شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹
صفحات ۳۴۰-۳۲۹

تاثیر عصاره هسته انگور (*Vitis vinifera*) بر آنزیم‌های گوارشی و بافت‌شناسی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

زهره مهری نخی[۱]، احسان احمدی‌فر[۲*]، نجمه شیخ زاده[۲]، محسن شهریاری مقدم[۳]

۱. کارشناس ارشد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲. استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۳. دانشیار گروه بهداشت و مواد غذایی آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۴. استاد یار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ ارسال: ۱۳۹۹/۰۴/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۳۰

چکیده

امروزه جایگزینی عصاره‌های گیاهی به‌جای نگهدارنده‌های شیمیایی در جیره غذایی آبزیان مورد توجه قرارگرفته است که این امر موجب کاهش اثرات سوء ناشی از مصرف نگهدارنده‌های شیمیایی شده است. در این پژوهش، تأثیر عصاره هسته انگور سیاه بر بافت شناسی روده و کبد و آنزیم های گوارشی کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفت. پودر عصاره هسته انگور به مقدار ۳۰ گرم در کیلوگرم به جیره غذایی پایه اضافه شد و در پایان دوره آزمایش، آنزیم‌های گوارشی شامل لیپاز، آمیلاز و تریپسین در آنها اندازه‌گیری شد. هم چنین ماهیان تشریح و روده و کبد آنها تثبیت و مطالعات بافت‌شناسی روی آنها انجام شد. نتایج نشان داد که از میان آنزیم‌های گوارشی مختلف، تنها آنزیم لیپاز نسبت به تیمار شاهد (۱/۳۵±۰/۰۴ U/mg protein) افزایش معنی‌داری (۱/۶۷±۰/۱۰ U/mg protein) نشان می دهد. مطالعه بافت شناسی روده و کبد نیز نشان داد، جیره تیمار اثر منفی بر ساختار طبیعی این بافت‌ها ایجاد نمی کند. همچنین، نسبت ارتفاع ویلی به فاصله بین دو ویلی مجاور در قسمت پایه‌ای در ماهیان تیمار شده (۱۷/۳۹±۰/۵۵ میکرومتر) نسبت به گروه شاهد (۱۶/۷۱±۰/۵۹ میکرومتر) کمی بیشتر شد، اما تفاوت معنی‌داری نشان نداد. تعداد سلول‌های گابلت نیز در ماهیان گروه شاهد (۴/۵۹±۰/۱۷) نسبت به ماهیان تیمار شده (۴/۰۹±۰/۲۱)کمی بیشتر بود. با این وجود تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. مطالعه مورفومتریک کبد نیز نشان دهنده افزایش معنی‌دار قطر سلول‌های کبدی در گروه تیمار (۲۴/۰۱±۰/۱۶ میکرومتر) در مقایسه با گروه شاهد (۲۳/۴۲±۰/۱۴ میکرومتر) بود. به طور کلی با توجه به نتایج بدست آمده از افزایش فعالیت آنزیم گوارشی و ساختار طبیعی کبد و روده می‌توان بیان نمود که عصاره دانه انگور یک افزودنی مفید برای به کارگیری در جیره کپور معمولی است.

کلمات کلیدی: کپور معمولی، عصاره هسته انگور، آنزیم گوارشی، بافت شناسی، روده

* نویسنده مسئول: احسان احمدی‌فر
Email: Ehsan.Ahmadifar@uoz.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 73, No. 3 Autumn 2020
pp. 329-340

Effects of grape seed extract (*Vitis vinifera*) on digestive enzymes and histology in common carp (*Cyprinus carpio*)

Zohre Mehrinakhi[1*], Ehsan Ahmadifar[2], Najmeh Sheikhzadeh[3], Mohsen Shahriari Moghadam[4]

1. MSc. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran.
3. Associate Professor, Department of Food Hygiene and Aquatic Animals, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran.

Received: 21-Sep-2020 Accepted: 11-Jun-2020

Abstract

Today, the replacement of plant extracts instead of chemical preservatives in the diet has been considered with reducing the adverse effects of chemical preservatives. In this study, the effects of black grape seed extract on growth, intestinal and liver histology, as well as gastrointestinal enzymes, in common carp were investigated. Grape seed extract (30g kg-1) was added to the basal diet and at the end of the experimental period, the digestive enzymes, including lipase, amylase, and trypsin, were measured. The fish were also dissected, then intestine and liver were collected and fixed for histological studies. The results showed that among different digestive enzymes, only lipase had a significant increase (1.67±0.10 U/mg protein) compared to control group (1.35±0.04 U/mg protein). In the intestinal and liver histology, supplemental diet did not have any side effects on the normal structure. The ratio of villus height to the distance between two adjacent villus in the basal part was slightly higher in treated fish (17.39 ± 0.5μm) than the control group (16.71 ± 0.59 μm), but no significant differences was observed. Also, the number of goblet cells in control group (4.59±0.17μm) was slightly higher than treated fish (4.09±0.21μm), however, no significant difference was observed. Morphometric study in liver also showed an increase in hepatocyte size (24.01±0.16μm) compared to the control group (23.42±0.14μm). In general, the increase of the digestive enzyme activity and healthy liver and intestine structure could show the potential of grape seed extract as a beneficial feed additive in common carp.

Keywords: *Common carp, Grape seed extract, Digestive enzyme, Histology, Intestine*

Corresponding author: Ehsan Ahmadifar Email: Ehsan.Ahmadifar@uoz.ac.ir

۱. مقدمه

امروزه صنعت آبزی پروری بخش مهمی از اقتصاد را به خود اختصاص داده و تامین کننده پروتئین مورد نیاز برای مصارف انسانی است (Dawood *et al.*, 2020). هم چنین گسترش و موفقیت درآبزی پرروی به عوامل مختلفی مانند افزایش تراکم در واحد سطح وابسته است. پرورش متراکم ماهیان معمولا توام با استرس‌های اکسیداتیو، سرکوب سیستم ایمنی و بیماری‌های عفونی است (Abdel-Latif *et al.*, 2020). عموماً استفاده از ترکیبات شیمیایی در جیره غذایی یا در محیط پرورشی به عنوان یکی از روش‌های معمول مقابله با این مشکلات مطرح است. چون، استفاده بیش از اندازه از آنتی‌بیوتیک‌ها و دارو درمانی اثرات جانبی قابل ملاحظه‌ای بر سلامت انسان، محیط زیست و اکوسیستم می‌گذارد. بنابراین، استفاده از مکمل‌های غذایی طبیعی یکی از راهکاری ویژه و کارآمد در آبزی پروری مدرن شناخته شده است (Ahmadifar *et al.*, 2020).

