شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۷۱، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۷

صفحات ۲۵۵-۲۴۶

اثر عصاره اتانولی گیاه شوید (*Anethum graveolens*) به‌عنوان افزودنی غذایی بر پارامترهای رشد و فعالیت لیزوزیم و کمپلمان در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

رضا ذیلاب[۱]، عبدالمحمد عابدیان کناری[۲]، امیر حسین اسماعیلی[۳]*

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه تکثیر وپرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.

۲. استاد گروه تکثیر وپرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.

۳. استادیار گروه تکثیر وپرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۱۱ **تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۹/۱۵**

چکیده

در این تحقیق اثر عصاره اتانولی شوید بر پارامترهای رشد و شاخص‌های لیزوزیم و کمپلمان ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن ۱۲±۰/۳۲ گرم بررسی شد. ماهی‌ها به روش خوراکی با غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۳۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره شوید به‌مدت ۵۶ روز متوالی تغذیه شدند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ماهیان تغذیه شده با سطوح ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم عصاره شوید در شاخص‌های رشد نظیر افزایش وزن دارای تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد بود ولی از لحاظ ضریب تبدیل غذایی و ضریب رشد ویژه و کارایی پروتئین تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نشان نداد. همچنین همه تیمارها از درصد زنده‌مانی بالایی برخوردار بودند و با همدیگر تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. بیشترین میزان فعالیت لیزوزیم و کمپلمان نیز در گروه تغذیه شده با سطح ۱۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره مشاهده شد و نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P>0/05$). براساس نتایج حاضر، غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره شوید موجب افزایش وزن در این فاکتورها شده و برای افزایش ایمنی غلظت ۱۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: ***Anethum graveolens*** **، سیستم ایمنی، رشد، تغذیه.**

* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۱۰۱۴۴۵۵۳۱۰۱+۹۸ ایمیل: aabedian@modares.ac.ir

۱. مقدمه

نقش سیستم ایمنی در حفظ سلامت آبزیان و تضمین بقاء و رشد مناسب آن‌ها در طول دوره پرورش، سبب شده تا محققین به استفاده از انواع ترکیبات شیمیایی و طبیعی محرک و تقویت کننده سیستم ایمنی تمایل نشان دهند (Ahmadi *et al*., 2010). ماهی‌ها همانند سایر مهره‌داران برای مبارزه با عوامل بیماری‌زا عمدتاً به سیستم ایمنی غیراختصاصی ذاتی متکی هستند. بنابراین محرک‌های ایمنی در ماهی‌های پرورشی جهت افزایش فعالیت مکانیسم‌های دفاع غیراختصاصی و ایجاد مقاومت در مقابل بیماری‌ها، مورد استفاده قرار گرفته و به‌عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی بیوتیک‌ها معرفی شده‌اند. افزایش باکتری‌های مقاوم نسبت به آنتی بیوتیک‌ها، و عوارض جانبی این داروها بر بدن ماهی از جدی‌ترین تهدیدهای استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها بوده است (Harikrishnan *et al*., 2003; Ravelo *et al*., 2006; Alishahi *et al*., 2012). در بین محرک‌های ایمنی، عصاره‌های گیاهی به‌علت در دسترس بودن، قیمت پایین، عدم ایجاد مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا و آسیب کمتر به ماهی و محیط زیست مورد توجه قرارگرفته‌اند (Chen *et al*., 2003; Jian and Wu, 2004; Rao *et al*., 2006). این مکمل‌ها علاوه بر افزایش مقاومت ماهی، موجب بهبود شاخص‌های رشد می‌گردند که همه‌ی این عوامل در نهایت منجر به اقتصادی‌تر شدن این صنعت می‌گردد (Rao *et al*., 2006). مطالعات متعددی پیرامون استفاده از محرک‌های گیاهی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان صورت گرفته است که از جمله می‌توان به استفاده از گیاه گزنه، دارواش، آلوئه‌ورا، گون، سرخارگل، پونه کوهی، چای سبز، زنجبیل و مرزه کوهی اشاره داشت (Haghighi and Sharif Rohani, 2013; Pourgholam *et al*., 2013; Sheikhzadeh *et al*., 2011).

گیاه شوید، گیاهی یک‌ساله یا دوساله است و تا ارتفاع ۹۰ الی ۱۲۰ سانتی‌متر رشد می‌کند و از خانواده چتریان (Umbelliferae) و هم‌چنین دارای ۲۷۵ جنس و ۲۸۵۰ گونه است (Kaur *et al*., 2010). این گیاه بومی جنوب غربی آسیا بوده و در اروپا، هند، ایالات متحده کشت می‌شود (Shyu *et al*., 2009). عناصری که در گیاه شوید وجود دارد شامل اسانس، اسیدهای چرب، رطوبت (۳۹/۳٪)، پروتئین (۱۵/۶۸٪)، کربوهیدرات (۳۶٪)، فیبر (۱۴/۸۰٪)، خاکستر (۹/۸٪) و عناصر معدنی شامل کلسیم، پتاسیم، منیزیم، فسفر، سدیم، ویتامین A و نیاسین است. میوه‌های این گیاه حاوی روغن اسانس ۱ تا ۴ درصد و ترکیبات اصلی کاروون (۶۰-۳۰٪)، لیمونن (۳۶٪)، آلفافلاندرن (۲۰/۶۱٪) و هم‌چنین ترکیبات دیگری چون پینن، دیترپن، دی‌هیدروکورون، سینوئل، میرتیسن، پارامیرسن، دیلاپیئول و ایزومیریستیسین می‌باشد (Stavri and Gibbons, 2005). ترکیب فنولیک دیل‌پیول، در عصاره و اسانس شوید منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مقابل BHT و BHA می‌شود (Singh *et al*., 2005). آنتی اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که به‌طور موثر و به طرق مختلف از واکنش رادیکال‌های آزاد به شکل‌های اکسیژن و نیتروژن فعال با بیومولکول هایی نظیر پروتئین، آمینو اسید، لیپید و DNA جلوگیری می‌کند (Sharififar *et al*., 2007).

پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طی سالیان اخیر با شتاب زیادی توسعه یافته است. استخرهای پرورشی جدید ساخته شده‌اند و میزان تولید در واحد سطح افزایش چشمگیری پیدا کرده است. با افزایش تراکم و سطح پرورشی این ماهی، انواع بیماری‌های عفونی با سرعت زیاد در جمعیت ماهیان پرورشی گسترش یافته است. بنابراین تلاش و روش‌های متعددی برای افزایش مقاومت در برابر بیماری در سالیان متمادی صورت گرفته است (Shouda *et al*., 2008). اثرات مثبت این گیاه و فعالیت ضد میکروبی آن علیه باکتری‌های مختلف در جانوران آزمایشگاهی به اثبات رسیده است (Delaquist *et al*., 2002) اما تاکنون هیچ تحقیقی در خصوص تاثیر این گیاه برشاخص‌های رشد و سیستم ایمنی ماهی‌ها وجود ندارد. از این‌رو هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر عصاره اتانولی گیاه شوید بر پارامترهای رشد و فعالیت لیزوزیم و کمپلمان ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان که به‌عنوان یکی از گونه‌های مهم پرورشی می‌باشد.

جدول ۱ - ترکیب مواد اولیه در جیره‌های آزمایشی (بر حسب گرم بر کیلوگرم).

اجزای جیره آزمایشی		تیمارها (میلی‌گرم عصاره در کیلوگرم غذا)			
(گرم در کیلوگرم غذا)	شاهد	۵۰۰	۱۰۰۰	۱۵۰۰	۳۰۰۰
پودر ماهی	۴۵۰	۴۵۰	۴۵۰	۴۵۰	۴۵۰
پودر سویا	۲۱۵	۲۱۵	۲۱۵	۲۱۵	۲۱۵
آرد گندم	۱۴۶/۳	۱۴۶/۳	۱۴۶/۳	۱۴۶/۳	۱۴۶/۳
روغن ماهی	۵۸	۵۸	۵۸	۵۸	۵۸
روغن سویا	۵۸	۵۸	۵۸	۵۸	۵۸
لسیتین	۵	۵	۵	۵	۵
دی‌کلسیم فسفات	۵	۵	۵	۵	۵
مکمل معدنی*	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰
مکمل ویتامینه	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰
ضد قارچ	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵
آنتی اکسیدان	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲
فیلر	۱۰	۹/۵	۹	۸/۵	۷

* اقلام غذایی از کارخانه خوراک دام و آبزیان مازندران (ساری - ایران) تهیه گردید.

* هر کیلوگرم مکمل معدنی حاوی آهن (۶ گرم)، روی (۱۰ گرم)، سلنیم (۲۰ میلی‌گرم)، کبالت (۱۰۰ میلی‌گرم)، مس (۶۰۰ میلی‌گرم)، منگنز (۵ گرم)،ید (۴۰۰ میلی‌گرم)، کولین کلراید (۶۰ گرم) هر ۵ کیلوگرم مکمل ویتامینه ۰/۵ درصد حاوی ویتامین‌های E=۱۵۰ IU، D_3=۲۰۰۰۰۰۰ IU، A= ۸۰۰۰۰۰ IU، B_{12}= ۰/۰۵ /gr، B_6=۸۰ gr، B_5=۲۰۰gr، B_3 =۱۵۰gr، B_2=۴۰gr، B_1=۵۰gr، B_1=۵۰gr، K_3=۵۰gr، Enositol=۵۰۰gr، C=۵۰۰gr،

* در جیره غذایی از آنتی‌اکسیدان بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) استفاده گردید.

۲. مواد و روش‌ها

این بررسی در زمستان سال ۱۳۹۶ در دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. تعداد ۱۸۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۱۲±۰/۳۲ گرم از مزرعه پرورش ماهی آقای رحمتی در مازندران (تنکابی - ایران) خریداری و قبل از شروع آزمایش، ۱۰ روز با شرایط محیط سازگار شدند. پس از انجام مرحله سازگاری، ماهیان به‌طور تصادفی انتخاب و در ۱۵ تانک فایبرگلاس (۱۰۰ لیتری) با حجم آب ۸۰ لیتر به میزان ۱۲ عدد در هر تانک توزیع گردیدند. آزمایش در یک سالن سرپوشیده با دوره‌ی نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی انجام پذیرفت (ساعت تاریکی و روشنایی براساس شرایط آزمایشگاهی و امکانات موجود در نظر گرفته شد). اندازه‌گیری عوامل کیفی آب، همچون دمای آب (با دماسنج جیوه‌ای) به‌صورت روزانه، اکسیژن محلول (توسط اکسیژن متر) و pH (از طریق دستگاه pH متر) به‌صورت هفتگی انجام گرفت. میزان دمای آب، اکسیژن محلول و pH به‌ترتیب ۱۴ تا ۱۸ درجه سانتی‌گراد، ۸ تا ۹ میلی‌گرم در لیتر و ۷/۴ تا ۸/۴ اندازه‌گیری گردید.

