

اثرات تجویز خوراکی اسانس مورد (*Myrtus communis* L) بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی و آنتی اکسیدانی سرم خون بچه‌ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

تکاور محمدیان^۱، سکینه مشجور^{۲*}، رضا قانع مطلق^۱، حسین خاج^۳، صادق رباط کریمی^۱

۱- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

۳- موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۵/۲۱

چکیده

افزودنی‌های غذایی فیتوژنیک (با منشأ گیاهی)، مشتمل بر پودر گیاه، اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی هستند که به علت وجود ترکیبات زیست‌فعال فنول و فلاونوئیدی در ساختار بیوشیمیایی آن‌ها می‌توانند، اثرات متعدد و مفیدی را بر سلامت جانداران بر جای گیرانند. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثرات تجویز خوراکی اسانس گیاه مورد (*Myrtus communis*) بر شاخص‌های بیوشیمیایی و آنتی اکسیدانی سرم خون بچه‌ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بوده است. سه گروه ۲۰ تایی بچه‌ماهی کپور معمولی با میانگین وزن $16/53 \pm 2/98$ گرم در ۶ تکرار مورد مطالعه قرار گرفتند. یک گروه به عنوان شاهد و دو گروه دیگر تحت تغذیه با جیره غذایی غنی شده با اسانس گیاه مورد در غلظت‌های ۵۰۰ و ۷۰۰ mg/kg قرار گرفتند. خون‌گیری از ساقه دمی ماهیان تیمارهای مختلف در پایان دوره ۶۰ روزه تیمار، انجام شد. سپس شاخص‌هایی چون آنزیم‌های کبدی (آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و لاکتات دهیدروژناز (LDH))، پروتئین تام و آنزیم آنتی اکسیدانی کاتالاز (CAT)، اندازه‌گیری شد. آنالیزهای آماری نشان داد که میزان ALP و AST در سرم خون ماهیان در گروه‌های تیمار در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافته است ($P < 0/05$). در مقابل ALT و LDH در تیمار با غلظت ۵۰۰ mg/Kg اسانس در جیره نسبت به گروه‌های ۷۰۰ mg/Kg و شاهد بالاتر بوده، ولی تفاوت‌ها معنی‌داری نبود ($P > 0/05$). تغییرات پروتئین تام نیز معنی دار نبوده، ولی در گروه‌های تیمار کاهش فعالیت CAT به تبعیت از افزایش غلظت اسانس مشاهده گردید ($P < 0/05$). طبق نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که سطوح این تغییرات بیوشیمیایی سرم غیرطبیعی و متاثر از شرایط تنش‌زا نبوده و این مکمل غذایی سلامت ماهیان را تحت تاثیر قرار نداده است.

کلمات کلیدی: کپور معمولی، مورد، اسانس، استرس، آنزیم‌های کبدی، آنتی اکسیدان.

مقدمه

در سال‌های اخیر، به‌منظور ارتقای ایمنی و کارایی تغذیه‌ای ماهیان، تحقیقات بسیاری در جهت شناسایی و توسعه مکمل‌های غذایی جدید صورت پذیرفته است (فلاح پور، ۱۳۹۶). از طرفی در سیستم‌های تکثیر و پرورش ماهیان، حفظ شرایط بهداشتی و ممانعت از شیوع بیماری‌ها نیز بسیار حائز اهمیت است (پذیرا، ۱۳۹۶). با این وجود کنترل بیماری‌های ماهیان با بهره‌گیری از ترکیبات دارویی شیمیایی نظیر انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، عموماً با نگرانی‌هایی چون توسعه سویه‌های میکروبی مقاوم به درمان، ماندگاری پسماندهای دارویی در بافت آبرزی و مخاطرات آن برای مصرف‌کنندگان و نیز تأثیرات محیطی همراه بوده است (Otatake *et al.*, 2002). از این جهت در سال‌های اخیر، آمار جهانی نشانگر این است که توجه به مصرف گیاهان دارویی و بازگشت به طب سنتی، در کشورهای توسعه‌یافته آمریکایی و اروپایی، پیشرفت چشمگیری داشته است و این امر، بنا به دلایلی چون، کاهش عوارض سوء مصرف و شیوع مقاومت‌های دارویی به عوامل عفونت‌زا، گزارش شده است (Ekor, 2013).

در کشور ایران، بیش از ۸۰۰۰ گونه گیاهی شناخته شده است که بسیاری از آن‌ها خواص دارویی درمانی دارند (Zargari, 1997). در میان این طیف وسیع از گیاهان دارویی ایران، گیاه مورد با نام علمی *Myrtus communis* یک سرده از تیره موردیان *Myrtaceae* است که گیاهی درختچه‌ای همیشه‌سبز با برگ‌هایی با طول ۳-۵ سانتیمتر و بویی خوشایند است که بومی نواحی مدیترانه‌ای، جنوب اروپا و آفریقای شمالی بوده، ولی در ایران در نواحی غربی استان کرمانشاه، ایلام، فارس، خوزستان، کرمان، یزد و هرمزگان نیز

رویش دارد (Zargari, 1997; Mozafarian, 1996). مورد گیاهی معطر و خوشبو است و این به دلیل وجود غده‌های حاوی اسانس در برگ، میوه و گل‌های آن است (De Laurentis, 2005). بخش دارویی این گیاه عمدتاً برگ‌های آن است که حاوی اسانس بوده و این اسانس متشکل از، ترپن‌ها، سزکویی ترپن‌ها، الکل‌ها، استرها، آلدئیدها، فنل‌ها، اترها و پراکسیدها است (Omidbaigi, 2005; Salimi Beni *et al.*, 2017). تحقیقات اخیر وجود خواص ضدباکتری، ضدقارچ، ضداکسیدان، ضد ویروس، ضد التهاب و ضد درد، ضد انگل، تقویت کننده معده و قابض و ایمنی آن‌ها را برای انسان و دیگر مهره‌داران، گزارش نموده‌اند (Hennia *et al.*, 2018, 2019; Bahadori birgani *et al.*, 2018; Mansouri *et al.*, 2017; Salimi Beni *et al.*, 2017; Aleksic and Knezevic, 2014; Messaoud *et al.*, 2005; Aidiwanes, *et al.*, 2005; Burt and Reinders, 2003; Twaij *et al.*, 1988; Zargari *et al.*, 1989) و آن را در کنترل بیماری دیابت قند، بیماری‌های ریوی و سرطان نیز، موثر دانسته‌اند (Burt and Reinders, 2003).

