"مقاله پژوهشی"

تغییرات رشد، آنزیم‌های گوارشی، فلور باکتریایی روده و پارامترهای خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با نانو عصاره گیاه فراسیون سفید (*Marrubium vulgare*) و پروبیوتیک

راحله میرزایی[۱]، فرید فیروزبخش[۱]*، حسین اورجی[۱]

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۸/۵ تاریخ پذیرش۱۴۰۲/۱۰/۱۲

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی تغییرات رشد، آنزیم‌های گوارشی، فلور باکتریایی روده و پارامترهای خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با نانو عصاره گیاه فراسیون سفید (*Marrubium vulgare*) و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*lactobacillus plantarum*) و باسیلوس سابتیلیس (*Bacillus subtilis*) انجام‌گردید. برای این طرح ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن متوسط ۰/۲±۸/۶۶ گرم به مدت ۸ هفته در چهار تیمار (تیمارشاهد: بدون نانو عصاره گیاه و پروبیوتیک، تیمار۲: ۴۰۰ میلی‌گرم نانو عصاره گیاه و ۱ گرم پروبیوتیک ، تیمار۳: ۸۰۰ میلی‌گرم نانو عصاره گیاه و ۱ گرم پروبیوتیک و تیمار۴: ۱ گرم پروبیوتیک با نسبت مساوی از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *باسیلوس سابتیلیس*) در هرکیلوگرم از جیره غذایی در ۱۲ تانک به تعداد ۲۰ قطعه، مورد آزمایش قرارگرفتند. در پایان دوره علاوه بر وزن ماهیان، ترکیبات لاشه شامل رطوبت، پروتئین، چربی و خاکستر اندازه‌گیری شد. همچنین به منظور سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی خون و آنزیم‌های کبدی از ماهیان در پایان دوره خونگیری انجام شد. طبق نتایج وزن نهایی، کارایی پروتئین و درصد بازماندگی در تیمار۲ بیشترین مقدار را نسبت به سایر تیمارها داشت. همچنین، تیمار ۳ دارای بیشترین ضریب تبدیل غذایی نسبت به سایر تیمارها بود اما تیمار ۲ کمترین مقدار ضریب تبدیل غذایی را در بین تیمارها نشان داد.گلبول قرمز،گلبول سفید، هموگلوبین، هماتوکریت در تیمار ۲ به طور معنی‌داری افزایش یافتند ($p<۰/۰۵$). میزان گلوکز، تری‌گلیسرید، پروتئین کل و میزان آنزیم‌های کبدی AST، ALT و ALP گروه‌های مختلف تیماری ماهیان، اختلاف معنی‌داری را با یکدیگر نشان دادند ($p<۰/۰۵$) و همچنین میزان آن در تیمارها نسبت به گروه شاهد کمتر بود. آنزیم آمیلاز تحت تاثیر سطوح پروبیوتیک و نانو عصاره گیاه ارتقا یافت و بیشترین میزان مربوط به تیمار ۲ بود. آنزیم تریپسین و کیموتریپسین در تیمارهای ۲ و ۳ اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان دادند ($p<۰/۰۵$). نتایج این تحقیق نشان داد که ۴۰۰ میلی‌گرم نانو عصاره گیاه فراسیون در هرکیلوگرم غذا و پروبیوتیک به عنوان یک مکمل غذایی می‌تواند اثر مثبتی روی فاکتورهای رشد و شاخص‌های بیوشیمیایی خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان داشته باشد.

کلمات کلیدی: فراسیون سفید، قزل‌آلای رنگین‌کمان، پروبیوتیک، نانو عصاره

* عهده‌دار مکاتبات: f.firouzbakhsh@sanru.ac.ir r

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-16]

مقدمه

ماهی به عنوان یک منبع ارزشمند از پروتئین و چربی با کیفیت بالا در رژیم غذایی انسان جایگاه ویژه‌ای دارد و صنعت آبزی‌پروری در تأمین این غذای با ارزش برای جمعیت روزافزون بشری نقش مهمی را ایفا می‌کند. در راستای افزایش تولید ماهی، استفاده از جیره‌های غذایی سالم که علاوه بر حفظ سلامتی و بهبود عملکرد رشد ماهی در طول پرورش، ضامن سلامتی مصرف کننده نیز باشد، ضرورت بیشتری می‌یابد. ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان یکی از مهمترین ماهیان پرورشی در سراسر جهان است (Hardy, 2017; Neto *et al*., 2019). یکی از رویکردهای جدید در صنایع پرورش دام، طیور و آبزیان جهت حفظ و افزایش تولید، استفاده از اسانس‌های گیاهی در جیره‌های غذایی می‌باشد. مطالعات نشان داده است که استفاده از اسانس‌های گیاهی موجب تقویت رشد، تحریک سیستم ایمنی و تغییر برخی پارامترهای خون‌شناسی می‌شود (قاسمی پیربلوطی و همکاران، ۱۳۹۰). امروزه استفاده از مواد شیمیایی همچون آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت کشاورزی و آبزی‌پروری با نگرانی روزافزونی رو به رو شده است (Van Hai, 2019; Dawood, 2016). شواهد نشان می‌دهد گیاهان دارویی از سالیان دور برای درمان بیماری‌های مختلف مورد توجه قرار گرفته‌اند. امروزه استفاده از عصاره گیاهان دارویی به عنوان ترکیبات ضدقارچ، ضد باکتری و همچنین محرک سیستم ایمنی در ماهیان گسترش زیادی یافته است (فیروزبخش و همکاران، ۱۳۹۸).

گیاه گندنای کوهی یا فراسیون سفید با نام علمی (*Marrubium vulgar*) از خانواده نعناعیان (Lamiaceae) است. این گیاه بومی اروپا، شمال آفریقا و آسیا می‌باشد و در مناطق استپی، خشک و نیمه خشک ایران توزیع شده است (Ahvazi *et al*., 2016). این گیاه دارای گل‌های سفید با ارتفاع حدود ۵۰ سانتی‌متر، ساقه گوشه‌دار، برگ‌های مو دار با رگ‌های مشخص و به رنگ سبز متمایل به خاکستری می‌باشد. قسمت‌های مورد استفاده این گیاه قسمت‌های هوایی بصورت تازه یا خشک شده هستند که خاصیت صفرابری و خلط‌آوری، رفع سوء هاضمه، افزایش اشتها را دارا می‌باشد (شریعت بهادری و همکاران، ۱۳۹۶). در زمان مصر باستان به عنوان داروی ضد سرفه و گل‌های سفید رنگ آن به عنوان پادزهر گاز سگ‌های وحشی مورد استفاده قرارگرفته است (Meyre *et al*., 2010). در هند به عنوان داروی برونشیت، تبخال، سرفه و در آلمان نیز به عنوان داروی ضد نفخ، سوء هاضمه و اشتهاآور مورد استفاده قرارگرفته است (Halvorson *et al*., 2003). در بررسی انجام شده از عصاره‌ی این گیاه خواص ضد دیابتی آن مشخص شد. این گیاه حاوی پلی فنول‌ها و فلاونوئیدهای متنوع و ترکیباتی مانند اپی ژنین، اوروسیلک اسید، بتا – سیسترول – لیتئولین، مارابیوم، پکتین و آسکوربیک اسید می‌باشد. مشخص شده است تجویز آن به صورت مکمل به افراد، کلسترول و تری‌گلیسرید سرم را کاهش می‌دهد و دارای اثرات سودمند بر متابولیسم کربوهیدرات‌ها و لیپیدها نیز می‌باشد (Herrera *et al*., 2004). استرهای فنیل پروپانوئید مستخرج از گیاه دارای خاصیت ضدالتهابی از طریق مهار آنزیم سیکلواکسیژناز است (Sahpaz *et al*., 2002). همچنین گزارش شده است که گیاه فراسیون سفید اثر ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی دارد (Orhan *et al*., 2010). خواصی

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-16]

همچون خاصیت ضددرد، ضددیابتی، آنتی‌اکسیدان، ضداسپاسم، ضدفشار خون و خواص تقویت کننده سیستم‌ایمنی بدن مشخص شده است. نتایج تحقیق Yousefi وهمکاران (۲۰۱۶) نشان داده‌است که عصاره اتانول استخراج شده از گیاه فراسیون سفید اثر آنتی-باکتریال بر روی باکتری *Staphylococcus aureus* داشته است.

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیزم‌های زنده‌ای هستند که به تثبیت فلور میکروبی روده به نفع سلامت میزبان کمک کرده و بر ضد میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا عمل می‌کنند (حمیدی و همکاران، ۱۳۹۷) به کارگیری پروبیوتیک در جیره غذایی ماهی باعث ایجاد تعادل میکروبی روده، تحریک و افزایش کارایی سیستم ایمنی، افزایش فعالیت‌های گوارشی، افزایش هضم و جذب غذا می‌شود و به دنبال آن افزایش رشد را به همراه دارد. همچنین باکتری‌های پروبیوتیکی سبب افزایش سوخت و ساز و ترشح آنزیم‌های گوارشی - می‌شود که در نهایت منجر به افزایش قابلیت هضم چربی و پروتئین‌های موجود در جیره‌ی غذایی شده و کارایی تغذیه و رشد ماهی را به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد (نصیری پور و همکاران، ۱۳۹۷). پروبیوتیک‌ها باعث تحریک سیستم ایمنی، افزایش تولید لاکتیک‌اسید، کاهش تولید آمین‌های سمی و افزایش دسترسی به اسیدهای آمینه در محل جذب آن-ها، صرفه‌جویی انرژی و افزایش دسترسی به ویتامین‌ها و آنزیم‌ها برای میزبان می‌شوند. امروزه تمایل به مصرف ترکیباتی نظیر پروبیوتیک‌ها در حال افزایش است تا بتوان تولیدی پربازده و پایدارتر با استفاده از مواد طبیعی و بدون استفاده از مواد شیمیایی عرضه نمود (حسینی و همکاران، ۱۴۰۳). در میان پروبیوتیک‌هایی که اخیرا روی آنها تحقیق شده است گونه‌های باسیلوس گونه‌هایی هستند که افزایش ایمنی بدن و مقاومت در برابر بیماری‌ها را در ماهی به طور چشمگیری نشان داده‌اند (Abarike *et al*., 2020).

لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*Lactobacillus plantarum*) ازنظر ریخت‌شناسی باکتری‌های میله‌ای شکل با انتهای گرد هستند، آرایش سلولی آنها به‌شکل منفرد، جفتی و زنجیره‌های کوتاه است، از گروه ریز موجودات بی‌هوازی اختیاری هستند و کلنی آنها از نظر شکل ظاهری گرد و صاف و سفید یا زرد است. این باکتری‌ها از چندین منبع از جمله محصولات لبنی، میوه‌ها، سبزیجات و غذاهای تخمیر شده جدا شده اند. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* یک گونه مهم پروبیوتیک است که در فرآیند تخمیر محصولات گیاهی مختلف دخیل است. این گونه برای تولید مواد فعال مختلف شناخته شده است که برخی از آنها دارای اثرات ضد میکروبی مانند پلانتارایسین هستند که علیه پاتوژن‌های خاص عمل می‌کنند. برخی از مقالات تحقیقاتی پیشنهاد کردند که اضافه شدن *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به جیره‌ها می تواند تعادل میکروارگانیسم‌های روده میزبان را بهبود بخشد، سیستم ایمنی بدن را تقویت کند و هضم و جذب مواد مغذی را افزایش دهد. و به این ترتیب رشد موجود زنده بهبود اثربخشی در تبدیل خوراک به افزایش وزن را مشاهده خواهدکرد (Valipour *et al*., 2019). باکتری *باسیلوس سابتیلیس* نیز باکتری گرم مثبت، میله‌ای شکل و اغلب هوازی اجباری یا بی‌هوازی اختیاری می‌باشد. این باسیل‌ها در همه جا حضور دارند و به‌علت تشکیل اسپور می‌توانند سال‌ها در محیط باقی بمانند. در میان بسیاری از گونه-های پروبیوتیک، باسیلوس سابتیلیس (*Bacillus*

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-16]

subtilis) یکی از ارگانیسم‌های پروبیوتیک پرکاربرد در آبزی پروری است. به دلیل اینکه گونه‌های باکتریایی جنس باسیلوس آنزیم‌های خارجی بسیاری ترشح می‌کنند استفاده گسترده‌ای در آبزی پروری به عنوان پروبیوتیک دارند. باکتری‌های گرم مثبت خصوصا جنس باسیلوس به دلیل ترشح گسترده وسیعی از آنزیم‌های خارجی سبب افزایش فعالیت لیپاز، پروتئاز و آمیلاز در لوله گوارش می‌شوند. تحقیقات نشان داده است که باسیلوس سابتیلیس به طور مفید باعث ترویج عملکرد رشد، بهبود پاسخ های ایمنی و بقا در برخی از گونه‌های آبزی، مانند میگوی مونودون (*Penaeus monodon*) شده است (هاشمی پناه و همکاران، ۱۳۹۷). قائدنیا و همکاران (۱۳۹۹) طبق مطالعه‌ای که بر روی اثر جیره حاوی پروبیوتیک *باسیلوس سابتیلیس* (*Bacillus subtilis*) بر روی میگوی سفید غربی انجام دادند، گزارش کردند که تغذیه میگوی سفید غربی با جیره‌های حاوی مقادیر 10^7 و 10^8 CFU/Kg از این پروبیوتیک موجب افزایش معنی‌دار عملکرد سیستم ایمنی میگوها و شاخص‌های سلامتی در برابر بیماری لکه سفید می‌گردد. همچنین در تحقیقی که ضیایی نژاد و همکاران (۱۳۹۳) انجام دادند، نتایج نشان داده‌است که استفاده از آرتمیای غنی شده با باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *باسیلوس سابتیلیس* باعث بهبود شاخص‌های رشد و بازماندگی در لارو ماهی شانک (*Acanthopagrus latus*) شده است.

پروبیوتیک‌ها و پربیوتیک‌ها عموماً با تغییر در میکروفلور طبیعی روده تاثیر بر روند گوارش و جذب مواد غذایی مختلف گذاشته که این تغییرات به طور غیرمستقیم بر فاکتورهای ایمنی هومورال موجود تاثیر می‌گذارد. فرآیند نانوریزپوشانی کردن مواد باعث تأثیرگذاری بیشتر و مؤثرتر مواد غذایی برای رسیدن به نقاط خاصی در بدن میشود (سلمانپور احمدی و همکاران، ۱۳۹۴). ترکیبات فعال عصاره و اسانس‌های گیاهی فرار است. برخی از آنها به سختی محلول در آب هستند و همچنین، به راحتی اکسیده می‌شوند. یکی از راهکارها برای غلبه براین محدودیت‌ها کپسوله کردن است. برخی از مطالعات نشان می‌دهد که فرآیند کپسوله کردن قادر است خاصیت ضد میکروبی و ضد اکسایشی ترکیبات را افزایش دهد و همچنین، سبب حفظ پایداری خواص آن برای مدت طولانیتر شود (Hogan *et al.*, 2001). pH بسیار پایین معده، همچنین حضور نمک‌های صفراوی در روده، دلایل اصلی کاهش ناگهانی در قابلیت زیستی سلول‌های باکتری است. از این رو زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در مسیر دستگاه گوارش از اهمیت زیادی برخوردار است (حسینی و همکاران، ۱۳۹۶). کپسوله سازی تکنولوژی حفاظتی کپسوله کردن جامد، مایع یا گاز است. مزیت منحصر به فرد کپسوله این است که ماده هسته کاملا پوشش داده شده و از محیط خارجی جدا می‌شود. مهم‌تر از آن، نانوکپسوله سازی خواص مواد هسته‌ای را تحت تاثیر قرار نمی‌دهد (Dubey *et al.*, 2009). برخی از مطالعات نشان می‌دهد که فرایند کپسوله کردن قادر است خاصیت ضد میکروبی و ضداکسایشی ترکیبات را افزایش می‌دهد و همچنین سبب حفظ پایداری خواص آن برای مدت طولانی‌تر شود (گرایلی افرا و همکاران، ۱۳۹۸). مطالعات زیادی اهمیت نانوکپسوله کردن را تایید کردند و بیان کردند که برای این روش از عصاره طبیعی سبزیجات، پودر سبزیجات و موادی مانند مواد فنلی، کاروتنوئیدها، اسید

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-16]

اسکوربیک، توکوفرول‌ها، مواد مغذی، مواد معدنی، ویتامین‌ها و فیبر غذایی و غیره می‌توان استفاده کرد (El-Abd *et al*., 2018). به دنبال افزایش روز افزون مقاومت‌های باکتریایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تجاری رایج، گرایش به استفاده از گیاهانی با خواص ضدمیکروبی افزایش یافته است. همچنین در مطالعات انجام شده نشان داده شده است که هم‌افزایی گیاه و پروبیوتیک نقش موثری را در افزایش پاسخ ایمنی و کاهش استرس از طریق پاسخ فیزیولوژیکی برای تنظیم استفاده از ذخایر انرژی موجود در بدن داشته است. همچنین از طریق افزایش سلول‌های سفید خون و افزایش آنزیم میلوپراکسیداز در نوتروفیل خون باعث افزایش پاسخ ایمنی ماهی گردیده است. استفاده از پروبیوتیک در آبزی‌پروری امیدوار کننده بوده است، حتی در ماهی شانک (*Sparus auratus*) و ماهی قزل-آلای کاردینال (*Paracheirodon axelrodi*) پروبیوتیک باعث کاهش شاخص‌های استرس از طریق کاهش کورتیزول و گلوکز در ماهی شده است (Abarike *et al*., 2020). همچنین در مطالعه‌ای که بر روی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) انجام شد ترکیب گیاه و پروبیوتیک به طور قابل توجهی میزان رشد و ضریب تبدیل غذایی را در تیمار ترکیب گیاه و پروبیوتیک افزایش داد و باعث افزایش پاسخ ایمنی و مقاومت به بیماری گردید (Abarike *et al*., 2018). با توجه به اینکه گیاهان دارویی از جمله گیاه مورد مطالعه دارای منابع مهمی جهت مهار عوامل ضد میکروبی، رشد و آنزیم‌های گوارشی است بنابراین به نظر می‌رسد ترکیب پروبیوتیک و گیاه مورد مطالعه می‌توانند اثرات مثبتی در افزایش رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی و فلور باکتریایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *O.mykiss* داشته باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به مدت ۶۰ روز از آذر لغایت بهمن ۱۴۰۱ در سالن آکواریوم گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. در ابتدای آزمایش تعداد ۲۴۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین-کمان با میانگین وزن اولیه ۰/۲±۸/۶۶ گرم به سالن آکواریوم گروه شیلات دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری منتقل شدند. بعد از گذشت ۱۴روز دوره آداپتاسیون با شرایط محیطی، در ۱۲ تانک ۳۰۰ لیتری گرد از جنس فایبرگلاس با تراکم ۲۰ قطعه بچه ماهی در هر تانک به صورت کاملا تصادفی، ذخیره‌سازی شدند و در شرایط ۱۰ ساعت نور و ۱۴ ساعت تاریکی، در این سالن پرورش داده شدند. اندازه‌گیری دمای آب به صورت روزانه بود و میانگین شاخص‌های فیزیکی و شیمی آب در طی دوره پرورش شامل اکسیژن محلول ۷/۸ میلی‌گرم در لیتر، دما ۲±۱۵ درجه سانتی‌گراد و pH آب ۷/۲ بود.

تهیه و آماده‌سازی عصاره الکلی گیاه فراسیون سفید و پروبیوتیک

پس از جمع‌آوری گیاه از منطقه پلور استان مازندران، تایید تشخیص گونه گیاهی توسط گروه گیاه‌شناسی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. گیاه فراسیون سفید پس از شستشوی کامل و جداسازی گل و لای، برای خشک شدن به مدت ۷ روز در دمای اتاق نگهداری شد و سپس آسیاب گردید. برای تهیه عصاره اتانولی نیز، نسبت

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-16]

نمونه گیاه به حلال (اتانول ۷۰٪)،۱به ۵ ، به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد درون دستگاه شیکر انکوباتور با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه انجام شد. عصاره حاصل به کمک دستگاه پمپ خلأ از فیلتر کاغذی واتمن شماره ۱عبور داده شد. عصاره صاف شده با استفاده از دستگاه تبخیرکننده دوار (Rotary Evaporator)تحت شرایط خلا و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و سپس تا زمان استفاده در یخچال (دمای ۱±۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد (Shahvardi *et al*., 2019).

