

تاثیر سطوح مختلف عصاره نعناع فلفلی بر برخی شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی و ایمنی ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

میلاذ عادل^(۱)، رضا پورغلام^(۱)، سید جلیل ذریه زهرا^{(۲)*}، مریم قیاسی^(۱)

*zorrieh@yahoo.com

۱- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۲

چکیده

افزایش روز افزون مقاومت‌های باکتریایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تجاری، گرایش به استفاده از گیاهان را به منظور تحریک سیستم ایمنی ذاتی افزایش داده است. در این مطالعه تاثیر جیره های غذایی حاوی سطوح مختلف عصاره نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) بر شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی و ایمنی ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور ماهیان با میانگین وزنی $12 \pm 0.22/32$ گرم در حوضچه‌های فایبرگلاس ۱۸۰۰ لیتری با تراکم ۸۰ عدد ماهی توزیع و طی مدت ۸ هفته، تیمارهای مختلف در ۳ تکرار شامل از غذای حاوی سطوح ۰، ۱، ۲ و ۳ درصد عصاره نعناع فلفلی تغذیه شدند. در انتهای دوره از ماهیان خونگیری شد و شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی و ایمنی تیمارها مورد مقایسه آماری قرار گرفتند. نتایج بدست آمده نشان داد که در تعداد گلبول‌های سفید و قرمز خون، درصد نوتروفیل، میزان هماتوکریت، هموگلوبین، پروتئین تام سرم، IgM و میزان فعالیت لایزوزیم سرم ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی عصاره نعناع فلفلی بویژه در غلظت‌های بالا (۲ و ۳٪) تفاوت معناداری با تیمار شاهد وجود دارد. نتایج حاصله مبین آن است که عصاره نعناع فلفلی، دارای اثرات تقویت کننده سیستم ایمنی غیر اختصاصی در ماهی قزل آلائی رنگین کمان می‌باشد. بنابراین، استفاده از عصاره این گیاه به ویژه در سطح ۳ درصد به عنوان محرک ایمنی در جیره ماهی قزل آلائی رنگین کمان، توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: قزل آلائی رنگین کمان، نعناع فلفلی، شاخص‌های خونی، ایمنی، بیوشیمیایی.

*نویسنده مسئول

مقدمه

مقاومت دارویی میکروارگانیزم‌ها که ناشی از مصرف بی‌رویه داروها، خود درمانی و تجویز آنتی‌بیوتیک توسط افراد غیر متخصص است، به عنوان یکی از معضلات مهم صنعت آبرزی پروری مطرح می‌باشد. عدم موفقیت در درمان بسیاری از بیماری‌های مزمن و حاد، اثرات جانبی مضر داروهای شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومت روز افزون باکتری‌های مختلف در برابر برخی از داروها به ویژه آنتی‌بیوتیک‌های رایج، گرایش محققین را نسبت به مطالعه در زمینه استفاده از محرک‌های ایمنی با منشا گیاهی به دلیل در دسترس‌تر بودن، خطرات کمتر برای محیط زیست و آبرزی و هم چنین قیمت پایین‌تر افزایش داده است (Dugenci et al., 2003). این مکمل‌های خوراکی علاوه بر بهبود شاخص‌های رشد، منجر به تحریک سیستم ایمنی غیر اختصاصی، افزایش تحمل تنش‌های محیطی و مقاومت در برابر برخی بیماری‌های عفونی آبرزیان می‌گردند، که همه این عوامل در نهایت منجر به اقتصادی‌تر شدن تولید آبرزیان پرورشی می‌گردد (Rao et al., 2006).

ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به عنوان یکی از با ارزش‌ترین ماهیان اقتصادی و مهمترین گونه سردآبی در صنعت آبرزی پروری کشور می‌باشد که تلاش در جهت بهبود شاخص‌های رشد و افزایش قدرت ایمنی این ماهی در برابر بیماری‌های متعدد باکتریایی افزایش فزاینده‌ای یافته است (Alishahi et al., 2010). در مطالعات متعدد، اثرات تحریک ایمنی گیاهان مختلف از قبیل گزنه (*Nigella sativa*)، دارواش (*Viscum album*)، آلوئه‌ورا (*Aloe barbadensis*)، گون (*Astragalus gummifer*)، سرخار گل (*Echinacea purpurea*)، پونه کوهی (*Mentha longifolia*)، چای سبز (*Camellia sinensis*)، زنجبیل (*Zingiber officinale*) و مرزه بختیاری (*Satureja bachtiarica*) در قزل‌آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفته است (Haghighi & Sharif Rohani, 2011; Sheikhzadeh et al., 2011). پورغلام و همکاران، (۱۳۹۲).