۱.۲. تهیه و آماده‌سازی عصاره شوید

قسمت‌های برگ و ساقه گیاه شوید از استان کهگیلویه و بویراحمد، شهرستان دنا، تهیه و کاملاً توسط آب شسته شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت داخل خشک‌کن قرارگرفت تا کاملاً خشک شود، سپس توسط آسیاب صنعتی تبدیل به پودر و در محلی خشک و دور از رطوبت تا زمان مصرف نگهداری شد. برای تهیه عصاره اتانولی، ۲۰۰ گرم از پودر گیاه شوید را در داخل ارلن ریخته و ۱/۵ لیتر اتانول ۷۰ درصد به آن اضافه شد و پس از ۴۸ ساعت عصاره‌ها به وسیله کاغذ صافی، صاف گردیده و حلال (اتانول ۷۰ درصد) با استفاده از دستگاه روتاری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد جداسازی شد (Sajjadi *et al.*, 1998). سپس عصاره حاصل توسط دستگاه فریز درایر به‌صورت پودر درآمد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Arabshahi-Delouee and Urooj, 2007).

۲.۲. آماده‌سازی جیره

ابتدا مواد لازم جهت ساخت جیره از کارخانه خوراک دام و آبزیان مازندران (ساری-ایران) تهیه گردید. پس از آنالیز مواد اولیه، جیره‌های مورد نظر با

جدول ۲ - تجزیه تقریبی جیره پایه (شاهد).

ترکیب بیوشیمیایی جیره	میزان (٪)
پروتئین خام	۵۱/۹۹
چربی خام	۱۵/۵۰
خاکستر	۱۰/۲۱
کربوهیدرات	۱۳/۹۶
رطوبت	۸/۳۴
انرژی کل (Kj/g)	۲۰/۷۰

استفاده از نرم افزار Lindo فرموله و ساخته شدند (جدول ۱). کلیه مراحل ساخت غذا در آزمایشگاه تغذیه دانشکده علوم دریایی تربیت مدرس انجام شد. اجزای جیره غذایی با الک ۰/۵ میلی‌متری غربال شدند. سپس کلیه مواد اولیه براساس فرمول‌های نوشته شده توزین شدند. برای ساخت جیره‌ها مواد خشک و روغن با هم مخلوط شدند سپس به مخلوط آب اضافه و هر جیره غذایی با استفاده از چرخ گوشت پلت شد. پس از این مرحله پلت‌ها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۲ ساعت در خشک کن نگه‌داری گردیدند تا خشک شوند و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شدند (Abedian Kenari *et al.*, 2011). به‌منظور اطمینان از مطابقت جیره‌های ساخته شده با فرمول مورد نظر، جیره‌ها دوباره مورد سنجش شیمیایی قرار گرفتند (جدول ۲).

جیره‌های غذایی به کار رفته در این تحقیق شامل تیمار ۱ (شاهد) که غذای پایه‌ی بدون افزودنی بود، تیمار ۲ با افزودن ۵۰۰ میلی‌گرم عصاره اتانولی گیاه شوید بر کیلوگرم جیره غذایی، تیمار۳ با افزودن ۱۰۰۰ میلی‌گرم عصاره اتانولی گیاه شوید بر کیلوگرم جیره غذایی، تیمار۴ با افزودن ۱۵۰۰ میلی‌گرم عصاره اتانولی گیاه شوید بر کیلوگرم جیره غذایی، و همچنین تیمار ۵ با افزودن ۳۰۰۰ میلی‌گرم عصاره اتانولی گیاه شوید بر کیلوگرم جیره غذایی بود (Oskoii *et al.*, 2012) (جدول ۲). ماهی‌ها با تیمارهای فوق به‌مدت ۵۶ روز تغذیه شدند. غذادهی ماهیان براساس سیری و مشاهده نحوه غذاگیری انجام شد. و همچنین غذادهی ۳ وعده در روز در ساعات ۹، ۱۴و ۱۸ انجام گرفت.

۳.۲. ارزیابی فاکتورهای رشد

به‌منظور ارزیابی تاثیر سطوح مختلف عصاره اتانولی گیاه شوید بر شاخص‌های رشد بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان و مقایسه بین تیمارهای مختلف در ابتدای دوره تمام بچه ماهیان با ترازوی دقیق توزین شده و پس از آن در انتهای دوره نیز کل ماهیان مورد سنجش وزنی و طولی قرارگرفتند (به این منظور۲۴ ساعت قبل از زیست‌سنجی تغذیه ماهیان قطع شده و قبل از زیست‌سنجی ماهیان با پودر گل میخک به میزان ۵ گرم در ۱۰ لیتر آب، بی‌هوش شدند). درصد زنده‌مانی و سایر شاخص‌های رشد شامل افزایش وزن بدن (WG)، نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، کارایی پروتئین (PER)، توسط روش‌های معمول و روابط مربوطه تعیین شدند (Portz *et al.*, 2001; Peixoto *et al.*, 2016; Fuchs *et al.*, 2015).