دو باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* *Lactobacillus plantarum* و *باسیلوس سابتیلیس* *Bacillus subtilis* از شرکت دانش بنیان زیست ماهان تهیه شدند.

تهیه نانو عصاره گیاه

از کیتوزان و آلژینات سدیم به عنوان مواد پوششی استفاده شد. ابتدا محلول ۱ ٪ کیتوزان و ۱ ٪ آلژینات سدیم تهیه، بعد به نسبت ۵۰ به ۵۰ استفاده شد. برای نانو ریزپوشانی کردن عصاره دو غلظت استفاده و برای افزایش پایداری و رهایش تدریجی، نسبت پوشش‌ها (کیتوزان وآلژینات سدیم) به عصاره ۲ به ۱ در نظر گرفته شد. برای تولید نانو ریزپوشانی، از دستگاه اولتراسوند با طول موج ۴۰ کیلوهرتز به مدت ۱۵ دقیقه و تعداد ۶ دور (زمان هر دور ۳۰ ثانیه و زمان استراحت ۱۵ ثانیه بین دورها) استفاده شد. برای کاهش بیشتر اندازه ذرات و افزایش بازده ذرات نانو، از دستگاه هموژنایزر با دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. محلول حاصل از فرآیند، در دمای منفی ۱۸ درجه سانتی‌گراد منجمد، و با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (Christ Marti) در فشار ۰/۰۵۱ میلی‌بار و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. سپس به صورت پودری به جیره اضافه شد (حقجو و همکاران، ۱۳۹۴).

آماده سازی جیره و تیمار بندی

در این آزمایش از غذای تجاری، کارخانه خوراک به دانه شمال (بابلسر، استان مازندارن) استفاده شد (جدول۱). ماهیان مورد آزمایش با وزن اولیه ۰/۲±۸/۶۶ گرم در چهار تیمار (گروه شاهد: گروه شاهد فاقد پروبیوتیک و نانو عصاره گیاه، گروه۲: ماهیان تغذیه شده با ۴۰۰ میلی‌گرم نانو عصاره اتانلی گیاه فراسیون سفید + ۱ گرم از مخلوط دو باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *باسیلوس سابتیلیس* در هر کیلوگرم از جیره، گروه۳: ماهیان تغذیه شده با ۸۰۰ میلی‌گرم نانو عصاره اتانلی گیاه فراسیون سفید + ۱گرم از مخلوط دو باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *باسیلوس سابتیلیس* در هر کیلوگرم از جیره و گروه ۴: ماهیان تغذیه شده با ۱گرم از مخلوط دو باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *باسیلوس سابتیلیس* در هر کیلوگرم از جیره) با ۳ تکرار به مدت ۶۰ روز در سه نوبت در ساعات ۹، ۱۳و ۱۷، بر اساس سیری ظاهری تغذیه شدند (Hosseini, 2010).

جدول ۱: تجزیه تقریبی جیره پایه مورد استفاده برای تغذیه بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان

نوع ترکیبات	پروتئین(٪)	چربی(٪)	کربوهیدرات(٪)	انرژیKcal/kg	خاکستر(٪)	رطوبت(٪)
مقدار	۴۳	۱۰	۳۶	۴۳۲۰	۱۱	۷۰

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-16]

محاسبه شاخص‌های رشد

برای بررسی شاخص‌های رشد در پایان دوره، زیست سنجی ماهیان در هر تکرار انجام و بر اساس فرمول‌های زیر محاسبه شد (Misra *et al*., 2006).

۱۰۰× (وزن اولیه به گرم ÷ (وزن اولیه گرم – وزن نهایی به گرم) = درصد افزایش وزن

۱۰۰× طول دوره پرورش(روز) / (LnW2-LnW1) =(SGR) نرخ رشد ویژه

(W1:وزن نهایی(گرم) ، W2:وزن اولیه (گرم))

(افزایش وزن ماهی به ÷ غذای خورده شده در طول دوره پرورش) = ضریب تبدیل غذایی

(غذای خورده شده (گرم) ÷ افزایش وزن کسب شده (گرم) = نرخ کارایی غذا

(پروتئین خورده شده (گرم) ÷ افزایش وزن کسب شده (گرم) = نرخ کارایی پروتئین

۱۰۰× تعداد اولیه/ (تعداد تلفات÷ تعداد اولیه) = درصد بازماندگی

در انتهای دوره آزمایش، برای محاسبه ترکیبات لاشه ۳ قطعه بچه ماهی از هر تکرار به طور تصادفی انتخاب و فاکتورهایی همچون رطوبت، پروتئین خام، چربی خام و خاکستر با استفاده از روش استاندارد آنالیز شد (AOAC, 1990).

اندازه گیری شاخص‌های خونی

جهت بررسی شاخص‌های خونی و نمونه برداری بچه ماهیان، در پایان آزمایش پس از انجام زیست سنجی تعداد ۳ قطعه ماهی از هر تکرار به صورت تصادفی صید و ماهیان با استفاده از پودر گل میخک با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیهوش شدند. سپس خون‌گیری از طریق ساقه دمی انجام شد (Hrubec and Smith, 2010). بخشی از نمونه‌های خون در تیوپ‌های حاوی ماده ضد انعقاد خون قرار گرفتند تا شمارش گلبول قرمز، گلبول سفید و سنجش درصد هماتوکریت صورت گیرد. بخشی دیگر در لوله‌های فاقد ماده ضد انعقاد خون قرارگرفتند. پس از تشکیل لخته، سرم خون با استفاده از سانتریوفوژ توسط سمپلر از لخته جداسازی شد و در میکروتیوپ‌های جداگانه قرارگرفت. نمونه‌های سرم جداسازی شده تا زمان انجام آزمایشات سرمی در فریزر منفی ۲۰° درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (ذوالفقاری و فیروزبخش، ۱۳۹۲). شمارش گلبول قرمز و گلبول سفید با استفاده از لام نئوبار در یک میلی‌متر مکعب خون محاسبه شد. از رنگ گیمسا برای تشخیص گلبول‌های سفید استفاده و زیر میکروسکوپ نوری شمارش‌گردید. اندازه‌گیری هماتوکریت با روش میکروهماتوکریت و با استفاده از لوله‌های میکروهماتوکریت و سانتریفوژ انجام شد (Skov *et al*., 2011). میزان هموگلوبین خون با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۴۰nm و براساس روش درابکین اندازه‌گیری شد. درصد هماتوکریت با روش میکروهماتوکریت سنجیده شد (Kampbell and Ellis., 2007). میانگین حجم گلبول قرمز (MCV)، میانگین هموگلوبین گلبول قرمز(MCH)، میانگین غلظت هموگلوبین گلبول قرمز(MCHC) به روش زیر محاسبه گردید:

MCV: (مقدار هماتوکریت ÷ گلبول قرمز) ×۱۰

MCH:(مقدار هموگلوبین ÷ گلبول قرمز) ×۱۰

MCHC: (مقدار هموگلوبین ÷ مقدار هماتوکریت) ×۱۰۰

اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمایی خون

خون گرفته شده درون لوله‌ی آزمایش استریل ریخته شد. جداسازی سرم خون به کمک دستگاه سانتریوفوژ مدل Sahand.T.A با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت (Dein *et al*., 1986). سپس سرم بدست آمده با استفاده از پیپت پاستور از محتویات گلبولی جدا گردید و تا زمان سنجش در فریزر منفی ۲۰ نگهداری شد. اندازه‌گیری شاخص‌های سرمی با استفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمون و به طریق روش اسپکتروفتومتری با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل 223337-S2100UV، شرکت UNICO، ساخت کشور آمریکا) محاسبه گردید. پروتئین کل با استفاده از

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-16]

کیت تشخیصی شرکت زیست شیمی (تهران – ایران) و با روش Modi-Biuret اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری میزان کلسترول کل، تری‌گلیسرید و گلوکز با استفاده از کیت‌های تجاری شرکت پارس آزمون (تهران، ایران) و بوسیله دستگاه اتوآنالایزر (مدل RS232، شرکت BIOTEK، کشور آمریکا) انجام شد.

سنجش آنزیم‌های کبدی وآنزیم‌های گوارشی

آزمایشات مربوط به آنزیم‌های کبدی شامل آنزیم-های آسپارات آمینو ترانسفراز (AST)، آلانین ترانسفراز (ALT) و آلانین فسفاتاز (ALP) توسط کیت‌های آزمایشی مربوطه توسط دستگاه اتوآنالایزر انجام شد. برای سنجش آنزیم‌های گوارشی (تریپسین، کیموتریپسین، آمیلاز و لیپاز) از کل لاشه استفاده شد و با نسبت ۱ به ۹ محلول بافر توسط هموژنایزر هموژن شد. یک گرم لاشه در ۹ میلی‌لیتر بافر ۵۰Tris-HCl میلی‌مولار، $CaCl_2$ ۲۰ میلی‌مولار، KCl ۵۰ میلی‌مولار در pH ۸/۵ توسط هموژنایزر (مدل T18) به مدت ۳۰ ثانیه هموژن شده و سپس هموژنات به مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفوژ یخچالدار (مدل D78532) در ۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. سوپرناتانت حاصله در ویال اپندورف تقسیم شده و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان آنالیز نگهداری شد (Rodjaroen *et al*., 2020).

سنجش فلور میکروبی روده

جهت بررسی فلور باکتریایی روده بچه ماهیان و حضور باکتری در روده، از هر تکرار به طور تصادفی ۳ قطعه ماهی صید در شرایط استریل روده از محوطه شکمی برداشته شد. پس از تخلیه روده‌ها همگن گردید. برای شمارش باکتری‌های روده و باکتری‌های اسیدلاکتیک نمونه‌ها در محلول سرم فیزیولوژیک حداکثر تا$^{-۷}$ ۱۰رقیق شدند. ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مورد نظر توسط پیپت استریل به داخل پلیت‌های استریل منتقل و با حرکت دورانی، نمونه کاملاً با محیط کشت (تریپتیک سوی آگار (Triptic Soy Agar TSA) مخلوط شد. هر کدام از پلیت‌ها ۵ بار در جهت عقربه‌های ساعت و ۵ بار در خلاف جهت عقربه‌های ساعت بر روی سطح میزگردانده شد. بعد از اینکه محیط جامد شد، پلیت به‌مدت ۲۴ ساعت به‌صورت وارونه داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت. در نهایت میانگین باکتری‌های شمارش‌شده سه پلیت در عکس رقت مورد نظر ضرب گردید تا مقدار کل باکتری‌ها محاسبه شود (Pollock *et al*., 2002).

