



University of Guilan

University of Guilan with collaboration of Iranian
Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 6, No. 2, 2020, pages: 49-62



The effect of chitosan nanoparticles coated with folic acid to feed on growth parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings

Sahar Farahnak Roudsari¹, Seyed Abdolmajid Mousavi², Houman Rajabi Islami¹,
Mehdi Shamsaei Mehrgan¹

1- Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran,
Iran

2- Department of Animal Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University,
Varamin, Iran

Received 01 March 2020

Accepted 18 June 2020

KEYWORDS

Rainbow trout
Nano chitosan
Folic acid
Growth performance

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of chitosan nanoparticles containing folic acid in the diet of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* on growth and survival indices. For this purpose, rainbow trout with an average weight of 30 ± 2 g were divided into five experimental treatments: 0, 0.1, 0.25, 0.5 and 1 mg of chitosan/folic acid nanoparticles per kg of diet. Each treatment containing 25 fish in 3 repetitions in 15 tanks (500 liter) was designed into a closed-circuit breeding system. After making a manual diet and adapting the fish to the new conditions they were fed for 8 weeks. At the end of the experiment period, growth and survival indices were evaluated. The highest growth rate was recorded in the treatment of 1 mg/kg of chitosan/folic acid nanoparticles at the rate of 69.23 ± 4.34 g. With increasing Ch/FA nanoparticles levels in the formulated diets, the feed conversion ratio decreased linearly, which in fish fed with 1 mg/kg diet supplemented with chitosan / folic acid nanoparticles reached to 1.29 ± 0.08 ($p < 0.05$). On the other hand, the survival rate was the same in all treatments, but at the end of the period, losses were clearly observed in the control. The results showed that increasing the level of chitosan/folic acid nanoparticles in formulated diets will increase the growth rate and have a positive effect on growth index.

*Corresponding author: sa_mousavi@iauvaramin.ac.ir



"مقاله پژوهشی"

تأثیر نانوذرات کیتوزان حاوی اسید فولیک جیره بر شاخص‌های رشد در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت‌قد (*Oncorhynchus mykiss*)

سحر فرحناک رودسری^۱، سید عبدالمجید موسوی^{۲*}، هومن رجبی اسلامی^۱، مهدی شمسایی مهرجان^۱

۱- گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه علوم دامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۳/۲۹

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۲/۱۱

کلمات کلیدی

چکیده

هدف از انجام این مطالعه بررسی تأثیر نانوذرات کیتوزان حاوی اسید فولیک در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت‌قد (*Oncorhynchus mykiss*) بر شاخص‌های رشد و بقا بود. به این منظور ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن 2 ± 30 گرم در پنج تیمار آزمایشی شاهد، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم نانوذرات کیتوزان-اسید فولیک بر کیلوگرم غذا تقسیم شدند. هر تیمار حاوی ۲۵ قطعه بچه ماهی، در ۳ تکرار و ۱۵ مخزن ۵۰۰ لیتری در یک سیستم پرورش مدار بسته طراحی شد. پس از ساخت جیره دستی و سازگاری ماهیان با شرایط جدید؛ به مدت ۸ هفته مورد تغذیه آزمایشی قرار گرفتند. پس از اتمام دوره پژوهش شاخص‌های رشد و بقا مورد ارزیابی قرار گرفت. بیشترین افزایش وزن بدن در تیمار ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا به میزان ۴/۳۴ $\pm 69/23$ گرم ثبت شد. با افزایش سطح نانوذرات کیتوزان-اسید فولیک در رژیم‌های غذایی فرموله شده ضریب تبدیل غذا به طور خطی کاهش یافته که در ماهی‌های تغذیه شده با ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم رژیم غذایی مکمل نانوذرات کیتوزان-اسید فولیک به کمترین مقدار به میزان $0/08 \pm$ رسید (۰/۰۵ < p). از طرفی درصد بقا در تمام تیمارها یکسان بود. نتایج این تحقیق نشان داد که افزایش سطح نانوذرات کیتوزان-اسید فولیک در رژیم‌های غذایی فرموله شده باعث افزایش نرخ رشد خواهد شد و تأثیر مثبت روی شاخص‌های رشد داشته است.

مقدمه

نانوکپسولاسیون شاخه جدید و کاربردی از فناوری نانو در صنایع غذایی کپسوله کردن در مقیاس نانومتر با استفاده از پلیمرهای زیستی، فیلم، لایه‌ها و یا نانوذرات است که به عنوان یک محافظ در مقیاس نانو برای مولکول‌ها و مواد تشکیل‌دهنده غذا یا مواد غذایی استفاده می‌شوند. کیتوزان یک پلی‌ساکارید طبیعی است که از کیتین اعضای بدن بی‌مهرگانی مانند میگو و خرچنگ استخراج شده (Li et al. 2016) و به‌طور طبیعی دومین پلی‌ساکارید فراوان پس از سلولز است (Jollès and Muzzarelli, 1999) و به دلیل غیرسمی بودن، تجزیه بیولوژیک، سازگاری زیستی و القای سیستم ایمنی، اخیراً برای کپسوله کردن بسیاری از ترکیبات فعال مورد توجه قرار گرفت است. مفهوم سیستم تحویل پلیمر دارویی که ابتدا توسط Ringsdorf بیان شد روشی است که در آن دارو به یک هدف مشخص انتقال می‌یابد (Andrianov and Payne, 1998). به‌طور کلی، انتقال از مسیر دهانی بیشترین ارجحیت را در مسیر انتقال دارو دارد، هرچند محدودیت‌های خاصی به‌ویژه برای داروهای محلول در آب با توجه به دسترسی زیستی پایین، کاتابولیسم در دستگاه گوارش، حلالیت ضعیف برخی داروها در دستگاه گوارش، زمان ناکافی انتقال در روده و وابستگی به انتقال پاراسلولی آنها وجود دارد (Kotze et al. 1998). کیتوزان یک پلی‌ساکارید کاتیونی است که به‌طور طبیعی یک ترکیب غیرسمی و سازگار با محیط زیست شناخته شده است (Hu et al. 2008).

اسید فولیک مولکولی کوچک بوده که تحت عنوان ویتامین B9 نیز شناخته می‌شود که در فرآیندهای بیوشیمیایی بسیار موثر است (Gazzali et al. 2016). ساختار مولکولی اسید فولیک را می‌توان به سه بخش تقسیم کرد: یک قسمت اسید گلوتامیک، یک قسمت اسید p-آمینوبنزوئیک و یک بخش پترین (Vora et al. 2002). این ویتامین درضایعات سلولی، تنظیم فعالیت ژنی، تولید سلول‌های قرمز و سفید خونی، تجدید بافت پوششی و نیز سنتز مواد شیمیایی نقش دارد که عملکرد مغز را متعادل می‌کنند (Marchetti et al. 2014).