در این ارتباط، بافت شناسی روش ارزشمندی برای مطالعه و بررسی اثرات مختلف مکمل‌ها در جیره‌های مختلف غذایی بر دستگاه گوارش ماهی‌ها ست. این اثرات شامل تغییرات پاتولوژیک در روده (Baeverfjord and Krogdahl, 1996)، کبد (Caballero *et al.*, 2004) و دیگر قسمت‌های دستگاه گوارش است. از آنجایی که بافت پوششی دستگاه گوارش از نخستین بخش‌هایی است که تحت تاثیر مستقیم غذای خورده شده قرار می‌گیرد، مطالعه و بررسی دقیق آن می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در خصوص اثرات احتمالی مکمل‌های اضافه شده به غذا در اختیار محققین قرار دهد (Jamroz *et al.*, 2006). هم‌چنین مطالعات نشان داده‌اند اضافه کردن برخی مکمل‌ها به جیره می‌تواند منجر به گستره‌ای از اثرات منفی بر دستگاه گوارش ماهی‌ها شود. از شاخص‌ترین آنها می‌توان به التهاب روده‌ای به دلیل برخی خواص ضد جذبی موجود در افزودنی‌ها اشاره کرد (Francis *et al.*, 2001). هم‌چنین اثرات برخی مکمل‌ها به جیره در بافت کبدی نیز قابل مشاهده است (Robaina *et al.*, 1995). در نتیجه جهت بررسی جوانب مختلف مکمل اضافه شده به جیره مطالعات بافت‌شناسی ضروری به نظر می‌رسد. هم‌چنین از آنجایی که آسیب‌های ایجاد شده توسط ترکیبات مختلف در گونه‌های مختلف ماهی‌ها متفاوت است، نیاز است مطالعات موردی انجام شود.

مطالعات مختلف نشان داده‌اند تغییرات غذا و مکمل‌های غذایی می‌تواند در تولید آنزیم‌های گوارشی ماهی موثر باشد. در نتیجه مطالعه تغییرات آنزیم‌های گوارشی ماهیان پس از مصرف جیره حاوی مکمل‌های غذایی گامی ضروری برای مطالعه تغییرات ایجاد شده در مکانیسم گوارش ماهی مطالعه شده است. بعلاوه با توجه به آنکه آنزیم‌های گوارشی نقش کلیدی در هضم مواد غذایی برعهده دارند، آگاهی از سطح فعالیت آن‌ها می‌تواند در پی بردن به قدرت هضمی ماهیان موثر باشد (Harikrishnan *et al.*, 2011).

گیاهان مختلف یا محصولات جانبی آن‌ها شامل ترکیبات فنل، پلی‌فنول، آلکالوئید، کینون، ترپنوئید، لکتین و پلی‌پپتید هستند که بسیاری از آن ها جایگزین‌های مؤثری برای آنتی بیوتیک ها، مواد شیمیایی، واکسن‌ها و سایر ترکیبات مصنوعی‌اند (Harikrishnan *et al.*, 2011). گیاهان دارویی با داشتن مزیت‌هایی از جمله عوارض جانبی کمتر، سهولت دسترسی، امکان تولید در سطح وسیع، قیمت مناسب و خطر کمتر برای محیط‌زیست و جانور، عدم ایجاد مقاومت نسبی عوامل بیماری‌زا همواره به‌عنوان جایگزین مناسب برای داروهای شیمیایی مورد توجه‌اند (قاسمی پیربلوطی و همکاران، ۱۳۹۰).

هسته‌ی انگور (*Vitis vinifera*) ترکیبی از چربی، پروتئین، کربوهیدرات و ۵ الی ۸ درصد پلی‌فنل است، که مقادیر آن در رقم‌های مختلف متفاوت است. عصاره هسته انگور غنی از پروآنتوسیانیدین است. این ماده یک نوع بیوفلاوونوئید و با داشتن خاصیت ضد باکتریایی، بافت‌های زنده را تقویت می‌کند. افزایش استحکام رگ‌ها،

بالا بردن سطح ایمنی بدن و بهبود گردش خون ازجمله فواید این ماده به شمار می‌آید (Bagchi *et al.*, 1997). در آبزی پروری نیز اثرات مثبت عصاره دانه انگور خوراکی بر عملکرد رشد، مقاومت در برابر بیماری، بهبود سیستم ایمنی و آنتی اکسیدانی در گونه‌های ماهی نشان داده شده است (Zhai *et al.* 2014; Arslan *et al.*, 2018; Ahmadifar *et al.*, 2020; Mousavi *et al.*, 2020). با این وجود، اطلاعات کافی در زمینه اثرات عصاره دانه انگور بر آنزیم‌های گوارشی و بافت‌شناسی اندام‌های مهم در رشد و ایمنی در ماهی در دسترس نیست. با توجه به مطالب ذکر شده، تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر وجود عصاره‌ی اتانولی هسته انگور در جیره غذایی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی و بافت شناسی روده و کبد در ماهی کپور معمولی انجام شد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تهیه ماهی و شرایط نگهداری آن

ماهی کپور معمولی با وزن تقریبی (۳/۳۲±۴۵/۶۷) از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان گرمابی شهرستان زهک تهیه و به آزمایشگاه پژوهشکده تالاب بین المللی هامون واقع در دانشگاه زابل منتقل شدند. قبل از انتقال ماهیان به آزمایشگاه مخازن ذخیره شسته و به وسیله ی فرمالین ضدعفونی شده و با آبی که به مدت ۲۴ ساعت کلرزدایی شده بود، آبگیری شدند. پس از ورود، ماهیان به مدت ۱۰ دقیقه با سدیم کلراید ۲ درصد ضدعفونی شدند، سپس با شرایط آزمایشگاهی نگهداری و سازگار شدند و در طول این مدت با استفاده از غذای حبه ای یا پلت شده شاهد غذادهی شدند. پس از آن ماهیان به طور تصادفی در مخازن فایبرگلاسی با تراکم ۲۰ قطعه در هر مخزن قرار گرفتند.

