"مقاله پژوهشی"

اثر تجویز رژیم غذایی اسید سیتریک و آب لیموترش (*Citrus limon*) بر عملکرد رشد، پاسخ‌های ایمنی سرم و مخاط، بیان ژن‌های مرتبط با رشد (GH, IGF-1) و ایمنی (IL-1, Lyz) در کپور معمولی

زهرا روحی[1]*، محمدرضا ایمان‌پور[1]، رقیه صفری[1]

۱- گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۲/۲۳

چکیده

این مطالعه برای ارزیابی اثر تجویز رژیم غذایی اسید سیتریک و آب لیموترش (*Citrus limon*) بر عملکرد رشد، پاسخ‌های ایمنی سرم و مخاط، بیان ژن‌های مرتبط با رشد (GH، IGF-I) و ایمنی (Lyz، IL-1) در کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) انجام شد. در این مطالعه، ۳۰۰ عدد ماهی کپور معمولی (میانگین وزنی ۰/۴±۱۵/۰ گرم) به طور تصادفی بین پانزده مخزن نگهداری فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری توزیع شدند. ماهی‌ها در پنج گروه (هر کدام با سه تکرار) حاوی ۰/۵ و ۱ درصد اسید سیتریک، ۰/۵ و ۱ درصد آب لیموترش به ازای هر کیلوگرم غذا و همچنین کنترل با رژیم غذایی پایه و بدون افزودنی به مدت هشت هفته تغذیه شدند. نتایج بدست آمده نشان داد که ماهیانی که با رژیم غذایی حاوی اسید سیتریک تغذیه شدند به طور معنی‌داری شاخص‌های رشد بالاتری در مقایسه با گروه شاهد داشتند (p<۰/۰۵). همچنین، هنگامی که رژیم غذایی با ۱ درصد اسید سیتریک همراه بود، نتایج افزایش معنی‌داری در پاسخ‌های ایمنی ذاتی از جمله ایمونوگلوبولین و لیزوزیم سرم و موکوس نشان داد (p<۰/۰۵). مقادیر آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز و گلوتاتیون S-ترانسفراز کاهش معنی‌داری در ماهیان تغذیه شده با مواد افزودنی نشان داند، در حالی که فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و لاکتات دهیدروژناز در ماهیان تغذیه شده با رژیم غذایی حاوی ۱ درصد اسید سیتریک کاهش معنی‌داری داشتند (p<۰/۰۵). در مورد بیان ژن‌ها، نتایج نشان داد که ژن‌های رشد (GH، IGF-I) و ایمنی (Lyz، IL-1) به طور قابل توجهی تحت تأثیر مکمل‌های غذایی قرارگرفتند، که نشان می دهد بیان ژن‌ها در مقایسه با گروه کنترل افزایش داشته است (p<۰/۰۵). نتایج این تحقیق نشان داد که تجویز غذای حاوی اسید سیتریک و آب لیموترش، به ویژه ۱ درصد اسید سیتریک، سبب بهبود رشد و برخی شاخص‌های ایمنی در کپور معمولی شدند.

کلمات کلیدی: اسید سیتریک، کپور معمولی، رشد، بیان ژن، پاسخ ایمنی، آب لیمو

* عهده‌دار مکاتبات: zahra.roohi2022@gmail.comr

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-09-15]

مقدمه

یکی از راه‌های پیشگیری از بیماری‌های رایج در مزارع پرورشی ماهیان، استفاده از محرک‌های سیستم ایمنی می‌باشد (ایمان‌پور و روحی، ۱۳۹۴). در بین مکمل‌های غذایی، اسیدهای آلی جایگزین مناسبی برای تحریک سیستم ایمنی معرفی شدند. اسیدهای آلی بین یک تا هفت اتم کربن داشته و طی فرآیند تخمیر میکروبی تولید می‌شوند. در متابولیسم موجودات، اسیدهای آلی می‌توانند فعالیت آنزیم‌های گوارشی را تحت تاثیر قرار داده و به‌عنوان منبع مناسب انرژی، از طریق چرخه اسید سیتریک یا چرخه اسید کربوکسیلیک مورد مصرف قرارگیرند (Silva *et al.*, 2014).

لیموترش، یک میوه یا نام علمی *Citrus limon* بوده که در جنوب ایران در مقادیر انبوه کشت می‌گردد. لیموترش به دلیل دارابودن میزان زیادی از اسیدهای آلی به ویژه اسیدسیتریک و ایجاد شرایط اسیدی، در درمان بسیاری از عفونت‌ها به‌کار می‌رود (رفیعی و رمضانی، ۱۳۹۱). علاوه بر این، لیموترش منبع بسیار غنی از ویتامین ث بوده که برای حفظ فرآیندهای فیزیولوژیکی از قبیل: رشد، ایمنی و تولید مثل جاندار مورد نیاز می‌باشد (Dabrowski and Ciereszko, 2001). همچنین، این میوه به عنوان یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های شناخته شده می‌باشد که متابولیت‌های پروکسیدی تولید شده در سلول‌ها را سم‌زدایی کرده و در نتیجه ساختار و فرآیندهای سلولی حساس در برابر اکسیداسیون را محافظت می‌کند (رفیعی و رمضانی، ۱۳۹۱؛ Fracalossi *et al.*, 2001). محققان عملکرد مثبت جیره‌های حاوی اسیدهای آلی را به عواملی نظیر: افزایش کارایی آنزیم‌های گوارشی (Kotzamanis *et al.*, 2007)، افزایش میزان هضم پذیری پروتئین و چربی (Luckstadt, 2008)، افزایش میزان اتولیز مواد معدنی (Sugiura, 1998) و افزایش تجمع باکتری‌های مفید در روده (Zhou *et al.*, 2008) نسبت داده‌اند که در آبزیان نیز ثابت گردیده است (جافرنوده و همکاران، ۱۳۹۹).

اسید سیتریک یک اسید ضعیف آلی است که در لیموترش و پرتقال وجود دارد. دارا بودن خصوصیت‌هایی مانند: حلالیت بالا در آب، ترش کنندگی و ایجاد طعم دلپذیر، خواص بافری و غیر سمی بودن آن در حجم زیاد، باعث افزایش کاربرد وسیع آن شده است که حدود ۷۰ درصد از این اسید و نمک‌هایش در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Lianou *et al.*, 2012).

کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) یکی از مهم‌ترین ماهیان پرورشی ایران و جهان است و به دلیل مقاومت زیاد در مقابل نوسان‌های محیطی و استفاده از محدوده وسیعی از مواد غذایی قابل دسترس در تمام استان‌های دارای صنعت آبزی‌پروری ماهیان گرمابی پرورش داده می‌شود (علیشاهی و همکاران، ۱۳۹۰). کپور معمولی جزء مهم‌ترین ماهیان اقتصادی دریای خزر می‌باشد (عبدلی و نادری، ۱۳۸۷) که ذخایر طبیعی آن طی سال‌های اخیر به دلایل متعددی رو به کاهش نهاده است. از مهم‌ترین مسائل در پرورش به‌صورت مصنوعی توجه به امر تغذیه می‌باشد، لذا پرورش‌دهنده‌ای موفق خواهد بود که با اعمال مدیریت صحیح و با حداقل هزینه ممکن یک جیره مناسب غذایی تهیه و تجویز نماید (قناعت‌پرست و همکاران، ۱۳۸۰). با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در خصوص اثر مقایسه‌ای سطوح مختلف آب لیموترش و اسید سیتریک (یکی از

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-09-15]

