فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال نهم، شماره اول، بهار ۱۴۰۰

مقاله پژوهشی

تاثیر جیره حاوی پودر گیاه گلدر (*Otostegia persica*) بر شاخص‌های خونی، آنتی‌اکسیدانی و ایمنی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

احمد رخشانی[۱]، ابراهیم علیزاده دوغیکلایی[۲]، احسان احمدی‌فر[۳]*، محسن شهریاری مقدم[۴]

تاریخ دریافت: بهمن ۹۸ تاریخ پذیرش: مرداد ۹۹

چکیده

هدف این مطالعه بررسی تاثیر جیره حاوی پودر گیاه گلدر (*Otostegia persica*) بر شاخص‌های خونی، آنتی‌اکسیدانی و ایمنی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) است. برای این منظور، ماهیان با میانگین وزنی ۲/۱۲±۲۸/۳۲ گرم طی مدت ۴۵ روز با جیره غذایی حاوی ۰/۰ (شاهد)، ۰/۵ (T_1)، ۱/۰ (T_2) و ۱/۵ (T_3) درصد پودر گیاه گلدر مورد تغذیه قرار گرفتند. در انتهای دوره از ماهیان خون‌گیری انجام شد و شاخص‌های خونی و ایمنی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد اضافه کردن پودر گیاهی به جیره غذایی موجب تغییر معنی‌داری در شاخص‌های خون‌شناسی (تعداد گلبول قرمز و سفید و هماتوکریت) و شاخص‌های گلبول قرمز (MCV، MCH و MCHC) بین تیمارهای آزمایشی نشد (P>۰/۰۵). همچنین آنزیم‌های کبدی آلکالین فسفاتاز (ALP)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) دارای تفاوت معنی‌داری نبودند (P>۰/۰۵). بیشترین میزان پروتئین کل در تیمار T_2 مشاهده شد و گروه شاهد دارای کمترین مقدار عددی بود و بین تیمارهای حاوی ۱ و ۱/۵ درصد پودر گیاهی با دیگر تیمارها تفاوت معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۵). در مقایسه مقادیر آلبومین، کلسترول و تری‌گلیسرید سرم خون ماهیان کپور تغذیه شده با پودر گلدر در پایان آزمایش با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۱ و ۱/۵ درصد پودر گلدر بالاترین میزان را داشتند (P<۰/۰۵). با افزایش میزان گلدر درجیره غذایی میزان مالون دی‌الدهید به طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵). به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از پودر گیاه گلدر اثرات مثبتی بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سرم خون داشته است.

واژگان کلیدی: *شاخص‌های خونی، شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی، ایمنی، گیاه گلدر، کپور معمولی.*

۱- کارشناس ارشد فرآوری محصولات شیلاتی، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۳- استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۴- دانشیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، ایران.
* نویسنده مسئول: Ehsan.Ahmadifar@uoz.ac.ir

مقدمه

با رشد سریع آبزی‌پروی و به ویژه پرورش کپورماهیان به صورت متراکم، افزایش شیوع بیماری‌های مختلف نیز به چشم می‌خورد. موفقیت در صنعت آبزی‌پروری وابسته به کاهش میزان تلفات و همچنین به حداقل رساندن استفاده از داروهای مختلف از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها است (Gudding et al., 1999). مطالعات مختلف نشان داده‌اند استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در جیره غذایی آبزیان منجر به ایجاد سویه‌های باکتریایی مقاوم می‌شود. به علاوه امروزه باقی مانده‌های داروهای استفاده شده در بدن آبزیان از نگرانی‌های رایج مصرف‌کنندگان است.

مطالعات نشان داده است استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند منجر به تغییر فلور میکروبی طبیعی دستگاه گوارش ماهیان که برای آن‌ها مفید هستند، شود (Cahill, 1990). بنابراین چند راهکار جایگزین برای استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها مانند استفاده از گیاهان دارویی (Hoseinifar et al., 2010) و پروبیوتیک‌ها پیشنهاد شده است (Ahmadifar et al., 2020). استفاده از گیاهان دارویی نسبت به داروهای شیمیایی دارای چندین مزیت است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به عوارض جانبی کم، همچنین سازگار بودن با محیط زیست و مقرون به صرفه بودن اشاره کرد. بسیاری از این گیاهان محرک رشد و سیستم ایمنی بدن هستند و در مطالعات مختلف از آن‌ها استفاده شده است (Akbarzadeh, 2003). در نتیجه صنعت داروسازی به سمت تولید داروهای مبتنی بر گیاهان دارویی سوق پیدا کرده است و استفاده از این داروها در پزشکی، دامپزشکی و دامپروری رواج یافته است (Nourinasab et al., 2019; Parvin et al., 2019).

محرک‌های سیستم ایمنی عملکردهای مختلفی دارند. از مهمترن آن‌ها می‌توان به افزایش تولید آنتی‌بادی، توان بیگانه‌خواری و تولید لیزوزیم اشاره کرد (Sakai, 1999).

گیاه گلدر (*Otostegia persica*) از خانواده نعنا (Lamiaceae) است و در غرب آسیا پراکنده شده است و در جنوب و جنوب شرقی ایران در استان‌های فارس، کرمان و سیستان و بلوچستان می‌روید (Hajhashemi et al., 2004). این گیاه به دلیل محتوای بالای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند فنل، تانن و فلاوونوئیدها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی است. همچنین عصاره متانولی گیاه گلدر به دلیل داشتن ترکیبات فعال Morin و

Quercetin دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی معادل چای سبز (*Camellia sinensis*) است (Sharififar et al., 2003) و تاکنون مطالعات اندکی روی آن انجام شده است.

