شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۲، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۸
صفحات ۲۶۹-۲۵۹

اثر ترکیب پلی‌فنل کاتشین موجود در چای سبز بر عملکرد رشد، برخی شاخص‌های خونی و موکوسی ماهی کاراس معمولی (*Carassius carassius*)

مرضیه حیدریه[1]*، نجمه شیخ زاده[2]

۱-گروه دامپزشکی و علوم دامی، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، کرج، ایران
۲-گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ ارسال: ۱۳۹۸/۰۹/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۱۸

چکیده

در مطالعه حاضر تأثیرات کاربرد کاتشین موجود در چای سبز از طریق تغذیه بر عملکرد رشد، متابولیسم و برخی از پارامترهای موکوسی بافت پوست در ماهی کاراس معمولی (*Carassius carassius*) ارزیابی گردید. تعداد ۷۲ ماهی سالم با میانگین وزنی۰/۳۶ ± ۸/۰۳ گرم به طور تصادفی به ۲ تیمار با ۳ تکرار و گروه شاهد (در هر گروه ۱۲ ماهی) تقسیم شدند. ماهیان به مدت ۴۵ روز با ۲ سطح ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خوراک مورد تغذیه قرار گرفتند. پس از بررسی اختلاف معنی‌داری در عملکرد رشدی بین ۲ گروه تیمار و گروه شاهد مشاهده نشد (P> ۰/۰۵). برخی پارامترهای سرمی شامل گلوکز، تری‌گلیسیرید و میزان کلسترول کل در هر تیمار نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشتند (۰/۰۵ >P). پارامترهای ایمنی موکوسی، به طور ویژه لیزوزیم و آلکالین فسفاتاز فعالیت بالاتری را در هر دو تیمار نسبت به گروه شاهد نشان دادند (۰/۰۵ >P). میزان فعالیت آنزیم پروتئاز تنها در دوز ۵۰۰ میلی‌گرم کاتشین در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشت (۰/۰۵ >P). براساس نتایج به دست آمده در این تحقیق می‌توان بیان نمود که کاتشین موجود در چای سبز به ویژه دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خوراک می‌تواند بر بهبود پارامترهای ایمنی موکوسی بافت پوست در ماهی کاراس معمولی تأثیرگذار باشد.

واژگان کلیدی: ماهی کاراس معمولی، کاتشین موجود در چای سبز، عملکرد رشد، ایمین موکوسی، پارامترهای بیوشیمیایی

* نویسنده مسئول: مرضیه حیدریه
Email: mheidarieh@aeoi.org.ir

Journal of Fisheries
Vol. 72, No. 3, Autumn 2019
pp. 259-269

Effects of polyphenolic compound green tea catechin on growth performance, some biochemical and mucosal indices in crucian carp (*Carassius carassius*)

M. Heidarieh[1*], N. Sheikhzadeh[2]

1-Department of Veterinary and Animal Science, Nuclear Agricultural School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran
2-Department of Food Hygiene and Aquatic Animals, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Received: 25-Dec-2019 **Accepted: 08-Jan-2020**

Abstract

The present study was performed to evaluate the effects of diets supplemented with green tea catechin on growth performance, metabolism, and some mucosal immune parameters in crucian carp (*Carassius carassius*). Seventy-two healthy fish with mean weight 8.03 ± 0.36 g were randomly distributed into three treatment groups with three replicates in each group and 12 fish in each aquarium. Fish in treatment groups were administrated with 100 and 500 $mgkg^{-1}$ catechin for 45 days. Results showed that growth performance did not change in treatment groups compared to the control group ($P>0.05$). Serum biochemical parameters including glucose, triglyceride, and total cholesterol levels in both treatment groups decreased with respect to the control group ($P<0.05$). Mucosal immune parameters, namely lysozyme and alkaline phosphatase showed higher activity in both treatment groups compared to the control group ($P<0.05$). In contrast, protease activity increased in higher dose group in comparison with the control group ($P<0.05$). The results indicated that green tea catechin, especially at 500 mg kg^{-1}, could exert beneficial effects on some biochemical parameters and skin mucosal immunity in crucian carp.

Keywords: crucian carp; green tea catechin; growth; mucosal immunity; biochemical parameters

Corresponding author: Marzieh Heidarieh Email: mheidarieh@aeoi.org.ir

۱. مقدمه

امروزه با توجه به افزایش روزافزون جمعیت جهان، تقاضا برای محصولات آبزی بیشتر شده است. یکی از مهمترین راه‌های تأمین این محصولات، آبزی‌پروری و پرورش متراکم آبزیان است. پرورش متراکم آبزیان منجر به افزایش احتمال ابتلای آنها به بیماری‌های مختلف می‌شود (Ebrahimi and Beiraghdar, 2002). یکی از روش‌های مؤثر در پیشگیری و شاهد بیماری‌ها و آلودگی‌ها استفاده از انواع محرک‌های ایمنی است.

