تاثیر استفاده برخی از عصارهای گیاهی بر رشد و تغذیه، آنزیم‌های گوارشی و پارامترهای ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

محمد خادمی حمیدی*[۱]، حسین آدینه[۱]، محمد هرسیج[۱]، حسنا قلی‌پور کنعانی[۱]

*mohammadkhademi110@gmail.com

۱-گروه شیلات، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه کنبد کاووس، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۸

چکیده

تاثیر عصاره‌های کونوکارپوس (*Conocarpus erectus* L.)، پالونیا (*Paulownia fortunei*) و مخلوط آنها (۵۰٪ کونوکارپوس+ ۵۰٪ پالونیا) بر کارایی رشد و تغذیه، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و ایمنی غیر اختصاصی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد مطالعه قرار گرفت. ماهیان به ۴ گروه تغذیه‌ای با رژیم غذایی ۰٪ (T1)، ۱٪ عصاره کونوکارپوس (T2)، ۱٪ عصاره پالونیا (T3) و مخلوط آنها (T4) به‌مدت ۳۰ روز تقسیم شدند. ۱۸۰ قطعه ماهی (۴/۰۹±۵۷ گرم) به طور تصادفی در ۱۲ آکواریوم ۷۰ لیتری قرار گرفتند که به ۳ تیمار و ۱ شاهد تقسیم شدند. عملکرد رشد ماهیان در همه تیمارهای تغذیه شده با عصاره‌های گیاهی در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌دار آماری داشت ($p<0/05$)؛ بیشترین مقدار در تیمار ۴ بدست آمد. ضریب تبدیل غذایی (FCR) در تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد بهبود یافت. سطوح آنزیم های گوارشی افزایش معنی‌داری در تیمار ۳ ماهی تغذیه شده با ۱٪ عصاره پالونیا در مقایسه با سایر تیمارها و شاهد نشان داد. اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی مختلف و شاهد در سطح پروتئین و آلبومین سرم خون ماهی وجود نداشت ($p>0/05$) در حالیکه مقادیر گلوکز و هموگلوبین در ماهیان مصرف کننده عصاره گیاهی افزایش معنی‌داری آماری داشتند. نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از عصارهای کنوکارپوس و پالونیا در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان منجر به بهبود رشد، آنزیم‌های گوارشی و ایمنی غیر اختصاصی خون شود.

لغات کلیدی: ماهی قزل‌آلای رنگین کمان، عصاره‌های گیاهی، رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی، ایمنی غیر اختصاصی

*نویسنده مسئول

مقدمه

آبزی‌پروری با سرعت بیش‌تری در مقایسه با سایر بخش-های تولید منابع غذایی حیوانی در حال پیشرفت است و از چندین دهه گذشته به سرعت به یک صنعت پویا و رو به رشد تبدیل شده است ولی در کنار این رشد همواره با مشکلاتی روبرو بوده است که از جمله آن می‌توان به تغییرات کیفیت آب، عوامل نامساعد محیطی، شیوع بیماری‌ها و مشکلات تغذیه‌ای اشاره کرد. ماهی قزل‌آلای رنگین کمان یکی از مهمترین گونه‌های تجاری در دنیاست که به دلیل داشتن قابلیت تکثیر مصنوعی آسان و تولید انبوه تخم، لارو و بچه ماهی، تغذیه فعال در محیط‌های پرورشی با ضریب تبدیل غذایی مناسب، قابلیت سازگاری بالا در محیط‌های پرورشی، کیفیت گوشت و بازار پسندی مناسب به طور گسترده در بسیاری از کشورهای جهان به میزان ۸۱۴۰۹۱ تن پرورش داده می‌شود (FAO, 2018). یکی از مشکلات صنعت پرورش ماهیان سردآبی در ایران، کاهش بازدهی و بالا بودن هزینه‌های تولید است. لذا، محققین زیادی به دنبال استفاده از محرک‌های رشد و ایمنی در راستای افزایش بازدهی در کوتاهترین بازده زمانی و کاهش هزینه‌های تولید می‌باشند. از اینرو، استفاده از محرک‌های گیاهی می‌تواند قابل توجه باشد.

گیاه پالونیا فورتونی (*Paulownia fortunei*) از تیره گل میمون (Schrophulariaceae) است. پالونیا گونه بومی کشور چین از ۲۶۰۰ سال پیش بخوبی شناخته شده است (Jimenez *et al.*, 2005). برگ این گیاه با داشتن ترکیبات پلی‌ساکارید با خواص آنتی‌اکسیدانی جهت تولید داروهای گیاهی (Wang *et al.*, 2019)، با داشتن ۲۵ درصد پروتئین به عنوان خوراک دام و نیز در تولید کودهای آلی استفاده می‌گردد (Bashir *et al.*, 2015).

کنوکارپوس ارکتوس (*Conocarpus erectus* L.) از خانواده کامبرتاسه (Combretaceae) یکی از گیاهان زینتی رایج در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری است. این درخت در آفریقا به شکل علوفه سبز در مخلوط جیره نشخوارکنندگان استفاده شده است. برخی گزارش‌ها حاکی از این است که شاخ و برگ کنوکارپوس خوش خوراک بوده و گیاهی جذاب برای خوراک حیوانات است (Bashir *et al.*, 2015). میزان پروتئین آن ۱۱-۷ درصد گزارش شده است (Baroon & Mohamed, 2012).

