تعیین نیازغذایی شاه میگوی چنگال باریک (*Astacus leptodactylus*) جوان به کلسترول در سامانه آبزی‌پروری مداربسته

رضا جلیلی[۱]، ناصر آق[۲*]، احمد ایمانی[۳]، فرزانه نوری[۴]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات و آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، پست الکترونیکی: re.jalili@gmail.com

۲- دانشیار پژوهشی، پژوهشکده آرتمیا و آبزی‌پروری، دانشگاه ارومیه، پست الکترونیکی: n.agh@urmia.ac.ir

۳- دانشیار گروه شیلات و آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، پست الکترونیکی: a.imani@urmia.ac.ir

۴- استادیار پژوهشی، پژوهشکده آرتمیا و آبزی‌پروری، دانشگاه ارومیه، پست الکترونیکی: f.noori@urmia.ac.ir

* نویسنده مسوول

تاریخ دریافت: ۹۸/۹/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۹/۴/۱۷

چکیده

کلسترول به عنوان یک ماده مغذی ضروری برای سخت پوستان است، اما تاکنون در خصوص نیاز غذایی شاه میگوی آب شیرین به کلسترول گزارشی ارائه نشده است. بنابراین مطالعه حاضر با هدف تعیین نیاز غذایی شاه میگوهای جوان به کلسترول در شرایط پرورش متراکم به مدت ۱۲ هفته انجام پذیرفت. بدین منظور، شاه میگوهای جوان (میانگین وزنی ۱ ± ۱۳/۸ گرم) در سامانه آبزی پروری مداربسته و در ۱۲ مخزن پرورشی با هوادهی و پناهگاه و ۱۰٪ تعویض آب روزانه ذخیره‌سازی شدند. چهار جیره خالص حاوی ۳۰ ٪ پروتئین و ۱۰ ٪ چربی به همراه چهار سطح مکمل تجاری کلسترول (شامل صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد کلسترول) تنظیم شد. کازئین و ژلاتین به عنوان منابع اصلی پروتئین در جیره آزمایشی استفاده گردید. بر اساس نتایج بدست آمده، کمترین و بیشترین شاخص های رشد، بازماندگی و فعالیت آنزیم های گوارشی پروتئاز کل، لیپاز و آمیلاز به ترتیب در شاه میگوهای تغذیه شده با جیره های غذایی فاقد و حاوی ۰/۵ درصد کلسترول مشاهده گردید (P<۰/۰۵). همچنین با افزایش کلسترول جیره به میزان ۰/۷۵ درصد تفاوت معنی داری در شاخص های رشد و فعالیت آنزیم های پروتئاز و آمیلاز مشاهده نگردید (P>۰/۰۵) ولی شاخص بازماندگی و فعالیت آنزیم لیپاز بطور معنی داری کاهش یافت (P<۰/۰۵). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که افزودن ۰/۵ درصد کلسترول به جیره غذایی شاه میگوهای پرورشی در سیستم متراکم متکی به جیره غذایی دستی سبب بهبود شاخص های رشد و فعالیت آنزیم های گوارشی می گردد.

کلمات کلیدی: *نیاز غذایی، کلسترول، شاه میگوی آب شیرین، سامانه مداربسته پرورش آبزیان، Astacus leptodactylus*

۱. مقدمه

شاه میگو (خرچنگ دراز آب شیرین) به بزرگترین راسته از سخت‌پوستان یعنی ده‌پایان متعلق بوده و تنها نمایندگان خزندگان بزرگ-چنگال در آب شیرین به شمار می‌روند (Holdich, 2002). شاه میگوی آب شیرین موجود در کشور گونه *Astacus leptodactylus* است (Nezami, 1997). گونه‌های مختلف شاه میگو در مقیاس وسیع در آمریکا، چین و استرالیا پرورش می‌یابد (Holdich, 2002). به خاطر کاهش میزان برداشت از ذخایر گونه بومی اروپا (*A. astacus*)، واردات نقش مهم تری در تأمین بازار

مصرف کشورهای اروپایی بر عهده دارد. قیمت بالای خرچنگ در اروپای مرکزی و کشورهای اسکاندیناوی سبب تشویق پرورش‌دهندگان به پرورش آن گردیده است (Wolf, 2004). اقتصادی بودن پرورش، که برای گونه‌های متداول در بخش آبزی پروری مطرح است، در ارتباط با شاه میگو نمی‌تواند موضوع نگران کننده ای باشد، چرا که: (۱) امکان پرورش آن در استخرهای خاکی ارزان قیمت و حتی کانال‌های آبرسانی، (۲) کشت توأم آن با برنج و سایر محصولات کشاورزی و (۳) امکان برداشت چندین باره تنها با یک بار ذخیره‌سازی در استخرهای پرورشی وجود دارد (Avault and Huner, 1985).

کاهش دسترسی به زمین و منابع آب کافی سبب افزایش اهمیت پرداختن به سامانه پرورش متراکم آبزیان شده است. تهیه جیره غذایی متعادل برای موفقیت آبزی پروری در این سامانه‌ها امری ضروری است، چرا که موجود تنها از طریق جیره‌های دستی قادر به تامین نیازهای متابولیکی خود جهت رشد بهینه است. هنوز فاصله زیادی با دایر نمودن سامانه‌های پرورش متراکم شاه میگوی آب شیرین (*Astacus leptodactylus*) وجود دارد و از عوامل مهم توسعه موفقیت‌آمیز این سامانه‌ها می‌توان به تغذیه کارآمد در کنار عوامل دیگر نظیر تهیه مواد اولیه مقرون به صرفه جهت ساخت سامانه‌های پرورشی، طراحی مطلوب این سامانه‌ها جهت حفظ کیفیت مناسب آب و تعیین تراکم مناسب پرورش اشاره نمود. تغذیه ناکارآمد و هزینه بالای عملیات از موانع مهم عدم توسعه این سیستم‌ها به شمار می‌روند. با این حال این سیستم‌ها برای شاه میگوهای دریایی جنس *Homarus* موفق عمل کرده‌اند (Jussila, 1997). کمبود اطلاعات در زمینه احتیاجات غذایی شاه میگوی آب شیرین منجر به محدودیت توسعه پرورش نیمه متراکم و متراکم آن گردیده است. تلاش‌ها جهت پرورش متراکم شاه میگوی آب شیرین در استخرهای خاکی و مخازن پرورشی با منابع غذایی طبیعی محدود، سبب افزایش تقاضا برای جیره‌های مصنوعی مناسب جهت تأمین نیازهای غذایی این موجود شده است (Wolf, 2004). نتیجه آنکه کسب اطلاعات دقیق از نیازمندی‌های غذایی آبزیان به منظور تولید جیره های تجاری مقرون به صرفه جهت تأمین نیازهای غذایی گونه‌های پرورشی آبزیان بسیار ضروری به نظر می‌رسد (Cowey, 1988).