اخیراً در آبزی‌پروری استفاده از گیاهان دارویی به عنوان محرک‌های ایمنی به منظور تقویت سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهیان پرورشی رایج شده است (Rao *et al.*, 2006). از این میان توجه خاصی به گیاهان دارویی مختلف حاوی ترکیبات فنولی و آلکالوئیدی شده است (Rizvi *et al.*, 2005). چای سبز جزء شاخه *Angiosperm*، رده *Dialypetalae*، راسته *Parital*، خانواده *Teacae* و جنس *Camellia* است و با نام علمی *Camellia sinensis* شناخته می‌شود. چای سبز به عنوان یک گیاه دارویی حاوی کاتشین‌ها، فلاونول‌ها، فلاونون‌ها و اسیدهای فنولی رنگدانه‌های گیاهی مورد توجه قرارگرفته است که می‌توان به مهمترین خواص ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد باکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و ضد ویروسی آن نیز اشاره کرد (Weber *et al.*, 2003). برگ سبز چای همه آنزیم‌ها و واسطه‌های متابولیکی که معمولاً از طریق رشد و فتوسنتز در گیاه تجمع می‌یابند را در بر دارد. برجسته‌ترین این مواد پلی‌فنول‌ها و ترکیبات کاتشین، از گروه فلاونوئیدها، به همراه مشتقات آن، اپی‌کاتشین، اپی‌کاتشین گالات، اپی‌گالوکاتشین و اپی‌گالوکاتشین گالات هستند (Riemersma et al., 2001; Vinson and Teufel, 2004; Koo and Cho, 2004). اثرات مثبت ترکیبات مختلف استخراج شده از چای سبز بر عملکرد رشد، پاسخ‌های سیستم ایمنی، مقاومت در برابر عوامل استرس‌زا و محافظت در برابر عوامل بیماری‌زا و همچنین فاکتورهای بیوشیمیایی خون انواع ماهی بررسی شده‌اند (Abdel-Tawwab *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2007; Ebrahimi *et al.*, 2015; Harikrishnan *et al.*, 2011; Hwang *et al.*, 2013; Nootash *et al.*, 2013; Sheikhzadeh *et al.*, 2011; Thawonsuwan *et al.*, 2010). اما تا به حال گزارشی مبنی بر بررسی اثرات کاتشین استخراج شده از چای سبز بر عملکرد رشدی، فاکتورهای بیوشیمیایی در سرم و ایمنی در موکوس بافت پوست ماهی کاراس معمولی (*Carassius carassius*) مشاهده نشده است.

ماهی کاراس معمولی جزء خانواده کپور ماهیان و یکی از شش گونه اصلی پرورشی ماهیان آب شیرین در سیستم توأم ماهیان گرمابی در برخی از کشورها مانند چین است. مقاومت و سازگاری بالای ماهی کاراس معمولی در شرایط استرس‌زا، پر زاد و ولد بودن و داشتن گوشت لذیذ و مغذی علیرغم دارا بودن استخوان‌های فراوان از مزایای این ماهی است (Chiu *et al.*, 2013) که مورد توجه برخی از پرورش‌دهندگان در کشور به خصوص در شهرهای جنوبی مانند خوزستان (به علت تحمل درجه حرارت بالای توسط ماهی کاراس معمولی) قرار گرفته است.

با توجه به پتانسیل پرورش ماهی کاراس در ایران و از طرف دیگر اهمیت ترکیبات مختلف پلی‌فنولی مانند کاتشین استخراج شده از چای سبز در پرورش ماهی تحقیق حاضر با هدف بهبود عملکرد رشد، برخی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم و پاسخ‌های ایمونولوژیک موکوس بافت پوست ماهی کاراس معمولی با استفاده از کاتشین استخراج شده از چای سبز به صورت خوراکی انجام گردید.

۲. مواد و روش کار

۱.۲. طراحی آزمایش

این مطالعه در پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، کرج انجام شد. در این مطالعه ۱۰۸ قطعه ماهی سالم کاراس معمولی با میانگین وزنی ۰/۳۶ ± ۸/۰۳ گرم از مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان زینتی در گرگان خریداری شد. ماهی‌ها پس از

۱۵ روز سازگاری اولیه به طور کاملاً تصادفی در ۹ آکواریوم شیشه‌ای (هر آکواریوم شامل ۱۲ قطعه ماهی) با ابعاد ۹۰×۳۵×۴۰ سانتی‌متر و حجم ۱۰۸ لیتر ذخیره‌سازی شدند. به طور میانگین در کل دوره درجه حرارت آب ۲۸-۲۶ درجه سانتی‌گراد، سختی آب ppm ۳۶۰-۳۲۰ ، pH برابر ۸/۸-۸/۳ و اکسیژن ppm ۶/۹-۷/۵ بود. در طی دوره آزمایش فتوپریود به صورت ۱۲ ساعت روشنایی : ۱۲ ساعت تاریکی بود. تیمارهای مورد استفاده در تحقیق حاضر شامل : تیمار شاهد که تنها با غذای تجاری (شرکت بیومار فرانسه با میزان رطوبت ۱۱٪، پروتئین خام ۳۶٪، چربی کل ۱۴٪، خاکستر ۱۰٪، فیبر ۴٪) و ۲ تیمار با سطوح ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم به ازاء کیلوگرم خوراک ماهی از کاتشین استخراج شده از برگ چای سبز با شماره محصول C0567 (شرکت سیگما، آمریکا) مورد تغذیه قرار گرفتند که با ۳ تکرار برای هر تیمار اثر کاتشین در طی یک دوره ۴۵ روزه بررسی شد (Ahmadifar *et al.*, 2019).