افزایش وزن بدن (WG) = (وزن انتهایی به گرم - وزن ابتدای به گرم)

ضریب رشد ویژه (SGR) = ۱۰۰ × دوره پروش / ([(وزن ابتدایی ماهی)ln - (وزن انتهایی ماهی)ln]

ضریب تبدیل غذایی (FCR) = وزن تر ماهی به دست آمده به گرم / مقدار غذای خشک داده شده به گرم

کارایی پروتئین (PER) = پروتئین مصرفی به گرم / وزن تر ماهی تولید شده به گرم

درصد زنده‌مانی (SR) = ۱۰۰ × (تعداد اولیه ماهیان / تعداد ماهیان باقی مانده)

۴.۲. تعیین میزان فعالیت لیزوزیم و کمپلمان (ACH50) در سرم خون

در پایان دوره آزمایش، جمع‌آوری خون از تمام ماهی‌ها به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت لیزوزیم و کمپلمان صورت گرفت. برای تهیه سرم خون در انتهای آزمایش از هر تکرار ۳ قطعه ماهی جدا و خون ماهیان پس از بیهوشی با سرنگ ۳ سی سی غیرهپارینه استحصال شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفیوژ، فاز رویی (سرم) جمع‌آوری و در

جدول ۳ - اثرات تیمارهای مختلف بر رشد و شاخص‌های تغذیه‌ایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان.

شاخص رشد	شاهد	۵۰۰ میلی‌گرم	۱۰۰۰ میلی-گرم	۱۵۰۰ میلی-گرم	۳۰۰۰ میلی-گرم
وزن اولیه (گرم)	۱۳/۲۷±۰/۷۸	۱۳/۲۷±۰/۴۱	۱۳/۲۷±۱/۱۱	۱۳/۲۷±۰/۹۱	۱۳/۳۰±۱/۰۹
وزن نهایی (گرم)	۵۸/۴۱±۱/۸۲^{b}	۲۵/۷۷±۴/۶۸^{d}	۶۷/۹۴±۳/۳۳^{a}	۶۶/۳۳±۲/۸۹^{a}	۳۸/۵۵±۱/۷۸^{c}
افزایش وزن بدن	۴۵/۱۳±۲/۳۸^{b}	۱۲/۵۰±۴/۵۸^{d}	۵۴/۶۶±۳/۱۲^{a}	۵۳/۰۵±۲/۲۱^{a}	۲۵/۲۱±۰/۹۱^{c}
ضریب رشد ویژه	۲/۶۴±۰/۱۴^{a}	۱/۱۶±۰/۳۲^{c}	۲/۹۱±۰/۱۳^{a}	۲/۸۷±۰/۰۷^{a}	۱/۸۹±۰/۰۷^{b}
ضریب تبدیل غذایی	۰/۸۰±۰/۰۴^{b}	۱/۸۳±۰/۷۷^{a}	۰/۷۸±۰/۰۴^{b}	۰/۸۰±۰/۰۲^{b}	۱/۱۳±۰/۰۳^{b}
کارائی پروتئین	۱/۷۲±۰/۱۰^{a}	۰/۸۳±۰/۳۲^{c}	۱/۷۸±۰/۱۰^{a}	۱/۷۵±۰/۰۸^{a}	۱/۱۳±۰/۰۵^{b}
زنده مانی (درصد)	۹۴/۴۴±۴/۸۱	۹۷/۲۲±۴/۸۱	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

داده‌ها به صورت ME ± SD بیان شده‌اند. حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها است (P<۰/۰۵).

میکروتیوب ریخته و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت تعیین میزان لیزوزیم سرم با استفاده با استفاده از روش Demers و Bayne (۱۹۹۷) و بر مبنای لیز شدن باکتری گرم مثبت حساس به آنزیم لیزوزیم یعنی (*Micrococcus lysodeikticus*) انجام گرفت. به‌طور خلاصه از آنزیم لیزوزیم سفیده‌ی تخم مرغ با رقت‌های مختلف (۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در بافر فسفات سیترات (۰/۱ مولار و pH = ۵/۸) به‌عنوان استاندارد استفاده گردید. مقدار ۲۵ میکرولیتر از نمونه استاندارد و سرم تیمارهای مختلف، به‌طور جداگانه در هر یک از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف هر کدام با سه تکرار ریخته شد، سپس ۱۷۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری (*M. lysodeikticus*) در همان بافر (۷۵ µg/ml) به هر چاهک اضافه و بلافاصله با نمونه‌های سرم مخلوط گردید و اجازه داده شد تا این واکنش در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد صورت گیرد. جذب نوری نمونه‌ها هر ۳۰ ثانیه یک‌بار تا پنج دقیقه به کمک دستگاه الیزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید.