۲.۲. تهیه عصاره هسته‌ی انگور سیاه و ساخت جیره غذایی

انگور سیاه (*Vitis Vinifera*) از منطقه ی مالکان (استان آذربایجان شرقی، ایران) جمع آوری شد. هسته‌های انگور به صورت دستی جدا و به دور از تابش مستقیم خشک شده و سپس توسط آسیاب خانگی پودر شدند. استخراج عصاره با اتانول ۹۰درصد انجام شد. به این صورت که ۴۰ میلی لیتر آب و ۳۶۰ میلی لیتر اتانول به ۱۰۰ گرم هسته‌ی انگور اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت روی دستگاه شیکر (IKA) مخلوط شدند عصاره‌ی به دست آمده با استفاده از کاغذ صافی جدا شده و حلال با تبخیر در خلاء در حداکثر دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد حذف شد (Mousavi *et al.*, 2020).

میزان دانه انگور مورد مصرف در جیره تیمار ۳۰ گرم به ازای هر کیلوگرم غذا محاسبه گردید. دوز انتخاب شده نیز براساس دوز مناسب این عصاره در ماهی کپور معمولی بود (Mehrinakhi *et al.*, 2020). جیره غذایی پایه با فرمولاسیون ذکر شده در ذیل (جدول ۱) خرد شد و همراه با آب مقطر و عصاره‌ی هسته‌ی انگور سیاه ۳۰ گرم به ازای هر کیلوگرم غذا مخلوط شد و بعد از تشکیل خمیر با استفاده از چرخ گوشت به شکل پلت‌های استوانه ای درآمد. سپس این پلت‌ها به مدت دو روز در دمای اتاق خشک گردید و تا زمان استفاده در کیسه‌های زیپ‌دار بسته بندی و در یخچال در دمای ^{o}C ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۳.۲. اندازه گیری آنزیم‌های گوارشی

در هر واحد آزمایش، ۶ ماهی به طور تصادفی جمع‌آوری و در عصاره گل میخک رقیق شده (۵۰ میکرولیتر در لیتر) بی‌هوش شدند. پس از ضد عفونی هر ماهی در کلرید بنزالکونیوم ۰/۱ درصد، روده ماهیان جدا شد و محتویات آن با احتیاط برداشته شد. بعد از شستشو با محلول نمک استریل (NaCl ۰/۸۵درصد)، روده هر ماهی به صورت دستی در نیتروژن مایع خرد شد و سپس بافر ۲۵ میلی مولار تریس هیدروکلرید (pH ۷/۲) اضافه و با ورتکس مخلوط گردید.

جدول۱ - ترکیب تقریبی جیره غذایی تجربی (٪ ماده خشک)

ترکیبات (درصد)	
پودر ماهی	۳۳
آرد گندم	۲۶
کنجاله سویا	۱۲
گلوتن گندم	۶
آرد ذرت	۱۴
مواد معدنی	۳
ویتامین	۳
هم بند	۲
مواد ضد قارچ	۱

نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۵۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. فعالیت تریپسین با استفاده از کیت تریپسین اندازه‌گیری گردید (CK-E91540) (EASTBIOPHARM CO. China). فعالیت آنزیم لیپاز با استفاده از روش Bülow و Mosbach (۱۹۸۷)، انجام شد. فعالیت آنزیم آمیلاز نیز با روش ارائه شده توسط Bernfeld و همکاران (۱۹۵۵) انجام شد. تمامی فعالیت‌های آنزیمی بر اساس واحد در میلی‌گرم پروتئین بافتی ثبت شد.

۴.۲. مطالعات بافت شناسی

طبق روش قبل، از هر مخزن، ۶ ماهی به طور تصادفی جمع‌آوری و در عصاره گل میخک رقیق شده (۵۰ میکرولیتر در لیتر) بی هوش شدند. سپس نمونه‌ها تشریح و قسمت جلویی روده و کبد جداسازی و در داخل فرمالین ۱۰درصد تثبیت و سپس به اتانول ۷۰ درصد منتقل شدند. مراحل آبگیری به ترتیب با استفاده از الکلهای ۹۰، ۹۵، ۱۰۰درصد و در نهایت با الکل بوتیلیک (۱۲ ساعت) انجام گردید. مراحل شفاف‌سازی نمونه‌ها با استفاده از تولوئن انجام شد. نمونه‌ها بعد از ۹ ساعت نگهداری در داخل پارافین مایع (در داخل اون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد) در داخل پارافین قالب‌گیری شدند. سپس از قسمت جلویی دستگاه گوارش و کبد مقاطع ۵ میکرونی با استفاده از میکروتوم تهیه شد. برش‌های تهیه شده با رنگ‌های هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی و توسط میکروسکوپ (Nikon E600) مجهز به دوربین عکاسی مطالعه و عکس برداری شدند. آنالیز مورفومتریک برش‌های بافتی با استفاده از نرم افزارImajeJ (version 1.38) انجام شد. از هر ماهی برش‌های بافتی تهیه و برای مطالعه بافت کبد قطر ۵۰ هپاتوسیت در هر ماهی اندازه گیری شد. هم‌چنین ارتفاع ویلی‌ها (۶۰ ویلی در هر ماهی)، عرض ویلی‌ها و فاصله بین دو ویلی مجاور در قسمت پایه‌ای اندازه‌گیری شد. تعداد سلول‌های گابلت در ۱۰۰ میکرومتر از فولدهای روده‌ای (۶۰ فولد در هر ماهی) شمارش گردید (Rašković *et al.*, 2016, Viveros *et al.*, 2011).