از این رو این ترکیب فیتوژنیک (مشتق شده گیاهی) نیز می‌تواند به عنوان یک مکمل و افزودنی غذایی گیاهی برای گونه‌های مختلف جانوری از جمله آبزیان مورد توجه قرار گرفته (Peterson *et al.*, 2014) و همانند دیگر ترکیبات گیاهی مشابه احتمال می‌رود که بتواند موجب تحریک رشد و اشتها، تحریک ترشح شیره گوارشی، افزایش ضریب جذب غذا، تحریک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان و ایمنی آن‌ها گردیده و عملکرد رشد، سلامت و محافظت از بیماری‌ها را در این جانداران تا سطح مطلوبی بهبود بخشد (Menanteau-Ledouble *et al.*, 2015; Peterson *et al.*, 2014).

از آنجایی که سیستم ایمنی ماهیان، اولین سیستم دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زا و استرس‌های محیطی است، لذا پاسخ سریع و ایمنولوژیک ماهیان نسبت به تجویز خوراکی اسانس‌های گیاهی در شرایط تکثیر پرورش آبزیان را می‌توان از طریق تغییر در سطح فعالیت برخی پارامترهای ایمنی و بیوشیمیایی به عنوان شاخص‌های هشداردهنده استرس‌های محیطی ارزیابی نموده (Sutli et al., 2018) و سطوح مطلوب و بهینه این مکمل‌های غذایی را برای تجویز در جیره غذایی آبزیان، تعیین نمود.

در مطالعات تغذیه، سم‌شناسی و ایمنی، یکی از گونه‌های ماهی مدل متداول، ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) است، زیرا این ماهی یکی از گونه‌های پرورشی آب شیرین بوده که در اغلب بوم‌سازگان‌های آبی نیز یافت می‌شود و به علت پراکنش وسیع در سطح جهان، حساسیت به آلاینده‌ها و سازگاری با شرایط آزمایشگاهی همواره مورد توجه محققین شیلاتی بوده است (Hajibeglou and Sudagar, 2010). نظر به دامنه گسترده تکثیر و پرورش ماهیان در ایران، لزوم شناسایی و معرفی مکمل‌های غذایی سودمند در صنعت آبی‌پروری و نیز ضعف و محدودیت اطلاعاتی موجود در این حوزه، در پژوهش حاضر محققین تلاش نموده‌اند تا ضمن افزایش دسترسی زیستی به اسانس گیاه مورد (*M. communis*) به واسطه افزودن آن به جیره غذایی ماهی کپور معمولی، تاثیرات مصرف آن به عنوان یک مکمل غذایی را بر تغییرات آنزیم‌های کبدی و آنتی‌اکسیدانی در خون مورد بررسی و کاوش قرار دهند. در تحقیقات پیشین نیز، اثرات مثبت عصاره گیاه مورد بر تقویت نرخ رشد و بقا، پارامترهای بیوشیمیایی خون و ایمنی (کلسترو

تری گلیسیرید) در ماهی کپور معمولی (Bahadori Birgani et al., 2018) و نیز تاثیر آن بر تغییرات کیفی ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، در شرایط نگهداری سرد (Nasiri et al., 2016) مورد تایید قرار گرفته بود.

مواد و روش‌ها

در تحقیق حاضر، تعداد ۵۰۰ عدد بچه ماهی کپور معمولی با میانگین وزن $2/98 \pm 16/53$ گرم و میانگین طول $82/13 \pm 10/13$ از مرکز تکثیر پرورش شهید ملکی اهواز تهیه و با استفاده از مخزن مخصوص حمل بچه ماهی و کپسول اکسیژن به دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل گردید. پیش از شروع آزمایش، ماهی‌ها از نظر ظاهری و بالینی مورد بررسی قرار گرفتند و پس از تحمل ۲۴ ساعت گرسنگی به دلیل حمل و نقل به مدت دو هفته نسبت به شرایط آزمایشگاهی ($24 \pm 2^\circ\text{C}$: دمای آب، 1 ± 6 ppm: اکسیژن و $7/6 \pm 0/2$ pH) سازگار گردیدند. غذادهی ماهیان در طول دوره سازگاری با جیره اصلی (جدول ۱) انجام گرفت. غذادهی به صورت روزانه به میزان ۲/۵٪ وزن توده زنده و سه بار در روز برای همه گروه‌ها انجام گرفت. اجزای جیره از شرکت بهدان چهارمحال و بختیاری (شهرکرد) (<https://www.behdanco.com>) تهیه و به تفکیک ذکر شده در جدول یک باهم ترکیب و ساخته شدند. غذاهای تهیه شده در دمای معمولی آزمایشگاه به مدت ۲۴ ساعت خشک و در کیسه‌های پلاستیکی بسته‌بندی و در یخچال تا زمان مصرف نگهداری شد. غذای مورد نیاز در هر روز پس از محاسبه از یخچال خارج و در لیوان‌های پلاستیکی

آباد (<http://khorraman.ir>) تهیه گردید. نسبت ترکیبات شیمیایی در این اسانس (طبق دستورالعمل ارائه شده توسط کارخانه) در جدول ۳ قابل مشاهده است.

شماره گذاری شده تا زمان مصرف قرار داده شد. آنالیز تقریبی جیره نیز در جدول ۲ گزارش شده است. در ادامه اسانس گیاه مورد (*M. communis*)، به صورت یک محصول تجاری از شرکت داروسازی خرمان خرم

جدول ۱: ترکیب اصلی جیره استفاده شده در آزمایش

اجزای غذایی جیره	آرد جو	آرد گندم	سبوس گندم	کنجاله سویا	پودر ماهی	روغن ماهی	روغن (آفتابگردان)	آنزیمیت	ملاس	پرمیکس ویتامین و مواد معدنی
درصد	۲۵	۱۰	۸	۲۴	۲۰	۳	۴	۲	۲	۲

جدول ۲: آنالیز تقریبی جیره

در وزن خشک (درصد)	انرژی خام (Kcal/kg)	پروتئین خام	چربی خام	فیبر	رطوبت	خاکستر	TVN (mg/100gr)
	۳۵۰۰	۳۷	۹-۱۰	۵	کمتر از ۸	۱۱-۱۲	۳۹

جدول ۳: ترکیبات شیمیایی عمده اسانس گیاه مورد

ترکیب	Linalool	Limonene	α -Pinene	1,8-Cineole	α -Terpineole	Linalyl acetate	Terpinene-4-ol	Trans/Cis Carveole
درصد	۱۰/۶	۲۱/۲	۲۹/۴	۱۸	۳/۱	۴/۶	۰/۵	کمتر از ۰/۴-۰/۱

به منظور آماده سازی جیره مخصوص آزمایش، ابتدا تمامی اقلام خشک پس از پودر شدن با آسیاب، با هم مخلوط شده، سپس آب و روغن اسانس گیاه مورد (با احتساب میزان اسانس مورد برای هر تیمار)، به آن ها اضافه شده و کاملاً همگن شده و ماده خمیری حاصل توسط چرخ گوش با دهانه متوسط (۲ میلی متر) به صورت رشته ای آماده شد. رشته های غذایی پس از تفکیک در آون با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶ ساعت خشک شده و سپس خرد گشته و به شکل پلت مهیا شدند. پلت ها به مدت ۱ روز در دمای اتاق نگهداری شدند و نهایتاً به یخچال با دمای ۴ درجه سانتیگراد تا زمان استفاده منتقل گردیدند.