سنجش فعالیت کمپلمان جهت تعیین فعالیت همولیتیک کمپلمان از روش (Amar *et al*., 2000) براساس همولیز گلبول‌های قرمز خرگوش (RaABC) استفاده گردید. به‌طور خلاصه، گلبول‌های قرمز خرگوش سه مرتبه با بافر اتیلن گلیکول تترا استیک اسید – منیزیوم – ژلاتین ورنال شسته شده و تعداد سلول‌های آن به صورت تقریبی به کمک لام نئوبار روی $۲×۱۰^{۸}$ در هر میلی‌لیتر بافر تنظیم شد. سپس نمونه‌های سرم ابتدا ۱۰۰ مرتبه با بافر فوق رقیق شد، سرانجام به همه لوله‌ها ۱۰۰µگلبول قرمز خرگوش اضافه، و پس از انکوباسیون مخلوط حاصل به‌مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. به هر کدام از لوله‌ها ۳/۱۵ ml محلول ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم اضافه گردید. نمونه‌ها با دور g ×۱۶۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید، سپس میزان جذب نوری محلول رویی در طول موج ۴۱۴ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری گردید. حجمی از سرم که سبب ۵۰ درصد همولیز شود، عبارت است از فعالیت کمپلمان نمونه که از رابطه‌ی زیر برای محاسبه آن استفاده گردید.

ACH۵۰ (u/ml) = K× (فاکتور رقت) × ۰/۵

۵.۲. تجزیه و تحلیل آماری

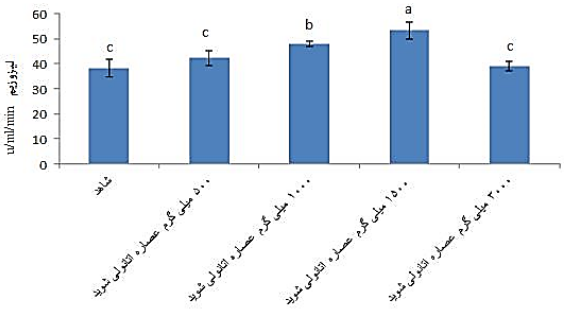
ابتدا نرمال بوده داده‌ها با آزمون کالموگروف - اسمیرنوف و همگنی واریانس‌ها با آزمون لون (Leven) بررسی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یکطرفه (One-Way ANOVA) و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح اعتماد ۵ درصد (P=۰/۰۵) استفاده شد. تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام گرفت.

۳. نتایج

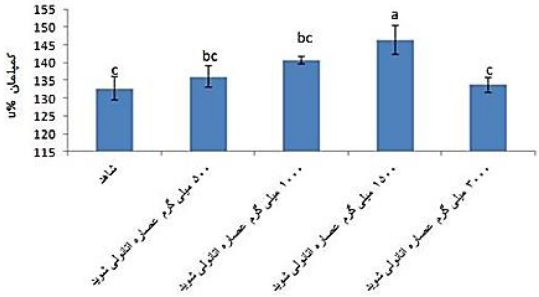
۱.۳. شاخص‌های رشد

نتایج شاخص‌های رشد و زنده‌مانی ماهی قزل آلای رنگین‌کمان تحت تأثیر افزودنی غذایی عصاره اتانولی گیاه شوید در جدول ۳ نشان داده شده است. بیشترین و کمترین وزن نهایی، افزایش وزن به‌ترتیب در تیمارهای ۱۰۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم عصاره اتانولی شوید مشاهده گردید و بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵). بالاترین ضریب

رشد ویژه در تیمار ۱۰۰۰ مشاهده شد ولی با تیمار



شکل ۱ – تغییرات میانگین فعالیت لیزوزیم در بین تیمارهای مختلف.



شکل ۲ – تغییرات میانگین فعالیت کمپلمان در بین تیمارهای مختلف.

شاهد فاقد تفاوت معنی‌دار بود و کمترین میزان آن را در تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم عصاره اتانولی شوید مشاهده گردید و بین تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P<۰/۰۵$). از نظر ضریب تبدیل غذایی بین سطوح ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم عصاره اتانولی شوید و شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ولی با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($P<۰/۰۵$). از لحاظ کارایی پروتئین، بالاترین میزان را در تیمارهای ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره و شاهد رویت شد ولی تفاوت معنی‌داری بین این ۳ تیمار مشاهده نگردید. همچنین هیچ تفاوت معنی‌داری در زنده‌مانی ماهیان بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد و کلیه تیمارها از زنده‌مانی بالایی برخوردار بودند ولی بیشترین تلفات مربوط به تیمار شاهد بود (جدول ۳).

۲.۳. بررسی فعالیت لیزوزیم و کمپلمان

شکل ۱ تغییرات میانگین فعالیت لیزوزیم را در غلظت‌های مختلف عصاره گیاه شوید نشان می‌دهد. میزان فعالیت لیزوزیم سرم در تیمارهای مختلف معنی‌دار می‌باشد ($P<۰/۰۵$)، به‌طوری که بیشترین و کمترین میزان فعالیت لیزوزیم به‌ترتیب مربوط به تیمارهای ۱۵۰۰ میلی‌گرم عصاره اتانولی شوید و شاهد می‌باشد. شکل ۲ نیز نشان دهنده‌ی فعالیت همولیتیک کمپلمان سرم می‌باشد که میزان آن در تیمارهای مختلف نیز معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$)، به‌طوری که بیشترین و کمترین میزان فعالیت همولیتیک کمپلمان سرم به ترتیب مربوط به تیمارهای حاوی ۱۵۰۰ میلی‌گرم عصاره اتانولی شوید و شاهد می‌باشد.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