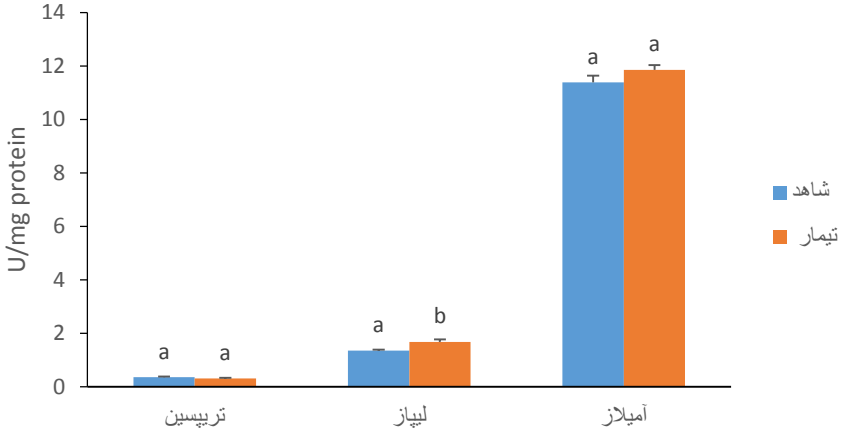
۵.۲. تجزیه و تحلیل آماری

آزمون‌های آماری توسط نرم افزار SPSS-19 انجام شد. پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها، مقایسه تاثیر عصاره دانه انگور بر فاکتورهای اندازه‌گیری شده با استفاده از آزمون t-test انجام شد. سطح معنی‌داری نیز $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

۳. نتایج

نتایج اندازه گیری آنزیم‌های گوارشی در شکل ۱ شان داده شده است. بر اساس نتایج بدست آمده از میان

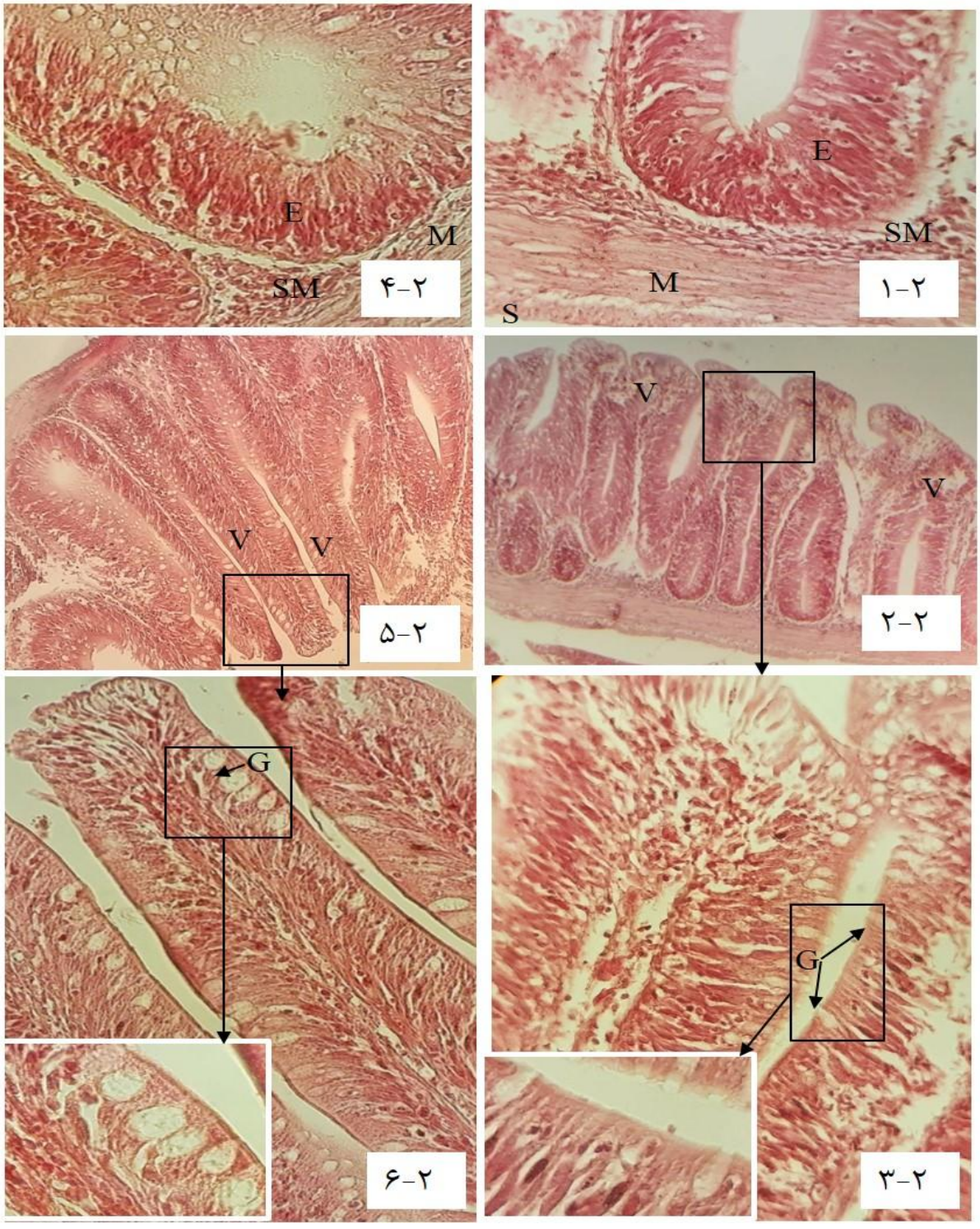
آنزیم‌های اندازه‌گیری شده تنها تفاوت معنی‌داری در میزان لیپاز بین گروه شاهد و ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی عصاره هسته انگور مشاهده شد. به گونه‌ای که میزان لیپاز در گروه شاهد ۱/۳۵±۰/۰۴ U/mg protein واحد در میلی گرم پروتیین و در تیمار تغذیه شده با عصاره هسته انگور ۱/۶۷±۰/۱۰ U/mg protein اندازه‌گیری شد. هم‌چنین میزان آنزیم تریپسین در گروه شاهد و تیمار تغذیه شده با عصاره دانه انگور به ترتیب ۰/۳۶±۰/۰۲ و ۰/۳۱±۰/۰۲ و میزان آنزیم آمیلاز به ترتیب ۱۱/۳۹±۰/۲۵ و ۱۱/۸۵±۰/۱۸ U/mg protein واحد در میلی گرم پروتیین اندازه‌گیری شد.



