

اثر سطوح مختلف اسیدهای چرب غیراشباع بلند زنجیره و اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه در جیره غذایی بر برخی شاخص‌های ریخت‌سنجی روده پیشین لارو قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

فرزانه نوری^{۱*}، احمد ایمانی^۲، سعید حاجی‌نژاد^۳، کوروش سروی مغالو^۲

تاریخ دریافت: آذر ۹۶

تاریخ پذیرش: بهمن ۹۶

چکیده

هدف مطالعه حاضر بررسی اثر سطوح مختلف اسیدهای چرب جیره غذایی (PUFA و HUFA) بر برخی شاخص‌های ریخت‌سنجی روده پیشین لاروهای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در شروع تغذیه آغازین بود. بنابراین هشت جیره غذایی مختلف شامل جیره‌های حاوی سطوح مختلف HUFA شامل صفر، ۰/۵، ۱، ۲ درصد در سطح PUFA برابر ۲۰ درصد (آزمایش نخست) و سطوح مختلف PUFA شامل ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد در سطح HUFA معادل ۸ درصد چربی جیره غذایی (آزمایش دوم) تنظیم شد. تراکم لاروها در هر مخزن پرورشی ۱۰۰ قطعه بود و آزمایش به مدت شش هفته به طول انجامید. در پایان آزمایش، از هر تیمار شش قطعه ماهی به صورت تصادفی انتخاب و قسمت ابتدایی روده کوچک آن‌ها برای مطالعات بافت‌شناسی کلاسیک نمونه‌برداری شد. در آزمایش نخست با افزایش سطح HUFA جیره غذایی، ضخامت اپیتلیوم و ارتفاع چین‌های روده (Villi) کاهش یافت ($P < 0/05$) و سطح مناسب HUFA در این آزمایش ۰/۵ درصد تشخیص داده شد. همچنین در آزمایش دوم تنها ارتفاع چین بخش پیشین روده تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار گرفت ($P < 0/05$) و در سطح PUFA ۲۰ درصد از چربی کل جیره، ارتفاع چین ($207/3 \pm 10/3$ میکرومتر) از بیشترین میزان برخوردار بود. بنابراین توصیه می‌شود در صورت استفاده از منابع روغن گیاهی (جایگزینی منابع دریایی با منابع گیاهی) که موجب افزایش میزان PUFA جیره غذایی می‌شود، سطح اسیدهای چرب غیراشباع بلند زنجیره می‌تواند تا هشت درصد افزایش یابد تا ساختار طبیعی بافت روده حفظ شود.

واژگان کلیدی: جیره غذایی، اسیدهای چرب غیراشباع، لارو نوری، تغذیه آغازین، قزل‌آلای رنگین‌کمان.

۱- استادیار پژوهشکده آرمیا و آبی‌پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۲- استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ایران.

۳- کارشناس ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ایران.

* نویسنده مسئول: f.noori@urmia.ac.ir

مقدمه

عملکرد تغذیه‌ای آن نقش به‌سزایی دارند (NRC, 2011). به دلیل متغیر بودن کیفیت و نوع اسیدهای چرب روغن‌های مختلف مورد استفاده در ساخت خوراک آبزیان، آگاهی از نیازهای دقیق ماهیان به گروه‌های مختلف اسیدهای چرب برای تولید غذاهای تجاری مقرون به‌صرفه، ضروری تلقی می‌شود. چرا که عدم آگاهی از اطلاعات دقیق تغذیه‌ای سبب اسراف پرهزینه و آلودگی محیط زیست می‌شود (روغنی، ۱۳۸۱).

اهمیت اسیدهای چرب غیراشباع بلند زنجیره (Highly Unsaturated Fatty Acids: HUFA) در تغذیه آبزیان، به طور گسترده‌ای در سالین گذشته مورد بررسی قرار گرفته است (Watanabe and Kiron, 1999; Sargent et al., 1994). نقش‌های فیزیولوژیکی، سلولی و بیوشیمیایی این اسیدهای چرب در ماهیان و دیگر مهره‌داران مشابه است و عمدتاً در نگهداری ساختار و یکپارچگی اصلی غشاهای سلولی و عمل به عنوان پیش‌ساز هورمون‌های پاراکرائینی (Paracrine Hormones) فعال یا ایکوزانوئیدها (Eicosanoids) مهم تلقی می‌شوند (Sargent et al., 1999). برای مثال ایکوزانوئیدها

تولید موثر و بهینه گونه‌های پرورشی و حفظ سلامتی آن‌ها در گرو تامین مقدار مناسب و زیست‌فراهم مواد مغذی ضروری از طریق جیره‌های غذایی است (شیوازاد و صیداوی، ۱۳۸۵). اسیدهای چرب به عنوان اجزای ساختمانی چربی‌ها، نقش مهمی در متابولیسم آبزیان دارند. به دلیل اهمیت ویژه آن‌ها، احتیاجات غذایی اسیدهای چرب ضروری طی مراحل مختلف آنتوژنی گونه آبزی بسیار متغیر است و بنابراین تعریف دقیق آن برای یک گونه معین مستلزم تعیین احتیاجات مطلق نوع مشخص اسیدهای چرب غیراشباع (Polyunsaturated Fatty Acids: PUFA) و تعادل بهینه میان انواع PUFAها است. بیشترین میزان اسیدهای چرب غیراشباع موجود در چربی‌ها و روغن‌ها را گروه C18 تشکیل می‌دهد که مهم‌ترین آن‌ها اسید اولئیک (C18:1) با یک پیوند مضاعف، اسید لینولئیک (C18:2) با دو پیوند مضاعف و (C18:3) اسید لینو لنیک با سه پیوند مضاعف هستند (میرنظامی ضیابری، ۱۳۷۴). بنابراین نوع و ترکیب اسیدهای چرب در استفاده از آن‌ها برای تامین مواد ساختاری و همچنین تدارک منابع انرژی مورد نیاز آبزی و سرانجام