تجزیه و تحلیل آماری

جهت بررسی توزیع نرمال داده‌ها از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف استفاده شد. به منظور مقایسه معنی‌دار بودن تفاوت بین میانگین‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA)، استفاده شد. سپس مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت. نتایج به صورت میانگین± انحراف معیار نمایش داده شد. کلیه آزمون‌ها با نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ در سطح اطمینان ۹۵ درصد و رسم شکل‌ها نیز با نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج

طبق نتایج وزن نهایی و میزان افزایش وزن در تیمار۲ بیشترین مقدار را نسبت به سایر تیمارها داشت و

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-16]

اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد و تیمار ۳ نشان دادند ($p<۰/۰۵$). اما با تیمار تغذیه شده با پروبیوتیک بدون نانو عصاره گیاه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). فاکتور نرخ رشد ویژه تیمار۲ بیشتر از سایر تیمارها بود، و با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$). در بین تیمارها فاکتورهای غذای دریافت شده و شاخص بازماندگی اختلاف معنی‌داری نشان داده نشد ($p>۰/۰۵$). میزان طول نهایی در ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک بدون نانو عصاره‌ی گیاه بیشترین مقدار را نسبت به سایر تیمارها نشان داد ($p<۰/۰۵$). همچنین، تیمار ۳ دارای بیشترین ضریب تبدیل غذایی نسبت به سایر تیمارها بود و با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت ($p>۰/۰۵$) اما با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$). میزان کارایی پروتئین در تیمار ۲ بیشتر از سایر تیمارها بود و با تیمار شاهد و تمیار ۳ اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$). بازماندگی ماهی‌هایی که پروبیوتیک و نانو عصاره گیاه با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم دریافت کردند، بیشتر (۹۸/۳۳ درصد) از سایر تیمارهای آزمایشی بود اما با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($p>۰/۰۵$).

جدول۲: شاخص‌های رشد ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه‌شده با سطوح مختلف نانو عصاره گیاه فراسیون سفید و دو پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* و *Bacillus subtilis* پس از ۶۰ روز

شاخص	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
وزن اولیه (گرم)	۸/۷۹ ± ۰/۰۸^{a}	۸/۶۰ ± ۰/۱۳^{a}	۸/۵۴ ± ۰/۳۸^{a}	۸/۷۴ ± ۰/۰۶^{a}
وزن نهایی (گرم)	۵۰/۳۰ ± ۲/۹^{b}	۶۷/۲۲ ± ۲/۱^{a}	۵۲/۷۶ ± ۴/۱^{b}	۶۳/۰۶ ± ۷/۰۱^{a}
افزایش وزن (گرم)	۴۱/۵۰ ± ۲/۹^{b}	۵۸/۶۲ ± ۲/۲^{a}	۴۴/۲۲ ± ۴/۲^{b}	۵۴/۳۲ ± ۷/۰۰^{a}
درصد افزایش وزن بدن (گرم)	۴۷۲/۰۶ ± ۳۳/۷۳^{c}	۶۸۲/۰۴ ± ۳۶/۹۰^{a}	۵۱۸/۸۳ ± ۵۷/۲۸^{bc}	۶۲۱/۴۸ ± ۸۰/۰۰^{ab}
طول اولیه (سانتیمتر)	۱۰/۲۰ ± ۰/۷^{a}	۱۰/۲۳ ± ۰/۷۲^{a}	۹/۹۶ ± ۰/۱۵^{a}	۱۰/۴۰ ± ۰/۳۴^{a}
طول نهایی (سانتیمتر)	۱۷/۴۳ ± ۰/۲۷^{b}	۱۸/۴۱ ± ۰/۵۲^{ab}	۱۸/۸۳ ± ۱/۷^{ab}	۱۹/۷۵ ± ۱/۰۸^{a}
نرخ رشد ویژه (درصد)	۲/۹۰ ± ۰/۱^{c}	۳/۴۲ ± ۰/۰۷^{a}	۳/۰۳ ± ۰/۱۵^{bc}	۳/۲۸ ± ۰/۱۸^{ab}
ضریب تبدیل غذایی (گرم/گرم)	۰/۹ ± ۰/۰۷^{a}	۰/۷ ± ۰/۰۲^{b}	۰/۹ ± ۰/۰۹^{a}	۰/۸ ± ۰/۱^{b}
کارایی پروتئین	۰/۹ ± ۰/۶^{b}	۱/۳ ± ۰/۰۵^{a}	۱/۰۲ ± ۰/۰۹^{b}	۱/۲ ± ۰/۱^{a}
بازماندگی (درصد)	۹۴/۴۴ ± ۰/۵۵^{a}	۹۸/۳۳ ± ۲/۸۸^{a}	۹۸/۱۴ ± ۳/۲۱^{a}	۹۷/۵۹ ± ۲/۸۲^{a}

میانگین (± انحراف معیار)، حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$)

شاخص‌های ترکیب لاشه

در این تحقیق میزان ترکیب لاشه و جیره‌ها (پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت) در پایان دوره سنجش شد و نتایج ثبت گردید. طبق نتایج بدست آمده میزان چربی بین تیمارها در کل دوره اختلاف معنی‌داری نداشت ($p>۰/۰۵$). میزان رطوبت در تیمارهای ۲ و ۳ اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان ندادند ($p>۰/۰۵$). میزان خاکستر در تیمار ۳ دارای بیشترین مقدار نسبت به سایر تیمارها بود ($p<۰/۰۵$). میزان پروتئین در تیمار شاهد دارای بیشترین مقدار نسبت به سایر تیمارها بود و نسبت به سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$).

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-16]

جدول۳: شاخص‌های ترکیب لاشه ی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سطوح مختلف نانو عصاره‌ی گیاه فراسیون سفید و دو پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* و *Bacillus subtilis* پس از ۶۰ روز

شاخص	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
رطوبت (درصد ماده تر)	۷۲/۱۸ ±۰/۶۶^{ab}	۷۱/۲۷ ±۰/۰۶^{b}	۷۱/۰۳ ±۰/۶۷^{b}	۷۳/۱۳ ±۱/۲۶^{a}
خاکستر (درصد ماده خشک)	۵/۰ ± ۰/۰۰^{c}	۸/۰۰ ± ۰/۰۰^{ab}	۸/۶ ± ۰/۵۷^{a}	۷/۶ ±۰/۵۷^{b}
چربی (درصد ماده خشک)	۳۶/۱۴ ±۲/۰۹^{a}	۳۵/۷۰ ±۰/۹^{a}	۳۶/۵۳ ±۱/۴^{a}	۳۵/۷۷ ±۰/۴^{a}
پروتئین (درصد ماده خشک)	۵۰/۸۳ ±۰/۰۱^{a}	۴۸/۸۷ ±۰/۰۶^{b}	۴۸/۰۵ ±۰/۰۴^{c}	۴۴/۵۲ ±۰/۰۱^{d}

میانگین (± انحراف معیار)، حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است (p<۰/۰۵)

شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی

طبق نتایج جدول ۴ تعداد گلبول‌های سفید در تیمارها اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نشان دادند (p<۰/۰۵). و میزان گلبول سفید در تیمار شاهد نسبت به سایر تیمارها کمتر بود. گلبول قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت با افزودن ۴۰۰ میلی‌گرم نانو عصاره گیاه و پروبیوتیک به جیره ماهیان، به طور معنی‌داری افزایش یافتند، اما اختلاف معنی‌داری در بین تیمارها مشاهده نشد (p>۰/۰۵). میزان گلوگز خون و تری‌گلیسرید در تیمار ۲ اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان داد (p<۰/۰۵). اما میزان کلسترول در این تیمار اختلافی را با شاهد نشان نداد (p>۰/۰۵). میزان گلوکز، کلسترول، تری گلیسرید و پروتئین کل و همچنین میزان آنزیم های کبدیAST، ALT و ALP در بین تیمارها نسبت به گروه شاهد کمتر بود. میزان MCV، MCH و MCHC نیز در بین تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (p>۰/۰۵).

شاخص آنزیم‌های گوارشی

آنزیم آمیلاز تحت تاثیر سطوح پروبیوتیک و نانو عصاره گیاه ارتقا یافت و بیشترین میزان مربوط به تیمار ۲ بود. آنزیم تریپسین و کیموتریپسین در تیمارهای ۲ و ۳ اختلاف معنی‌داری را نشان نداد اما با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (p<۰/۰۵). آنزیم لیپاز در تیمارها نسبت به شاهد مقدار کمتری را نشان داد.

شاخص فلور باکتریایی روده

سنجش فلورباکتریایی روده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان طبق جدول ۶ محاسبه شد. طبق نتایج تعداد باسیلوس‌های کل روده در بین تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان داد (p<۰/۰۵)، که از بین آنها تیمار تغذیه شده با پروبیوتیک بدون نانوعصاره گیاه، بیشترین تعداد باکتری را نسبت به سایر تیمارها داشت. همچنین تعداد باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک در تیمار ۳ افزایش معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد (p<۰/۰۵). تعداد باکتری‌های کولیفورم در تیمار تغذیه شده با پروبیوتیک بدون نانوعصاره گیاه، بیشتر از سایر تیمارها بود. تعداد باکتری‌های *Enterobacteriaceae* و باکتری‌های گرم منفی در بین تیمارها اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان دادند (p<۰/۰۵). همچنین باکتری گرم مثبت کلستریدیوم در تیمار ۲ دارای کمترین تعداد نسبت به سایر تیمارها بود و با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد (p<۰/۰۵).