در سال‌های اخیر محققین برای جایگزینی محرک‌های ایمنی گیاهی به جای محصولات شیمیایی از عصاره‌های مختلف گیاهی جهت بهبود و تقویت سیستم ایمنی آبزیان استفاده می‌نمایند که در این راستا می‌توان به استفاده از عصاره الکلی یونجه (*Medicago sativa*) عملکرد رشد، مصرف غذا، ترکیب بدن و برخی از فراسنجه‌های سرمی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (نجفی و همکاران، ۱۳۹۷)، اثرات عصاره هیدروالکلی گیاه آنغوزه (*Ferula assafoetida*) در جیره غذایی بر بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی (صفری، ۱۳۹۷)، بکارگیری عصاره نعنا فلفلی (*Mentha piperita*) بر شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی ماهی قزل‌آلا باعث تقویت ایمنی غیراختصاصی (عادل و همکاران، ۱۳۹۴)، افزودن سطوح مختلف عصاره سرخارگل (*Echinacea purpurea*) به عنوان محرک ایمنی بچه ماهی قزل‌آلا در برابر بیماری استرپتوکوکوزیس (پورغلام و همکاران، ۱۳۹۲)، استفاده از مکمل گیاهی خارمریم (*longterm silymarin*) در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (Banaee *et al.*, 2011) و اثرات استفاده از روغن استخراج شده از میوه لیمو تلخ (*Citrus limon*) بر عملکرد رشد، وضعیت فاکتورهای بیوشیمیایی و هماتولوژی خون بچه ماهی *Labeo victorianus* (Okoth *et al.*, 2016) اشاره کرد. هدف از این مطالعه افزودن عصاره‌های کنوکارپوس و پالونیا به جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به میزان ۱ درصد جهت بررسی فاکتورهای رشد، تغذیه، ترشح آنزیم‌های گوارشی و سنجش برخی پارامترهای ایمنی غیر اختصاصی بود.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و شریط آزمایشگاهی

تعداد ۲۵۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به همراه آب تازه از کارگاه آقای رزاقی شهر دابودشت شهرستان آمل استان مازندران، ایران تهیه و توسط ماشین حمل ماهی زنده به مخازن پرورش آزمایشگاه بهداشت آبزیان دانشگاه گنبد کاووس انتقال یافت. برای سازگاری با شرایط آزمایشگاهی ماهیان جوان به مدت ۱۰ روز نگهداری

شدند. تعویض آب روزانه ۱۰ درصد از کف مخازن انجام پذیرفت. در طول دوره پرورش هر سه روز یکبار فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب شامل؛ دما، اکسیژن محلول و اسیدیته آب با دستگاه HACH مدل ۲۰۰۰ ساخت آمریکا اندازه‌گیری شد که بترتیب برابر ۰/۳۹±۱۸/۲۰ سانتی‌گراد، ۰/۴۳±۷/۱۵ میلی‌گرم در لیتر، ۰/۱۰± ۸/۱۹ بود. روزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ آزمایش مقادیر آمونیاک (TAN)، نیترات (NO3-N) و نیتریت (NO2-N) با روش استاندارد آزمایشگاهی توسط دستگاه فتومتریک سنجیده شد (APHA 1998)که بترتیب برابر ۰۰۱۶ ±۰/۰۱۴ میلی‌گرم در لیتر، ۰/۲۱± ۱۶/۵۶ میلی-گرم در لیتر و ۰/۰۰۹۴±۰/۰۲۰ میلی‌گرم در لیتر به ثبت رسید.

طرح آزمایش

برگ گیاه پالونیا از محوطه دانشگاه گنبد کاووس و برگ گیاه کونوکارپوس از اهواز تهیه و توسط مرکز هرباریوم دانشگاه گنبد کاووس مورد تایید قرار گرفت. برای عصاره‌گیری، برگ‌های گیاه پس از شستشو در سایه خشک و توسط آسیاب برقی کاملاً خرد گردید. به ازای هر ۱۰۰ گرم پودر گیاه خشک نیز ۵۰۰ میلی‌لیتر الکل اتانولی ۸۰ درصد (۴۰۰ میلی‌لیتر الکل+ ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) اضافه گردید. برای ترکیب و استخراج مواد موثره، به مدت ۷۲ ساعت بر روی دستگاه شیکر قرار داده شد. محتویات از کاغذ صافی عبور داده شد تا عصاره از پودر برگ جدا شود (Haghighati *et al.*, 2003). عصاره‌های کونوکارپوس و پالونیا با کمک دستگاه روتاری مدل HS2005S ساخت کشور کره در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد. عصاره بدست آمده در ظرف شیشه‌ای تیره رنگ درون یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای افزودن به رژیم غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان جوان نگهداری گردید.

تعداد ۱۸۰ قطعه ماهی در ۱۲ آکواریوم (۴ تیمار و هر یک با ۳ تکرار) با حجم آبگیری ۷۰ لیتر ذخیره‌سازی شدند. در قالب طرح کاملاً تصادفی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۴/۰۹± ۵۷/۰۰ گرم و طول۰/۶۰± ۱۷/۵۰ سانتی‌متر در ۴ تیمار به‌مدت ۳۰ روز مورد آزمایش قرار گرفتند که شامل تیمار شاهد بدون عصاره (T1)، ۱٪ عصاره کونوکارپوس (T2)، ۱٪ عصاره پالونیا (T3) و مخلوط ۰/۵٪ عصاره کونوکارپوس و ۰/۵ ٪ عصاره پالونیا (T4) بودند. جهت پایداری عصاره در آب از محلول ژلاتین ۵ درصد در جیره‌های غذایی استفاده شد (صفری و همکاران، ۱۳۹۷). غذای آماده هر تیمار به طور مجزا درون ظروف درب‌دار در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد دور از نور نگهداری شد. در طول دوره آزمایش میزان غذادهی به میزان ۲ درصد وزن زنده و در ۳ نوبت بود. هر روز قبل از غذادهی، عمل سیفون کردن آب برای خروج مدفوع انجام شد.

