شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۶۹، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۵

صفحات ۴۵۱-۴۴۳

بررسی اثرات تغذیهای پودر سیاه دانه (*Nigella sativa*) بر فعالیت ضد باکتریایی و شاخص‌های موکوس ماهی کلمه (*Rutilus caspicus*)

حسن صحرایی*[۱]، فاضل ظهیری[۱]، محمدرضا ایمانپور[۲]، احمدرضا پیرعلی زفره ئی[۳]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده شیلات ومحیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۲. استاد گروه شیلات، دانشکده شیلات ومحیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۳. دانشجوی دکتری، دانشکده شیلات ومحیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۲/۲۷

چکیده

در این مطالعه تاثیر سطوح متفاوت سیاه دانه *Nigella sativa* جیره بر فعالیت ضد باکتریایی موکوس، برخی آنزیم‌های موکوس در بچه ماهی کلمه *Rutilus caspicus* مورد بررسی قرار گرفت. ۴۲۰ قطعه بچه ماهی با میانگین وزنی ۰/۱۱±۴/۴۹ گرم در ۴ تیمار شاهد (۰)، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد پودر سیاه دانه به ازاء هر کیلوگرم جیره غذایی با ۳ تکرار به‌مدت ۶۰ روز غذادهی شدند. در پایان دوره آزمایش سطوح پروتئین محلول موکوس، فسفاتاز قلیایی و فعالیت ضد باکتریایی با روش میکرودیلوشن، علیه دو باکتری گرم‌مثبت *Streptococcus faecalis* و *Staphylococcus aureus* و گرم‌منفی *Escherchia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد فعالیت ضد باکتریایی موکوس با افزایش سطوح سیاه دانه افزایش یافته و قطر هاله عدم رشد در ماهیان تغذیه شده با سطح ۲ درصد سیاه دانه در مقایسه با گروه شاهد به‌صورت معنی‌دار افزایش یافت ($P<0/05$) و بیشترین قطر هاله عدم رشد در برابر باکتری *Streptococcus faecalis* مشاهده شد. هم‌چنین سطوح پروتئین محلول موکوس، آنزیم لیزوزیم و آلکالین فسفاتاز ماهیان تغذیه شده تا سطح ۰/۵ سیاه دانه در مقایسه با گروه شاهد به صورت معنی‌داری افزایش یافت ($P<0/05$). حداقل غلظت بازدارندگی رشد در غلظت ۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر و در غلظت‌های بالاتر موکوس، فعالیت ضد باکتریایی نیز بیشتر بود و در غلظت ۲۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر بیشترین فعالیت ضد باکتریایی دیده شد. به‌طور کلی نتایج نشان داد جیره حاوی سیاه دانه دارای اثرات مثبتی بر فعالیت ضد باکتریایی موکوس ماهی کلمه دارد.

واژگان کلیدی: فعالیت ضد باکتریایی، موکوس، ماهی کلمه، سیاه دانه.

* نویسنده مسئول: تلفن: ۹۸۹۳۷۶۶۳۵۱۳۸+ ایمیل: hasansahraei22@gmail.com

۱. مقدمه

ماهی کلمه (*Rutilus caspicus*) متعلق به کپور ماهیان یکی از گونه‌های تجاری با ارزش دریای خزر محسوب می‌گردد. ماهی کلمه در سال‌های اخیر به دلایل مختلف نظیر صید غیرقانونی آلودگی مناطق تخمریزی در دریای خزر و کاهش مهاجرت تولید مثلی، میزان ذخایر ماهی کلمه کاهش یافته است. این ماهی براساس طبقه‌بندی اتحادیه بین المللی حفاظت در سال ۱۹۹۴ از گونه‌های در معرض تهدید محسوب شده است (Kiabi *et al.*, 1999).