گیاه نعنای فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* و نام رایج Peppermint گیاهی علفی، پایا و چند ساله از تیره نعنای می‌باشد. این گیاه بومی مناطق مدیترانه بوده و

دامنه انتشار وسیعی در اکثر نقاط ایران به ویژه مناطق شمالی دارد (Hadian et al., 2008) و از جمله گیاهان بسیار مهم دارویی با خواص متعدد از قبیل اشتها آوری، ضد اسپاسم و ضد التهاب، ضد سرطان و دارای اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی است که مصارف گسترده‌ای در صنعت دارویی، غذایی و بهداشتی دارد (Iscan et al., 2002). علاوه بر آن، اثرات تحریک‌کنندگی رشد و ایمنی این گیاه در جانوران خون گرم و انسان نیز به اثبات رسیده است (Cosentino et al., 2009). منتول (Menthol)، منتون (Mentone) و متیل استات (Methyl acetate) از مهمترین ترکیبات موجود در این گیاه می‌باشند (Mahboubi & Haghi, 2008).

بررسی‌های صورت گرفته نشان دهنده اثرات گیاه نعنای فلفلی به عنوان محرک رشد و ایمنی در طیور و گونه‌های آبرزی از قبیل ماهی کپور معمولی (*Cyprinus caprio*) و باس دریایی (*Lates calcarifer*) بوده است (Talpur, 2014; Hajibeglou & Sudagar, 2010). با این وجود تاکنون مطالعه‌ای در خصوص تاثیر استفاده از این گیاه در جیره غذایی قزل‌آلای رنگین کمان صورت نگرفته است. لذا در مطالعه حاضر تاثیر سطوح مختلف عصاره نعنای فلفلی جیره بر شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی و ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش کار

این مطالعه در یک دوره ۸ هفته‌ای در پاییز سال ۱۳۹۳ در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، انجام پذیرفت. در ابتدای آزمایش و به منظور سازگاری ماهیان با شرایط جدید پرورشی، تعداد ۹۶۰ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با میانگین ($\pm SD$) وزنی $32/2 \pm 0/12$ گرم در ۱۲ حوضچه فایبر گلاس با حجم ۱۸۰۰ لیتر آب (هر حوضچه ۸۰ عدد ماهی) با شرایط یکسان از نظر حجم آب و فاکتورهای کمی و کیفی مشابه توزیع شدند. میانگین شاخصهای فیزیکی و شیمی آب در طی دوره پرورش شامل: اکسیژن محلول ($7/8 \pm 6/6$ میلی گرم در لیتر)، دما ($14/2 \pm 1/2$ درجه سانتیگراد)، pH ($7/2 \pm 4/4$) میلی گرم در لیتر) و هدایت الکتریکی ($5736/4 \pm 127/2$) میلی موس در سانتیمتر) بود.

آماده سازی جیره: پس از سازگاری ماهیان با شرایط جدید پرورشی، ماهیان به مدت ۸ هفته با غذای تجاری (کارخانه خوراک آبزیان مازندران) تغذیه شدند. آنالیز جیره پایه مورد استفاده در این مطالعه به صورت خلاصه در جدول ۱ آمده است. به منظور تهیه جیره‌های آزمایشی، سطوح ۰ (شاهد)، ۱، ۲ و ۳ درصد از عصاره نعنای فلفلی به جیره پایه فرموله شده اضافه و به صورت یکنواخت و همگن با جیره پایه مخلوط گردید. میزان غذای روزانه بچه ماهیان بر حسب درصد وزن بدن، دمای آب و براساس جدول غذادهی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تعیین شد و ماهیان به مدت ۸ هفته و ۳ بار در روز با جیره‌های منتخب، تغذیه شدند. این بررسی در قالب یک طرح کاملا تصادفی انجام شد و برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. در طی دوره، هر روز مدفوع و سایر مواد باقی مانده از کف حوضچه‌ها سیفون و حدود یک سوم، آب هر حوضچه تعویض شد.