خود کاملاً تحت تاثیر عوامل تغذیه‌ای قرار دارد (Wold et al., 2007). افزودن ترکیباتی چون فسفولیپیدها موجب بهبود توانایی سلول‌های روده در جذب و انتقال مواد مغذی به ویژه چربی‌ها می‌شود که در این میان اسیدهای چرب ضروری ۳-n موجود در ساختار فسفولیپیدها موجب تسریع بلوغ دستگاه گوارش می‌شوند (Tocher et al., 2008).

روده طولانی‌ترین بخش دستگاه گوارش بوده، از نظر بافت‌شناسی از لایه‌های مختلف با کارکردهای اختصاصی تشکیل شده است. لایه مخاطی داخلی‌ترین لایه دستگاه گوارش است. لایه زیرمخاط که زیر لایه مخاطی قرار دارد، از جنس بافت همبند است. بعد از آن لایه ماهیچه‌ای قرار گرفته است که متشکل از دو لایه ماهیچه حلقوی داخلی و طولی خارجی است و وظیفه حرکت دادن و مخلوط کردن مواد غذایی را به عهده دارد (Banan Khojasteh et al., 2009). بخش قدامی-میانی روده مکان اصلی جذب چربی است (Olsen et al., 2000)، در حالی که جذب پروتئین در ناحیه خلفی روده صورت می‌گیرد (Deplano et al., 1991).

با توجه به اهمیت دستگاه گوارش به عنوان تنها اندام دخیل در گوارش و جذب مواد مغذی

نقش‌های فیزیولوژیکی گوناگونی همانند تنظیم یونی و تخم‌ریزی در ماهیان بر عهده دارند (Sargent, 1995). کمبود اسیدهای چرب ضروری در ماهی موجب افزایش ضریب تبدیل غذایی، تغییر نفوذپذیری غشاهای سلولی، کبد چرب و غیره می‌شود (Turchini et al., 2009). از دیگر نشانه‌های کمبود یا فقدان اسیدهای چرب ضروری در جیره ماهی می‌توان به پوسیدگی باله، خونریزی آبشش، انحراف ستون فقرات، کاهش توان تولیدمثل، سندروم استرس، کاهش رشد و مرگ و میر اشاره داشت. استئاتوز و تخریب ساختار روده نیز گزارش شده است (Sargent et al., 2002; Glencross, 2009).

پژوهش‌های متعدد حاکی از آن است که طول زنجیره و درجه اشباع نشدگی اسیدهای چرب جیره غذایی می‌تواند بر فرآیند گوارش و سرانجام جذب چربی توسط آبی اثر بگذارد (Olsen et al., 2000). از سوی دیگر رشد و توسعه لاروها به عملکرد دستگاه گوارش و کمیت و کیفیت غذای مورد استفاده وابسته است، چرا که روده وظیفه گوارش، جذب و انتقال مواد مغذی را بر عهده دارد. چه بسا که بلوغ دستگاه گوارش از نظر عملکردی بر ظرفیت هضمی دستگاه گوارش اثر می‌گذارد و

و همچنین نقش اسیدهای چرب جیره غذایی در تغذیه آبزیان، مطالعه حاضر به بررسی اثر سطوح مختلف اسیدهای چرب HUFA و PUFA (C18) جیره غذایی بر برخی شاخص‌های ریخت‌سنجی دستگاه گوارش لاروهای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نژاد ایرانی در شروع تغذیه آغازین پرداخته است.

مواد و روش‌ها

پس از تهیه اقلام اولیه غذایی و انجام آنالیزهای شیمیایی، جیره‌های مختلف غذایی

طبق جدول ۱ به کمک نرم‌افزار جیره‌نویسی WUFFDA و منطبق بر نیازهایی غذایی لاروهای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تنظیم و ساخته شدند (NRC, 2011). همچنین تجزیه تقریبی اقلام غذایی و جیره‌های غذایی شامل درصد پروتئین، چربی و خاکستر (جدول ۱) طبق روش‌های استاندارد تعیین شد (AOAC, 1990). جیره‌های آزمایشی به لحاظ میزان چربی، پروتئین و انرژی یکسان بودند و فقط نوع روغن جیره‌ها متفاوت بود.

جدول ۱: ترکیب، تجزیه تقریبی و الگوی اسیدهای چرب جیره پایه

ترکیب جیره پایه (درصد از جیره‌های غذایی)			
۰/۰۶٪	ویتامین C	۲۰٪	پودر ماهی کیلکا
۰/۰۵٪	ویتامین E	۵۵٪	گلوتن ذرت
۰/۰۲٪	آنتی‌اکسیدان (BHT)	۲۰٪	گلوتن گندم
۰/۰۶٪	آستاگزانتین	۱٪	پودر خون
۲٪	دی‌کلسیم فسفات	۱۵٪	سویا
۲٪	مخمر نانوبی	۲٪	نشاسته
۱٪	لیزین	۱۰٪	آرد گندم
۰/۶۲٪	متیونین	۵٪	پرمیکس معدنی
تجزیه تقریبی جیره‌های آزمایشی			
۱۴/۵٪	کربوهیدرات	۴۲/۲۵٪	پروتئین خام
۲/۵٪	فیبر	۱۹٪	چربی خام
۳۴۰۰ Cal	انرژی خام	۳/۷۵٪	خاکستر