بهینه‌سازی فاکتورهای تغذیه‌ای و میکروبی می‌تواند باعث سازگاری اکولوژیکی، رشد بهتر و کاهش تلفات سنگین در طی دوره پرورش در آبزیان گردد. از آن جایی که ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌عنوان یکی از باارزش‌ترین ماهیان اقتصادی در صنعت آبزی‌پروری کشور می‌باشد، تلاش در جهت بهبود شاخص‌های رشد و افزایش قدرت ایمنی این ماهی در برابر بیماری‌های متعدد ویروسی و باکتریایی که امروزه به مشکل جدی این صنعت تبدیل شده، افزایش فزاینده‌ای داشته است. اخیراً گرایش بیشتری به استفاده از عصاره‌ها و اسانس های گیاهی به‌عنوان عوامل کنترل کننده‌ی زیستی در آبزیان صورت گرفته است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با عصاره اتانولی گیاه شوید اثرات مثبتی روی پارامترهای رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان داشته و در پایان دوره آزمایش باعث بهبود رشد شده است. در انتهای دوره ماهیان تغذیه شده با سطح ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا بیشترین وزن را داشتند که اختلاف وزن آن‌ها با تیمارهای دیگر معنی‌دار بود. نتایج مشابهی نیز در رابطه با ضریب رشد ویژه به دست آمد. این نتایج بیانگر آن است که سطوح مختلف عصاره شوید روی وزن کسب شده تاثیر گذار بوده که می‌تواند ناشی از بهبود وضعیت فیزیولوژیک ماهی و نیز احتمالاً به‌دلیل بهبود وضعیت ایمنی باشد که زمینه‌ساز کاهش آلودگی‌ها، عفونت‌ها و هدایت انرژی به سمت تولید پروتئین بیشتر بوده است. نتایج مشابه تحریک‌کنندگی رشد به هنگام استفاده از گیاه آلوئه‌ورا (Heidarieh *et al.*, 2012a) و ارگوسان (Heidarieh *et al.*, 2012b) در قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش شد. یکی از عوامل اقتصادی بودن پرورش آبزیان ضریب تبدیل غذا

است، چرا که موجب کاهش هزینه‌های غذا و مقدار غذادهی و به تبع آن موجب کاهش آلودگی آب محیط پرورشی و کاهش عفونت‌های ثانویه خواهد شد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تجویز خوراکی عصاره شوید در سطح ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا باعث کاهش ضریب تبدیل غذایی شد ولی در مقایسه با تیمار شاهد معنی‌دار نبود. شاید بتوان بیان نمود که عصاره اتانولی شوید باعث بهبود قابلیت هضم و جذب مواد غذایی، کاهش ضریب تبدیل غذایی و افزایش ساخت پروتئین می‌شوند که در نهایت موجب افزایش رشد می‌گردد. نتایج مطالعه حاضر با نتایج سایر محققین روی دیگر مواد گیاهی از جمله سیر (Nya and Austin, 2009a)، گیاه زنجبیل (Nya and Austin, 2009b) در رژیم غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، رژیم غذایی حاوی ۱٪ دارچین (Ahmad *et al*., 2011) مطابقت دارد. کارایی پروتئین نیز دارای تفاوت معنی-داری بین تیمارها بود و بهترین کارایی پروتئین نیز در تیمارهای ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد، ولی تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نشان نداد. این نتایج نیز با نتایج دیگر (Nya and Austin, 2009a, b; Ahmad *et al*., 2011) مطابقت دارد. درصد زنده‌مانی یکی از پارامترهای مهم در آبزی‌پروری است و می‌تواند تحت تاثیر رژیم غذایی قرار گیرد. در این تحقیق هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و تیمارهای مختلف مشاهده نشد. کلیه تیمارها آزمایشی از زنده‌مانی بالایی برخوردار بودند که نشان دهنده‌ی شرایط مناسب تغذیه‌ای در تمام گروه‌ها بود.

استفاده ازمحرک‌های ایمنی می‌تواند منجر به افزایش پاسخ سیستم‌ایمنی و بهبود وضعیت سلامت ماهی در برابرمیکروارگانیسم‌های بیماری‌زا گردد (Tort *et al*., 2004; Atamanalp *et al*., 2008). نتایج مطالعه حاضر حاکی از افزایش معنی‌داری فعالیت لیزوزیم سرم به‌عنوان یکی از شاخص‌های مهم وضعیت ایمنی در تیمارهای تغذیه شده با عصاره شوید بود، به‌طوری که بیشترین میزان فعالیت لیزوزیم سرم در تیمار ۱۵۰۰ میلی‌گرم عصاره شوید مشاهده شد و با افزایش میزان این عصاره فعالیت لیزوزیم هم افزایش پیدا کرد ولی در سطح ۳۰۰۰ میلی‌گرم کاهش نشان داد. رادیکال‌های آزاد مشتقات اکسیژن فعال هستند که تولید مداوم آن‌ها طی فعالیت طبیعی سلول مخصوصاً در میتوکندری، میکروزوم‌ها، غشاهای هسته و فاگوسیت‌ها صورت می‌گیرد (Mates, 2000). مقادیر بالا و یا حذف نامناسب ROS منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود که ممکن است عامل اختلالات متابولیکی شدید باشد و در نهایت سلامت ماهی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. با توجه به این‌که گیاه شوید دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است (Singh *et al*., 2005) می‌تواند از این تخریب جلوگیری کند. آنتی اکسیدان‌ها با خنثی کردن اثرات اکسیداسیون و رادیکال‌های آزاد از به خطر انداختن سلامت ماهی جلوگیری می‌کنند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که با افزایش تعداد سلول‌های بیگانه‌خوار، میزان لیزوزیم نیز افزایش می‌یابد (Sahoo *et al*., 2005)، که با نتایج به‌دست آمده از این تحقیق همخوانی دارد. احتمالاً ترکیبات عصاره شوید موجب افزایش تعداد فاگوسیت-های ترشح کننده لیزوزیم شده است (Soltani *et al*., 2010).