کپور معمولی متعلق به خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) است و یکی از ماهیان مهم پرورشی به شمار می‌آید که از بازارپسندی خوبی برخوردار است. پرورش این گونه به دلیل مقاومت بالای آن در برابر تنش‌های محیطی مشکلات کمی دارد و از گونه‌های پرورشی مهم در ایران است (وثوقی و مستجیر، ۱۳۹۴).

با توجه به این که تاکنون مطالعه‌ای در باره تاثیر استفاده از این گیاه در جیره غذایی ماهی کپور معمولی صورت نگرفته است، از این رو در مطالعه حاضر تاثیر سطوح مختلف پودر گیاه گلدر بر شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی و ایمنی ماهی کپور معمولی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

برای اجرای آزمایش، ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) از مرکز تکثیر زهک (سیستان و بلوچستان) با میانگین وزنی ۲۸/۳۲±۲/۱۲ گرم خریداری شدند. ماهی‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه پژوهشکده تالاب بین المللی هامون، به مدت ۱۰ دقیقه در محلول کلرید سدیم (۲ درصد) قرار داده شدند. ماهیان پس از گذشت هفت روز دوره سازگاری به مدت ۴۵ روز تیمار شدند. شاخص‌های کیفی آب در طول دوره آزمایش به صورت روزانه اندازه‌گیری شدند (دما ۲۵/۴۰±۲/۵ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۶/۴۰±۰/۳ میلی‌گرم در لیتر، pH ۷/۵±۰/۳۲).

ساخت جیره غذایی

بخش‌های هوایی گیاه گلدر (*Otostegia persica*) از عطاری در شهرستان زاهدان خریداری و پودر شد و مطابق روش احمدی‌فر و همکاران (۱۳۹۸) به غذا اضافه شد. تیمارهای آزمایشی با افزودن ۰/۰ (تیمار شاهد)، ۰/۵ (T_1)، ۱/۰ (T_2) و ۱/۵ (T_3) درصد پودر گیاه گلدر به جیره پایه (جدول ۱) آماده شد (هر تیمار با سه تکرار). جیره‌های غذایی تهیه شده پس از خشک شدن در پوشش‌های مناسب پلاستیکی بسته‌بندی و تا زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری شدند. مقدار غذای مورد نیاز به صورت روزانه از فریزر خارج و مصرف شد.

زیست‌سنجی ماهیان با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم و تخته زیست‌سنجی با دقت یک میلی‌متر انجام شد.

جدول ۱: مواد غذایی و ترکیب تقریبی جیره‌های آزمایشی (وزن خشک)

مواد	درصد
آرد گندم	۲۸
پودر ماهی	۳۴
گلوتن گندم	۳
پودر سویا	۱۲
آرد ذرت	۱۴
مکمل معدنی*	۳
مکمل ویتامینی*	۳
هم‌بند**	۲
ضدقارچ***	۱
ترکیب تقریبی	
ماده خشک	۸۰/۵۰
پروتئین خام	۳۲/۴۰
چربی خام	۸/۷۸
خاکستر	۵/۹۲
فیبر	۱۱/۲۰

*: مکمل‌ها مطابق دستور العمل Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۶) ترکیب شده‌اند.
**: هم‌بند Amet (مهرتابان، ایران).
***: ضدقارچ ToxiBan (Vet-A-Mix، Shenandoah، آمریکا).

پس از زیست‌سنجی، در آکواریوم‌هایی با حجم آبگیری ۸۰ لیتر، تعداد ۹ قطعه ماهی به طور تصادفی ذخیره‌سازی شد. غذادهی به ماهیان روزانه بر اساس جدول (درجه حرارت و وزن ماهی) ارائه شده توسط شرکت تولید کننده جیره (پروتئین ایمن تاب، ایران) در حدود ۵-۴ درصد وزن بدن در چهار وعده به مدت ۴۵ روز انجام گرفت.

شاخص‌های خون

قبل از خون‌گیری تغذیه ماهیان به مدت ۲۴ ساعت قطع شد. سپس از هر تکرار به صورت تصادفی ۳ قطعه ماهی (در مجموع ۳۶ نمونه) انتخاب و با استفاده از سرنگ هپارینه از سیاهرگ ساقه دمی در پشت باله مخرجی خون‌گیری انجام شد. در هنگام خون‌گیری به دلیل جلوگیری از تاثیر احتمالی ماده بیهوشی بر شاخص‌های خونی از مواد بیهوش‌کننده استفاده نشد (فاطمی و میرزرگر، ۱۳۸۶).

بخشی از نمونه خون برای تهیه سرم جدا شد. نمونه‌های سرم به دست آمده برای استفاده طی آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای تعیین حجم هماتوکریت (Hct) از لوله‌های مویین میکروهماتوکریت استفاده شد و نمونه‌های خون به مدت پنج دقیقه در ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس درصد هماتوکریت با استفاده از خط‌کش مخصوص اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری هموگلوبین (Hb) از روش سیانومت هموگلوبین استفاده

شد. برای این منظور ۲۰ میکرو لیتر خون به ۵ میلی‌لیتر محلول درآبکین اضافه شد و جذب آن توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد (Feledman et al., 2000).

شمارش تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) و سفید (WBC) و شمارش افتراقی گلبول‌های سفید بر اساس روش ارائه شده توسط Tatina و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد. همچنین شاخص‌های گلبولی شامل MCV (حجم متوسط گلبول قرمز)، MCH (وزن هموگلوبین داخل گلبولی) و MCHC (غلظت هموگلوبین داخل گلبولی) بر اساس روش ارائه شده توسط Shalaby و همکاران (۲۰۰۶) محاسبه شدند.

