غنی سازی ویتامین C در تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و تاثیر آن بر بازمانی در استرس شوری

- **محمود حافظیه*:** موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ٦١١٦-١٤١٥٥
- **مرتضی علیزاده:** مرکز تحقیقات شیلاتی آبهای شور داخلی، یزد صندوق پستی: ۱۱۲۳-۸۹۷۱۵
- **تورج ولی نسب:** موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ٦١١٦-١٤١٥٥

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۸۹

چکیده

در این تحقیق، اثر آرتمیای غنی شده با امولسیون حاوی مقادیر مختلف ویتامین C بر میزان تجمع این ویتامین در ناپلیوس آرتمیا و لارو تاسماهی ایرانی تغذیه شده با آرتمیا و میزان بازمانی لارو ماهی تحت استرس شوری در ٦ گروه مختلف تیمار غذایی (۵ تیمار و یک شاهد) هر یک با ۳ تکرار طی ۱۵ روز دوره آزمایش مورد بررسی قرار گرفت. ناپلیوس آرتمیا تحت شرایط استاندارد تفریخ و سپس با امولسیون لستین و درصدهای مختلف ویتامین C به شکل آسکوربیل پالمیتات (۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد) طی دو زمان ۱۲ و ۲٤ ساعت غنی سازی شدند و طی مدت آزمایش مورد تغذیه لارو تاسماهی ایرانی که در تانک‌هایی با حجم آبگیری ۲۵ لیتر و با وزن اولیه ٤/۳ میلی‌گرم وزن خشک پرورش داده شده بودند، قرار گرفتند. در پایان دوره تعدادی از لارو ماهی‌های تیماری به مدت ۷۲ ساعت در معرض شوری‌های ٦، ۱۲ و ۱۸ گرم در لیتر که با رقیق و غلیظ‌سازی آب دریای خزر بدست آمد، قرار گرفته و در ساعات ۱، ۲، ٤، ۸، ۲٤، ۳٦ و پایان دوره نسبت به شمارش مرگ و میر در آنها اقدام شد. نتایج آنالیز ویتامین C در ناپلیوس آرتمیا و تاسماهی ایرانی نشان داد که میزان تجمع ویتامین C در گروه‌های تیماری اختلاف معنی‌داری با هم دارند ($P<0.05$). نتایج آنالیز ویتامین C با HPLC لارو تاسماهی ایرانی نشان داد این ماهی در محدوده زمانی مورد مطالعه ۱۵ روز و دامنه دمای ۲۲-۲۰ درجه سانتیگراد روزانه ۲ میکروگرم در گرم وزن خشک بدن اسید اسکوربیک می‌سازد. لاشه ٦۹ میلی‌گرم وزن خشک ماهی دارای ٤۱/۲ میکروگرم به ازای هر گرم وزن خشک بدن، ویتامین C دارد. حال آنکه بلافاصله در شروع آزمایش این ماهی ۱۱ میکروگرم بر گرم وزن خشک بدن ویتامین C داشته است. ناپلیوس آرتمیا به فاصله ٢٤ ساعت بدون غنی سازی افت محتوایی ویتامین C را نشان داد بطوریکه از ۳۱۲ به حدود ۲۹٤ میکروگرم بر گرم وزن خشک کاهش داشت. روند افزایش محتوایی ویتامین C در ناپلیوس آرتمیا و لارو تاسماهی ایرانی با روند افزایش درصد غنی سازی ویتامین C در زمان ۱۲ ساعت و ٢٤ ساعت نوسان نشان داد بطوریکه از ۱۰ تا ۲۰ درصد غنی‌سازی تجمع این ویتامین در آرتمیا و ماهی افزایش یافت و از ۲۰ تا ۳۰ درصد شاهد کمی کاهش در میزان این ویتامین در آرتمیا و ماهی هستیم ولی روند افزایش محتوایی ویتامین C در هر دو موجود با افزایش زمان غنی سازی، افزایش معنی‌داری را نشان داد. مرگ و میر در لارو ماهی گروه شاهد طی شوری ٦ گرم در لیتر از ۳٦ ساعت در معرض قرارگیری شروع (بازمانی ۷۵ درصد) و تا ۷۲ ساعت افزایش نشان داد (بازمانی ۲۵ درصد) در حالی که در کلیه لاروهای تیماری بازماندگی حداقل ۹۰ و حداکثر ۱۰۰ درصد بدون اختلاف معنی‌دار آماری ($P<0.05$) بدست آمد. بعنوان نتیجه‌گیری کلی افزودن ویتامین C به غذای زنده لارو تاسماهی ایرانی می‌تواند در رهاسازی مستقیم آن به دریا مفید باشد و در این مسیر از تلفات ناشی از رهاسازی در رودخانه‌ها جلوگیری نمود ضمن آنکه باعث افزایش زنده‌مانی لارو گردید.