اندازه‌گیری فاکتورهای رشد و تغذیه

پایان دوره آزمایش برای بررسی روند رشد و تغذیه زیست سنجی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان توسط ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم و خط کش با دقت ۱ میلی-متر انجام شد. معیارها محاسباتی شامل افزایش وزن، درصد رشد روزانه، نرخ رشد ویژه، ضریب چاقی، ضریب تبدیل غذایی، کارایی تبدیل غذا و نسبت کارایی پروتئین انجام شد:

افزایش وزن (WG, g)= میانگین وزن نهایی (گرم)- میانگین وزن اولیه (گرم)

میانگین رشد روزانه (ADG, ٪)= [(وزن نهایی- وزن اولیه)/ مدت‌زمان پرورش]× ۱۰۰

ضریب رشد ویژه (SGR, $\%day^{-1}$)= ((ln وزن نهایی (گرم)- ln وزن اولیه (گرم))/ مدت‌زمان پرورش (روز))× ۱۰۰

ضریب چاقی (CF)= (وزن نهایی (گرم)/ توان سوم طول کل ماهی (سانتی‌متر))× ۱۰۰

ضریب تبدیل غذایی (FCR)= [مقدار غذای مصرف‌شده (گرم)/ (وزن نهایی (گرم)- وزن اولیه (گرم))]

کارایی تبدیل غذا (FCE, %)= (وزن بدست آمده/ مقدار غذای مصرف شده (گرم))× ۱۰۰

نسبت کارایی پروتئین (PER)= (وزن بدست آمده (گرم)/ مقدار مصرف پروتئین (گرم))

نسبت کارایی چربی (LER)= (وزن بدست آمده (گرم)/ مقدار مصرف چربی (گرم))

خونگیری و سنجش فاکتورهای ایمنی

۲۴ ساعت از قبل عملیات نمونه‌برداری غذادهی متوقف گردید. ماهیان با عصاره میخک به مقدار ۳۰ گرم در یک لیتر آب که از کاغذ صافی عبور داده شده بود نیز بیهوش شدند. بعد از عمل زیست سنجی به‌صورت تصادفی ۵ قطعه ماهی از هر تکرار صید گردید و عمل خونگیری از ساقه‌ی دمی با استفاده از سرنگ استریل انجام شد. خون درون میکروتیوب‌های استریل قرار گرفت و با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰rpm × دور در دمای ۴ درجه سرم خون جداسازی شده و درون میکروتیوب‌های درب‌دار استریل قرار گرفت که برای سنجش فاکتورهای خونی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای تعیین میزان فعالیت لیزوزیم سرم از روش ارائه‌شده توسط (۱۹۹۰) ELLIS استفاده شد. بدین منظور از لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ (1 mg/ Lysozyme.mL^{-1}) منظور ترسیم منحنی به‌عنوان استاندارد استفاده شد. مقدار ۲۵ میکرولیتر از پلاسما به پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای شکل الایزا افزوده شد. سپس مقدار ۱۷۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی میکروکوکوس لیزودیکتیکوس (Micrococcus Lysodeikticus) در غلظت ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر در ۰/۵ مولار بافر فسفات با پی‌اچ ۶/۲ اضافه شد. با استفاده از دستگاه الایزاریدر مارک Bio-Tek آمریکا جذب نوری اولیه در طول‌موج ۵۳۰ nm قرائت و پس از یکساعت نگهداری در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد اتاق، مجدداً جذب نوری اندازه‌گیری شد. هر واحد از فعالیت لیزوزیم بر اساس کاهش جذب (۰/۰۰۱ در دقیقه) تعیین شد. پروتئین و گلوکز سرم خون با استفاده از کیت تشخیصی شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری شد (Borges *et al.*, 2004). میزان ایمنوگلوبولین و هموگلوبین توسط کیت مخصوص به روش کدورت‌سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد.