ایمنی یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های فیزیولوژیک برای مقابله با عوامل بیماری‌زا و حفظ هموستازی بدن است(Ardó *et al.*, 2008). یکی از بخش‌های مهم سیستم ایمنی ذاتی (غیراختصاصی) در ماهی‌ها ایمنی موکوسی می‌باشد. اجزاء موجود در موکوس شامل لیزوزیم، ایمونوگلوبولین‌ها، پروتئین‌های کمپلمان (عامل مکمل)، لکتین‌ها، آنزیم‌های پروتئولیتیک، پروتئین واکنش‌دهنده C و دیگر پروتئین‌های آنتی باکتریال (Subramanian *et al.*, 2007) می‌باشد، که هر کدام به نحوی در جهت افزایش فعالیت سیستم ایمنی ماهی ایفای نقش می‌کنند. یکی از بهترین روش‌ها برای کنترل بیماری در آبزی‌پروری تقویت مکانیسم دفاعی ماهی برای مواجه با محرک‌های سیستم ایمنی است. امروزه استفاده از محرک‌های ایمنی به‌عنوان یک راهکار جایگزین در جهت تحریک ایمنی و کاهش ریسک بروز بیماری شده توسعه پیدا کرده است(Pohlenz and Gatlin, 2014). در سالیان اخیر استفاده از گیاهان دارویی با توجه به مزیت‌های متعدد، از جمله خطرات زیست محیطی حداقل، عدم مقاومت دارویی، ارزان، پایدار و در دسترس بودن، توجهات زیادی را در سطح جهان به خود جلب نموده است (Chen *et al.*, 2003; Raja *et al.*, 2012). تحقیقات متعددی در خصوص استفاده از مکمل‌های گیاهی به‌عنوان محرک ایمنی در ماهیان مختلف گزارش شده است. به‌عنوان مثال می‌توان به اثر سیر و چای سبز در قزل‌آلای رنگین کمان (Sheikhzadeh *et al.*, 2011; Nya and Austin, 2011)، پوست پسته در قزل‌آلای رنگین کمان (Ebrahimi *et al.*, 2014)، رزماری و داروا‌ش در تیلاپیا (Abutbul *et al.*, 2004; Park and Choi, 2012) آویشن در کپور معمولی (Soltani *et al.*, 2010)، چای سبز در هامور (Harikrishnan *et al.*, 2011)، پوست انار در ماهی کپور (Shafiei *et al.*, 2016)، زیره سیاه و شنبلیله در بچه ماهی کپور (Roohi *et al.*, 2016)، تفالۀ زیتون (Khoshkholgh *et al.*, 2013) عصاره خرما (Hoseinifar *et al.*, 2016)، بررسی اثرات گیاه اوکالیپتوس، صبرزرد، سرخارگل، سیلیمارین در ماهی کپور (Alishahi, 2004; Harikrishnan *et al.*, 2011) اشاره نمود.

گیاه سیاه دانه (*Nigella sativa*) یک گیاه دولپه‌ای از خانواده Ranunculaceae است، که به‌صورت خودرو در نقاط مختلف کشور وجود دارد (Zargari, 2006) اثرات ضد باکتریایی(Morsi, 2000)، ضد ویروسی (Abuharfeil *et al.*, 2001)، آنتی اکسیدان و تحریک ایمنی در حیوانات خون‌گرم (Fararh *et al.*, 2004) به آن نسبت داده شده است. مطالعات حاکی از افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها و تحریک ایمنی آن است (Wu *et al.*, 2005; Swamy and Tan, 2000; Daoud, 2006). سیاه دانه حاوی روغن ثابت (۴۰٪-۳۵٪)، روغن فرار (۱٪-۰/۵)، پروتئین (۲۳٪)، اسیدهای آمینه مختلف، قندها، موسیلاژ، آلکالوئیدها، اسیدهای ارگانیک، تانن‌ها، رزین ها، گلیکوزیدهای سمی، متاربین، ساپونین‌ها(ملانین)، ملانتیژنین، لیپاز، فیتواسترول‌ها، ویتامین‌ها (نظیر ویتامین C، اسیدفولیک، تیامین، نیاسین)، فیبر خالص و انواع مواد معدنی (نظیر آهن، روی، کلسیم، سدیم و پتاسیم) می‌باشد (Amin, 1991; Mozafarian, 1995). هدف از این مطالعه ارزیابی خصوصیات ضد باکتریایی، اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی، لیزوزیم و پرتئین محلول موکوس ماهی کلمه تغذیه شده با سطوح مختلف پودر سیاه دانه بود.

۲. مواد و روش‌ها

این آزمایش از آذر ماه تا بهمن ماه سال ۹۳ در مرکز آبزی‌پروری شهید ناصر فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. بچه ماهیان کلمه با میانگین وزنی ۰/۱۱±۴/۴۹ گرم از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان سیجوال بندرترکمن تهیه

و به مرکز آبزی‌پروری منتقل شدند و به مدت ۲ هفته سازگاری با شرایط جدید صورت گرفت. ماهیان به صورت تصادفی به‌مدت ۲ ماه به تعداد ۳۰ عدد در هر تشت ۲۰ لیتری و در سه تکرار با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ درصد پودر سیاه دانه به ازاء هر کیلوگرم جیره غذایی افزوده شده به جیره و یک تیمار شاهد توزیع شدند.