۲.۲. زیست‌سنجی و بررسی پارامترهای رشد

به منظور اندازه‌گیری شاخص‌های رشد در ابتدا و انتهای آزمایش وزن تمام ماهیان (با دقت ۰/۰۱ گرم) و طول (با دقت ۱میلی‌لیتر) ثبت گردید. بدین منظور همه ماهی‌های موجود در هر آکواریوم به صورت مجزا با استفاده از عصاره گل میخک (۵۰ میکرولیتر در لیتر) بی‌هوش شدند (Keene and Noakes, 1998). با استفاده از داده‌های حاصل از زیست‌سنجی، برخی شاخص‌های رشد مانند وزن نهایی، طول نهایی، نرخ رشد ویژه و ضریب چاقی ماهی ها تعیین شد (Turchini *et al.*, 2003).

$$\text{نرخ رشد ویژه} = \frac{\text{لگاریتم طبیعی وزن نهایی} - \text{لگاریتم طبیعی وزن اولیه}}{\text{طول دوره پرورش}} \times ۱۰۰$$

$$\text{ضریب چاقی} = \frac{\text{میانگین وزن نهایی}}{\text{میانگین طول نهایی}} \times ۱۰۰$$

۳.۲. بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون

در پایان دوره آزمایش، از هر آکواریوم ۳ قطعه ماهی به صورت تصادفی انتخاب شد و با استفاده از عصاره گل میخک (۵۰ میکرولیتر در لیتر) بی‌هوش گردیدند. به منظور جلوگیری از ورود آب و موکوس به نمونه خون، ماهیان خشک شدند. خون‌گیری با سرنگ از ساقه دمی ماهی‌ها انجام و خون گرفته شده وارد میکروتیوپ‌های فاقد هپارین (به منظور جداسازی سرم) شدند. میکروتیوپ‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق و به مدت ۱ شب نیز در دمای یخچالی نگه‌داری شدند و سپس به مدت ۵ دقیقه و با دور ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شدند. نمونه‌های سرم‌ها در میکروتیوب‌های جداگانه تا قبل از انجام آزمون‌های بیوشیمیایی در دمای ۸۰ - درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

سطح تری‌گلیسیرید، گلوکز ، کلسترول و مقدار پروتئین سرم ماهی با استفاده از محلول‌ها و استانداردهای مربوطه و توسط کیت‌های تجاری و تشخیصی شرکت زیست شیمی (تهران، ایران) و دستگاه طیف‌سنج نوری درطول موج ۴۰۵ نانومتر و اختلاف جذب نوری در مدت ۳ دقیقه مورد سنجش قرار گرفتند.

۴.۲. بررسی فاکتورهای ایمنی موجود در موکوس بافت پوست ماهی‌ها

به منظور سنجش برخی از پارامترهای ایمنی موکوسی بافت پوست از جمله پروتئین کل، فسفاتاز قلیایی، پروتئاز و لیزوزیم، موکس براساس روش ارائه شده توسط Sheikhzadeh و همکاران (۲۰۱۲b) جمع آوری شد. بعد از اتمام دوره غذادهی، به طور کاملاً تصادفی از هر تکرار شش قطعه ماهی نمونه برداری شده و سپس نمونه های گرفته شده در عصاره گل میخک (۵۰ میکرولیتر در لیتر) بی‌هوش گردید و سپس موکوس جلدی ماهی‌ها به آرامی با استفاده از کاردک پلاستیکی نرم جمع‌آوری شد. نمونه‌های موکوس هر ۶ ماهی در هرتیمار به عنوان یک نمونه در نظر گرفته شد. در حین

نمونه‌گیری برای جلوگیری از آلوده شدن نمونه‌ها با خون یا ترشحات سلول‌های اپی‌تلیال، دقت شد تا به پوست آسیبی نرسد. نمونه‌های موکوس جمع‌آوری شده با ۴ برابر حجم از بافر تریس (pH برابر ۵، ۸ میلی‌مولار تریس اسید کلریدریک، ۱۵۰ میلی‌مولار سدیم کلرید) هموژن شده، با دور ۴۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شده و مایع رویی بعد از جداسازی لیوفیلیزه گردید. پودر لیوفیلیزه در بافر تریس حل شده و موکوس حل نشده با سانتریفوژ جدا شد. در ادامه، مایع رویی با استفاده از جریان ملایم گاز ازت تغلیظ شده و پس از عبور از فیلتر میلی‌پور به عنوان عصاره موکوسی تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریز گردید.

محاسبه فعالیت لیزوزیم عصاره موکوس براساس روش پیشنهاد شده توسط Sheikhzadeh و همکاران (۲۰۱۲a) انجام شد. در این روش لیزوزیم به روش کدورت‌سنجی و با دستگاه طیف‌سنج نوری انجام گردید. بدین منظور، پس از تهیه نمودن ۰/۷۵ میلی گرم باکتری میکروکوکوس لیزودیکتیکوس (سیگما) در میلی لیتر بافر سیترات فسفات ۰/۱ مولار با pH برابر ۸/۵ ، ۲۵ میکرولیتر عصاره موکوس با ۱۷۵ میکرولیتر بافر سیترات فسفات در میکروپلیت‌های الیزا مخلوط گردید. جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر به مدت ۱۰دقیقه به طور پیوسته اندازه‌گیری شد. مقداری از موکوس که سبب ۰/۰۰۱ کاهش میزان جذب در مدت زمان یک دقیقه گردید به عنوان یک واحد در میلی‌گرم لیزوزیم در نظر گرفته شد.

بررسی فسفاتاز قلیایی موکوس پوست ماهی با روش ارائه شده توسط Palashka و همکاران (۲۰۰۸) انجام شد. نمونه‌های موکوس با میزان هم حجم از پارا نیترو فنل فسفات به میزان ۴ میلی‌مولار، تهیه شده در آمونیوم بی‌کربنات به میزان ۱۰۰ میلی‌مولار و حاوی ۱ میلی‌مولار کلرید منیزیوم با pH برابر ۷/۸ در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. تغییرات در میزان جذب نوری در ۴۰۵ نانومتر به مدت ۲ ساعت به صورت پیوسته اندازه‌گیری شد. مقداری از آنزیم که سبب آزاد نمودن میلی‌مول از ترکیب پارانیتروفنل در مدت زمان یک دقیقه گردید، به عنوان ۱ واحد فعالیت آلکالین فسفاتاز منظورگردید. برای پارا نیترو فنل ضریب جذب[1] برابر ۱/۷۸× ۱۰۴ مول در سانتی‌متر در نظر گرفته شد.