نمونه‌برداری و آنالیز آنزیم‌های گوارشی

برای تخلیه مواد اضافی از روده ماهیان به‌مدت ۲۴ ساعت قطع غذادهی شدند. محوطه شکم با الکل ضدعفونی سپس کل روده از بدن جدا و توسط سرم فیزیولوژی شست‌وشو شد. نمونه‌های هر تکرار درون میکروتیوب‌های استریل درب دار قرار داده و سپس به فریزر با دمای ۸۰- درجه-سانتی‌گراد انتقال داده شد. نمونه‌ها پس از خروج از فریزر سریعاً با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم و سپس به نسبت وزنی- حجمی (۱ به ۹) محلول بافر هموژنز شد (Cahu *et al.*, 1999). جهت تهیه عصاره آنزیمی ابتدا بافر ساخته شد که بدین منظور ۱۰۰ میلی‌مولار Tris-Hcl، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، ۰/۱ درصد Triton در pH ۷/۸ با هموژن شدند. نمونه‌ها در دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار با دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد قرار داده شد که در نهایت مایع رویی بدست آمده به‌عنوان عصاره آنزیمی برای سنجش جدا گردید (Rungruangsak *et al.*, 2002). مقدار فعالیت آنزیم آمیلاز به روش دستی با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی و مقدار فعالیت آنزیم لیپاز به روش آنزیمی، کالریمتری با استفاده از کیتهای آزمایشگاهی شرکت پارس آزمون و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. طبق دستورالعمل شرکت سازنده، آمیلاز و پروتئاز بر اساس روش ورتینگتون (Worthington, 1993) و لیپاز براساس روش ایجیما و همکاران (Iijima *et al.*, 1998) اندازه‌گیری شد. در این تحقیق اندازه‌گیری آنزیم های گوارشی بر حسب فعالیت کل آنزیمی انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای آنالیز داده‌ها از نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۰ و محیط نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. از آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (One-Way ANOVA) برای مقایسه آماری تیمارها و از روش دانکن برای بررسی وجود یا فقدان اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها تیمارهای مختلف آزمایشی استفاده شد. در آزمون های آماری سطح معنی دار ۰/۰۵ در نظر گرفته شد ($P<0/05$).

نتایج

آنالیز عملکرد رشد و تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه‌شده با عصاره‌های کونوکارپوس، پالونیا و مخلوط ۵۰ درصدی از هر یک در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱: فاکتورهای رشد و تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تغذیه شده با ۱ درصد از عصاره‌های گیاهی
Table 1: Feed and Growth factors of rainbow trout fed with 1% of herbal extracts

تیمارها / معیارها	T1 (شاهد بدون عصاره)	T2 کونوکارپوس	T3 پالونیا	T4 کونوکارپوس+پالونیا
وزن نهایی (گرم)	۷۰/۰±۱/۲۷^{b}	۸۴/۴۰±۹/۱۷^{a}	۸۵/۸۵±۴/۷۴^{a}	۸۹/۶۶±۶/۴۲^{a}
طول نهایی (سانتی‌متر)	۲۱/۳۰±۰/۶۷^{a}	۲۰/۶۵±۰/۵۸^{a}	۲۰/۵۲±۱/۲۵^{a}	۲۰/۵۰±۱/۴۷^{a}
وزن بدست آمده (گرم)	۱۳/۰۳±۳/۸۱^{b}	۲۷/۱۵±۷/۷۱^{a}	۲۸/۴۷±۷/۱۲^{a}	۳۲/۶۱±۷/۱۹^{a}
نرخ رشد روزانه(درصد)	۰/۷۷±۰/۲۵^{b}	۱/۵۷±۰/۴۱^{a}	۱/۶۶±۰/۴۹^{a}	۱/۹۱±۰/۴۴^{a}
ضریب چاقی	۰/۷۲±۰/۰۵^{b}	۰/۹۵±۰/۰۳^{ab}	۱/۰۰±۰/۱۷^{a}	۱/۰۷±۰/۲۸^{a}
ضریب تبدیل غذایی	۲/۷۲±۰/۹۰^{a}	۱/۳۰±۰/۴۲^{b}	۱/۲۱±۰/۳۰^{b}	۱/۰۵±۰/۲۸^{b}
کارایی پروتئین	۰/۳۲±۰/۰۹^{b}	۰/۶۸±۰/۱۹^{a}	۰/۷۲±۰/۱۸^{a}	۰/۸۲±۰/۱۸^{a}
کارایی چربی	۲/۱۷±۰/۶۳^{b}	۴/۵۲±۱/۲۸^{a}	۴/۷۴±۱/۱۸^{a}	۵/۴۳±۱/۱۹^{a}
شاخص کبدی	۲/۱۴±۰/۵۳^{ab}	۱/۷۳±۰/۱۳^{b}	۲/۴۲±۰/۲۵^{a}	۲/۳۴±۰/۳۰^{a}
شاخص روده	۲/۶۷±۰/۸۰^{a}	۱/۷۵±۰/۲۰^{b}	۱/۷۴±۰/۲۹^{b}	۲/۱۹±۰/۱۷^{ab}

حروف غیر یکسان در هر ردیف نشان از تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

پایان دوره آزمایش وزن نهایی بین تیمار شاهد با تیمارهای آزمایشی با عصاره‌ها تفاوت معنی‌دار آماری داشت ($p<۰/۰۵$) بطوریکه بیشترین وزن در تیمار ۴ (۸۹/۶۶±۶/۴۲ گرم) و کمترین وزن در تیمار ۱ (۷۰/۰±۱/۲۷ گرم) بدست آمد. نرخ رشد روزانه و ضریب چاقی بین تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). در مطالعه حاضر، ضریب تبدیل غذایی بین تیمار شاهد و تیمارهای مصرف‌کننده عصاره‌ها تفاوت معنی‌دار آماری داشت ($p<۰/۰۵$). کمترین و بیشترین آن بترتیب در تیمار ۴ و در تیمار ۱ (شاهد) بود. نسبت کارایی پروتئین و چربی بین تیمارهای مختلف آزمایشی در مقایسه با تیمار ۱ (شاهد) اختلاف معنی‌داری آماری مشاهده شد ($p<۰/۰۵$) بطوریکه بیشترین مقادیر آن‌ها در تیمار ۴ و کمترین آن در تیمار ۱ (شاهد) مشاهده شد. بالاترین مقدار شاخص کبدی در T3 و بالاترین شاخص روده در T1 (شاهد) به ثبت رسید.