چربی‌ها و اسیدهای چرب ضروری از مهمترین مواد غذایی هستند که ضمن تاثیر مستقیم بر رشد، تأمین انرژی، تشکیل غشای سلولی و عملکرد سیستم ایمنی موجود زنده، در جذب سایر مواد مغذی نظیر ویتامین‌های محلول در چربی و رنگدانه‌ها و همچنین دیگر فرآیندهای متابولیکی نقش دارند (Goddard, 1996). بعلاوه این مواد منبع استرول‌ها و فسفولیپیدهای ضروری هستند. استرول‌ها علاوه بر دارا بودن وظایف متعدد زیستی، به عنوان آغازگر ساخت برخی ویتامین‌ها و هورمون‌ها نیز محسوب می‌شوند (Chen and Jenn, 1991).

شاه میگوها همانند سایر بند پایان قادر به ساخت استرول‌ها در بدن خود نیستند (Teshima et al., 1982; Teshima et al., 1986). مشخص شده است که با تغذیه میگوها با غذای فاقد استرول، میزان استرول بافت آن‌ها بعد از تغذیه کاهش می‌یابد، هر چند در تغذیه با غذای حاوی استرول، سطح بافتی آن ثابت ماند (Teshima, 1997). مهمترین استرول مورد استفاده کلسترول می‌باشد. سخت پوستان فاقد توانایی ساخت استرول‌ها می‌باشند. به طور مثال تزریق استات نشاندار به میگوی کروما نشان داد که این موجود نتوانسته است استات را در ساختمان کلسترول وارد نمایند، که مبین عدم توانایی این موجود در تولید زیستی کلسترول است (Kanazawa, 1971). بنابراین، حضور استرول‌ها و بخصوص کلسترول در غذا برای رشد و بقاء بهتر سخت پوستان ضروری است. کلسترول جزء اصلی غشای سلولی و پیش‌ساز هورمون‌های پوست‌اندازی و استروئیدی به شمار می‌رود. Sheen در سال (۲۰۰۰) اظهار داشت میزان نیاز سخت پوستان به کلسترول بسته به نوع ترکیب جیره نیز می تواند متفاوت باشد. همچنین سطح مورد نیاز در جیره تابعی از گونه و ترکیب استرول مصرفی است. به طور مثال این مقدار برای *Pacifastacus leniusculus* حدود ۱/۴ درصد استرول (ترکیبی از ۰/۴۷ درصد کلسترول و ۱/۳۹ درصد فیتوسترول) و میگوی بزرگ آب شیرین (*Macrobrachium rosenbergii*) ۱/۰–۰/۵ درصد، لابستر آمریکایی ۳/۰ درصد گزارش شده است.

در مطالعه‌ای که توسط Hernandez و همکاران (۲۰۰۴) در *Cherax quadricarinatus* جوان (۰/۰۶ g) انجام شد، مشخص گردید که خرچنگ‌های تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ درصد کلسترول وزن نهایی، درصد افزایش وزن و SGR (به ترتیب g ۱/۳، ۱۸۲۷ درصد، ۴/۹ درصد در روز) بیشتر و FCR (۱/۰۱) کمتری در مقایسه با گروه‌های دیگر (۰، ۰/۲۵، ۰/۷۵ و ۱ درصد) داشتند. همچنین جیره‌های حاوی کلسترول بالاتر از ۰/۵ درصد موجب کاهش رشد گردید. با این حال هنوز مکانیسم کاهش رشد ناشی از سطوح بالای کلسترول در سخت پوستان شناخته

نشده است. با رشد صنعت آبزی پروری و وابستگی آن به غذاهای دستی اقتصادی، بخش قابل توجهی از مطالعات تغذیه‌ای به توسعه جیره های دستی برای آبزیان پرداخته است. از اینرو مطالعه فیزیولوژی گوارش موجود می تواند به عنوان بخش ضروری تعیین میزان و نوع مواد مغذی جیره مطرح باشد (Tacon, 1995). به همین دلیل سنجش فعالیت آنزیم های گوارشی در مطالعات تغذیه‌ای آبزیان می تواند نشانگر کارکرد فیزیولوژیکی مناسب سیستم گوارش، کیفیت و سطوح مناسب ترکیب اجزاء جیره، کارایی تغذیه ای و نیز رشد موجود باشد (Bowyer et al., 2012).

پرورش متراکم شاه میگوی آب شیرین یکی از مباحث مهم در زمینه تنوع بخشی و همچنین توسعه پایدار صنعت پرورش آبزیان است. بدیهی است که در شرایط پرورش متراکم، نقش جیره غذایی حیاتی بوده و موجودات جهت دریافت نیازهای غذایی خود به غذای دستی متکی خواهند بود. از اینرو مطالعات هرچه بیشتر در خصوص تعیین نیازهای زیستی موجود در شرایط پرورشی متراکم ضروری می نماید. تا کنون مطالعات کمی در خصوص تعیین نیازهای غذایی و تنظیم جیره خرچنگ دراز آب شیرین صورت گرفته است. در همین راستا، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر سطوح مختلف کلسترول بر رشد، بقا و فعالیت آنزیم های گوارشی شاه میگوی آب شیرین تغذیه شده با جیره های خالص انجام گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱ پرورش شاه میگو

این مطالعه در پژوهشکده آرتمیا و آبزی پروری دانشگاه ارومیه روی شاه میگوهای جوان با میانگین وزنی ۱±۱۳/۸۰ گرم که با تراکم ۴ عدد در هر تانک (۱۸×۲۰×۳۰ بترتیب طول، عرض و ارتفاع)، بعبارتی ۶۶ عدد در مترمربع، ذخیره سازی شده بودند، انجام گرفت. همچنین نسبت جنسی آن‌ها ۱:۱ بود و آزمایش ۱۲ هفته به طول انجامید.

هر یک از مخازن پرورشی دارای ورودی و خروجی مجزا بوده و میانگین درجه حرارت (°C)، اکسیژن (ppm)، pH، نیتریت (ppm)، نیترات (ppm)، کلسیم (ppm) و سختی کل (mg $CaCO_3$/l) طی دوره پرورش به ترتیب ۱/۲±۱۶/۵، ۰/۲±۸/۱، ۰/۳±۷/۸، ۰/۰۰۳±۰/۰۰۸، ۰/۱۲±۰/۷۶، ۲/۴±۶۱/۲ و ۴/۵±۱۶۵ بود. سیستم پرورشی بصورت مدار بسته بود و روزانه حدود ۱۰ ٪ آب تعویض می‌گردید. همینطور میزان جریان ورودی تانک‌ها ۰/۲±۲ لیتر در دقیقه، دوره نوری شامل ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ روشنایی بود و جهت تنظیم pH و قلیاییت آب نیز از خرده صدف استفاده گردید. علاوه بر این، از سیستم هوادهی مرکزی و بخاری برای تنظیم اکسیژن محلول و دما استفاده شد.