فعالیت آنزیمی پروتئاز در موکوس بافت پوست ماهی براساس هیدرولیز آزوکازئین به عنوان سوبسترا اندازه‌گیری شد. در این روش حجم برابری از نمونه موکوس به همراه بافر آمونیوم بی‌کربنات ۱۰۰ میلی‌مولار که این بافر شامل ۷٪ (وزنی/ حجمی) کازئین در آب با pH برابر ۸/۷ بود به مدت ۱۹ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. واکنش آنزیمی با اضافه کردن ۰/۶ میلی‌لیتر از ۴/۶٪ (وزنی/حجمی) تری‌کلراستیک اسید متوقف شد .سپس در دمای ۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. برای سنجش آنزیم قسمت رویی جداسازی شد و به همراه ۰/۵ مولار سود میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد (Palaksha *et al.*, 2008).

۵.۲. تجزیه و تحلیل داده ها

برای آنالیز آماری نتایج تحقیق از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده گردید. در ابتدا داده‌ها با آزمون Kolmogorov-Smirnov نرمال و همگرایی واریانس داده‌ها نیز با آزمون Levene انجام گردید. سپس برای مقایسه میانگین‌ها در بین تیمارها و نیز معنی‌دار بودن تفاوت بین میانگین‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و آزمون تکمیلی دانکن در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ استفاده شد. تمام نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش گردید.

۳. نتایج

برخی از شاخص‌های رشد در جدول ۱ نشان داده شده است. در این مطالعه، شاخص‌های رشدی مورد بررسی در هر دو تیمار نسبت به گروه شاهداختلاف معنی‌داری نداشتند (P> ۰/۰۵). نتایج به دست آمده از

[1] Extinction coefficient

میزان گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسرید در سرم خون ماهی کاراس معمولی تغذیه شده با جیره‌های حاوی دو سطح ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم کاتشین به ازای یک کیلوگرم خوراک ماهی نشان دهنده کاهش معنی‌دار نسبت به گروه شاهد بود (P< ۰/۰۵). اما در میزان پروتئین سرم در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول شماره ۲). همچنین در موکوس بافت پوست ماهی کاراس معمولی تغذیه شده با جیره‌های حاوی کاتشین، فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و لیزوزیم در دو سطح ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم کاتشین افزایش معنی‌داری در مقایسه با جیرهٔ شاهد نشان دادند (P< ۰/۰۵) (جدول شماره ۳). آنزیم پروتئاز در سطح ۵۰۰ میلی‌گرم کاتشین در موکوس بافت پوست در ماهی‌های تغذیه شده با کاتشین افزایش معنی‌داری نسبت به ماهیان در گروه شاهد داشت (P< ۰/۰۵) (جدول شماره ۳). همچنین از نظر آماری، تفاوت ما بین میزان پروتئین موکوس در هر دو تیمار نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود (P> ۰/۰۵) (جدول شماره ۳).

جدول ۱- مقایسه میانگین شاخص‌های رشد ماهی‌های کاراس معمولی تحت تغذیه با ۲ سطح کاتشین موجود در چای سبز

گروه‌های آزمایش	فاکتورهای رشد			
	وزن نهایی (گرم)	طول نهایی (سانتی متر)	نرخ رشد ویژه	ضریب چاقی
شاهد	۱۵/۴۸ ± ۱/۴۸	۶/۶۹ ± ۰/۳۶	۰/۳۲۵ ± ۰/۰۲۰	۵/۱۷ ± ۰/۳۸
۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم جیره	۱۵/۳۵ ± ۱/۷۱	۶/۴۳ ±۰/۲۰	۰/۳۱۴ ± ۰/۸۲	۵/۷۹±۰/۲۹
۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم جیره	۱۵/۳۸ ± ۱/۰۹	۶/۵۱±۱/۰۹	۰/۳۱۷± ۰/۰۶	۵/۵۹± ۰/۴۵

مقادیر به صورت (میانگین± انحراف معیار) ارائه شده است.

جدول ۲- مقایسه میانگین برخی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم ماهی کاراس معمولی تحت تغذیه با ۲ سطح کاتشین موجود در چای سبز

گروه‌های آزمایش	فاکتورهای بیوشیمیایی سرم			
	پروتئین (گرم/ دسی‌لیتر)	گلوکز (میلی‌گرم/ دسی‌لیتر)	کلسترول (میلی‌گرم/ دسی‌لیتر)	تری‌گلیسرید (میلی‌گرم/ دسی‌لیتر)
شاهد	۳/۵۰± ۰/۳۳	[a]۱۰۳/۸۹± ۶/۶۰	[a]۱۱۲/۰۶±۴/۷۰	[a]۳۷۳/۷۲±۱۸/۵۹
۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم جیره	۳/۴۰±۰/۹۳	[b]۶۲/۱۳±۳/۳۴	[b]۵۶/۸۳±۴/۴۵	[b]۲۱۸/۶۲±۱۹/۴۷
۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم جیره	۳/۶۷±۱/۰۱	[b]۵۲/۲۴±۲/۷۷	[b]۵۷/۵۵ ±۱/۸۲	[b]۱۸۳/۶۴±۱۰/۵۳

مقادیر به صورت (میانگین± انحراف معیار) ارائه شده است.

*اعداد با حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد (P< ۰/۰۵).