منبع روغن یا چربی جیره‌ها برای گروه شاهد روغن ماهی و برای گروه‌های دیگر از ترکیب روغن‌های نارگیل، کنجد، زیتون، کانولا، آفتابگردان و ذرت بود به نحوی که سطوح مختلف اسیدهای چرب HUFA (صفر، ۰/۵، ۱، ۲ درصد) در سطح PUFA ۲۰ درصد (آزمایش نخست) و سطوح مختلف PUFA (۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد) در سطح HUFA ۸ درصد (آزمایش دوم) ایجاد شد. الگوی اسیدهای چرب جیره‌های غذایی با استفاده از روش Roy و Lepage (۱۹۸۴) تعیین شد (جدول ۲). جیره‌ها پس از آماده‌سازی به صورت پلت درآمد. پلت‌ها بعد از خشک شدن، تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. لاروهای نژاد ایرانی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از تخم‌گشایی و در زمان شروع تغذیه فعال (با متوسط وزن آغازین ۲۰۰ میلی‌گرم) با تراکم ۱۰۰ قطعه لارو در هر مخزن پرورشی (مخازن ۲۰ لیتری) با هوادهی مناسب به صورت طرح کاملاً تصادفی در قالب دو آزمایش هر آزمایش با ۴ تیمار (هر تیمار ۳ تکرار) ذخیره‌سازی شدند. غذادهی روزانه در ۸ نوبت به میزان ۱۰ درصد وزن بدن به مدت ۶ هفته و با توجه به دمای آب انجام شد (Lovell, 2003).

جدول ۲: الگوی اسیدهای چرب جیره‌های غذایی آزمایشی

جیره‌های غذایی آزمایش دوم				جیره‌های غذایی آزمایش نخست				اسید چرب*
۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	
۱۸/۲۱	۱۸/۱۱	۱۸/۰۸	۱۷/۹۸	۲۴/۲۱	۲۵/۲۶	۲۵/۶۴	۲۶/۱۴	(%) SFA
۲۸/۴۸	۳۹/۸۷	۵۱/۱۵	۶۲/۵۴	۵۱/۱۹	۵۱/۱۷	۵۱/۲۴	۵۱/۲۳	(%) MUFA
۳۴/۰۴	۲۵/۱۶	۱۶/۳۲	۷/۴۵	۱۶/۳۳	۱۶/۳۱	۱۶/۳۴	۱۶/۳۷	(%) C18:2n-6
۸/۸۷	۶/۵۵	۴/۳۴	۱/۹۴	۴/۲۴	۴/۲۴	۴/۲۶	۴/۲۵	(%) C18:3n-3
۴۲/۹۱	۳۱/۷۱	۲۰/۵۶	۹/۳۹	۲۰/۵۷	۲۰/۵۷	۲۰/۶۰	۲۰/۶۱	(%) PUFA
۸/۱۰	۸/۱۰	۸/۰۹	۸/۰۹	۲/۰۳	۱/۰۱	۰/۵۱	۰/۰۱	(%) HUFA

*: درصد هر یک از اسیدهای چرب از کل اسیدهای چرب

SFA: اسیدهای چرب اشباع، MUFA: اسیدهای چرب با یک پیوند دوگانه، PUFA: اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه،

HUFA: اسیدهای چرب بلند زنجیره با چند پیوند دوگانه

مقاطع بافتی به کمک نرم‌افزار Dino Capture 2.0 انجام شد.

پیش از انجام تحلیل‌های آماری داده‌ها، نرمال بودن توزیع باقی‌مانده‌ها (Residuals) و همچنین همگنی واریانس‌ها (Homoscedasticity) به ترتیب توسط آزمون‌های شاپیروویلک (Shapiro-Wilk) و لون (Levene's Test) مورد بررسی قرار گرفت و سرانجام گروه‌های آزمایشی از نظر تاثیرگذاری تیمارهای اعمال شده توسط آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند. همه آزمون‌ها در محیط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ صورت پذیرفت و نتایج به صورت «میانگین \pm خطای استاندارد» ارائه شدند.

نتایج

نتایج به دست آمده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه شاخص‌های ریخت‌سنجی مورد مطالعه شامل ضخامت اپیتلیوم، ضخامت لایه‌های مخاط، زیرمخاط و لایه عضلانی، ارتفاع و قطر قاعده چین‌ها، برای دو گروه آزمایشی (آزمایش‌های نخست و دوم) در جدول‌های ۳ و ۴ آمده است. همان‌طور که در

در طول دوره پرورش، شاخص‌های فیزیوشیمیایی آب شامل دما ($14 \pm 0/5$) درجه سانتی‌گراد) و میزان اکسیژن محلول ($8/2 \pm 0/2$) میلی‌گرم در لیتر) با دستگاه مولتی‌متر (WTW، آلمان) به طور مرتب به صورت هفتگی اندازه‌گیری و ثبت شد. این مقادیر در محدوده مناسب برای پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود.

برای انجام مطالعات بافت‌شناسی، نمونه‌برداری از تیمارها به صورت کاملاً تصادفی در انتهای دوره پرورش به تعداد ۲ عدد از هر تکرار (۶ ماهی از هر تیمار) انجام گرفت. سپس نمونه‌ها داخل محلول بوئن تثبیت و پس از ۲۴ ساعت به اتانول ۷۰ درصد انتقال داده شدند.