نتایج مطالعات در سال‌های اخیر نشان داد که نانوذرات کیتوزان به‌طور گسترده‌ای برای ارائه داروهای آب‌گریز، ویتامین‌ها، پروتئین‌ها، مواد مغذی و فنولی به سیستم‌های زیستی و پایدار کمتر سمی استفاده می‌شود (Hu et al.

2008; Jang and Lee, 2003). از اسید فولیک نیز به عنوان یک حامل برای درمان هدفمند و تشخیص استفاده می‌شود (Müller, 2013; Schieferstein and Ross, 2013). بعلاوه، استفاده از نانوذرات کیتوزان و اسید اسکوربیک باعث افزایش عمر مفید و پایداری اسید اسکوربیک (۹۵ درصد) در رژیم غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در طی ۲۰ روز در دمای محیط نسبت به اسکوربیک اسید بدون نانوذرات (۳۵ درصد) می‌شود (Alishahi et al. 2011). همچنین، مطالعات اثر اسید فولیک در رژیم غذایی ماهی خاویاری سیبری به وضوح نشان داد که عملکرد رشد به طور قابل توجهی تحت تأثیر غلظت اسید فولیک در رژیم غذایی با بالاترین نرخ رشد و نرخ رشد ویژه در ماهیان تغذیه شده با ۲/۷۱ میلی‌گرم اسید فولیک بر کیلوگرم بوده است (Falah et al. 2020). بعلاوه اسید فولیک نقش مهمی در سنتز پورین و پرمیدین، در متابولیسم هموسیستین و در متیلاسیون DNA دارد. همچنین برای رشد طبیعی بافت‌ها، به‌ویژه در ارتباط با تقسیم سریع سلول‌ها مانند جنین‌شناسی لازم است (Borradale et al. 2014). Sesay و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که وزن نهایی، افزایش وزن، نرخ رشد ویژه و نسبت راندمان خوراکی در ماهی (*Megalobrama amblycephala*) به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) با افزایش سطح اسید فولیک به میزان ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا افزایش می‌یابد. تاثیر اسید فولیک روی رشد و شاخص هماتوسوماتیک کبد (*Penaeus monodon*) میگوی ببری بزرگ نتایج مثبتی روی میزان وزن نهایی و راندمان خوراک در میگوهای تغذیه شده با بیش از ۲ میلی‌گرم اسید فولیک بر کیلوگرم غذا نشان داد (Shiau and Huang, 2001). با توجه به اینکه هیچ تحقیق مدونی در زمینه استفاده از نانوذرات کیتوزان حاوی اسید فولیک جیره در تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان و اثر آن بر بقاء و فراسنجه‌های رشد طبق بررسی‌های نویسندگان دیده نشده، امید است که این تحقیق بتواند مسیر جدیدی را در زمینه استفاده از نانوذرات کیتوزان حاوی اسید فولیک در صنعت تغذیه قزل‌آلای رنگین کمان ارائه نماید.

مواد و روش‌ها

تهران شهرستان احمدآباد مستوفی انجام شد. تعداد ۳۷۵ عدد بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان نژاد اسپانیایی با میانگین وزن 2 ± 30 گرم به صورت تصادفی از جمعیت موجود در مزرعه پرورش ماهی کاسپین قزل در فیروزکوه خریداری شد. ماهیان پس از انتقال ۲۴ ساعت قطع غذاهای شدند. سپس، به مدت دو هفته با جیره دست‌ساز فاقد اسید فولیک و ویتامین B12 از آنجا که علائم کمبود مشابه اسید فولیک را نشان می‌دهد (NRC, 2011) تغذیه شدند. اقلام هر یک از جیره‌های غذایی در ادامه به خوبی با یکدیگر مخلوط شدند تا خمیر یکنواختی به دست آید. خمیر حاصله در ادامه از دستگاه پلت‌ساز عبور داده شده و پس از خشک کردن در سایه و جریان هوا بعد از مدت ۱۰ ساعت به پلت‌های متناسب با اندازه دهان ماهیان خرد شدند. پلت‌های غذایی در ادامه درون کیسه‌های پلاستیکی درون یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری شدند.

اجزا خوراک مصرفی در جدول ۲ آمده است. همچنین، تعداد ۱۵ مخزن از جنس پلی‌اتیلن به حجم ۵۰۰ لیتر استفاده شد. برای هر تیمار ۳ تکرار و در هر تکرار ۲۵ عدد بچه ماهی در نظر گرفته شد. جیره‌های آزمایشی (جدول ۱) به طور هفتگی تهیه شد. جیره غذایی شاهد بدون اسید فولیک نیز در طول آزمایش در نظر گرفته شد. غذا دهی به صورت روزانه در ساعات ۰۶:۰۰، ۱۰:۰۰، ۱۴:۰۰ و ۱۸:۰۰ متناسب با دمای آب و وزن بدن انجام شد (NRC, 1993).

نانوکیتوزان مورد استفاده در این مطالعه از شرکت دانش بنیان نانو پوشش یکتا در تهران تهیه شد. کیتوزان مصرفی با نام Middle-viscous crab shell chitosan (MVC) و درجه داستیلاسیون متوسط ۹۵ درصد، وزن مولکولی ۱۰۰۰ کیلو دالتون و درجه خلوص ۹۰ درصد بود. آماده‌سازی نانوذرات کیتوزان-اسید فولیک از طریق تشکیل ژلاسیون یونی بین گروه‌های اسید آمینه با بار مثبت کیتوزان اسید سیتریک و اسید فولیک انجام شد. به این منظور، ۰/۲ گرم اسید سیتریک، ۱ گرم نانوذرات کیتوزان و ۰/۵۵ گرم اسید فولیک در ۱۰ سی‌سی آب مقطر مخلوط و روی همزن مغناطیسی به مدت ۳ ساعت در دمای زیر ۲۰ درجه سانتی‌گراد و تاریکی قرار گرفت. مخلوط حاصل در سانتریفیوژ به مدت ۳۰ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، پس از انجام فریز درایر به مدت ۲۴ ساعت نمونه بارگذاری شده زرد رنگ بدست آمد. اندازه‌گیری اندازه ذرات، پتانسیل زتا و ذرات باردار شده نانو کایتوزان / فولیک اسید، با استفاده از روش پراکندگی نور دینامیکی به وسیله دستگاه (Dynamic Light Scattering) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. همچنین، ریخت‌شناسی ذرات باردار شده به وسیله دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FESEM) در ولتاژ ۱۵ کیلو وات مشخص شد (Khanmohammadi et al. 2015).