۱.۲. جمع آوری موکوس

بعد از اتمام دوره غذادهی، موکوس سطح بدن ماهی براساس روش پیشنهاد شده توسط (Subramanian *et al.*, 2007) جمع‌آوری شد. ۲۴ ساعت قبل از جمع‌آوری نمونه موکوس، ماهی‌ها در معرض گرسنگی قرار داده شدند. سپس به‌طور تصادفی از هر تکرار، ۱۰ قطعه ماهی در محلول عصاره گل میخک (۵ میلی‌گرم در لیتر) به‌مدت ۲ دقیقه بیهوش و سپس به کیسه پلاستیکی حاوی ۱۰ میلی-لیتر ۵۰ Nacl میلی مولار، انتقال داده شد. برای جمع-آوری موکوس، کیسه‌های پلاستیکی به مدت ۱ دقیقه به آرامی تکان داده شد. سپس، ماهی‌ها از کیسه‌های پلاستیکی خارج و به مخزن‌های مربوطه منتقل شدند. موکوس را بلافاصله به تیوب‌های ۱۵ میلی‌لیتری استریل منتقل و از دستگاه (,5810R Eppendorf Engelsdorf, Germany)،(۱۵۰۰×g دور برای ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) برای سانتریفیوژ استفاده شد. سپس موکوس سطح میانی که عاری از هرگونه آلودگی بود را برای انجام مطالعات درون میکروتیوپ ۲ میلی‌لیتری و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

۲.۲. بررسی فعالیت ضدباکتریایی موکوس

باکتری‌های مورد استفاده در این آزمایش از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه گردید که شامل باکتری‌های گرم‌مثبت *Streptococcus faecalis*، *Staphylococcus aureus* و گرم‌منفی *Escherchia coli*، *Pseudomonas aeruginosa* بود. پس از رشد باکتری‌ها در محیط کشت مایع، به منظور مشاهده فعالیت ضد باکتریایی موکوس، از روش میکرودیلوشن استفاده شد.

۳.۲. سنجش پروتئین محلول

برای اندازه‌گیری پروئیین محلول از روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) و منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی استفاده گردید. اندازه‌گیری بعد از اضافه کردن معرف رنگی فولین فنول سیوکالتیو به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق شده موکوس استاندارد و قرائت نوری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (mbiac iB ,a LbiL c97) انجام گرفت. با انتقال جذب نوری به منحنی استاندارد، میزان پروتیئن محلول بر حسب میلی‌گرم بر میلی لیتر محاسبه شد.

۴.۲. فعالیت آلکالین فسفات

میزان آلکالین فسفاتاز قلیایی موکوس با استفاده از کیت‌های تولید شده توسط شرکت پارس آزمون و دستگاه اسکتروفتومتر و با طول موج ۴۵۰ نانومتر و اختلاف جذب نوری در مدت ۳ دقیقه محاسبه شد.

۵.۲. فعالیت لیزوزیم

محاسبه فعالیت لیزوزیم بر اساس روش پیشنهاد شده توسط Esteban و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد. در این روش محاسبه لیزوزیم به‌روش کدورت سنجی و به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گردید. برای این کار از باکتری لیوفلیزه *Micrococcus lyzodeikticus* حل شده در بافر فسفات پتاسیم به‌عنوان سوبسترا استفاده شد و جذب این محلول در مقابل شاهد (کووت حاوی بافر فسفات پتاسیم) در طول موج ۴۵۰ نانومتر و به‌مدت ۱۰ دقیقه، اثر کاهشی سلول‌های میکروکوکوس لیزودیکتیکوس ثبت گردید.

۶.۲. تجزیه و تحلیل آماری

نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف-اسمیرنف مورد ارزیابی قرار گرفت. آنالیز آماری داده‌ها با تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA One- way) انجام و داده‌ها توسط آزمون دانکن در سطح ۵ % با یکدیگر مقایسه شدند. کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزارآماری SPSS نسخه ۱۶

جدول ۱- مقایسه اثر غلظت‌های متفاوت سیاه دانه بر فعالیت ضد باکتریایی موکوس اپیدرم ماهی کلمه علیه باکتری استرپتوکوکوس فکالیس (میانگین±انحراف معیار)

غلظت سیاه دانه(gr/kg)	۰	۵	۱۰	۲۰
قطر هاله ضد رشد (mm)	۶/۶۹±۰/۰۲۵^{a}	۶/۹۲±۰/۰۲۵^{b}	۷/۱۱±۰/۰۶۱^{c}	۷/۲۵±۰/۰۳۰^{d}

حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P<$۰/۰۵ .