بلوک‌های پارافینی پس از طی مراحل پاساژ بافتی، تهیه شدند. برش‌های سریالی با ضخامت ۴ میکرون به کمک میکروتوم نیمه‌اتوماتیک (ROTO-CUT 200، Scilab، انگلستان) از بلوک‌ها تهیه و به شیوه هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند (ادیب مرادی و پوستی، ۱۳۸۵). سنجش‌های ریختی شامل ضخامت اپیتلیوم، لایه مخاط، زیرمخاط و لایه عضلانی به همراه ارتفاع و قطر چین با استفاده از عکس‌های

جدول ۳ آمده است، ضخامت اپیتلیوم و ارتفاع چین در آزمایش نخست (سطوح مختلف PUFA جیره غذایی شامل ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد در سطح HUFA ۸ درصد) تنها ارتفاع چین‌های بخش پیشین روده تفاوت آماری معنی‌داری را میان جیره‌های آزمایشی مورد استفاده نشان داد ($P < 0/05$)؛ جدول ۴).

جدول ۳: آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه شاخص‌های ریخت‌سنجی روده پیشین لاروهای قزل‌آلای رنگین‌کمان در پایان آزمایش نخست (تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح ۰، ۰/۵، ۱، ۲ درصد HUFA در سطح ۲۰ درصد PUFA)

ضخامت اپیتلیوم*	ضخامت لایه مخاط	ضخامت لایه زیرمخاط	ضخامت لایه عضلانی	ارتفاع چین*	قطر چین	F
۸/۵۲	۴/۴۵	۲/۷۸	۵/۲۵	۱۶/۴۱	۱/۳۰	
۰/۰۲۱	۰/۰۷۱	۰/۱۴۹	۰/۰۵۳	۰/۰۰۵	۰/۳۷۲	P-value

*: دارای اختلاف معنی‌دار

جدول ۴: آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه شاخص‌های ریخت‌سنجی روده پیشین لاروهای قزل‌آلای رنگین‌کمان در پایان آزمایش دوم (تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ درصد PUFA در سطح ۸ درصد HUFA)

ضخامت اپیتلیوم*	ضخامت لایه مخاط	ضخامت لایه زیرمخاط	ضخامت لایه عضلانی	ارتفاع چین*	قطر چین	F
۱/۴۲	۰/۳۴	۳/۹۷	۰/۴۰	۳۰/۶۳	۰/۱۹	
۰/۳۹۰	۰/۸۰۰	۰/۱۴۴	۰/۷۶۴	۰/۰۰۹	۰/۸۹۵	P-value

با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۵، به نظر می‌رسد که با افزایش سطح HUFA جیره غذایی هنگامی که میزان PUFA جیره غذایی ۲۰ درصد بود، از میزان شاخص‌های فوق به غیر از قطر چین، کاسته شد و از نظر شاخص‌های فوق سطح مناسب HUFA جیره غذایی می‌تواند بین صفر تا ۰/۵ درصد باشد. (P<۰/۰۵)

با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۶، ارتفاع چین روده پیشین تیمارهای مختلف ابتدا با افزایش سطح PUFA جیره افزایش و سپس کاهش یافت، به نحوی که در جیره غذایی حاوی ۲۰ درصد PUFA و ۸ درصد HUFA، ارتفاع چین بیشترین میزان را داشت (P<۰/۰۵).

جدول ۵: شاخص‌های ریخت‌سنجی روده پیشین لاروهای قزل‌آلای رنگین‌کمان در گروه‌های مختلف آزمایشی در انتهای آزمایش نخست (تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف HUFA در سطح ۲۰ درصد PUFA) (میانگین ± خطای استاندارد)

سطوح HUFA				
۰٪	۰/۵٪	۱٪	۲٪	
۱۱۳/۷۲±۲/۳۸ ^{ab}	۱۳۳/۶۰±۱۰/۰۰ ^a	۱۱۱/۰۰±۶/۵۳ ^b	۹۰/۳۴±۲/۸۸ ^b	ضخامت اپیتلیوم (μm)*
۶۳/۵۷±۲/۶۵	۵۴/۴۴±۱/۴۱	۶۲/۳۳±۳/۸۰	۵۱/۱۰±۲/۱۴	ضخامت لایه مخاط (μm)
۹/۴۵±۰/۵۷	۸/۱۰±۱/۲۳	۷/۲۴±۰/۳۲	۵/۶۶±۰/۴۹	ضخامت لایه زیرمخاط (μm)
۳۳/۰۳±۲/۷۳	۴۱/۴۲±۴/۶۷	۲۸/۳۲±۱/۰۱	۳۱/۶۵±۲/۵۵	ضخامت لایه عضلانی (μm)
۲۵۳/۰۰±۲۹/۸۰ ^a	۱۶۵/۳۰±۱۰/۰۰ ^b	۱۵۷/۷۰±۱۰/۹۰ ^b	۱۶۳/۷۰±۱۲/۵۰ ^b	ارتفاع چین (μm)*
۹۸/۵۲±۴/۱۴	۱۱۳/۸۷±۴/۰۵	۹۵/۵۷±۵/۶۷	۱۱۳/۹۳±۴/۷۳	قطر چین (μm)

*: حروف متفاوت در هر ردیف نشانگر وجود تفاوت آماری معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

عدم وجود حروف در ردیف‌ها نشانه عدم وجود تفاوت معنی‌دار آماری است.