شاه میگوها پس از سازگاری با شرایط پرورش، با چهار جیره غذایی خالص شامل جیره پایه و ۳ جیره حاوی سطوح مختلف مکمل کلسترول در سه تکرار و به مدت ۱۲ هفته تغذیه شدند. غذادهی به میزان ۴ ٪ وزن بدن و ۲ بار در روز (ساعت ۸ و ۲۲) صورت گرفت. تمام مخازن هر روز صبح از نظر حذف غذاهای باقیمانده، تعداد پوست اندازی، مرگ و میر، شستشو و آبگیری مورد رسیدگی قرار گرفتند. به منظور آگاهی از وضعیت رشد شاه میگو و همچنین محاسبه صحیح مقدار غذای روزانه، هر دو هفته یک بار تمام شاه میگوها از مخازن پرورش خارج و با ترازوی حساس (دقت ۰/۰۰۱ g) توزین شدند.

۲-۲ تهیه جیره های آزمایشی

در این مطالعه از یک جیره پایه خالص حاوی ۳۰٪ پروتئین و ۱۰ ٪ چربی استفاده شد. با توجه به نوع آزمایش، برای ساخت جیره‌های مورد نظر از مواد خالص استفاده گردید. کازئین و ژلاتین به عنوان منابع اصلی پروتئین و روغن سویا و روغن ماهی کیلکا به منظور تأمین چربی جیره مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱).

چهار سطح کلسترول (شامل صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد) به کمک مکمل کلسترول (scharlau, 57-88-5) در جیره پایه ایجاد گردید، تا جیره های آزمایشی مورد نظر به دست آید (جدول ۱). پس از آنالیز شیمیایی اجزای سازنده جیره، جیره‌های آزمایشی طبق احتیاجات غذایی شاه میگو آب شیرین به درشت مغذی‌ها به کمک نرم افزار WUFFDA تنظیم شدند. اجزای جیره پس از آسیاب شدن، با یکدیگر مخلوط و سپس بوسیله چرخ گوشت به صورت پلت‌هایی با قطر ۳ میلی متر در آمدند. پلت ها در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد خشک گردیده و تا زمان مصرف در یخچال (۴°C) نگهداری شدند.

جدول ۱: ترکیب اجزای غذایی جیره های آزمایشی (٪)

اجزای جیره	گروه های آزمایشی			
	۱ (شاهد)	۲	۳	۴
کازئین	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵
ژلاتین	۵	۵	۵	۵
گلوتن گندم	۵	۵	۵	۵
روغن ماهی کیلکا	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
روغن سویا	۸	۸	۸	۸
سبوس گندم	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
آرد گندم	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵
نشاسته گندم	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵
دکسترین	۵	۵	۵	۵
کلسترول	–	۰/۲۵	۰/۵	۰/۷۵
کولین کلراید	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
آستاگزانتین	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲
بتائین	۱	۱	۱	۱
مکمل ویتامینی[۱]	۱	۱	۱	۱
مکمل معدنی[۲]	۱	۱	۱	۱
ال- متیونین	۱	۱	۱	۱
ال- لیزین	۱	۱	۱	۱
آنتی اکسیدان (BHT)	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱
CMC[۳]	۲/۲	۲/۲	۲/۲	۲/۲
دی کلسیم فسفات	۲	۲	۲	۲

[۱] ترکیب مکمل ویتامینی (IU / کیلوگرم غذا) : ویتامین A ۱۶۰۰۰۰۰، ویتامین D3 ۴۰۰۰۰۰، نیاسین ۴۰۰۰، ریبوفلاوین ۸۰۰۰، پیریدوکسین ۴۰۰۰، فولیک اسید ۲۰۰۰، ویتامین B12 ۸۰۰۰، اینوزیتول ۲۰۰۰۰، ویتامین C ۶۰۰۰۰ ویتامین B2 ۸۰۰۰ ویتامین K3 ۲۰۰۰، ویتامین E ۴۰۰۰۰

[۲] ترکیب مکمل معدنی (گرم/کیلوگرم غذا) : روی ۱۲/۵، آهن ۲۶، منگنز ۱۵/۸، مس ۴/۲، کبالت ۰/۴۸، سلنیوم ۲، ید ۱

[۳] کربوکسی متیل سلولز

جدول ۲: تجزیه شیمیایی جیره های آزمایشی

		گروه های آزمایشی (درصد کلسترول جیره غذایی)			
		۱ (۰)	۲ (۰/۲۵)	۳ (۰/۵)	۴ (۰/۷۵)
پروتئین (٪ ماده خشک)		۳۳/۱	۳۳/۰	۳۳/۴	۳۳/۲
چربی (٪ ماده خشک)		۱۰/۲	۱۰/۱	۹/۹۲	۱۰/۱
کربوهیدرات (٪ ماده خشک)		۳۸/۸	۳۸/۳	۳۷/۲	۳۸/۱
اسید اولئیک	۱۸:۱ n-۹	۲۴/۶	۲۴/۱	۲۳/۸	۲۳/۶
اسید لینولئیک	۱۸:۲ n-۶	۴/۰۹	۴/۷۸	۴/۹۰	۴/۸۳
اسید لینولنیک	۱۸:۳ n-۳	۵/۹۲	۵/۹۴	۵/۷۸	۵/۸۶
اسید آراشیدونیک	۲۰:۴ n-۶	۰/۱۱	۰/۱۳	۰/۱۲	۰/۱۴
اسید ایکوزاپنتانوئیک	۲۰:۵ n-۳	۰/۸۴	۰/۸۸	۰/۸۵	۰/۸۳
اسید دکوزاهگزانوئیک	۲۲:۶ n-۳	۲/۰۶	۲/۰۴	۲/۰۹	۲/۰۵

۲-۳ تجزیه تقریبی جیره‌های آزمایشی

جیره ها و اجزای آن تا رسیدن به وزن ثابت در دمای ۱۰۵ ℃، خشک گردیدند. سپس درصد رطوبت و ماده خشک محاسبه شد (AOAC, 1995). محتوای پروتئین خام نمونه‌ها (N×۶/۲۵) به روش کجلدال (Behrotest WD40, Germany) انجام گردید. استخراج چربی کل با استفاده حلال دی اتیل اتر صورت پذیرفت. سرانجام میزان کربوهیدرات از تفاضل صد از مجموع میزان پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر محاسبه گردید (AOAC, 1995).