در مطالعه حاضر، تیمارهای آزمایش مشتمل بر گروه شاهد (۱) (خوراک فاقد افزودنی)، تیمار (۲)

(خوراک حاوی ۵۰۰ mg/kg اسانس گیاه مورد)، تیمار (۳) (خوراک حاوی ۷۰۰ mg/kg اسانس گیاه مورد) در شش تکرار (تعداد ۲۵ قطعه بچه ماهی در هر تیمار درون مخازن پلی اتیلن ۳۰۰ لیتری) بوده و غذادهی به صورت ۳٪ وزن توده زنده ماهی در دو وعده در روز و به مدت ۶۰ روز انجام پذیرفت. انتخاب غلظت ها مبتنی بر حداقل و حداکثر غلظت موثره پیشنهادی محققین در سابقه پژوهش های اخیر در ارتباط با عصاره گیاه مورد بود که تغییرات خونی، بیوشیمیایی و ایمنی را در ماهی کپور معمولی القا نموده بودند (Bahadori Birgani et al., 2018).

جهت تعیین تغییرات توده زنده ماهیان در هر یک از تیمارها، هر ۱۵ روز یکبار ۱۰۰ درصد ماهیان هر تکرار با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم توزین و طول

نانومتر و سطح آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) بر اساس تبدیل نیتروفنیل فسفات به نیترو فنول و فسفات در طول موج ۴۰۵ نانومتر تعیین و براساس میزان جذب نوری (OD) و فرمول ارائه شده در دستورالعمل کیت‌های پارس آزمون محاسبه گردید (Moss and Henderson, 1999).

میزان پروتئین کل (TPr)

سنجش میزان پروتئین کل (TPr)^۱، در هر عصاره بافتی با استفاده از روش Bradford (1976)، انجام پذیرفت. در این روش برای تعیین غلظت پروتئین، از منحنی استاندارد پروتئین آلبومین گاوی (BSA)^۲ ۰/۲ mg/ml، استفاده گردید. در ادامه طیف جذبی نمونه‌ها، توسط دستگاه میکروپلیت ریدر BioTek، در طول موج ۵۹۵ nm قرائت گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی سرم خون

فعالیت آنزیم کاتالاز نمونه‌های سرم خون ماهیان بر مبنای روش پیشنهادی (Korolyuk 1988)، سنجش گردید. به منظور ارزیابی فعالیت آنزیم کاتالاز، حجم نهایی واکنش در ۲۰۵ µl تنظیم شد که مشتمل بر سرم خون، بافر Tris-HCl ۰/۰۵ mM با pH=۷/۸ و ۰/۰۳٪ H₂O₂ ۱۰ mM بود، منتهی این واکنش پس از قرارگیری به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی با افزودن آمونیوم مولیبدات ۴٪ متوقف گردید. سپس غلظت آنزیم بر مبنای قرائت اختلاف جذب نوری (Δ) بین نمونه A(s) و کنترل A(c) در طول موج ۴۱۰ نانومتر، توسط دستگاه میکروپلیت ریدر BioTek سنجش گردید.

کل آن‌ها با تخته بیومتری با دقت ۱ mm اندازه‌گیری شد. قبل از اجرای آزمون زیست‌سنجی، بچه‌ماهیان به مدت ۲۴ ساعت گرسنه نگه‌داشته شدند. در پایان دوره تیمار بندی، ابتدا ماهیان به سطل حاوی ۱۰۰ ppm داروی بیهوشی ۲- فنوکسی اتانول منتقل گردیدند تا بیهوش شوند (Genc et al., 2007; Giannenas et al., 2012)، سپس خون‌گیری با استفاده از سرنگ هپارینه ۲/۵ میلی لیتری از ساقه دمی از تعداد ۳ قطعه از ماهیان در هر تکرار تیمار صورت گرفت. برای جداسازی سرم خون، نمونه‌های خون به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند، سپس نمونه‌های سرم از خون جدا شده و تا قبل از انجام آزمون‌های بیوشیمیایی در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Genc et al., 2007).

اندازه‌گیری سطوح آنزیم‌های کبدی در سرم خون

به منظور تعیین شاخص‌های بیوشیمیایی خون، پس از تهیه نمونه‌های سرمی خون ماهیان هر تیمار، از روش رنگ‌سنجی مطابق بر دستورالعمل کیت‌های تشخیصی پارس آزمون (ایران) و با بهره‌گیری از دستگاه طیف سنج قرائت گر میکروپلیت (BioTek، آمریکا)، در طول موج‌های تعریفی برای هر شاخص استفاده شد. در این راستا، سطح فعالیت آنزیم‌های آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) سرم بر اساس مقدار مصرف نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید (NADH) و تبدیل آن به NAD⁺ در طول موج ۳۴۰ نانومتر، سطح لاکتات دهیدروژناز (LDH) سرم بر اساس تبدیل پیرووات به لاکتات در طول موج ۳۴۰