اسیدهای آلی موجود در لیموترش) در غذای آبزیان انجام نگرفته است؛ از این رو، هدف از این مطالعه بررسی اثر جیره‌های حاوی اسید سیتریک و آب لیموترش (*Citrus limon*) بر عملکرد رشد، شاخص‌های ایمنی سرم و موکوس و بیان ژن‌های مرتبط با رشد (IGF I – GH) و ایمنی (IL-1– Lyz) در ماهی کپور معمولی بود.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش تعداد ۳۰۰ قطعه ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی ۱۵±۰/۴ گرم از یکی از مراکز تکثیر و پرورش ماهیان گرمابی بخش خصوصی شهرستان گرگان واقع در استان گلستان تهیه و به سالن آبزی‌پروری شهید ناصر فضلی دانشکده شیلات و محیط زیست در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انتقال یافتند. این تحقیق در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در چهار تیمار و یک گروه شاهد (هر کدام با ۳ تکرار) انجام شد. تیمارها شامل؛ جیره فاقد افزودنی (گروه شاهد)، جیره حاوی اسید سیتریک ۰/۵ درصد (تیمار ۱)، جیره حاوی اسید سیتریک ۱ درصد (تیمار ۲)، جیره حاوی ۰/۵ درصد آب لیموترش (تیمار ۳) و جیره حاوی ۱ درصد آب لیموترش (تیمار ۴) بودند. ماهیان روزانه سه نوبت به میزان ۵ درصد وزن بدن در ساعات ۸، ۱۲ و ۱۶ به مدت ۸ هفته تغذیه شدند (Baba *et al.*, 2016). به منظور تهیه جیره‌های مکمل مورد نظر، ابتدا غذا با ترازوی دیجیتال وزن شده و سپس به نسبت وزن غذا، غلظت‌های مختلف اسید سیتریک (در حالت مایع) و آب لیموترش بر روی غذا اسپری می‌شد. همچنین، از ژلاتین به عنوان پوشش غذا استفاده شد. سپس، جیره‌های آماده شده در دمای محیط و با رعایت نکات بهداشتی خشک و تا زمان مصرف در یخچال و در درمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (واحدی، ۱۳۹۵). در این آزمایش از پلت های تجاری مخصوص کپورماهیان و در اندازه مناسب برای بچه ماهیان کپورمعمولی استفاده شد. ترکیب شیمیایی جیره در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: ترکیب شیمیایی جیره غذایی

ترکیبات	درصد
پروتئین	۲۸
چربی	۱۱/۴
رطوبت	۸
خاکستر	۶

برای آگاهی از عملکرد جیره‌های غذایی و چگونگی رشد ماهیان، هر دو هفته یکبار عملیات زیست‌سنجی انجام شد. همچنین، در انتهای دوره، پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تغذیه و اطمینان از خالی بودن لوله گوارش، شاخص‌های رشد و تغذیه اندازه‌گیری شد. برای این منظور، وزن ماهیان با استفاده از ترازو (با دقت ۱ میلی‌گرم) و طول آن‌ها با استفاده از خط‌کش (با دقت ۱ میلی‌متر) اندازه‌گیری شد. شاخص‌های رشد تعیین‌شده عبارتند از (Ai *et al.*, 2006; Hevrøy *et al.*, 2005; Tacon, 1990):

وزن / ((گرم) وزن اولیه بدن – (گرم) وزن نهایی بدن)] = (%) درصد افزایش وزن بدن
۱۰۰ × [(گرم) اولیه بدن

لگاریتم طبیعی – لگاریتم طبیعی وزن نهایی بدن)] = (روز/درصد وزنی) نرخ رشد ویژه
۱۰۰ × [طول دوره پرورش بر حسب روز / (وزن اولیه بدن

[(گرم) افزایش وزن / (گرم) مقدار غذای مصرف شده] = ضریب تبدیل غذایی
۱۰۰ × (تعداداولیه ماهی/ تعداد نهایی ماهی) = (درصد) میزان بازماندگی

در انتهای آزمایش، جهت بررسی میزان آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، لاکتات دهیدروژناز (LDH)،گلوتاتیون اس ترانسفراز (GST)،

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-09-15]

آلکالین فسفاتاز (ALP)، ایمنوگلوبولین کل (Igm) و لیزوزیم (Lyz) سرم خون، تعداد ۳ قطعه ماهی از هر تانک (۹ قطعه ماهی از هر تیمار) به صورت تصادفی صید و پس از بی‌هوشی ماهیان با استفاده از عصاره‌ی گل میخک (۵۰ میلی‌گرم در لیتر)، خون‌گیری از ساقه دمی با سرنگ صورت گرفت. سپس سرم خون با انجام سانتریفیوژ (۵۰۰۰ دور، ۱۰ دقیقه) جداسازی و تا زمان استفاده در فریزر و در دمای۸۰- درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شد. سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون با استفاده از کیت‌های تجاری پارس آزمون و براساس دستور العمل شرکت سازنده انجام شد. همچنین سنجش گلوتاتیون اس- ترانسفراز بر اساس روش Habig و همکاران (۱۹۷۴) انجام شد.

به‌منظور بررسی ایمنوگلوبولین و لیزوزیم موکوس نیز، از ماهیان موکوس گرفته شد، بدین صورت که ابتدا ماهیان در پک‌های پلاستیکی حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سدیم کلرید ۵۰ میلی‌مولار قرار داده شدند (Ross *et al.*, 2000). سپس، جهت ترشح موکوس بلافاصله و در مدت زمان ۳ دقیقه کیسه‌ها به آرامی تکان داده شدند. موکوس‌های جمع‌آوری‌شده به تیوب‌های استریل منتقل شده و توسط دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. نمونه‌های سانتریفیوژ شده جهت بررسی‌های مورد نظر به میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و تا زمان انجام آزمایش درون فریزر و در دمای۸۰-درجه سانتی‌گراد ذخیره گردیدند (Subramanian *et al.*, 2007).

به منظور بررسی بیان ژن‌های مرتبط با رشد و ایمنی در پایان آزمایش، از هر تانک پرورشی ۳ قطعه ماهی صید و تحت شرایط استریل از کبد، مغز و کلیه آن‌ها نمونه‌برداری شد. نمونه‌های گرفته شده از ماهی بلافاصله پس از نمونه‌برداری، در ازت مایع (با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) فریز گردیدند؛ سپس در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند. در این پژوهش، استخراج RNA به روش Awad و همکاران (۲۰۱۱) و با استفاده از ماده بیوزول (Biozol) هضم کننده انجام شد. همچنین سنتز cDNA با استفاده از روش پیشنهادی کیت شرکت فرمنتاز (Fermentase- France) انجام شد که در این روش با استفاده از ۵ میکرولیتر RNA تیمار شده با DNase I غلظت ۵۰۰ نانوگرم، ۱ میکرولیتر آغازگر الیگو و ۵ میکرولیتر آب DEPC انجام شد. واکنش PCR کمی بعد از بهینه‌سازی دما و مواد مصرفی، در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از پرایمر qPCR طراحی شده انجام شد. داده‌های به‌دست آمده جهت تعیین بیان نسبی ژن‌های مورد نظر با استفده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ آنالیز شد (Pfaffl *et al.*, 2002).

در پژوهش حاضر، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگراف-اسمیرنوف مورد سنجش قرارگرفت. از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه برای مقایسه میانگین بین تیمارها و از آزمون دانکن برای بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها (در سطح ۵ درصد) با نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. تمامی نمودارها در برنامه Excel نسخه ۲۰۱۰ رسم گردید.

نتایج

نتایج نشان داد که استفاده از اسید سیتریک در سطوح ۰/۵ و ۱ درصد جیره در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری سبب بیشترین افزایش وزن نهایی

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-09-15]

گردید (p<۰/۰۵). همچنین، بیشترین و کمترین درصد نرخ رشد ویژه به ترتیب در تیمارهای اسید سیتریک ۱ درصد و در گروه شاهد به ثبت رسید. کمترین میزان وزن نهایی و افزایش وزن، در گروه شاهد مشاهده گردید، که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵). در بازماندگی تمامی تیمارها با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵).