مطالعه حاضر در پاییز سال ۱۳۹۸ در مزرعه مدار بسته شرکت آبی اکسیر کوثر به مدت ۸ هفته واقع در استان

جدول ۱ گروه‌های آزمایشی دریافت کننده مقادیر متفاوت از گرم نانوذرات کیتوزان - اسید فولیک (Lin et al. 2011)

نام تیمار	گروه آزمایشی
تیمار ۱	شاهد
تیمار ۲	۰/۱ میلی‌گرم نانوذرات کیتوزان-اسید فولیک
تیمار ۳	۰/۲۵ میلی‌گرم نانوذرات کیتوزان-اسید فولیک
تیمار ۴	۰/۵ میلی‌گرم نانوذرات کیتوزان-اسید فولیک
تیمار ۵	۱ میلی‌گرم نانوذرات کیتوزان-اسید فولیک

جدول ۲ ترکیبات شیمیایی و آنالیز تقریبی جیره غذایی مورد استفاده برای تغذیه قزل‌آلای رنگین کمان

ترکیب	گرم در کیلوگرم
پودر ماهی	۶۳
پودر سویا	۱۳
گلو تن گندم	۲
روغن ماهی	۹
روغن سویا	۵
مخلوط ویتامین ^۱	۲
مخلوط ماده معدنی ^۲	۳
هم‌بند	۳
آنالیز تقریبی	
پروتئین خام	۱۷/۵
خاکستر	۱۲/۴
رطوبت	۷/۵
کربوهیدرات	۱۰/۲

^۱هر کیلوگرم پرمیکس ویتامین حاوی ۵۰۰۰۰۰ IU ویتامین A، ۴۰۰۰۰۰ IU ویتامین D3، ۱۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین K3، ۱۵۰۰۰ میلی‌گرم نیکوتونیک اسید، ۵۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین B1، ۵۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین B2، ۳۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین B6، ۲۵۰۰۰ میلی‌گرم اینوزیتول، ۸۰۰۰ میلی‌گرم آنتی‌اکسیدان، ۴۰۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین E.

^۲هر کیلوگرم مواد معدنی حاوی ۲۶۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۶۰۰۰ میلی‌گرم مس، ۴۰۰۰ میلی‌گرم آهن، ۶۰۰۰ میلی‌گرم روی، ۵۰۰ میلی‌گرم سلنیوم، ۲۰۰۰ میلی‌گرم ید، ۵۰۰ میلی‌گرم کبالت، ۱۲۰۰۰۰ میلی‌گرم کولین کلراید.

به منظور اندازه‌گیری طول کل و طول چنگالی برای اندازه‌گیری شاخص وضعیت از تخته زیست‌سنجی و خط‌کش فلزی با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر و برای تعیین وزن کل، وزن کبد، وزن روده و امعاء و احشا از ترازوی مدل (TTA 5500) با دقت ۰/۱ استفاده شد، تمام تیمارها ۲۴ ساعت قبل از نمونه‌گیری قطع غذادهی شدند. برای بیهوشی از ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک (*Syzygium aromaticum*) استفاده شد. بعد از بیهوشی از تمام تیمارها نمونه‌گیری و تشریح انجام شد.

شاخص رشد و کارایی تغذیه شامل افزایش وزن بدن (WG)، درصد افزایش وزن بدن (BWI)، نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب وضعیت (CF)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، درصد بقاء (SR)، شاخص کبدی (HSI) و شاخص احشایی (VIS) در انتهای آزمایش طبق روابط زیر محاسبه شد:

به منظور اندازه‌گیری طول کل و طول چنگالی برای اندازه‌گیری شاخص وضعیت از تخته زیست‌سنجی و خط‌کش فلزی با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر و برای تعیین وزن کل، وزن کبد، وزن روده و امعاء و احشا از ترازوی مدل (TTA 5500) با دقت ۰/۱ استفاده شد، تمام تیمارها ۲۴ ساعت قبل از نمونه‌گیری قطع غذادهی شدند. برای بیهوشی از ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک (*Syzygium aromaticum*) استفاده شد.

$$\text{درصد افزایش وزن بدن} = \frac{\text{وزن اولیه (گرم)} - \text{وزن نهایی (گرم)}}{\text{وزن اولیه (گرم)}} \times 100$$

(Huanga et al. 2003)

$$\text{وزن اولیه (گرم)} - \text{وزن نهایی (گرم)} = \text{افزایش وزن}$$

(Huanga et al. 2003)

$$\text{درصد نرخ رشد ویژه} = \frac{\text{وزن اولیه (گرم)} - \text{وزن نهایی (گرم)}}{\text{دوره پرورش به روز}} \times 100$$

(Esmaelei and Khara, 2014)

$$\text{درصد شاخص وضعیت} = \frac{\text{وزن نهایی (گرم)}}{\text{طول چنگالی (سانتی متر مکعب)}} \times 100$$

(Falah et al. 2020)

$$\text{ضریب تبدیل غذایی} = \frac{\text{مقدار غذای مصرفی (گرم)}}{\text{افزایش وزن (گرم)}}$$

(Huanga et al. 2003)

$$\text{درصد بازماندگی} = \frac{\text{تعداد نهایی ماهیان}}{\text{تعداد اولیه ماهیان}} \times 100$$

(Huanga et al. 2003)

$$\text{درصد شاخص کبدی} = \frac{\text{وزن کبد (گرم)}}{\text{وزن بدن (گرم)}} \times 100$$

(Ighwela et al. 2014)

$$\text{درصد شاخص احشایی} = \frac{\text{وزن احشا (گرم)}}{\text{وزن بدن (گرم)}} \times 100$$