ترکیب اسیدهای چرب جیره با استریفیکاسیون در ترکیب محلول استیل کلراید و متانول با استفاده از دستگاه Agilent 7890A GC System, USA با مقایسه زمان‌های تثبیت استاندارد متیل استرهای اسید چرب تعیین شد (Lepage and Roy, 1984) (جدول ۲).

۲-۴ شاخص های رشد و کارایی تغذیه

شاخص‌های رشد و کارایی تغذیه بر اساس روابط زیر محاسبه گردیدند:

۱۰۰× وزن اولیه بدن / (وزن اولیه بدن – وزن نهایی بدن) = (٪) درصد افزایش وزن

۱۰۰× [(لگاریتم وزن اولیه(گرم)–لگاریتم وزن ثانویه (گرم)] / طول دوره پرورش (روز) =(درصد در روز) میزان رشد ویژه

غذای مصرفی (گرم)/وزن زنده بدست آمده(گرم) = ضریب تبدیل غذایی

۱۰۰× (تعداد اولیه/ تعداد نهایی) = (٪) بازماندگی

۱۰۰× (وزن نهایی/ وزن هپاتوپانکراس)= شاخص هپاتوپانکراس

۲-۵ تعیین میزان فعالیت آنزیمهای گوارشی

۲-۵-۱ تهیه عصاره آنزیمی

برای تهیه عصاره آنزیمی، بافت هپاتوپانکراس سه قطعه شاه میگو در هر تکرار در ۹ میلی لیتر بافر Tris-HCl ۱۰۰ میلی مولار، EDTA ۰/۱ میلی مولار، X-100Triton ۰/۱ درصد در pH ۷/۸ توسط هموژنایزر (مدل D 500) همگن گردید و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ ℃ در ۳۰۰۰۰g سانتریفیوژ (مدل Z36HK) گردیدند. سوپرناتانت حاصل در ویال‌های یک میلی‌لیتری تقسیم و تا زمان سنجش در دمای ۸۰ ℃– نگهداری شدند (Briggs, et al., 1988). میزان پروتئین محلول نمونه های هموژن شده هپاتوپانکراس شاه میگوها به روش Bradford (۱۹۷۶) سنجیده شد.

۲-۵-۲ تعیین فعالیت آنزیم پروتئاز کل

جهت تعیین فعالیت آنزیم پروتئاز کل ابتدا ۲۰ میکرولیتر از عصاره خام آنزیمی با ۰/۵ میلی لیتر محلول Azocasein دو درصد در Tris-HCl ۵۰ میلی مولار (pH=۷/۵) مخلوط و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه، ۰/۵ میلی لیتر TCA (Trichloroacetic Acid) به آن اضافه گردید. نمونه‌ها سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت g ۶۵۰۰ سانتریفیوژ شدند. فعالیت ویژه آلکالین پروتئاز به ازای مدت انکوباسیون (۱۰ دقیقه) و میزان پروتئین عصاره آنزیمی (میلی گرم) محاسبه گشت (Garcia-Carreno and Haard, 1993).

۲-۵-۳ تعیین فعالیت آنزیم لیپاز

هر سنجش لیپازی شامل ۷ میکرولیتر عصاره خام آنزیمی به همراه ۸۶ میکرولیتر محلول Sodium cholate و ۲/۵ میکرولیتر محلول متوکسی اتانول بود. پس از افزودن ۵/۵ میکرولیتر پارانیتروفنیل مریستات به مجموعه فوق و انکوباسیون نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه، جذب نوری نمونه-ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد (Iijima et al., 1998).

۲-۵-۴ تعیین فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز

جهت سنجش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز ابتدا به ۲۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی ۲۵۰ میکرولیتر نشاسته یک درصد اضافه شد. پس از ۳ دقیقه ۰/۵ میلی لیتر از معرف رنگی دنیتروسالیسیلیک اسید به آن اضافه گردیده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه قرار گرفتند. سپس ۵ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه و جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد. میزان فعالیت آلفا -آمیلاز، بر حسب میکرو مول مالتوز آزاد شده تحت اثر آنزیم در دقیقه به ازای میلی گرم پروتئین محاسبه شد (Worthington, 1991).

۲-۵-۵ تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

بررسی آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) و آزمون مقایسه میانگین توکی Tukey' HSD test انجام شد.

تمام مفروضات آنالیز واریانس پیش از انجام تحلیل‌های آماری، مورد بررسی قرار گرفت. تمامی آزمون‌ها در سطح معنی داری کمتر از ۵ درصد تفسیر شدند و نتایج نهایی بصورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش گردید.

۳. نتایج و بحث

نتایج شاخص های رشد و بقا شاه میگوهای گروه های مختلف آزمایشی در جدول ۳ آمده است. نتایج نشان داد که شاخص های وزن نهایی، درصد افزایش وزن و ضریب رشد ویژه شاه میگوهای تغذیه شده با جیره های حاوی صفر و ۰/۲۵ درصد کلسترول (گروه های آزمایشی ۱ و ۲) در مقایسه با گروه های تغذیه کرده با ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد کلسترول (گروه های آزمایشی ۳ و ۴) بطور معنی داری پایین بود (P<۰/۰۵). همچنین از نظر این شاخص ها، میان شاه میگوهای تغذیه شده با جیره های حاوی ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد کلسترول اختلاف معنی داری مشاهده نگردید (P>۰/۰۵).

شاخص هپاتوپانکراس در گروه تغذیه شده با ۰/۵ درصد کلسترول جیره در مقایسه با سایر گروه های آزمایشی بطور معنی داری بالا بود (P<۰/۰۵)، ولی در بین سایر گروه های آزمایشی اختلاف معنی مشاهده نشد (P>۰/۰۵). شاخص میزان بازماندگی در گروه هایی که جیره فاقد کلسترول و ۰/۲۵ درصد کلسترول دریافت کرده بودند بطور معنی داری پایین از گروه هایی بود که از میزان ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد کلسترول جیره تغذیه کرده بودند. همچنین بیشترین شاخص بازماندگی مربوط به گروه آزمایشی ۰/۵ درصد کلسترول جیره بود که در مقایسه با سایر گروه های آزمایشی بطور معنی داری بالا بود (P<۰/۰۵).