جدول ۳- مقایسه میانگین فعالیت برخی آنزیم‌ها و فاکتورهای ایمنی موکوسی بافت پوست ماهی کاراس معمولی تحت تغذیه با ۲ سطح کاتشین موجود در چای سبز

گروه‌های آزمایش	فعالیت آنزیمی و فاکتورهای بیوشیمیایی موکوس بافت پوست			
	پروتئین (گرم/ دسی‌لیتر)	لیزوزیم (واحد/ میلی‌گرم)	فسفاتاز قلیایی (واحد/ میلی‌گرم)	پروتئاز (واحد/ میلی‌گرم)
شاهد	۲/۰۱± ۰/۵۹	[c]۲۸/۰۳± ۱/۴۰	[b]۲/۲۱±۰/۶۰	[b]۵/۰۸± ۱/۱۵
۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم جیره	۱/۶۸± ۰/۱۱	[b]۶۳/۹۷±۳/۹۹	[a]۶/۱۷±۰/۶۳	[b]۴/۳۲±۱/۰۸
۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم جیره	۱/۵۵± ۰/۵۳	[a]۱۰۳/۳۵±۲/۷۲	[a]۷/۴۴±۰/۷۹	[a]۱۰/۶۳±۰/۸۹

مقادیر به صورت (میانگین ± انحراف معیار) ارائه شده است.

*اعداد با حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد (P< ۰/۰۵).

۴. بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از مکمل‌های غذایی علاوه بر افزایش رشد و تحریک سیستم ایمنی به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها نیز مطرح شده‌اند (Ringø *et al.*, 2010). محرک‌های ایمنی با منشاء گیاهی به دلیل عوارض جانبی کمتر بر موجود زنده و محیط زیست، عدم ایجاد مقاومت دارویی، ارزان بودن، پایدار و در دسترس بودن بسیار مورد توجه بوده‌اند (Raa, 1996). در این مطالعه اثر کاتشین استخراج شده از چای سبز را بر برخی شاخص‌های رشد، خونی و موکوسی در ماهی کاراس معمولی بررسی شد. به طور کلی، برگ‌های سبز چای حاوی ۳۶ درصد پلی‌فنول می‌باشند که در این میان کاتشین‌ها بیشترین سهم را دارا هستند (Uzunalic *et al.*, 2005). همانطورکه در بخش نتایج نشان داده شده است تغییرات شاخص‌های رشدی در هر دو تیمار ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم کاتشین بر کیلوگرم خوراک ماهی کاراس معمولی در این تحقیق اختلاف معنی‌داری را در مقادیر وزن نهایی، طول نهایی، نرخ رشد ویژه و ضریب چاقی نداشتند. در راستای نتایج مطالعه حاضر، استفاده از ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره چای سبز در هر کیلوگرم خوراک بر شاخص‌های رشدی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بی‌اثر بود (Nootash *et al.*, 2013). با این حال، افزایش و کاهش سطح فاکتورهای رشد در ماهی‌های مختلف پس از مصرف چای سبز در بعضی مطالعات گزارش شده است که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی ندارند. استفاده از غلظت ۰/۲۵ و ۲ گرم عصاره چای سبز در هر کیلوگرم خوراک ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochronis niloticus*) منجر به بهبود عملکرد رشد گردید (Abdel-Twwab *et al.*, 2010). اما در سنگ ماهی (*Sebastesschlegel*) و کفشک ماهی زیتونی (*Paralichthys olivaceus*) پس از تغذیه با عصاره چای سبز کاهش رشد گزارش شد (Hwang *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2007). علت این موضوع را می‌توان به گونه و سن ماهی، غلظت و نوع عصاره چای سبز، نحوه به کارگیری و طول دوره تغذیه نسبت داد (Hwang *et al.*, 2013).

نتایج در مطالعه حاضر نشان دادند که ماهیان تغذیه شده در دو سطح ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم کاتشین در هر کیلوگرم خوراک کاهش معنی داری در میزان گلوکز، تری‌گلیسرید و کلسترول را نشان دادند. گلوکز از فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون است که می‌تواند به عنوان یکی از شاخص‌های مهم در تعیین وضعیت فیزیولوژیک ماهی به کاررود (Lucas, 1996). Mehdizade و همکاران (۲۰۱۰) کاهش معنی‌دار گلوکز را در موش‌های دیابتی پس از مصرف عصاره چای سبز گزارش نمودند. Haidari و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که مصرف عصاره چای سبز به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم خوراک نیز باعث کاهش معنی‌داری در سطح گلوکز و کلسترول سرمی در موش‌های دیابتی می‌شود؛ اما در میزان تری‌گلیسرید تغییر معنی‌داری مشاهده نکردند. به طورکلی، در مطالعات مختلف، مکانیسم‌های متفاوتی در مورد چگونگی اثر عصاره چای سبز برکنترل قند خون ذکرشده است. تغییر در سطح گلوکز خون ماهی نشان دهنده تأثیر ترکیبات موجود در کاتشین بر مکانیسم‌های شاهد کننده جذب، ذخیره و متابولیسم گلوکز خون است. براساس گزارشات موجود، چای سبز می‌تواند از طریق مهار جذب گلوکز در روده به طور غیرمستقیم و یا به طور مستقیم با اثر بر متابولیسم گلوکز در کبد و ممانعت از انجام گلوکونئوژنز کبدی منجر به کاهش گلوکز در خون شود (Thieleckea and Boschmann, 2009; Wu *et al.*, 2005). یافته‌های کمی پیرامون اثر کاتشین بر میزان کلسترول و تری گلیسرید سرم خون در ماهی‌های مختلف موجود است. اما مطالعات *In vitro* متعدد در سایر موجودات در رابطه با بررسی اثرات چای سبز و ترکیبات موجود در آن نشان دهنده توانایی این مواد در ایجاد اختلال در سنتز و تعدیل میزان کلسترول خون هستند (Derakhshande and Aman Allahim, 2008; Thieleckea and Boschmann, 2009; Kuhn *et al.*, 2004). کاتشین‌های موجود در چای سبز، دارای خاصیت کاهندگی سطح کلسترول و به طور کلی کاهش سطح لیپید می‌باشند