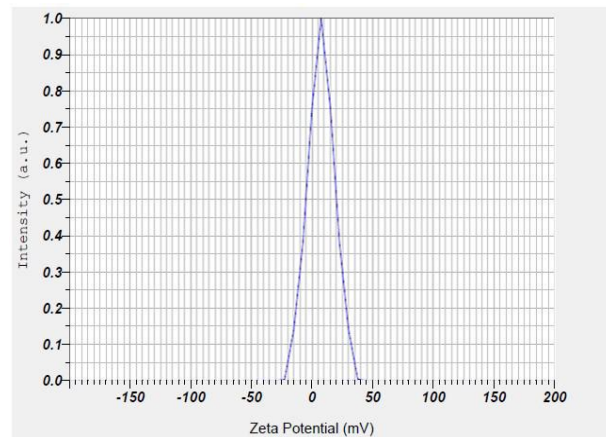
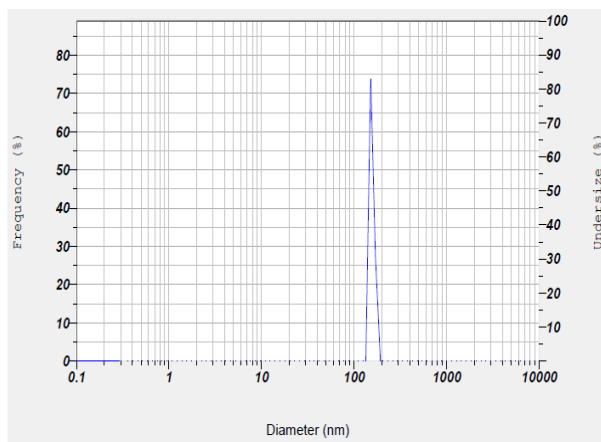
(Ighwela et al. 2014)

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۱) و تست جداساز دانکن و کوادراتیک استفاده شد. قبل از انجام آزمون آنالیز واریانس، نرمال بودن داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. تمام آنالیزها و آزمایشات با سه تکرار انجام شد. همچنین، در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌داری ۹۵ درصد در نظر گرفته شدند. ترسیم نمودارها در نرم‌افزار Excel, 2019 انجام شد.

نتایج

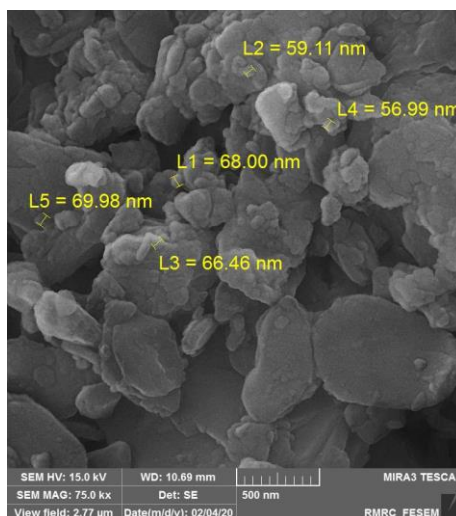
اندازه متوسط نانوذرات کیتوزان متصل به اسید فولیک ۱۴۷/۴ ± نانومتر (شکل ۱) به دست آمد که بیشترین درصد نانوذرات مربوط به اوج بیش از ۱۴۷ نانومتر بود. میانگین پتانسیل زتای نانوذره کیتوزان-اسید فولیک ۷/۵ میلی‌ولت مثبت شد.



شکل ۱ اندازه (الف) و پتانسیل زتا (ب) نانوذرات کیتوزان - اسید فولیک

متفاوت ساختار نانوذرات پیوسته، کروی، یکنواخت و سطح خشن را نشان داد.

خصوصیات مورفولوژیک نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با اسید فولیک در شکل ۲ مشخص شده است. اندازه‌های

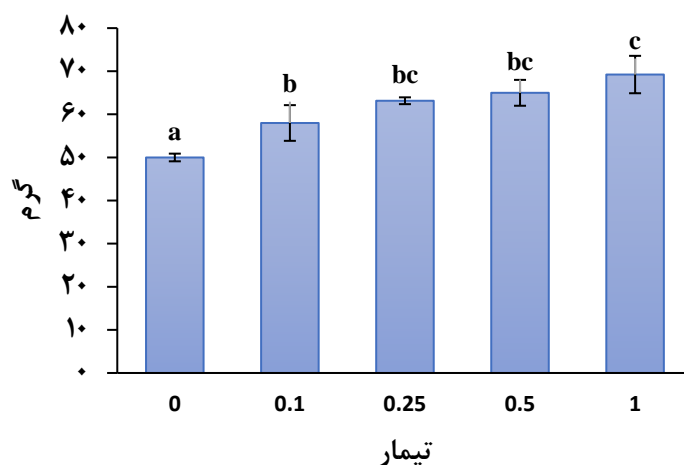


شکل ۲ تصویر میکروسکوپ الکترونی از ذرات نانو کیتوزان - اسید فولیک

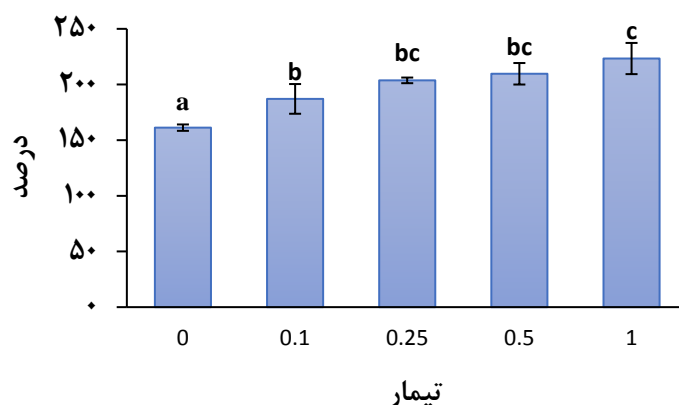
SGR و BWI، WG

با توجه به جدول ۳ بیشترین میانگین وزن و طول نهایی در پایان دوره پرورش در ماهیان تغذیه شده با ۱ میلی‌گرم نانوذرات کیتوزان-اسید فولیک در غذا دیده شد و به ترتیب $4/33 \pm 100/23$ گرم و $21/27 \pm 0/45$ سانتیمتر مشخص شد. همچنین، هیچ مرگ و میری ثبت نشد و درصد بقا در تمام تیمارها ۱۰۰ درصد بود. بر اساس آزمون آنالیز واریانس یکطرفه تفاوت معنی‌داری بین تمام تیمار در **BWI، WG** و **SGR** ویژه مشاهده شد. افزایش سطح نانوذرات کیتوزان-اسید فولیک در رژیم‌های غذایی فرموله شده باعث **WG** و

SGR با بالاترین مقادیر در ماهیانی می‌شود که از رژیم غذایی مکمل ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات کیتوزان-اسید فولیک برخوردار بودند ($p < 0/05$) که به ترتیب $4/34 \pm 69/23$ گرم و $2/09 \pm 0/08$ درصد روزانه و کمترین میزان در شاهد ($49/99 \pm 0/89$ درصد $0/02 \pm 1/71$ درصد روزانه) مشاهده شد (شکل‌های ۳ و ۵). همچنین، بالاترین **BWI** در تیمار ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات کیتوزان-اسید فولیک به میزان $223/34 \pm 2/86$ درصد و پایین‌ترین مقدار در شاهد به میزان $161/25$ دیده شد (شکل ۴).