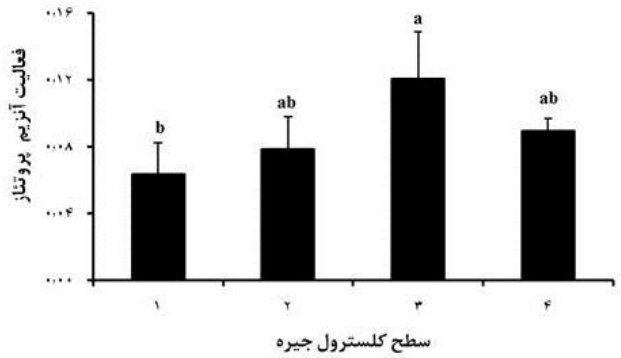
جدول ۳: شاخص های رشد و بازماندگی شاه میگوهای (A. leptodactylus) تغذیه شده با سطوح مختلف کلسترول جیره در پایان آزمایش

	گروه های آزمایشی (درصد کلسترول جیره غذایی)			
	۱ (۰)	۲ (۰/۲۵)	۳ (۰/۵)	۴ (۰/۷۵)
وزن ابتدایی (گرم)	۱۳/۹±۱/۲۲ a	۱۳/۶±۱/۸۷ a	۱۳/۸±۱/۰۱ a	۱۳/۷±۱/۶۴ a
وزن نهایی (گرم)	۱۶/۵±۱/۱۴ b	۱۷/۱±۱/۳۲ b	۱۹/۷±۲/۳۹ a	۱۹/۳±۱/۸۵ a
افزایش وزن (درصد)	۱۹/۲±۸/۲۷ b	۲۳/۶±۹/۵۴ b	۴۲/۳±۱۷/۳ a	۳۹/۸±۱۳/۴ a
رشد ویژه (درصد در روز)	۰/۱۹±۰/۰۷ b	۰/۲۳±۰/۰۸ b	۰/۳۸±۰/۱۳ a	۰/۳۷±۰/۱۱ a
شاخص هپاتوپانکراس	۴/۵۰±۰/۵۹ b	۳/۶۰±۱/۱۷ b	۷/۳۰±۰/۶۲ a	۴/۵۸±۱/۱۴ b
بازماندگی (٪)	۵۰/۰±۸/۳۳ c	۵۰/۰±۸/۳۳ c	۸۳/۳±۸/۳۳ a	۶۶/۷±۸/۳۳ b

مقادیر ارائه شده در جدول نشان دهنده میانگین ± اختلاف میانگین، می باشند. اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار در سطح p<۰/۰۵ هستند.

نتایج مربوط به میزان فعالیت آنزیم پروتئاز کل هپاتوپانکراس شاه‌میگوهای گروه‌های مختلف پس از ۱۲ هفته تغذیه با جیره‌های

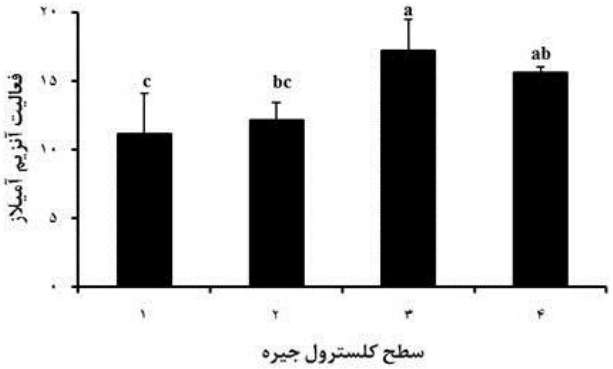
آزمایشی در شکل ۱ گزارش شده است. میزان فعالیت آنزیم پروتئاز در شاه میگو های تغذیه شده با جیره فاقد کلسترول (گروه آزمایشی ۱، ۰/۰۲±۰/۰۶ واحد در میلی گرم پروتئین) در مقایسه با گروه آزمایشی ۰/۵ درصد کلسترول (گروه آزمایشی ۳) بطور معنی داری پایین بود (P<۰/۰۵). همچنین از نظر میزان فعالیت آنزیم پروتئاز میان شاه میگوهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد کلسترول (بترتیب، ۰/۰۲±۰/۰۸، ۰/۰۳±۰/۱۲ و ۰/۰۱±۰/۰۹ واحد در میلی گرم پروتئین) اختلاف معنی داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).



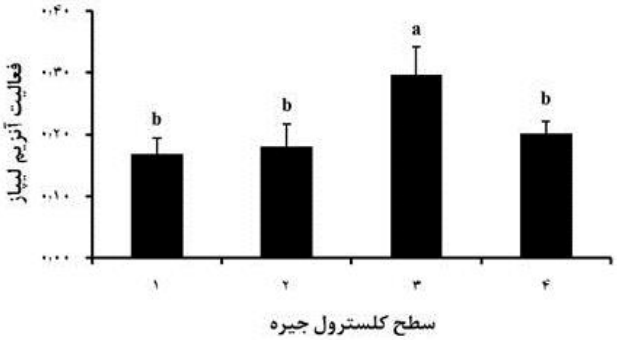
شکل ۱: فعالیت آنزیم پروتئاز کل هپاتوپانکراس شاه میگوهای تغذیه شده با جیره-های آزمایشی حاوی صفر (گروه ۱)، ۰/۲۵ درصد (سطح ۲)، ۰/۵ درصد (سطح ۳) و ۰/۷۵ درصد (سطح ۴) کلسترول در پایان آزمایش. حروف متفاوت نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار آماری میان گروه‌های آزمایشی در P<۰/۰۵ می‌باشد.

نتایج مربوط به میزان فعالیت آنزیم آمیلاز هپاتوپانکراس شاه-میگوهای گروه‌های مختلف آزمایشی پس از ۱۲ هفته تغذیه با جیره‌های آزمایشی در شکل ۲ آمده است. میزان فعالیت آنزیم آمیلاز در گروه تغذیه شده با جیره غذایی ۰/۵ درصد کلسترول (گروه آزمایشی ۳) در مقایسه با گروه‌های آزمایشی صفر و ۰/۲۵ درصد کلسترول (گروه‌های آزمایشی ۱ و ۲ بترتیب، ۱۱/۱±۲/۹۹ و ۱۲/۱±۱/۳۲ واحد در میلی گرم پروتئین) به طور معنی داری بالا بود (P<۰/۰۵). همچنین با افزایش میزان کلسترول جیره از ۰/۵ درصد به ۰/۷۵ درصد (گروه‌های آزمایشی ۳ و ۴ بترتیب، ۱۷/۲±۲/۲۹ و ۱۵/۶±۰/۴۳ واحد در میلی گرم پروتئین) اختلاف معنی داری در میزان فعالیت آنزیم آمیلاز مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

نتایج مربوط به میزان فعالیت آنزیم لیپاز هپاتوپانکراس شاه-میگوهای تغذیه شده با جیره های آزمایشی حاوی سطوح مختلف کلسترول در پایان دوره پرورش نشان داد که میانگین فعالیت آنزیم لیپاز در شاه میگوهای تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۰/۵ درصد کلسترول (گروه آزمایشی ۳، ۰/۰۴±۰/۳۰ واحد در میلی گرم پروتئین) در مقایسه با سایر گروه های آزمایشی بطور معنی داری بالا بود (P<۰/۰۵). همچنین در بین سایر گروه های آزمایشی ۱، ۲ و ۴ از این نظر (بترتیب، ۰/۰۲±۰/۱۷، ۰/۰۳±۰/۱۸ و ۰/۰۲±۰/۲۰ واحد در میلی گرم پروتئین) اختلاف معنی داری مشاهده نگردید (P>۰/۰۵، شکل ۳).