³-Ammonium molybdate

¹-Total protein

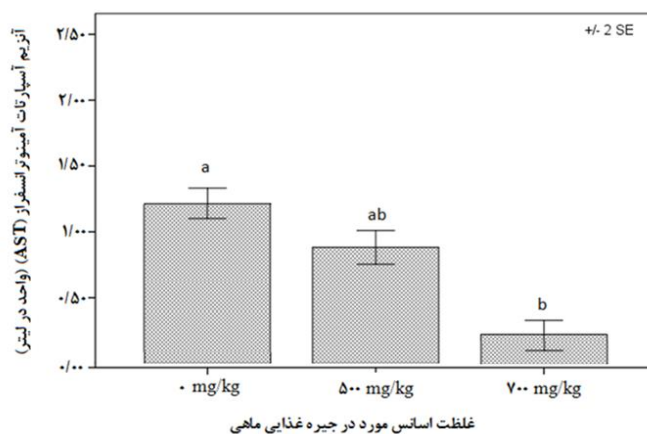
²-Bovine serum albumin

تجزیه و تحلیل داده ها

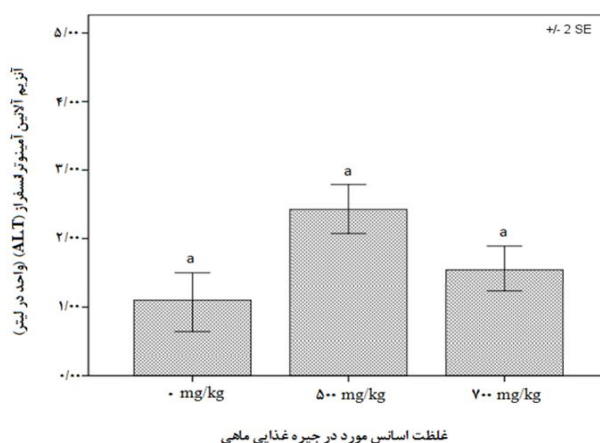
در نهایت کلیه داده‌های جمع‌آوری شده در نرم افزار Excel ثبت و داده‌ها توسط نرم افزار SPSS 16 با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و پس آزمون دانکن مورد ارزیابی قرار گرفتند و وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف نسبت به گروه شاهد در سطح اطمینان ۹۵٪ سنجیده شد.

نتایج

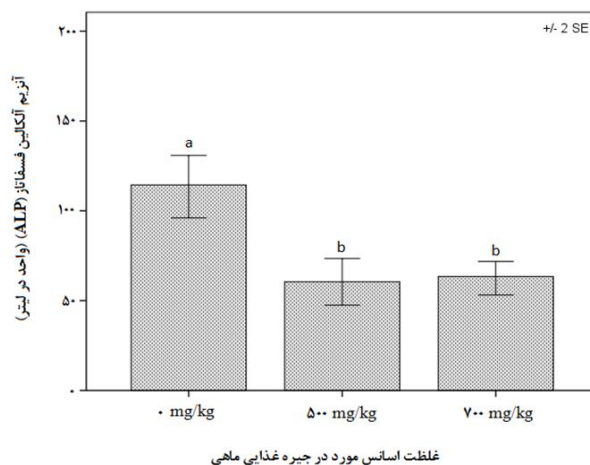
در تحقیق حاضر، در طی دوره آزمایش در هیچ یک از تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد مرگ و میری مشاهده نشد. نتایج اندازه‌گیری آنزیم‌های سرمی در خون بچه‌ماهیان کپور معمولی نشان می‌دهد که سطح فعالیت آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، طی مواجهه ماهیان با افزایش غلظت اسانس گیاه مورد در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشته است ($P < 0.05$) (شکل ۱).



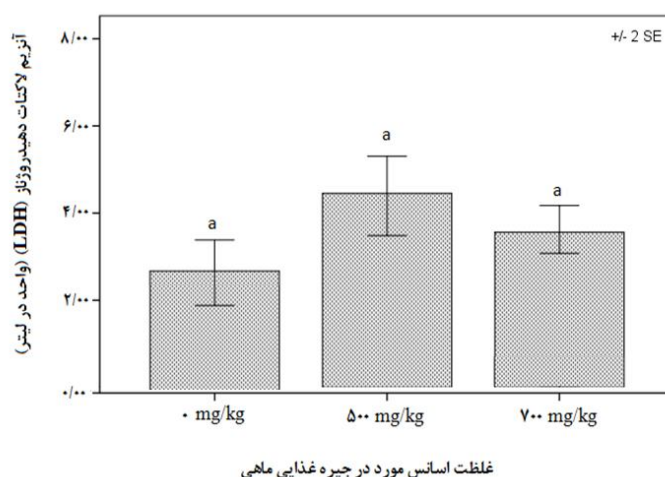
شکل ۱: تغییرات آنزیم AST در خون بچه‌ماهیان کپور معمولی طی مواجهه با سطوح مختلف اسانس گیاه مورد. بیان داده‌ها به شکل میانگین $\pm$ انحراف معیار و حروف لاتین ناهمنام نشانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0.05$).



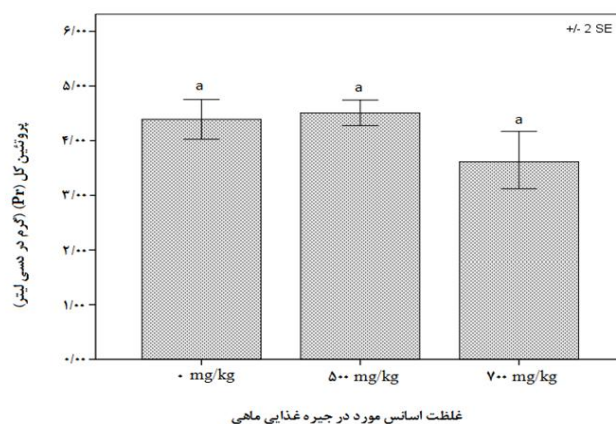
شکل ۲: تغییرات آنزیم ALT در خون بچه‌ماهیان کپور معمولی طی مواجهه با سطوح مختلف اسانس گیاه مورد. بیان داده‌ها به شکل میانگین $\pm$ انحراف معیار و حروف لاتین ناهمنام نشانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0.05$).



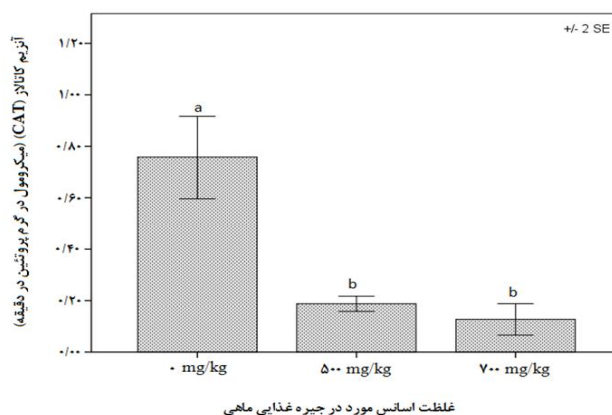
شکل ۳: تغییرات آنزیم ALP در خون بچه‌ماهیان کپور معمولی طی مواجهه با سطوح مختلف اسانس گیاه مورد. بیان داده‌ها به شکل میانگین $\pm$ انحراف معیار و حروف لاتین ناهمنام نشانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0.05$).



شکل ۴: تغییرات آنزیم LDH در خون بچه‌ماهیان کپور معمولی طی مواجهه با سطوح مختلف اسانس گیاه مورد. بیان داده‌ها به شکل میانگین $\pm$ انحراف معیار و حروف لاتین ناهمنام نشانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0.05$).