جدول ۶: شاخص‌های ریخت‌سنجی روده پیشین لاروهای قزل‌آلای رنگین‌کمان در گروه‌های مختلف آزمایشی در انتهای آزمایش دوم (تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف PUFA در سطح ۸ درصد HUFA) (میانگین \pm خطای استاندارد)

سطوح PUFA				
۴۰٪	۳۰٪	۲۰٪	۱۰٪	
۷۴/۰۵ \pm ۷/۲۰	۹۰/۹۹ \pm ۴/۹۱	۸۷/۹۶ \pm ۲/۳۰	۸۶/۵۲ \pm ۳/۲۴	ضخامت اپیتلیوم (μm)
۳۸/۳۲ \pm ۳/۵۳	۵۵/۹۸ \pm ۲/۶۱	۵۳/۷۰ \pm ۲/۲۸	۴۷/۲۵ \pm ۳/۲۱	ضخامت لایه مخاط (μm)
۲۹/۸۷۰ \pm ۳/۲۹۰	۳۴/۸۷۰ \pm ۶/۰۹۰	۶/۵۹۳ \pm ۰/۵۴۴	۶/۰۲۲ \pm ۰/۶۰۴	ضخامت لایه زیرمخاط (μm)
۲۹/۸۷۳ \pm ۳/۲۹	۳۴/۸۷ \pm ۶/۰۹	۲۶/۳۰ \pm ۲/۱۹	۲۲/۱۰ \pm ۳/۷۰	ضخامت لایه عضلانی (μm)
۱۹۶/۰۰ \pm ۱۳/۵۰ ^b	۱۴۳/۵۰ \pm ۱۰/۲۰ ^a	۲۰۷/۳۰ \pm ۱۰/۳۰ ^b	۱۵۷/۸۲ \pm ۶/۶۳ ^a	ارتفاع چین (μm) [*]
۱۰۶/۱۸ \pm ۵/۴۵	۹۷/۲۰ \pm ۱۰/۸۰	۱۰۱/۴۴ \pm ۸/۸۷	۱۰۹/۱۹ \pm ۷/۷۳	قطر چین (μm)

*: حروف متفاوت در هر ردیف نشانگر وجود تفاوت آماری معنی‌دار است ($P < 0.05$).

عدم وجود حروف در ردیف‌ها نشانه عدم وجود تفاوت معنی‌دار آماری است.

بحث

طول زنجیره و درجه اشباع نشدگی

اسیدهای چرب جیره غذایی می‌تواند بر فرآیند گوارش و سرانجام جذب چربی توسط آبزی اثر بگذارد (Olsen et al., 2000). بلوغ دستگاه گوارش از نظر عملکرد، در ظرفیت گوارشی دستگاه گوارش جانور موثر است و همچنین تحت تاثیر عوامل تغذیه‌ای قرار دارد (Wold et al., 2007). تغذیه نامناسب موجب کاهش ارتفاع سلول‌های اپیتلیومی می‌شود. همچنین تجمع قطرات چربی در آنتروسیت‌ها نشان دهنده عدم توانایی سلول‌ها در انتقال

مطالعه دوران لاروی ماهیان حائز اهمیت است چرا که موفقیت یا شکست در برنامه‌های آبزی‌پروری در گرو وقایعی است که در این دوران رخ می‌دهند (Gisbert and Doroshov, 2006). از این رو درک تکوین ریختی و الگوی رشد ماهیان به ویژه در مراحل اولیه زندگی آن‌ها و تاثیر عوامل محیطی از جمله کیفیت جیره غذایی از نظر مواد ریزمغذی در موفقیت فعالیت‌های آبزی‌پروری مهم تلقی می‌شود (Darias et al., 2010).

تاثیر جایگزینی روغن ماهی جیره غذایی آزاد ماهی اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) با منابع گیاهی شامل روغن زیتون (حاوی ۷۸ درصد اسیدهای چرب با یک پیوند دوگانه و ۸ درصد PUFA)، روغن سویا (حاوی ۲۳ درصد اسیدهای چرب با یک پیوند دوگانه و ۵۸ درصد PUFA) و روغن کانولا (حاوی ۵۶ درصد اسیدهای چرب با یک پیوند دوگانه و ۳۶ درصد PUFA) را مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد چین‌خوردگی روده در قسمت میانی آن در همه گروه‌های دریافت کننده روغن‌های گیاهی کوتاه‌تر از جیره غذایی حاوی روغن ماهی بود. در قسمت دیستال روده، قسمت چین روده به طور قابل توجهی پیچیده بود و چین‌خوردگی روده در گروه تغذیه شده با روغن سویا در مقایسه با گروه روغن کلزا کوتاه‌تر بود. هرچند ممکن است با کوتاه شدن چین روده سطح روده کاهش یابد و در جذب مواد غذایی یا رشد اختلال ایجاد شود، اما نتایج نشان داد که جایگزینی بخشی از روغن ماهی جیره غذایی با روغن‌های گیاهی هیچ تاثیر منفی ملموسی در سلامت روده آزاد ماهی اقیانوس اطلس نداشت (Moldal et al., 2014).