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-16]

جدول۴: شاخص‌های بیوشیمیایی خون ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه‌شده با سطوح مختلف نانو عصاره‌ی گیاه فراسیون سفید و دو پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* و *Bacillus subtilis* پس از ۶۰ روز

شاخص	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
گلبول سفید ($\times10^3/MM^3$)	۹/۴۳ ±۰/۴^a	۱۱/۵۰ ±۰/۳^b	۱۱/۲۶ ±۰/۵^b	۱۰/۹۳ ±۱/۰۲^b
گلبول قرمز ($\times10^4/MM^3$)	۹۲/۶۶ ± ۹/۴^a	۱۰۲/۳۳ ± ۱۰/۹۶^a	۹۸/۳۳ ± ۶/۵۰^a	۹۶/۶۶ ±۹/۷^a
هموگلوبین (g/dl)	۸/۴۴ ±۰/۳^a	۹/۱ ±۰/۶^a	۹/۰۲ ±۱/۸^a	۸/۸ ±۰/۹^a
هماتوکریت (درصد)	۳۸/۶۰ ±۰/۵^a	۳۹/۹۶ ±۰/۹^a	۳۹/۲۰ ±۰/۷^a	۳۹/۷۰ ±۰/۴^a
MCV (fl)	۴۱۹/۲۳ ±۳۹/۵۸^a	۳۹۳/۸۹ ±۴۳/۳۰^a	۳۹۹/۶۵ ±۲۳/۴۸^a	۴۲۷/۱۷ ±۴۸/۳۰^a
MCH (pg)	۹۱/۹۹ ±۰/۵^a	۹۰/۲۳ ±۱۴/۹۴^a	۹۱/۱۵ ±۱۲/۸۳^a	۹۵/۳۳ ±۱۹/۱۱^a
MCHC (درصد)	۲۱/۸۸ ±۱/۰۲^a	۲۲/۸۱ ±۱/۳۵^a	۲۲/۹۶ ±۴/۴۱^a	۲۲/۱۷ ±۱/۸^a
گلوکز (mg/dl)	۱۳۱/۰۰ ±۱/۰^a	۱۱۱/۶۶ ±۱/۵^c	۱۰۶/۶۶ ±۲/۰^d	۱۲۶/۶۶ ±۱/۵^b
کلسترول (mg/dl)	۳۶۴/۰۰ ±۳/۶^a	۳۲۷/۰۰ ±۲/۰^a	۳۱۷/۳۳ ±۲/۵^a	۳۳۰/۶۶ ±۵۵/۷^a
تری‌گلیسرید (mg/dl)	۳۸۱/۶۶ ±۳/۰۵^a	۳۱۳/۳۳ ±۴/۱^d	۳۲۶/۶۶ ±۱/۵^c	۳۴۳/۶۶ ±۳/۲^b
پروتئین کل (mg/g)	۳۵/۲۶ ±۰/۴^a	۳۰/۷۳ ±۰/۸^b	۲۸/۱۰ ±۰/۳^c	۲۷/۹۳ ±۰/۲^c
ALP (U/I)	۸۳۱/۰۰ ±۱/^{a}	۶۷۳/۳۳ ±۱/۵^c	۶۵۳/۰۰ ±۲/۶^d	۷۳۱/۳۳ ±۰/۵^b
SGPT-ALT (U/I)	۱۷/۹۰ ±۰/۱^a	۱۵/۹۰ ±۰/۱^b	۱۳/۸۰ ±۰/۱^c	۱۱/۳۶ ±۰/۳^d
SGOT-AST (U/I)	۲۹۸/۳۳ ±۱/۵^a	۲۳۹/۶۶ ±۲/۰۸^b	۲۲۶/۰۰ ±۱/۰^c	۲۱۹/۰۰ ±۳/۶^d

میانگین (± انحراف معیار)، حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

جدول ۵: شاخص‌های آنزیم های گوارشی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه‌شده با سطوح مختلف نانو عصاره‌ی گیاه فراسیون سفید و دو پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* و *Bacillus subtilis* پس از ۶۰ روز

شاخص	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
فعالیت آمیلاز (U/MG PROTEIN)	۱۲/۶۹ ± ۰/۴^c	۱۴/۹۱ ± ۰/۰۷^a	۱۳/۷۸ ± ۰/۴^b	۱۲/۰۸ ± ۰/۰۲^c
فعالیت لیپاز (U/MG PROTEIN)	۳/۳۷ ± ۰/۰۰۵^c	۲/۸۷ ± ۰/۱۳^b	۳/۰۸ ± ۰/۰۲^a	۲/۱۷ ± ۰/۰۲^d
فعالیت تریپسین (MMOL/MG PROTEIN)	۰/۰۳ ± ۰/۰۰۵^b	۰/۰۵ ± ۰/۰۰^a	۰/۰۴ ± ۰/۰۰۵^a	۰/۰۳ ± ۰/۰۰^b
فعالیت کیموتریپسین (MMOL/MG PROTEIN)	۰/۰۷ ± ۰/۰۰ ^{c}	۰/۱۲ ± ۰/۰۰ ^{a}	۰/۱۱ ± ۰/۰۰ ^{a}	۰/۰۹ ± ۰/۰۲ ^{b}

میانگین (± انحراف معیار)، حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است (p<۰/۰۵)

جدول۶: شاخص‌های فلورباکتریایی روده ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه‌شده با سطوح مختلف نانو عصاره‌ی گیاه فراسیون سفید و دو پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* و *Bacillus subtilis* پس از ۶۰ روز

شاخص	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
Total Bacillus (LogCFU/g^{-1})	۲/۲ ± ۰/۲^d	۳/۵ ± ۰/۲^b	۳/۲ ± ۰/۱^c	۴/۱ ± ۰/۱^a
Total Lactic acid (LogCFU/g^{-1})	۴/۲ ± ۰/۰۷^c	۶/۰۲ ± ۰/۰۴^b	۶/۶ ± ۰/۰۵^a	۶/۱ ± ۰/۱^b
Total Coliform (LogCFU/g^{-1})	۳/۱ ± ۰/۱^{ab}	۳/۰۰ ± ۰/۰۰^c	۳/۲ ± ۰/۱^{ab}	۳/۴ ± ۰/۱^a
Total Enterobacteriaceae (LogCFU/g^{-1})	۳/۴ ± ۰/۲^a	۳/۳ ± ۰/۰۰^b	۳/۱ ± ۰/۱^b	۳/۴ ± ۰/۱^b
Total gram negative Bacteria (LogCFU/g^{-1})	۴/۴ ± ۰/۱^a	۳/۰۰ ± ۰/۰۰^c	۳/۱ ± ۰/۱^c	۳/۴ ± ۰/۰۴^b
Clostridium (LogCFU/g^{-1})	۱/۹۹ ± ۰/۰۴^a	۱/۶۴ ± ۰/۱۲^b	۱/۸۹ ± ۰/۱۱^a	۱/۶۹ ± ۰/۰۸^b

میانگین (± انحراف معیار)، حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-16]

بحث

فراسیون سفید دارای ترکیبات فعالی نظیر کومارین ها، ویتامین بتاکاروتن، مالتونین، دوپامین، نورآدرنالین و گلوتاتیون می‌باشد. فراسیون سفید دارای ترکیبات فعالی است که همگی می‌توانند بر میزان رشد و اشتهای آبزیان تأثیرگذار باشند (Yousefi *et al.*, 2016). در این تحقیق شاخص‌های رشد نظیر وزن نهایی، افزایش وزن بدن و نرخ رشد ویژه ماهیان تحت تاثیر دوز ۴۰۰ میلی‌گرم از نانو عصاره گیاه و پروبیوتیک افزایش پیدا کردند و بالاترین کارایی رشد در ماهیان تغذیه شده با این سطح از نانو عصاره گیاه و پروبیوتیک بدست آمد. عملکرد رشد مستقیم ترین شاخص تولید گوشت در ماهی است و برای افزایش مزایای اقتصادی بسیار مهم است. لاکتوباسیل‌ها از رایج ترین پروبیوتیک ها هستند که می‌توانند دستگاه گوارش حیوانات را تحت کنترل خود درآورند، انواع آنزیم‌های گوارشی را ترشح کنند، محیط گوارش را از طریق فعالیت‌های متابولیک بهبود بخشند و جذب مواد مغذی را تسریع کنند (Wang *et al.*, 2005). در واقع گیاهان دارویی و مشتقات آنها مانند تولید طبیعی می‌توانند فعالیت‌های گوارشی را کنترل و گونه های بیماری زا و غیر پاتوژن باکتری‌ها را در روده ماهی محدود کنند. این فرآیند منجر به بهره‌وری بیشتر در استفاده از مواد غذایی و همچنین باعث افزایش عملکرد رشد و بهبود بهره‌وری خوراک می‌شود (Demiroz Akbulut *et al.*, 2020). در این تحقیق میزان نرخ رشد ویژه در تیمارهای نانو عصاره گیاه دارای میزان بالاتری نسبت به شاهد بودند. اما اختلاف معنی داری را با تیمار شاهد نشان ندادند. در تحقیقی Asmaa و همکاران (۲۰۲۰) اثر تیمول موجود در آویشن و نانوکیتوزان بر روی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) انجام دادند، ترکیب ماده و نانوکیتوزان تاثیر مثبتی بر روی فاکتورهای کارایی پروتئین و رشد داشته است. پارامترهای خون و تغییرات در مقادیر WBC، RBC و Hb شاخص‌های مناسبی برای ارزیابی سلامت ماهی و بررسی سطح انتقال اکسیژن خون در بدن در پاسخ به جایگزینی درمانی با گیاهان دارویی مختلف می باشند (Yilmaz *et al.*, 2019). در این مطالعه تغییر فاکتورهای بیوشیمیایی خون و آنزیم‌های کبدی نیز محاسبه گردید. طبق جدول شماره ۵ میزان گلبول سفید در تیمارهای ۲ و ۳ نسبت به شاهد افزایش یافت و اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان داد. ولی با تیمار تغذیه شده با پروبیوتیک بدون عصاره نانوکپسوله شده اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. همچنین میزان گلبول قرمز در تیمارهای حاوی نانو عصاره گیاه و پروبیوتیک نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داد ولی نسبت به سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشتند. استفاده از غذاهای حاوی پروبیوتیک سبب افزایش متابولیسم خواهد شد لذا به دنبال افزایش نیاز اکسیژنی، تعداد گلبول های قرمز نیز افزایش نشان می‌دهند (Ahvazi *et al.*, 2017; Firouzbakhsh *et al.*, 2011). مطالعات متعدد نشان داده است که استفاده از گیاهان دارویی سبب افزایش تعداد گلبول سفید شده، که آن را ناشی از وجود ترکیباتی مانند تریپنیولن، سینئول، لینالول، ترپینئول، لینالین، استات، تانن و فلاونوئید می‌دانند. این مواد سبب بهبود روند تولید گلبول سفید و یا موجب تحریک تکثیر آنها می‌شوند (Sadeghi *et al.* 2014). گیاه فراسیون سفید به دلیل وجود تانن‌ها باعث افزایش میزان گلبول سفید خون می‌شود. خانواده نعناعیان (Lamiaceae) از جمله گیاه مورد مطالعه سرشار از