(Muramatsu *et al.*, 1986; Fukuyo *et al.*, 1986) و جذب روده‌ای کلسترول و سایر ترکیبات لیپیدی را کاهش می‌دهند که می‌تواند علل احتمالی اثر چای سبز بر لیپیدها باشد (Muramatsu *et al.*, 1986; Ikeda *et al.*, 1992). همچنین اثرات کاهندگی سطح کلسترول چای سبز توسط Singh و همکاران (۲۰۰۹) نیز گزارش شد. از سوی دیگرRoach و همکاران (۱۹۹۳) و پیرو گزارش آنها Derakhshande and Aman Allahim (۲۰۰۸) مهار سنتز ترکیبات استرولی در کبد توسط عصاره چای سبز را علت کاهش کلسترول و ترکیبات لیپیدی در خون مطرح کردند. همچنین مطابق با نتایج به دست آمده در این بررسی، Immanuel و همکاران (۲۰۰۹) کاهش معنی‌دار میزان تری‌گلیسرید در سرم خون ماهی تیلاپیا پس از استفاده از عصاره گیاهی را گزارش نمودند.

لیزوزیم آنزیمی ضد باکتریایی و یک شاخص با اهمیت ایمنی غیراختصاصی در ماهی است (Ross *et al.*, 2000؛ Subramanian *et al.*, 2007). نتایج مطالعه حاضر حاکی از افزایش معنی‌داری فعالیت آنزیم لیزوزیم در موکوس پوست ماهی کاراس معمولی تغذیه شده با جیره حاوی دو سطح ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم خوراک بود. نتایج این تحقیق با نتایج بدست آمده از مطالعه Abdel-tawwab و همکاران (۲۰۱۰) در ماهی تیلاپیا نیل و Kakolaki و همکاران (۲۰۱۷) در ماهی کفال خاکستری هم‌خوانی دارد. سایر مطالعات انجام شده توسط محققین نشان داد که به دنبال استفاده از عصاره چای سبز در خوراک ماهی میزان فعالیت لیزوزیم افزایش یافته که این افزایش بسته به گونه ماهی، غلظت و نوع عصاره مورد استفاده می‌تواند متفاوت باشد (Yin *et al.*, 2009).

آنزیم فسفاتاز قلیایی یک آنزیم لیزوزیمی بوده که بیشترین دامنه فعالیت آن در pH قلیایی است و نقش حفاظتی را در برابر پاتوژن‌ها انجام می‌دهد (Ross *et al.*, 2000; Subramanian *et al.*, 2007). فسفاتاز قلیایی در اپی‌تلیوم مجاری صفراوی، سلول‌های کبدی، کلیه‌ها و مخاط روده و پوست یافت می‌شود (Murray *et al.*, 2003). اطلاعات محدودی در رابطه با تأثیر محرک‌های ایمنی بر فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی موجود در موکوس ماهیان وجود دارد. Sheikhzadeh و همکاران (۲۰۱۲a) افزایش معنی‌داری را در فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی موکوس در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تحت تیمار محرک ایمنی ارگوسان و Roosta و همکاران (۲۰۱۳) افزایش فعالیت فسفاتاز قلیایی را در موکوس ماهی تایگر بارب (*Puntius tetrazona*) و Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۵) در ماهی دم شمشیری سیاه (*Xiphophorus helleri*) پس از تغذیه با پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (*Lactobacillus acidophilus*) گزارش نمودند. همچنین فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در موکوس ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*) با تغذیه ۸ هفته‌ای زنجبیل افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان داد (Zahiri *et al.*, 2017). در این مطالعه با افزایش سطح کاتشین فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در موکوس بافت پوست افزایش یافت که با مطالعه Ahmadifar و همکاران (۲۰۱۹) تأثیر مثبت ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) تغذیه شده با کاتشین موجود در برگ خرمالو همسو بود.

پروتئازها یکی دیگر از عوامل موجود در موکوس ماهی‌ها هستند. ترشح پروتئازها در موکوس پوست مستقیماً بر پاتوژن‌ها عمل کرده و باکتری‌ها را از طریق شکستن پروتئین‌ها از بین می‌برند یا ممکن است به طور غیرمستقیم با تغییر غلظت موکوس علیه پاتوژن‌ها عمل نمایند (Esteban, 2012). Sheikhzadeh و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند تغذیه ماهی با جیره حاوی چای سبز به طور معنی‌داری سبب افزایش فعالیت پروتئازی موکوس بافت پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان شد. در مطالعه دیگر افزودن عصاره خرما به جیره غذایی سبب افزایش معنی‌دار فعالیت پروتئازی موکوس در ماهی کپور شد (Hoseinifar *et al.*, 2016). در این تحقیق نیز میزان فعالیت پروتئاز موکوسی بافت پوست تحت تأثیر ۵۰۰ میلی‌گرم کاتشین موجود در هر کیلوگرم خوراک ماهی کاراس معمولی نسبت به تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم کاتشین و گروه شاهد در دوره ۴۵ روزه افزایش

معنی‌داری داشت. در مجموع نتایج ضد و نقیض تأثیر کاتشین استخراج شده از چای سبز در برخی مطالعات را می‌توان به فعالیت کاتشین‌ها نسبت داد که به کیفیت چای سبز (موقعیت جغرافیایی کشت، آب و هوا، شرایط برداشت و ذخیره‌سازی) و شرایط فرایند عمل‌آوری آن بستگی دارد (Shisuoka *et al.*, 1986).