جدول ۱: تجزیه تقریبی جیره پایه مورد استفاده در این مطالعه

ترکیب بیوشیمیایی جیره پایه	میزان (%)
پروتئین خام	۴۶/۲
چربی خام	۱۲/۹
خاکستر	۹/۸
رطوبت	۴/۷۶
عصاره عاری از ازت	۱۵/۲۶

زمان انجام آزمایشات بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد (Feldman *et al.*, 2000).

اندازه گیری شاخص‌های خونی: در این مطالعه تعداد گلبولهای قرمز خون (RBC)، تعداد گلبولهای سفید خون (WBC)، میزان هماتوکریت (HCT) و هموگلوبین (Hb) با استفاده از روش Feldman و همکاران 2000 اندازه‌گیری شد. همچنین، شمارش افتراقی گلبولهای سفید خون (نوتروفیل، لنفوسیت، ائوزینوفیل و مونوسیت) نیز با تهیه گسترش خون و طبق روش توصیه شده Borges و همکاران (۲۰۰۴) صورت پذیرفت.

اندازه گیری شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی: اندازه گیری شاخص‌های گلوکز، پروتئین تام، آلومین، ایمونوگلوبولین نوع M (IgM)، ALT، ALP، AST، C₃ و C₄ با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی (شرکت پارس آزمون، تهران) و بوسیله دستگاه

تهیه و آماده سازی عصاره نعنای فلفلی: در این مطالعه ۲ کیلوگرم از گیاه نعنای فلفلی پس از جمع آوری از رویشگاه‌های طبیعی استان مازندران و تایید توسط بخش گیاه شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه ساری، در محیط خشک و تاریک، به دور از نور خورشید و در جریان هوا خشک شد و سپس آسیاب و به صورت پودر در آمد. بر اساس روش کار Sivam (۲۰۰۱) پودر به دست آمده در بالن یک لیتری و به نسبت ۱ به ۵ با الکل اتیلیک ۸۰٪ مخلوط شد و به مدت ۴۸ ساعت بر روی دستگاه شیکر به آرامی مخلوط گردید. سپس مخلوط به دست آمده توسط صافی و کیف بوخنر صاف شد. عصاره اولیه به دست آمده وارد دستگاه تقطیر دوار گردید و در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد و به مدت ۴ ساعت الکل پرانی صورت گرفت و عصاره تغلیظ شده به دست آمده تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد.

نمونه برداری و خونگیری: در انتهای دوره آزمایش، به منظور ارزیابی تأثیر سطوح مختلف عصاره نعنای فلفلی بر برخی شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی و ایمنی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان و مقایسه بین تیمارهای مختلف، ماهیان ابتدا با پودر گل میخک Clove oil (۵ گرم در ۱۰ لیتر آب) بیهوش شدند. از هر تیمار ۲۴ نمونه (هر تکرار ۸ نمونه) خون محیطی از ورید ساقه دمی ماهیان اخذ گردید. مقدار ۱ سی سی خون جهت اندازه‌گیری شاخص‌های خونی به ظروف حاوی ماده ضد انعقاد هپارین و ۱ سی سی خون دیگر به ظروف فاقد ماده ضد انعقاد هپارین جهت اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی سرم منتقل گردید. سپس با استفاده از دستگاه سانتریفوژ (Germany, D-7200 Tuttilige 7) با ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه نمونه‌های سرم جدا و تا

اتوانالایزر (مدل Eurolyser, Belgium) صورت گرفت. اندازه‌گیری گلوکز به روش گلوکز اکسیداز، پروتئین تام به روش بیوره (Biuret)، آلبومین به روش بروموکرزول (Bromocresol green)، IgM بر اساس روش ایمونوتوربیدی متریکی و تری گلیسرید به روش آنزیمی لپاز (Lipase/GPO-PAP) صورت گرفت. سنجش آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) به روش آنزیماتیک کینتیک طبق روش Shahsavani و همکاران (۲۰۱۰) صورت گرفت همچنین، میزان فعالیت لایزوزیم سرم از طریق جذب نوری و با استفاده از دستگاه بیوفتومتر (Sartorius, Germany) و طبق روش توصیه شده توسط Ellis (۱۹۹۰) اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 18 و با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه (one-way analysis of variance) صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Multiple-range test Duncans) در سطح احتمال ۵ درصد تعیین گردید ($p \leq 0.05$).