شکل ۵: تغییرات غلظت پروتئین تام در خون بچه‌ماهیان کپور معمولی طی مواجهه با سطوح مختلف اسانس گیاه مورد. بیان داده‌ها به شکل میانگین $\pm$ انحراف معیار و حروف لاتین ناهمنام نشانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0.05$).



شکل ۶: تغییرات آنزیم CAT در خون بچه‌ماهیان کپور معمولی طی مواجهه با سطوح مختلف اسانس گیاه مورد. بیان داده‌ها به شکل میانگین $\pm$ انحراف معیار و حروف لاتین ناهمنام نشانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0.05$).

مختلف اسانس گیاه مورد بر فعالیت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و به طور ویژه، آنزیم کاتالاز سرم خون بچه ماهیان کپور نشان می‌دهد، که روند کاهش فعالیت CAT، تابعی از افزایش غلظت اسانس بوده و اختلاف آن نسبت به گروه شاهد معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$) (شکل ۶). لذا افزایش دوز این مکمل با مهار فعالیت آنزیم CAT در گروه‌های تیمار همراه بوده است.

بحث

امروزه عوامل متعددی شناسایی شده‌اند که می‌توانند فشار مضاعفی را بر مشکلات پیش‌رو در صنعت آبرزی پروری اعمال نمایند، نظیر کمبود و یا افزایش قیمت مواد خام سازنده غذای ماهیان نظیر، پودر ماهی و یا دیگر مشتقات مشابه آن، که چالش اصلی در افزایش پایدار بازده تولید در سیستم‌های تکثیر و پرورش ماهیان محسوب می‌شوند. با این وجود، استفاده از پروتئین‌های غذایی و مواد خام کم‌هزینه و نامرغوب با درصداپایین ریزمغذی‌ها و مکمل‌های غذایی می‌تواند منجر به کاهش نرخ هضم‌پذیری پروتئین و افزایش نامتعادل سطوح اسیدهای آمینه و کربوهیدرات‌ها و

همانطور که در شکل‌های ۲ و ۴ مشاهده شد، سطح فعالیت آنزیم‌های آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) و لاکتات دهیدوژناز (LDH) در گروه تیمار با غلظت ۵۰۰ mg/Kg اسانس در جیره غذایی ماهی، نسبت به گروه‌های تیمار ۷۰۰ mg/Kg و نیز گروه شاهد بالاتر بوده، ولی با این حال میزان این دو آنزیم تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌های شاهد و تیمارها نشان نمی‌دهد ($P > 0.05$). نتایج حاصله از آنالیزهای آماری آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز (ALP)، نیز نشان می‌دهد که در هر دو غلظت تیمار در طول دوره مجاورت سطح فعالیت آنزیم کاهش یافته و اختلاف آن نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بوده است ($P < 0.05$). با این حال پایین‌ترین سطح ALP در غلظت ۵۰۰ mg/Kg اسانس در جیره غذایی ماهی، مشاهده شده که برابر با U/L 60.5 ± 14.5 بوده است (شکل ۳). نتایج حاصله از سنجش میزان پروتئین تام سرم خون ماهیان بر اساس شکل ۵ نیز نشان داد که سطح کل پروتئین‌های سرم در تیمار ۷۰۰ mg/Kg اسانس در جیره غذایی ماهی، نسبت به تیمار دیگر و گروه شاهد کاهش یافته، ولی اختلاف آن‌ها معنی‌دار نبوده است ($P > 0.05$). تاثیر سطوح

فیبرها در غذا گردد. این امر منجر به مصرف بیشتر غذا، مستعد شدن به بیماری و تولید مواد دفعی بالاتر می‌گردد که هم هزینه تولید را بالا می‌برد و هم بازده تکثیر را کاهش می‌بخشد (Gonçalves and Santos, 2015). اما در این بین، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که مکمل‌های غذایی فیتوژنیک^۱ نظیر اسانس و عصاره گیاه مورد، ضمن افزایش مقاومت به میکروب‌ها، باکتری‌ها و عوامل بیماری‌زا (Suphoronski et al., 2019; Lillehoj et al., 2018; Sutli et al., 2018; Beni et al., 2017; Saiedi et al., 2014; Akin et al., 2010; Gholamhoseinian Najar et al., 2009; Azadbakht et al., 2004; Khaleghi, 1996)، سبب تحریک فعالیت گوارشی شده و قابلیت جذب و هضم غذا را نیز در آبزیان بهبود می‌بخشند (Mohiti-Asli and Ghanaatparast-Rashti, 2018; Menanteau-Ledouble et al., 2015; Feibt et al., 2005).

نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر نشان داد که تغییرات فعالیت آنزیم‌های کبدی در سرم نظیر ALP، ALT و ALT و فاکتورهای مرتبط با استرس نظیر آنزیم کاتالاز و پروتئین تام در طی یک دوره تیمار ۶۰ روزه ماهیان کپور معمولی با اسانس گیاه مورد، پاسخ‌های بیوشیمیایی و ایمنی را در پی داشته است. به نحوی که ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم اسانس گیاه مورد (*M. communis*) در تمامی پارامترهای سنجش شده، عملکرد بهینه‌تری را در مقایسه با گروه شاهد و دیگر تیمار (۷۰۰ mg/Kg) مذکور ابراز نمودند. آنزیم‌های ALT و AST به‌طور متداول جهت تشخیص آسیب بافت‌های ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرند. همچنین این آنزیم‌ها به آلودگی‌های محیطی و سمیت ناشی از ترکیبات