جدول ۲- مقایسه اثر غلظت‌های متفاوت سیاه دانه بر فعالیت ضد باکتریایی موکوس اپیدرم ماهی کلمه علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (میانگین±انحراف معیار)

غلظت سیاه دانه(gr/kg)	۰	۵	۱۰	۲۰
قطر هاله ضد رشد (mm)	۶/۷۳±۰/۰۱۵^{a}	۶/۹۸±۰/۰۲۶^{b}	۷/۱۴±۰/۰۴۰^{c}	۷/۲۲±۰/۰۳۰^{d}

حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P<$۰/۰۵ .

جدول ۳- مقایسه اثر غلظت‌های متفاوت سیاه دانه بر فعالیت ضد باکتریایی موکوس اپیدرم ماهی کلمه علیه باکتری سودوموناس آئروژینوزا (میانگین±انحراف معیار)

غلظت سیاه دانه (gr/kg)	۰	۵	۱۰	۱۵
قطر هاله ضد رشد (mm)	۶/۷۲±۰/۰۲۰^{a}	۶/۹۹±۰/۰۱۵^{b}	۷/۱۴±۰/۰۴۵^{c}	۷/۳۴±۰/۰۳۲^{d}

حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P<$۰/۰۵ .

جدول ۴- مقایسه اثر غلظت‌های متفاوت سیاه دانه بر فعالیت ضد باکتریایی موکوس اپیدرم ماهی کلمه علیه باکتری اشریشیاکلی (میانگین±انحراف معیار)

غلظت سیاه دانه(gr/kg)	۰	۵	۱۰	۱۵
قطر هاله ضد رشد (mm)	۶/۶۳±۰/۱۴۱a	۶/۸۲±۰/۰۶۰b	۷/۰۵±۰/۰۵۰c	۷/۲۳±۰/۰۲۰d

حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P<$۰/۰۵ .

صورت گرفت.

۳. نتایج

نتایج حاصل از بررسی خواص ضد باکتری استرپتوکوکوس فکالیس در جدول ۱ آمده است. با افزایش میزان سیاه دانه به جیره تا ۲ درصد، قطر هاله ممانعت از رشد باکتری افزایش یافت. نتایج حاصل از آزمون دانکن نشان داد که قطر هاله ممانعت از رشد در غلظت ۲۰ گرم در کیلوگرم (۲ درصد) تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد و دیگر تیمارها داشت ($P<$۰/۰۵).

نتایج حاصل از بررسی خواص ضد باکتریایی استافیلوکوکوس اورئوس در جدول ۲ آمده است. همان گونه که در جدول زیر نشان داده شده است با افزایش میزان سیاه‌دانه به جیره خاصیت ضد باکتریایی موکوس بیشتر شد. نتایج حاصل از آزمون دانکن نشان داد که قطر هاله عدم رشد در غلظت ۲۰ گرم در کیلوگرم (۲ درصد) تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد و دیگر تیمارها داشت ($P<$۰/۰۵).

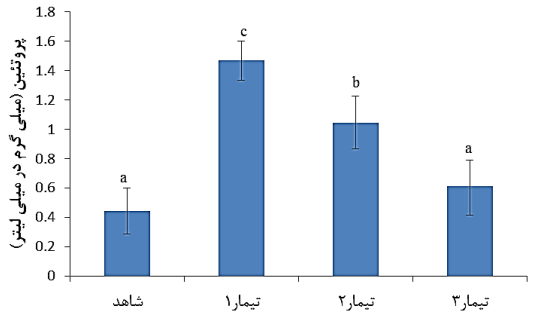
نتایج حاصل از بررسی خواص ضد باکتریایی سودوموناس آئروژینوزا در جدول ۳ آمده است. همان گونه که در جدول زیر نشان داده شده است با افزایش میزان سیاه‌دانه به جیره خاصیت ضد باکتریایی موکوس بیشتر شد. بیشترین خاصیت ضد باکتریایی مربوط به میزان ۲۰ گرم سیاه‌دانه در کیلوگرم (۲ درصد) جیره بود ($P<$۰/۰۵).

نتایج حاصل از بررسی خواص ضد باکتری استرپتوکوکوس فاسیوم در جدول ۴ آمده است. با افزایش میزان سیاه دانه به جیره تا ۲۰ گرم در کیلوگرم (۲ درصد)، قطر هاله ممانعت از رشد باکتری افزایش یافت. نتایج حاصل از آزمون دانکن نشان داد که قطر هاله ممانعت از رشد در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری با یکدیگر و با تیمار شاهد داشت ($P<$۰/۰۵).