تری‌اسیل‌گلیسرول‌ها است که با افزودن فسفولیپیدها به جیره غذایی برطرف می‌شود. حال اگر در ساختار فسفولیپیدها اسیدهای چرب ضروری ۳- n وجود داشته باشد، این ترکیبات به طور موثر مورد استفاده قرار می‌گیرند و موجب بلوغ سریع دستگاه گوارش می‌شوند (Tocher et al., 2008). در مطالعه حاضر نیز سطوح مختلف PUFA در آزمایش دوم شامل ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد در سطح HUFA معادل ۸ درصد چربی جیره غذایی موجب تغییراتی در ریخت‌سنجی روده پیشین شد، به نحوی که در گروه تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۲۰ درصد PUFA (درسطح HUFA ۸ درصد) بیشترین ارتفاع چین قابل مشاهده بود.

Castro و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی تاثیر جایگزینی روغن ماهی با روغن گیاهی بر ریخت‌شناسی بافت دستگاه گوارش ماهی‌های نوجوان باس دریایی اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) دریافتند که تغذیه با روغن‌های گیاهی اثری بر ریخت‌شناسی بافت پیلوریک و قسمت قدامی و خلفی روده ماهیان نداشت. این نتایج با برخی از نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر به ویژه آزمایش دوم مطابقت دارد. Moldal و همکاران (۲۰۱۴) در پژوهشی

همکاران (۲۰۰۷) معتقد هستند که امکان کاهش و حتی حذف روغن ماهی از جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بدون هیچ گونه آثار منفی بر آبی، وجود دارد. با این وجود اثر هم‌افزایی سایر اجزای جیره غذایی مانند منبع پروتئین را نباید از نظر دور داشت. در بررسی اثر کیفیت جیره غذایی بر ریخت‌سنجی روده کپور معمولی، Poleksic و همکاران (۲۰۰۷) دریافتند که جایگزینی کامل پودر ماهی با منبع گیاهی موجب کاهش معنی‌دار ارتفاع آنتروسیت‌ها شد. آن‌ها چنین نتیجه‌گیری کردند که استفاده از ریخت‌سنجی روده معیار مناسبی برای ارزیابی کیفیت جیره‌های غذایی است (Poleksic et al., 2007). برای مثال در تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی در قفس با جیره غذایی حاوی سطوح پایین‌تر چربی ارتفاع آنتروسیت‌ها کاهش و بر تعداد سلول‌های مخاطی افزوده شد (Poleksic et al., 2006). در مطالعه دیگری با موضوع اثر جایگزینی پودر ماهی با کنجاله آفتابگردان روی ریخت‌سنجی روده ماهی سیم دریایی پوزه کوتاه (*Diplodus puntazzo*)، مشخص شد که جایگزینی در سطح ۲۰ درصد موجب افزایش تعداد سلول‌های جامی شد. علاوه بر این، ضخامت لایه عضلانی بخش

Salhi و همکاران (۱۹۹۹) در بررسی اثرات نسبت‌های مختلف EPA/DHA روی روده لارو ماهی سیم سرطلایی دریافتند که اثر جایگزینی روغن ماهی با روغن‌های گیاهی بر وضعیت تکاملی روده لارو ماهی سیم سرطلایی (*Sparus aurata*) حاکی از عدم وجود تفاوت قابل توجه در ارتفاع و تعداد چین‌های سطح اپیتلیوم روده لاروهای گروه‌های آزمایشی با تیمار شاهد بود.

چنین به نظر می‌رسد که افزایش ارتفاع چین یا پرزهای روده موازی با افزایش عملکرد گوارشی و جذب روده است که خود معلول افزایش سطح جذب، فزونی فعالیت آنزیم‌های گوارشی غشای نوار مسواکی (ریزپرز) و انتقال مواد مغذی به جریان خون است (Awad et al., 2008). در بررسی‌های مختلف مشخص شده است که وجود مقادیر بالای اسید پالمیتیک در جیره‌های غذایی حاوی سطوح بالای روغن ماهی موجب تحریک ساخت درون‌زاد فسفاتیدیل کولین (نوعی فسفولیپید) و در نتیجه بهبود صدور چربی‌های جذب شده توسط آنتروسیت‌های روده به کمک پروتومیکرون‌ها است (Olsen et al., 2000; Gisbert et al., 2005). البته پژوهشگرانی چون Oo و همکاران (۲۰۰۷) و Drew و

افزایش تعداد سلول‌های جامی در بخش پیشین روده این ماهی و همچنین کاهش تعداد واکوئل‌های فوق هسته‌ای در تیمارهای مختلف غذایی شد. در حالی که سایر شاخص‌ها مانند ارتفاع چین‌ها، پهنای غشای لامینا پروپریا و غیره تفاوتی میان تیمارها وجود نداشت (Bowyer et al., 2012). وجود برخی تفاوت‌ها در نتایج مطالعات مختلف می‌تواند ناشی از گونه آبی هدف، مدت زمان اجرای آزمایش، مرحله زیستی آبی مورد مطالعه، شرایط محیطی و نوع دستکاری در جیره غذایی باشد (Dapra et al., 2011; NRC, 2012; Bowyer et al., 2012).

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد ریخت‌سنجی روده لارو ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تاثیر نوع جیره غذایی قرار گرفت. بنابراین توصیه می‌شود در صورت استفاده از منابع روغن گیاهی (جایگزینی منابع دریایی با منابع گیاهی) برای تنظیم جیره‌های غذایی که خود موجب افزایش میزان PUFA جیره‌ها می‌شود، برای حفظ ساختار طبیعی بافت روده ماهیان سطح اسیدهای چرب غیراشباع بلند زنجیره می‌تواند تا هشت درصد افزایش یابد.