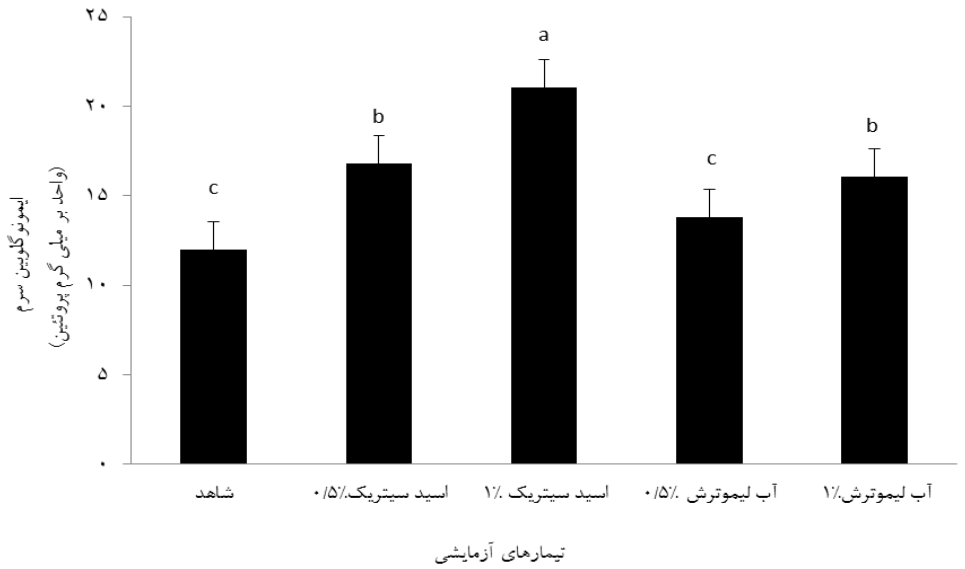
جدول ۲: برخی از شاخص‌های رشد ماهیان کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف اسید سیتریک و آب لیموترش

شاخص‌های رشد	شاهد	اسید سیتریک		آب لیمو ترش	
		۰/۵ درصد	۱ درصد	۰/۵ درصد	۱ درصد
وزن اولیه (گرم)	۱۵/۴۶ ± ۰/ ۳۲^{a}	۱۵/۵۲ ± ۰/۰۲^{a}	۱۴/۹۶ ± ۰/ ۱۸^{a}	۱۵/۱۲ ± ۰/۰۵^{a}	۱۵/۰۶ ± ۰/ ۱۱^{a}
وزن نهایی (گرم)	۲۲/۵۴ ± ۰/۶۰^{d}	۲۹/۵۶ ± ۰/۰۱^{b}	۳۳/۵۲ ± ۰/۴۱^{a}	۲۶/۰۶ ± ۰/۰۲^{c}	۲۷/۸۱ ± ۰/۰۴^{c}
طول اولیه (سانتی‌متر)	۹/۱۴ ± ۰/۴۸^{a}	۹/۲۱ ± ۰/۸۱^{a}	۹/۳۵ ± ۰/۷۶^{a}	۹/۳۸ ± ۰/۳۷^{a}	۹/۵۴ ± ۰/۹۶^{a}
طول نهایی (سانتی‌متر)	۱۰/۴۷ ± ۰/۱۲^{c}	۱۱/۲۸ ± ۰/۴۴^{b}	۱۲/۰۸ ± ۰/۳۰^{a}	۱۱/۲۷ ± ۰/۱۰^{b}	۱۱/۸۶ ± ۰/۵۰^{b}
درصد افزایش وزن	۱/۶۲ ± ۰/ ۰۲^{d}	۲/۰۵ ± ۰/۰۱^{b}	۲/۵۸ ± ۰/۰۱^{a}	۱/۸۲ ± ۰/۰۳^{c}	۱/۸۵ ± ۰/۰۲^{c}
نرخ رشد ویژه (درصد وزنی / روز)	۰/۲۸ ± ۰/ ۰۵^{d}	۰/۴۶ ± ۰/۰۲^{b}	۰/۵۶ ± ۰/۰۴^{a}	۰/۳۶ ± ۰/۰۳^{c}	۰/۳۸ ± ۰/۰۲^{c}
ضریب تبدیل غذایی	۲/۹۱ ± ۰/ ۰۲^{a}	۲/۵۳ ± ۰/۰۵^{c}	۲/۴۸ ± ۰/۰۳^{d}	۲/۶۴ ± ۰/۰۳^{b}	±۶۵/۲ ۰/۰۴^{b}
بازماندگی (درصد)	۹۷/۶۷ ± ۳/ ۲۵^{a}	۹۸/۸۵ ± ۲/۹۱^{a}	۹۶/۸۲ ± ۳/۳۵^{a}	۹۷/۳۳ ± ۲/۸۳^{a}	۹۶/۶۷ ± ۲/۴۵^{a}

*حروف غیرهمسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵). اعداد میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد می‌باشند.

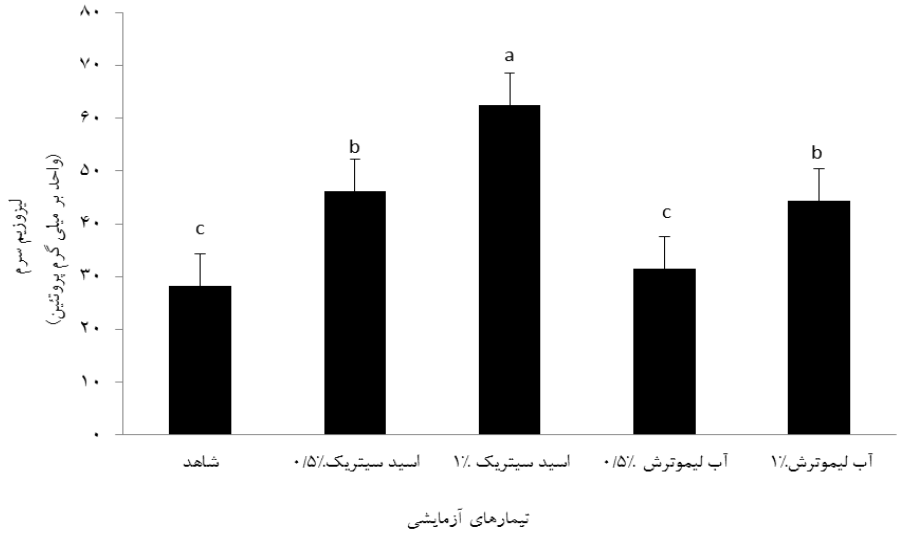
شاخص‌های ایمنی سرم: نتایج به‌دست آمده نشان داد که اسید سیتریک تاثیر مثبتی بر میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم (الف) و ایمنوگلوبولین (ب) سرم خون ماهیان کپور معمولی داشت؛ به طوری که افزایش غلظت اسید سیتریک جیره سبب افزایش معنی‌دار این دو شاخص در مقایسه با گروه شاهد گردید (p<۰/۵). اما، در تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی آب لیموترش به میزان ٪ ۰/۵ این اختلاف در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵). با توجه به نتایج میزان فعالیت آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز در جیره حاوی ۰/۵ درصد اسیدستریک در مقایسه با سایر تیماهای آزمایشی کاهش معنی‌دار داشت (p<۰/۵) (شکل‌های ۱ و ۲). همچنین، میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز نیز در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی آب لیموترش به میزان یک درصد جیره در مقایسه با سایر تیمارها و گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش‌یافت (p<۰/۰۵). تیمار تغذیه شده با جیره حاوی اسیدسیتریک به میزان ۱ درصد به طور معنی‌داری سبب کاهش فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز در مقایسه با گروه شاهد شد (p<۰/۰۵). همچنین کمترین میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی اسید سیتریک در مقایسه با گروه شاهد و سایر تیمارها مشاهده شد (p<۰/۰۵) (جدول ۳).