شکل ۳ مقایسه میانگین افزایش وزن بدن در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان انگشت قد تغذیه شده با تیمارهای متفاوت از نانوذرات کیتوزان-اسید فولیک (میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا) در پایان دوره آزمایش

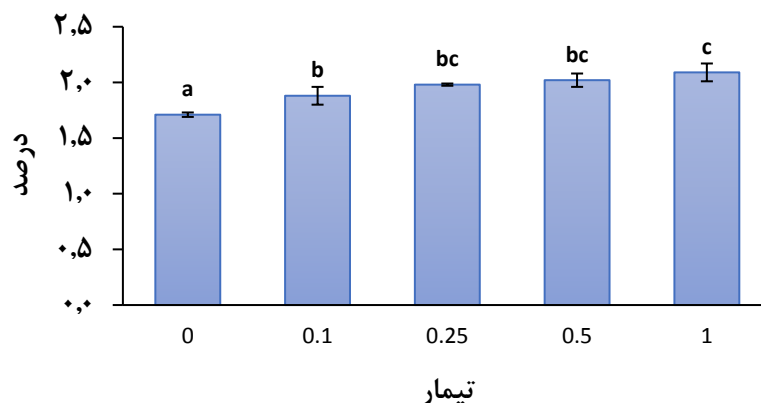


شکل ۴ مقایسه میانگین درصد افزایش وزن بدن در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان انگشت قد تغذیه شده با تیمارهای متفاوت از نانوذرات کیتوزان-اسید فولیک (میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا) در پایان دوره آزمایش

جدول ۳ فراسنجه‌های رشد در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با تیمارهای متفاوت نانوذرات کیتوزان اسید فولیک (میلی‌گرم در کیلوگرم غذا)

Quadratic Trend	Linear Trend	ANOVA	جیره آزمایشی نانوذرات کیتوزان - اسید فولیک (میلی‌گرم در کیلوگرم غذا)					
			۱	۰/۵۰	۰/۲۵	۰/۱۰	صفر	
-	-	-	۳۰ ± ۲	۳۰ ± ۲	۳۰ ± ۲	۳۰ ± ۲	۳۰ ± ۲	میانگین وزن اولیه
۰/۲۱	.	۰/۰۰۱	۱۰۰/۲۳ ± ۴/۳۳ ^b	۹۵/۹۹ ± ۲/۹۹ ^b	۹۴/۱۵ ± ۰/۷۸ ^{ab}	۸۸/۹۹ ± ۴/۱۳ ^{ab}	۸۰/۹۹ ± ۰/۸۹ ^a	میانگین وزن نهایی
۰/۷	۰/۰۱۱	۰/۰۷۶	۲۱/۲۷ ± ۰/۴۵ ^c	۲۱/۲۰ ± ۰/۲۳ ^{bc}	۲۰/۶۷ ± ۰/۳۷ ^{bc}	۲۰/۸۶ ± ۰/۴۳ ^b	۲۰/۲۵ ± ۰/۰۵ ^a	میانگین طول نهایی
۰/۲۰۸	.	۰/۰۰۱	۶۹/۲۳ ± ۴/۳۴ ^c	۶۴/۹۹ ± ۳ ^{bc}	۶۳/۱۵ ± ۰/۷۹ ^{bc}	۵۷/۰۹۹ ± ۴/۱۴ ^b	۴۹/۹۹ ± ۰/۸۹ ^a	افزایش وزن بدن (g)
۰/۲۰۸	.	۰/۰۰۱	۲۲۳/۳۴ ± ۱۴ ^c	۲۰۹/۶۵ ± ۹/۶ ^{bc}	۲۰۳/۷۲ ± ۲/۵۳ ^{bc}	۱۸۷/۰۷ ± ۱۳/۳۵ ^b	۱۶۱/۲۵ ± ۲/۸۶ ^a	درصد افزایش وزن بدن
۰/۱۳۴	.	۰/۰۰۱	۲/۰۹ ± ۰/۰۸ ^c	۲/۰۲ ± ۰/۰۶ ^c	۱/۹۸ ± ۰/۰۱ ^{bc}	۱/۸۸ ± ۰/۰۸ ^b	۱/۷۱ ± ۰/۰۲ ^a	نرخ رشد ویژه (/.)
۰/۰۴۸	.	.	۱/۲۹ ± ۰/۰۸ ^c	۱/۳۱ ± ۰/۰۶ ^c	۱/۳۵ ± ۰/۰۲ ^{bc}	۱/۴۸ ± ۰/۰۱ ^b	۱/۶۴ ± ۰/۰۳ ^a	ضریب تبدیل غذایی (g)
۰/۳۵۲	۰/۰۴۴	۰/۰۴۶	۱/۰۸ ± ۰/۰۴ ^{ab}	۱/۰۴ ± ۰/۰۲ ^{ab}	۱/۱۲ ± ۰/۰۶ ^b	۱/۰۲ ± ۰/۰۲ ^a	۱/۰۱ ± ۰/۰۱ ^a	شاخص وضعیت (گرم/سانتی متر مکعب)
۰/۷۰۵	۰/۹۷۷	۰/۹۶۹	۱/۲ ± ۰/۱۵ ^a	۱/۱۹ ± ۰/۱۶ ^a	۱/۳۱ ± ۰/۲۴ ^a	۱/۱۹ ± ۰/۱ ^a	۱/۲ ± ۰/۳ ^a	شاخص کبدی (/.)
۰/۲۶۵	۰/۸۹۱	۰/۶۶۴	۸/۸ ± ۰/۹۹ ^a	۸/۸۵ ± ۰/۹ ^a	۱۰/۰۷ ± ۱/۵۹ ^a	۹/۰۳ ± ۰/۵۴ ^a	۸/۵۳ ± ۱/۰۶ ^a	شاخص احشایی (/.)

حروف غیرهمسان در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد و داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشد.