زنوبیوتیک حساس بوده و قبل از بروز اثرات خطرناک نسبت به آن‌ها پاسخ می‌دهند (Flart et al., 2011). آنزیم‌های ALT و AST جزو خانواده آنزیم‌های آمینوترانسفراز هستند که نقش مهمی در تنظیم متابولیسم پروتئین و آمینواسیدها و فعالیت ترانس آمینازها دارند (Atli et al., 2006). افزایش فعالیت این آنزیم‌ها احتمالاً به نقش‌شان در تنظیم فرآیند گلوکونوزن (چرخه بازسازی گلوکز در کبد) جهت پاسخ به تقاضای انرژی جانور در شرایط تنش‌زا، باز می‌گردد، زیرا افزایش ترانس آمینازها یک مکانیسم ایمنی است که در مراحل اولیه استرس روی می‌دهد (Lin et al., 1997). آنزیم ALP نیز، اگرچه در تمامی بافت‌های ماهیان از جمله سلول‌های کبدی، اپی تلیوم مجاری صفراوی و نیز مخاط روده و کلیه‌ها تولید می‌شود، اما سطح این آنزیم، تنها در زمانی که اختلالات کبدی، نکرز بافتی کبد، انسداد و یا آسیب اپتیلیوم مجاری صفراوی داخل و خارج کبد، سیروز و یا آسیب بافتی در روده ماهی رخ دهند، به شدت در خون افزایش می‌یابد (Agrahari and Gopal, 2009)، لذا به‌عنوان شاخص مسمومیت‌های سلولی به زنوبیوتیک‌ها نیز، شناخته شده‌اند (Lohner et al., 2001). در این راستا و بنابر نتایج ارائه شده، روند نزولی سطوح فعالیت هر سه آنزیم کبدی مورد آزمون (ALP، ALT و AST) در سرم خون (شکل ۳)، به تبعیت از افزایش غلظت اسانس در جیره غذایی بچه‌ماهیان کپور معمولی نشان دهنده عدم القای استرس و بروز اثرات سیتولیزی بر سلول‌های کبدی و تحریک رهایش آنزیم‌های فوق ذکر تحت تاثیر حضور اسانس مورد در جیره غذایی ماهیان بوده است، زیرا نشت این آنزیم‌ها از سیتوزول کبد به داخل

¹-Phytogetic feed additives

جریان خون و افزایش آن‌ها در سرم ناشی از بروز اختلالات بافت شناسی و آسیب‌های کبدی متأثر از اثرات استرس اکسیداتیو و تولید رادیکال‌های آزاد است (Flart *et al.*, 2011) که در پژوهش حاضر این طیف از واکنش‌های مشابه مشاهده نگردید. در شرایط تنش‌زا، تغییرات غدد درون‌ریز و ترشحات هورمون‌های گلوکورتیکوتروپینی^۱ (ارتقای سطح واکنش‌های گلکوکورتیزون) (Remyla *et al.*, 2008)، افزایش سطح گلوکز سرمی را در پی دارد. این هورمون‌ها با افزایش کاتابولیسم پروتئین‌ها در بافت‌ها، موجب افزایش سطح جذب اسید آمینه توسط کبد و افزایش فعالیت آنزیم‌های آمینوترانسفراز و سایر آنزیم‌های موثر در چرخه بازسازی گلوکز در کبد می‌شوند. از طرفی، گلکوکورتیکوئیدها^۲ نیز از مصرف گلوکز توسط بافت‌های خارج کبدی ممانعت به عمل آورده و نهایتاً سطح گلوکز خون را ترفیع می‌بخشند (Remyla *et al.*, 2008). بنابر نتایج این تحقیق حضور اسانس مورد در جیره غذایی به عنوان یک عامل محرک، افزایش کاتابولیسم پروتئین و کاهش سطح پروتئین تام و نیز افزایش فعالیت آنزیم‌های گلیکولیتیک مانند لاکتات دهیدروژناز را در پی داشته است که این امر می‌تواند در راستای نقش LDH در کاهش ذخایر گلیکوژنی و پیرو آن، افزایش غلظت گلوکز خون باشد، اما نظر به این که اختلاف بین گروه‌های تیمار و شاهد معنی دار نیست (شکل‌های ۵ و ۴) به نظر می‌رسد این اثرات القای تولید LDH و کاهش پروتئین تحت تاثیر تنش نبوده و در راستای تقویت سیستم دفاعی و

ایمنی بدن ماهیان بوده است. در ارتباط با تحریکات سیستم دفاع آنتی اکسیدانی، آنزیم CAT یکی از انواع آنزیم‌های موجود در پراکسی‌زوم^۳ است، که جز سدهای دفاعی اولیه سلول نسبت به اکسیدان‌ها بوده و حذف و زدایش رادیکال‌های آزاد حاصله از H₂O₂ را تسهیل نموده و آن‌ها را به اکسیژن مولکولی و آب متابولیزه می‌نماید (Hao and Chen, 2012). تغییرات فعالیت این آنزیم، معمولاً به عنوان شاخص زیستی برای نشان دادن وضعیت استرس اکسیداتیو مورد استفاده قرار می‌گیرد. بنابر نتایج ارائه شده در تحقیق حاضر (شکل ۶)، افزایش غلظت اسانس گیاه مورد در جیره غذایی طی دوره تیمار، مهارکننده فعالیت آنزیم CAT خون ماهیان بوده است و اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌های تیمار و شاهد، نشان داده است. در این جا به نظر می‌رسد، غلظت آنزیم CAT در جهت خشی نمودن استرس و تحریکات سیستم دفاع آنتی اکسیدانی، روند کاهشی را به تبعیت از افزایش غلظت اسانس در جیره غذایی بچه ماهیان کپور معمولی، به نمایش گذارده است، به نحوی که، افزایش جبرانی فعالیت آنزیم در دوزهای بالای اسانس مشاهده نگردید و احتمال می‌رود این شرایط متأثر از تحریک سیستم دفاعی، افزایش تولیدات گونه فعال اکسیژن (ROS^۴)، افزایش سطح متابولیسم، افزایش غلظت گلوکز و سطح بالای سوخت و ساز بدن بوده که نهایتاً تلاش در جهت پاکسازی اکسی رادیکال‌های آزاد و تنظیم و تعدیل آن‌ها، مصرف آنزیم و تخریب ساختار آنزیمی آن را طی مقابله با سوپراکسید رادیکال‌های فعال در پی داشته است. این نتایج

یکی از اندامک‌های غشادار سلولی است، که محتوی Peroxisomes^۱ انواعی از آنزیم‌های موثر در واکنش‌های متابولیک است.