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-09-15]



شکل ۱: فعالیت ایمنوگلوبولین کل سرم در ماهیان کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف اسید سیتریک و آب لیموترش

حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p<$ ۰/۰۵). عداد میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد می‌باشند.



شکل ۲: فعالیت لیزوزیم سرم در ماهیان کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف اسید سیتریک و آب لیموترش

حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p<$۰/۰۵). عداد میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد می‌باشند.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-09-15]

جدول ۳: برخی از شاخص‌های ایمنی سرم خون در ماهیان کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف اسید سیتریک و آب لیموترش

شاخص‌های ایمنی سرم	شاهد	اسید سیتریک		آب لیمو ترش	
		۰/۵ درصد	۱ درصد	۰/۵ درصد	۱ درصد
ALT (واحد بر لیتر)	۱۱/۶۰ ± ۰/۵۱[a]	۵/۶۱ ± ۰/۵۷[c]	۸/۹۴ ± ۰/ ۶۶[b]	۷/۹۴ ± ۰/۹۸[b]	۸/۶۶ ± ۰/ ۴۷[b]
ALP (واحد بر لیتر)	۳۳/۰۸ ± ۳/۷۲[b]	۳۴/۳۴ ± ۱/۷۹[b]	۲۵/۴۴ ± ۱/۵۷[c]	۳۳/۶۲ ± ۱/۷۱[b]	۴۴/۴۳ ± ۲/۳۱[a]
GST (نانومول/دقیقه/میلی گرم پروتئین)	۶۶/۲۲ ± ۷/۸۰[a]	۴۲/۵۴ ± ۳/۷۸[b]	۲۴/۵۳ ± ۲/۷۸[c]	۴۷/۵۰ ± ۵/۲۰[b]	۴۵/۸۰ ± ۳/۰۶[b]
LDH (واحد بر لیتر)	۱۳۵۲/۰۰ ± ۱۷/۷۵[b]	۱۳۴۳/۸۰ ± ۱۵/۶۱[b]	۱۱۰۹/۷۰ ± ۱۱/۲۱[c]	۱۳۵۴/۹۶ ± ۲۱/۶۵[b]	۱۵۸۲/۴۰ ± ۱۶/۲۲[a]

*حروف غیرهمسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵). اعداد میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد می‌باشند.

شاخص‌های ایمنی موکوس: بر اساس نتایج جدول ۴، میزان ایمنوگلوبولین و فعالیت لیزوزیم موکوس در تمامی تیمارها در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵). به طوری که، در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی اسید سیتریک به میزان ۱ درصد بیشترین افزایش در میزان ایمنوگلوبولین و فعالیت لیزوزیم موکوس مشاهده شد که با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشت (p<۰/۰۵).

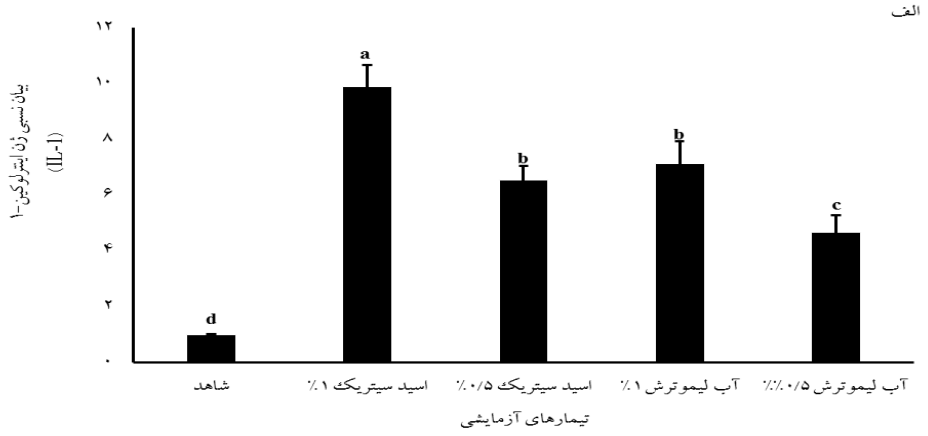
جدول ۴: برخی از شاخص‌های ایمنی موکوس در ماهیان کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف اسید سیتریک و آب لیموترش

شاخص‌های ایمنی موکوس	شاهد	اسید سیتریک		آب لیمو ترش	
		۰/۵ درصد	۱ درصد	۰/۵ درصد	۱ درصد
لیزوزیم (واحد بر میلی گرم پروتئین)	۱۲/۸۸ ± ۰/۱۱[d]	۲۸/۰۰ ± ۱/۲۴[a]	۲۸/۹۹ ± ۰/ ۹۱[a]	۱۶/۸۳ ± ۰/۳۵[c]	۸/۶۶ ± ۰/ ۴۷[b]
ایمنوگلوبولین (واحد بر میلی گرم پروتئین)	۳/۱۰ ±۰/۰۳[d]	۳/۱۸ ± ۰/۳۶[b]	۸/۸۴ ± ۰/۱۴[a]	۴/۶۹ ± ۰/۱۲[c]	۶/۴۸ ± ۰/۲۳[b]

*حروف غیرهمسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵). اعداد میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد می‌باشند.

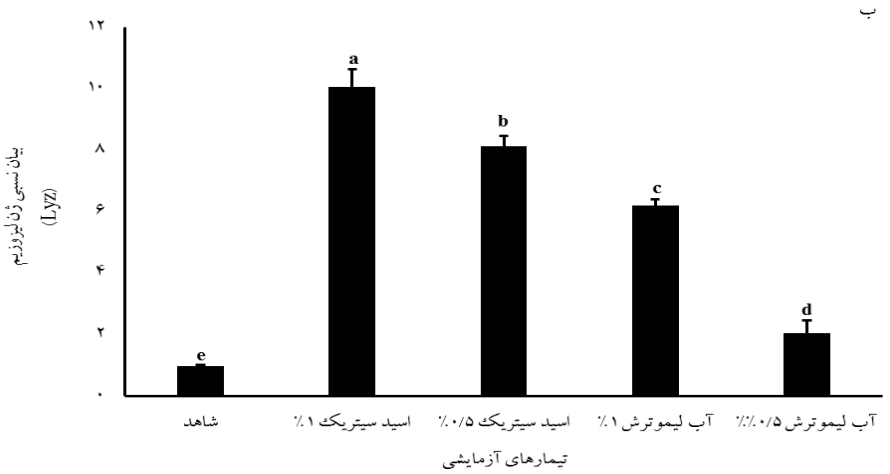
بیان نسبی ژن‌های مرتبط با رشد و ایمنی: نتایج حاصل از ارزیابی بیان ژن‌های لیزوزیم و اینترلوکین-۱ در این تحقیق نشان داد که گروه‌های تغذیه شده با سطوح مختلف اسید سیتریک و آب لیموترش افزایش معنی‌داری در بیان این دو ژن در مقایسه با گروه شاهد داشتند (p<۰/۰۵). بیشترین و کمترین میزان بیان ژن‌های مربوط به ایمنی به ترتیب در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی اسید سیتریک ۱ درصد و آب لیموترش ۰/۵ درصد مشاهده شد (شکل ۳ و ۴). همچنین، در ارتباط با بیان ژن‌های مرتبط با رشد (GH و IGF-1) مشخص گردید که تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی اسید سیتریک در مقایسه با گروه شاهد و همچنین تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی آب لیموترش به طور معنی‌داری دارای بیشترین مقدار بیان بودند (p<۰/۰۵). با این حال، تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی آب لیموترش نیز در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری در بیان ژن‌های مرتبط با رشد داشتند (p<۰/۰۵) (شکل‌های ۵ و ۶).

