# تأثیر غلظت‌های مختلف اسیدفولیک و ریبوفلاوین بر برخی از شاخص‌های رشد، خونی و ایمنی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)


- **سهیل لامعی‌حسن‌کیاده**: گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران
- **مهدی محمدعلیخانی**: باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- **سلطنت نجارلشگری**: مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تنکابن، ایران
- **رقیه محمودی***: مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران


تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۷

## چکیده

**مطالعه حاضر به‌منظور ارزیابی تأثیر غلظت‌های مختلف اسیدفولیک و ریبوفلاوین بر برخی از شاخص‌های رشد، خونی و ایمنی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان طراحی و اجرا گردیده است. بدین منظور تعداد ۸۹۱ قطعه بچه‌ماهی با متوسط وزن ۰/۲± ۶/۵ گرم به‌طور تصادفی در ۲۷ مخزن فایبرگلاس در قالب ۹ تیمار (۳۳ قطعه ماهی در هر مخزن) توزیع شدند. بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با جیره معمولی و جیره حاوی سطوح مختلفی از اسیدفولیک (صفر، ۶ و ۱۰ میلی‌گرم) و ریبوفلاوین (صفر، ۲۰ و ۳۰میلی‌گرم) مورد تغذیه قرار گرفتند. در پایان دوره ۶۰ روزه پرورش، ۳۰ عدد ماهی از هر تیمار به‌طور تصادفی انتخاب و پس از اندازه‌گیری فاکتورهای رشد، خونگیری از آن‌ها انجام شد. نتایج نشان دادند بیش‌ترین میانگین افزایش وزن بدن، ضریب رشد ویژه، ضریب رشد روزانه، سلول‌های سفید خون، سلول‌های قرمز خون، هموگلوبین و هماتوکریت در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۲۰ میلی‌گرم ریبوفلاوین و ۱۰میلی‌گرم اسیدفولیک مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد و سایر تیمارها نشان داد ($P<0/05$). از نظر میزان بازماندگی اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد. براساس نتایج به‌دست آمده بهترین فرمول پیشنهادی برای تغذیه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت‌قد، ترکیبی از ۲۰ میلی‌گرم ریبوفلاوین و ۱۰ میلی‌گرم اسیدفولیک در هر کیلوگرم از غذای خشک است که با توجه به مقدار مصرف اندک ویتامین‌ها استفاده از این فرمول در مزارع پرورش ماهیان سردآبی مقرون به صرفه بوده و دارای توجیه اقتصادی می‌باشد.**

**کلمات کلیدی:** اسیدفولیک، ریبوفلاوین، رشد، شاخص‌های خونی و ایمنی، قزل‌آلای رنگین‌کمان



* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: roghaye.mahmodi@gmail.com

## مقدمه

تغذیه یک عامل حیاتی و مؤثر برای پرورش متراکم ماهی است و عدم تغذیه یا تغذیه ناکافی می‌تواند منجر به اختلالات سلولی مختلف و در نتیجه کاهش تولید محصول مزرعه شود. رژیم‌های غذایی بیماری‌های مختلف و عفونت‌ها را پوشش داده یا حداقل پیشرفت بیماری را به تعویق می‌اندازند. با این‌حال، رژیم‌های غیرکنترل شده ممکن است منجر به عدم تعادل غذایی، مسمومیت‌های تغذیه‌ای و بیماری‌های مربوط به کمبود مواد مغذی در بدن حیوان شوند. در نتیجه، تولید موفقیت‌آمیز ماهیان وابسته به یک رژیم متعادل و با کیفیت بالا شامل تمام ویتامین‌ها و مواد معدنی ضروری است. از سوی دیگر، تغذیه ماهی‌ها شامل ۴۰ تا ۵۰ درصد هزینه‌های کل تولید ماهی است. به‌دلیل بالا بودن هزینه ریزمغذی‌ها و ویتامین‌ها در پرورش ماهی، بسیاری از متخصصان ماهی علاقه‌مند به کاهش مصرف ویتامین هستند. با این‌حال، ویتامین‌ها برای رشد طبیعی ماهی و سلامت و تکثیر آن‌ها ضروری هستند و از این‌رو هر گونه کمبود این مواد مغذی می‌تواند باعث مشکلات جدی مانند ضعف رشد، ضعف سیستم ایمنی بدن و مرگ ماهیان گردد (Cowey و Robert، ۱۹۷۸). غلظت لازم هر ویتامین به اندازه ماهی، استرس‌های محیطی و مصرف سایر عناصر غذایی بستگی دارد (Jane و Drake، ۲۰۰۹). کمبود ویتامین در بچه‌ماهیان انگشت‌قد بسیار شایع است و اگرچه رژیم‌های غذایی با مقادیر زیادی از ترکیبات مغذی همراه هستند اما با این وجود بیماری‌های مرتبط با کمبود ویتامین‌ها همواره مشکل اساسی مزارع پرورش ماهی می‌باشد. به‌نظر می‌رسد که قرار گیری ویتامین‌ها در معرض اکسیداسیون، به‌ویژه هنگامی که در معرض گرما، رطوبت، مواد معدنی جزئی و چربی‌های فاسد قرار داشته باشند دلیل اصلی این کمبود باشد (Powers، ۲۰۰۳). اسیدفولیک یک عنصر غذایی ضروری برای تکثیر سلولی، فعالیت‌های خونی، بهبود فعالیت غشای سلولی، تنظیم گلوکز خون و تخم‌دهی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است (Vazquez و Guerrero، ۲۰۰۷؛ Cowey و Woodward، ۱۹۹۳). آزاد ماهیان روزانه به ۶-۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم اسیدفولیک نیاز دارند (Harper و همکاران، ۱۹۷۹) و هر کمبودی در این ویتامین می‌تواند انواع اختلالات فیزیولوژیک (کم‌خونی مگالوبلاستیکی، کاهش وزن و افزایش اشتها) را در این ماهی‌ها ایجاد کند (Cowey و Woodward، ۱۹۹۳؛ Jaafar و همکاران، ۲۰۱۱؛ Simmons، ۱۹۹۷). ویتامین ریبوفلاوین در کوآنزیم‌های بافتی، فلاوین مونوکلئوتید، فلاوین آدنین دی نوکلئوتید، کوآنزیم‌های بسیاری از آنزیم‌ها از جمله گلوتاتیون رودوکتاز و دی آمینواکسیداز یافت می‌شود (Halver و Hardy، ۲۰۰۲). ویتامین B2 یا ریبوفلاوین برای متابولیسم کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، چربی‌ها و کتون‌ها ضروری است (Jane و Drake ، ۲۰۰۹؛ McLaren و همکاران ۱۹۴۷). هم‌چنین ریبوفلاوین می‌تواند از غیرفعال شدن سیستم ایمنی پیشگیری کرده و مقاومت غشاهای سلول‌های قرمز را افزایش دهد (Fang den و Wilson، ۲۰۰۳). آزاد ماهیان روزانه به ۲۰-۳۰ میلی‌گرم ریبوفلاوین در هر کیلوگرم جیره خشک نیاز دارند (Cowey و Robert، ۱۹۷۸). کمبود آن میزان رشد ماهی‌ها را کاهش داده و ممکن است منجر به بی‌اشتهایی، اختلال حرکتی، کم‌خونی، کوتاه شدن سرپوش آبششی، خوردگی باله، تیره شدن رنگ بدن و اختلالات چشمی مختلف نظیر عروق قرنیه، حساسیت در مقابل نور، آب مروارید و خونریزی گردد (Halver، ۱۹۸۹؛ Powers ، ۲۰۰۳؛ Pilly و Kutty، ۲۰۰۵). در نتایج تحقیقی که به‌وسیله Fang den و Wilson (۲۰۰۳) به بررسی مقادیر مورد نیاز ریبوفلاوین در جیره غذایی بچه‌ماهیان Sunshine Bass پرداخته شده آمده است مقادیر پایین ویتامین ریبوفلاوین در جیره غذایی این ماهی عوارضی هم‌چون کاهش رشد و کم اشتهایی را نشان می‌دهد. در ارزیابی تأثیر ویتامین‌های توکوفرول (E) و ریبوفلاوین (B2) بر فاکتورهای خونی و ایمنی بچه‌ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) توسط عاشوری و همکاران (۱۳۹۳)، مخلوط ۳۰۰ میلی‌گرم ویتامین E و ۲۰ میلی‌گرم ویتامین B2 در جیره موجب بهبود شاخص‌های خونی و ایمنی گردید. صیادبورانی و همکاران (۱۳۹۳) در بررسی تأثیر سطوح مختلف ویتامین C و ویتامین E در جیره را بر پارامترهای رشد و سیستم ایمنی ماهی آزاد دریای خزر، دوز مناسب ویتامین C و E برای بچه ماهیان آزاد دریای خزر را به ترتیب ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا اعلام کردند. هم‌چنین نتایج نشان داد که میان این دو ویتامین در جیره برهم کنش مثبت وجود داشت. Esmaeili و Khara (۲۰۱۴) به بررسی عملکرد رشد، پارامترهای خون‌شناسی و ایمنی‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با رژیم‌های غذایی حاوی مقادیر مختلف ویتامین E و اسیدفولیک پرداختند. یافته‌های این مطالعه نشان داد که ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E و ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسیدفولیک برای رشد طبیعی و فیزیولوژی نیاز دارد. نتایج ارزیابی اثرات ویتامین E و ریبوفلاوین و ترکیب آن‌ها را بر روی پارامترهای خون‌شناسی ماهی کپورمعمولی انگشت‌قد توسط Sharifzadeh و Khara (۲۰۱۵) بیانگر تغییر پارامترهای خون‌شناسی توسط مکمل‌های ویتامین E و B2 بود. این تحقیق به‌منظور ارزیابی تأثیر غلظت‌های مختلف اسیدفولیک و ریبوفلاوین بر شاخص‌های رشد، خونی و ایمنی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به‌منظور دستیابی به ترکیب مناسب آن‌ها در جیره غذایی انجام پذیرفت.