شکل ۱- میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی در ماهی کپور معمولی گروه شاهد و تغذیه شده با عصاره هسته انگور (حروف مختلف در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار مابین گروه‌هاست).

مقاطع مربوط به بافت‌شناسی روده ماهی کپور معمولی در شکل ۲ آورده شده است. در کل، ساختار ظاهری در روده هم در گروه کنترل و هم در گروه تیمار نرمال بود و ضایعه‌ای در گروه‌ها دیده نشد. بررسی مورفومتریک روده نیز در جدول ۲ نشان داده شده است. در ماهیان تغذیه شده با عصاره هسته انگور ارتفاع ویلی‌ها (۴۲۶/۶۶±۱۲/۴۸ میکرومتر) بود و در ماهیان گروه شاهد ارتفاع ویلی‌ها قدری کمتر (۴۱۷/۸۵±۱۲/۴۰ میکرومتر) بود ولی تفاوت معنی‌داری ($p>0.05$) بین آنها مشاهده نشد. هم‌چنین عرض ویلی‌ها در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۳ درصد عصاره دانه انگور به طور میانگین (۸۰/۴۲±۱/۳۸ میکرومتر) اندازه‌گیری شد در حالی که در گروه شاهد (۷۸/۲۳±۱/۲۱ میکرومتر) اندازه‌گیری شد و تفاوت معنی‌داری ($p>0.05$) بین آنها وجود نداشت.

فاصله بین دو ویلی مجاور در قسمت پایه در ماهیان تیمار تغذیه شده با عصاره هسته انگور (۲۴/۹۷±۰/۳۷ میکرومتر) در مقایسه با گروه شاهد (۲۵/۵۷±۰/۳۹ میکرومتر) کمی کمتر بود، اما تفاوت معنی‌داری دیده نشد. هم‌چنین ارتفاع ویلی به فاصله بین دو ویلی مجاور در قسمت پایه در ماهیان تیمار شده (۱۷/۳۹±۰/۵۵ میکرومتر) نسبت به گروه شاهد (۱۶/۷۱±۰/۵۹ میکرومتر) کمی بیشتر شده بود، اما تفاوت معنی‌داری نشان نداد. هم‌چنین نتایج شمارش تعداد سلول‌های گابلت نشان داد که در ماهیان گروه شاهد تعداد این سلول‌ها (۴/۵۹±۰/۱۷) نسبت به ماهیان تیمار شده (۴/۰۹±۰/۲۱)کمی بیشتر است. با این وجود تفاوت معنی‌داری ($p>0.05$) مشاهده نشد.

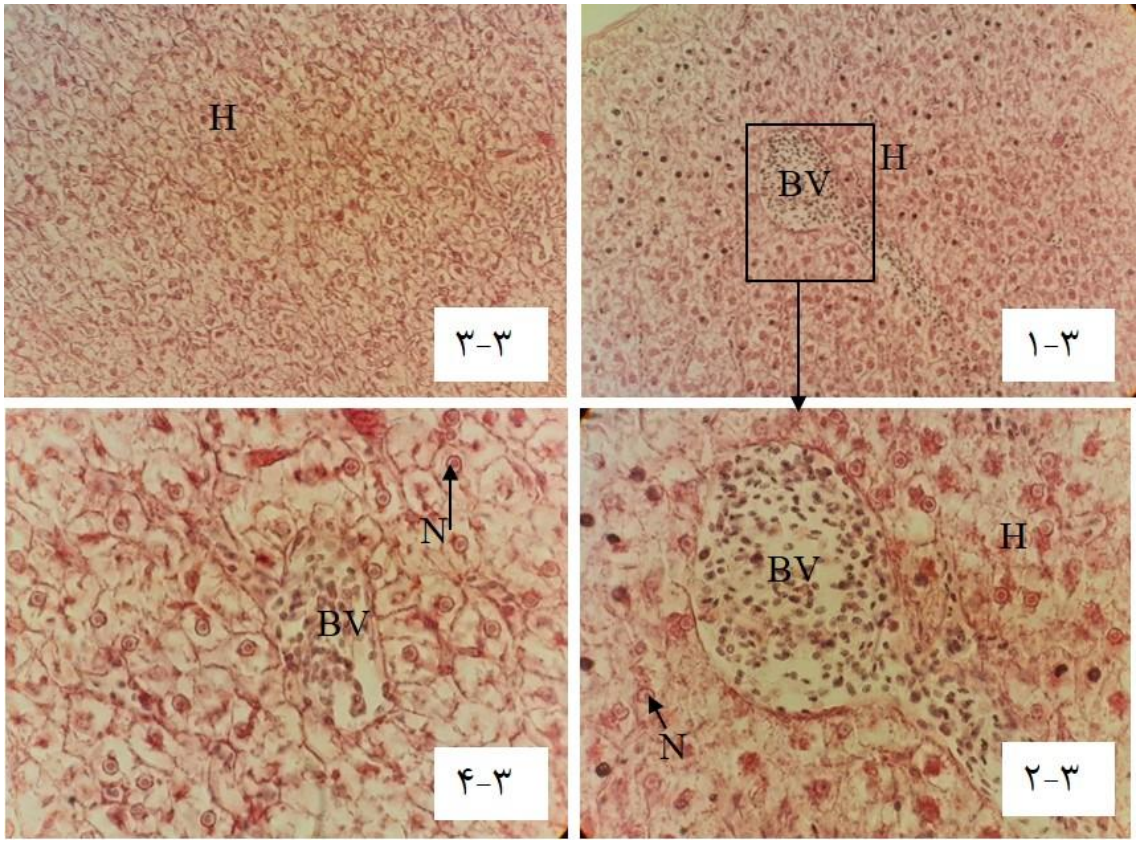


شکل ۲- تصاویر بافت شناسی دستگاه گوارش ماهی کپور معمولی گروه شاهد و تغذیه شده با عصاره هسته انگور.