پیشین روده در گروه شاهد و با ۳۰ درصد جایگزینی کمترین بود (Nogales Merida et al., 2010). در مطالعه اثر افزودن روغن ماهی یا روغن پودر گل میخک بر فراسنجه‌های بافتی مرغان تخم‌گذار مشخص شد که افزودن روغن پودر گل میخک موجب افزایش ارتفاع چین‌های دوزادها شد، در حالی که افزودن روغن ماهی موجب کاهش تعداد سلول‌های جامی شد. با این وجود سایر شاخص‌های ریخت‌سنجی تغییرات معنی‌داری نشان نداد (Gandomani et al., 2014). در مطالعه حاضر نیز تغییراتی در فراسنجه‌های ریختی روده پیشین لارو ماهیان مشاهده شد که تحت تاثیر نسبت‌های مختلف HUFA و PUFA جیره غذایی بود. چنین وقایعی همزمان با کاهش فعالیت آنزیم‌هایی چون آلکالین فسفاتاز، مالتاز، لوسین آمینوپپتیداز، نوکلئوتیداز و سرانجام کاهش واکوئل‌های فوق هسته‌ای در آزاد ماهیان بود که به مفهوم کاهش آندوسیتوز ناشی از التهاب است (Bakke-McKellep et al., 2000). همچنین جایگزینی روغن ماهی با روغن کانولا، روغن حاصل از فرآوری پسماند طیور و مخلوط روغن ماهی و روغن طیور در شاه‌ماهی دم زرد (*Seriola lalandi*) موجب

منابع

- ادیب مرادی م و پوستی ا. ۱۳۸۵. روش‌های آزمایشگاهی بافت شناسی. ۲۹۶ص.
- روغنی ا. ۱۳۸۱. تغذیه حیوانات اهلی غیرنشخوار کننده. انتشارات آییژ. ۲۴۷ص.
- شیوازاد م. و صیداوی ع. ۱۳۸۵. زیست‌فراهمی مواد مغذی در حیوانات: اسیدهای آمینه، مواد trout (*Oncorhynchus mykiss*). World Applied Science Journal, 6: 1525–1531.
- Bowyer J.N., Qin J.G., Adams L.R., Thomson M.J. and Stone D.A. 2012.** The response of digestive enzyme activities and gut histology in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) to dietary fish oil substitution at different temperatures. Aquaculture, 368: 19–28.
- Castro C., Couto A., Perez-Jimenez A., Serra C.R., Diaz-Rosales P., Fernandes R., Corraze G., Panserat S. and Oliva-Teles A. 2016.** Effects of fish oil replacement by vegetable oil blend on digestive enzymes and tissue histomorphology of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. Fish Physiology and Biochemistry, 42(1): 203–217.
- Dapra F., Geurden I., Corraze G., Bazin D., Zambonino-Infante J.L. and Fontagne-Dicharry S. 2011.** Physiological and molecular معدنی و ویتامین‌ها. انتشارات دانشگاه تهران. ۵۶۸ص.
- میرنظامی ضیابری س.ح. ۱۳۸۰. فن‌آوری و روغن و پالایش آن. انتشارات علوم کشاورزی، ۴۶۴ص.
- AOAC. 1990.** Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists, USA. 771P.
- Awad W., Ghareeb K. and Bohm J. 2008.** Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a synbiotic containing *Enterococcus faecium* and oligosaccharides. International Journal of Molecular Sciences, 9(11): 2205–2216.
- Bakke-McKellep A.M., Press C.M., Krogdahl A. and Landsverk T. 2000.** Changes in immune and enzyme histochemical phenotypes of cells of the intestinal mucosa of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with soybean-meal induced enteritis. Journal of Fish Diseases, 23: 115–127.
- Banan Khojasteh S., Sheikhzadeh F., Mohammadnejad D. and Azami A. 2009.** Histological, histochemical and ultrastructural study of the intestine of rainbow

- responses to dietary phospholipids vary between fry and early juvenile stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 319(3): 377–384.
- Darias M.J., Mazurais D., Koumoundouros G., Glynatsi N., Christodouloupoulou S., Huelvan C., Desbruyeres E., Le Gall M.M., Quazuguel P., Cahu C.L. and Zambonino-Infante, J.L. 2010.** Dietary vitamin D3 affects digestive system ontogenesis and ossification in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 298(3): 300–307.
- Deplano M., Diez J.P., Connes R., Kentouri M. and Cavalier F. 1991.** Appearance of lipid-absorption capacities in larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* during transition to the exotrophic phase. *Marine Biology*, 108: 361–371.
- Drew M.D., Ogunkoya A.E., Janz D.M. and Van Kessel A.G. 2007.** Dietary influence of replacing fish meal and oil with canola protein concentrate and vegetable oils on growth performance, fatty acid composition and organochlorine residues in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 267: 260–268.
- Gandomani V.T., Mahdavi A.H., Rahmani H.R., Riasi A. and Jahanian E. 2014.** Effects of different levels of clove bud (*Syzygium aromaticum*) on performance, intestinal microbial colonization, jejunal morphology, and immunocompetence of laying hens fed different n-6 to n-3 ratios. *Livestock Science*, 167: 236–248.
- Gisbert E. and Doroshov S.I. 2006.** Allometric growth in green sturgeon larvae. *Journal of Applied Ichthyology*, 22: 202–207.
- Gisbert E., Villeneuve L., Zambonino Infante J.L., Quazuguel P. and Cahu C. 2005.** Dietary phospholipids are more efficient than neutral lipids for long-chain polyunsaturated fatty acid supply in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Lipids*, 40(6): 1–11.
- Glencross B.D. 2009.** Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture*, 1(2): 71–124.
- Lepage G. and Roy C.C. 1984.** Improved recovery of fatty acids through direct transesterification without prior extraction or purification. *Journal of Lipid Research*, 25: 1391–1396.
- Lovell R.T. 2003.** Diet and fish husbandry. P: 703–754. In: Halver J.E. and Hardy R.W. (Eds.). *Fish Nutrition*. Academic Press, USA.
- Moldal T., Lokka G., Wiik-Nielsen J., Austbo L., Torstensen B.E., Rosenlund G. and Koppang**