## مواد و روش‌ها

**محل اجرای تحقیق:** مطالعه و اجرای این تحقیق در مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی کشور واقع در کیلومتر ۱۸ جاده دوهزار تنکابن از بهمن ماه سال ۱۳۹۳ تا فروردین ۱۳۹۴ انجام گردید. برای انجام این تحقیق از ۲۷ مخزن فایبرگلاس با حجم ۱۰۰ لیتر آب استفاده شد. مخازن قبل از معرفی بچه‌ماهیان شستشو، ضدعفونی و سپس آبگیری شدند.برای نگه‌داری سطح اکسیژن آب در حد استاندارد هر یک از مخازن به‌صورت جداگانه به سیستم هوادهی مجهز شدند.

**سنجش فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب:** پارامترهای فیزیکی و شمیایی آب مخازن شامل pH و شوری توسط دستگاه مولتی‌متر پرتابل (مدل Molti 340i شرکت WTW آلمان) به‌صورت هفتگی اندازه‌گیری شدند. هم‌چنین اکسیژن محلول آب ورودی و خروجی مخازن آزمایشی و دما سه بار در روز (صبح، ظهر و غروب) اندازه‌گیری شدند. متوسط اکسیژن محلول، شوری، دما و pH در طول دوره آزمایش به ترتیب ۰/۲±۷/۵ میلی‌گرم بر لیتر، ۰ درصد، ۱±۱۱ درجه سانتی‌گراد و ۰/۰۱±۷/۸ بود.

**تهیه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان:** با توجه به هدف تحقیق تعداد ۸۹۱ عدد بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن اولیه ۰/۲ ± ۶/۵ گرم تهیه و پس از زیست‌سنجی (اندازه‌گیری وزن، طول و تعیین بایومس کل) در ۹ گروه آزمایشی و با ۳ تکرار در ۲۷ مخزن فایبرگلاس ۱۰۰ لیتری ( با تراکم ۳۳ عدد در هر مخزن) توزیع شدند.

**جیره‌های غذایی و نحوه تهیه آن‌ها:** ماهیان مورد آزمایش با اضافه نمودن اسیدفولیک و ریبوفلاوین(جدول ۱) به غذای دان شرکت چینه (حاوی ۴۵درصد پروتئین، ۱۶ درصدچربی، ۸ درصد خاکستر و ۲ درصد فیبر) تغذیه شدند. جیره‌های غذایی حاوی ۸ غلظت متفاوت از اسیدفولیک و ریبوفلاوین و یک جیره شاهد (فاقد اسیدفولیک و ریبوفلاوین) به‌صورت هفتگی تهیه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ذخیره‌سازی شدند. برای آماده‌سازی غذا، اسیدفولیک و ریبوفلاوین بر اساس وزن غذا با استفاده از ترازوی ۰/۰۰۰۱گرم توزین و در آب مقطر حل شدند. سپس گرانول‌های غذا بر روی صفحه پلی‌اتیلن پخش گردید به‌طوری‌که ضخامت سطح پخش شده به اندازه قطر گرانول بود و در انتها اسیدفولیک و ریبوفلاوین محلول در آب مقطر توسط افشانه بر روی سطح غذا اسپری گردید (Mehrabi و همکاران، ۲۰۱۱). میزان غذای روزانه براساس جدول غذادهی ماهی قزل‌آلا برای بچه‌ماهی تا وزن ۹ گرم ۳-۲ درصد تعیین گردید. تغذیه بچه‌ماهیان به‌صورت روزانه و در ۵ نوبت (ساعات ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۵ و ۱۷) صورت پذیرفت. تمام آزمایش‌های کاربردی برای بررسی اثرات این ترکیبات بر شاخص‌های رشد، خونی و ایمنی تا سه بار تکرار شدند.

**جدول ۱: دوز استفاده از ویتامین‌ها در تیمارهای مختلف ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت‌قد**

| ردیف | نام تیمار | دوز استفاده از ویتامین‌ها |
|---|---|---|
| ۱ | شاهد | فاقد اسیدفولیک و ریبوفلاوین |
| ۲ | AF6 | ۶ میلی‌گرم اسیدفولیک |
| ۳ | AF10 | ۱۰ میلی‌گرم اسیدفولیک |
| ۴ | R20 | ۲۰ میلی‌گرم ریبوفلاوین |
| ۵ | R30 | ۳۰ میلی‌گرم ریبوفلاوین |
| ۶ | AF6+R20 | ۶ میلی‌گرم اسیدفولیک+۲ میلی‌گرم ریبوفلاوین |
| ۷ | AF6+R30 | ۶ میلی‌گرم اسیدفولیک+۳۰ میلی‌گرم ریبوفلاوین |
| ۸ | AF10+R20 | ۱۰ میلی‌گرم اسیدفولیک+۲۰ میلی‌گرم ریبوفلاوین |
| ۹ | AF10+R30 | ۱۰ میلی‌گرم اسیدفولیک+۳۰ میلی گرم ریبوفلاوین |

**زیست‌سنجی و نحوه تعیین شاخص‌های رشد:** برای بررسی اختلاف پارامترهای رشد بین تیمارهای آزمایشی در طول دوره آزمایش، هر ۷ روز یک‌بار تعداد ۳۰ عدد ماهی از هر مخزن آزمایشی به‌طور تصادفی انتخاب و طول و وزن آن‌ها با استفاده از تخته بیومتری با دقت یک سانتی‌متر و ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری و ثبت گردید. در پایان هر زیست‌سنجی پارامترهای رشد ازجمله افزایش وزن بدن، میزان رشد روزانه (DGR)، درصد افزایش وزن بدن (BWI)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، ضریب رشد ویژه (SGR)، فاکتور وضعیت (K) و درصد بازماندگی (S) با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه گردید (Leenhouwers و همکاران، ۲۰۰۷):

- افزایش وزن:

$BWG = wt2 - wt1$ که wt2 وزن نهایی و wt1 وزن اولیه ماهی می‌باشد.