لغات کلیدی: ویتامین C، قره برون، آرتمیا ارومیانا، غنی سازی و استرس شوری

*پست الکترونیکی نویسنده مسئول: jhafezieh@yahoo.com

مقدمه

تحقیقات بسیاری پیرامون مکانیسم بیوسنتز اسید اسکوربیک (ویتامین C) در ماهیان انجام شده است. مطالعه تنظیم بیوسنتز اسید اسکوربیک در ماهیان می‌تواند در درک فرآیند تغذیه و همچنین پرورش آنها و احتمالاً در تعیین نیاز این جانوران به ویتامین C در ارتباط با شرایط فیزیولوژیک مانند تولید مثل، سیستم ایمنی و استرس موثر باشد. ویتامین C مولکولی ضروری در سلامت عمومی جانوران از قبیل رشد (۱۲)، تشکیل استخوان (۷) و تولید مثل (۱۳) است.

تامین اسید اسکوربیک بصورت داخلی (بیوسنتز) یا خارجی (جیره غذایی) به حفظ و ذخیره‌سازی اسید اسکوربیک بدن کمک می‌کند. بسیاری از مهره‌داران قادر به سنتز این ویتامین هستند اما برخی فاقد این توانایی‌اند و به همین دلیل به منابع خارجی آن نیازمندند. با این وجود حتی در آبزیانی که قادر به سنتز این ویتامین هستند، بدلیل میزان نیازمندی بیش از میزان سنتز شده، این ویتامین باید بصورت مکمل در جیره غذایی اضافه گردد. ویتامین C، ناپایدارترین ویتامین محلول در آب بوده که به راحتی از دسترس خارج می‌گردد. به منظور غنی‌سازی پایدار این ویتامین از آسکوربیل پالمیتات استفاده می‌شود. آسکوربیل پالمیتات خاصیت پایداری، چربی دوست بودن و همچنین قابلیت ورود به امولسیون‌های روغنی دارد و به سرعت به اسید اسکوربیک تبدیل می‌شود (۱۷).

در شرایط پرورشی، اغلب موجودات در اثر عواملی مانند حمل و نقل، تراکم و کاهش کیفیت آب در معرض استرس قرار می‌گیرند. پس کاهش استرس با استفاده از راهکارهای مختلف از جمله مواد غذایی مثل ویتامین‌ها می‌تواند بعنوان یکی از راهکارهای بنیادی مطرح باشد. Henriqueet و همکاران (۱۹۹۸) واکنش هیپوکسی در ماهی سیم دریایی *Sparus aourata* تغذیه شده با مکمل ویتامین C را مورد بررسی قرار داد و نشان دادند که میزان مقاومت در آن افزایش یافت. از مقاومت در برابر شوری برای بررسی تاثیر مکمل‌های تغذیه‌ای از جمله ویتامین C روی لارو ماهیان استفاده‌های متعددی شده است (۵ و ۹). Li و همکاران (۱۹۹۸) از استرس تراکم در گربه ماهی *Ictalurus punctatus* تغذیه شده با ویتامین C استفاده کردند ضمن آنکه این ماهی را در معرض باکتری *Edwardiella ictaluri* قرار داده و تاثیر ویتامین C را در افزایش مقاومت این ماهی بررسی نمودند. برخی از عوامل استرس‌زا مانند افزایش دما، شوری و شرایط کمبود اکسیژن محلول برای بررسی تاثیر فسفولیپیدها مورد استفاده قرار گرفته است (۲۴). همچنین رفتار گروهی (Schooling behavior) به منظور بررسی تاثیر ویتامین C در ماهی Ayu (۱۰) و ماهی دم زرد (*Seriola quinquerdiata*) (۲۱) مورد استفاده قرار گرفته است.

در این تحقیق سعی شده است تا ضمن برآورد میزان سنتز ویتامین C در لارو تاسماهی ایرانی بعنوان یکی از مهمترین ماهیان دریای خزر، به میزان تجمع آن در لارو این ماهی که از آرتمیا ارومیانا غنی شده با این ویتامین تغذیه نموده و همچنین تاثیر این غنی‌سازی در تحمل شرایط استرس شوری با نمود درصد بازماندگی دست یافت.

مواد و روشها

غنی‌سازی براساس روش کار ارائه شده توسط Merchie (۱۹۹۶) و همچنین پروتکل غنی‌سازی آرتمیا توسط Agh و Sorgeloos (۲۰۰۵) انجام گرفت بدین صورت که آرتمیا با روغن کبد ماهی کاد و مقادیر ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد آسکوربیل پالمیتات طی دو بار تا ساعت ۱۲ و ساعت ۲۴ غنی‌سازی شد و سپس بسته به شرایط غذایی لارو تاسماهی چهار وعده در روز به تیمارهای مختلف لارو ماهی خاویاری ایرانی داده شد.