- E.O. 2014.** Substitution of dietary fish oil with plant oils is associated with shortened mid intestinal folds in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Veterinary Research*, 10(60): 1–13.
- NRC (National Research Council). 2011.** Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academy Press, USA. 376P.
- Nogales Merida S., Toms-Vidal A., Martnez-Llorens S. and Jover Cerd M. 2010.** Sunflower meal as a partial substitute in juvenile sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) diets: Amino acid retention, gut and liver histology. *Aquaculture*, 298: 275–281.
- Olsen R.E., Myklebust R., Ringo E. and Mayhew T.M. 2000.** The influences of dietary linseed oil and saturated fatty acids on caecal enterocytes in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.): A quantitative ultrastructural study. *Fish Physiology and Biochemistry*, (22): 207–216.
- Oo A.N., Satoh S. and Tsuchida N. 2007.** Effect of replacements of fish meal and fish oil on growth and dioxin contents of rainbow trout. *Fisheries Science*, 73(4): 750–759.
- Poleksic V., Raskovic B., Markovic Z., Dulic Z., Stankovic M., Zivic I. and Lakic N. 2007.** Effects of different dietary protein sources on intestine and liver morphology of carp yearlings. *Proceedings of the 3rd Serbian Congress for Microscopy*, Belgrade, Serbia, Serbian Microscopy Society. P: 237–238.
- Poleksic V., Savic N., Raskovic B. and Markovic Z. 2006.** Effect of different feed composition on intestine and liver histology of trout in cage culture. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 22: 359–372.
- Salhi M., Izquierdo M.S., Hernandez-Cruz C.M., Bessonart M. and Fernandez-Palacios H. 1999.** Effect of different dietary polar lipid levels and different n-3 HUFA content in polar lipid on the gut and liver histological structure of seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, 179: 253–264.
- Sargent J., McEvoy L., Estevez A., Bell G., Bell M., Henderson J. and Tocher D. 1999.** Lipid nutrition of marine fish during early development: Current status and future directions. *Aquaculture*, 179(1): 217–229.
- Sargent J.R. 1995.** Origin and functions of egg lipids: Nutritional implications. P: 353–372. In: Bromage N.R. and Roberts R.J. (Eds.). *Broodstock Management and Eggs and Larval Quality*. Blackwell Science, London.
- Sargent J.R., Tocher D.R. and Bell J.G. 2002.** The lipids. *Fish*

- Nutrition. Academic Press, San Diego. 807P.
- Tocher D.R., Bendiksen E.A. Campbell P.J. and Bell J.G. 2008.** The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*, 280(1): 21–34.
- Turchini G.M., Bente E.T. and Wing-Keong N. 2009.** Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*, 1(1): 10–57.
- Watanabe T. and Kiron V. 1994.** Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture*, 124(1-4): 223–251.
- Wold P.A., Hoehne-Reitan K., Cahu C.L., Zambonino Infante J.L., Rainuzzo J. and Kjorsvik E. 2007.** Phospholipids vs. neutral lipids: Effects on digestive enzymes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture*, 272(1): 502–513.



Effect of various dietary levels of highly unsaturated fatty acids and polyunsaturated fatty acids on some morphometric features of duodenum in newly weaned rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae

Farzaneh Noori^{1*}, Ahmad Imani², Saeed Hajinezhad³, Kourosh Sarvi Moghanlou²

Received: December 2017

Accepted: February 2018

Abstract

The present study was to investigate the effect of various dietary levels of unsaturated fatty acids (HUFA and PUFA) on some morphometric features of duodenum in newly weaned rainbow trout larvae. Therefore, eight different experimental diets consisted of various dietary levels of HUFA (0, 0.5, 1 and 2 percent) at a fixed dietary PUFA of 20 percent (the first experiment) and various dietary PUFA levels (10, 20, 30 and 40 percent) at a fixed dietary HUFA of 8 percent (the second experiment) were formulated. The stocking density of larvae was 100 larvae per each container and the experiments lasted for six weeks. At the end of the experiments, six fish were randomly taken and the proximal intestine was dissected out and fixed for classical histological studies. In the first experiment concomitant with any increase in dietary HUFA content, epithelial thickness and villous height significantly decreased ($P < 0.05$) and according to the results the appropriate HUFA level could be 0.5 percent of the dietary lipid moiety. However, in the second experiment, only villous height of duodenum was affected by experimental diets ($P < 0.05$) and villous height was the highest ($207.2 \pm 10.3 \mu\text{m}$) at PUFA level of 20 percent of the total dietary lipid. In conclusion, it is recommended that in the case of using vegetable oils in feed formulation (to replace marine lipid sources) led to higher PUFA levels, dietary HUFA levels could be increased to eight percent for keeping normal intestine morphometry.

Key words: *Diet, Unsaturated Fatty Acids, Larva, Weaning, Rainbow Trout.*

1- Assistant Professor in Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran.

2- Assistant Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

3- M.Sc. in Fisheries Science, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

*Corresponding Author: f.noori@urmia.ac.ir