- میزان رشد روزانه (گرم/ روز):

$G.R = (Bwf - Bwi) / n$ که Bwf متوسط وزن نهایی، Bwi متوسط وزن اولیه و n تعداد روزهای پرورش می‌باشد.

- درصد افزایش وزن بدن (BWI%):

$BWI\% = (Bwf - Bwi) / Bwi \times ۱۰۰$ که Bwf متوسط وزن نهایی و Bwi متوسط وزن اولیه می‌باشد.

- ضریب تبدیل غذایی:

$FCR = F/(wt - wo)$ که F میزان غذای مصرف شده، wo میانگین بیوماس اولیه (گرم) و wt میانگین بیوماس نهایی (گرم) می‌باشد.

- ضریب رشد ویژه:

$SGR=(Lnwt - Lnwo)/t \times ۱۰۰$ که wo میانگین بیوماس اولیه (گرم)، wt میانگین بیوماس نهایی (گرم) و t تعداد روزهای پرورش می‌باشد.

- فاکتور وضعیت (K یا CF):

$CF = (Bw/TL3) \times ۱۰۰$ که Bw میانگین وزن نهایی بدن برحسب گرم و TL میانگین طول کل نهایی برحسب سانتی‌متر است.

- درصد بازماندگی:

(تعداد اولیه بچه‌ماهی‌ها-تعداد تلفات)/تعداد اولیه بچه‌ماهی‌ها× ۱۰۰

**خونگیری و تعیین شاخص‌های خونی:** بعداز طی دوره پرورش (۶۰ روز) و ۲۴ ساعت بعد از آخرین بیومتری ۳۰ درصد از جمعیت ماهیان هر تیمار به‌طور تصادفی انتخاب و پس از بی‌هوشی با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره گل میخک با استفاده از سرنگ هپارینه ۲ سی‌سی از ساقه‌دمی آن‌ها خون‌گرفته‌شد و پس ازانتقال به ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری هپارینه جهت اندازه‌گیری شاخص‌های خونی در مجاورت یخ به آزمایشگاه ویرومد رشت منتقل شدند. در آزمایشگاه، تعداد گلبول‌های سفید خون (WBC) و شمارش افتراقی آن‌ها، تعداد گلبول‌های قرمز خون (RBC)، غلظت هموگلوبین (Hb)، هماتوکریت (HCT)، حجم متوسط گلبول قرمز (MCV)، غلظت متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) مورد سنجش قرار گرفتند.

**روش اندازه‌گیری فاکتورهای خونی**

**شمارش گلبول‌های قرمز (RBC):** با استفاده از پیپت ملانژور قرمز، با رقت ۱ به ۲۰۰، ماده رقیق‌کننده ریس، لام شمارش نئوبار (در ۵ خانه مرکزی لام شمارش شده و در عدد ۱۰۰۰۰ ضرب می‌گردد) (عامری‌مهابادی، ۱۳۷۸؛ مجابی و حیدرنژاد، ۱۳۸۲؛ Klontz، ۱۹۹۴).

**شمارش گلبول‌های سفید (WBC):** با استفاده از پیپت ملانژور سفید، با رقت ۱ به ۲۰، ماده رقیق‌کننده ریس، لام شمارش نئوبار (در ۴ خانه مخصوص گلبول‌های سفید شمارش شده و درعدد ۵۰ ضرب می‌گردد) (عامری‌مهابادی، ۱۳۷۸؛ مجابی و حیدرنژاد، ۱۳۸۲؛ Klontz، ۱۹۹۴).

**اندازه‌گیری هماتوکریت (HCT):** دو سوم لوله میکروهماتوکریت را ازخون پر کرده، پس از مسدود نمودن انتهای لوله با خمیر هماتوکریت، لوله را با دور ۷۰۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده و با خط‌کش مخصوص میزان آن برحسب درصد قرائت گردید (Mohseni و همکاران، ۲۰۰۶).

**اندازه‌گیری هموگلوبین (Hb):** اندازه‌گیری آن به‌روش سیان مت یا سیانید هموگلوبین و با استفاده از اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر بر حسب گرم در دسی‌لیتر انجام شد (عامری‌مهابادی، ۱۳۷۸؛ مجابی و حیدرنژاد، ۱۳۸۲؛ Klontz، ۱۹۹۴).

**محاسبه MCV با واحد فمتولیتر** (Simmons، ۱۹۹۷):

$$MCV = \frac{\text{هماتوکریت} \times ۱۰}{RBC(\text{میلیون به})}$$

**محاسبه MCH با واحد پیکوگرم** (Serverd، ۱۹۶۴):

$$MCH = \frac{\text{هموگلوبین} \times ۱۰}{RBC(\text{میلیون به})}$$

**محاسبه MCHC با واحد گرم در دسی‌لیتر** (Serverd، ۱۹۶۴):

$$MCHC = \frac{\text{هموگلوبین}}{\text{هماتوکریت}} \times ۱۰۰$$

**تعیین شاخص‌های ایمنی:** نمونه‌های خون فاقد ماده ضدانعقاد تهیه و پس از نگه‌داری ساعته در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در دور g ۳۰۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و سپس نمونه‌های سرم در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند (Jaafar و همکاران، ۲۰۱۱). غلظت ایمنوگلوبولین کل (IgM) براساس تابش کمپلکس آنتی‌بادی پلی‌کلونال موجود در محلول تامپون در طول موج ۸۴۰-۳۰۰ نانومتر تعیین شد (Zilva و Pannall، ۱۹۸۴). بدین‌روش که IgM موجود در سرم خون با آنتی‌بادی پلی‌کلونال تشکیل کمپلکس داده و باعث کدر شدن محلول شدند. شدت کدورت ایجاد شده با مقدار IgM رابطه مستقیم داشت و توسط دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد (Khoshbavar-Rostami و همکاران، ۲۰۰۶؛ سقا، ۱۳۸۲). برای تعیین فعالیت لیزوزیم، ابتدا سرم‌های خونی در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند تا از فعالیت آنزیم جلوگیری شود. از سوسپانسیون Micrococcus Lysodeikticua (Sigma, St. Louis, USA) برای تعیین فعالیت لیزوزیم استفاده شد و جذب نوری (OD) سوسپانسیون‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Jaafar و همکاران، ۲۰۱۱). آزمایش‌های فعالیت تام همولیتیک (CH50) با استفاده از کیت DiaMerta (ساخت ایتالیا) (Migliorini و همکاران، ۱۹۸۵؛ Takahashi و همکاران، ۱۹۷۸؛ Miller و Nussenzweig، ۱۹۷۵) انجام شدند.