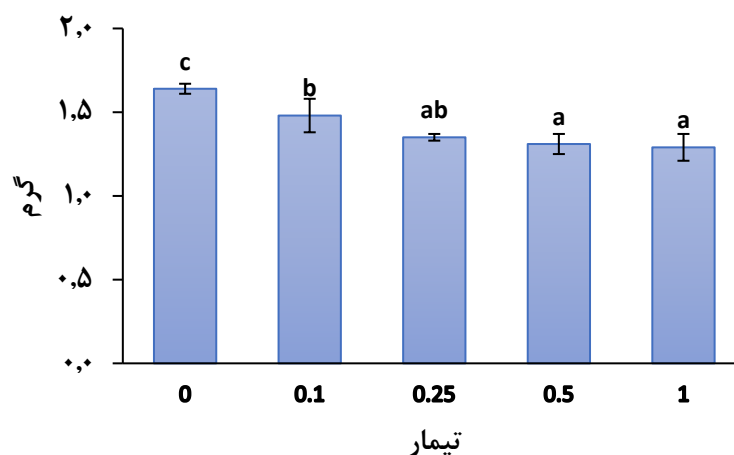


شکل ۵ میانگین نرخ رشد ویژه در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان انگشت‌قد تغذیه شده با تیمارهای متفاوت از نانوذرات کیتوزان - اسید فولیک (میلی گرم بر کیلوگرم غذا) در پایان دوره آزمایش

میلی گرم در کیلوگرم رژیم غذایی مکمل نانوذرات کیتوزان - اسید فولیک به کمترین مقدار به میزان $1/29 \pm 0/08$ گرم رسیده است ($p < 0/05$) و بیشترین مقدار FCR در شاهد به میزان $1/64 \pm 0/03$ گرم مشخص گردید (شکل ۶).

FCR

طبق جدول ۳ تفاوت معنی‌داری بین تمام تیمارها در FCR مشاهده شد ($p < 0/05$). FCR با افزایش سطح نانوذرات کیتوزان-اسید فولیک در رژیم‌های غذایی فرموله شده به طور خطی کاهش یافته و در ماهی‌های تغذیه شده با ۱

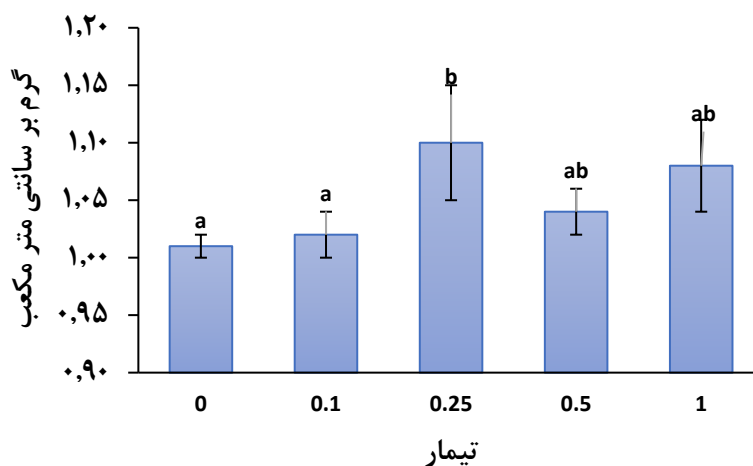


شکل ۶ ضریب تبدیل غذا در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان انگشت‌قد تغذیه شده با تیمارهای متفاوت از نانوذرات کیتوزان - اسید فولیک (میلی گرم بر کیلوگرم غذا) در پایان دوره آزمایش

بر سانتی متر مکعب نشان دادند ($p < 0/05$) و کمترین CF در شاهد به میزان $1/01 \pm 0/01$ گرم بر سانتی متر مکعب مشخص شد (شکل ۷).

CF

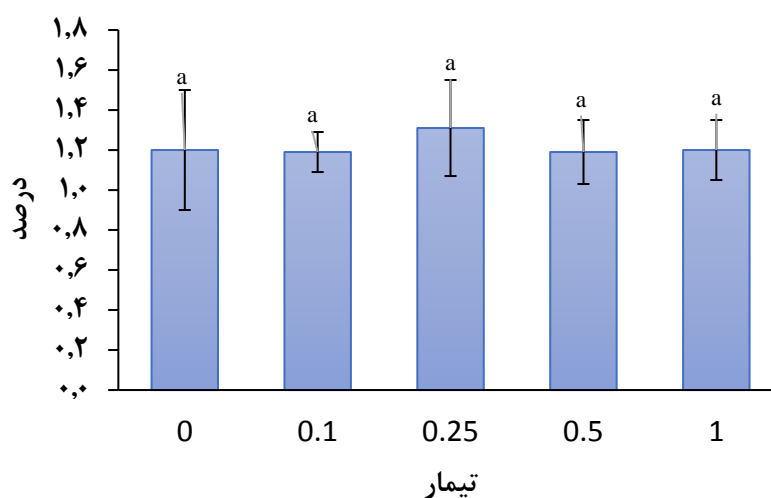
در بررسی انجام شده در رابطه با سنجش CF، ماهیانی که با رژیم غذایی مکمل $0/25$ نانوذره کیتوزان-اسید فولیک تغذیه شدند، بالاترین CF را به میزان $1/10 \pm 0/05$ گرم



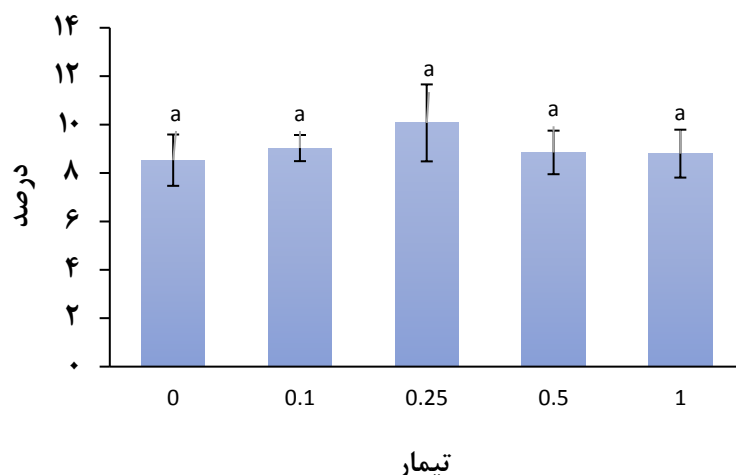
شکل ۷ شاخص وضعیت در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت قد تغذیه شده با تیمارهای متفاوت از نانوذرات کیتوزان - اسید فولیک (میلی گرم بر کیلوگرم غذا) در پایان دوره آزمایش

مکمل نانوذرات کیتوزان-اسید فولیک بیشترین مقدار HSI به میزان 0.24 ± 0.31 درصد رسید ($p < 0.05$) و بیشترین مقدار VIS به میزان 1.59 ± 1.07 درصد مشخص شد.