شکل ۲: فعالیت آنزیم آمیلاز هپاتوپانکراس شاه میگوهای تغذیه شده با جیره های آزمایشی حاوی صفر (گروه ۱)، ۰/۲۵ درصد (سطح ۲)، ۰/۵ درصد (سطح ۳) و۰/۷۵ درصد (سطح ۴) کلسترول در پایان آزمایش. حروف متفاوت نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار آماری میان گروه‌های آزمایشی در P<۰/۰۵ می‌باشد.



شکل ۳: فعالیت آنزیم لیپاز هپاتوپانکراس شاه میگوهای تغذیه شده با جیره های آزمایشی حاوی صفر (گروه ۱)، ۰/۲۵ درصد (سطح ۲)، ۰/۵ درصد (سطح ۳) و ۰/۷۵ درصد (سطح ۴) کلسترول در پایان آزمایش. حروف متفاوت نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار آماری میان گروه‌های آزمایشی در P<۰/۰۵ می‌باشد.

برخلاف بسیاری از جانوران، سخت پوستان توانایی ساخت کلسترول را ندارند. بنابراین کلسترول به عنوان یک مکمل ضروری در جیره سخت پوستان مطرح است (Kanazawa et al., 1971). سطح بهینه کلسترول جیره برای گونه های مختلف سخت پوستان ۰/۲– ۲ ٪ می باشد که این مقادیر بستگی به میزان غذادهی، مرحله زیستی، اجزای تشکیل دهنده جیره و مقدار

کلسترول دریافتی از غذاهای طبیعی دارد (Duerr and Walsh, 2006; Morris et al., 2011). Kanazawa و همکاران (۱۹۷۱) و Shudo و همکاران (۱۹۷۱) سطوح بهینه کلسترول جیره برای *P. japonicus* را به ترتیب ۰/۵-۱٪ و ۰/۲ درصد گزارش کردند. مطالعات بعدی بر روی این گونه نشان داد که حداکثر سطح بهینه کلسترول جیره ۲ درصد می‌باشد (Deshimaru and Kuroki, 1974). برخی از دلایل ممکن برای بروز چنین اختلافاتی می تواند تفاوت در اجزای غذایی، مقاومت پلت ها از لحاظ تراوش در آب و نیز مصرف غذا باشد (Teshima et al., 1997). در مورد مصرف غذا، Teshima و همکاران (۱۹۹۷) اظهار داشتند که سطح بهینه کلسترول در جیره میگوی ژاپنی در سطوح تغذیه‌ای ۳، ۵ و ۷ ٪ از وزن بدن بترتیب ۰/۵، ۰/۴ و ۰/۲۹ می باشد. مطالعه بر روی لابستر آمریکایی *Homarus americanus*، میگوی *Feneropenaeus pencillatus*، شاه میگوی *Cherax quadricarinatus* و خرچنگ *Scylla serrata* زمانی که تغذیه آنها تا حد سیری بود سطح بهینه کلسترول به صورت مشابه ۰/۵٪ بود (Castell et al., 1975; Chen and Jenn, 1991; Sheen, 2000; Hernandez et al., 2004). این نتایج بیانگر اینست که سطح بهینه کلسترول در گونه‌های مختلف و یا در مراحل متفاوت زیستی یک گونه متفاوت می‌باشد. برای مثال خرچنگ *Scylla serrata* در مرحله مگالوپا به سطح بالاتری از کلسترول جیره (۰/۸ درصد) نیاز دارد که این میزان به جهت پوست اندازی های سریعتر این مرحله ضروری می نماید.

نیاز کلسترولی گونه‌های تجاری میگو مانند *P. monodon* بین ۰/۲- ۰/۸ می‌باشد (Chen, 1993; Sheen et al., 1994). که این میزان برای *L. vannamei* زمانی که ۰/۵٪ فسفولیپید به جیره اضافه شده باشد، به ۰/۱ درصد کاهش می باشد (Morris et al., 2011). افزودن ۰/۵- ۱٪ کلسترول به جیره نیمه خالص که دارای ۰/۱۲ درصد کلسترول می باشد اثر مثبتی بر شاخص‌های رشد و بقا میگوی بزرگ آب شیرین نداشت (Briggs et al., 1988). نتایج مطالعات بعدی بر روی میگوی بزرگ آب شیرین نشان داد سطح بهینه کلسترول جیره ۰/۶ ٪ می باشد، چرا که فیتواسترول های موجود در جیره می‌توانند جایگزین بخشی از کلسترول جیره گردند (D'Abramo and Daniels, 1994; D'Abramo, 1998). بنابراین با توجه به هزینه پایین‌تر و دسترسی بیشتر به روغن های گیاهی در مقایسه با روغن های دریایی، تعیین میزان این امکان سنجی می تواند پیامدهای مهمی در تنظیم جیره‌های غذایی سخت پوستان داشته باشد. برای مثال در گونه های شاه میگوی *Pacifastacus leniusculus* و میگوی *L. vannamei* ترکیب فیتواسترول‌های جیره با منشا سویا توانست به طور کامل جایگزین کلسترول شود (D'Abramo et al., 1985; Morris et al., 2011).