برای تهیه محلول‌های غنی‌سازی ابتدا به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب معمولی (دمای آب حدود ۴۰ درجه سانتیگراد) مقدار یک گرم لیستین (شرکت مرک آلمان) اضافه می‌گردید و برای حل شدن کامل لیسیتین در آب از همزن برقی استفاده شد. در مرحله بعدی مقدار ۱۰ میلی‌لیتر روغن کبد ماهی کاد شرکت Seven seas انگلستان به محلول اضافه گردید و با استفاده از همزن برقی ۳-۲ بار و هر بار به مدت ۳-۲ دقیقه بهم زده شد تا روغن کاملا" بصورت قطرات بسیار ریز درآید بدین منظور مقدار کمی از امولسیون را روی لام تمیز قرار داده و با استفاده میکروسکوپ اندازه قطرات چربی تشکیل شده بررسی گردید تا زمانی که اندازه گلبولها (قطرات) چربی کمتر از ۱۰ میکرون بدست آید. در مرحله بعدی مقدار یک گرم آسکوربیل پالمیتات (برای رسیدن به محلول غنی‌سازی حاوی درصد ویتامین C)، ۲ گرم آسکوربیل

پالمیتات (۲۰ درصد ویتامین C) برای تیمار ۲ و ۳ گرم آسکوربیل پالمیتات (۳۰ درصد) برای تیمار ۳ به امولسیون فوق اضافه و با همزن برقی، چندین بار بطور تناوبی بهم زده شد تا آسکوربیل پالمیتات بطور کامل حل شود. امولسیون‌های نهایی به ارلن مایر تمیز استریل شده منتقل و سپس درب ارلن مایر محکم بسته و تا زمان استفاده درون یخچال نگهداری گردید بطوریکه محلول غنی‌سازی تا ۲۴ ساعت قابل استفاده بود (۲۲).

برای انجام غنی‌سازی، ناپلی‌های آرتمیا با تراکم ۲۰۰ هزار ناپلی در لیتر وارد ظروف غنی‌سازی حاوی آب فیلتر شده با شوری ۳۷ گرم در لیتر، دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و pH حدود ۸ گردید و در طول زمان غنی‌سازی هوادهی انجام شد. به ازای هر ۲۰۰ هزار ناپلی آرتمیا مقدار ۲ میلی‌لیتر از محلول غنی‌سازی در زمان صفر (بلافاصله پس از انتقال ناپلی‌ها به ظروف غنی‌سازی تیمار ۱۲ ساعته) و همان مقدار محلول غنی‌سازی دقیقا" ۱۲ ساعت پس از شروع غنی‌سازی (تیمار ۲۴ ساعته) اضافه گردید. قابل ذکر است که برای تهیه محلول غنی‌سازی با روغن کبد ماهی کاد (بدون ویتامین C)، روش کار به همان ترتیبی که در بالا توضیح داده شد بدون اضافه کردن ویتامین C انجام گردید (۱۶). سپس آرتمیای غنی شده به لارو تاسماهی ایرانی (با وزن اولیه خشک ۴/۳ میلی‌گرم و در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد) انتقالی از مرکز تکثیر شهید بهشتی رشت به سالن پرورش مرکز تحقیقات آرتمیا دانشگاه ارومیه خورانده شد. عملیات تغذیه لارو ماهی از روز ۵ یعنی پس از سازش غذایی به مدت ۱۵ روز انجام و سپس ویتامین C موجود در ناپلی و لارو ماهی با روش ارائه شده در زیر آنالیز گردید.

نمونه‌ها (ماهی یا آرتمیا) ابتدا با آب به خوبی شستشو شده و سپس با کاغذ فیلتر آبگیری گردیدند سپس یک گرم از نمونه به یک لوله پلاستیکی منتقل نموده و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر استاندارد داخلی (ایزو آسکوربیک اسید) و ۲ میلی‌لیتر محلول استاندارد خارجی شامل :یک میلی مول EDTA با ۲ میلی مول هموسیتئین در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر شده بدان اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۲-۱ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد هموژنیزه و سپس محلول شفاف بالایی به یک لوله آزمایش تمییز منتقل گردید. مجددا ۲ میلی‌لیتر محلول استاندارد به آن اضافه و روش تکرار تا ۵ میلی‌لیتر ماده شفاف بدست آید. این محلول به مدت ۱۰-۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ گردید و محلول بدست آمده را از کارتریژ C-18, 5µm عبور داده کاندیشن و سپس فیلتر نمود (برای کاندیشن کردن، متانول، آب مقطر فیلتر شده و محلول استاندارد را بترتیب از آن عبور داده می‌شود). حال نمونه‌ها برای تزریق در دستگاه HPLC آماده می‌باشد. قبل از تزریق نمونه‌های اصلی به دستگاه HPLC، استانداردهای اسکوربیک اسید و ایزو اسکوربیک اسید را به دستگاه تزریق و منحنی استاندارد را رسم نموده، ۱۰۰ میلی‌لیتر از نمونه را به دستگاه تزریق کرده، شناسایی اسکوربیک اسید با توجه به زمان بارداری و محاسبه مقدار آن با توجه به مقدار استاندارد داخلی اضافه شده به نمونه‌ها انجام گرفت (۴).

به منظور اعمال تنش شوری در پایان دوره تعداد ۱۰ ماهی را در شوری‌های مختلف ۶، ۱۲ و ۱۸ گرم در لیتر که با رقیق‌سازی و غلیظ‌سازی آب دریای خزر بدست آمد، قرار داده و حداکثر زمان نگهداری ۷۲ ساعت در نظر گرفته شد. تعداد مرگ و میر نمونه‌ها در ساعات مختلف بینابینی، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت محاسبه گردید که بصورت درصد از کل بدست آمده و در جدول مورد مطالعه آماری قرار گرفت.