نتایج تجزیه واریانس یک‌طرفه در HSI و VIS ماهیان بیانگر عدم وجود اختلاف آماری معنی‌دار، بین تیمارهای مورد آزمایش بود ($p > 0.05$) (شکل‌های ۸ و ۹). در ماهی-های تغذیه شده با ۰/۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم رژیم غذایی



شکل ۸ شاخص کبدي در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت قد تغذیه شده با تیمارهای متفاوت از نانوذرات کیتوزان - اسید فولیک (میلی گرم بر کیلوگرم غذا) در پایان دوره آزمایش



شکل ۹ شاخص احشایی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان انگشت قد تغذیه شده با تیمارهای متفاوت از نانوذرات کیتوزان - اسیدفولیک (میلی گرم بر کیلوگرم غذا) در پایان دوره آزمایش

گرفت که از رژیم غذایی مکمل ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات کیتوزان - اسید فولیک برخوردار بودند ($P < 0.05$) که به ترتیب ۱۴ ± ۲۲۳/۳۴ درصد و ۰/۰۸ ± ۲/۰۹ درصد روزانه و کمترین میزان در شاهد (۲/۸۶ ± ۱۶۱/۲۵ درصد و ۰/۰۲ ± ۱/۷۱ درصد روزانه) مشخص شد. FCR با افزایش سطح نانوذرات کیتوزان - اسید فولیک در رژیم‌های غذایی فرموله شده به طور خطی کاهش یافت که این موضوع نشان‌دهنده جذب بالا، عمر مفید نانوذرات کیتوزان - اسید فولیک و تاثیر مستقیم آن روی شاخص‌های رشد بوده است. همچنین، کمترین میزان FCR در ماهیان تغذیه شده با ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات کیتوزان حاوی اسید فولیک دیده شد که می‌تواند در نتیجه بهبود رشد توسط اسید فولیک و افزایش مصرف و کارایی خوراک باشد که نقش مکمل اسید فولیک در استفاده از خوراک ماهی قزل‌آلای رنگین کمان را اثبات می‌کند. گزارش‌های قبلی نیز رابطه مثبت مشابهی را بین رشد و مکمل اسید فولیک رژیم غذایی لازم برای رشد تیلاپیا (۰/۸۲ میلی‌گرم در کیلوگرم (Shiau and Huang, 2001)، هامور (۰/۸ میلی‌گرم در کیلوگرم، Lin et al. 2011)، قزل‌آلای رنگین کمان (۰/۱۶ - ۰/۳ میلی‌گرم در کیلوگرم، Cowey and Woodward, 1993) و سیم پوزه کند انگشت قد (۰/۶۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم، Sesay et al. 2016) نشان داد.

بحث

اسید فولیک یک ریزمغذی مهم است که بدن برای رشد طبیعی، رشد و نگهداری از گونه‌های عمده ماهیان پرورشی از طریق نقش حیاتی آن در متابولیسم اسیدهای آمینه (Ducker and Rabinowitz, 2017; Steele et al. 2020) و سنتز DNA مورد نیاز است (Gazzali et al. 2016; Hansen et al. 2015). از آنجایی که سلول‌های حیوانی فاقد آنزیم‌های کلیدی درگیر در مسیر بیوسنتز فولات هستند (Cossins, 2000)، برای تکثیر، تکامل و هموستاز طبیعی سلول‌ها به یک منبع رژیم غذایی نیاز دارند (Shi et al. 2015; Sesay et al. 2017). نتایج آزمایشات حاصل از این مطالعه در طول ۸ هفته سنجهش رژیم غذایی حاوی نانوذرات کیتوزان - اسید فولیک نشان داد که با افزایش سطح نانوذرات کیتوزان - اسید فولیک در رژیم غذایی فرموله شده روند افزایشی در وزن و نرخ رشد ویژه مشاهده می‌گردد و به وضوح مشخص شد که اسید فولیک موجود در نانوذرات می‌تواند نیاز ماهی قزل‌آلای رنگین کمان را برای رشد تامین کند. همچنین، هیچ مرگ و میری در رژیم غذایی پایه ثبت نشد که می‌تواند به سنتز اسید فولیک توسط باکتری‌های روده نسبت داده شود (Cowey and Woodward, 1993). مطالعه حاضر به وضوح نشان داد که عملکرد رشد ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان به طور قابل توجهی تحت تأثیر غلظت نانوذرات کیتوزان - اسید فولیک در رژیم غذایی با بالاترین درصد افزایش وزن و نرخ رشد ویژه در ماهیانی قرار

کیتوزان مورد استفاده در مطالعه حاضر باشد که می‌تواند نیازهای آن را در غلظت‌های پایین‌تر تامین کند. با افزایش نانوذرات کیتوزان-اسید فولیک تا ۰/۲۵ میلی‌گرم کیلوگرم در رژیم غذایی یک افزایش خطی و قابل توجه در CF ماهی ثبت شد که نشان دهنده وضعیت مناسب تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با مقدار اسید فولیک تغذیه شده است. در یک ارزیابی کلی استفاده از ۱ میلی‌گرم نانوذرات کیتوزان-اسید فولیک در کیلوگرم غذا به طور قطع تاثیر مثبتی روی رشد و استفاده از خوراک در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان انگشت قد از طریق افزایش درصد جذب خواهد داشت. همچنین، بهترین پاسخ در ماهیانی که دارای بالاترین نانوذرات کیتوزان در رژیم غذایی هستند مشاهده شد.