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-09-15]



شکل۳: بیان نسبی ژن اینترلوکین-۱ به ژن بتا-اکتین در ماهی کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف اسید سیتریک و آب لیموترش

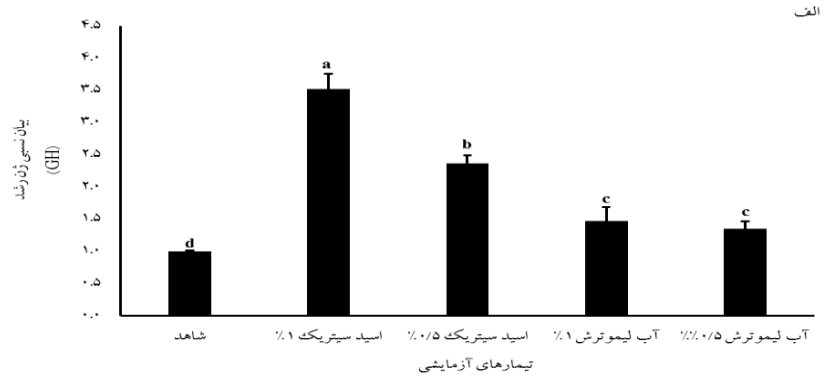
حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۵$). عداد میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد می‌باشند.



شکل۴: بیان نسبی ژن لیزوزیم به ژن بتا-اکتین در ماهی کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف اسید سیتریک و آب لیموترش

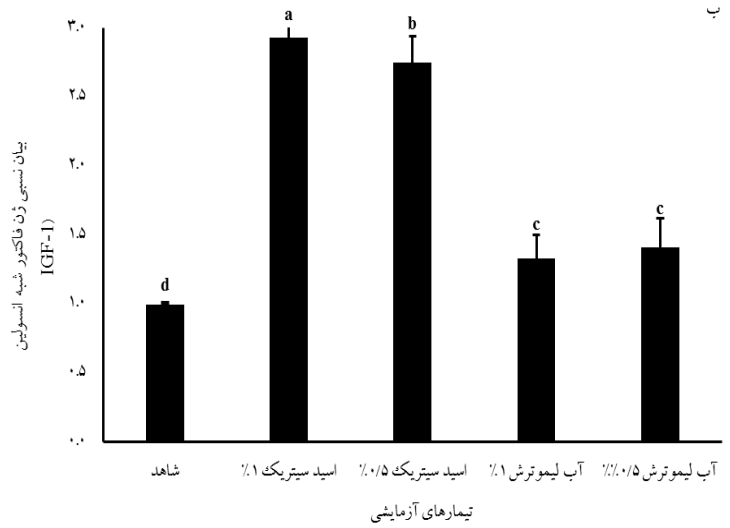
حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۵$). عداد میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد می‌باشند.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-09-15]



شکل۵: بیان نسبی ژن GH در ماهی کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف اسید سیتریک و آب لیموترش

حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۵). عداد میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد می‌باشند.



شکل۶: بیان نسبی ژن IGF-1 در ماهی کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف اسید سیتریک و آب لیموترش

حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۵). عداد میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد می‌باشند.

بحث

نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد که هر چهار تیمار آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد عملکرد رشد بهتری داشتند. در همین راستا، تحقیقات Anthonius و همکاران (۲۰۱۸) در ارتباط با تاثیر جیره حاوی ۳ درصد مکمل اسید سیتریک و لیموترش در جیره ماهی هامور (*Epinephelus fuscoguttatus*) به مدت ۱۰ هفته نشان داد که تیمارهای تغذیه شده با اسید سیتریک و لیمو ترش در مقایسه با گروه شاهد دارای افزایش معنی‌داری در شاخص‌های رشد، افزایش وزن بدن و نرخ رشد ویژه بودند. همچنین، نتایج حاصل از تحقیق حاضر همسو با نتایج به دست آمده از تحقیقات Baba و همکاران (۲۰۱۶) و Acar و همکاران (۲۰۱۵) در ماهی تیلاپیا، Vielma و همکاران (۱۹۹۹) و Pandey و Satoh (۲۰۰۸) در ماهی قزل‌آلای رنگین-کمان می‌باشد؛ احتمال می‌رود علت افزایش معنی‌دار

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-09-15]

شاخص‌های رشد در تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی اسید سیتریک در مقایسه با سایر تیمارها را بتوان به خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ظرفیت بافری بالای اسید سیتریک نسبت داد که این عوامل خود سبب بهبود عملکرد گوارش و کاهش استرس می‌گردد (Li *et al.*, 2017). همچنین در توافق با نتایج تحقیق حاضر، Khajepour و Hosseini (۲۰۱۲)، بیان کردند که جیره مکمل‌سازی شده با اسیدسیتریک سبب بهبود شاخص‌های رشد فیل ماهیان جوان پرورشی شد؛ آن‌ها بیان کردند که اسید سیتریک با اسیدی کردن محیط روده سبب حلالیت و آزادشدن کاتیون‌ها می‌شود و دسترسی رت به مواد معدنی افزایش می‌دهد، با کاهش میزان فعالیت باکتری‌های مضر احتمالی روده و افزایش فعالیت باکتری‌های مفید در شرایط اسیدی، شرایط عملکرد بهتر فلور میکروبی روده برقرار شده و در نتیجه میزان هضم و جذب مواد افزایش می‌یابد و در نهایت عملکرد رشد بهبود پیدا می‌کند. در تحقیق حاضر، اگرچه آب لیمو ترش سبب بهبود عملکرد شاخص‌های رشد در مقایسه با گروه شاهد شد، اما ممکن است افزایش بیشتر رشد در تیمار تغذیه شده با جیره مکمل سازی شده با اسیدسیتریک به دلیل این که یک جیره غنی شده با ماده موثره (ماده موثره آبلیمو ترش) بوده است، کارایی بهتری داشته باشد.

ایمنوگلوبولین سرم به عنوان جزئی از سیستم ایمنی هومورال بدن، عملکرد اصلی خنثی‌سازی آنتی ژن‌های میکروبی خارجی را بر عهده دارد. لیزوزیم نیز، از آنزیم‌های پروتئینی گلیکوزید هیدرولاز بوده که نقش مهمی در ایمنی ذاتی آبزیان ایفا می‌کند (Biller-Takahashi *et al.*, 2013). در مطالعه حاضر، میزان ایمنوگلوبولین کل و فعالیت آنزیم لیزوزیم سرم و موکوس در هر چهار تیماره تغذیه‌ای (سطوح مختلف اسید سیتریک و آب لیموترش) در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشت. با این حال، این افزایش در تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی اسیدسیتریک در مقایسه با تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی آب لیموترش بیشتر مشهود بود. Baba و همکاران (۲۰۱۶)، گزارش کردند که جیره حاوی عصاره پوست لیمو باعث افزایش فعالیت آنزیم لیزوزیم و شاخص‌های ایمنی در ماهی تیلاپیا (*Oreochromis mossambicus*) شد. همچنین، Beltrán و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که استفاده از پوست لیمو در جیره شانک ماهی (*Sparus aurata* L.) به مدت ۳۰ روز سبب افزایش معنی‌داری در میزان ایمنوگلوبولین سرم و موکوس این ماهی گردید که همسو با نتایج تحقیق حاضر می‌باشد. از آن‌جایی که آنزیم لیزوزیم از گرانول‌های گلبول‌های سفید به ویژه نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها و ماکروفاژها ترشح می‌شود و همچنین وجود آن نشانگر فعالیت لوکوسیتی است، بنابراین، در نتیجه‌ی حضور این آنزیم، فعالیت بیگانه خواری لوکوسیت‌ها افزایش می‌یابد (Sheikhzadeh *et al.*, 2013). بنابراین، می‌توان علت افزایش معنی‌دار در میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم را به افزایش تعداد گلبول‌های سفید نسبت داد. با این حال، تاکنون مکانیسم علمی خاصی برای توجیه چرایی افزایش این آنزیم پیدا نشده است. اما یکی از فرض‌های پیشنهادی این است که ممکن است اسید سیتریک به عنوان کوفاکتور تحریک کننده سیستم فعال کننده پروفنول اکسیداز عمل کرده و همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی آن اعمال اثر کرده باشد این عامل نقش بسیار مهمی در افزایش قدرت سیستم ایمنی بدن دارد. از سویی دیگر، ممکن است اسید سیتریک به

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-09-15]

عنوان محصول میانی چرخه اسید سیتریک (اسید تری کربوکسیلیک) سبب سرعت بخشیدن به تولید ATP و گلوکز در شرایط استرس‌زا و در نهایت کاهش استرس گردد (Su *et al.*, 2014).