به منظور انجام بررسی‌های آماری، داده‌ها در excel مرتب با توجه به انجام تست نرمال بودن داده‌ها بوسیله pp plot نرم‌افزار SPSS آنالیز واریانس یک طرفه انجام و در صورت وجود اختلاف آماری، میانگین داده‌ها با آزمون دانکن مورد مقایسه قرار گرفت و در نهایت گراف آنها تهیه شد.

نتایج

نتایج انالیز لارو تاسماهی ایرانی نشان داد این ماهی در محدوده زمانی مورد مطالعه ۱۵ روز و دامنه دمای ۲۲-۲۰ درجه سانتیگراد روزانه ۲ میکروگرم در گرم وزن خشک بدن اسید آسکوربیک می‌سازد. نتایج آنالیز ویتامین C (جدول ۱) با HPLC در لاشه ۶۹۱ میلی‌گرمی وزن تر لارو این ماهی که معادل ۶۹ میلی‌گرم وزن خشک دارد نشان داد که ۴۱/۲ میکروگرم به ازای هر گرم وزن خشک بدن ویتامین C وجود دارد حال آنکه بلافاصله در شروع آزمایش این ماهی ۱۱ میکرو گرم بر گرم وزن خشک بدن ویتامین C داشته است.

ناپلیوس آرتمیا به فاصله ۲۴ ساعت بدون غنی‌سازی افت محتوایی ویتامین C را نشان داد بطوریکه از ۳۱۲ به حدود ۲۹۴ میکروگرم بر گرم وزن خشک کاهش داشت. روند افزایش محتوایی

ویتامین C در ناپلیوس آرتمیا و لارو تاسماهی ایرانی با روند افزایش درصد غنی‌سازی ویتامین C نوسان نشان داد بطوریکه از ۱۰ تا ۲۰ درصد غنی‌سازی ویتامین C در زمانهای ۱۲ ساعت و ۲۴ ساعت باعث افزایش ابن ویتامین در آرتمیا و ماهی شد. از ۲۰ تا ۳۰ درصد در زمانهای ۱۲ ساعت و ۲۴ ساعت در میزان این ویتامین در آرتمیا و ماهی کمی کاهش نشان داد درصد بازماندگی لارو ماهی بعد از زمانهای اعمال شده در شوری‌های مختلف در جدول ۱ آورده شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود آنالیز واریانس کلیه تیمارها با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را از حیث درصد بازماندگی در شوری‌های مختلف و ساعات مختلف نشان می‌دهند ($P<0.05$). لارو ماهی گروه کنترل بعد از ۳۶ ساعت در معرض شوری ۱۲ گرم در لیتر در کل از بین رفتند. تیمارهای آزمایشی در ۶ گرم در لیتر اختلاف آماری با هم نشان ندادند ولی در شوری ۱۲ گرم در لیتر با افزایش غلظت ویتامین C و افزایش زمان غنی‌سازی اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد را در درصد بازماندگی نشان داد. در شوری ۱۸ گرم در لیتر قبل از ۱۲ ساعت در معرض بودن، کلیه لاروهای کنترل و تیماری از بین رفتند.

بحث

آرتمیا ارومیانا از نظر میزان ویتامین C تامین کننده نیاز آبزیان مصرف کننده از آن نمی‌باشد و فرآیند غنی‌سازی بهتر است روی ناپلیوس آرتمیا ارومیانا انجام گیرد. روش غنی‌سازی استفاده شده در این تحقیق توانست به میزان قابل توجهی تجمع ویتامین C را در پیکره ناپلی آرتمیا ارومیانا بالا برده و نتایج تغذیه‌ای آن توسط لارو تاسماهی ایرانی نیز مبین افزایش تراکم این ویتامین در پیکره لاروها گردیده است که با نتایج محققین دیگر مانند Sorgeloos و همکاران (۲۰۰۱) همخوانی دارد. میزان ۲۰ درصد و زمان ۲۴ ساعت باعث افزایش معنی‌دار این ویتامین نه تنها در ناپلیوس آرتمیا بلکه در لارو تاسماهی گردید. اویسی‌پور (۱۳۸۵) نشان داد ۲۰ درصد ویتامین C در زمان ۶ ساعت غنی‌سازی دافنی بعنوان غذای زنده بهترین نتیجه را در لارو تاسماهی از بعد تجمع در بافت، رشد و بازماندگی از خود بجای گذاشت. شاید اختلاف زمان ۶ ساعت تا ۲۴ ساعت که بهترین زمان غنی‌سازی در این مطالعه بدست آمد، بدلیل اختلاف شرایط زیستی دافنی با ناپلیوس آرتمیا است. نتایج افزایش محتوای ویتامین C در ناپلی آرتمیا و لارو تاسماهی بعنوان یک ماهی هدف با نتایج مطالعات سایر محققین مشابهت نشان می‌دهد (۱۴، ۱۵، ۱۶ و ۱۷).