نتایج مطالعه اخیر نشان داد که کاتشین استخراج شده از چای سبز موجب کاهش گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسیرید سرمی و افزایش فعالیت آنزیم لیزوزیم، آلکالین فسفاتاز، پروتئاز موکوسی بافت پوست در ماهی کاراس معمولی گردید و مناسب‌ترین دوز ۵۰۰ میلی‌گرم کاتشین بر کیلوگرم خوراک بود. برای تکمیل مطالعه و اطمینان از عدم تأثیر پاتولوژیک کاتشین موجود در چای سبز بر بافت‌های بدن به خصوص دستگاه گوارش مطالعات بافت‌شناسی توصیه می‌گردد.

References

Abdel-Tawwab, M., Ahmad, M.H., Seden, M.E.A., Saker, S.F.M., 2010. Use of green tea, *Camellia sinensis L.*, in practical diet for growth and protection of Nile tilapia, (*Oreochromis niloticus L.*), against *Aeromonas hydrophila* infection. *Journal of the World Aquaculture Society* 41, 203-213.

Abdel-Tawwab, M., Ahmad, M.H., Seden, M.E.A., Sakr, S.F.M., 2010. Use of green tea, *Camellia sinensis L.*, in practical diet for growth and protection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus (L.)*, against *Aeromonas hydrophila* infection. *The Journal of the World Aquaculture Society* 41, 203-213.

Ahmadifar, E., Shahriari Moghadam, M., Sheikhzadeh, N., 2019. The effect of persimmon leaf extract (*Diospyros kaki*) as feed additive on some blood parameters and non-specific immune response in Common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of aquaculture science* 7(1), 27-36.

Chiu, A., Li, L., Guo, Sh., Bai, J., Fedor, Ch., Naylor, R.L., 2013. Feed and fish meal use in the production of carp and tilapia in China. *Aquaculture*, 414-415, 127-34.

Cho, S.H., Lee, S.M., Park, B.H., Ji, S.C., Lee, J., Bae, J., 2007. Effect of dietary inclusion ofvarious sources of green tea on growth, body composition and blood chemistry of the juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 49, 33-35.

Derakhshande, H., Aman Allahim F., 2008. Evaluation of green tea consumption on level of blood cholesterol on rat. *Journal of Korasan University Medical Science* 1(1), 33-40.

Ebrahimi, E., Beiraghdar, O., 2002. Nutrient requirements and feeding of finish for aquaculture, Iranian Students Booking Agency- Isfahan, Pp., 304.

Ebrahimi, V., Salati, A.P., Azarm, H.M., Hasanpour, S., 2015. Effects of dietary green tea (*Camellia sinensis L*) on acute stress responses in sturgeon hybrid (*Huso huso*♂× *Acipenser ruthenus* ♀). *Aquaculture Research*, 48(2), 618-623.

Esteban, M.A., 2012. An overview of the immunological defenses in fish skin. *International Scholarly Research NetworkImmunology* 2012: 1-29.

Fukuyo, M., Hara, Y., Muramatsu, K., 1986. Effect of tea leaf catechin, (-)-epigallocatechin gallate, onplasma cholesterol level in rats. *Japan Society of Nutrition and Food Science* 39, 495 - 500.

Haidari, F., Shahi, M.M., Zarei, M., Rafiei, H., Omidian, K., 2012. Effect of green tea extract on body weight, serum glucose and lipid profile in streptozotocin induced diabetic rats. A dose response study. *Saudi Medical Journal* 33 (2), 128 - 33.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S., 2011. 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.

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

Hoseinifar, S.H., Roosta, Z., Hajimoradloo, A., Vakili, F., 2015a. The effects of *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black sword tail (*Xiphophorus helleri*). *Fish & Shellfish Immunology* 42, 533–538.

Hwang, J.H., Lee, S.W., Rha, S.J., Yoon, H.S, Park, E.S., Han, K.H., Kim, S.J., 2013. Dietary green tea extract improves growth performance, body composition, and stress recovery in the juvenile black rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Aquaculture International* 21, 525- 538.

Ikeda, I., Imasato, Y., Sasaki, E., 1992. Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. *Biochimica et Biophysica Acta* 1127: 141 - 6.

Immanuel, G., Uma, R.P., Iyapparaj, P., Citarasu, T., Punitha, S.M, Babu, M., Palavesam, A., 2009. Dietarymedicinal plant extracts improve growth, immune activity and survival of tilapia *Oreochromismossambicus*. *Journal of Fish Biology* 74, 1462-1475.

Kakolaki, Sh., Jedgal, S., Salehi, H., Zorriehzahra, S.J., Hoseinzadeh Sahafi, H., Afsharnasab, M., Sepahdari, A., Akbari, P., Feridoni, M.S., 2017. A study on methanol herbal plant extract of Garlic (Camellia sinensis) on immunity level of Mugil cephalus. *Iranian Fisheries Science Research Institute* 1-37.

Keene, J.L., Noakes. D.L.G., 1998. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (walbaum). *Aquaculture Research* 29(2), 89–101.

Koo, M.W.L., Cho, C.H., 2004. Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system, *European Journal of Pharmacology* 500, 177-185.