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-16]

ویتامین‌های مفید مانند A, C و D و همچنین مواد معدنی مانند پتاسیم، آهن، کلسیم، منگنز، منیزیم و سلنیوم می‌باشد که می‌توانند تعداد سلول‌های خون در ماهی را افزیش دهد (Kulczy´nski *et al*., 2019). میزان سطح گلوکز در تحقیق حاضر در تیمارهای تغذیه شده با نانو عصاره گیاه و پروبیوتیک کمتر از سایر تیمارها بود.گیاه فراسیون سفید به دلیل وجود خاصیت ضد دیابتی سطح گلوکز خون را کاهش می‌دهد (Ahvazi *et al*., 2017). در مطالعه انجام شده توسط Meyre و همکاران (۲۰۰۵) بر روی گیاه فراسیون سفید، مشخص گردیده است که دی ترپن‌های زیست فعال موجود در گیاه *Marrubium vulgare* در تیمارهای با غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب ۵۰ تا ۶۰ درصد باعث کاهش غلظت گلوکز خون گردیده است. همچنین باعث کاهش قابل توجه میزان پروتئین‌کل، تری‌گلیسرید و سطح کلسترول کل گردیده است. درواقع ترکیبات موجود در عصاره گیاه باعث کاهش میزان پروتئین‌کل، تری گلیسرید و سطح کلسترول کل وگلوکز در تیمارهای ۲ و ۳ نسبت به تیمار شاهد در این تحقیق گردیده است. میزان سطح کلسترول در تیمار ۴ بدون نانو عصاره گیاه بیشتر از تیمارهای تغذیه شده با نانو عصاره گیاه و پروبیوتیک نشان داده شد ولی اختلاف معنی‌داری با این تیمارها نشان نداد. طبق نتایج میزان هموگلوبین تیمارهای ۲ و ۳ دارای بیشترین مقدار نسبت به سایر تیمارها بود. اما اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان نداد. این نتایج با گزارش تحقیق قنبری و فیروزبخش(۲۰۲۲) درمورد افزایش میزان گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت و گلبول سفید تیمارهای حاوی ۴۰۰ میلی‌گرم از نانوعصاره گیاه *Thymbra spicata* همخوانی دارد.

نتایج حاصله بیانگر آن است که عصاره نانوکپسوله گیاه فراسیون سفید، دارای اثرات تقویت کننده سیستم ایمنی غیر اختصاصی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان می باشد (Mocanu *et al*., 2010) تاثیر مثبت سطوح مختلف $۲۲/۴\times۱۰^{۹}$، $۳۸/۴\times۱۰^{۹}$ و $۷۰/۴\times۱۰^{۹}$ CFU/g پروبیوتیک *B. subtilis* را بر شاخص‌های خون‌شناسی قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش کردند. طبق تحقیقی که صارمی و همکاران (۱۳۹۷)، بر روی اثرات عصاره الکلی زیره سبز بر آنزیم‌های گوارشی و برخی پارامترهای سرمی ماهی انگشت قد کپور معمولی *Cyprinus carpio* انجام دادند، افزودن عصاره الکلی زیره سبز به جیره غذایی ماهیان کاهش معنی‌دار پروتئین کل، گلوکز و کلسترول خون را نسبت به تیمار شاهد نشان داد،که با تحقیق حاضر همخوانی دارد. همچنین در تحقیقی که روغنی و همکاران (۱۳۸۴)، بر اثر هیپوگلیسمیک و هیپولیپیدمیک تجویز خوراکی و درازمدت بخش هوایی فراسیون سفید در موش صحرایی دیابتی انجام دادند، میزان گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسرید تیمارهای درمان شده با گیاه فراسیون نسبت به تیمارهای بدون گیاه کاهش معنی‌داری را نشان داد. طبق نتایج مشخص شده است که اثر هیپوگلیسمیک موجود در گیاه فراسیون با اعمال اثرات آزادکنندکی انسولین باعث کاهش گلوکز خون می‌گردد.

در تحقیقات انجام شده در این خصوص مشخص شده است که پلی‌فنل‌ها و فنیل پروپانوئیدهای موجود در بخش هوایی این گیاه موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در سطح سلولی می‌شود. همچنین این احتمال می‌رود که ترکیبات موجود در بخش هوایی فراسیون سفید با مهار نمودن مسیر سنتز پروستاگلاندین‌ها

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-16]

تغییرات مطلوب در پارامترهای بیوشیمیایی خون به وجود آورد همچنین به نظر می‌رسد B- sitosterol موجود در عصاره گیاه باعث کاهش کلسترول می گردد (Karioti *et al*., 2005). در آبزی پروری محاسبه‌ی میزان گلوکز یکی از فاکتورهای اندازه‌گیری شاخص استرس و پاسخ به فاکتورهای بیولوژیکی به شمار می‌رود (Benmebarek *et al*., 2013). به نظر می‌رسد ترکیبات فلونوئیدی موجود در گیاه با تاثیر بر هیپوتالاموس و هیپوفیز باعث کاهش اضطراب و به سبب آن کاهش سطح گلوکز ماهی گردیده است. که در این تحقیق استفاده از دوز ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم از نانو عصاره گیاه باعث کاهش سطح گلوکز نسبت به تیمار شاهد و تیمار تغذیه شده با پروبیوتیک گردیده است. عصاره‌های گیاهان دارویی به دلیل داشتن ترکیبات ضد اکسایشی به حیوانات در غلبه بر شرایط تنش‌زا و بهبود کارایی خوراک کمک میکنند، اما بخش عمده‌ای از خواص ضد اکسایشی آنها هنگام عبور از شرایط اسیدی معده تخریب شده و در نتیجه، ظرفیت ضد اکسایشی آنها کاهش می‌یابد، از این رو برای حفاظت از این ترکیبات از روشهای نوینی همانند ریزکپسول سازی استفاده می‌شود (مخدوم و همکاران، ۱۳۹۴).

طبق نتایج میزان آنزیم‌های گوارشی لیپاز وآمیلاز در تیمارهای ۴۰۰ میلی‌گرم نانو عصاره گیاه و پروبیوتیک از شاهد کمتر بود و اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد داشتند. اما این آنزیم‌ها در تیمار ۸۰۰ میلی‌گرم نانو – عصاره گیاه و پروبیوتیک نسبت به شاهد افزایش یافت. میزان آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین در تیمارهای حاوی عصاره نانوکپسوله شده و پروبیوتیک از تیمار شاهد بیشتر بودند و اختلاف معنی‌داری را با شاهد نشان دادند.

در تحقیقی که Asmaa و همکاران (۲۰۲۰) بر روی ترکیب thymol (ترکیب شیمیایی فنولی) و نانوکیتوزان بر روی *Oreochromis niloticus* انجام دادند، ترکیب thymol و نانوکیتوزان فعالیت آنزیم لیپاز را به طور قابل توجهی افزایش داد، همچنین میزان آنزیم آمیلاز را در خون آفزایش دادکه با تحقیق فوق همخوانی دارد.

می‌توان نتیجه گرفت که ترکیب گیاه و نانو عصاره باعث افزایش طول پرزهای روده و بهبود فعالیت آنزیم‌های روده گردیده است که در نهایت قطعا می‌تواند بر عملکردهای رشد تاثیرگذار باشد (Zaki *et al*., 2015). طبق نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر میزان فعالیت ALP , ALT و AST در تیمارها اختلاف معنی‌داری را با هم داشتند و نسبت به شاهد کمتر بودند. این امر می‌تواند نشان دهنده‌ی بهبود بافت سلول‌های کبدی در اثر استفاده از عصاره‌ی گیاه باشد. کمتر شدن آن در تیمارهای حاوی عصاره‌ی نانوکپسوله می تواند نشان دهنده‌ی این باشد که نانوکپسولاسیون اثر موثرتری در این امر دارد (عادلی و همکاران، ۱۳۹۸). هرگاه غشای سلولی آسیب ببیند ممکن است آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (AST) و آسپارتات آمینوترانسفراز (ALT) که در داخل میتوکندری سلول‌ها در بافت‌های مختلفی نظیر کبد، قلب، ماهیچه‌های اسکلتی، کلیه، پانکراس، طحال، گلبول‌های قرمز وآبشش ماهی‌ها یافت می‌شود به داخل خون آزاد شوند وسطح فعالیت آن‌ها در خون افزایش یابد (*et al*., Banaee 2011).