نتایج بدست آمده از سنجش آنزیم‌های روده ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان تغذیه شده با عصاره گیاهان در جدول ۲ ارائه شده شده است. افزودن عصاره پالونیا به رژیم غذایی ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان باعث افزایش معنی‌داری در میزان آنزیم آمیلاز و لیپاز نسبت به تیمار شاهد شد ($p<۰/۰۵$). بیشترین و کمترین مقدار آن بترتیب در تیمارهای ۳ و ۱ بدست آمد. مقدار آنزیم پروتئاز در تیمارهای مصرف‌کننده مجزا عصاره کونوکارپوس و پالونیا در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری داشت در حالیکه بین تیمارهای ۱ و ۴ اختلاف آماری وجود نداشت ($p>۰/۰۵$). بیشترین مقدار این پارامتر در تیمار ۳(۱۸/۳۵±۱۶۲/۰۰) و کمترین آن در تیمار ۱ (شاهد) (۸۲/۰±۶/۵۵) بدست آمد.

تاثیر بکارگیری ۱ درصد از عصاره‌ها کونوکارپوس، پالونیا و مخلوط آنها در جیره غذایی بر پارامترهای ایمنی غیراختصاصی ماهی قزل آلای رنگین‌کمان در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار فعالیت لیزوزیم در تیمار ۴ (۴/۵۰±۵۳/۶۶ واحد/ میلی‌لیتر/ دقیقه) در مقایسه با دیگر تیمارهای آزمایشی بدست آمد. مقدار گلوکز در تیمار ۱ (شاهد) افزایش معنی‌دار آماری نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی داشت ($p<۰/۰۵$). بیشترین و کمترین مقدار آن بترتیب در تیمار شاهد (۸۰/۰۰±۲/۶۴ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) و تیمار ۲ (۶۳/۶۶±۲/۵۱ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) بدست آمد. پروتئین کل و آلبومین سرم خون بین تیمارهای مختلف آزمایشی اختلاف نداشت ($p >۰/۰۵$). مقادیر هموگلوبین خون بین تیمار شاهد با سایر تیمارهای آزمایشی تفاوت آماری معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۵$) بطوریکه بیشترین مقدار آن در تیمار T3 برابر ۱۲/۹۶±۰/۲۸ بدست آمد.

جدول ۲: آنزیم‌های گوارشی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تغذیه شده با ۱ درصد از عصاره‌های گیاهان
Table 2: Rainbow trout digestive enzymes fed with 1% extracts of herbs

تیمارها / معیارها	T1 (شاهد بدون عصاره)	T2 کونوکارپوس	T3 پالونیا	T4 کونوکارپوس+پالونیا
آمیلاز (واحد/ گرم بافت)	۴۰۶/۰±۱۰/۱۴^{b}	۶۰۴/۳۳±۵۴/۰۴^{a}	۶۴۳/۰±۴۴/۴۴^{a}	۴۴۰/۳۳±۴۰/۵۱^{b}
لیپاز (واحد/ گرم بافت)	۶۲/۳۳±۵/۱۳^{b}	۷۴/۳۳±۵/۰۳^{b}	۱۳۲/۳۳±۱۴/۱۸^{a}	۷۱/۶۶±۱۰/۵۰^{b}
پروتئاز (واحد/ گرم بافت)	۸۲/۰±۶/۵۵^{b}	۱۴۲/۰±۱۴/۹۳^{a}	۱۶۲/۰۰±۱۸/۳۵^{a}	۹۰/۰±۹/۸۴^{b}

حروف غیر یکسان در هر ردیف نشان از تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

جدول ۳: برخی فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تغذیه شده با ۱ درصد از عصاره‌های گیاهی
Table 3: Some non-specific immunity of rainbow trout fed with 1% of herbal extracts

تیمارها / معیارها	T1 (شاهد بدون عصاره)	T2 کونوکارپوس	T3 پالونیا	T4 کونوکارپوس+پالونیا
لیزوزیم (واحد/میلی‌لیتر/دقیقه)	۳۰/۶۶±۴/۰۴^{bc}	۲۴/۳۳±۴/۵۰^{c}	۳۴/۳۳±۳/۵۱^{b}	۵۳/۶۶±۴/۵۰^{a}
گلوکز (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	۸۰/۰۰±۲/۶۴^{a}	۶۳/۶۶±۲/۵۱^{b}	۶۹/۳۳±۲/۰۸^{b}	۶۸/۰۰±۶/۵۵^{b}
پروتئین (گرم بر دسی‌لیتر)	۴/۱۸±۰/۰۳^{a}	۴/۲۸±۰/۰۶^{a}	۳/۹۵±۰/۳۱^{a}	۴/۲۶±۰/۰۳^{a}
آلبومین (گرم بر دسی‌لیتر)	۱/۸۹±۰/۰۷^{a}	۱/۸۸±۰/۰۶^{a}	۱/۷۹±۰/۱۱^{a}	۱/۹۵±۰/۰۹^{a}
هموگلوبین	۸/۳۲±۰/۲۸^{c}	۱۱/۰۱±۰/۲۸^{b}	۱۲/۹۶±۰/۲۸^{a}	۱۰/۷۵±۰/۲۸^{b}