**تحلیل آماری:** به‌منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها از آزمون Shapiro-Wilk استفاده شد. با توجه به نرمال بودن داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA (ANOVA Oneway) و پس از انجام آزمون Homogeneity of Variances جهت مقایسه گروه‌ها با یکدیگر از آزمون دانکن نرم‌افزار SPSS Ver. ۱۸ استفاده شد. میزان معنی‌دار بودن در سطح ۹۵ درصد تعیین گردید و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel ۲۰۰۷ استفاده شد.

## نتایج

نتایج افزودن غلظت‌های متفاوت اسیدفولیک و ریبوفلاوین در جیره ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت‌قد بر شاخص‌های رشد در جدول ۲ آمده است. همان‌گونه که داده‌های موجود در جدول نشان می‌دهد بیش‌ترین وزن بدن و به تبع آن بیش‌ترین درصد افزایش وزن بدن در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰ میلی‌گرم اسید فولیک و ۳۰ میلی‌گرم ریبوفلاوین مشاهد شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P<۰/۰۵$). هم‌چنین کم‌ترین میزان افزایش وزن بدن در ماهیان گروه شاهد مشاهده شد. بیش‌ترین افزایش طول کل در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۶ میلی‌گرم اسیدفولیک و ۳۰ میلی‌گرم ریبوفلاوین مشاهده شد که با ماهیان تیمار ۹ (AF10+R30) فاقد اختلاف معنی‌دار ($P>۰/۰۵$)، ولی با سایر

تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). هم‌چنین ماهیان گروه شاهد دارای کوتاه‌ترین طول کل بودند. بهترین ضریب تبدیل غذایی (۱/۰±۰۵/۰۶) در تیمار ۹ و ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ریبوفلاوین و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسیدفولیک و بالاترین آن(۱/۰±۵۳/۰۹) در تیمار شاهد(فاقدمکمل‌های ریبوفلاوین و اسیدفولیک) ثبت گردید و براساس آزمون کروسکال-والیس مشخص گردید که بین تیمارهای مورد بررسی از نظر میزان ضریب تبدیل غذایی اختلاف معنی دار آماری وجود دارد (P<۰/۰۵). کم‌ترین فاکتور وضعیت یا ضریب‌چاقی(۰/۱۲ ± ۰/۹۴)در ماهیان تیمار ۷ (جیره غذایی حاوی ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ریبوفلاوین و ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسیدفولیک) مشاهده شد که با سایر تیمارهای مورد بررسی اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵). براساس داده‌های جدول ۲، نرخ بازماندگی ماهیان تغذیه شده با درصدهای متفاوت اسیدفولیک و ریبوفلاوین در طول دوره پرورش بدون اختلاف معنی‌دار بود (P>۰/۰۵). نتایج تأثیر غلظت‌های متفاوت اسیدفولیک و ریبوفلاوین در جیره ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت‌قد بر شاخص‌های خونی و ایمنی در جدول ۳ آمده است. براساس آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه به‌منظور مقایسه میزان هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول‌های قرمز در خون ماهیان مورد بررسی، بین تیمار ۴ و برخی تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد(P<۰/۰۵). براساس آزمون دانکن به‌منظور مقاسیه جفتی گروه‌ها، میانگین میزان هموگلوبین و هماتوکریت در تیمار ۸ بیش‌تر از سایر تیمارها بود و با گروه شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری داشت (P<۰/۰۵). هم‌چنین کم‌ترین میزان هموگلوبین و هماتوکریت در تیمار ۴ مشاهده شد و با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار آماری داشت(P<۰/۰۵).مقایسه‌حجم متوسط گلبول قرمز خون ماهیان موردبررسی اختلاف معنی‌داری را بین شاهد و سایر تیمارها نشان داد (P<۰/۰۵). مقایسه جفتی گروه‌ها نیز نشان داد میانگین حجم متوسط گلبول قرمز از شاهد تا تیمار ۵ دارای روند افزایشی بوده به‌طوری‌که در تیمار ۵ بیش‌ترین حجم متوسط گلبول قرمز مشاهده شد و با گروه شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری داشت (P<۰/۰۵). هم‌چنین کم‌ترین حجم متوسط گلبول قرمز مشاهده شده در گروه شاهد بود. براساس آزمون آماری درمقایسه بین غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز خون بچه‌ماهیان تیمار شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). از نظر تعداد گلبول‌های سفید خون ماهیان بین گروه شاهد و تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد (P<۰/۰۵) و گروه شاهد کم‌ترین تعداد گلبول‌های سفیدخون را درمقایسه گروه‌ها با یکدیگر نشان داد و از نظر آماری بین همه تیمارها با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید (P<۰/۰۵). میزان گلبول‌های سفید در تیمارها از روند افزایشی برخوردار بوده به‌طوری‌که بیش‌ترین تعداد گلبول‌های سفید در تیمارهای ۸ (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ریبوفلاوین ۲۰+۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسیدفولیک)و ۹(۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ریبوفلاوین+۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسیدفولیک) مشاهده شد. این تیمارها درصد لنفوسیت‌ها را در ماهی‌ها بالا بردند و بیش‌ترین میزان آن زمانی مشاهده شد که این ماهی‌ها در معرض تیمارهای ۷ و ۹ قرار گرفته بودند. درصد نوتروفیل نیز در همه تیمارها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵) و بالاترین میزان نوتروفیل در گروه شاهد و کم‌ترین میزان آن در تیمارهای ۷ و ۹ مشاهده شد (P<۰/۰۵). هیچ‌یک از تیمارها تأثیر معنی‌داری بر میزان مونوسیت‌ها و ائوزینوفیل‌های خون بچه‌ماهیان نداشتند. براساس داده‌های جدول ۳ بالاترین میزان ایمونوگلوبین و IgM به‌ترتیب در تیمارهای ۷ و ۳ مشاهده شد و تیمارهای ترکیبی تأثیرات منفی بر فعالیت لیزوزیم داشته و میزان آن دراین تیمارها درمقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵). بالاترین میزان فعالیت لیزوزیم درماهیان تیمارهای ۲ و ۳ مشاهده شد. بنابراین تیمار ۱ (۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسیدفولیک) نشان‌دهنده بالاترین سطح CH50 بود و این پارامتر در زمان رویارویی ماهی‌ها با تیمارهای ۵ و ۶ به سطحی پایین‌تر از گروه شاهد رسید.