نتایج

اثرات سطوح مختلف عصاره نعنای فلفلی بر شاخص‌های خونی ماهیان قزل‌آلا در جدول (۳) آمده است. نتایج نشان داد که افزودن نعنای فلفلی به جیره غذایی تأثیر معناداری بر تعداد گلبول‌های سفید (WBC) و گلبول‌های قرمز خون (RBC)، درصد هماتوکریت (HCT) و غلظت هموگلوبین (Hb) داشته و تفاوت معنی‌داری بین تیمار تغذیه شده با ۲ و ۳ درصد عصاره نعنای فلفلی در جیره با تیمار شاهد و تیمار تغذیه شده با ۱ درصد عصاره نعنای فلفلی در جیره مشاهده شد ($p \leq 0.05$). مقایسه نتایج حاصل از آنالیز لکوسیت‌های خون ماهیان در انتهای آزمایش (جدول ۲) بیشترین درصد نوتروفیل را در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۳ درصد عصاره نعنای فلفلی نشان داد که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد و تیمار ۱ درصد عصاره نعنای فلفلی نشان دادند ($p \leq 0.05$) هر چند که بین تیمار ۲ و ۳ درصد تفاوت معناداری در درصد نوتروفیل مشاهده نشد ($p > 0.05$). درصد لنفوسیت و مونوسیت در بین تیمارهای آزمایشی تفاوت معناداری نداشت ($p > 0.05$). با این وجود، ماهیانی که جیره حاوی عصاره نعنای فلفلی دریافت کرده بودند از درصد لنفوسیت و مونوسیت بیشتری نسبت به تیمار شاهد برخوردار بودند.

جدول ۲: مقایسه میانگین (\pm SD) شاخص‌های خونی قزل‌آلای تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره نعنای فلفلی در جیره:

شاخص	شاهد	نعنای فلفلی ۱٪	نعنای فلفلی ۲٪	نعنای فلفلی ۳٪
گلبول قرمز (میلیون/ میلی‌لیتر)	۱/۷۲±۰/۱۲ ^b	۱/۸۲±۰/۱۸ ^b	۲/۰۲±۰/۱۷ ^a	۲/۱±۰/۲۳ ^a
گلبول سفید (هزار/ میلی‌لیتر)	۱۳/۴±۱/۲ ^b	۱۳/۹±۱/۷ ^b	۱۴/۳±۱/۳ ^{ab}	۱۵/۹±۱/۸ ^a
هموگلوبین (گرم/ دسی‌لیتر)	۹/۲±۱/۴ ^b	۹/۱۶±۱/۱۸ ^b	۱۰/۸۲±۲/۳ ^a	۱۱/۱۲±۱/۸۷ ^a
هماتوکریت (درصد)	۳۱/۱±۱/۵ ^c	۳۰/۸±۱/۳ ^c	۳۲/۶±۱/۴ ^b	۳۴/۴±۱/۵ ^a
لنفوسیت (/.)	۹۶/۲±۱/۶ ^a	۹۳/۲±۰/۸ ^a	۹۱/۲±۲/۰ ^a	۸۸/۷±۱/۳ ^a
نوتروفیل (/.)	۲/۲±۰/۸ ^b	۵/۵±۲/۳ ^b	۶/۷±۱/۸ ^{ab}	۸/۶±۲/۵ ^a
مونوسیت (/.)	۱/۲±۰/۱ ^a	۱/۳±۰/۶ ^a	۱/۴±۰/۴ ^a	۱/۷±۰/۶ ^a

حروف غیریکسان در یک بازه آزمون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار تیمارها می‌باشد ($p \leq 0.05$)

مقایسه با گروه شاهد وجود ندارد ($p > 0.05$). هر چند که مقادیر آنزیم‌های ALT و ALP در تیمار ۲ درصد بیشتر از سایر تیمارها بوده است (جدول ۳).