نتایج حاصل از بررسی حاضر نشان داد که جیره حاوی ۰/۵ درصد اسید سیتریک به طور معنی‌داری کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز را داشت که نشان دهنده اثرات مثبت اسید سیتریک در جیره غذایی بچه ماهیان کپور معمولی بود. آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز نقش مهمی در مراحل نهایی تجزیه پروتئین جهت تولید ATP ایفا می‌کنند (Petrović *et al.*, 1996). آلانین آمینو ترانسفراز در قلب، کبد، کلیه، طحال، پانکراس، مغز، عضلات استخوانی و سرم به طور طبیعی در مقدار بسیار کم حضور دارد. اما، افزایش چشمگیر سطح آن ممکن است به دلیل انسداد کیسه صفراوی، نکروز بافت کبد، آسیب وارده به غشای سلولی، به ویژه سلول‌های کبد، کلیه، قلب، سلول‌های ماهیچه‌ای و گلبول قرمز خون باشد؛ بدین صورت که هرگاه این بافت‌ها دچار ضایعاتی شوند، میزان این آنزیم افزایش می‌یابد (Banaee *et al.*, 2016)، بنابراین، عدم افزایش این آنزیم‌ها در تحقیق حاضر می‌تواند به این معنی باشد که اسیدسیتریک و یا آبلیمو به عنوان ماده‌هایی افزودنی به بافت کبد آسیبی وارد نکرده‌اند.

آلکالین فسفاتاز آنزیمی است که در اپیتلیوم مجاری صفراوی، سلول‌های کبدی و نیز در مخاط پوست و روده و کلیه‌ها یافت می‌شود (El-Sayed and Saad, 2009). آلکالین فسفاتاز نقش بسزایی در مقابله با عوامل استرس‌زا و بهبود ایمنی به عنوان اولین پاسخ ایمنی ایفا می‌نماید؛ براساس نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر، ماهیان کپورمعمولی تغذیه شده با یک درصد لیموترش دارای بالاترین سطح آلکالین فسفاتاز بودند که یکی از مهمترین دلایل افزایش سطح فعالیت این آنزیم افزایش سطح ایمنی است. نویدپورآقجه مشهد و همکاران (۱۳۹۴) با بررسی تاثیر سطوح مختلف پودر تفاله گوجه فرنگی در جیره ماهی کپور معمولی بر میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز به نتایج مشابهی دست یافتند. به طوری که فعالیت این آنزیم در بچه‌ماهیان تغذیه شده با ۵۰ گرم پودر تفاله گوجه‌فرنگی بر کیلوگرم جیره سبب افزایش معنی‌دار این آنزیم گردید که مطابق با نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر می‌باشد. در واقع این آنزیم به دلیل فعالیت هیدرولیتیکی به عنوان یک عامل ضدباکتریایی ضروری شناخته شده و عملکرد حفاظتی در بهبود زخم، عفونت انگلی و استرس دارد (Iger and Abraham, 1990). بنابراین، افزایش این آنزیم در تیمار تغذیه شده با آبلیمونشان دهنده افزایش پاسخ ایمنی میزبان می‌باشد.

گلوتاتیون اس ترانسفراز به عنوان آنزیم آنتی-اکسیدانی کمکی سبب اتصال گلوتاتیون به مواد سمی شده و ترکیباتی با سمیت کمتر ایجاد می‌کند. بنابراین نقش مهمی در حفاظت از بافت‌ها در برابر آسیب‌ها و استرس اکسیداتیو دارد (Lawrence and Hamingway, 2003). عدم تغییر در میزان گلوتاتیون اس ترانسفراز نشان دهنده وضعیت سلامتی ماهی می-باشد. از آنجا که سیستم آنتی اکسیدانی مکانیسم دفاعی مؤثر در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژنی به شمار می-رود، افزایش در القای این آنزیم‌ها نشان دهنده سازگاری ماهی نسبت به شرایط استرسی در استرس‌های کوتاه مدت و بلندمدت می‌باشد (Oliveira *et al.*, 2009). براساس گزارش‌های Sharma و همکاران

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-09-15]

(۱۹۸۵) کاهش غلظت گلوتاتیون اس ترانسفراز در تحقیق حاضر را تا حد زیادی می‌توان به اثرات مثبت استفاده از اسید سیتریک و آب لیموترش نسبت داد که هر دو مورد به دلیل دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی، توانستند به عنوان آنتی‌اکسیدان در حذف رادیکال‌های آزاد موثر واقع گردند.

لاکتات دهیدروژناز یک آنزیم سیتوپلاسمی می‌باشد که جهت بررسی آسیب سلولی و به عنوان شاخصی جهت بررسی سمیت یک ماده شیمیایی و لیز سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد (El-Demerdash, 2011). این آنزیم تحت تاثیر پاتوژن‌ها، غذای دریافتی، استرس محیطی و فعالیت بدنی ترشح و میزان آن در سرم خون افزایش می‌یابد (Colpo, 2005). نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که میزان این آنزیم در سرم خون ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف اسید سیتریک و آب لیموترش کاهش معنی‌داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. شاید بتوان کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در ماهیان کپور معمولی تغذیه شده با جیره‌های حاوی اسید سیتریک را به خواص آنتی‌اکسیدانی اسید سیتریک، حذف رادیکال‌های آزاد و پیشگیری از پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلولی نسبت داد (Ambali *et al.*, 2012).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بیان ژن‌های مربوط به ایمنی (لیزوزیم و اینترلوکین-۱) در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۱ درصد اسید سیتریک افزایش معنی‌داری نسبت به تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی آب لیموترش و گروه شاهد در پایان دوره پرورش داشت. نتایج نشان داد که افزایش بیان این ژن‌ها وابسته به میزان دوز مکمل‌ها بوده و با افزایش دوز هر دو مکمل (اسید سیتریک و آب لیموترش) افزایش یافت. He و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی تاثیر تغذیه با جیره حاوی مکمل آویپلاس (مخلوط اسیدهای آلی: اسید سیتریک ۲۵ درصد و سوربیک اسید ۱۶ درصد) به میزان ۰/۶ گرم در کیلوگرم جیره افزایش معنی‌داری را در بیان نسبی ژن‌های مرتبط با ایمنی از جمله لیزوزیم و کاهش معنی‌داری در فعالیت کاتالاز در میگوی سفید اقیانوس آرام (*Litopenaeus vannamei*) گزارش کردند که مطابق با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. در برخی از مطالعات صورت گرفته در ارتباط با افزایش بیان ژن‌های مربوط به ایمنی شامل: لیزوزیم و اینترلوکین-۱، علت اصلی بیان ژن‌های مربوطه را به مواد موثره مکمل‌های گیاهی مورد استفاده در جیره‌های غذایی نسبت داده‌اند؛ به عنوان مثال می‌توان به مطالعه Nootash و همکاران (۲۰۱۳) در ارتباط با استفاده از چای سبز (*Camellia sinensis*) به عنوان مکمل غذایی در جیره ماهی غذای قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) اشاره کرد. همچنین، به‌کارگیری عصاره خرما (*Phoenix dactylifera*) به عنوان مکمل غذایی در جیره ماهی کپور معمولی (Hoseinifar *et al.*, 2015a) و مکمل‌سازی جیره ماهی کپور معمولی با گیاه آنقوزه (*Ferula assafoetida*) به عنوان محرک ایمنی (صفری و همکاران، ۲۰۱۶) سبب افزایش معنی‌دار در بیان نسبی ژن‌های ایمنی (لیزوزیم و اینترلوکین-۱) گردید که با نتایج مطالعه حاضر همسو می‌باشد. احتمالاً در تحقیق حاضر، استفاده از اسیدسیتریک و یا آبلیموترش با اسیدی کردن محیط روده، پاسخ‌های ایمنی را در نتیجه تغییر در میکروبیوتای روده و سوق دادن محیط آن را به افزایش باکتری‌های اسیدلاکتیک و جنس باسیلوس که