آنالیز سرم خون

برای اندازه‌گیری پروتئین کل از روش Lopes-Lutz و همکاران، (۲۰۰۸) استفاده شد. سطح کلسترول و تری‌گلیسرید سرم به روش آنزیمی اندازه‌گیری شد (Thomas, 1998). آلبومین و آنزیم‌های کبدی شامل آلکالین فسفاتاز (ALP) به وسیله کیت‌های تشخیصی (پارس آزمون، ایران) و آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) با استفاده از کیت (Aldrich-Sigma، امریکا) و با روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Burtis et al., 2012).

شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی

تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز

برای سنجش آنزیم کاتالاز (CAT)، نمونه‌های سرم با محلول هیدروژن پراکسید ترکیب شدند و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس از محلول آمونیوم مولیبدات برای توقف فرآیند اکسیداسیون و تعیین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز استفاده شد. سنجش فعالیت آنزیم با دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۴۱۰ نانومتر انجام شد (Gokoglu et al., 2004).

تعیین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

برای سنجش آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، ابتدا در حضور هیدروژن پراکسید فرآیند اتواکسیداسیون پیروگالول بررسی شد. در طی این فرآیند از سطح آنزیم سوپراکسید دیسموتاز موجود در سرم کاسته شد. سپس سنجش با دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر انجام شد (Misra et al., 2006).

تعیین آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز

آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز بر اساس میزان مهار تیوباربیتوریک اسید (TBA) توسط مالون دی‌آلدهید (MDA) موجود در سرم صورت می‌گیرد. به طوری که هر چقدر سطح MDA افزایش یابد میزان مهار TBA بیشتر شده، در نتیجه رنگ کمتری در محلول تولید می‌شود و جذب نوری نیز کاهش می‌یابد (Lopes-Lutz et al., 2008).

تجزیه و تحلیل آماری

پراکنش نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ بررسی شد. پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها، برای بررسی تاثیر تیمارها و زمان نگهداری در طرح کاملا تصادفی از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه استفاده شد. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها، برای بررسی تفاوت بین میانگین‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد از پس‌آزمون دانکن در نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۴ استفاده شد. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 استفاده شد.

نتایج

شاخص‌های خونی

نتایج سنجش میزان شاخص‌های خونی کپور معمولی تیمار شده با جیره‌های غذایی دارای سطوح مختلف گیاه گلدر در پایان دوره ۴۵ روزه در جدول ۲ ارائه شده است. بر اساس نتایج به دست آمده میزان هماتوکریت، هموگلوبین، گلبول‌های قرمز و سفید، لنفوسیت، مونوسیت، نوتروفیل، MCH، MCV و MCHC در میان تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>۰/۰۵$).

شاخص‌های شیمیایی سرم خون

مطابق با نتایج جدول شماره ۳، میزان پروتئین کل در میان تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌دار داشت به طوری که ماهیان تغذیه شده با جیره T_3 (۱/۵ درصد پودر گیاه گلدر) بالاترین میزان پروتئین کل را دارا بودند ($P<۰/۰۵$). بر اساس نتایج به دست آمده، میزان آنزیم‌های کبدی AST و ALT در تیمارهای مختلف متفاوت و بیشترین مقدار این آنزیم‌ها در تیمار شاهد و کمترین میزان در تیمار T_3 مشاهده شد.

جدول ۲: بررسی شاخص‌های خونی ماهی کپور معمولی(*Cyprinus carpio*) تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف گیاه گلدر (*Otostegia persica*) پس از ۴۵ روز (میانگین ± خطای استاندارد)

شاخص‌ها	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
هماتوکریت (٪)	۳۱/۳۳±۴/۰۴[a]	۳۰/۶۷±۳/۰۶[a]	۲۹/۳۳±۴/۰۴[a]	۳۰/۳۳±۴/۹۳[a]
هموگلوبین (g/dL)	۳/۹۷±۰/۲۵[a]	۴/۱۴±۰/۲۰[a]	۳/۸۵±۰/۴۳[a]	۳/۹۳±۰/۳۲[a]
گلبول قرمز ($\times 10^6.mm^{-3}$)	۰/۸۳±۰/۰۹[a]	۱/۰۳±۰/۲۴[a]	۱/۰۵±۰/۲۳[a]	۰/۸۹±۰/۱۱[a]
گلبول سفید (mm^{-3})	۷۷۶۶/۶۷±۳۵۱/۱۹[a]	۷۸۳۳/۳۳±۵۰۳/۳۲[a]	۸۵۶۶/۶۷±۳۷۸/۵۹[a]	۸۷۳۳/۳۳±۴۰۴/۱۵[a]
لنفوسیت (٪)	۹۴/۰۰±۳/۶۱[a]	۹۳/۶۷±۳/۲۱[a]	۹۴/۶۷±۱/۵۳[a]	۹۷/۳۳±۰/۵۸[a]
نوتروفیل (٪)	۵/۳۳±۳/۵۱[a]	۵/۶۷±۲/۸۹[a]	۵/۰۰±۲/۰۰[a]	۲/۶۷±۰/۵۸[a]
مونوسیت (٪)	۰/۶۷±۱/۱۵[a]	۰/۶۷±۰/۵۸[a]	۰/۳۳±۰/۵۸[a]	۰/۰۰±۰/۰۰[a]
MCV (fL)	۳۸۲/۹۶±۸۰/۶۵[a]	۳۱۱/۶۹±۸۷/۵۲[a]	۲۸۳/۴۹±۲۷/۹۲[a]	۳۴۱/۲۰±۱۹/۰۹[a]
MCH (pg)	۴۷/۹۵±۲/۵۰[a]	۴۱/۵۸±۸/۴۵[a]	۳۷/۷۴±۷/۷۳[a]	۴۴/۸۴±۶/۸۲[a]
MCHC (٪)	۱۲/۸۵±۲/۳۵[a]	۱۳/۵۷±۱/۲۶[a]	۱۳/۲۲±۱/۵۰[a]	۱۳/۲۴±۲/۶۴[a]

حروف مشابه در هر ردیف نشان دهنده عدم وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها است ($P>0/05$).