Sheen (۲۰۰۰) اظهار داشت که خرچنگ *Scylla serrata* تغذیه شده با جیره‌های فاقد کلسترول میزان رشد و بازماندگی کمتری در مقایسه با خرچنگ هایی که از سطوح مختلف کلسترول جیره استفاده کرده بودند، داشت. بطور مشابهی در مطالعه حاضر نیز، وزن نهایی شاه میگوهای تغذیه شده با سطوح صفر، ۰/۲۵، ۰/۷۵ و ۱ درصد کلسترول جیره در مقایسه با شاه میگوهایی که با ۰/۵ کلسترول جیره تغذیه کرده بودند، بطور معنی داری پایین بود. تغذیه بیش از حد کلسترول اثرات مطلوب و مثبتی بر روی شاخص های رشد و بقا نداشت. تغذیه با سطوح بالای کلسترول در *P. monodon* (Sheen et al., 1994) و پست لارو *L. vannamei* (Niu et al., 2012) می تواند کارایی رشد را کاهش دهد. مکانیسم دقیق که سبب این اثرات نامطلوب می گردد ناشناخته است و به تحقیقات آتی در این خصوص نیاز است (Sheen, 2000). سطح بهینه ۰/۵ درصد کلسترول جیره حاصل از مطالعه حاضر با نتایج برخی مطالعات بر روی برخی سخت پوستان، *H.americanus* (Castell et al., 1975)، *P. monodon* (Sheen et al., 1994) و *P. vannamei* (Duerr and Walsh, 1996) همخوانی دارد. نتایج Briggs (۱۹۸۸) نشان داد کلسترول به عنوان یک مکمل ضروری در جیره های نیمه خالص برای بهبود شاخص بازماندگی *M. rosenbergii* مطرح می‌باشد. کلسترول به عنوان مهمترین پیشگام متابولیکی برای سنتز اکدیزون یا هورمون پوست اندازی در سخت پوستان شناخته شده است (Watson and Spaziani, 1982). کاهش بیوسنتز هورمون پوست اندازی در لارو سخت پوستان تغذیه شده با جیره‌های فاقد کلسترول سبب کاهش میزان پوست اندازی و بازماندگی می گردد. نتایج مطالعات نشان داد که جذب کلسترول توسط اندام Y به هنگام شروع توالی پوست اندازی تا حد زیادی افزایش می یابد (Spazani and Kater, 1973). در این زمان افزایش کلسترول جیره اثرات نامطلوبی در میزان رشد و بقا سخت پوستان خواهد داشت (Sheen, 2000).

Sheen (2000) گزارش داد که بیشترین میزان بازماندگی (۹۳٪) در گروه خرچنگ‌های تغذیه شده با ۰/۲۱ ٪ کلسترول

جیره که کمترین میزان سطح مورد استفاده بود مشاهده گردید همچنین این محققین اظهار داشتند که *S. serrata* با کمترین سطح کلسترول جیره می تواند از بازماندگی خوبی برخوردار باشند. در همین راستا مطالعات D'Abramo و همکاران (۱۹۸۴) روی لابستر آمریکایی و Sheen و همکاران (۱۹۹۴) در میگوی *Penaeus monodon* نشان داد بیشترین میزان بازماندگی در جیره هایی که از کلسترول کمتری برخوردار بود (بترتیب، ۰/۱۲ و ۰/۱۹ درصد) در مقایسه با جیره‌هایی که از کلسترول بالاتری (بیشتر از ۰/۵ ٪) برخوردار بود اتفاق می افتد. در تضاد با مطالعات بالا مشاهده شده است که کلسترول همبستگی مثبتی با بازماندگی سخت‌پوستان دریایی دارد. نتایج Paibulkichakul و همکاران (۱۹۹۸) نشان داد میگوهای *P. monodon* تغذیه شده با ۱٪ کلسترول میزان بازماندگی بیشتری در مقایسه با آنهایی که از جیره فاقد کلسترول دریافت کرده بودند، داشت. همچنین میزان رشد و بقا در میگوهای *Penaeus vannamei* تغذیه شده با سطوح مختلف کلسترول بالا بود (Duerr and Walsh, 1996). با این حال، نتایج مطالعه حاضر حاکی از کاهش میزان بازماندگی در جیره فاقد کلسترول می باشد. با افزایش کلسترول جیره به ۰/۵ درصد میزان بازماندگی به طور معنی داری افزایش و در گروه های تغذیه شده با ۰/۷۵ درصد کلسترول به طور معنی داری کاهش می‌یابد که این نیز می تواند بدلیل مسمومیت تغذیه ای و یا اختلال در بیوسنتز هورمون پوست اندازی باشد (Mercer, 1982).

نتایج مطالعه حاضر حاکی از افزایش آنزیم‌های پروتئاز، لیپاز و آمیلاز در شاه میگوهای تغذیه شده با ۰/۵ کلسترول جیره در مقایسه با شاه میگوهای تغذیه شده با جیره های فاقد کلسترول می باشد. تاکنون مطالعه ای در خصوص تاثیر کلسترول بر روند فعالیت آنزیم های گوارشی در سخت پوستان انجام نشده است. بدیهی است شناخت این مکانیسم نیاز به بررسی بیشتر در مطالعات آتی دارد. در این راستا می توان به نقش کلسترول در سنتز اسیدهای صفراوی اشاره داشت. اسیدهای صفراوی جهت جذب چربی در روده ضروری می‌باشند. اسیدهای صفراوی همانند مواد شوینده سبب شکستن مولکول‌های چربی و تبدیل به قطرات بسیار کوچک چربی می‌شود این دانه های کوچک دارای سطح کافی برای عملکرد آنزیم لیپاز بر انجام فرآیند هضم می باشند که این نیز می تواند با تاثیر مثبت بر کارکرد تغذیه ای و مصرف غذا و نهایتا رشد بهتر موجود گردد.

۴. نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه می‌توان اظهار داشت که شاه میگوی آب شیرین همانند سایر سخت پوستان برای بهبود شاخص های رشد و بازماندگی به مکمل کلسترول جیره غذایی نیاز دارد. شاه میگوهای تغذیه شده با جیره فاقد کلسترول و ۰/۲۵ درصد کلسترول کمترین رشد را داشته و با افزایش سطح کلسترول جیره تا ۰/۵درصد روند صعودی رشد و پس از آن روند نزولی مشاهده گردید. بنابراین لازم است در تنظیم جیره غذایی برای این گونه، از کلسترول به عنوان یک جزء ضروری جیره غذایی استفاده گردد. به علاوه، میزان ۰/۵ درصد کلسترول در جیره غذایی مورد استفاده جهت پرورش متراکم این گونه توصیه می‌شود.

منابع

AOAC, 1995. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 16th edn. AOAC, Arlington, VA, USA.

Avault, J.W.; Huner, J.V., 1985. Crawfish culture in the United States. In: Huner J.V. and Brown, E.E. (Ed), Crustacean and Mollusk Aquaculture in the United States. AVI, Westport. Connecticut, pp 1-61.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

Bowyer, J.N.; Qin, J.G.; Stone, D.A.J., 2012. Protein, lipid and energy requirements of cultured marine fish in cold, temperate and warm water. Reviews in Aquaculture, 4, 1–23.

Briggs, M.R.P.; Jauncey, K.; Brown, J.H., 1988. The cholesterol and lecithin requirements of juvenile prawn (Macrobrachium rosenbergii) fed semi-purified diets. Aquaculture, 70, 121–129.