^۱-Reactive oxygen species

^۱-Glu-corticotropin

^۲-Glucocorticoids

نشان می‌دهد بهره‌گیری از ترکیبات با منشأ گیاهی نظیر اسانس گیاه *M. communis* می‌تواند سطوح القای فعالیت آنتی اکسیدانی را در ماهیان ارتقا بخشد. برگ‌های گیاه مورد (*M. communis* L)، محتوی تانن‌ها، روغن‌های فرار و ترکیبات فلاونوئیدی است (Baytop, 1999) که تقویت کننده سیستم دفاع آنتی اکسیدانی بوده و اسانس آن نیز واجد ترکیبات ترپنی، فنلی و پراکسیدی است (Naseian, 1997) که در مقادیر کم می‌توانند سبب بهبود کارایی تغذیه و اشتها در ماهیان گردد (Feibt et al., 2005). مطالعات گذشته نیز اذعان داشتند که مهمترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس گیاه مورد که در مجموع ۹۶/۳ درصد از وزن اسانس برگ خشک را تشکیل می‌دهند عبارتند از ترکیب‌هایی چون 1,8-cineole (۲۳/۴٪)، Linalyl (۲۲/۴٪)، Limonene (۱۹/۲٪)، Linalool (۱۱/۷٪) و acetate (۶/۱٪) (Barazandeh, 2000) که در این بین، ترکیباتی با بالاترین درصد مشارکت چون سینئول، اثرات آرام بخش، ضد آلرژی و محرک ترشحات صفراوی در کبد داشته و آلفا پنین نیز، اثرات ضدالتهابی و ممانعت از تحریکات سیستم ایمنی را القا می‌نماید (Mir Azadi et al., 2012).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اگرچه در طول دوره تیمار تغذیه‌ای ۶۰ روزه ماهیان با جیره غذایی غنی شده با اسانس گیاه مورد (*M. communis*)، فعالیت شاخص‌های آنزیمی کبد چون AST، ALT، ALP و LDH و آنزیم آنتی اکسیدانی نظیر CAT در سرم خون بچه‌ماهیان کپور معمولی به تبعیت از افزایش غلظت اسانس در جیره غذایی تغییر نموده است، ولی سطوح این تغییرات بیوشیمیایی طبیعی بوده و در نهایت سلامت

این ماهیان را تحت‌تاثیر قرار نداده است. از منظر دوز مصرفی مکمل غذایی اسانس مورد نیز، بنابر نتایج ارائه شده، جیره حاوی ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم اسانس گیاه مورد توصیه می‌گردد. با این حال اثرات این مکمل غذایی در دیگر ماهیان گرمابی به‌ویژه در شرایط تحت تنش و یا چالش بیماری، نیازمند بررسی‌های تکمیلی خواهد بود.

سپاسگزاری

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

منابع

۱. پذیرا، ع.، ۱۳۹۶. فعالیت ضد قارچی اسانس آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) بر روی قارچ‌های جداشده از پوست ماهی کوی (*Cyprinus carpio* var. Koi). نشریه توسعه آبرزی پروری، ۱۱(۲)، ۱۳-۲۲.
۲. فلاح پور، ف.، بنایی، م.، جواد زاده، ن.، ۱۳۹۶. اثرات تجویز خوراکی عصاره گل ختمی (*Althaea officinalis*) بر سلول‌های خونی و برخی آنزیم‌های کبدی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). نشریه توسعه آبرزی پروری، ۱۱(۲)، ۱۰۵-۱۱۷.

3. Agrahari, S., Gopal, K., 2009. Fluctuations of certain biochemical constituents and markers enzymes as a consequence of monocrotophos toxicity in the edible freshwater fish, *Channa punctatus*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 94, 5-9.
4. Aidiwannes, W., Mohamodi, B., Marzouk, B., 2005. Variation in essential oil and fatty

- microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
14. Burt, S.A., Reinders, R.D., 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7. *Letters in Applied Microbiology*, 36(3), 162-166.
 15. De laurentis, N., Rosato, A., Callo Leone, L., Milillo, M.A., 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of *Myrtus communis*. *Revista italiana EPPOS*, 39, 3-8.
 16. Ekor, M., 2013. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacol*, 4, 177.
 17. Feibt, C., Franke, L., Appendino, G., Werz, O., 2005. Identification of molecular targets of the oligomeric nonprenylated acylphloroglucinols from *Myrtus communis* and their implication as anti-inflammatory compounds. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 315, 389-396.
 18. Flart, O., Cogun, H.Y., Yüzereroğlu, A.T., Gök G., Flrat, O., Kargin, F., Kötemen Y., 2011. A comparative study on the (cypemethrin) and two metals (copper, lead) to serum biochemistr of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 37, 657-666.
 19. Genc, M., Aktas, M., Genc, E., Yilmaz, E., 2007. Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth, body composition and hepatopancreas histology of *Penaeus semisulcatus* (de Haan 1844), *Aquaculture Nutrition*, 13(2), 156-161.
 20. Gholamhoseinian, Najar, A., Mansouri, S., Rahighi, S. 2009. Eeffect of sub-inhibitory concentration of *Myrtus communis* leave extracts on the induction of free radicals in *Staphylococcus aureus*; A possible mechanism for the antibacterial action. *Asian Journal of Plant Sciences*, 8(8), 551-6.
 21. Goncalves, R. and Santos, G., 2015. Phytogenics for better profitability and sustainability. *Aquaculture Asia Pacific*, pp. 34-36.
 - asid composition during *Myrtus communis* var *italica* fruit maturation. *Food Chemistry*, 112, 621-626.
 5. Akin, M., Aktumsek, A., Nostro, A., 2010. Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. and *Myrtus communis* L. growing in Northern Cyprus. *African Journal of Biotechnology*, 9(4), 531-5.
 6. Aleksic, V., Knezevic, P., 2014. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiological Research*, 169(4), 240-254.
 7. Atli, G., Alptekin, O., Tukel, S., Canli, M., 2006. Response of catalase activity to Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143(2), 218-224.
 8. Azadbakht, M., Ziaiye, H., Abdollahi, F., Shabankhani, B., 2004. Effect of methanolic essence and extract of *Myrtus Communis* on *Trichomonas Vaginalis*. *Journal of Guilan University of Medical Sciences*, 12(48), 8-13.
 9. Bahadori Birgani, S., Roomiani, L., Chelehmal Dezfulezhad, M., 2018. The effect of the extract supplements (*Myrtus communis* L.) on growth, survival, blood and immune system of fish Common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Animal Researches (Iranian journal of biology)*, 31(3), 329-341.
 10. Barazandeh, M.M., 2000. Essential oil composition of *Myrtus communis* L. from Iran. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 6(1), 115-127.
 11. Baytop, T., 1999. Therapy with medicinal plants in Turkey (past and present). 2nd ed. Nobel Tıp Kitabevi, Istanbul Ertug F., 2000.
 12. Beni, A.S., Kocheki, Shahmokhtar, M., Masoumiasl, A., Khajehsharifi, H., 2017. Phytochemical and biological studies of some *Myrtus* (*Myrtus communis* L.) populations of south west region of Zagros (Iran). *Natural Products Chemistry and Research*, 5(7), 1000290.
 13. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of