اشکال ۲-۱ (شاهد) و ۲-۴ (تغذیه شده با عصاره هسته انگور) تصاویر برش بافتی از قسمت پایه ویلی‌ها، انتروسیت‌ها، لایه سروز، لایه ماهیچه‌ای، لایه زیر موکوس و موکوس در تصویر دیده می‌شوند.

اشکال ۲-۲ و ۲-۳ (شاهد) و ۲-۵ و ۲-۶ (تغذیه شده با عصاره هسته انگور) تصاویر برش بافتی از روده کپور معمولی، ویلی‌ها و سلول‌های گابلت دیده می شوند.

E، آنتروسیت؛ G، سلول گابلت؛ M، لایه ماهیچه‌ای؛ S، سروز؛ SM، زیر موکوس؛ V، ویلی.



شکل ۳- تصاویر بافت شناسی کبد ماهی کپور معمولی شاهد و تغذیه شده با عصاره هسته انگور.
اشکال ۳-۱ و ۳-۲ تصاویر برش بافتی کبد ماهی کپور معمولی در تیمار شاهد، مویرگ‌ها و هپاتوسیت‌ها با ساختار منظم و هسته مرکزی در سیتوپلاسم دیده می شوند. اشکال ۳-۳ و ۳-۴ تصاویر برش بافتی کبد ماهی کپور معمولی تغذیه شده با عصاره هسته انگور. مویرگ‌ها و هپاتوسیت‌ها با ساختار منظم دیده می‌شوند، H، هپاتوسیت؛ N، هسته؛ BV، رگ خونی.

نتایج مطالعات بافت شناسی کبد ماهی کپور معمولی در شکل ۳ آورده شده است. ساختار کبد در هر دو گروه نرمال بود و ضایعه پاتولوژیکی در گروه‌ها دیده نشد. نتایج مورفولوژیک بافت کبد (جدول ۲) نیز نشان داد، قطر هسته سلول‌های کبدی در گروه شاهد ۵/۸۷±۰/۰۶ میکرومتر و در ماهیان تغذیه شده با غذای حاوی عصاره هسته انگور ۵/۷۲±۰/۰۵ میکرومتر بود و تفاوت معنی‌دار ($p<0.5$) نداشتند. هم‌چنین قطر سلول‌های کبدی در ماهیان گروه شاهد ۲۳/۴۲±۰/۱۴ میکرومتر و در ماهیان تیمار ۲۴/۰۱±۰/۱۶ میکرومتر اندازه‌گیری شد که این تفاوت معنی‌دار بود.

جدول ۲- شاخص‌های اندازه‌گیری شده در بافت روده و کبد ماهی کپور معمولی در گروه شاهد و تغذیه شده با عصاره هسته انگور

	عرض ویلی (µ)	ارتفاع ویلی (µ)	فاصله بین دو ویلی مجاور در قسمت پایه‌ای	ارتفاع ویلی/ فاصله بین دو ویلی مجاور در قسمت پایه‌ای	تعداد سلول موکوسی (۱۰۰µ)	قطر هپاتوسیت (µ)	قطر هسته هپاتوسیت (µ)
شاهد	۷۸/۲۳±۱/۲۱	۴۱۷/۸۵±۱۲/۴۰	۲۵/۵۷±۰/۳۹	۱۶/۷۱±۰/۵۹	۴/۵۹±۰/۱۷	a۲۳/۴۲±۰/۱۴	۵/۸۷±۰/۰۶
تیمار	۸۰/۴۲±۱/۳۸	۴۲۶/۶۶±۱۲/۴۸	۲۴/۹۷±۰/۳۷	۱۷/۳۹±۰/۵۵	۴/۰۹±۰/۲۱	b۲۴/۰۱±۰/۱۶	۵/۷۲±۰/۰۵

حروف مختلف در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار مابین گروه‌هاست.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از عصاره گیاهان مختلف به عنوان مکمل‌های غذایی در جیره غذای آبزیان توسط محققان بررسی شده است (Bowyer *et al.*, 2012). از جمله اثرات این ترکیبات می‌توان به افزایش رشد متعاقب مصرف عصاره گیاهان اشاره نمود. اثرات افزایش رشد متعاقب مصرف عصاره دانه انگور در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان و کپور معمولی نیز در تحقیقات قبلی نشان داده شد (زمانی و معافی، ۱۳۹۶؛ Arslan *et al.*, 2018; Ahmadifar *et al.*, 2020; Mousavi *et al.*, 2020).

در کل، مکانیسم‌های متعددی برای افزایش رشد در گونه‌های ماهی وجود دارد. اولاً افزایش رشد ممکن است به دلیل کاهش میزان باکتری‌های بیماری‌زا و افزایش باکتری‌های مفید در روده ماهی رخ دهد. نتایج مطالعات پیشین در زمینه استفاده از عصاره دانه انگور نشان داده‌اند که عصاره هسته انگور در افزایش جمعیت میکروبی روده در انسان و جانوران موثر است (Yamakoshi *et al.*, 2001). افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی متعاقب استفاده از ترکیبات مختلف در جیره غذایی ماهی نیز از علل دیگر افزایش رشد است. در مطالعه حاضر بیش ترین میزات فعالیت آنزیم لیپاز و پروتئاز در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی عصاره هسته انگور اندازه‌گیری شد. هم‌چنین از میان آنزیم‌های گوارشی سنجش شده فقط لیپاز تفاوت معنی‌دار و مثبتی نسبت به گروه شاهد نشان داد. آنزیم‌های روده‌ای به عنوان مسئول گوارش نهایی لیپوپروتئین‌هایند. لیپاز عمدتا توسط پانکراس ترشح شده و نقش مهمی در تجزیه و گوارش تری‌آسیل‌گلیسرول‌ها دارد. در تحقیق حاضر فعالیت این آنزیم نسبت به ماهیان شاهد، افزایش معنی‌داری نشان داد. Bita و همکاران (۲۰۱۹) نیز اثر عصاره الکلی جلبک سارگاسوم (*Sargassum ilicifolium*) را بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی کفال خاکستری مطالعه کردند (*Mugil cephalus*) و نتایج آنها نشان داد بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های پروتئاز، آمیلاز و لیپاز در گروه تغذیه شده با ۱۵ گرم در کیلوگرم جیره بدست آمد. از دیگر مطالعات انجام شده می‌توان به مطالعات انجام شده توسط Fereidouni و همکارن (۲۰۱۵) در زمینه تاثیر عصاره سیر (*Allium sativum*) بر آنزیم‌های گوارشی لارو ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) اشاره کنیم. این محققین نشان دادند بیشترین میزان سطح آمیلاز و لیپاز در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۳ درصد عصاره سیر بوده است. Akbari و همکاران (۲۰۱۹) نیز اثرسطوح مختلف عصاره الکلی گیاه سالیکورنیا (Salicornia sp) بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون و آنزیم‌های گوارشی ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) مطالعه کردند و نتایج آنها نشان داد میزان آمیلاز و پروتئاز در ماهیان تغذیه شده با عصاره این گیاه تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد داشتند. افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی را می‌توان به نقش آلکالوئیدها، ترپنوئیدها و ساپونین‌های موجود در ترکیبات گیاهی در تحریک ترشح آنزیم‌های گوارشی دانست (Harikrishnan *et al.*, 2011).