جدول ۳: شاخص‌های سرمی خون ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف پودر گیاه گلدر (*Otostegia persica*) پس از ۴۵ روز (میانگین ± خطای استاندارد)

شاخص‌ها	شاهد	T_1	T_2	T_3
کلسترول ($mg.dL^{-1}$)	۲۹۵/۴۱±۱۲/۶۴[a]	۲۶۸/۱۸±۱۷/۳۷[a]	۲۶۲/۱۵±۲۴/۷۰[a]	۲۶۴/۵۰±۲۷/۳۶[a]
تری‌گلیسیرید ($mg.dL^{-1}$)	۳۱۵/۷۵±۲۵/۳۵[a]	۲۸۷/۴۴±۳۸/۸۱[a]	۲۹۹/۱۷±۱۰/۵۹[a]	۲۸۱/۱۳±۲۲/۱۱[a]
پروتئین کل ($g.dL^{-1}$)	۵/۲۱±۰/۱۸[a]	۵/۳۱±۰/۱۶[ab]	۵/۶۳±۰/۱۶[b]	۵/۶۱±۰/۱۸[b]
آلبومین ($g.dL^{-1}$)	۱/۰۳±۰/۱۷[a]	۱/۰۳±۰/۲۷[a]	۰/۹۹±۰/۱۲[a]	۱/۱۳±۰/۲۱[a]
ALP ($IU.dL^{-1}$)	۲۷۸/۱۰±۱۵/۶۸[a]	۲۳۹/۶۹±۲۳/۵۹[a]	۲۴۷/۸۱±۱۴/۴۰[a]	۲۴۰/۳۴±۵/۴۳[a]
ALT ($IU.dL^{-1}$)	۱۳/۶۶±۱/۲۹[a]	۱۳/۷۵±۱/۴۲[a]	۱۲/۴۴±۱/۵۶[a]	۱۲/۴۳±۰/۹۸[a]
AST ($IU.dL^{-1}$)	۱۶۳/۰۸±۱۳/۶۴[a]	۱۴۲/۱۲±۳۶/۳۰[a]	۱۵۴/۶۷±۲۴/۰۳[a]	۱۳۴/۰۰±۱۱/۷۹[a]

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها است ($P<0/05$).

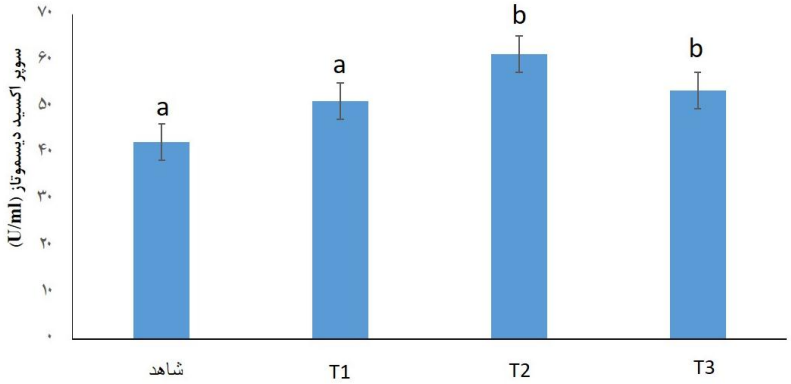
ALP: آلکالین فسفاتاز؛ ALT: آلانین آمینوترانسفراز؛ AST: آسپارتات آمینوترانسفراز.

شاهد: جیره پایه بدون پودر گیاه گلدر. T_1 جیره پایه حاوی ۵ گرم، در T_2 حاوی ۱۰ گرم و در T_3 حاوی ۱۵ گرم پودر گیاه گلدر در هر کیلوگرم.

بیشترین میزان تری‌گلیسرید (TG) در تیمار شاهد، بیشترین مقدار آلبومین (Alb) در تیمار T_3 و بیشترین مقدار آلکالین فسفاتاز (ALP) و کلسترول (Chol) در تیمار شاهد مشاهده شد، هر چند که این تفاوت‌ها معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

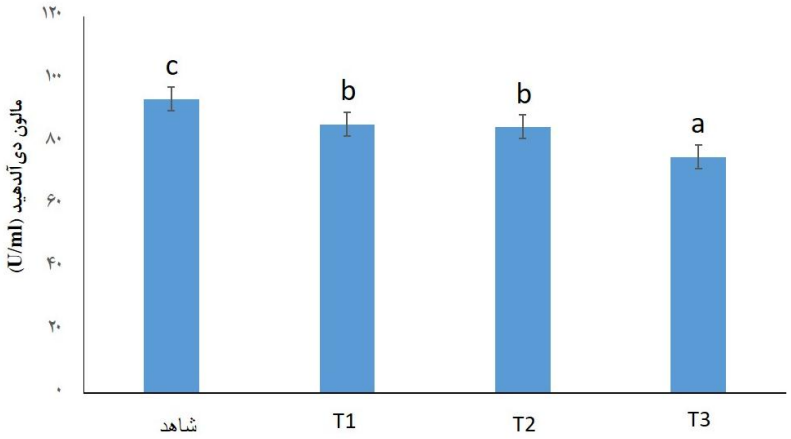
شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی سرم خون