نتایج مطالعه نشان داد استفاده از عصاره گیاه شوید نیز منجر به افزایش فعالیت سیستم کمپلمان در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود که شاید دلیل آن حضور کارتنوئیدها و فراوانی ترکیبات فنولی و توکوفرولی موجود در عصاره این گیاه دانست. اثبات شده وجود این ترکیبات منجر به تقویت سیستم ایمنی و مقاوم شدن ماهی در مقابل عوامل عفونی می‌گردد. Harikrishnan و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه خود به بررسی تاثیر عصاره انار بر سیستم ایمنی کفشک ماهی پرداختند. در این تحقیق اثر روش تزریقی با مقادیر ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از این عصاره استفاده شد که موجب تقویت سیستم ایمنی (فعالیت لیزوزیم وکمپلمان) گردید که با نتایج ما هم‌راستا می-باشد.

به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره شوید با غلظت ۱۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیشترین توانایی را برای حفظ رشد و ارتقای ایمنی غیراختصاصی این ماهی دارد. البته مطالعات بیشتری در زمینه نقش هر یک از ترکیبات موجود در عصاره شوید بر افزایش فعالیت سیستم ایمنی نیاز است.

تشکرو قدردانی

بدین‌وسیله از دانشگاه تربیت مدرس به‌منظور

پشتیبانی‌های این تحقیق و کارشناسان محترم مرکز آزمایشگاه دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس آقای کمالی و نورانی به جهت فراهم نمودن کلیه امکانات وتسهیلات برای اجرای پروژه قدردانی می‌گردد.

References

Abedian, Kenari, A., Sotoudeh, E., Rezaei, M.H., 2011. Dietary soybean phosphatidyl choline effects growth performance and lipolytic enzyme activity in Caspian brown trout (*Salmo trutta Caspius*) alevin. *Aquaculture Research* 42(5), 655-663.

Amar, E.C., Kiron, V., Satoh S., Watanabe T., 2000. Effects of dietary B-carotene on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Fisheries Science* 66(6), 1068 - 1075.

Arabshahi-Delouee, S., Urooj, A., 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica L.*) leaves. *Food Chain* 102(4): 1233-1240.

Atamanalp, M., Yanik, T. (2003). Alterations in hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to mancozeb. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27(5): 1213-1217

Arabshahi-delouee, S., Urooj, A., 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica L.*) leaves. *Food Chain* 102(4), 1233-1240.

Ahmadi, K., Vosoghi, A.A., Mirvaghefi, A.R., Attai Mehr, B., Banaei, M., 2010. Effect of dietary extract of *Silybum mariamum* as medicinal herb on some nonspecific factors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Marine Biology Journal of Islamic Azad University*, 2, 19-26. (In Farsi)

Alishahi, M., Soltani, M., Mesbah, M., Zargar, A. 2012. Immunostimulatory and growth stimulation effects of Ergosan, Levamisole and herbal extracts in *Cyprinus carpio*. *Journal of Veterinary Research* 67(2), 135-142.

Choi, S.H., Park, K.H., Yoon, T.J., Kim, J.B., Jang, Y.S., Choe, C.H., 2008. Dietary Korean mistletoe enhances cellular non-specific immune responses and survival of Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Fish and Shellfish Immunology* 24(1), 67-73.

Chen, X., Wu, Z., Yin, J., Li, L., 2003. Effects of four species of herbs on immune function of *Carassius auratus* gibelio. *Journal of Fishery Sciences of China* 10, 36-40.

Chahal, K., Monika, A.K., Bhardwaj, U., Kaur, R. 2017. Chemistry and biological activities of *Anethum graveolens* L. (dill) essential oil: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 6, 295-306.

Delaquis P.J., Stanich K., Girard B., Mazza G., 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 74(1), 101-109.

Demers, N.E., Bayne, C.J., 1997. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Developmental & Comparative Immunology* 21(4), 363-373.

Fuchs, V.I., Schmidt, J., Slater, M.J., Zentek, J., Buck, B.H., Steinhagen, D., 2015. The effect of supplementation with polysaccharides, nucleotides, acidifiers and Bacillus strains in fish meal and soy bean based diets on growth performance in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 437, 243-251.

Harikrishnan, R., Rani, M.N., Balasundaram, C. 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, Cyprinus carpio, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture* 221(1-4), 41-50.

Harikrishnan, R., Heo, J., Balasundaram, C., Kim, M.C., Kim, J.S., Han, Y.J., Heo, M.S., 2010. Effect of *Punica granatum* solvent extracts on immune system and disease resistance in *Paralichthys olivaceus* against lymphocystis disease virus (LDV). *Fish and shellfish Immunology*, 29(4), 668-673.

Haghighi, M., Rohani, M.S., 2013. The effects of powdered ginger (*Zingiber officinale*) on the haematological and immunological parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of medicinal Plant and Herbal Therapy Research* 1(1), 8-12.