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-16]

نتایج حاصل از پژوهش اثرات نانو عصاره گیاه فراسیون و پروبیوتیک بر شمارش کلی باکتری‌های روده و باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* بر روی ماهی قزل-آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف آزمایش طبق جدول شماره ۶ مورد بررسی قرار گرفت. میزان باکتری‌های کل در تیمار۴ بیشتر ازسایر تیمارها بود و اختلاف معنی‌داری در بین تیمارها مشاهده گردید. همچنین میزان باکتری‌های کل در تیمارهای تغذیه شده با نانوعصاره گیاه و پروبیوتیک بیشتر از تیمار شاهد بود. به نظر می‌رسد که ترکیبات موجود در گیاه باعث افزایش طول پرزهای روده‌ی ماهی گردیده است و از این طریق باعث افزایش میزان باکتری کل در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک نسبت به تیمار شاهد گردیده است. میزان باکتری‌های اسید لاکتیک در تیمارهای تغذیه شده با نانوعصاره گیاه و پروبیوتیک بیشتر از سایر تیمارها بودند و با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. اما میزان باکتری‌های اسید لاکتیک در تیمار ۳ بیشتر از تیمار ۲ بود. با توجه به افزودن دوز بیشتر از نانوعصاره به جیره‌های غذایی در تیمارها، به نظر میرسد افزایش میزان باکتری‌های اسید لاکتیک در تیمار با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم نانو عصاره گیاه و پروبیوتیک، به دلیل وجود مواد مغذی در گیاه باشد. در تحقیقی که محمد علیخانی و همکاران (۱۳۹۹) بر روی تاثیر عصاره گیاه خرفه بر فلور باکتریایی ماهی قزل-آلای رنگین‌کمان انجام دادند، افزایش سطح عصاره گیاه باعث افزایش میزان باکتری‌های بی‌هوازی شد که با نتایج تحقیق فوق همخوانی دارد. میزان حضور باکتری‌ها در روده ماهی بازتابی از محل زندگی ماهی و نوع غذای مصرفی آن می‌باشد. ترکیبات مفید ازجمله ویتامین‌ها و برخی از آنزیم‌ها، موجب افزایش فعالیت-های گوارشی و آنزیمی شده و به‌دنبال آن افزایش رشد و توسعه سطوح غذایی را به‌همراه دارد (محمد علیخانی و همکاران، ۱۳۹۹). با توجه به این نتیجه به‌نظر می‌رسد که این تغییر نسبت به تیمار شاهد نتیجه تاثیر مواد موثره در گیاه باشد. جمعیت باکتری‌های انتروباکتریاسه و باکتری‌های گرم منفی نیز تحت تاثیر نانوعصاره گیاه و پروبیوتیک نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت. به طوری که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. در مطالعه ای که بر روی اثر نانونقره را بر باکتری *Escherichia coli* به عنوان مدلی برای باکتری‌های آنتروباکتریاسه بررسی کردند، نتایج آنها نشان داد نانوذرات نقره می‌توانند سبب جلوگیری از رشد و طولانی کردن فاز تاخیری رشد این باکتری شوند (Li *et al.*, 2010). همچنین در تحقیق دیگر که توسط خورشیدی و همکاران (۱۳۹۴) بر روی تغییرات فلور باکتریایی روده و پوست ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) تحت تاثیر نانوذرات نقره کلوئیدیانجام شد، نتایج نشان داد که میزان باکتری‌های آنتروباکتریاسه تحت تاثیر نانوذرات نقره نسبت به گروه شاهد کمتر بوه است.

از نتایج این تحقیق می‌توان دریافت که استفاده از ۴۰۰ میلی‌گرم نانو عصاره گیاه فراسیون در هرکیلوگرم از غذا همراه با لوگ ۸ از مخلوط پروبیوتیک با نسبت مساوی از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و باسیلوس *سابتیلیس* به عنوان یک مکمل غذایی اثر مثبتی بر فاکتورهای رشد و شاخص‌های بیوشیمیایی خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دارد.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-16]

سپاسگزاری

پژوهش حاضر در سالن تکثیر و پرورش آبزیان و آزمایشگاه فیزیولوژی آبزیان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. از همکاران در این آزمایشگاه و همچنین جناب آقای دکتر خسرو جانی خلیلی برای همکاری و فراهم کردن تسهیلات، کمال سپاس و قدردانی را داریم.

منابع

۱. حسینی، س.ص.، محمدیان، ت.، عباسپور، م.، علیشاهی، م.، ۱۳۹۶. اثر ریزپوشانی با آلژینات/کیتوزان بر بقاء باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (*Lactobacillus plantarum*) در شرایط شبیه سازی شده معده و روده در فیل ماهی (*Huso huso*). مجله علمی شیلات، ۲۷(۲) ۱۷۲-۱۶۱.

۲. حسینی، ع.ا.، کوچنین، پ.، علیشاهی، م.، محمدیان، ت.،ذاکری، م.، ۱۴۰۳. اثر ریزپوشانی باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (*Lactobacillus rhamnosus*) به روش امولسیون داخلی با آلژینات/کیتوزان بر روی برخی از شاخص‌های ایمنی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). نشریه توسعه آبزی پروری، ۱۸(۲) ، ۵۲-۳۷.

۳. حقجو، س.، قنبرزاده، ب.، همیشه‌کار، ح.، اثنی-عشری، س.، دهقان نیا، ج.، ۱۳۹۴. ارزیابی ویژگی‌های کلوئیدی وآنتی اکسیدانی نانولیپوزوم-های حاوی عصاره گزنه. فناوریهای نوین غذایی، ۲(۱۱) . ۲۳-۱۱.

۴. حمیدی، م. رحیمی، ش.، مژگانی، ن.، ۱۳۹۷. تأثیر پروبیوتیک، آویشن (*Thymus vulgaris* L.) و شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) بر فراسنجه‌های خونی، پاسخ ایمنی، خصوصیات لاشه و عملکرد جوجه‌های گوشتی. ماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۳۴(۱)،۳۴-۲۹.

۵. خورشیدی، ز.، کلباسی، م.، بهروزی، ش.، ۱۳۹۴. بررسی تغییرات فلور باکتریایی روده و پوست ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) تحت تاثیر نانوذرات نقره کلوئیدی. مجله-ی فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۴(۳)،۹۴-۷۹.

۶. ذوالفقاری، آ.، و فیروزبخش، ف.، ۱۳۹۲. اثر عصاره آبی ریحان بر تغییرات رشد و شاخص‌های هماتولوژی و بیوشیمی خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*). مجله تحقیقات دامپزشکی، ۶۸(۴)، ۴۰۴-۳۹۷ .

۷. روغنی، م.، مجردنژاد بلوچ، توراندخت.، دهکردی روغنی، ف.، ۱۳۸۴. اثر هیپوگلیسمیک و هیپولیپیدمیک تجویز خوراکی و درازمدت بخش هوایی فراسیون سفید در موش صحرایی دیابتی (*Marrubium vulgare*). مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان، ۷(۲)، ۵-۱.

۸. سلمانپور احمدی، ح. ع.، منوچهری، ح.، صفری، ر.، ۱۳۹۴. بررسی تاثیر نانوذره کیتوزان و عصاره آویشن شیرازی نانوکپسوله شده در فساد میکروبی فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) تلقیح شده با لیستریا منوسایتوژنز. مجله منابع طبیعی ایران، شیلات، ۶۸(۴)، ۵۸۷-۵۷۷.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-16]

۹. شریعت بهادری، آ. ع.، دلیمی اصل، س.، موسوی پور، ع.، غفاری، س.، نمرودی، س.، ۱۳۹۶. اثرات درمانی ترکیب گیاهان *Marrubium vulgare* + *Salvia officinalis* + *lippia citriodora* بر روی تاکی زوئیت انگل توکسوپلاسما گوندی و تشخیص با روش MTT. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز، ۳۹(۶)، ۵۰-۴۴.

۱۰. صارمی، ن.، شهریاری، ع.، زنگویی، نسیم.، ذاکری، م.، موسوی، س.م.، ۱۳۹۷. اثرات عصاره الکلی زیره سبز بر آنزیم‌های گوارشی و برخی پارامترهای سرمی ماهی انگشت قد کپور معمولی *Cyprinus carpio*. نشریه توسعه آبزی پروری، ۴(۱۲)، ۶۹-۵۱.

۱۱. ضیائی نژاد، س.، رفیعی، غ.، میرواقفی، ع.، فرحمند، ح.، ۱۳۹۳. بررسی تاثیر باکتری‌های *باسیلوس سابتیلیس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در شاخص‌های رشد، بازماندگی و فلور میکروبی دستگاه گوارش لارو ماهی شانک زرد باله(*Acanthopagrus latus*) به شیوه‌های رسانش مختلف. مجله منابع طبیعی شیلات، ۶۸(۲)، ۲۹۸-۲۷۸.

۱۲. عادلی، ع.، شاملوفر، م.، اکرمی، ر.، ۱۳۹۲. تاثیر عصاره گیاه به‌لیمو *Aloysia citrodora* بر عملکرد رشد، ترکیبات لاشه برخی آنزیم‌های کبدی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری، ۱۲(۳)، ۴۸ -۲۷.

۱۳. قاسمی پیربلوطی، ع .، پیرعلی، ا.، پیشکار، غ.ر.، جلالی، س.م.ع.، رئیسی، م.، جعفریان دهکردی، م.، حامدی، ب.، ۱۳۹۰. اثر اسانس چند گیاه دارویی بر سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss*. فصلنامه‌ی داروهای گیاهی، ۲(۲)، ۳۳-۶.

۱۴. قائدنیا، ب.، میربخش، م.، ذریه زهرا س.م.ج.، ۱۳۹۹. تاثیر جیره حاوی پروبیوتیک *Bacillus subtilis* IS02 بر شاخص‌های سلامتی، عملکرد سیستم ایمنی و پیشگیری از بیماری لکه سفید در میگوی سفید غربی. نشریه علمی توسعه آبزی پروری، ۱۴(۳)، ۹۹-۸۷.

۱۵. فیروزبخش، ف.، حق پرست، س.، معمار زاده، محمدرضا.، ۱۳۹۸. تأثیر عصاره فلفل قرمز (*Caspicum annum*) بر تحریک ایمنی، فراسنجه‌های خونی و رشد بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*). مجله بوم شناسی آبزیان، ۹(۱)، ۲۰-۹.

۱۶. گرایلی افرا، ع.، اورجی ، ح.، کرامت، ع.ص.، صفری، ر.، ۱۳۹۸. مقایسه استفاده از عصاره الکلی و نانوریزپوشانی شده گیاه گزنه (*Urtica dioica*) بر عملکرد رشد و شاخص‌های خونی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله تغذیه آبزیان، ۲(۵)، ۱۱۳-۱۰۱.

۱۷. محمد علیخانی، م.، شمسائی مهرجان، م.، حقیقی، م.، سلطانی، م.، کمالی، ا.، ۱۳۹۹. اثرات خوراکی عصاره خشک خرفه (*Portulaca oleracea*) بر برخی از شاخص‌های رشد، کیفیت لاشه و فلور میکروبی روده بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری ،۱۲(۱)،

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-16]

۲۲۹-۲۳۶.

۱۸. مخدوم، م.، صمدی، ف.، دستار، ب.، جعفری، س .م.، ۱۳۹۴. اثرات نانو و میکروکپسوله عصاره الکلی نعناع فلفلی برکیفیت گوشت جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی. همایش پژوهش‌های نوین در علوم دامی، دانشگاه بیرجند، ۵۳۲-۵۲۹.