مشکینی (۱۳۸۲) افزایش معنی‌دار اسکوربیک اسید را در آرتمیا ارومیانا مترادف با افزایش میزان آسکوربیل پالمیتات در ماده غنی‌ساز گزارش نمود بطوریکه میزان AA بعد از ۱۲ ساعت غنی‌سازی در ناپلی آرتمیا و آرتمیا غنی شده با صفر، ۱۰ و ۲۰ درصد AP بترتیب ۹۰۰، ۲۱۰۰، ۲۸۰۰ و ۳۹۰۰ میکروگرم به ازای هر گرم وزن خشک تعیین نمود. بنابراین می‌توان گفت اگرچه آرتمیا ارومیانا از نظر میزان ویتامین C نسبتا فقیر است ولی با فرآیند غنی‌سازی می‌توان نسبت آن را بسیار بالا برد و بطور غیرمستقیم آن را به تغذیه ماهی رساند. بهترین زمان غنی‌سازی با ویتامین C در ناپلیوس آرتمیا ۲۴ ساعت و بهترین غلظت ۲۰ درصد در این مطالعه بدست آمد هر چند که اختلاف معنی‌داری با ۳۰ درصد و ۲۴ ساعت نشان نداد ولی با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌دار بود Smith و همکاران (۲۰۰۴) زمان ۶ ساعت را برای غنی‌سازی آرتمیا فرنسیسکانا مطرح می‌نماید که این موضوع می‌تواند بدلیل تفاوت‌های ریختی گونه‌ای آرتمیا ارومیانا با فرانسیسکانا از بعد میزان کشیدگی بدن و بلند بودن لوله گوارش باشد.

افزایش میزان آسکوربیک اسید در لارو قره‌برون متعاقب افزایش این ویتامین در ناپلی آرتمیا با نتایج توانایی بالای تاسماهی در ذخیره‌سازی این اسید که توسط Papp و همکاران (۱۹۹۷) ارائه گردید، مشابهت نشان می‌دهد.

جدول ۱ : میزان ویتامین C (میکروگرم بر گرم وزن خشک بدن) ناپلی آرتمیا و لارو ماهی قره‌برون غنی‌سازی شده و درصد بازماندگی لارو در شوری‌های مختلف

تیمار	شرح	ویتامین C در ناپلی آرتمیا	ویتامین C در لارو قره‌برون	درصد بازماندگی لارو در شوری‌های مختلف (گرم در لیتر)						
				٦			١٢			١٨
				٣٦	٤٨	٧٢	٢٤	٣٦	٤٨	١٢
ناپلیوس آرتمیا		٣١٢	---	–	–	–	–	–	–	---
لارو تاسماهی قبل از غنی‌سازی با وزن خشک اولیه میلی‌گرم		٤/٣	---	–	–	–	–	–	–	---
	ناپلی غنی نشده آرتمیا	٢٩٤/٣^{a}	----	–	–	–	–	–	–	---
T0	لارو ماهی غنی نشده بعد از ١٥ روز	----	٤١/٢^{a}	٧٥^{a}	٥٠^{a}	٤٣^{a}	١٣^{a}	٠^{a}	٠^{a}	٠
T1	تیمار ١٠ درصد ویتامین C– ١٢ ساعت غنی‌سازی	٣٦٧^{a}	٤٣/٣^{a}	١٠٠^{b}	١٠٠^{b}	١٠٠^{b}	٩٠^{b}	٩٠^{b}	٩٠^{b}	٠
T2	تیمار ٢٠ درصد ویتامین C– ١٢ ساعت غنی‌سازی	٦٠١/٨^{b}	٨٢/٧^{c}	١٠٠	١٠٠	١٠٠	٩٥^{c}	٩٣^{b}	٩٢^{b}	٠
T3	تیمار ٣٠ درصد ویتامین C– ١٢ ساعت غنی‌سازی	٥٢٩/٣^{b}	٧٦/٣^{bc}	١٠٠	١٠٠	١٠٠	٩٨^{c}	٩٦^{c}	٩٦^{c}	٠
T4	تیمار ١٠ درصد ویتامین C– ٢٤ ساعت غنی‌سازی	٥٧١/٧^{b}	٤٥/٥^{a}	١٠٠	١٠٠	١٠٠	٩٦^{c}	٩٦^{c}	٩٦^{c}	٠
T5	تیمار ٢٠ درصد ویتامین C– ٢٤ ساعت غنی‌سازی	٨٦٧/٧^{cd}	٨٥/٣^{c}	١٠٠	١٠٠	١٠٠	٩٨^{c}	٩٨^{c}	٩٧^{c}	٠
T6	تیمار ٣٠ درصد ویتامین C– ٢٤ ساعت غنی‌سازی	٨٠٥/٤^{c}	٧٥/٥^{bc}	١٠٠	١٠٠	١٠٠	٩٩^{c}	٩٨^{c}	٩٨^{c}	٠
	١٠ درصد ویتامین C	٤٦٩^{a}	٤٤^{a}	١٠٠^{a}	١٠٠^{a}	١٠٠^{a}	٩٣^{a}	٩٣^{a}	٩٣^{a}	٠
	٢٠ درصد ویتامین C	٧٣٤^{b}	٨٤^{b}	١٠٠	١٠٠	١٠٠	٩٧/٥^{b}	٩٥/٥^{b}	٩٤/٥^{b}	٠
	٣٠ درصد ویتامین C	٦٦٧^{b}	٧٦^{b}	١٠٠	١٠٠	١٠٠	٩٨/٥^{b}	٩٧^{b}	٩٧^{b}	٠
	١٢ ساعت غنی‌سازی	٤٩٩^{a}	٦٧^{a}	١٠٠^{a}	١٠٠^{a}	١٠٠^{a}	٩٤^{a}	٩٣^{a}	٩٢/٥^{a}	٠
	٢٤ ساعت غنی‌سازی	٧٤٧^{b}	٦٩^{a}	١٠٠	١٠٠	١٠٠	٩٨^{b}	٩٧/٥^{b}	٩٧^{b}	٠