Heidarieh, M., Mirvaghefi, A.R., Sepahi, A., Sheikhzadeh, N., AliShahbazfar, A., Akbari, M., 2013a. Effects of dietary Aloe vera on growth performance, skin and gastrointestine morphology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 13(2).

Heidarieh, M., Mirvaghefi, A.R., Akbari, M., Farahmand, H., Sheikhzadeh, N., Shahbazfar, A.A., Behgar, M. 2012b. Effect of dietary Ergosan on growth performance, digestive enzymes, intestinal histology, hematological parameters and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(4), 1169-1174.

Jian, J., Wu, Z., 2004. Influences of traditional Chinese medicine on non-specific immunity of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Fish and Shellfish Immunology* 16(2), 185-191.

Kaur G.J., Arora D.S., 2010. Bioactive potential of *Anethum graveolens*, Foeniculum vulgare and Trachyspermum ammi belonging to the family Umbelliferae-Current status. *Journal of Medicinal Plants Research* 4(2), 087-094**.**

Nya, E.J., Austin, B., 2009a. Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 32(11), 963-970.

Nya, E.J., Austin, B., 2009b. 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.

Oskoii, S.B., Kohyani, A.T., Parseh, A., Salati, A.P., Sadeghi, E., 2012. Effects of dietary administration of *Echinacea purpurea* on growth indices and biochemical and hematological indices in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Fish Physiology and Biochemistry* 38(4), 1029-1034.

Portz, L., Cyrino, J.E.P., Martino, R.C., 2001. Growth and body composition of juvenile largemouth bass *Micropterus salmoides* in response to dietary protein and energy levels. *Aquaculture Nutrition* 7(4), 247-254.

Pourgholam, R., Sharif Rohani, M., Safari, R., Saeeidi, A.A., Binaeei, M., Najafeyan, R., Sepahdari, A. 2013. Effect of Echinacea purpurea extract on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and its resistance to Streptococcusis. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 22(3), 1-12.

Peixoto, M.J., Salas-Leitón, E., Pereira, L.F., Queiroz, A., Magalhães, F., Pereira, R., de Almeida, Ozório, R.O., 2016. Role of dietary seaweed supplementation on growth performance, digestive capacity and immune and stress responsiveness in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture Reports* (3), 189-197.

Ravelo, C., Magariños, B., Herrero, M.C., Costa, L., Toranzo, A.E., Romalde, J.L. 2006. Use of adjuvanted vaccines to lengthen the protection against lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 251(2-4), 153-158.

Rao, Y.V., Das, B.K., Jyotyrmayee, P., Chakrabarti, R., 2006. Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 20(3), 263-273.

Rao, Y.V., Das, B.K., Jyotyrmayee, P., Chakrabarti, R. 2006. Effect of Achyranthes aspera on the immunity and survival of Labeo rohita infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology* 20(3): 263-273.

Shyu, Y.S., Lin, J.T., Chang, Y.T., Chiang, C.J., Yang, D.J. 2009. Evaluation of antioxidant ability of ethanolic extract from dill (*Anethum graveolens L.*) flower. *Food Chemistry* 115(2), 515-521.

Stavri M., Gibbons S., 2005. The antimycobacterial constituents of dill (*Anethum graveolens*), *Phytotherapy Research* 19(11), 938-941.

Singh, G., Maurya, S., De Lampasona, M.P., Catalan, C., 2005. Chemical constituents, antimicrobial investigations, and antioxidative potentials of *Anethum graveolens* L. essential oil and acetone extract: Part 52. *Journal of Food Science* 70(4), 208-215.

Shahverdi, A., Ostad, S., Khodaee, S., Bitarafan, L., Monsef-Esfahani, H., Jamalifar, H., Mohseni, M., 2008. Antimicrobial and cytotoxicity potential of *Peganum harmala* smoke. *Pharmacognosy Magazine* 4(15): 236.

Sheikhzadeh, N., Nofouzi, K., Delazar, A., Oushani, A.K. 2011. Immunomodulatory effects of decaffeinated green tea (*Camellia sinensis*) on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 31(6), 1268-1269.

Sajjadi S.E., Movahedian-Atar A.M., Yektaian, A., 1998. Antihyperlipidemic effect of hydroalcoholic extract and polyphenolic fraction from *Dracocephalum Kotschyi* Boiss. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 73(3), 167-170.

Sharififar, F., Moshafi, M.H., Mansouri, S.H., Khodashenas, M., Khoshnoodi, M., 2007. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control* 18(7), 800-805.

Soltani, M., Sheikhzadeh, N., Ebrahimzadeh-Mousavi, H.A., Zargar, A., 2010. Effects of Zataria multiflora essential oil on innate immune responses of common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Fisheries and Aquatic science* 5(3), 191-199.

Sahoo, P.K., Kumari, J., Mishra, B.K., 2005. Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. *Journal of Applied Ichthyology* 21(2), 151-155.

Shonouda, M., Osman, S., Salama, O., Ayoub, A. 2008. Toxical effect of *Peganum harmala* L. leaves on the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* Boisd and its parasitoids *Microplitis rufiventris* Kok. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11(4), 546-552.

Tort, L., Rotllant, J., Liarte, C., Acerete, L., Hernandez, A., Ceulemans, S., Padros, F. 2004. Effects of temperature decrease on feeding rates, immune indicators and histopathological changes of gilthead sea bream *Sparus aurata* fed with an experimental diet. *Aquaculture* 229(1-4), 55-65.