حروف غیر یکسان در هر ردیف نشان از تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

بحث و نتیجه‌گیری

از هزاران سال قبل محصولات طبیعی از جمله گیاهان با داشتن ترکیبات فعال موثره با اهداف مختلفی مورد استفاده قرار می‌گرفت که می‌توان به خاصیت درمانی، محرک رشد و تحریک اشتها و همچنین بهبود دهنده کیفیت آب اشاره کرد. گزارش‌های جدید مبنی بر این است که گیاه پالونیا با داشتن پلی‌ساکارید می‌تواند ایمنی سلولی و هومورال را در ماکیان افزایش دهد (Wang *et al.*, 2019)، همچنین از این گیاه در تولید کمپوست و تغذیه دام استفاده می‌شود. برگ گیاه کنوکارپوس خوش خوراک بوده و گیاهی جذاب برای خوراک حیوانات است (Bashir *et al.*, 2015). در این مطالعه عملکرد رشد، تغذیه، آنزیم‌های گوارشی، برخی از فاکتورهای سرمی خون و کیفیت آب محیط پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفت. فاکتورهایی همچون وزن نهایی، وزن بدست آمده، درصد رشد روزانه و نرخ رشد ویژه اختلاف آماری معنی‌داری بین تیمار شاهد و تیمارهای استفاده‌کننده از عصاره‌های گیاهی داشتند ($p<۰/۰۵$). اگرچه تاکنون مطالعه‌ای در خصوص بکارگیری عصاره‌های گیاهان پالونیا و کنوکارپوس در جیره غذایی آبزیان (ماهی و میگو) انجام نشده است اما عصاره سایر گیاهان نیز مورد تحقیق قرار گرفته است که در این مبحث به آن اشاره می‌شود. اثرات استفاده از روغن اسانس (EO) استخراج شده از میوه لیمو تلخ (*Citrus limon*) توانست بر عملکرد رشد بچه ماهی *Labeo victorianus* اثر مثبت گذاشته و مقدار ۵ درصد آن باعث بهبود معنی‌دار وضعیت فاکتورهای بیوشیمیایی و هماتولوژی خون شد (Okoth *et al.*, 2016). هر یک از گیاهان دارای طیف گسترده‌ای از ساختار شیمیایی و فعالیت‌های بیولوژیکی هستند که شناخت و پردازش خواص هر یک از آنها نیازمند پژوهش‌های پایه و کاربردی در زمینه‌های مختلف است (Silva & Fernandes Júnior, 2010). در این مطالعه تیمار شاهد بدون استفاده از عصاره در مقایسه با تیمارهای استفاده‌کننده از دو عصاره گیاهی به میزان ۱ درصد از ضریب تبدیل غذایی بالاتری برخودار بود بطوریکه دامنه آن برای ماهی قزل‌آلای رنگین کمان ۱/۰۵-۲/۷۲ بترتیب در تیمارهای ۴ و ۱ بدست آمد. در همین راستا گزارش شده است که افزودن ۱ درصد عصاره

الکلی گیاه یونجه در جیره غذایی بچه ماهی قزل‌آلا به طور معنی‌داری منجر به افزایش رشد و کاهش ضریب تبدیل غذایی می‌شود (نجفی و همکاران، ۱۳۹۷). وجود تانن در برخی گیاهان همچون کونوکارپوس و دانه انار می‌تواند عامل تحریک غذایی باشد که در همین ارتباط گزارش شده که افزودن ۳ درصد آرد هسته دانه انار به جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان باعث افزایش فراسنجه‌های رشد می‌گردد که با افزایش آن به سطح ۴ درصد این روند کاهش یافت. استفاده بیش از حد تانن در جیره غذایی آبزیان می‌تواند اثر معکوس بر رشد داشته باشد (عمادی و همکاران، ۱۳۹۵).

تانن‌های موجود در برگ کونوکارپوس با کاهش اتصال میکروارگانیسم‌ها به ذرات غذایی، مهار رشد میکروارگانیسم‌ها و آنزیم‌های میکروبی می‌توانند باعث هضم مواد مغذی شوند (Goel *et al.*, 2005). آنالیز آنزیم‌های گوارشی نشان داد که بیشترین مقدار آمیلاز و پروتئاز در تیمارهای مصرف‌کننده کونوکارپوس (T2) و پالونیا (T3) بدست آمد که حاکی از اثربخش بودن عصاره برگ این دو گیاه است. برگ‌های پالونیا با ۲۵ درصد پروتئین دارای ارزش غذایی برای دام‌ها می‌باشد که باید توجه داشت که وجود اسیدهای چرب در این گیاه می‌تواند منجر به افزایش کلسترول خون شود (Beare–Rogers *et al.*, 1971) از اینرو، افزایش ترشح آنزیم لیپاز در تیمار ۳ مصرف‌کننده عصاره برگ پالونیا به مقدار ۱۳۲/۳۳±۱۴/۱۸ را به این موضوع ارتباط داد.