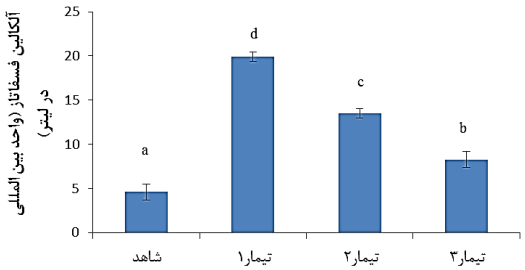
نتایج تعیین کم‌ترین غلظت مهارکننده رشد چهار نوع باکتری موکوس ماهیان تغذیه شده با

جدول ۴- نتایج حداقل غلظت‌های بازدارندگی موکوس ماهیان تغذیه شده از سطوح متفاوت سیاه دانه برای سویه‌های باکتریایی مورد بررسی (بر حسب میکرولیتر در میلی لیتر)

MIC ($\mu l\ ml^{-1}$)	سطح سیاه دانه ($mg\ kg^{-1}$)			
	0	5	10	20
Streptococcus fecalis	50	50	25	12.5
Escherichia coli	100	50	25	12.5
Staphylococcus aureus	100	100	50	12.5
Pseudomunase auroginosa	200	50	50	12.5



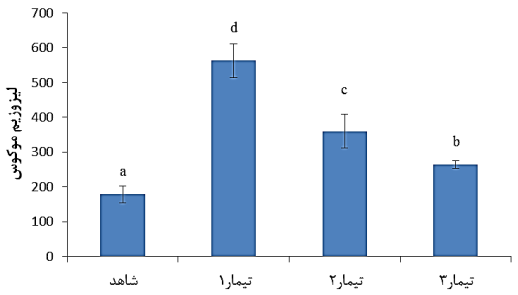
شـــکل ۱ - مقایســـه مقدار پروتئین محلول نمونه‌های موکوس ماهیان تغذیه شده با سطوح متفاوت سیاه دانه.



شکل ۲ - مقایسه مقدار آنزیم فسفاتاز قلیایی نمونه‌های موکوس ماهیان تغذیه شده با سطوح متفاوت سیاه‌دانه.

غلظت‌های مختلف سیاه دانه در جدول ۵ آمده است. همان گونه که نشان داده شده است با رقیق شدن موکوس خاصیت ضد باکتریایی کاهش یافت و نمونه‌های موکوس در برابر باکتری‌های متفاوت فعالیت ضد باکتریایی متفاوتی را از خود نشان دادند. حداقل غلظت بازدارندگی رشد در غلظت ۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر بود و در غلظت‌های بالاتر موکوس، فعالیت ضد باکتریایی نیز بیشتر بود و در غلظت ۲۰۰ میکرولیتر در میلی لیتر بیشترین فعالیت ضدباکتریایی دیده شد .

اندازه‌گیری مقدار پروتئین محلول نمونه‌های موکوس نشان داد که افزودن پودر سیاه دانه به جیره باعث افزایش میزان پروتئین محلول موکوس شده و با افزایش غلظت سیاه دانه تا ۲۰ گرم در کیلوگرم جیره (۲ درصد)، میزان پروتئین محلول کاهش می‌یابد



شکل ۳ - مقایسه مقدار آنزیم لیزوزیم نمونه‌های موکوس ماهیان تغذیه شده با سطوح متفاوت سیاه دانه.

(شکل ۱). هم‌چنین نتایج حاصل از آزمون دانکن نشان داد که تیمار شاهد با تیمارهای ۰/۵ درصد و ۱ درصد اختلاف معنی‌دار دارد ولی بین تیمار شاهد با تیمار ۲ درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد و البته تیمارهای تغذیه شده با سطوح مختلف سیاه‌دانه با هم اختلاف معنی دار دارند ($P<۰/۰۵$).

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز نمونه‌های موکوس نشان داد که سیاه دانه باعث افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز موکوس شده و با افزایش میزان سیاه دانه به جیره تا غلظت ۲۰ گرم در کیلوگرم آنزیم آلکالین فسفاتاز کاهش می‌یابد (شکل ۲). هم-چنین نتایج حاصل از آزمون دانکن نشان داد که تیمار شاهد با تیمارهای تغذیه شده با سطوح مختلف پودر سیاه دانه اختلاف معنی‌دار دارد و تیمارهای ۰/۵، ۱ و ۲ درصد سیاه دانه نیز تک به تک با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند ($P<۰/۰۵$).