۱۹. نصیری پور، س. ح.، جعفریان، ح.، قلی پور کنعانی، م.، ۱۳۹۶. تأثیر پروبیوتیک تجاری مولتی بهسیل بر عملکرد رشد، کارایی تغذیه و کیفیت لاشه ماهیان جوان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) مجله‌ی علوم آبزی پروری. ۶(۱) ۵۲-۴۲.

۲۰. هاشمی پناه، ا.، رفیعی، غ.، نیکبخت، ا.، بزرگی، س.، ۱۳۹۷.تاثیر آرتمیای غنی شده با باسیلوس سابتیلیس و پدیوکوکوس پنتوساسئوس بر شاخص‌های رشد و بقا و ترکیبات لاشه پست لارو میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*). فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری، ۱۰(۲)، ۲۴۴-۲۳۹.

21. Abarike, E., Jian, J., Tang, J., Cai, J., Yu, H., Lihua, C., Jun, L., 2018. Influence of traditional Chinese medicine and Bacillus species (TCMBS) on growth, immune response and disease resistance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquacultur Research. 00:1–10.
22. Abarike, E., Jian, J., Tang. J., Cai, J., 2020. A mixture of Chinese herbs and a commercial probiotic Bacillus species improves hemato-immunological, stress, and antioxidant parameters, and expression of HSP70 and HIF-1α mRNA to hypoxia, cold, and heat stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture Reports. 18, 100438.
23. Ahvazi, M., Jamzad, Z., Balali, G., Saeidi, H., 2016. Trichom micro-morphology in *Marrubium L*. in Iran and the role of environmental factors on their variation. Iranian Journal of Botany, 22 (1), 39-58.
24. Ahvazi, M., Jamzad, Z., Balali, G., Saeidi, H., 2017. A Taxonomical, Morphological and Pharmacological Review of *Marrubium vulgare* L., An OldMedicinal Plant in Iran. Journal of Medicinal Plants, 17(65), 7-24.
25. AOAC. (Association of Official Analitical Chenists) 1990 .Official MeTHODS Of Analysis AOAC, Washangton, DC, 1363/P.
26. Asmaa, S., Abd El-Naby, Adham, A., Al-Sagheer, Samar, S., Negm, Mohammed A.E., 2020. Dietary combination of chitosan nanoparticle and thymol affects feed utilization, digestive enzymes, antioxidant status, and intestinal morphology of *Oreochromis niloticus* Naiel. Aquaculture, 515, 734577.
27. Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A.R., Rafei. G.R., 2011. Effects of long-term silymarin oral supplementation on the blood biochemical profile of rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiologyand Biochemistry, 37, 887-896.
28. Benmebarek, A., Zerizer, S., Laggoune, S., Kabouche, Z., 2013. Immunostimulatory activity of Stachys mialhesi de No´e. Allergy, Asthma & Clinical Immunology, 9 (1), 1–4.
29. Dawood, M.A.O., Koshio, S., 2016. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review. Aquaculture, 454, 243-251.
30. Dein, F.J., 1986. Hematology.PP.174-191.
31. Demiroz Akbulut, T., Demirci, B., Baykan, S., 2020. Essential oils of *Marrubium* L. taxa from aegian province of Turkey. Journal of Essential Oil Research, 32, 612-620.
32. Dubey, R., Shami, T.C., Rao, K.U., 2009. Microencapsulation technology and applications. Defence Science Journal, 59(1), 82–95.
33. El-Abd, M., Abdel-Hamid, M., S.El-Sayed, H., A.El-Metwaly, H., E. El-Demerdash, M., F. A. Mohamed, Z., 2018. Viability of Microencapsulated Probiotics

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-16]

Combined with Plant Extracts in Fermented Camel Milk under Simulated Gastrointestinal Conditions. Middle East Journal of Applied Sciences, 8(3), 837-850.
34. Firouzbakhsh F., Noori F., Khalesi M.K. and Jani-Khalili K., 2011. Effects of a probiotic, protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. Fish Physiological biochemistry, 37(4), 833-42.
35. Halvorson, W.L. GP., 2003. USGS weeds in the west project: status of introduced plants in southern Arizona Parks, Factsheet for *Marrubium vulgare* L., U.S.G.S.N.P. Service.,Editor., U.S. p. 2-24.
36. Hardy, R.W., 2017. Pacific salmon, Oncorhynchus spp. In Handbook of Nutrient Requirements of Finfish (1991) (pp. 105-122). CRC Press.
37. Herrera-Arellano, A., Aguilar-Santamaria, L., Garcia-Hernandez, B., 2004. Nicasio-Torres P, Tortoriello J. Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. Phytomedicine; 11, 561-66.
38. Hogan, S.A., Mcnamee, B.F., Oridiordan, E.D., Osullivan, M., 2001. Emulsification microencapsulation properties of sodium caseinate/ carbohydrate blends. International Dairy Journal, 11, 137-144.
39. Hosseini S.V., Kenari A.A., Regenstein J.M., Grant A.A., 2010. Effects of alternative dietary lipid sources on growth performance and fatty acid composition of Beluga Sturgeon, *Huso huso*, juveniles. Journal Of The World Aquaculture Society, 41(4), 471-489.
40. Hrubec, T.C., and Smith, S.A., 2010. Hematology of fishes.Veterionary Hematology,Wiley-black well, USA, 1206, 994-1003.
41. Kampbell, T.W., Ellis, Ch.K., 2007 Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology. (1st ed.) Wiley Blackwell Scientific publications, Oxford, London, UK,(6)423-430.
42. Karioti A, Heilmann J, Skaltsa H., 2005. Labdane diterpenes from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*. Phytochemistry, 66(9), 1060-6.
43. Kulczy´nski, B., Kobus-Cisowska, J., Taczanowski, M., Kmiecik, D., Gramza-Michałowska, A., 2019. The chemical composition and nutritional value of chia seeds—current state of knowledge. Nutrients, 11(6), 1242.
44. li W.R., Xie X.B., Shi Q.S., Zeng H.Y., You-Sheng O.Y. and Chen Y.B., 2010. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. Applied Microbiology and Biotechnology, 85(4), 1115–1122.
45. Meyre-Silva C, Yunes R.A, Schlemper V., 2005. Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in *Marrubium vulgare* (Lamiaceae). IL Farmaco, 60, 321–326.
46. Meyre-Silva C and Cechinel-Filho V., 2010. A review of the chemical and pharmacological aspects of the genus Marrubium. Current Pharmaceutical Design, 16, 3503-18.
47. Misra, C.K., Kumar, D.B., Mukherjee, S.C., PAATTNAIK, P., 2006. Effect of long term administration of dietary a-glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. Aquaculture, 255, 82-94.
48. Mocanu, M., Cristea, V., Dediu, L., Bocioc, E., Grecu, R. I., Ion, S. and Vasilean, I., 2010. The effect of probiotic diet on growth and hematology parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792). Lucrari Stiintifice-Sera Zootheniie, 59, 258-263.
49. Neto, R.V.R., Yoshida, G.M., Lhorente, J.P. and Yáñez, J.M., 2019. Genome-wide association analysis for body weight identifies candidate genes related to development and metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Molecular Genetics and Genomics, 294(3), 563-571.
50. Orhan, IE., Belhattab, R.Ş., enol, FS., G¨ulpi nar, AR., Hoşbaş, S., Kartal, M., 2010. Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of Artemisia absinthium, A. herba-alba, A. fragrans, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, Origanum vulgare subsp. glandulossum and essential oil analysis of twoArtemisia

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-16]

species. Ind Crop Prod, 32(3), 566-571.
51. Pollock, R.A., Finlay, L., Mondschein, W. and Modesto, R.R., 2002. Laboratory exercises in microbiology, (8)232-240.
52. Rodjaroen, S., Thongprajukaew, K., Khongmuang, P., Malawa, S., Tuntikawinwong, K. and Saekhow, S., 2020. Ontogenic development of digestive enzymes in mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) and their. Aquaculture, 140, 277-305.
53. Sadeghi, A.A., Mohamadi-Saei, M., Ahmadvand, H., 2014. The efficacy of dietary savory essential oil on reducing the toxicity of aflatoxin B1 in broiler chicks. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi, 20, 481-486.
54. Sahpaz, S., Garbacki, N., Tits, M., Bailleul, F., 2002. Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. Journal of Ethnopharmacology, 79, 389-92.
55. Shahvardi, M., Farzaneh, M., Nejad-Ebrahimi, S., Soltani-Oshyani, A., 2019. The Destructive Effects of Essential Oil and Extracts of Some Medicinal Plants (Apiaceae family) on The Reduction of Zearalenone in Rumen Flui. Journal of Veterinary Research, 74,(3) 360-368.
56. Skov, P.V., Larsen, B.K., Frisk, M., Jokumsen, A., 2011. Effects of rearing density and water current on the respiratory physiology and hematology in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, at high temperature. Aquaculture, 319, 446-452.
57. Valipour, A., Nedaei, Sh., Noori, A., Khanipour, A.A., Hoseinifar, S.H., 2019. Dietary *Lactobacillus plantarum* affected on some immune parameters, air-exposure stress response, intestinal microbiota, digestive enzyme activity and performance of narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*, Eschscholtz). Aquaculture, 504, 121-130.
58. Van Doan, H., Hoseinifar, S.H., Ringø, E., Ángeles Esteban, M., Dadar, M., Dawood, M.A., Faggio, C., 2019. Host-associated probiotics: A key factor in sustainable aquaculture. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture, 28(1), 1642.
59. Wang Y.; Cui Y.; Yang Y. and Cai F., 2005. Partial compensatory growth in hybrid tilapia (*Oreochrmis mossambicus* × *O. niloticus*) following food deprivation Applied Ichth, 21, 389-393.
60. Yılmaz, S., Ergün, S. and Soytaş, N., 2013. Dietary supplementation of cumin (*Cuminum cyminum*) preventing streptococcal disease during first-feeding of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Journal of BioScience and Biotechnology, 2, 117-124.
61. Yousefi, K., Hamedeyazdan, S., Torbati, M., Fathiazad, F., 2016. Chromatographic Fingerprint Analysis of Marrubiin in *Marrubium vulgare* L. via HPTLC Technique. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 6(1), 131-136.
62. Zaki, M., Salem, M.E.-S., Gaber, M., Nour, A., 2015. Effect of chitosan supplemented diet on survival, growth, feed utilization, body composition & histology of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). World Journal of Engineering and Technology, 3(4), 38-45.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-16]