مقایسه میانگین شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی سرم خون ماهی کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف پودر گیاه گلدر (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد) در شکل‌های ۱ تا ۴ ارائه شده است. مقدار آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز (SOD) بین تیمارهای مختلف آزمایشی تفاوت معنی‌دار آماری داشت (P<۰/۰۵) به طوری که بیشترین مقدار این شاخص در تیمار T_2 (۶۱/۵۰±۵/۱۲ واحد در میلی‌لیتر) به ثبت رسید (شکل ۱). مقدار مالون دی‌آلدهید (MDA) بین تیمار شاهد و ماهیان تغذیه شده با تیمارهای دیگر اختلاف آماری معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵)، به طوری که بیشترین و کمترین میزان آن به ترتیب ۹۳/۶۵±۶/۳۵ و ۷۵/۲۴±۴/۴۳ میلی‌مول بر لیتر بود که افزایش گیاه گلدر سبب کاهش این شاخص شد (شکل ۲). با افزایش میزان مصرف پودر گلدر، مقدار کاتالاز (CAT) سرم خون در تیمارهای آزمایشی کاهش یافت (P<۰/۰۵؛ شکل ۳). گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) سرم خون ماهی کپور در تیمار T_2 نسبت به تیمار شاهد به بیشترین مقدار رسید (P<۰/۰۵؛ شکل ۴).

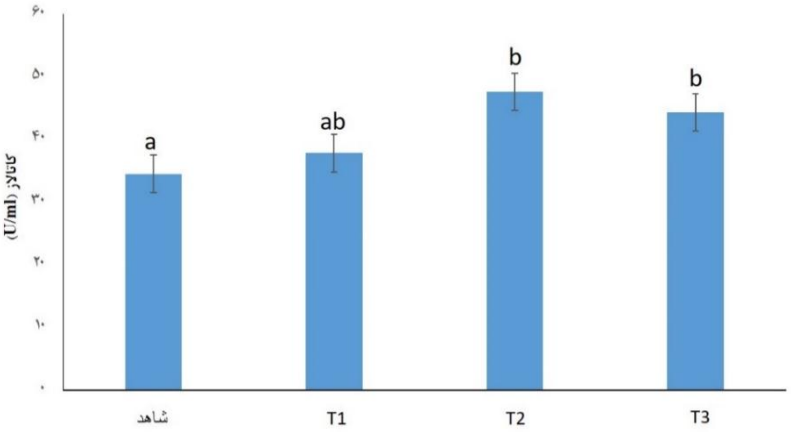


شکل ۱: تغییرات آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سرم خون ماهی کپور معمولی تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف گیاه گلدر (*Otostegia persica*) پس از ۴۵ روز (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان

دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵). شاهد: جیره پایه بدون پودر گیاه گلدر. T_1 جیره پایه حاوی ۵ گرم، در T_2 حاوی ۱۰ گرم و در T_3 حاوی ۱۵ گرم پودر گیاه گلدر در هر کیلوگرم.

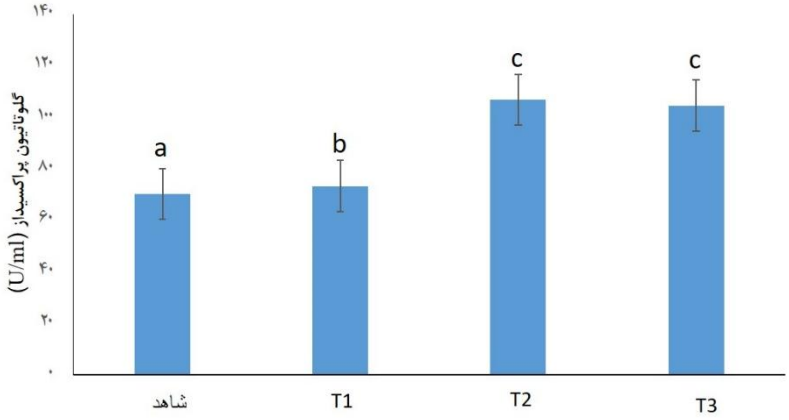


شکل ۲: تغییرات مقدار مالون دی‌آلدهید در سرم خون ماهی کپور معمولی تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف گیاه گلدر (*Otostegia persica*) پس از ۴۵ روز (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵). شاهد: جیره پایه بدون پودر گیاه گلدر. T_1 جیره پایه حاوی ۵ گرم، در T_2 حاوی ۱۰ گرم و در T_3 حاوی ۱۵ گرم پودر گیاه گلدر در هر کیلوگرم.



شکل ۳: تغییرات آنزیم کاتالاز در سرم خون ماهی کپور معمولی تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف گیاه گلدر (*Otostegia persica*) پس از ۴۵ روز (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود

اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵). شاهد: جیره پایه بدون پودر گیاه گلدر. T_1 جیره پایه حاوی ۵ گرم، در T_2 حاوی ۱۰ گرم و در T_3 حاوی ۱۵ گرم پودر گیاه گلدر در هر کیلوگرم.



شکل ۴: تغییرات آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در سرم خون ماهی کپور معمولی تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف گیاه گلدر (*Otostegia persica*) پس از ۴۵ روز (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵). شاهد: جیره پایه بدون پودر گیاه گلدر. T_1 جیره پایه حاوی ۵ گرم، در T_2 حاوی ۱۰ گرم و در T_3 حاوی ۱۵ گرم پودر گیاه گلدر در هر کیلوگرم.