دلیل دیگر در افزایش رشد گونه‌های مختلف ماهیان بهبود فعالیت و ساختار روده و متعاقب آن افزایش قابلیت جذب در ماهی می باشد. روده توسط سلول‌های پوششی پوشیده شده است، این لایه سلولی محافظی در برابر محیط بیرونی بوده و به صورت انتخابی برای جذب مواد غذایی، الکترولیت‌ها و آب عمل می‌کند در حالی که نسبت به ورود پاتوژن‌ها و آنتی‌ژن‌ها مقاوم است. اپی تلیوم پوششی هم‌چنین یک میانجی در پاسخ‌های ایمنی بوده و در شناسایی پاتوژن‌ها از باکتری‌های همزیست دستگاه گوارش عمل می‌کند (Shahriari Moghadam and Ahmadifar, 2018). مطالعات کمی در زمینه تاثیر پلی فنل‌های خوراکی روی بافت‌شناسی دستگاه گوارش انجام شده است. نتایج مطالعات پیشین نشان داده‌اند افزایش ارتفاع ویلی‌ها موجب افزایش عملکرد هضمی و جذبی روده و در نتیجه افزایش رشد خواهد شد (Zijlstra *et al.*, 1996). در مطالعه حاضر روی تاثیر عصاره هسته انگور بر بافت روده کپور معمولی، ضایعه پاتولوژیکی متعاقب مصرف این

مکمل مشاهده نشد، اما افزایش غیرمعنی‌داری در میزان ارتفاع ویلی روده دیده شد. مطالعات نشان داده‌اند ارتفاع بیشتر ویلی و عرض کمتر فاصله بین دو ویلی مجاور در قسمت پایه‌ای منجر به جذب بهتر مواد مغذی و در نتیجه رشد بهتر خواهد شد (Viveros *et al.*, 2011).

در مطالعه حاضر بررسی بافت کبد در ماهیان تیمار شده و ماهیان شاهد نشان داد که ساختار منظم و بدون ضایعه پاتولوژیکی در هر دو گروه وجود دارد، اما قطر سلول‌های کبدی در ماهیان تیمار شده در مقایسه با ماهیان شاهد کمی بزرگتر بود، با این وجود اختلاف معنی داری دیده نشد.دیده شد. Sotoudeh و همکاران (۲۰۱۶) بیان کرده‌اند مطالعه تغییرات بافت شناسی کبد اطلاعات ارزشمندی در زمینه سوخت و ساز بدن و هم‌چنین کیفیت جیره ماهیان پرورشی در اختیار قرار می‌دهد. در کل، وجود هپاتوسیت‌های متورم نشان دهنده تغییرات متابولیکی در کبد است (Kaczorek *et al.* 2017). با توجه به عدم مشاهده تغییرات بافت شناسی مشخص در بافت کبد و از طرف دیگر تغییرات متابولیکی در کبد به نظر می‌رسد که استفاده از عصاره هسته انگور ممکن است سبب افزایش سوخت و ساز و فعالیت بالاتر کبد در ماهی گردد. البته بررسی آنزیم‌های کبدی و میزان بیان ژن‌های مرتبط با این بافت نیز اطلاعات بیشتری را در این خصوص فراهم می‌آورد.

به طورکلی با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان بیان نمود که اضافه کردن عصاره انگور سیاه به جیره غذایی ماهی کپور معمولی روش ارزشمندی برای بهبود فعالیت آنزیم‌های گوارشی و بافت شناسی روده و کبد این ماهی است. هم‌چنین از آنجایی که در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی عصاره انگور سیاه رشد ماهیان نسبت به گروه شاهد به صورت معنی داری بیشتر بود، نتایج این تحقیق می‌تواند مورد استفاده پرورش دهندگان گیرد.

تشکر و قدردانی

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

۵. منابع

References

Adineh, H., Harsij, M., 2019. Effect of different levels of biofloc on water quality, growth performance and survival of *Litopenaeus vannamei* post larvae. *Journal of Veterinary Research* 73(4), 393-401. (In Persian)

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.

Asaduzzaman, M., Wahab, M.A., Verdegem, M.C.J., Huque, S., Salam, M.A., Azim, M.E., 2008. C/N ratio control and substrate addition for periphyton development jointly enhance freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* production in ponds. *Aquaculture* 280, 117–123.

Avnimelech, Y., 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture* 264(1-4), 140-147.

Awad, E., Awaad, A. 2017. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. *Fish and shellfish immunology* 67, 40-54.

Bairagi, A., Ghosh, K., Sen, S.K., Ray, A.K., 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. Excretion of juvenile striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus*. *Aquaculture Research* 1-8.

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

Bashir, M., Uzair, M., Chaudhry, B.A., 2015. A review of phytochemical and biological studies on conocarpus *erectus combretaceae*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Research* 1(1), 1-8.