برگ گیاه پالونیا دارای ترکیبات فیتوشیمیایی با خواص آنتی‌اکسیدانی است که در تولید داروهای گیاهی نیز استفاده می گردد. بر این اساس در این پژوهش از عصاره برگ گیاه پالونیا و کونوکارپوس به‌عنوان تقویت‌کنندگان ایمنی در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده شد. آزمایشات هماتولوژی سرم خون به‌منظور تشخیص اختلالات متابولیک، ارزیابی وضعیت سلامت ماهیان و واکنش به استرس‌های محیطی مانند وضعیت تغذیه، کیفیت آب محیط پرورش و تغییرات فصلی و دستکاری مورد استفاده قرار می‌گیرد. شرایط پرورش و استفاده از افزودنی‌های غذایی فاکتورهای خونی از جمله گلوکز خون را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Prasad & Charles, 2010). در این مطالعه استفاده از عصاره‌های گیاهی در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با تیمار شاهد منجر به کاهش گلوکز خون گردید که با نتایج بدست آمده از بکارگیری مکمل گیاهی خارمریم (*longterm silymarin*) در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان همسو بود (Banaee *et al.*, 2011). هموگلوبین پروتئینی است که در گلبول‌های قرمز خون نقش حمل نقل اکسیژن و دی اکسیدکربن در خون را دارد. استفاده از عصاره برگ گیاهان کنوکارپوس و پالونیا به میزان ۱ درصد در جیره غذایی سبب افزایش معنی‌دار میزان هموگلوبین خون در مقایسه با تیمار شاهد شد. در این راستا، استفاده از ۲ و ۳ درصد عصاره نعنا فلفلی (*Mentha piperita*) در جیره ماهی قزل‌آلا باعث افزایش هموگلوبین و لیزوزیم سرم خون شد (عادل و همکاران، ۱۳۹۴). همچنین افزودن ۱/۵ گرم بر کیلوگرم از عصاره سرخارگل (*Echinacea purpurea*) در جیره غذایی بچه ماهی قزل‌آلا باعث بهبود وضعیت سلامت و افزایش دوبرابری مقدار لیزوزیم سرم خون گردید (پورغلام و همکاران، ۱۳۹۲). لیزوزیم یکی از مهمترین فاکتورهای سنجش ایمنی غیراختصاصی آبزیان است که افزایش آن گویای بهبود وضعیت ایمنی ماهی در برابر عوامل عفونی و استرسی‌زا می‌باشد (عادل و همکاران، ۱۳۹۴). در این مطالعه بیشترین میزان لیزوزیم در تیمار مخلوط عصاره گیاه کنوکارپوس و پالونیا (T4) بدست آمد که نشان از اثربخش بودن استفاده مخلوط این دو گیاه است. همچنین افزودن ۱ درصد عصاره پالونیا (T3) در جیره غذایی ماهی قزل‌آلا در مقایسه با تیمار شاهد منجر به افزایش مقدار لیزوزیم سرم خون شد که با نتایج افزایش ایمنی بدست آمده از بکارگیری گیاه پالونیا در جیره ماکیان همخوانی داشت. آنان پیشنهاد می‌کنند که از گیاه پالونیا بدلیل داشتن پلی‌ساکارید به عنوان محرک ایمنی جدید در جیره دام و طیور می‌توان استفاده نمود (Wang *et al.*, 2019).

به طور کلی، نتایج نشان داد، اگرچه مقادیر فاکتورهای رشد و تغذیه بین تیمارهای مختلف آزمایشی تفاوت معنی‌دار آماری نداشت، اما بکارگیری ترکیب دو عصاره کنوکارپوس و پالونیا در جیره غذایی (T4) باعث بهبود این

فاکتورها گردید. بکارگیری ۱ درصد عصاره هیدروالکلی برگ گیاه کنوکارپوس و پالونیا در مقایسه با تیمار شاهد می‌تواند بر آنزیم‌های گوارشی و شاخص‌های ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تاثیرگذار باشد.

منابع

پورغلام، ر.، شریف روحانی، م.، صفری، ر.، سعیدی، ع.ا.، بینایی، م.، نجفیان، ر. ۱۳۹۲. اثر عصاره سرخار گل (Echinacea purpurea) بر برخی شاخص های ایمنی و بازماندگی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در برابر با استرپتوکوک. مجله علمی شیلات ایران، ۲۲ (۳): ۱۲-۱.

صفری، ر.، واحدی امیری، ف.، شعبانی، ع.، حسینی فر، س.ح.، کلنگی میانده، ح. ۱۳۹۷. اثرات عصاره هیدروالکلی گیاه آنغوزه (*Ferula assafoetida*) در جیره غذایی بر بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی (TNF-alpha) و (IL1B) در ماهی گورخری (Daniorerio). فیزیولوژی و تکوین جانوری، ۱۱ (۳): ۶۶-۵۵.

عادل، م.، پورغلام، ر.، ذریه زهرا، س.ج.، قیاسی، م. ۱۳۹۴. تاثیر سطوح مختلف عصاره نعناع فلفلی بر برخی شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی و ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۴ (۱): ۴۶-۳۷. DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103049

عمادی، ح.، نگارستان، ح.، حیدری، م.س. ۱۳۹۵. بررسی اثرات آرد هسته دانه انار (*Punica granatum*) بر فراسنجه‌های رشد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۵ (۴): ۱۷۶- ۱۷۱. DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110309

نجفی، ز.، اورجی، ح.، یگانه، س.، کرامت امیرکلایی، ع.ص. ۱۳۹۷. تأثیر عصاره‌ی الکلی یونجه (*Medicago sativa*)بر عملکرد رشد، مصرف غذا، ترکیب بدن و برخی از فراسنجه‌های سرمی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۷ (۵): ۹-۱. DOI: 10.22092/ISFJ. 2018.1022092

American Public Health Association (APHA), 1998. In: Clescert, L., Greenberg, A., Eaton, A. (Eds.), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th edition. Washington, USA.

Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A.R. and Rafei, G.R., 2011. Effects of *longterm silymarin* oral supplementation on the blood biochemical profile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 37: 885-896. DOI: 10.1007/s10695-011-9486-z

Baroon, Z. and Mohamed, A.R., 2012. Nutritional evaluation and trial of ensiled *conocarpus greenery* residue. *Explore Agriculture*, 48 (1): 138–147.

Bashir, M., Uzair, M. and Chaudhry, B.A., 2015. A review of phytochemical and biological studies on conocarpus *erectus combretaceae*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Research*, 1:1.

Beare–Rogers, J. L., Nera, E. A. and Heggtveit, H. A., 1971. Cardiac lipid changes in rats fed oils containing longchain fatty acids. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, 4: 120-124.

Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F. and Wassermann, G.F., 2004. Hematologic and serum biochemical values for jundia (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 30: 21-25.

Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., Quazuguel, P. and Le Gall, M.M. 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture*, 171: 109- 119.

Ellis, A.E., 1990. Lysozyme assays. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Robertson, B.S., Van Muiswinkel, publication. pp. 101-103.W.B. (eds.). Techniques in Fish Immunology. Fair Haven, NJ, USA: SOS.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture. Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, IT.

Goel, G. Puniya, A.K. Aguilar, C.N. and Singh, K., 2005. Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Naturewissensechaften*. 92(11): 497-503.

Haghighati, F., Jafari, S. and BEYT, E.J., 2003. Comparison of antimicrobial effects of ten Herbal extracts with chlorhexidine on three different oral pathogens; an in vitro study. Hakim Research Journal, 71-76.

Iijima, N., Tanaka, S. and Ota, Y., 1998. Purfication and characterization of bile salt activated Lipase from the hepatopancreas of red sea bream (*Pagrus major*). *Journal of Fish Physiology and Biochemistry*, 18: 59-69.

Jimenez, L., Rodrı´guez, A., Ferrer, J.L., Pe´rez, A. and Angulo, V. 2005. La *Paulownia*: una planta de ra´pido crecimiento como materia prima para lafabricacio´n de papel. *Afinidad*, 62 (516): 100-105.

Okoth, E.O., Muchiri, M. and Ngugi, C.C., 2016. Effects of dietary levels of essential oil (EO) extract from bitter lemon (*Citrus limon*) fruit peels on growth, biochemical, haemato-immunological parameters and disease resistance in Juvenile *Labeo victorianus* fingerlings challenged with *Aeromonas hydrophila*. 1-13.DOI:10.1111/ are.13062

Prasad, G. and Charles, S., 2010. Haematology and leucocyte enzyme cytochemistry of a threatened yellow catfish (*Horabagrus brachysoma*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 36: 435-443. DOI: 10.1007/s10695-009-9313-y

Rungruangsak-Torrissen, K., Rustad, A., Sunde, J., Eiane, S.A., Jensen, H.B., Opstvedt, J., Nygard, E., Samuelsen, T.A., Mundheim, H. and Luzzana, U., 2002. In vitro digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 644-654.

Silva, N. and Fernandes Júnior, A., 2010. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 16: 402-13.

Wang, Q., Meng, X., Zhu, L., Xu, Y., Cui, W., He, X. and Zhu, R., 2019. A polysaccharide found in *Paulownia fortunei* flowers can enhance cellular and humoral

immunity in chickens. *International Journal of Biological Mmacromolecules*, pp. 213-219. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.01.168

Worthington, C.C., 1993. Worthington Enzyme Manual. Enzymes and related Biochemicals Worthington Chemical. New Jersey. USA. 730 P.

The effect of some herbal extracts on nutrition and growth performance, digestive enzymes activity and immune parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Khademi Hamidi M.[1*]; Adineh H.[1]; Harsij M.[1]; Gholipour Kanani H.[1]

*mohammadkhademi110@gmail.com

1- Department of Fisheries, Faculty of Agriculture science and natural resources, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran

Abstract

The effects of *Conocarpus erectus*, *Paulownia fortunei* extracts and their mixture (50%+50%) on the growth performance, digestive enzymes activity and non-specific immunity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were studied. Fish were divided into 4 four experimental groups fed diets with 0% (T1), 1% of conocarpus extract (T2), 1% of paulownia extracts (T3) and their mixture (T4) for 30 days. One- hundred and eighty fish (57.00± 4.09 g) were randomly stocked in twelve 70-L Aquarium assigned into three treatments and a control group. The growth performance was significantly increased in all herbal extracts fed fish compared to the control ($P < 0.05$); the highest value was obtained by treatment 4. The food conversion ratio (FCR) was improved in all experimental treatments compared to control. The digestive enzymes levels revealed significant increment in fish fed 1% Paulownia extract (T3) in comparison with the other treatments and control. There were no significant difference in protein and albumin levels of fish blood serum in different experimental treatments and control ($P > 0.05$). While, glucose and hemoglobin levels were significantly increased in fish fed diets containing plant extract. The results of this experiment showed that the use of conocarpus and paulownia extracts can improve the growth, digestive enzymes and non-specific immunity of the *O. mykiss*.

Keywords: Rainbow trout, Plant extracts, Growth, Digestive enzymes activity, Non-specific immunity

*Corresponding author