بحث

امروزه استفاده از گیاهان دارویی به صورت فرآورده‌های گیاهی و یا عصاره تام در تمام دنیا رایج است و توجه خاص به گیاه‌درمانی در علوم مختلف رو به افزایش است (Wichti, 1994). هر چند که اثرات سودمند و تاثیرگذار محرک‌های گیاهی بر شاخص‌های خونی و ایمنی ماهیان گزارش شده است (Goda, 2008)، اما پژوهشگران آبزی‌پروری برای رسیدن به اطلاعات جامع و کاربردی، نیازمند بررسی اثرات انواع گیاهان دارویی هستند. در این پژوهش، تاثیر گیاه گلدر بر شاخص‌های خونی و ایمنی ماهی کپور معمولی به عنوان یک مکمل غذایی که دارای خاصیت محرک سیستم ایمنی و آنتی‌اکسیدانی است، مورد بررسی قرار گرفته و نتایج آن با نتایج دیگر پژوهشگران در زمینه گیاهان دارویی دیگر مقایسه شده است.

در آزمایش‌های مختلف، پژوهشگران از گیاهان دارویی با غلظت‌های مختلف برای انواع آبزیان استفاده می‌کنند تا بتوانند با جمع‌آوری اطلاعات بهترین غلظت را برای هر گیاه دارویی گزارش کنند. بنابراین می‌توان اظهار داشت که

بر اساس خواص هر گیاه دارویی و شرایط آزمایش نتایج متفاوتی به دست می‌آید. همسو با نتایج مطالعه حاضر، گزارش شده است که عصاره گیاه مریم‌گلی (*Salvia macrosiphon*) به میزان ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بر میزان هماتوکریت خون ماهی پنگوسی (*Pangasianodon hypophthalmus*) اثر معنی‌داری نداشت (رضایی و همکاران، ۱۳۹۱).

تغییر در تعداد گلبول‌های قرمز و غلظت هموگلوبین به عوامل مختلفی بستگی دارد و می‌تواند تحت شرایط تغییرات دمایی، غلظت اکسیژن و حتی تغییرات فصلی باشد. گلبول‌های قرمز نقش مهمی در انتقال اکسیژن دارند و کاهش تعداد آن‌ها می‌تواند اثرات منفی بر متابولیسم بدن داشته باشد (Khaki et al., 2009).

Pratheepa و همکاران (۲۰۱۰) تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره برگ گیاه *Aegle marmelos* شامل ۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵ و ۵۰ گرم در کیلوگرم غذا را در جیره ماهی کپور مطالعه کردند. نتایج نشان داد درصد بازماندگی در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰ و ۵ گرم در کیلوگرم عصاره نسبت به دیگر تیمارها بیشتر بود (Pratheepa et al., 2010).

مطالعات مختلفی در مورد تاثیر استفاده از مکمل‌های غذایی بر شاخص‌های گلبولی (MCH، MCV و MCHC) انجام شده است. Harikrishnan و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند استفاده از مخلوط عصاره‌های گیاهی *Azadirachta indica*، *Oscimum sanctum* و *Curcuma longa* به صورت معنی‌دارای نسبت به تیمار شاهد متفاوت بودند.

در مطالعه Fazlolahzadeh و همکاران (۲۰۱۱) بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۴۵ و ۰/۶ گرم در کیلوگرم پودر سیر بیان شد تعداد لنفوسیت‌ها و گلبول‌های قرمز افزایش و تعداد نوتروفیل‌ها به صورت معنی‌داری کاهش یافت. Nya و Austin (۲۰۰۹) نیز بیان کردند درصد لنفوسیت و نوتروفیل در قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با پودر گیاه زنجبیل (*Zingiber officinale*) افزایش یافت.

اندازه‌گیری پروتئین‌های سرم خون روش مناسبی برای بررسی وضعیت ایمنی‌شناسی ماهی است. در مطالعه انجام شده بر روی کپور معمولی، میزان پروتئین کل سرم در تیمار های T_2 و T_3 نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نشان داد. نتایج Alishahi و همکاران (۲۰۱۱) بر روی تاثیر عصاره گیاه خار مریم (*Silybum*

marianum) بر ماهی کپور معمولی هم راستا با نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر است. نتایج مشابهی هم توسط Dugenci و همکاران (۲۰۰۳) در مطالعه اثر دانه *Nigella sativa* بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش شد.

با توجه به این که غلظت‌های مختلفی از پودرها و عصاره‌های گیاهی در مطالعات مختلف استفاده می‌شوند، می‌تواند بر نتایج مطالعات اثرگذار باشد، بنابراین مطالعه روی غلظت‌های قابل استفاده پودر گلدر و پودرهای گیاهی دیگر در جیره و رسیدن به غلظت بهینه به منظور بررسی تاثیرات آن‌ها بر شاخص‌های رشد و ایمنی‌شناختی خون گونه‌های مختلف ماهیان قابل پیشنهاد است.

افزودن ترکیبات محرک به جیره غذایی یکی از روش‌های رایج برای بهبود وضعیت اکسیداتیو ماهیان است (Pellati et al., 2004). گیاه گلدر به دلیل محتوای بالای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند فنل، تانن و فلاونوئید فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارد (Sharififar et al., 2003). در این پژوهش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز با افزایش غلظت پودر گلدر تا میزان ۱ درصد، افزایش معنی‌داری یافت و این نشان دهنده تاثیرات مثبت این ماده است.

آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) از آنزیم‌های مهم کبدی هستند و در انتقال گروه‌های آمینی نقش موثری دارند. در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری در میزان آنزیم‌های کبدی در تیمارهای مختلف دیده نشد که نشان دهنده عدم وجود اثرات منفی گیاه گلدر در غلظت‌های استفاده شده بر ماهی کپور معمولی است. در مطالعه انجام شده در زمینه تاثیر اضافه کردن اسانس گیاه بومادران (*Achillea millefolium*) در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، نتایج نشانگر افزایش معنی‌دار AST و ALT در ماهیان تغذیه شده با ۱ درصد اسانس این گیاه بود (Nafisi Bahabadi et al., 2014). همچنین برخی از پژوهشگران بیان کرده‌اند استفاده از ترکیبات گیاهی در جیره غذایی منجر به کاهش آنزیم‌های کبدی در پلاسما می‌شود که از آن‌ها می‌توان به مطالعه انجام شده در زمینه تاثیر عصاره‌های سیر و پیاز در جیره غذایی ماهی *Clarias lazera* اشاره کرد (Al-Salahy, 2002). با توجه به نتایج مطالعه حاضر، میزان آنزیم‌های کبدی تغییر معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نداشت که احتمالا ناشی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در آن است.

به طور کلی نتایج پژوهش حاضر نشان داد اضافه کردن پودر گیاه گلدر به جیره غذایی ماهی کپور معمولی روش کارآمدی برای بهبود آنزیم‌های آنتی اکسیدانی پلاسما در ماهی کپور معمولی است. همچنین شایان ذکر است در دیگر شاخص‌های اندازه‌گیری شده مانند شاخص‌های خونی، آنزیم‌های کبدی و شاخص‌های اندازه‌گیری شده در سرم خون (به استثنای میزان پروتئین کل) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. با توجه به نتایج به دست آمده، از آنجایی که بیشترین اثرات مشاهده شده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پلاسما با اضافه کردن ۱ و ۱/۵ درصد پودر گیاه گلدر به جیره مشاهده شد، استفاده از این غلظت‌ها در جیره غذایی ماهی کپور معمولی با هدف بهبود آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پلاسمای خون پیشنهاد می‌شود

تشکر و قدردانی

از حمایت‌های مالی دانشگاه زابل (گرنت شماره: UOZ.GR.9718:51) تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

احمدی‌فر ا.، آدینه ح.، فدایی راینی م. و مقدم‌فر س. ۱۳۹۸. تاثیر پودر گلبرگ زعفران بر عملکرد رشد، تغذیه و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی لارو ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۸(۳): ۴۴-۳۳.

رضایی م.ه، سوری‌نژاد ا.، سلطانیان س. و یوسف‌زادی م. ۱۳۹۱. مطالعه برخی پارامترهای رشد و خون‌شناسی گربه‌ماهی پنگوسی (*Pangasianodon hypophthalmus*) با افزودن عصاره مریم‌گلی (*Salvia macrosiphon*) به جیره. بوم‌شناسی آبزیان، ۲(۲): ۴۳-۲۸.

فاطمی س.ا. و میرزرگر س.س. ۱۳۸۶. فارماکولوژی کاربردی ماهیان. انتشارات دانشگاه تهران. ۶۲۴ص.

وثوقی غ.ح.، مستجیر ب. ۱۳۹۴. ماهیان آب شیرین. انتشارات دانشگاه تهران. ۳۳۴ص.

Ahmadifar E., Dawood M.A.O., Shahriyari Moghadam M., Hashemi Shahrestanaki A., Van Doan H., Saad A.H., Aboubakr M., Abdelhiee E.Y. and Fadl S.E. 2020. The effect of *Pediococcus acidilactici* MA 18/5M on immune responses and mRNA levels of growth, antioxidant and immune-related genes in zebrafish (*Danio rerio*). Aquaculture Reports, 17(2020): 1–8 (100374).

Akbarzadeh M. 2003. Medicinal plants of the family Lamiaceae (Mentha), in the Mazanderan Vaz. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 19(1): 31–45.

Alishahi M., Soltani M., Mesbah M. and Rad A.E. 2011. Effects of dietary *Silybum marianum* extract on immune parameters of the common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Veterinary Research, 66(3): 255–286.

Al-Salahy M.B. 2002. Some physiological studies on the effect of onion and garlic juices on the fish, *Clarias lazera*. Fish Physiology and Biochemistry, 27(1): 129–142.

Burtis C.A., Ashwood E.R. and Bruns D.E. 2012. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Elsevier, USA. 2238P.

Cahill M.M. 1990. Bacterial flora of fishes: A review. Microbial Ecology, 19(1): 21–41.

Dugenci S.K., Arda N. and Candan A. 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. Journal of Ethnopharmacology, 88(1): 99–106.

Fazlolahzadeh F., Keramati K., Nazifi S., Shirian S. and Seifi S. 2011. Effect of garlic (*Allium sativum*) on hematological

parameters and plasma activities of ALT and AST of rainbow trout in temperature stress. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5(9): 84–90.

Feledman B.F., Zinkl L.G. and Jian N.C. 2000. Schalms Veterinary Hematology. Lippincott Williams and Wilkins, USA. 1206P.

Goda A.M.S. 2008. Effect of dietary ginseng herb (Ginsana® G115) supplementation on growth, feed utilization, and hematological indices of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), fingerlings. Journal of the World Aquaculture Society, 39(2): 205–214.

Gokoglu N., Yerlikaya P. and Cengiz E. 2004. Effects of cooking methods on the proximate composition and mineral contents of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Food Chemistry, 84(1): 19–22.

Gudding R., Lillehaug A. and Evensen O. 1999. Recent developments in fish vaccinology. Veterinary Immunology and Immunopathology, 72(1-2): 203–212.

Hajhashemi V., Rabbani M., Asghari G.R. and Karami-Sarvi Z. 2004. Effects of *Otostegia persica* (Burm) boiss on morphine withdrawal syndrome in mice. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 3: 30–35.