**جدول ۲: اثر غلظت‌های مختلف اسیدفولیک و ریبوفلاوین بر شاخص‌های رشد ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت‌قد**

| | شاهد | AF6 | AF10 | R20 | R30 | AF6+R20 | AF6+R30 | AF10+R20 | AF10+R30 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| طول کل (سانتی‌متر) | ۱۲/۳۹±۰/۷۳ a | ۱۲/۸۹±۰/۸ ab | ۱۲/۸۹±۰/۸ bc | ۱۳/۰۵±۰/۵ bc | ۱۲/۸۷±۰/۸۴ ab | ۱۲/۸۴±۱ ab | ۱۳/۹±۲/۱۱ d | ۱۳/۳۱±۰/۵۷ bc | ۱۳/۴۹±۰/۷ cd |
| وزن (گرم) | ۲۰/۳±۳/۳۸ a | ۲۳/۴±۳۶/۱۸ b | ۲۴/۲۲±۴/۰۵ ab | ۲۲/۲±۶۸/۸۶ b | ۲۳/۵۸±۴/۵۴ b | ۲۳/۱۷±۵/۴۵ b | ۲۴/۹۸±۳/۵۶ ab | ۲۴/۹۹±۳/۴۲ ab | ۲۵/۹۲±۳/۹۱ c |
| افزایش وزن بدن | ۲۱۶/۹±۵۲/۵۲ a | ۲۵۸/۱۶±۳۴/۵۵ b | ۲۷۱/۱۷±۴۸/۶۴ bc | ۲۵۷/۳±۷۲/۲۶ b | ۲۵۸/۲۲±۷/۰۸ b | ۲۵۵/۲۷±۹/۳۷ b | ۲۸۶/۱۴±۳۷/۶۶ bc | ۲۸۹/۱۷±۷۹/۱۳ c | ۲۹۵/۲۳±۲/۶۸ c |
| نرخ رشد ویژه (گرم بر روز) | ۱/۹۲±۰/۰۵ a | ۲/۱۳±۰/۰۸ b | ۲/۱۹±۰/۰۸ bc | ۲/۱۲±۰/۰۲ b | ۲/۱۳±۰/۱ b | ۲/۱۱±۰/۱۳ b | ۲/۲۵±۰/۰۶ bc | ۲/۲۷±۰/۰۷ c | ۲/۲۹±۰/۱ c |
| نرخ رشد روزانه (گرم بر روز) | ۳/۶۱±۰/۱۶ a | ۴/۳۱±۰/۲۸ b | ۴/۵۲±۰/۲۹ bc | ۴/۳±۰/۰۵ b | ۴/۳۱±۰/۳۷ b | ۴/۲۷±۰/۴۶ b | ۴/۷۷±۰/۲۴ bc | ۴/۸۳±۰/۲۹ c | ۴/۹۲±۰/۳۹ c |
| ضریب تبدیل غذایی | ۱/۵۳±۰/۰۹ d | ۱/۳±۰/۲ bc | ۱/۲۴±۰/۱ bc | ۱/۲۷±۰/۰۱ bc | ۱/۲۹±۰/۰۹ c | ۱/۲۸±۰/۱۲ bc | ۱/۱۲±۰/۰۷ ab | ۱/۱۶±۰/۱۲ abc | ۱/۰۵±۰/۰۶ a |
| فاکتور وضعیت (گرم بر سانتی‌متر) | ۱/۰۷±۰/۰۲ b | ۱/۰۹±۰/۰۱ b | ۱/۰۷±۰/۰۱ b | ۱/۰۶±۰/۰۱ b | ۱/۱۱±۰/۰۱ b | ۱/۰۹±۰/۰۱ b | ۰/۹۴±۰/۱۲ a | ۱/۰۶±۰/۰۲ b | ۱/۰۶±۰/۰۱ b |
| بازماندگی (درصد) | ۱۰۰± ۰ a | ۱۰۰± ۰ a | ۱۰۰± ۰ a | ۱۰۰± ۰ a | ۱۰۰± ۰ a | ۱۰۰± ۰ a | ۱۰۰± ۰ a | ۱۰۰± ۰ a | ۱۰۰± ۰ a |

حروف a، b، c و d بیانگر اختلاف معنی‌دار آماری بین میانگین‌های به‌دست آمده در سطح ۵٪ است.

**جدول ۳: اثر غلظت‌های متفاوت اسیدفولیک و ریبوفلاوین در جیره غذایی بر شاخص‌های خونی و ایمنی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت‌قد**

| | شاهد | AF6 | AF10 | R20 | R30 | AF6+R20 | AF6+R30 | AF10+R20 | AF10+R30 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| گلبول‌های قرمز (میلی‌مترمکعب) | ۰/۸۱±۰/۰۸ bc | ۰/۷۰±۰/۰۲ ab | ۰/۷۰±۰/۰۳ ab | ۰/۸۱±۰/۰۸ a | ۰/۷۴±۰/۰۶ ab | ۰/۸۱±۰/۰۵ bc | ۰/۷۷±۰/۰۳ ab | ۰/۸۵±۰/۰۲ c | ۰/۶۹±۰/۰۱ ab |
| هموگلوبین (گرم/دسی‌لیتر) | ۷/۲۳±۰/۷۲ bc | ۶/۲۳±۰/۱۸ ab | ۶/۲۶±۰/۲۷ ab | ۵/۳۶±۰/۲۹ a | ۶/۹۶±۰/۵۴ bc | ۷/۳±۰/۴۶ bc | ۶/۹۳±۰/۲۳ bc | ۷/۶۶±۰/۱۷ c | ۶/۳۶±۰/۱۴ ab |
| هماتوکریت (٪) | ۳۵/۳۳±۵/۵ bc | ۳۰± ۱ ab | ۳۰/۳۳±۲/۳ ab | ۳۶±/۰۲ a | ۳۳/۶۶±۴/۵ bc | ۳۵/۶۶±۴/۵ bc | ۳۳/۶۷±۲/۰۸ bc | ۳۸/۱±۰/۱۰ c | ۳۰/۳۳±۱/۱۵ ab |
| (fL) MCV | ۴۲۰/۶۶±۷/۲۴ a | ۴۲۸±۶/۸۸ ab | ۴۳۲±۳/۵۲ ab | ۴۵۰/۳۶±۴/۵ bc | ۴۵۷/۳±۳/۲۸ c | ۴۴۱/۰± ۵ ab | ۴۳۸/۳۳±۳/۴۸ ab | ۴۴۷/۳۳±۶/۶۹ bc | ۴۴۲/۳۳±۶/۸۸ ab |
| (pg) MCH | ۹۸±۰/۵۷ a | ۸۸/۰±۶۶/۳۳ a | ۸۹/۰±۳۳/۳۳ ab | ۹۲/۱±۶۶/۶۶ bc | ۹۴/۲±۳۳/۴ c | ۹۰±۰/۵۷ ab | ۸۹/۰±۱۲/۳۳ ab | ۹۰±۰/۱۱ ab | ۹۲/۰±۶۶/۸۸ bc |
| MCHC (گرم/دسی‌لیتر) | ۲۰/۶۶±۰/۳۳ | ۲۰/۳۳±۰/۳۳ | ۲۰/۶۶±۰/۳۳ | ۲۰/۰±۰/۵۷ | ۲۰/۳۳±۰/۳۳ | ۲۰/۳۳±۰/۳۳ | ۲۰/۰±۳۳/۳۳ | ۲۰/۱۱±۰/۱۷ | ۲۰/۹۶±۰/۱۷ |
| گلبول‌های سفید (میلی‌مترمکعب)($10^4$) | ۰/۳۵±۰/۰۱ a | ۰/۵۲±۰/۰۷ ab | ۰/۶۶±۰/۰۲ bc | ۰/۷۲±۰/۰۶ bcd | ۰/۷۷±۰/۰۸ cd | ۰/۷۷±۶۶/۹۶ cd | ۰/۸۵±۳۳/۹۲ cde | ۱/۰۱±۳۳/۱۲ e | ۹/۲۰±۳۳/۸۸ de |
| نوتروفیل (٪) | ۳۸±۰/۸۸ c | ۲۸±۰/۵۵ b | ۲۷±۱/۷۳ b | ۲۴/۰±۳۳/۳۳ ab | ۲۵/۰±۱/۵۲ ab | ۲۵±۱/۵۲ ab | ۲۰/۳۳±۰/۳۳ a | ۲۳/۶۶±۲/۱۸ ab | ۱۹/۶۶±۰/۳۳ a |
| لنفوسیت (٪) | ۲۴±۱/۷۳ c | ۲۵±۱/۰ b | ۲۵±۳/۵۱ b | ۷۱/۳۳±۱/۵۲ b | ۷۲±۲/۶۴ ab | ۷۱/۳۳±۳/۲۱ ab | ۷۵/۶۶±۰/۵۷ a | ۷۲/۳۳±۷/۷۸ ab | ۷۵/۳۳±۱/۱۵ a |
| مونوسیت (٪) | ۲/۳۳±۰/۳۳ | ۲/۶۶±۰/۳۳ | ۲/۳۳±۰/۳۳ | ۲/۳۳±۰/۳۳ | ۲±۰/۵۷ | ۲/۳۳±۰/۳۳ | ۲/۶۶±۰/۳۳ | ۲/۶۶±۰/۳۳ | ۲/۶۶±۰/۳۳ |
| ائوزینوفیل (٪) | ۱±۰/۵۷ | ۱/۰±۳۳/۳۳ | ۲±۰/۵۷ | ۱/۶۶±۰/۳۳ | ۱/۰±۰/۵۷ | ۱/۳۳±۰/۳۳ | ۱/۳۳±۰/۳۳ | ۱/۳۳±۰/۳۳ | ۲/۰±۰/۵۷ |
| ایمونوگلوبین کل (میلی‌گرم/دسی‌لیتر) | ۱۴/۴۷±۰/۴۹ a | ۱۴/۳±۱/۸ a | ۱۶/۵۳±۰/۳۲ bc | ۱۶/۵۷±۰/۶۱ bc | ۱۴/۶±۱/۱۳ a | ۱۵/۴۳±۰/۸۴ ab | ۱۷/۴۷±۱/۰۲ c | ۱۵/۷۷±۱/۰۴ abc | ۱۵/۰±۱/۶۲ ab |
| ایمونوگلوبین M (میلی‌گرم/دسی‌لیتر) | ۱۶/۶۶±۰/۸۸ a | ۲۳/۳۳±۲/۶ a | ۲۷/۳۳±۳/۷۱ bc | ۲۵/۳۳±۴/۸۴ c | ۲۴/۳۳±۳/۳۸ ab | ۲۰/۴±۰/۰۸ d | ۲۴/۶۶±۳/۷۱ bc | ۱۶/۳۳±۱/۴۵ bc | ۱۷/۶۶±۰/۶۶ ab |
| لیزوزیم | ۲۶±۲/۶۴ ab | ۵۱±۷/۰۲ c | ۴۸/۶۶±۱/۱۳ c | ۴۷/۳۳±۸/۸۷ b | ۴۵/۳۳±۱۱/۸۵ b | ۱۹/۶۶±۴/۱۷ a | ۱۸/۳۳±۲/۳۳ a | ۱۳/۶۶±۰/۶۶ a | ۲۱/۶۶±۶/۲۲ a |
| CH50 | ۳۱/۶۶±۳/۶۶ a | ۵۰/۳۳±۱۰/۶۸ a | ۳۷/۳۳±۷/۴۲ bc | ۴۰/۰±۴/۰۴ c | ۲۴/۳۳±۰/۸۸ ab | ۲۴/۰±۳/۵۱ d | ۳۲/۶۶±۳/۱۷ bc | ۴۴/۰±۸/۵۰ bc | ۳۵/۳۳±۲/۹۶ ab |