- performance and some innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). International Journal of Aquatic Biology, 5(4), 252- 259.
32. Menanteau-Ledouble, S., Krauss, I., Santos, G., Fibi, S., Weber, B., El-Matbouli, M., 2015. Effect of a phytogenic feed additive on the susceptibility of *Oncorhynchus mykiss* to *Aeromonas salmonicida*. Diseases of Aquatic Organisms, 115(1), 57-66.
 33. Messaoud, C., Zaouali, Y., Ben Saleh, A., Khoudja, M.L. Boussaid, M., 2005. *Myrtus communis* in Tunisia variability of the essential oil composition in natural population. Flavour and Fragrance Journal, 20, 577-582.
 34. Mir Azadi, Z., Var, B., Meshaktosadat, M.H. Karamian, R., 2012. Site quality and essential oil composition of *Myrtus Communis* L. (case study: Cham moord site in Lorestan province). Agricultural Biotechnology Journal, 3(2), 71-80.
 35. Mohiti-Asli, M., Ghanaatparast-Rashti, M., 2018. Comparing the effects of a combined phytogenic feed additive with an individual essential oil of oregano on intestinal morphology and microflora in broilers, Journal of Applied Animal Research, 46(1), 184-189.
 36. Moss, D., Henderson, A., 1999. Clinical enzymology in: Burtis, C.A., Ashwood, F.R. editors, Tietz textbook of clinical chemistry. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 721 pp.
 37. Mozaffarian, V.A., 1996. Dictionary of Iranian plant names. Farhang moaser, Tehran, Iran, 547 pp.
 38. Naseian, R., 1997. Study of phytochemical and antimicrobial activity extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. PhD Thesis University of Science Medical of Shiraz.
 39. Nasiri, E., Hesari, J., Shekarforoush, S., Kooshesh, S., 2016. Effect of aqueous extract of myrtle leaves (*Myrtus communis*) on quality changes of farmed gutted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chilled ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) storage. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 25 (3), 1-14.
 22. Hajibeglou, A., Sudagar, M., 2010. Immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with herbal immunostimulants diets. Journal of Animal and Veterinary Advances, 9(13), 1839-1847.
 23. Hao, L., Chen, L., 2012. Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles. Ecotoxicology and Environmental Safety, 80, 103-110.
 24. Hennia, A., Nemmiche, S., Dandlen, S., Miguel, M.G., 2019. *Myrtus communis* essential oils: insecticidal, antioxidant and antimicrobial activities: A review. Journal of Essential Oil Research, 31(6), 487-545.
 25. Hennia, A., Miguel, M.G., Nemmiche, S., 2018. Antioxidant activity of *Myrtus communis* L. and *Myrtus nivellei* Batt. and Trab. extracts: A brief review. Medicines (Basel), 5(3), 89.
 26. Khaleghi, M., 1996. Study of ten plant essential oil effect on Methycillin- resistant *Staphylococcus aureus* isolated from health vector and clinical samples. MSc Thesis University of Science Medical of Kerman.
 27. Koroluk, M., Ivanova, L., Maiorova, I., 1988. The method of definition of the activeness of catalase, Laboratorial work, 1, 16-19.
 28. Lillehoj, H., Liu, Y., Calsamiglia, S., Fernandez-Miyakawa, ME., Chi, F., Cravens, RL., Oh, S., Gay, C.G., 2018. Phytochemicals as antibiotic alternatives to promote growth and enhance host health. Veterinary Research, 49(1), 76.
 29. Lin, L., Yang, Y.J., Yang, S.S., Leu, M.L., 1997. Aluminum utensils contribute to aluminum accumulation in patients with renal disease. American Journal of Kidney Diseases, 30(5), 653-658.
 30. Lohner, T.W., Reash, R.J., Williams, M., 2001. Assessment of tolerant sunfish populations (*Lepomis* sp.) inhabiting seleniumladen coal ash effluents: 2. Tissue biochemistry evaluation,” Ecotoxicology and Environmental Safety, 50(3), 217-224.
 31. Mansouri Tae, H., Hajimoradloo, A., Hoseinifar, S.H., Ahmadvand, H., 2017. The effects of dietary Myrtle (*Myrtus communis* L.) supplementations on growth

- on fish health and stability in feed. Reviews in Aquaculture, 10(3), 716-72.
46. Twaij, H.A., Ali, H.M., Al-Zohyri, A.M., 1988. Phytochemical and antimicrobial studies of *Myrtus communis*. Research Journal of Biological Sciences, 19, 29-39.
 47. Zargari, A., 1997. Medicinal plant. Tehran, Iran, 130 pp. (In Persian).
 48. Zargari, A., 1989. Plant Medical. University of Tehran Press. pp. 645-647.
 49. Saiedi, S., Bokaiean, M., Khaleghi, M., 2014. Assessment of antimicrobial activity of *Myrtus communis* extract against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Applied Biology, 26(2), 37-46.
 50. Suphoronski, S.A., Chideroli, R.T., Facimoto, C.T., Mainardi, R.M., Souza, F.P., Lopera-Barrero, N.M., Jesus, G.F. A., Martins, M.L., Di Santis, G.W., de Oliveira, A., Gonçalves, G.S., Dari, R., Frouel, S., Pereira, U.P., 2019. Effects of a phytogenic, alone and associated with potassium diformate, on tilapia growth, immunity, gut microbiome and resistance against francisellosis. Scientific Reports, 9, 6045.
 51. Sutli, F.J., Gatlin III, D.M., Heinzmann, B.M. Baldisserotto, B., 2018. Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. Reviews in Aquaculture, 10(3), 716-726.
 40. Omid baigi, R., 2005. Production and Processing of medicinal plants. Tehran University, Iran, 283 pp.
 41. Otatake, M., Kiryu, I., Nakanishi, T., 2002. Development of vaccine delivery method for fish: *Parcutaneous* administration by immersion with application of multiple puncture instruments. Journal of Vaccine, 1, 3764-3769.
 42. Peterson, B.C., Bosworth, B.G., Li, M.H., Beltran, R., Santos, G.A., 2014. Assessment of a phytogenic feed additive (Digestarom PEP MGE) on growth performance, processing yield, fillet composition, and survival of channel catfish. Journal of the World Aquaculture society, 45(2), 206-212.
 43. Remya, S.R., Ramesh, M., Sajwan, K.S., Kumar, K.S., 2008. Influence of zinc on cadmium induced haematological and biochemical responses in a freshwater teleost fish *Catla catla*. Fish physiology and biochemistry, 34(2), 169.
 44. Salimi Beni, A., Kocheki Shahmokhtar, M., Masoumiasl, A., Khajehsharifi, H., 2017. Phytochemical and biological studies of some *Myrtus* (*Myrtus communis* L.) populations of South West Region of Zagros (Iran). Natural Products Chemistry and Research, 5(7), 290.
 45. Sutli, F.J., Gatlin, III D.M., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., 2018. Plant essential oils as fish diet additives: benefits