Harikrishnan R., Balasundaram C. and Heo M.S. 2010. Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology, 28(2): 354–361.

Hoseinifar S.H., Zare P. and Merrifield D.L. 2010. The effects of inulin on growth factors and survival of the Indian white shrimp larvae and postlarvae (*Fenneropenaeus indicus*). Aquaculture Research, 41(9): 348–352.

Hoseinifar S.H., Zoheiri F. and Lazado C.C. 2016. Dietary phytoimmunostimulant Persian hogweed (*Heracleum persicum*) has more remarkable impacts on skin mucus than on serum in common carp (*Cyprinus carpio*). Fish and Shellfish Immunology, 59: 77–82.

Khaki A.A. and Khaki A., Nouri M., Ahmadi Ashtiani H.R., Rastgar H., Rezazadeh S., Fathi Azad F. and Ghanbari M. 2009. Evaluation effects of quercetin on liver apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rat. Journal of Medicinal Plants, 8: 70–78.

Lopes-Lutz D., Alviano D.S., Alviano C.S and Kolodziejczyk P.P. 2008. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. Phytochemistry, 69(8): 1732–1738.

Misra C.K., Das B.K, Mukherjee S.C. and Pattnaik P. 2006. Effect of long term administration of dietary β-glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. Aquaculture, 255(1-4): 82–94.

Nafisi Bahabadi M., Banaee M., Taghiyan M. and Nematdoust Haghi B. 2014. Effects of dietary administration of yarrow extract on growth performance and blood biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). International Journal of Aquatic Biology, 2(5): 275–285.

Nourinasab N., Goreishi S.M. and Banifatemi S.S. 2019. Evaluation and optimization of supercritical extraction of insulin from *Otostegia persica*. Boletin del Grupo Espanol del Carbon, 51: 13–19.

Nya E.J. and Austin B. 2009. Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe, as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases, 32(11): 971–977.

Parvin A., Yaghmaei P., Noureddini M., Haeri Roohani S.A. and Aminzadeh S. 2019. Comparative effects of quercetin and hydroalcoholic extract of *Otostegia persica* boiss with atorvastatin on atherosclerosis complication in male wistar rats. Food Science and Nutrition, 7(9): 2875–2887.

Pellati F., Benvenuti S., Magro L., Melegari M. and Soragni F. 2004. Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of Echinacea spp. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 35(2): 289–301.

Pratheepa V., Ramesh S. and Sukumaran N. 2010. Immunomodulatory effect of *Aegle marmelos* leaf extract on freshwater fish *Cyprinus carpio* infected by bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. Pharmaceutical Biology, 48(11): 1224–1239.

Sakai M. 1999. Current research status **of** fish immunostimulants. Aquaculture, 172: 63–92.

Shalaby A.M., Khattab Y.A. and Abdel Rahman A.M. 2006. Effects of garlic (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, 12(2): 172–201.

Sharififar F., Yassa N. and Shafiee A. 2003. Antioxidant activity of *Otostegia persica* (Labiatae) and its constituents. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2: 235–239.

Tatina M., Bahmani M., Soltani M., Abtahi B. and Gharibkhani M. 2010. Effects of different levels of dietary vitamins C and E on some of hematological and biochemical parameters of sterlet (*Acipenser ruthenus*). Journal of Fisheries and Aquatic Science, 5(1): 1–11.

Thomas L. 1998. Clinical Laboratory Diagnostics: Use and Assessment of Clinical Laboratory Results. TH-Books Verlagsgesellschaft, Germany. 1727P.

Wichti M. 1994. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. CRC, USA. 292P.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 9, No. 1, Spring 2021

Research Paper

Effect of dietary golder powder (*Otostegia persica*) on blood parameters, antioxidant defense and immune of common carp (*Cyprinus carpio*)

Ahmad Rakhshani[1], Ebrahim Alizadeh Doghikalae[2], Ehsan Ahmadifar[3]*, Mohsen Shahriari Moghadam[4]

Received: February 2020 Accepted: August 2020

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of a diet containing golder powder (*Otostegia persica*) on blood parameters, antioxidant and immunological responses in common carp (*Cyprinus carpio*). For this purpose, fish with a mean weight of 28.32±2.12g were distributed in aquariums and were fed with 0 (control), 0.5 (T_1), 1 (T_2) and 1.5% (T_3) of golder powder for 45 days. At the end of the period, blood samples were collected from fish and immunological parameters and antioxidant enzymes evaluated. The results showed that the addition of plant powder to the diet did not cause significant changes in hematological indices (RBC and WBC count and hematocrit) and RBC indices (MCV, MCH and MCHC) between experimental treatments (P>0.05). Also, liver enzymes alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and aspartate transaminase (AST) were not significantly different (P>0.05). The highest total protein was observed in fish fed with T_2 and the control group has the lowest level, and there was a significant difference between treatments containing 1 and 1.5% of plant powder and other treatments (P<0.05). Albumin, triglyceride and cholesterol of fish fed with golder powder were not significantly different at the end of the experiment with control treatment (P>0.05). Catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase had the highest levels in fish fed with diets containing 1 and 1.5% of golder powder (P<0.05). The amount of malondialdehyde decreased significantly with increasing the amount of plant powder in the diet (P<0.05). Generally, golder powder has a positive effect on serum antioxidant parameters in this study.

Key words: *Blood Parameters, Antioxidant Parameters, Immunity, Golder,* Cyprinus carpio.

1- M.Sc. Student in Fish Product Processing, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran.
2- Associate Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran.
3- Assistant Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran.
4- Associate Professor in Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran.

*Corresponding Author: Ehsan.Ahmadifar@uoz.ac.ir