salina* can be used as an natural source of carotenoid for improving color and carotenoid level in fish.

**Key word**: *Dunaliella salina, Heros serverus*, Color, Beta carotene

1- Associated Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2- DVM Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

**Corresponding Author:** Alishahi, M., E-mail: alishahimoj@gmail.com