حروف a، b، c و d بیانگر اختلاف معنی‌دار آماری بین میانگین‌های به‌دست آمده در سطح ۵٪ است.

## بحث

در پژوهش حاضر با توجه به رژیم گوشت‌خواری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، تأثیر غلظت‌های مختلف اسیدفولیک و ریبوفلاوین به‌صورت مجزا و ترکیبی در جیره غذایی بر شاخص‌های رشد، خونی و ایمنی آن بررسی شده است. اسیدفولیک و ریبوفلاوین دو ویتامین مهم برای رشد متعادل ماهی‌ها هستند. هرچند غلظت بهینه این ویتامین‌ها به صورت جداگانه در مطالعات پیشین اندازه‌گیری شده است (Cowey و Robert، ۱۹۷۸؛ Harper و همکاران، ۱۹۷۹)، اما از آن‌جاکه ویتامین‌ها در کنار هم تأثیرات متقابلی ایجاد می‌کنند، برهم کنش این دو ویتامین از اهداف تحقیق حاضر بوده است. نتایج تحقیقی Fan و deng Wilson (۲۰۰۳) در بررسی مقادیر مورد نیاز ویتامین ریبوفلاوین در جیره غذایی بچه‌ماهی Sunshine bass، مشخص نمود که مقادیر پایین ویتامین B2 در جیره غذایی این ماهی عوارضی هم‌چون کم اشتهایی و کاهش رشد را نشان می‌دهد. جیره‌های حاوی مقادیر بیش از ۳/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم ریبوفلاوین برای جلوگیری از علائم کمبود و بهبود شرایط رشد بچه‌ماهیان Sunshine Bass مناسب است ولی مقادیر بهینه ریبوفلاوین در جیره این ماهی ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم پیشنهاد گردید. باتوجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، تیمار ۱۰ میلی‌گرم اسیدفولیک و ۳۰ میلی‌گرم ریبوفلاوین سبب بهبود شاخص‌های رشد بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان گردید. ماهیان تغذیه شده با این تیمار افزایش وزن بدن، طول کل، ضریب چاقی (K)، میزان رشد روزانه، میزان رشد ویژه و کاهش میزان غذای مصرفی را نشان دادند. مقدار مورد نیاز اسیدفولیک برای قزل‌آلای رنگین‌کمان در تحقیقات Halver و Hardy (۲۰۰۲) ۶ تا ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا گزارش شده است که با نتایج تحقیق حاضر مشابهت دارد. برخلاف نتایج این تحقیق McLaren و همکاران (۱۹۴۷)، مطالعه‌ای مقدماتی بر روی ماهیان قزل‌آلای انگشت‌قد با استفاده از رژیم غذایی گوشتی اجرا نموده و گزارش کردند که این ماهیان بیش‌تر از ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسیدفولیک جهت رسیدن به حداکثر افزایش وزن بدن نیاز ندارند هر چند که NRC (۱۹۸۱)، میزان اسیدفولیک مورد نیاز در رژیم غذایی ماهیان سردآبی را ۵ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم غذا توصیه نموده است. در مطالعه دیگری، Hughes و همکاران (۱۹۸۱)، ماهیان انگشت قد قزل‌آلای رنگین‌کمان را با مقادیر مختلف ریبوفلاوین (۲۴، ۱۸، ۱۲، ۶، ۳، ۰ و ۵۴ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم غذا) طی ۲۰ هفته تغذیه نمودند و گزارش نمودند که غلظت ۳ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم غذا، سبب افزایش میزان رشد، تغذیه کارآمد و کسب مقادیر فعالیت EGR (گلوتاتیون ردوکتاز گلبول قرمز) می‌گردد. این میزان در گزارش Woodward (۱۹۸۲) که ریبوفلاوین را با ۶ غلظت متفاوت (۰، ۴، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در رژیم غذایی قزل آلای رنگین‌کمان استفاده نمود ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم قید شده است که بهترین نتایج را از نظر رشد و ضریب تبدیل غذایی در برداشت. هر چند گزارش Hughes (۱۹۸۴) بر روی ماهیان انگشت‌قد قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که میزان بیش از حد ریبوفلاوین در غذای ماهی قزل‌آلا هیچ تأثیری بر کاهش رشد ندارد و بچه‌ماهیان قزل‌آلا نیز مشابه سایر موجودات به‌میزان بیش از حد ریبوفلاوین موجود در رژیم غذایی حساس نیستند اما کمبود این ویتامین به کاهش اشتها