اندازه‌گیری مقدار آنزیم لیزوزیم نمونه‌های موکوس نشان داد که با افزودن پودر سیاه‌دانه به جیره، میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم افزایش می‌یابد و با افزایش میزان سیاه دانه تا غلظت ۰/۵ درصد فعالیت آنزیم لیزوزیم افزایش می‌یابد (شکل ۳). هم‌چنین نتایج حاصل از آزمون دانکن نشان داد که بین فعالیت آنزیم لیزوزیم موکوس تیمارهای تغذیه شده با سطوح متفاوت پودر سیاه دانه با یکدیگر و با تیمار شاهد

اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P<۰/۰۵$).

۴. بحث و نتیجه‌گیری

لیزوزیم یک آنزیم ضد باکتریایی است که پپتیدوگلیکان موجود در دیواره باکتری‌ها را می‌شکند و بدین ترتیب به‌طور غیراختصاصی از رشد میکروارگانیسم‌ها جلوگیری می‌کند. لیزوزیم به‌صورت مستقیم روی باکتری‌های گرم‌مثبت به‌وسیله شکاف نقطه‌ای از لایه پپتیدوگلیکان اثر می‌گذارد (Ross *et al.*, 2000). در باکتری‌های گرم منفی لیزوزیم پس از تخریب لایه بیرونی توسط کمپلمان و دیگر آنزیم‌هایی که در معرض لایه‌ی پپتیدوگلیکان قرار می‌گیرند، فعالیت می‌کند (Subramanian *et al.*, 2007). آنزیم لیزوزیم به‌صورت گسترده‌ای در ماکروفاژها، میکروب ها، گیاهان، بی مهرگان و مهره‌داران وجود دارد و نیز در ترشحات بسیاری از حیوانات از جمله موکوس مشاهده می شود. نتایج مطالعه حاضر حاکی از افزایش معنی‌داری فعالیت آنزیم لیزوزیم در موکوس پوست بچه ماهیان کلمه تغذیه شده با جیره حاوی سیاه‌دانه بود. Dehghanian (۲۰۱۴) در مطالعاتی روی بچه ماهی کپور معمولی گزارش کردند که افزودن پودر سیاه‌دانه به جیره غذایی سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم لیزوزیم پوست شد. مطالعه Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۶) حاکی از تاثیر مثبت عصاره خرما بر فعالیت آنزیم لیزوزیم بود که با یافته‌های پژوهش حاضر هم راستا بود. آنزیم فسفاتاز قلیایی یک آنزیم لیزوزیمی بوده که بیشترین دامنه فعالیت آن در پ اچ قلیایی می‌باشد و در طول مراحل اولیه بهبود زخم‌ها و در شرایط استرس‌زا توسط سلول-های اپیدرمی ترشح می‌شود و نقش حفاظتی را در برابر پاتوژن‌ها انجام می‌دهد. آنزیم فسفاتاز قلیایی به‌دلیل فعالیت هیدرولیتیکی، به‌عنوان یک عامل ضد باکتریایی شناخته می‌شود و نیز در بهبود زخم و عفونت های انگلی نقش محافظتی دارد(Ross *et al.*, 2000; Subramanian *et al.*, 2007). در این مطالعه با افزایش مقادیر سیاه دانه فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی افزایش یافت که با مطالعه همسو (Hoseinifar *et al.*, 2016) بود. نتایج حاضر نشان داد که به کارگیری مکمل‌های گیاهی در جیره بچه ماهیان کلمه به‌طور معنی‌داری فعالیت ضد باکتریایی موکوس را افزایش می‌دهد. مطابق با نتایج Salmaniyan Ghehdarijani (۲۰۱۴) افزایش معنی‌داری در فعالیت ضد باکتریایی موکوس ماهی کلمه تغذیه شده با مکمل گیاهی سیر، Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۶) بر روی اثرات عصاره خرما بر کپور و Roohi و همکاران (۲۰۱۶) بر روی اثرات زیره سیاه (*Carum carvi*) و شنبلیله (*Trigonella foenum*) بر بچه ماهیان کپور مشاهده نمود. افزایش پروتئین محلول نشان دهنده بیشتر بودن اجزاء دخیل در سیستم ایمنی با ساختار پروتئینی در ماهی‌هایی است که با مکمل‌های گیاهی تغذیه شدند که همسو با یافته‌های این مطالعه بود.