منابع

- Alishahi, A., Mirvaghefia, A., Tehranib, M.R., Farahmanda, H., Koshioc, S., Dorkooshb, F.A., Elsabee, M.Z. 2010. Chitosan nanoparticle to carry vitamin C through the gastrointestinal tract and induce the non-specific immunity system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Carbohydrate Polymers 8: 243-251.
- Andrianov, A.K., Payne, L.G. 1998. Polymeric carriers for oral uptake of microparticulates. Advance Drug Delivery Reviews 34: 155-170.
- Borradale, D., Isenring, E., Hacker, E., Kimlin, M.G. 2014. Exposure to solar ultraviolet radiation is associated with a decreased folate status in women of childbearing age. Journal of Photochemistry and Photobiology 131B: 90-95.
- Chellappa, S., Huntingford, F.A., Strang, R.H.C., Thomson, R.Y. 1995. Condition factor and hepatosomatic index as estimates of energy status in male three-spined stickleback. Journal of Fish Biology 47: 775-787.
- Cossins, E.A. 2000. Canadian society of plant physiologists gold medal review / synthèsemédaille d'or de la Société HSI معمولا یک نشانگر زیستی مفید برای شناسایی اثرات خطرناک عوامل تنش‌زای محیطی است (Pait and Nelson, 2003). علاوه بر شاخص HSI، VIS و CF به عنوان شاخص‌های مهم برای ارزیابی وضعیت تغذیه‌ای و سلامتی ماهی استفاده می‌شوند (Chellappa et al. 1995). در مطالعه حاضر بر اساس آزمون آنالیز واریانس یکطرفه اختلاف آماری معنی‌داری با افزایش میزان اسید فولیک بین تمام تیمارها در HSI، VIS و CF مشاهده نشد ($p > 0.05$). مطابق با نتایج فعلی، HSI پایین‌تر در ماهیان خاویاری سبیری (Falaha et al. 2020)، سیم پوزه کند (Sesay et al. 2016)، هامور (Lin et al. 2011) و قزل‌آلای رنگین کمان (Kitamura et al. 1967) که با رژیم غذایی مکمل اسید فولیک تغذیه شده بودند گزارش شد. این ناهماهنگی در یافته‌ها ممکن است به دلیل تفاوت در نیازهای فیزیولوژیک هر گونه، رژیم‌های تغذیه‌ای و حتی زیست‌فراهمی ویتامین B9 محصور شده در نانوذرات canadienne physiologie végétale the fascinating world of folate and one-carbon metabolism. Canadian Journal of Botany 78: 691-708.
- Cowey, C.B., Woodward, B. 1993. The dietary requirement of young rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) for folic acid. The Journal of Nutrition 123: 1594-1600.
- Ducker, S., Rabinowitz, J.D. 2017. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. Cell Metabolism 25: 27-42.
- Esmaili, B., 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 13: 931-943.
- Falaha, F.J., Rajabi Islami, H., Shamsaie Mehrgan, M. 2020. Dietary folic acid improved growth performance, immunophysiological response and antioxidant status of fingerling Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* (Brandt 1896). Aquaculture Reports 17: 100391.
- Gazzali, A.M., Lobry, M., Colombeu, L., Acherar, S., Azais, H., Mordon, S., Arnoux, P., Baros, F., Vanderesse, R.,

- Frochot, C. 2016. Stability of folic acid under several parameters European Journal of Pharmaceutical Sciences 93: 419-430.
- Hansen, A.C., Waagbø, R., Hemre, G.I. 2015. New B vitamin recommendations in fish when fed plant-based diets. Aquaculture Nutrition 21: 507-527.
- Hu, B., Pan, C., Sun, Y., Hou, Z., Ye, H., Zeng, X. 2008. Optimization of fabrication parameters to produce chitosan tripolyphosphate nanoparticles for delivery of tea catechins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56: 7451-7458.
- Huanga, C.H., Changa, R.J., Huang, S.L., Chen, W. 2003. Dietary vitamin E supplementation affects tissue lipid peroxidation of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. Comparative Biochemistry and Physiology 134B: 265-270.
- Ighwela, K.A., Ahmad, A.B., Munafi, A.B.A. 2014. The selection of viscerosomatic and hepatosomatic indices for the measurement and analysis of *Oreochromis niloticus* condition fed with varying dietary maltose levels. International Journal of Fauna and Biological Studies 1: 18-20.
- Jang, K.I., Lee, H.G. 2008. Stability of chitosan nanoparticles for L-ascorbic acid during heat treatment in aqueous solution. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56: 1936-1941.
- Jollès, P., Muzzarelli, R.A.A. 1999. Chitin and Chitinases. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, p. 360.
- Khanmohammadi, M., Elmizadeh, H., Ghasemi, K. 2015. Investigation of size and morphology of chitosan nanoparticles used in drug delivery system employing chemometric technique. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 14: 665-675.
- Kitamura, S., Suwa, T., Ohara, S., Nakagawa, K. 1967. Studies on vitamin requirements of rainbow trout-II. The deficiency symptoms of fourteen kinds of vitamin. Bulletin of the Japanese Society of Fisheries 33: 1120-1125.
- Kotze, A.F., Luessen, H.L., de Leeuw, B.J., de Boer, A.G., Verhoef, J.C., Junginger, H.E. 1998. Comparison of the effect of different chitosan salts and N-trimethyl chitosan chloride on the permeability of intestinal. Journal of Controlled Release 51: 35-46.
- Li, P.W., Wang, G., Yang, Z.M., Duan, W., Peng, Z., Kong, L.X., et al. 2016. Development of drug-loaded chitosan-vanillin nanoparticles and its cytotoxicity against HT-29 cells. Drug Delivery 23: 30-35
- Lin, Y.H., Lin, H.Y., Shiau, S.Y. 2011. Dietary folic acid requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, and its effects on non-specific immune responses. Aquaculture 317: 133-137.
- Marchetti, C., Palaia, I., Giorgini, M., De Medici, C., Iadarola, R., Vertechy, L., Domenici, L., Di Donato, V., Tomao, F., Muzii, L., Panici, P.B. 2014. Targeted drug delivery via folate receptors in recurrent ovarian cancer: a review. OncoTargets and Therapy 7:1223-1236
- Müller, C. 2013. Folate-based radiotracers for PET imaging-update and perspectives. Molecules 18: 5005-5031.
- NRC (National Research Council), 1993. Nutrient Requirement of Fish. National Academy Press, Washington, D.C., USA. 182P.
- NRC (National Research Council), 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academy Press, Washington, DC, USA, 114 pp.
- Pait, A.S. and Nelson, J.O. 2003. Vitellogenesis in male *Fundulus heteroclitus* (Killifish) induced by selected estrogenic compounds. Aquatic Toxicology 64: 331-342.
- Sesay, D.F., Tsion, H.M.H., Zhou, Q., Ren, M., Xie, J., Liu, B., Chen, R., Pan, L. 2016. Effects of dietary folic acid on the growth, digestive enzyme activity, immune response and antioxidant enzyme activity of blunt snout bream

- (*Megalobrama amblycephala*) fingerling. *Aquaculture* 452: 142-150.
- Schieferstein, H., Ross, T.L. 2013. F-18-labeled folic acid derivatives for imaging of the folate receptor via positron emission tomography. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 56: 432-440.
- Shiau, S.Y., Huang, S.Y. 2001. Dietary folic acid requirement determined for grass shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 200: 339-347.
- Shi, L., Feng, L., Jiang, W.D., Liu, Y., Jiang, J., Wu, P., Zhou, X.Q. 2015. Folic acid deficiency impairs the gill health status associated with the NF- κ B, MLCK and Nrf2 signaling pathways in the gills of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish and Shellfish Immunology* 47: 289-301.
- Steele, T., Singer, R.D., Bjørnson, S. 2020. Effects of food availability on microsporidiosis and alkaloid production in the two-spotted lady beetle, *Adalia bipunctata* L. *Journal of Invertebrate Pathology* 175: 107443.
- Vora, A., Riga, A., Dollimore, D., Alexander, K.S. 2002. Thermal stability of folic acid. *Thermochimica Acta* 392: 209-220.