مقادیر برخی از آنزیم‌های سرمی خون ماهیان تغذیه شده با سطوح متفاوت نعنای فلفلی در جدول (۳) آمده است. بررسی آماری نشان دهنده آن است که اختلاف معناداری در مقادیر آنزیم‌های سرمی بین تیمارهای مختلف در

جدول ۳: میانگین ($\pm SD$) مقادیر برخی آنزیم‌های کبدی خون ماهی قزل آلائی تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره نعنای فلفلی

تیماز آنزیم	شاهد	نعناع فلفلی ۱٪	نعناع فلفلی ۲٪	نعناع فلفلی ۳٪
AST (U/L)	۶۰۸/۴±۳۹/۶	۵۹۶/۸±۴۹/۱	۶۲۹/۵±۵۸/۴	۶۵۳/۹±۷۲/۹
ALP (U/L)	۱۵۸/۱±۱۸/۲	۱۴۲/۵±۲۱/۸	۱۷۴/۳±۲۴/۵	۱۶۹/۱±۱۹/۶
ALT (U/L)	۳۰/۳±۶/۸	۳۸/۶±۲۷/۱	۴۲/۱۸±۱۱/۳	۳۷/۸۴±۹/۷

عدم وجود حروف در هر ردیف نشان دهنده‌ی معنی دار نبودن اختلافات در بین تیمارها می‌باشد ($p > 0.05$).

مقادیر برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی سرمی قزل آلائی جوان تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره نعنای فلفلی در پایان ۸ هفته پرورش، به صورت خلاصه در جدول (۴) آمده است. بررسی آماری نشان دهنده آن است که اختلاف معنی‌داری در مقادیر شاخص‌های بیوشیمیایی

گلوکز، آلبومین، گلوبولین و تری گلیسرید بین تیمارهای مختلف وجود ندارد ($p > 0.05$)، هر چند که مقادیر مذکور در تیمارهای حاوی عصاره نعنای فلفلی در جیره بیشتر از تیمار شاهد بوده است.

جدول ۴: تاثیر سطوح مختلف نعنای فلفلی بر برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی قزل آلائی رنگین کمان در انتهای دوره (Mean \pm SD)

تیماز آنزیم سرمی	شاهد	نعناع فلفلی ۱٪	نعناع فلفلی ۲٪	نعناع فلفلی ۳٪
گلوکز (میلی گرم/دسی لیتر)	۳۲/۲±۲/۶ ^a	۳۵/۶±۳/۲ ^a	۴۰/۲±۴/۳ ^a	۳۸/۴±۴/۱ ^a
تری گلیسرید (میلی گرم/دسی لیتر)	۳۲۸/۶±۲۵/۷ ^a	۳۴۲/۱±۳۰/۹ ^a	۳۱۸/۵±۲۸/۶ ^a	۳۱۹/۲±۲۱/۲ ^a
IgM (میکرو گرم/میلی لیتر)	۸۲/۴±۸/۶ ^c	۷۴/۳±۱۰/۴ ^c	۱۱۲/۶±۲۱/۳ ^b	۱۲۵/۸±۱۸/۸ ^a
گلوبولین (گرم/دسی لیتر)	۱/۱±۰/۲۸ ^b	۱/۶±۰/۴۸ ^a	۰/۸±۰/۲۱ ^b	۱/۱۸±۰/۲۴ ^b
آلبومین (گرم/دسی لیتر)	۲/۱±۰/۱۶ ^b	۱/۹±۰/۲۳ ^b	۳/۱±۰/۲۲ ^a	۲/۹±۰/۱۸ ^a
پروتئین تام (گرم/دسی لیتر)	۳/۲±۲/۲۶ ^b	۳/۵±۳/۳۲ ^b	۳/۹±۱/۴۶ ^{ab}	۴/۰۸±۲/۵۴ ^a
لایزوزیم سرم (میلی گرم/دسی لیتر)	۳/۱۶±۰/۳۶ ^c	۴/۳۴±۰/۴۶ ^b	۵/۲۸±۰/۵۸ ^a	۵/۳۴±۰/۶۴ ^a
C ₃ (میلی گرم/میلی لیتر)	۲۶/۵۷±۵/۳۸ ^a	۲۵/۸۶±۳/۵۲ ^a	۲۹/۲±۵/۱۶ ^a	۲۸/۳۹±۶/۱ ^a
C ₄ (میلی گرم/میلی لیتر)	۷/۶۲±۱/۴۶ ^a	۸/۲۴±۱/۵۶ ^a	۸/۰۶±۱/۱۸ ^a	۸/۴۲±۱/۲۹ ^a