Bett, C., Vinatea, L., 2009. Combined Effect of body weight, temperature and salinity on shrimp *Litopenaeus vannamei* oxygen consumption rate. *Brazilian Journal of Ocenography* 57(4), 305-314.

Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. – Anal. *Biochem* 72, 248-254.

Cheeke, P.R., 2000. Actual and potential applications of *yucca schidigera* and *quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. *Proceedings american society of animal science, Proceedings* 45, 241-254.

Cheeke, P.R., Piacente, S., Oleszek, W., 2006. Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of *Yucca schidigera*: a review. *Journal of Inflammation* 3(1), 6.

Cho, S.H., 2012. Onion powder in diet of the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*): effects on the growth, body composition and lysozyme activity. *Journal of the World Aquaculture Society* 43(1), 30-38.

Coccia, E., Varricchio, E., Paolucci, M., 2011. Digestive Enzymes in the Crayfish *Cherax albidus*: Polymorphism and partial characterization. *International Journal of Zoology* 1–9, 310-371.

Ekasari, J., Crab, R., Verstraete, W., 2010 Primary nutritional content of bio-flocs cultured with different organic carbon sources and salinity. *Hayati Journal of Biosciences* 17(3), 125-130.

Emerenciano, M., Ballester, E.L.C., Cavalli, R.O., Wasielesky, W., 2011. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). *Aquaculture Research* 43(-), 447-457.

Fernandez Gimenez, A.V., GarciaCarren, F.L., Navarrete Del Toro, M.A., Fenucci, J.L., 2001. Digestive proteinases of red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapada, Penaeoidea): Partial characterization and relationship with molting. *Comparative Biochemistry and Physiology (B)* 130(-), 331–338.

Haghighati, F., Jafari, S., 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. (In Persian)

Hajian, M., Sourinejad, I., Dashtian Nasab, A., Naji, A 2017. Effect of dietary supplementation of enriched Artemia with ethanolic leaf extract of grey mangrove Avicennia marina on growth performance, survival and stress resistance in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) postlarvae. *Aquatic Physiology and Biotechnology* 5 (3), 75-94. (In Persian)

Hernández-Acosta, M., Gutiérrez-Salazar, G.J., Guzmán-Sáenz, F.M., Aguirre-Guzmán, G., Alvarez-González, C.A., López-Acevedo, E.A., Fitzsimmons, K., 2016. The effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* on growth performance and enzymes activities of juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* cultured in low-salinity water. *Latin American Journal of Aquatic Research* 44(1), 121-128.

Khanjani, M., Sajjadi, M., Alizadeh, M., Sourinejad, I., 2015. Effect of different feeding levels on water quality, growth performance and survival of western white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) post larvae with application of biofloc technology. *Iranian Scientific Fisheries Journal* 24 (2), 13-27. (In Persian)

Kuhn, D.D., Lawrence, A.L., Boardman, G.D., Patnaik, S., Marsh, L., Flick Jr, G.J., 2010. Evaluation of two types of bioflocs derived from biological treatment of fish effluent as feed ingredients for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 303(1-4), 28-33.

Liu, L., Hu, Z., Dai, X., Avnimelech, Y., 2014. Effects of addition of maize starch on the yield, water quality and formation of bioflocs in an integrated shrimp culture system. *Aquaculture* 418–419, 79–86.

Lopez-Lopez, S., Nolasco, H., Vega-Villasante, F., 2003. Characterization of digestive gland esterase–lipase activity of juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology (B)* 135, 337–347.

Luo, G., Liu, Z., Shao, L., Tan, H., 2019. Using poly-β-hydroxybutyric as an additional carbohydrate for biofloc in a shrimp *Litopenaeus vannamei* bioflocs nursery system with brackish water. *Aquaculture*.

Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., Sasal, P. 2014. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture* 433(20), 50-61.

Santacruz-Reyes, R.A., Chien, Y.H., 2012. The potential of *Yucca schidigera* extract to reduce the ammonia pollution from shrimp farming. *Bioresource technology* 113, 311-314.

Schneider, O., Sereti, V., Eding, E.H., Verreth, J.A.J., 2005. Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. *Aquaculture Engineering* 32(-), 379–401.

Silva, N., 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.

Syahidah, A., Saad, C.R., Daud, H.M., Abdelhadi, Y.M. 2015. Status and potential of herbal applications in aquaculture: A review. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 14(1), 27-44.

Van Hai, N. 2015. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: a review. *Aquaculture* 446, 88-96.

Wang, Q., Meng, X., Zhu, L., Xu, Y., Cui, W., He, X., Zhu, R., 2019. A polysaccharide found in *Paulownia fortunei* flowers can enhance cellular and humoral immunity in chickens. *International journal of biological macromolecules* 213-219.

Wang, Y., McAllister, T.A., Yanke, L.J., Xu, Z.J., Cheeke, P.R., Cheng, K.J., 2000. In vitro effects of steroidal saponins from Yucca schidigera extract on rumen microbial protein synthesis and rumen fermentation. *Journal of the science of food and agriculture* 80, 2122-2214.

Wasielesky Jr, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L., 2006 Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258(-), 396–403.

Xu, W.J., Morris, T.C., Samocha, T.M., 2016. Effects of C/N ratio on biofloc development, water quality, and performance of *Litopenaeus vannamei* juveniles in a biofloc-based, high-density, zero-exchange, outdoor tank system. *Aquaculture* 453(-), 169-175.

Xu, W.J., Pan, L.Q., 2012. Effects of bioflocs on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating C/N ratio in feed. *Aquaculture* 356(-), 147-152.

Yang, Q.H., Tan, B.P., Dong, X.H., Chi, S.Y., Liu, H.Y., 2015. Effects of different levels of *Yucca schidigera* extract on the growth and nonspecific immunity of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and on culture water quality. *Aquaculture* 439(-), 39-44.

Zacarias, S., Schveitzer, R., Arantes, R., Galasso, H., Pinheiro, I., Espirito Santo, C., Vinatea, L., 2019. Effect of different concentrations of potassium and magnesium on performance of *Litopenaeus vannamei* postlarvae reared in low-salinity water and a biofloc system. *Journal of Applied Aquaculture* 31(1), 85-96.