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-09-15]

دارای دیواره سلولی (لیپو پلیساکاریدی) با خواص محرک ایمنی می‌باشند، سبب افزایش ایمنی شد (Song *et al.*, 2014؛ Hoseinifar *et al.*, 2015). همچنین اسیدهای چرب کوتاه زنجیر تولید شده توسط باکتری‌های مفید روده که در شرایط اسیدی دارای بهترین عملکرد می‌باشند، تولید می‌شوند می‌توانند به طور مستقیم به وسیله سلول‌ها به عنوان منبع انرژی استفاده و در سراسر روده به وسیله سیستم عروقی برده شوند (Scheppach, 1994). اختلافات جزئی در نتایج گزارش شده در خصوص تحریک کنندگی سیستم ایمنی توسط اسید سیتریک و یا آبلیموترش در مطلعات مختلف در مقایسه با تحقیق حاضر می‌تواند ناشی از تفاوت در گونه ماهی، ترکیب میکروبیوتای بومی روده، سطوح و مدت زمان بکارگیری محرک ایمنی باشد ولی به طور کلی یک ماده محرک ایمنی معمولا از طریق مکانیسم یکسانی می‌تواند بر سیستم ایمنی گونه آبزی اثر گذار باشد. همچنین در مطالعات قبلی در ارتباط با عملکرد و نقش دستگاه گوارش بر سیستم ایمنی بیان شده است که یک بخش از سیستم دفاع غیر اختصاصی در ماهی و سایر مهرهداران سیستم لنفوئیدی در ارتباط با دستگاه گوارش (GALT) است که نقش عمدهای را در ارتباط با بروز و تنظیم پاسخ‌های ایمنی در پاسخ به مواد غذایی دارد (Lazado and Caipang, 2014). احتمالا اسیدسیتریک و آبلیموترش از طریق اثر بر سیستم لنفوئیدی در ارتباط با دستگاه گوارش سبب بهبود وضعیت ایمنی ماهی می‌گردد. به طور کلی نتایج مطالعه حاضر موید این امر بود که افزودن اسیدسیتریک و آبلیموترش سبب بهبود برخی از شاخص‌های ایمنی گردید. اگرچه مطالعات بیشتری برای اثبات این موضوع نیاز است.

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که بیان نسبی ژن‌های مربوط به رشد (GH و IGF1) در جیره‌های حاوی سطوح متفاوت اسید سیتریک و آب لیموترش در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشت. تحت تاثیر قرار گرفتن ژن‌های مربوط به رشد را می‌توان به دلیل خواص موثر اسید سیتریک و آب لیموترش دانست. یکی از اهداف بسیار مهم در اسیدی کردن جیره، کمک به غلبه باکتری‌های مفید و مطلوب بر باکتری‌های مضر و بیماری‌زا می‌باشد. از سویی دیگر، این امر می‌تواند مانع رقابت باکتری‌های روده با میزبان در مصرف مواد مغذی موجود شده که در نتیجه آن سبب کاهش تولید متابولیت‌های سمی (مانند: آمونیاک و آمین‌ها) توسط باکتری‌ها شده و در نهایت منجر به افزایش رشد و بیان نسبی ژن‌های دخیل در رشد می‌گردد (Su *et al.*, 2014).

در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از آن است که استفاده از اسید سیتریک و آب لیموترش به ویژه اسید سیتریک در سطح ۱ درصد در جیره غذایی ماهی کپور معمولی منجر به بهبود شاخص‌های رشد، برخی شاخص‌های ایمنی سرم و موکوس و افزایش چشمگیر بیان نسبی ژن‌های مربوط به رشد (GH و IGF1) و ایمنی (Lyz و IL-1) گردید. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان بیان داشت که اسید سیتریک در سطح ۱ درصد می‌تواند به عنوان یک محرک رشد و ایمنی طبیعی در جیره غذایی ماهیان کپور معمولی در پیشگیری از صدمات ناشی از عوامل استرس‌زا و بروز بیماری‌های ثانویه عمل کند. همچنین، می‌توان اظهار داشت استفاده از آب لیموترش به عنوان منبع غنی و طبیعی از اسید سیتریک به منظور افزایش ایمنی غیراختصاصی و محرک سیستم ایمنی در برابر

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-09-15]

عوامل بیماری‌زا موثر بوده؛ لذا، استفاده از آن در جیره ماهی کپور معمولی پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم که از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند تشکر نماییم.

منابع

۱. ایمان‌پور، م.ر.، روحی، ز.، ۱۳۹۴. اثر سنگروویت بر عملکرد رشد، برخی پارامترهای بیوشیمیایی خون، بازماندگی و مقاومت به تنش شوری در بچه‌ماهیان سفید. یافته‌های نوین در علوم زیستی، ۲(۲)، ۱۳۲-۱۲۳.

۲. رفیعی، ف.، رمضانی، ر.، ۱۳۹۱. بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس و عصاره (آب) لیموترش بر میکروارگانیسم‌های دهانی. زیست فناوری میکروبی، ۴(۸)، ۱۲-۷.

۳. عبدلی، ا.، نادری، م.، ۱۳۸۷. تنوع زیستی ماهیان حوضه‌ی جنوبی دریای خزر. تهران. انتشارات علمی آبزیان. ۲۴۴ صفحه.

۴. علیشاهی، م.، سلطانی، م.، مصباح، م.، اسمعیلی‌راد، ا.، ۱۳۹۰. تأثیر تجویز خوراکی عصاره خار مریم (*Silybum marianum*) بر پاسخ‌های ایمنی ماهی کپور معمولی. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۶۶(۳)، ۲۶۳-۲۵۵.

۵. قناعت‌پرست، ا.، فرحجود، ب.، طلوعی، م.ح.، هدایت، م.، درویشی، ف.، موسوی، س.ه.، مجدی‌نسب، ف.، خمیرانی، ر.، ۱۳۸۰. پرورش ماهی گرمابی (عمومی). معاونت تکثیر و پرورش آبزیان اداره کل آموزش و ترویج. ۲۰۳ صفحه.

۶. نویدپورآقجه مشهد، ف.، میردار هریجانی، ج.، قرایی، ا.، راهداری، ع.، ۱۳۹۴. تأثیرسطوح مختلف پودر تفاله گوجه فرنگی بر فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون و شاخص‌های رشد در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). پژوهش‌های ماهی شناسی کاربردی، ۳(۴)، ۱۱۴-۱۰۱.