Kuhn, D.J., Burns, A.C., Kazi, A., Dou, Q.P., 2004. Direct inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway by ester bond-containing green tea polyphenils is associated with increased expression of sterol regulatory element-binding protein and LDL receptor. *Biochimica et Biophysica Acta* 1682, 1-10.

Lucas, A., 1996. Physical concepts of bioenergetics. In: Lucas, A. (ed). Bioenergetics of Aquatic Animals. English edition. Taylor and fransis, France, ISBN- 13: 9780132259057.

Mehdizade M, Hosseini Tehrani S, Ebrahiminia F., 2010. Effect of green tea (*Camellia sineisis L.*) extract on blood glucose and body weight in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Gorgan University of Medical Science* 2(1), 8 - 12.

Muramatsu, K., Fukuyo, M., Hara, Y., 1986. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level

Nootash, S., Sheikhzadeh, N., Baradaran, B., Khani Oushani, A., Maleki Moghadam, M.R., Nofouzi, K., 2013. Green tea (*Camellia sinensis*) administration induces expression of immune relevant genes and biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology* 35, 1916-1923.

Palaksha, K.J., Shin, G.W., Kim, Y.R., Jung, T.S., 2008. Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & Shellfish Immunology* 24, 479-88.

Raa, J., 1996. The use of immuno-stimulatory substances in fish and shellfish farming. *Reviews in Fisheries Science* 4(3), 229-288.

Rao, Y.Y., Das, B.K., Iyotymayee, P., Chakrabarti, R., 2006. Effect of *Achyranthes aspera Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology* 20, 265-273.

Riemersma, R.A., Rice-Evans, C.A., Tyrrell, R.M., Clifford, M.N., Lean, M.E., 2001. Tea flavonoids and cardiovascular health. *Quarterly Journal of Medicine* 94, 277-282.

Ringø, E., Olsen, R.E., Gifstad, T.Ø., Dalmo, R.A., Amlund, H., Hemre, G.I., Bakke,A.M., 2010. Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition* 16, 117-136.

Rizvi, S.I., Zaid, M.A., Anis, R., Mishra, N., 2005. Protective role tea catechins against oxidation-induced damage of type 2 diabetic erythrocytes. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 32, 70-75.

Roach, P.D., Kerry, N.L., Whiting, M.J., Nestel, P.J., 1993. Coordinate changes in the low density lipoprotein receptor activity of liver and mononuclear cells in the rabbit. *Atherosclerosis* 101,157-164.

Roosta, Z., Hajimoradloo, A., Hoseinifar, S.H., Vakili, F., 2013. Effect of different levels of Lactobacillus acidofilus as a probiotic on the anti-bacterial activity of mucus and non-specific immune of mucus in Tiger Barb (*Puntius tetrazona*). *Journal of Aquatic Ecology* 3 (2): 20-13.

Sheikhzadeh N, Karimi Pashaki A, Nofouzi K, Heidarieh M, Tayefi-Nasrabadi H. 2012a. Effects of dietary Ergosan on cutaneous mucosal immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Shellfish Immunol., 32:407-417.

Sheikhzadeh, N., Heidarieh, M., Karimi Pashaki, A., Nofouzi, K., Ahrab Farshbafi, M., Akbari., M. 2012b. Hilyses, fermented *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the growth performance and skin non-specific immune parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology* 32, 1083-1087.

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

Shisuoka, S. 1986. Process for the production of tea catechins, US patent 4.613.672.

Singh, D., Banerjee, S., Todd, D., 2009. PorterGreen and black tea extracts inhibit HMG-CoA reductase and activate AMP-kinase to decrease cholesterol synthesis inhepatoma cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* 20 (10), 816 – 22.

Thawonsuwan, J., Kiron, V., Satoh, S., Panigrahi, A., Verlhac, V., 2010. Epigallocatechin-3- gallate (EGCG) affects the antioxidant and immune defense of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiology and Biochemistry* 36, 687-697.

Thieleckea, F., Boschmann, M., 2009. The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome -A review. *Phytochemistry* 70(1), 11-24.

Turchini, G.M., Gunasekera, R.M., De Silva, S.S., 2003. Effect of crude oil extracts from trout offal as a replacement for fish oil in the diets of the Australian native fish Murray cod (*Maccullochella peelii* peelii). *Aquaculture Research* 34, 697-708.

Uzunalic, A.P., Skerget, M., Knez, Z., Weinreich, V., Otto, F., Gruner, S., 2005. Extraction of Active Ingredients from Green Tea (*Camellia Sinensis*): Extraction Efficiency of Major Catechins and Coffeine. *Food Chemistry* 96(4), 597-605.

Vinson, J.A., Teufel K., 2004. Green and black teas inhibit atherosclerosis by lipid, antioxidant, and fibrinolytic mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 3661-3665.

Weber, J.M., Ruzindana-Umunyana, A., Imbeault, L., Sircar, S., 2003. Inhibition of adenovirus infection and adenine by green tea catechins. *Antiviral Research* 58, 167-173.

Wu, C.H., Lu, F.H., Chang, C.S., Chang, T.C., Wang, R.H., Chang, C.J., 2003. Relationship among habitual tea consumption, percent body fat, and body fat distribution. *Obesity research* 11, 1088 – 95.

Yin, G., Ardo, L., Thompson, K.D., Adams, A., Jeney, Z., Jeney, G., 2009. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 26, 140-145.

Zahiri, F., Imanpour, M.R., Hajimoradlou, A., Hoseinifar, S.H., 2017. The effects of ginger powder (*Zingiber officinale*) on the growth, some of mucous immune ameters and hematological parameters in *Caspian kutumRutilus kutum* (Kamensky, 1901) fingerlings. *Journal of Applied Ichthyological Research* 5(1), 69-78.