افزایش مقاومت در برابر بیماری‌های عفونی در ماهیان تیمار شده با مکمل‌های گیاهی داروش (Park and Choi, 2012)، زیره سیاه (Raja Rajeswari *et al.*, 2012) و زنجبیل (Nya and Austin, 2009) نیز گزارش شده است. علاوه بر این Vennila و همکاران (۲۰۱۱)، Narvaez و همکاران (۲۰۱۱) به ترتیب فعالیت ضد باکتریایی موکوس ماهیان گرمسیری و ماهی آزاد را مورد مطالعه قرار دادند. در همه گزارش‌ها بر فعالیت ضد باکتریایی موکوس تاکید شده است که با نتایج تحقیق حاضر همسو می‌باشد. در مطالعه حاضر نیز بیشترین قدرت ضد باکتریایی موکوس بچه ماهیان کلمه بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب هر یک در ماهیان فاقد جیره سیاه دانه مشاهده شد. به نظر می‌رسد استفاده از محصولات دیگر دارویی این گیاه(عصاره‌آبی، اسانس و ...) و نیز میزان مصرف و دوره زمانی استفاده می‌تواند نتایج بهتری داشته باشد. تاکنون وجود برخی ترکیبات مهم ایمنی مانند ایمنوگلوبین‌ها، لیزوزیم، آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئین لکتین‌ها، آنزیم‌های پروتئولیتیک و سایر پپتیدها و پروتئین های ضد میکروبی در موکوس ماهیان گونه‌های مختلف به اثبات رسیده است (Kosuga *et al.*, 2000; Fast *et al.*, 2002; Subramanian *et al.*, 2007; Park and Choi, 2012). ازاین رو افزایش میزان موکوس ترشحی در ماهیان می‌تواند نقش بسیار مهمی در تقویت سیستم ایمنی غیراختصاصی آنها داشته باشد (Eslamloo *et*

al., 2013). به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد جیره حاوی سیاه دانه دارای اثرات مثبتی بر فعالیت ضد باکتریایی موکوس ماهی کلمه دارد.

۵. سپاسگزاری

بدین وسیله از مسئول محترم سالن آبزی پروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و کلیه کسانی که به نحوی در انجام این پژوهش همکاری نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References

Abuharfeil, N.M., Salim, M., Von Kleist, S., 2001. Augmentation of natural killer cell activity *in vivo* against tumour cells by some wild plants from Jordan. *Phytotherapy Research* 15, 109-113.

Abutbul, S., Golan-Goldhirsh, A., Barazani, O., Zilberg, D., 2004. Use of *Rosmaarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis* sp.). *Aquaculture* 238, 97-105.

Amin, A., 1991. Medicinal herbs Steny Iran. Publications of the Ministry of Health, pp.118-119. (In Persian)

Alishahi, M., 2004. The role of immuno stimulant in aquaculture. *Journal of Iranian Veterinary Science* 4, 33-38. (In Persian)

Ardó, L., Yin, G., Xu, P., Váradi, L., Sziget, G., Jeney, Z., Jeney, G., 2008. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-spesific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 275, 26-33.

Ebrahimi, E., Motamedi, J., Goli, H., Shafiei, F., Motaghi, E., Pirali Zefrei, A.H., 2014. Effect of different levels of pistachio hull (*Pistacia vera*) on the growth and some biochemical and hematological properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fisheries Science & Tecnnology Journal*, 3(2), 24-13. (In Persian)

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

Daoud, A.K., 2006. Effects of oral ingestion of *Nigella sativa* seeds (*Black Cumin*) on murine immune system. *Journal of Allergy and clinical Immunology* 115: 886-888.

Dehghanian S.H., 2014. The dietary effects of black Cumin seed (*Nigella sativa*) powder on some mucosal immunity parameters, growth, survival and resistance against salinity stress in Caspian roach (*Cyprinus carpio*). M.Sc. thesis. *Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran*. (In Persian).

Eslamloo, K., Akhavan, S.R., Henry, M.A., 2013. Effects of dietary administration of bacillus probiotics on the non-specific immune responses of tinfoil barb, *Barbonymus schwanenfeldii* (Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinidae). *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 43, 211-218.

Esteban, MA, A Cuesta, J Ortuno and J Meseguer 2009. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (Sparus aurata L.) innate immune system. *Fish & Shellfish Immunology* 99, 202-292.

Fararh, K.M., Atoji, Y., Shimizu, Y., Shiina, T., Nikami, H., Takewaki, T., 2004. Mechanisms of the hypoglycaemic and immunopotentiating effects of *Nigella sativa* L. oil in streptozotocin induced diabetic hamsters. *Research in Veterinary Science* 77, 123-9.

Fast, M.D., Sims, D.E., Burka, G.F., Mustafa, A., Ross, N.W., 2002. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucous and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 132(3), 645-657.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S., 2011a. Influence of diet enriched with green tea on innate humoral and cellular immune response of kelp grouper (*Epinephelus bruneus*) to *Vibrio carchariae* infection. *Fish and Shellfish Immunology* 30, 972-979.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S., 2011b. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture* 317, 1-15.