Castell, J.D.; Mason, E.G.; Covey, J.F., 1975. Cholesterol requirements of juvenile American lobster (Homarus

LangostillaPleuroncodesplanipes and Crayfish Pacifastacus astacus extracts. Journal of Food Biochemistry, 17:97-113.

Goddard, S., 1996. Feed management in Intensive Aquaculture. Chapman & Hall, 1996; 165p.

Hernandez, P. V.; Olvera-Novoa, M.A.; Rouse, D.B., 2003. Effect of dietary cholesterol on growth and survival of juvenile redclaw crayfish Cherax quadricarinatus under laboratory conditions. Aquaculture, 236: 405–411.

Holdich, D.M., 2002. Background and Functional Morphology. In: Biology of Freshwater Crayfish: In: Holdich, D.M. (Ed.), Blackwell Science. Oxford. pp 3-29.

Iijima, N.; Tanaka, S., Ota, Y. (1998). Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, Pagrus major. Fish Physiology Biochemistry, 18, 59–69.

Jussila, J., 1997. Physiological responses of astacid and parastacid crayfishes (Crustacea: Decapoda) to conditions of intensive culture. Doctoral Dissertation, Kuopio University Publications C. Natural and Environmental Sciences 67, Finland.

Kanazawa, H.; Tanaka, N.; Teshima, S.; Kashiwada, K., 1971. Nutritional requirements of prawn. II. Requirement for sterols. Nippon Suisan Gakkaishi., 37: 211–215.

Lepage, G.; Roy, C.C., 1984. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. Journal of Lipid Research, 25: 1391-1396.

Mercer, L., 1982. The qualitative nutrient-response relationship. Journal Nutrition, 112, 560–566.

Morris, T.C.; Samocha, T.M.; Davis, D.A.; Fox, J.M., Cholesterol supplements for Litopenaeus vannamei reared on plant based diets in the presence of natural productivity. Aquaculture, 314: 140–144.

americanus). Journal Fish Reserch. Board Can., 32: 1431–1435.

Chen, H. Y.; Jenn, J.S., 1991. Combined effects of dietary phosphatidylcholine and cholesterol on the growth, survival and body lipid composition of marine shrimp, Penaeus pencillatus. Aquaculture, 96: 167–178.

Chen, H.Y., 1993. Requirements of marine shrimp, Penaeus monodon, juveniles for phosphatidylcholine and cholesterol. Aquaculture, 109: 165–176.

D'Abramo, L. R., 1998. Nutritional requirements of the freshwater prawn Macrobrachium rosenbergii: Comparison with species of penaeid shrimp. Reviews in Fisheries Science, 6: 153–163.

D'Abramo, L. R.; Daniels, W. H., 1994. Sterol requirement of juvenile freshwater prawn Macrobrachium rosenbergii. Journal World Aquaculture Society, 200.

D'Abramo, L.R.; Wright, J.S.; Wright, K.M.; Bordner, C.E.; Conklin, D.E.; Baum, N.A., 1985. Sterol requirement of cultured juvenile crayfish Pacifastacus leniusculus. Aquaculture 49, 245–255.

Deshimaru, O.; Kuroki, K., 1974. Studies on a purified diet for prawn. II Optimum contents of cholesterol and glucosamine in the diet. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 40: 421–424.

Duerr, E.O.; Walsh, W.A., 1996. Evaluation of cholesterol additions to a soybean meal based diet for juvenile pacific white shrimp, Penaeus vannamei (Boone), in an outdoor growth trial. Aquaculture Nutrition, 2, 111–116.

Duerr, E.O.; Walsh, W.A., 2006. Evaluation of cholesterol additions to a soyabean meal-based diet for juvenile Pacific white shrimp, Penaeus vannamei (Boone), in an outdoor growth trial. Aquaculture Nutrition, 2: 111–116.

Garcia-Carreno, F.L.; Haard, N. F., 1993. Characterization of proteinase classes in

Tacon, A.G.J., 1995. Application of nutrient requirement data under practical conditions: special problems of intensive and semi-intensive fish farming. Journal Applied Ichthyology, 1 1:205-21 4

Teshima, S., 1997. Phospholipids and sterols. In: Advances in World Aquaculture, Vol. 6, Crustacean Nutrition (ed. by Conklin D'Abramo & Akiyama), pp. 85-107. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.

Teshima, S.; Kanazawa, A.; Kakuta, Y., 1986. Role of dietary phospholipids in the transport of 14C cholesterol in the prawn. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 52, 719–723.

Teshima, S.; Kanazawa, A.; Sasada, H.; Kawasaki, M., 1982. Requirements of larval prawn, Penaeus japonicus, for cholesterol and soybean phospholipids. Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ., 31, 193–199.

Watson, R.; Spaziani, E., 1982. Uptake of 14C-cholesterol and secretion of ecdysone by crab Y organ in vito. American Zoologist, 22, 296.

Wolf, Y.S., 2004. Growth and macronutritional requirements of signal crayfish, Pacifastacus leniusculus (Dana) in aquaculture. PhD thesis, Kiel University, Kiel, Germany.

Worthington, C.C., 1991. Worthington enzyme manual related Biochemical, 3th edn, pp, 212-215. Freehold, New Jersey.

Nezami, S., 1997. Crayfish in Iran. Crayfish News, 19 (2); 7.

Niu, J.; Chen, P.; Tian, L.; Liu, Y.; Lin, H.; Yang, H.; Liang, G., 2012. Excess dietary cholesterol may have an adverse effect on growth performance of early post-larval Litopenaeus vannamei. Journal of Animal Science and Biotechnology, 3: 19.

Paibulkichakul, C.; Piyatiratitivorakul, S.; Prasat, P.; Viyakarn, V.; Fast, A.; Menasveta, P., 1998. Optimal dietary levels of lecithin and cholesterol for black tiger prawn Penaeus monodon larvae and postlarvae. Aquaculture, 167, 273– 281.

Sheen, S. S., 2000. Dietary cholesterol requirement of juvenile mud crab Scylla serrata. Aquaculture, 189: 277–285.

Sheen, S.S.; Liu, P.C.; Chen, S.N.; Chen, J.C., 1994. Cholesterol requirement of juvenile tiger shrimp (Penaeus monodon). Aquaculture, 125, 131–137.

Shudo, K., Nakamura, K.; Ishikawa, S.; Kitabayashi. K., 1971. Studies on formula feed for Kuruma prawn. IV. On the growth promoting effect of both squid liver oil and cholesterol. Bulletin of the Japan Sea Regional Fisheries Research Laboratory, 65: 129–137.

Spazani, E.; Kater, S., 1973. Uptake and turnover of cholesterol-14C in Y-organs of the crab Hemigrapsus, as a function of the molt cycle. Comp. Endocrinol. 20 (20), 543–549.