7. Acar, Ü., Kesbiç, O.S., Yılmaz, S., Gültepe, N., Türker, A., 2015. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. Aquaculture, 437, 282-286.
8. Ai, Q., Mai, K., Tan, B., Xu, W., Duan, Q., Ma, H., Zhang, L., 2006. Replacement of fish meal by meat and bone meal in diets for large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. Aquaculture, 260, 255-263.
9. Ambali, S.F., Ayo, J.O., 2012. Vitamin C attenuates chronic chlorpyrifos-induced alteration of neurobehavioral parameters in Wistar rats. Toxicology international, 19 (2), 144-152.
10. Anthonius, C., Seok Kian Yong, A., Fui, C.F., 2018. Supplementation of duckweed diet and citric acid on growth performance, feed utilization, digestibility and phosphorus utilization of TGGG hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*) juvenile. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 40 (5), 1009-1016.
11. Awad, E., Mitchell, W.J., Austin, B., 2011. Effect of dietary supplements on cytokine gene expression in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of fish diseases, 34 (8), 629-634.
12. Baba, E., Acar, Ü., Öntaş, C., Kesbiç, O.S., Yılmaz, S., 2016. Evaluation of *Citrus limon* peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. Aquaculture, 465, 13-18.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-09-15]

13. Banaee, M., Nemadoost, Haghi, B., Vaziriyan, M., Taheri, S., Shahafve, S., 2016. Effects of sub-lethal toxicity of paraquat on blood biochemical parameters of common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). Iranian Journal of Toxicology, 10 (6), 1-5.
14. Beltrán, J.M.G., Espinosa, C., Guardiola, F.A., Esteban, M.Á., 2017. Dietary dehydrated lemon peel improves the immune but not the antioxidant status of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish & shellfish immunology, 64, 426-436.
15. Biller-Takahashi, J.D., Takahashi, L.S., Saita, M.V., Gimbo, R.Y., Urbinati, E.C., 2013. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. Brazilian Journal of Biology, 73 (2), 425-429.
16. Colpo, A., 2005. LDL Cholesterol:" Bad" Cholesterol or Bad Science? Journal of American Physicians and Surgeons, 10 (3), 83-89.
17. Dabrowski, K., Ciereszko, A., 2001. Ascorbic acid and reproduction in fish: endocrine regulation and gamete quality. Aquaculture Research, 32, 623-638.
18. El-Demerdash, F.M., 2011. Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. Food and chemical toxicology, 49 (6), 1346-1352.
19. El-Sayed, Y.S., Saad, T.T., 2008. Subacute Intoxication of a Deltamethrin-Based Preparation (Butox®5% EC) in Monosex Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* L. Basic & clinical pharmacology & toxicology, 102 (3), 293-299.
20. Fracalossi, D.M., Allen, M.E., Yuyama, L.K., Oftedal, O.T., 2001. Ascorbic acid biosynthesis in Amazonian fishes. Aquaculture, 192, 321-332.
21. Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. Journal of Biological Chemistry, 249, 7130-7139.
22. Hayes, J.D., Pulford, D.J., 1995. The glut athione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the lsoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part I. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 30 (6), 445-520.
23. He, W., Rahimnejad, S., Wang, L., Song, K., Lu, K., Zhang, C., 2017. Effects of organic acids and essential oils blend on growth, gut microbiota, immune response and disease resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against Vibrio parahaemolyticus. Fish and shellfish immunology, 70, 164-173.
24. Hevrøy, E., Espe, M., Waagbø, R., Sandnes, K., Ruud, M., Hemre, G.I., 2005. Nutrient utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed increased levels of fish protein hydrolyte during a period of fast growth. Aquaculture Nutrition. 11, 301-313.
25. Hoseinifar, S.H., Khalili, M., Rufchaei, R., Raeisi, M., Attar, M., Cordero, H., Esteban, M.Á., 2015a. Effects of date palm fruit extracts on skin mucosal immunity, immune related genes expression and growth performance of common carp (*Cyprinus carpio*) fry. Fish & shellfish immunology, 47 (2), 706-711.
26. Iger, Y., Abraham, M., 1990. The process of skin healing in experimentally wounded carp. Journal of Fish Biology, 36(3), 421-437.
27. Khajepour, F., Hosseini, S. A., 2012. Citric acid improves growth performance and phosphorus digestibility in Beluga (*Huso huso*) fed diets where soybean meal partly replaced fish meal. Animal feed science and technology, 171(1), 68-73.
28. Kotzamanis, Y.P., Gisbert, E., Gatesoupe, F.J., Infante, J.Z., Cahu, C., 2007. Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 147(1), 205-214.
29. Lawrence, A.J., Hamingway, K., 2003. Effects of pollution on fish: molecular effects and population responses. Wiley-Blackwell, p.376.
30. Li, X.Q., Cui, W.O., Leng, X.J., 2017. Citric acid substituted the inclusion of

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-09-15]

inorganic phosphorus in diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture Research, 48(3), 1089-1098.
31. Lianou, A., Koutsoumanis, K., Sofos, J., Dermirci, A., Ngadi, M., 2012. Organic acids and other chemical treatments for microbial decontamination of food. Microbial decontamination in the food industry: Novel methods and applications, 592-664.
32. Luckstadt, C., 2008. The use of acidifiers in fish nutrition. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources, 3: 1-8.
33. Lazado, C.C., Caipang, C.M.A., 2014. Mucosal immunity and probiotics in fish. Fish & Shellfish Immunology, 39(1), 78-89.
34. Nootash, S., Sheikhzadeh, N., Baradaran, B., Oushani, A.K.,Moghadam, M.R.M., Nofouzi, K., Monfaredan, A., Aghebati, L., Zare, F., Shabanzadeh, S., 2013. Green tea (*Camellia sinensis*) administration induces expression of immune relevant genes and biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish & shellfish immunology, 35(6), 1916-1923.
35. Oliveira, K.C., Moriya, M., Azedo, R.A., Almeida-Muradian, L.B.D., Teixeira, E.W., Alves, M.L., Moreti, A.C., 2009. Relationship between botanical origin and antioxidants vitamins of bee-collected pollen. Química Nova, 32(5), 1099-1102.
36. Petrović, S., Ozretiç, B., Krajnović-Ozretić, M., 1996. Cytosolic aspartate aminotransferase from the grey mullet (*Mugil auratus Risso*) red muscle: Isolation and properties. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 28 (8), 873-881.
37. Pandey, A., Satoh, S., 2008. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Fisheries science, 74(4), 867-874.
38. Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST©) for group -wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real -time PCR. Nucleic Acids Research, 30(9), e36.
39. 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. Diseases of Aquatic Organisems, 41, 43-51.
40. Sharma, R., Yang, Y., Sharma, A., Awasthi, S., Awasthi, Y.C., 2004. Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. Antioxidants and Redox Signaling, 6 (2), 289-300.
41. Sheikhzadeh, N., 2013. Influence of dietary vegetable crops on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune system and growth performance. Acta Scientiae Veterinariae, 41 (1), 1-6.
42. Silva, B.C., Vieira, F.D.N., Mouriño, J.L.P., Bolivar, N., Seiffert, W.Q., 2014. Butyrate and propionate improve the growth performance of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Research, 47, 612-623.
43. Su, X., Li, X., Leng, X., Tan, C., Liu, B., Chai, X., Guo, T., 2014. The improvement of growth, digestive enzyme activity and disease resistance of white shrimp by the dietary citric acid. Aquaculture international, 22 (6), 1823-1835.
44. 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 Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 148 (3), 256-263.
45. Sugiura, S.H., Dong, F.M., Rathbone, C.K., Hardy, R.W., 1998. Apparent protein digestibility and mineral availabilities in various feed ingredients for salmonid feeds. Aquaculture, 159 (3-4), 177-202.
46. Song, S.K., Beck, B.R., Kim, D., Park, J., Kim, J., Kim, H.D., Ringø, E., 2014. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: a review. Fish & Shellfish Immunology, 40(1), 40-48.
47. Scheppach, W., 1994. Effects of short

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-09-15]

chain fatty acids on gut morphology and function. Journal of Gut. 35(1), 35-38.
48. Tacon, A.G.J., 1990. Standard method for nutritional and feeding of farmed fish and shrimp. Argent librations press, p. 117.
49. Vielma, J., Ruohonen, K., Lall, S.P., 1999. Supplemental citric acid and particle size of fish bone-meal influence the availability of minerals in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture nutrition, 5 (1), 65-71.
50. Zhou, S.N., Oakes, K.D., Servos, M.R., Pawliszyn, J., 2008. Application of solid-phase microextraction for in vivo laboratory and field sampling of pharmaceuticals in fish. Environmental science & technology, 42 (16), 6073-6079.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-09-15]