Merchie و همکاران (۱۹۹۵a) بعد از ۱۵ روز تغذیه گربه ماهی آفریقایی با آرتمیا غنی‌شده با مقادیر صفر، ۱۰ و ۲۰ درصد آسکوربیل پالمیتات بترتیب مقادیر ۴۵، ۵۴۰ و ۵۴۰ میکروگرم اسکوربیک اسید در هر گرم وزن خشک بدن لاروها را گزارش نمودند. در همین تحقیق، سی باس اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) بعد از ۱۲ روز تغذیه با روتیفر غنی شده با مقادیر صفر، ۱۰ و ۲۰ درصد آسکوربیل پالمیتات بترتیب مقادیر ۳۴۰، ۱۰۳۰ و ۱۲۴۰ میکروگرم از این ویتامین در هر گرم وزن تر لاروها را گزارش دادند. Merchie و همکاران (۱۹۹۶) پس از ۲۰ روز تغذیه کفشک ماهی با آرتمیای غنی شده با ویتامین C صفر، ۱۰ و ۲۰ درصد بترتیب ۸۲۰، ۱۲۵۰ و ۱۴۰۰ میکروگرم ویتامین در هر گرم وزن خشک لارو را گزارش نمودند. در تحقیق دیگری بر روی گربه ماهی آفریقایی که با آرتمیای غنی شده با ۲۰ درصد HUFA و مقادیر صفر، ۲۰ درصد اسکوربیل پالمیتات تغذیه شده بودند بترتیب ۵۰۰ و ۸۲۰ میکروگرم اسکوربیک اسید در هر گرم وزن خشک بدن لاروها گزارش شد و همچنین مشخص شد که بین مقادیر اسید اسکوربیک آرتمیا با مقادیر بدست آمده در بدن لاروها همبستگی بالایی r^2= ۰/۹۶۱ وجود دارد (۱۷). مشکینی (۱۳۸۲) بیشترین میزان اسکوربیک اسید را در لاروهای قزل‌آلای رنگین کمان تغذیه شده از آرتمیای غنی شده با ۲۰ درصد آسکوربیل پالمیتات در روز ۱۱ و ۲۱ آزمایش با مقادیر ۱۲۳۵و ۱۲۲۳ میکروگرم در هر گرم وزن خشک گزارش نمود. در تحقیق حاضر غنی‌سازی با ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد ویتامین C به شکل آسکوربیل پالمیتات بترتیب ۴۶۹، ۷۳۴ و ۶۶۷ میکروگرم ویتامین C بر گرم وزن خشک آرتمیا ارومیانا و ۴۴، ۸۴ و ۷۶ میکروگرم ویتامین C بر گرم وزن خشک ماهی را تجمع نمود. لازم به ذکر است گروه بدون غنی‌سازی بعنوان گروه کنترل مورد مقایسه با گروه‌های تیماری قرار گرفته است.

براساس نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر و نتایج سایر محققین و نظر به آنکه حضور ویتامین C در جیره غذایی تاسماهیان فقط در سنین پایین دارای اثرات سودآور بیشتری می‌باشد (۱۹)، و نیز پیشنهاد فلاحتکار (۱۳۸۴) مبنی بر اهمیت وجود ویتامین C در جیره غذایی تاسماهیان در ابتدای دوره پرورشی بچه ماهیان، اهمیت انتقال ویتامین C از طریق غذای زنده به لاروهای تاسماهیان پر رنگ می‌شود. نکته بدست آمده اینکه ویتامین C بیش از حد نیاز دفع می‌شود و شاید دلیل کاهش تجمع ویتامین C در ۳۰ درصد غنی‌سازی دفع آن باشد که نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