*حروف غیریکسان در یک بازه آزمون نشان دهنده اختلاف معنی دار تیمارها می‌باشد ($p \leq 0.05$)

بر اساس نتایج حاصله میزان پروتئین تام سرم در تیمار ۲ و ۳ درصد تفاوت معنی‌داری را با تیمار شاهد و ۱ درصد نشان داد ($p \leq 0.05$)، هر چند که این تفاوت در بین تیمار ۲ و ۳ درصد معنی دار نبود ($p > 0.05$). (جدول ۴). همانگونه که در جدول ۴ مشاهده می‌شود بیشترین غلظت جزء C₃ و C₄ کمپلمان در انتهای دوره به ترتیب در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۲ و ۳ درصد عصاره نعنای فلفلی مشاهده شد، هر چند که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف در اجزای کمپلمان مشاهده نشد ($p > 0.05$). بررسی میزان

فعالیت لایزوزیم سرم ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف نعنای فلفلی در پایان دوره پرورش نشان دهنده آن است که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف وجود دارد ($p \leq 0.05$) و عصاره تجویز شده تاثیر معنی‌داری بر فعالیت لایزوزیم سرم ماهیان داشته است، بطوریکه بیشترین میزان فعالیت لایزوزیم در تیمار دو و سه درصد مشاهده شده است که تفاوت معنی‌داری را با تیمار شاهد و یک درصد نشان می‌دهد ($p \leq 0.05$).

بحث

از جمله اهداف تکثیر و پرورش ماهی قزل آلاهی رنگین کمان، بهبود شاخص‌های رشد و ایمنی به منظور کاهش میزان تلفات در جهت اقتصادی نمودن تولید این گونه ارزشمند می‌باشد (Alishahi et al., 2010). در سال‌های اخیر استفاده از محرک‌های سیستم ایمنی در جیره‌های غذایی ماهیان به منظور افزایش فعالیت سیستم‌های ایمنی غیر اختصاصی و ایجاد مقاومت در مقابل عوامل بیماری‌زا مورد توجه قرار گرفته است (Alishahi et al., 2010). داروهای گیاهی از جمله محرک‌های سیستم ایمنی هستند که با تأثیر گذاری بر سیستم ایمنی ماهیان موجب فعال شدن سلول‌های موثر در ایمنی می‌شوند که از آن جمله اثرات احتمالی آن، افزایش فعالیت سلول‌های ماکروفاژی، افزایش سلول‌های فاگوسیتوز کننده (نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها)، افزایش تعداد لنفوسیت‌ها و ایمونوگلوبولین‌های سرم و افزایش فعالیت لیزوزیم می‌باشد. استفاده از این مواد ابزار مؤثری برای افزایش شاخص‌های رشد، ظرفیت سیستم ایمنی و مقاومت ماهی در برابر بیماری‌های شایع بوده و تحقیق در مورد استفاده از مکمل‌ها، روند رو به رشدی دارد (Hosseinifar et al., 2010).

آزمایشات هماتولوژی و آنالیز اجزاء سرم خون بعنوان ابزاری مناسب به منظور تشخیص اختلالات متابولیکی، ارزیابی وضعیت سلامتی ماهیان در شرایط پرورشی متراکم، مقاومت غیراختصاصی گونه‌های مختلف ماهی و مولدین، ارزیابی وضعیت تغذیه و ارزیابی تأثیر مواد افزودنی به غذای ماهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن سطوح مختلف عصاره نعناع فلفلی به جیره ماهی قزل آلاهی رنگین کمان اثرات معنی داری بر تعداد گلبول‌های قرمز و سفید خون، درصد هماتوکریت، غلظت هموگلوبین و تعداد نوتروفیل در تیمار ۲ و ۳ درصد در مقایسه با تیمار شاهد و ۱٪ داشته است. چنین حالتی نیز متعاقب تجویز پودر نعناع فلفلی در جیره کپور معمولی و ماهی باس دریایی، عصاره سر خار گل (پورغلام و همکاران، ۱۳۹۲) در ماهی قزل آلاهی رنگین کمان و عصاره گون در ماهی تیلاپیا (Ardo et al., 2008) گزارش شده است. افزایش یافتن تعداد نوتروفیل‌ها متعاقب مصرف این محرک گیاهی، وابسته به بتاگلوکان- هابی است که قادر به تشخیص گیرنده‌های ویژه‌ای بر روی