Hoseinifar, S.H. Khalili M., Mrs. Rufchaei R., Raeisi M., 2016. Investigating the effects of date palm extract on growth performance and mucus immune parameters in Common Carp *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 fingerlings. *Journal of Applied Ichthyological Research* 3(4), 89-100. (In Persian)

Kosuga, Y., Mano, N., Hirose, H., 2000. Bacterial agglutinis in the skin mucus of Japanese eel. *Fish Pathology* 35: 73-77.

Khoshkholgh, M.; Noverian, H; Mosapour Shajani, M; Mohamadi, M., Azizi, S., 2013. The effect of olive oil cake on growth, body composition and sensory evaluation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fisheries* 66(133), 144-134. (In Persian)

Kiabi, B., Abdoli, A. and Naderi, M., 1999. Status of the fish fauna in the south Caspian Basin of Iran. *Journal of Zoology in the Middle East* 18, 57-65. (In Persian)

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.

Morsi, N.M., 2000. Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics resistant bacteria. *Acta*

Microbiologica Polonica 49, 63-74.
Mozafarian, V., 1995. Names of plants. contemporary culture, Tehran, 365 p. (In Persian)
Narvaez, E., Berendsen, J., Guzman, F., Gallardo, G.A., Mercado, L. 2011. An immunological method for quantifying antibacterial activity in *Salmo salar* skin mucus. *Fish and Shellfish Immunology* 28, 235-239.
Nya, E.J., Austin, B., 2011. Development of immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to (*Aeromonas hydrophila)* after the dietary application of garlic. *Fish and Shellfish Immunology* 30, 845-850.
Nya, E.J., Austin, B., 2009. Use of dietary ginger (*Zingeber officinale*) as an immunostimulant to control (*Aeromonas hydrophila)* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fish Diseases* 32, 971-977.
Park, K.H., Choi, S.H., 2012. The effect of mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on innate immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology* 32, 1016-1021.
Pohlenz, C., Gatlin, D.M., 2014. Interrelationships between fish nutrition and health. *Aquaculture* 431, 111-117.
Roohi, Z., Imanpoor, M.R., Hajimoradloo, A., Salmanian Ghahderijani, M., 2016. Effect of herbal supplements of caraway (*Carum carvi*) and fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) on antibacterial activity and soluble protein of mucus in *Cyprinus carpio* fingerlings. *Journal of Aquatic Ecology* 6(1), 128-136. (In Persian)
Raja, Rajeswari, P., Velmurugan, S., Babu, M., Albin Dhas, S., Kesavan, K., Citarasu, T., 2012. A study on the influence of selected Indian herbal active principles on enhancing the immune system in *Fenneropenaeus indicus* aginst *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture International* 20, 1009-1020.
Shafiei, F., Mahbobi, N., Ebrahimi, E., Nematollahi, A., Mohebi, A., 2016. Effect of alcoholic extract of pomegranate peel (*Punica granatum L.*) on blood parameters of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerling. *Fisheries Science & Tecnnology Journal* 5(2), 63-76. (In Persian)
Ross, N.W., Firth, K.J., Wang, A., Burka, J.F., Jojnson, S.C., 2000. Changes in hydrolytic enzyme activities of Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin mucus due to infection with the Salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) and cortisol implantation. *Disease of Aquatic Organisms* 41, 43-51.
Salmaniyan Ghehdarijani, M., 2014. Dietary effects of garlic on mucus parameters, growth and survival in Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*). M.Sc. thesis. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. 56 p. (in Persian).
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. (In Persian)
Sheikhzadeh, N., Nofouzi, K., Delazar, A., Khani Oushani, A. 2011. Immunomodulatory effects of decaffeinated green tea (*Camellia sinensis*) on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology* 31, 1268-1269.
Subramanian, S., MacKinnon, S.L., Ross, N.W., 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology* 148, 256-263.
Swamy, S.M., Tan, B.K., 2000. Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of *Nigella sativa* L. seeds. *Journal of Ethnopharmacology* 70, 1- 7.
Vennila, R., Kummar, K.R., Kanchana, S., Arumugam, M., Vijayalakshmi, S., Balasubramaniam, T., 2011. Preliminary investigation on antimicrobial and proteolytic property of the epidermal mucus secretion of marine stingray. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 1(2), 239-243.
Wu, D., Meydani, M., Leka, L.S., Nightingale, Z., Handelman, G.J., Blumberg, J.B., 2005. Effect of dietary supplementation with black currant seed oil on the immune response of healthy elderly subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* 70:536-43.
Zargari, A., 2006. Medicinal Plants.Tehran University publication. Tehran, Iran. (In Persian)