در این تحقیق اثر آرتمیای غنی شده با آسکوربیل پالمیتات (ویتامین C محلول در چربی) در درصدهای مختلف بر مقاومت به استرس شوری لاروهای تاسماهی ایرانی با اندازه‌گیری درصد بازماندگی در ساعات مختلف در معرض بودن بررسی شد. در شوری ۶ گرم در لیتر بعنوان کرانه پایین همه تیمارهای غنی شده ۱۰۰ درصد زنده ماندند حال آنکه تیمار شاهد (لارو غنی نشده) بعد از ۷۲ ساعت تنها ۴۳ درصد بازماندگی از خود نشان دادند. در شوری ۱۲ گرم در لیتر تیمار شاهد بعد از ۲۴ ساعت همگی از بین رفتند. در شوری ۱۸ گرم در لیتر (کرانه بالا) تا چند ساعت تمام لاروهای تیماری از بین رفتند. مهمترین عملکرد پذیرفته شده برای ویتامین C، نقش آن بعنوان یک آنتی اکسیدان قوی محلول در آب است. اسید آسکوربیک بعنوان یک آنتی اکسیدان قطع کننده زنجیره (chain- breaking) می‌تواند با بدام انداختن رادیکال‌ها، سبب قطع واکنش‌های زنجیری رادیکال‌های آزاد گردد و از این طریق جلو بسیاری از مرگ و میرهای ناشی از استرس‌های محیطی یا تغذیه‌ای را بگیرد. در بدن این اسید، (بصورت یک آنیون در pH فیزیولوژیک) با دادن هیدروژن و یک الکترون به تعداد زیادی از زیست مولکول‌های اکسید شده و عناصر نادری مثل کوآنزیم‌های فلزی، بعنوان یک عامل احیاء کننده عمل کرده و در عوض خود اسید آسکوربیک اکسید می‌شود. اکسید شدن آن به شکل رادیکال آسکوربیل (محصول تک الکترونی اکسایش) یا اسید دهیدروآسکوربیک (محصول دو الکترونی اکسایش) می‌تواند مجدداً بطور طبیعی، شیمیایی- بوسیله گلوتاتیون احیا شده (GSH)- یا آنزیمی- بوسیله ردوکتاز وابسته به GSH یا NAD(P)H- باز تولید شود (۲۵). در نهایت دهیدرو اسکوربیک به ترکیباتی (۲۰) فاقد خصوصیت آنتی اکسیدانی مانند اسید ۲ و ۳-دی کتوگولونیک (2,3-diketogulonic acid) متابولیز و سپس به اکسالات (Oxalate) و تراونات (Theronate) هیدرولیز می‌شود. بررسی نتایج آزمایش استرس شوری با نتایج سایر محققین که روی میگوی آب شیرین، کفشک ماهی، باس دریایی و گربه ماهی آفریقایی مطالعه نموده‌اند همخوانی دارد (۶، ۱۴، ۱۵، ۱۷ و ۱۸).

بعنوان نتیجه‌گیری نهایی میزان سنتز ویتامین C در لارو تاسماهی ایرانی در محدوده زمانی مورد مطالعه ۱۵ روز و دامنه دمای ۲۲-۲۰ درجه سانتیگراد روزانه ۲ میکروگرم در گرم وزن خشک بدن محاسبه گردید. همچنین حضور ویتامین در جیره غذایی لاروهای تاسماهی ایرانی، اثر مثبتی بر زنده‌مانی لاروها طی در معرض قرارگیری استرس شوری تا شوری ۱۲ گرم در لیتر که معادل شوری دریای خزر می‌باشد، دارد.

شاید بتوان از این نتایج چنین پیشنهاد نمود که با غنی‌سازی لارو تاسماهی ایرانی با این ویتامین امکان رهاسازی مستقیم لاروها به دریای خزر با شوری حدود ۱۱ وجود خواهد داشت و از این نظر بسیاری از مرگ و میرهای ناشی از آلودگی رودخانه‌ها و سایر عوامل مرگ و میر رودخانه‌ای را حذف نمود.

منابع

۱-اویسی‌پور، م.ر.، ۱۳۸۵. غنی‌سازی دافنی با روغن ماهی و ویتامین C و اثر آن بر رشد، زنده‌مانی و ترکیب بدن لارو تاسماهی ایرانی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد شیلات دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس. ۱۲۴ صفحه.

۲-فلاحتکار، ب.، ۱۳۸۴. تاثیر آرتمیا ارومیانا غنی شده با ویتامین C و اسیدهای چرب غیراشباع بر رشد و بازماندگی لارو تاسماهی ایرانی. گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی. دانشگاه گیلان. ۱۳۲صفحه.

۳-مشکینی، ع.، ۱۳۸۲. تاثیر آرتمیا ارومیانا غنی شده با ویتامین C بر رشد و بازماندگی لارو ماهی قزل‌آلای رنگین کمان. گزارش نهایی پژوهشکده آرتمیا و سایر آبزیان دانشگاه ارومیه. ۹۸ صفحه.

4-Agh, N. and Sorgeloos, P., 2005. Handbook of protocols and guidelines for culture and enrichment of live food for use in larviculture. Artemia & Aquatic Animals Research Center, Urmia University, Urmia, Iran. Laboratory of Aquaculture and Artemia Reference Center, University of Ghent, Ghent, Belgium.

5-Furuita, H.; Konishi, K. and Takeuchi, T., 1999. Effect of different levels of eicosapentaenoic acid and docosahexaneoic acid in Artemia nauplii on growth, survival and salinity tolerance of larvae of the Japanese flounder *Paralichthys oliveaceus*. Aqua., 170:59-69.