گلبول‌های سفید خون می‌باشند (Andrews et al., 2009). زمانی که این گیرنده‌ها توسط گلوکان‌ها اشغال شوند، فعالیت گلبول‌های سفید در احاطه کردن، کشتن و هضم کردن باکتری‌های بیماری‌زا بیشتر می‌شود که همه این عوامل موجب بهبود سیستم دفاعی میزبان می‌گردد (Andrews et al., 2009).

لایزوزیم از مهمترین اجزای ایمنی غیراختصاصی ماهی محسوب می‌شود که موجب تخریب جداره باکتری‌ها، فعال سازی کمپلمان و افزایش فعالیت بیگانه خواری در ماهی می‌شود. افزایش میزان فعالیت لایزوزیم سرم گویای بهبود وضعیت ایمنی ماهی است و افزایش آن به مقابله بهتر سیستم ایمنی ماهی در برابر عوامل عفونی و استرس‌زا کمک می‌نماید. افزایش فعالیت لایزوزیم متعاقب تجویز برخی محرک‌های ایمنی، واکسن‌ها و برخی پریبیوتیک‌ها در ماهی مشاهده شده است (Alishahi et al., 2010). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن سطوح مختلف عصاره نعناع فلفلی تأثیر معناداری در میزان فعالیت لایزوزیم سرم ماهیان داشته است و بیشترین میزان فعالیت لایزوزیم متعاقب تجویز سطح ۳ درصد عصاره نعناع فلفلی مشاهده شد. نتایج بررسی Talpur (۲۰۱۴) نشان داد که استفاده از سطوح ۳ تا ۵ درصد نعناع فلفلی در جیره ماهی باس دریایی تأثیر معنی داری در میزان فعالیت لایزوزیم سرم و قدرت باکتری‌کشی آن دارد که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد، نتایج مشابهی نیز به هنگام به کارگیری پودر نعناع فلفلی در جیره کپور معمولی، عصاره سر خار گل (پورغلام و همکاران، ۱۳۹۲)، چای سبز (Sheikhzadeh et al., 2011) و زنجبیل (Haghighi & Sharif Rohani, 2013) در ماهی قزل آلاهی رنگین کمان گزارش شده است (Ardo et al., 2008).

آنزیم‌های کبدی به عنوان شاخص فعالیت کبدی محسوب می‌شوند و تغییر در میزان فعالیت و ترشح آنها می‌تواند متأثر از فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب، تراکم، شرایط پرورشی، نوع جیره مصرفی، سن، جنس و وضعیت سلامت ماهیان باشد (Racicot et al., 1975). در مطالعه حاضر مقادیر آنزیم‌های سرمی ALT، AST و ALP تحت تأثیر سطوح مختلف عصاره نعناع فلفلی اضافه شده به جیره ماهیان قرار نگرفت، هر چند که مقادیر آنزیم‌های

نیز متعاقب مصرف پودر نعنای فلفلی در ماهی کپور معمولی، عصاره زنجبیل (Dugenci *et al.*, 2003; Haghghi & Sharif Rohani, 2013) در ماهی قزل آلابی رنگین کمان، عصاره آلوئه ورا در کپور معمولی (Alishahi *et al.*, 2010) و عصاره سیر در ماهی نیل تیلاپیا مشاهده شده است (Shalaby *et al.*, 2006).