و رشد و افزایش تلفات در ماهی‌ها می‌انجامد. در تحقیقات انجام شده غلظت‌های مختلفی از اسیدفولیک و ریبوفلاوین در جیره غذایی قزل آلای رنگین‌کمان ارائه شده است که برخی از آن‌ها با نتایج تحقیق حاضر مغایرت دارد. تفاوت‌ها می‌تواند به‌دلیل هم اندازه نبودن ماهیان مورد بررسی و یا اثر سینرژیست ویتامین‌هایی باشد که هم‌زمان با اسیدفولیک و یا ریبوفلاوین در این تحقیقات به‌کار رفته است مثلاً نیاسین و اسیدفولیک (Hien و Doolgindachbaporn، ۲۰۱۱) یا اسید فولیک و ویتامین C (Shafaeipour و همکاران،۲۰۱۱) که می‌توانند سبب کاهش نیاز به این ویتامین‌ها و در نتیجه سایر ویتامین‌ها در جیره غذایی شوند. براساس نتایج به‌دست آمده در این تحقیق میزان ریبوفلاوین و اسیدفولیک در جیره غذایی بر اغلب فاکتورهای خونی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مؤثر می‌باشند. به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان گلبول قرمز، گلبول سفید، هموگلوبین و درصد هماتوکریت در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسید فولیک و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ریبوفلاوین مشاهده شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (P<۰/۰۵). درصد مونوسیت و ائوزینوفیل در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی نسبت‌های مختلف ریبوفلاوین و اسیدفولیک بدون تفاوت آماری معنی‌دار بود. از نظر غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد اما از نظر حجم متوسط گلبول قرمز و غلظت متوسط هموگلوبین گلبولی بین گروه شاهد و تیمارها و تیمارها با یکدیگر اختلاف معنی‌دار وجود داشت. در ارزیابی اثرات ویتامین E و ریبوفلاوین و ترکیب آن‌ها بر روی پارامترهای خون‌شناسی ماهی کپور معمولی انگشت‌قد Sharifzadeh و Khara (۲۰۱۵) بیان داشتند تعداد گلبول‌های قرمز خون، مقدار هموگلوبین و درصد هماتوکریت در رژیم غذایی حاوی ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E و ۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین B2 و تعداد گلبول‌های سفید خون در رژیم غذایی حاوی ۱۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E بیش‌تر از سایر تیمارهای آزمایشی بود و تفاوت معنی‌داری از نظر غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز بین تیمارها مشاهده نشد. لیزیوزیم و CH50 شاخص‌های مهم سیستم ایمنی غیراختصاصی در ماهی هستند. در این بین لیزوزیم یکی از ترکیبات مهم در سیستم ایمنی دفاعی بدن در مهره‌داران و نرم‌تنان می‌باشد. امروزه مشخص شده است که عملکرد سیستم ایمنی غیراختصاصی در برابر بروز انگل‌ها، باکتری‌ها و عفونت‌های ویروسی افزایش می‌یابد (Posten و همکاران، ۱۹۷۶). در مطالعه حاضر بیش‌ترین میزان لیزوزیم و CH50 در تیمار ۶ میلی‌گرم اسیدفولیک مشاهده شد و بین گروه شاهد و تیمارها و تیمارها با یکدیگر اختلاف معنی‌دار وجود داشت. در ارزیابی تأثیر ویتامین‌های توکوفرول (E) و ریبوفلاوین (B2) بر فاکتورهای خونی و ایمنی بچه‌ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) توسط عاشوری و همکاران (۱۳۹۳)، بیش‌ترین میزان CH50 در جیره غذایی حاوی ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ریبوفلاوین مشاهده شد. بیش‌ترین و کم‌ترین میزان IgM در تیمار ۱۰ میلی‌گرم اسیدفولیک و گروه شاهد مشاهده شد. در ارزیابی اثرات ویتامین E و ریبوفلاوین و ترکیب آن‌ها را بر روی پارامترهای خون‌شناسی ماهی کپورمعمولی انگشت‌قد، Sharifzadeh و Khara (۲۰۱۵) بیان داشتند غلظت IgM در گروه شاهد کم‌تر از سایر تیمارهای آزمایشی می‌باشد که هم‌سو با نتایج مطالعه حاضر است. در این تحقیق، بیش‌ترین میزان ایمونوگلوبولین کل در تیمار ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسیدفولیک+۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ریبو فلاوین مشاهده شد و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). در ارزیابی تأثیر ویتامین‌های توکوفرول (E) و ریبوفلاوین (B2) بر فاکتورهای خونی و ایمنی بچه‌ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) توسط عاشوری و همکاران (۱۳۹۳)، بیش‌ترین میزان ایمونوگلوبولین کل در جیره غذایی حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E و در میان جیره‌های ترکیبی در رژیم غذایی حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین B2 مشاهده شد و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشتند. هرچند ترکیب‌ها هیچ‌گونه تأثیر مشترکی بر تولید ایمونوگلوبولین‌ها، غلظت IgM، فعالیت لیزوزیم و CH50 سرم خون نداشتند اما تیمار ۶ میلی‌گرم اسیدفولیک بالاترین سطوح لیزوزیم و CH50، تیمار ترکیبی ۶ میلی‌گرم اسیدفولیک و ۳۰ میلی‌گرم ریبوفلاوین بالاترین سطح ایمونوگلوبولین کل و تیمار ۲۰ میلی‌گرم ریبوفلاوین بالاترین سطح IgM را نشان دادند.

با توجه به یافته‌های تحقیق حاضر می‌توان گفت افزودن ترکیب ۲۰ میلی‌گرم ریبوفلاوین و ۱۰ میلی‌گرم اسیدفولیک به جیره غذایی سبب بهبود شاخص‌های رشد شامل: افزایش وزن بدن، ضریب رشد ویژه و ضریب رشد و شاخص‌های خونی شامل: تعداد سلول‌های قرمز و سفید خون، مقدار هموگلوبین و درصد هماتوکریت شده و با توجه به این‌که از نظر میزان بازماندگی تفاوت معنی‌داری در بین تیمارهای مختلف وجود نداشت و نرخ رشد و افزایش وزن بدن بیش‌تر مورد توجه پرورش‌دهندگان ماهیان هستند، بهترین فرمول پیشنهادی برای تغذیه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت‌قد، ترکیبی از ۲۰ میلی‌گرم ریبوفلاوین و ۱۰ میلی‌گرم اسیدفولیک در هر کیلوگرم از غذای خشک است که با توجه به مقدار مصرف اندک ویتامین‌ها استفاده از این فرمول در کارگاه‌های پرورش ماهیان سردآبی مقرون به‌صرفه بوده و دارای توجیه اقتصادی می‌باشد. هم‌چنین توصیه می‌گردد این ترکیب به جیره غذایی تجاری ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان اضافه گردد.

## منابع


۱. **سقا، ح.ر.، ۱۳۸۲.** کتاب جامع تجهیزات آزمایشگاهی و فرآورده‌های تشخیصی. انتشارات کتاب میر. ۱۲۴۶ صفحه.