6-Gapasin, R.S.J.; Bombeo, R.; Lavens, P.; Sorgeloos, P. and Nelis, H., 1998. Enrichment of live food with essential fatty acids and vitamin C: Effects on milkfish (*Chanos chanos*) larval performance. Aqua., 162:269-286.

7-Gosiewska, A.; Wilson, S.; Kwon, D. and Peterkofsky, B., 1994. Evidence for an in vitro role of insulin-like hormone growth factor-binding protein-1 and -2 as inhibitors of collagen gene expression in vitamin C- deficient and fasted guinea pigs. Arch. Biochm. Biophys., 2:301-315.

8-Henriqueet, M.M.E.; Gomes, E.F.; Gouillou 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*. Aqua., 161:415-426.

9-Kolkovski, S.; Czensky, S.; Yackey, C.; Moreau, R.; Cihla, F.; Mahan, D. and Dabrowski, K., 2000. The effect of vitamin C and E in (n-3) highly unsaturated fatty acid-enriched Artemia nauplii on growth, survival, and stress resistance of fresh water walleye *Stizostedion vitreum* larvae. Aqua. Nut., 6:199-206.

10-Koshio, S.; Sakakura, T.; Iida, Y.; Tsukamoto, K.; Kida, T. and Dabrowski, K., 1997. The effect of vitamin C intake on schooling behavior of amphidromous fish, Ayu Plecoglossus altivelis. Fish. Sci., 63:619-624.

11-Li, M.H.; Wise, DJ. and Robinson, E.H., 1998. Effect of dietary vitamin C on weight gain, tissue ascorbate concentration, stress response and disease resistance of channel catfish *Ictalurus punctatus*. J. World Aqua. Soc., 29:1-8.

12-Lim, C. and Lovell, R.T., 1978. Pathology of vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), J. Nut., 108:1137P.

13-Luck, M.R.; Jeyaseelan, I. and Scholes, R.A., 1995. Ascorbic acid and fertility. Biol. Repro., 52:262-273.

14-Merchie, G.; Lavens, P.; Radull, J.; De Nelis, H.; Leenheer, A. and Sorgeloos, P., 1995a. Evaluation of vitamin C-enriched Artemia nauplii for larvae of the giant freshwater prawn. Aqua. Int., 3:355-363.

15-Merchie, G.; Lavens, P.; Dhert, Ph.; Pector, R.; Mai Soni, A.F.; Abbs, M.; Nelis, H.; De Ollevier, F.; Leenheer, A. and Sorgeloos, P., 1995b. Live food mediated vitamin C transfer to *Dicentrarchus labrax* and *Clarias gariepinus*. J. Appl. Ichthyol., 11:336-341.

16-Merchie, G.; Lavens, P.; Storch, V.; Ubel, U.; De Nelis, H.; Leenheer, A. and Sorgeloos, P., 1996. Influence of dietary vitamin C dosage on turbot *Scophthalmus maximus* and European sea bass *Dicentrarchus labrax* nursery stages. Comp. Biochem. Physiol., 114:123-133.

17-Merchie, G.; Lavens, P. and Sorgeloos, P., 1997. Optimization of dietary vitamin C in fish and crustacean larvae: A review. Aqua., 155:165-181.

18-Moreau, R.; Dabrowski, K. and Sato, P.H., 1999a. Renal L-gulono-1,4- lactone oxidase as effected by dietary ascorbic acid in Lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*), Aqua., 180:359-367.

19-Papp, G.Z.; Saroglia, M.Z.; Jeney, G. and Terova, J.G., 1997. Effects of vitamin C on collagen status of sturgeon hybrid (*Acipenser ruthenus* L. χ *Acipenser baeri* L.). III International Symposium on Sturgeon, Piacenza, Italy, My 8-11 1997. Booklet of abstracts.

20-Niemela, K., 1987. Oxidative and non-oxidative alkali-catalysed degradation of L-ascorbic acid, J. Chrom., 399:235-249.

21-Sakakura, Y.; Koshio, S.; Iida, Y.; Tsukamoto, K.; Kida, T. and Blom, J.H., 1998. Dietary vitamin C improves the quality of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) seedings. Aqua., 161:427-436.

22-Smith, G.G.; Brown, M.R. and Ritar, A.J., 2004. Feeding juvenile Artemia enriched with ascorbic acid improves larval survival in the spiny lobster *Jasus edwardsii*. Aqua. Nut., Vol. 10, No. 2, pp.105-112.

23-Sorgeloos, P.; Dhert, Ph. and Candreva, P., 2001. Use of brine shrimp, *Artemia* spp. in marine fish larviculture. Aqua., 200:147-15.

24-Tago, A.;Yamamoto, Y.; Tashima, S. and Kanazawa, A., 1999. Effect of 1,2-di-20:5-phosphatidylcholin (PC) and 1,2-di-22:6_PC on growth and stress tolerance of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae. Aqua., 179:231-239.

25-Winkler, B.S.; Orselli, S.M. and Rex, T.S., 1994. The redox couple between glutathione and ascorbic acid: A chemical and physiological perspective, Free Radical Biology Medical. 17:333-340.