۲. **صیادبورانی، م.؛ خارا، ح.؛ صیادبورانی، م. و فخارزاده، م.ا.، ۱۳۹۳.** تأثیر سطوح مختلف ویتامین C و ویتامین E در جیره را بر پارامترهای رشد و سیستم ایمنی ماهی آزاد دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران. سال ۲۳، شماره ۴، صفحات ۸۵ تا ۹۶.

۳. **عاشوری، ع.ر.؛ خارا، ح.؛ یزدانی‌ساداتی، م.ع. و کاظمی، ر.، ۱۳۹۳.** بررسی تأثیر ویتامین ای توکوفرول (E) و ریبوفلاوین (B2) بر فاکتورهای خونی و ایمنی بچه‌ماهی شیپ. مجله فیزیولوژی و تکوین جانوری. جلد ۸، شماره ۱، صفحات ۱۷ تا ۲۲.

۴. **عامری‌مهابادی، م.، ۱۳۷۸.** روش‌های آزمایشگاهی هماتولوژی دامپزشکی. انتشارات دانشگاه تهران. ۱۲۶ صفحه.

۵. **مجابی، ع. و حیدرنژاد، ا.، ۱۳۸۲.** خون شناسی دامپزشکی و روش‌های آزمایشگاهی. انتشارات سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی. ۲۱۴ صفحه.

۶. **Cowey, C.B. and Roberts, R.J., 1978**. Nutritional pathology of teleosts. Fish Pathology. Bailliere Tindall, London. In Roberts, R.J., (ed.) 318 P.

۷. **Cowey, C.B. and Woodward, B., 1993**. The Dietary Requirement of Young Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss)* for Folic Acid. Journal of Nutration. Vol. 123, pp: 1594-1600.

۸. **Fang Deng, D. and Wilson, R., 2003.** Dietary riboflavin requirement of juvenile Sunshine bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). Aquaculture. Vol. 218, pp: 695-701.

۹. **Halver, J.E. and Hardy, R., 2002**. Fish Nutrition. Third Edition. 839 p.

۱۰. **Harper, H.A.; Rodwell, V.W. and Mayes, P.A., 1979.** Review of physiological chemistry. 17th Edition. Lange Medical Publications, Los Altos, USA.

۱۱. **Hien, D.V. and Doolgindachbaporn, S., 2011**. Effect of Niacin and Folic Acid in Feed Rations on Growth and Live Weights of Green Catfish (*Mystus nemurus Valenciennes)*. Pakistan Journal of Biological Sciences. Vol. 14, pp: 64-68.

۱۲. **Hughes, S.G., 1984.** Effect of excess dietary Ribofelavin on growth of Rainbow trout. Journal of Nutrition. Vol. 14, pp: 1160-1663.

۱۳. **Hughes, S.G.; Rumsey, G.L. and Nickum, H.G., 1981**. Riboflavin Requirement of Fingerling Rainbow Trout. Journal of American Fisheries Society. Vol. 43, pp: 167-172.

۱۴. **Jaafar, R.M.; Skov, J.; Kania, P.V. and Buchmann, K., 2011.** Dose Dependent Effects of Dietary Immunostimulants on Rainbow Trout Immune Parameters and Susceptibility to the Parasite *Ichthyophthirius Multifiliis.* Journal of Aquaculture research and development. Vol. 3, pp: 1-8.

۱۵. **Jane, H. and Drake, V.J., 2009**. Riboflavin. Micronutrient Information Center. Linus Pauling Institute at Oregon State University.

۱۶. **Esmaeili, B. and Khara, H., 2014.** Growth performance, hematology and immunological parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed with diets containing different levels of vitamin E and folic acid. Iranian Journal of Fisheries Sciences. Vol. 13, No. 4, pp: 931-943

۱۷. **Khoshbavar-Rostami, H.A.; Soltani, M.; Kazemi, B. and Hassan, M.D., 2006b**. Purification and partial characterization of serum immunoglobulins from Caspian Sea sturgeons. Bulletin European Association Fish Pathology. Vol. 26, pp: 58-62.

۱۸. **Klontz, G.W., 1994.** Fish hematology. In: Techniques in fish immunology. Stolen, J.S.; Fletcher, T.C.; Rowley, A.F.; Kelikoff, T.C.; Kaatari, S.L. and Smith, S.A. (eds). Vol. 3. SOS Publications, Fair Hven, New Jersey, USA. pp:121-132.

۱۹. **Leenhouwers, J.I.; Ter, V.M.; Verreth, J.A.J. and Schrama, J.W., 2007**. Digesta characteristics and performance of African catfish *(Clarias gariepinus)* fed cereal grains that differ in viscosity. Aquaculture. Vol. 264, pp: 330-341.

۲۰. **McLaren, B.A.; Keller, E.; O'Donnell, D.J. and Elvehjem, C.A., 1947.** The nutrition of rainbow trout. I. Studies of vitamin requirements. Archive of Biochemistry. Vol. 15, pp: 169-178.

۲۱. **Migliorini, P.; Chieregatti, G.; Trovatello, G.; Canarella, S.; Daniela, F. and Celada, F., 1985**. The serum capacity to solubilize immune complexes (ICSC) measured by an enzyme-anti-enzyme complex probe. Journal of Immunological Methods. Vol. 77, pp: 119-130.

۲۲. **Mohseni, M.; Poukazemi, M.; Bahmani, M.; Falahatkar, B.; Pourali, H.R. and Salehpour, M., 2006.** Effects of feeing rate and frequency on growth performance of yearling great sturgeon, *Huso huso*. Journal of Applied Ichthyology. Vol. 22, pp: 278-282.

۲۳. **NRC (National Research Council). 2011**. Nutrient requirements of fish and shrimp, Washington, DC, USA, National Academic Press, Washington. DC. 376 P.

۲۴. **Posten, F.L.; Pedigo, R.B. and Hammond, R.B., 1976.** Effects of artificial and insect defoliation on soybean net photosynthesis Journal of Economic Entomology. Vol. 69, pp: 109-112.

۲۵. **Powers, H.J., 2003**. Riboflavin (vitamin B-2) and health. American Journal of Clinical Nutrition. Vol. 77, No. 6, pp: 1352-1360.

۲۶. **Shafaeipour, A.; Gorjipour, E.; Kamayi, K. and Falahatkar, B., 2011**. Effects of Different Levels of Folic Acid and Vitamin C on Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of the World Aquaculture Society. Vol. 42, pp: 281- 286.

۲۷. **Sharifzadeh, S.A.; Khara, H. and Ghobadi, Sh., 2015.** Effects of vitamins E and Riboflavin (B2) and combinations of them on the hematological parameters of common carp, *Cyprinus carpio* L., fingerlings. Archives of Polish Fisheries. Vol. 23, pp: 107-111.

۲۸. **Simmons, A., 1997.** Hematology, Simmons, Butterworth-Heinemann, 507 p.

۲۹. **Vazquez, G.R. and Guerrero G.A., 2007**. Characterization of blood cells and hematological parametersin *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Journal of Tissue and Cell. Vol. 39, pp: 151-160.

۳۰. **Woodward, B., 1982.** Riboflavin Supplementation of Diets for Rainbow Trout. Journal of Nutrition. Vol. 112, No. 5, pp: 908-913.

۳۱. **Takahashi, M.; Takahashi, S.; Brade, V. and Nussenzweig, V., 1978.** Requirements for the solubilization of immune aggregates by complement. The role of the classical pathway. Journal of Clinical Investigation. Vol. 62, 349 p.