کمپلمان در ماهیان نقش مهمی در باکتری کشی سرم و موکوس ایفا می‌کند و به عنوان اپسونین با اتصال به بخش‌های اختصاصی عامل مهاجم در سطح بدن میزبان در بیگانه‌خواری دخیل می‌باشد. در مطالعه حاضر، بیشترین غلظت جزء C₃ و C₄ کمپلمان در انتهای دوره به ترتیب در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی دو و سه درصد نعنای فلفلی مشاهده شد، هر چند که تفاوت معناداری بین تیمارهای مختلف در اجزای کمپلمان مشاهده نشد. تحریک فعالیت اجزای C₃ یا C₄ کمپلمان در ماهی قزل آلابی رنگین کمان متعاقب مصرف داروهای گیاهی از قبیل سرخار گل (پورغلام و همکاران، ۱۳۹۲)، خار مریم (احمدی و همکاران، ۱۳۸۹)، گزنه و انبه (Awad *et al.*, 2010) به اثبات رسیده است.

در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از آن است که استفاده از عصاره نعنای فلفلی به ویژه در سطح ۳ درصد جیره، بر روی برخی از شاخص‌های خونی و ایمنی ماهی قزل آلابی رنگین کمان تاثیر گذار می‌باشد. بنابراین استفاده از این مکمل خوراکی بعنوان محرک سیستم ایمنی در جیره غذایی قزل آلابی رنگین کمان توصیه می‌شود. هر چند که، انجام مطالعات بیشتر به منظور تعیین سطح بهینه استفاده از این عصاره در جیره غذایی، اثر-گذاری آن بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی، تراکم باکتریایی روده، ترکیبات بدن و میزان مقاومت ماهی در برابر باکتری‌های بیماری‌زای شایع ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود واجب می‌دانند تا از تلاش‌ها و زحمات کارکنان محترم بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، بویژه جناب آقای مهندس

ALP و ALT در تیمار ۲ درصد بیشتر از سایر تیمارها بوده است. تحقیقات Binaii و همکاران (۲۰۱۴) مبین آن است که متعاقب تجویز سطوح مختلف گزنه در جیره فیل ماهیان جوان، تاثیر معنی‌داری در شاخص‌های سرمی ALT، AST و ALP مشاهده نمی‌شود (در نقطه مقابل، به دنبال مصرف عصاره سیر در ماهی نیل تیلاپیا تفاوت معنی‌داری در شاخص‌های سرمی ALT و AST مشاهده شده است (Shalaby *et al.*, 2006)). عدم تاثیر عصاره نعنای فلفلی بر آنزیم‌های کبدی مورد مطالعه، نشان دهنده آن است که عصاره گیاهی مذکور فاقد مواد آسیب رسان کبدی می‌باشد، هر چند که در آزمایشات تکمیلی بایستی مطالعات هیستوپاتولوژی بر روی بافت‌های کبدی، کلیه و روده انجام گیرد (Talpur, 2014).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری را در میزان گلوکز، آلبومین، گلوبولین و تری گلیسرید سرم متعاقب تجویز سطوح مختلف عصاره نعنای فلفلی در بین تیمارهای مختلف نشان نداد. نتایج مشابهی به هنگام استفاده از سطوح مختلف نعنای فلفلی در جیره ماهی باس دریایی گزارش شده است (Talpur, 2014). در نقطه مقابل، متعاقب مصرف این گیاه در جیره کپور معمولی تفاوت معنی‌داری در میزان گلوکز، آلبومین و گلوبولین مشاهده شده است (Hajibeglou & Sudagar, 2010). اختلافات به دست آمده در این نتایج را می‌توان به تفاوت‌های گونه‌ای، سن ماهیان، فرمولاسیون جیره غذایی، درجه خلوص و دوز مورد استفاده از این گیاه نسبت داد.

افزایش سطح پروتئین‌های سرم به عنوان شاخص مناسبی برای بررسی وضعیت دفاع ایمنی ماهی مطرح می‌باشد. پروتئین تام پلاسما شامل پروتئین‌های آلبومین و گلوبولین است. تصور می‌شود که افزایش میزان آلبومین، گلوبولین و پروتئین سرم بیشتر در ارتباط با تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی میزبان باشد (Wiegertjes *et al.*, 1996). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که متعاقب مصرف سطوح ۲ و ۳ درصد عصاره نعنای فلفلی افزایش معناداری در سطح پروتئین تام سرم و IgM نسبت به تیمار شاهد و ۱ درصد دیده می‌شود، که نشان دهنده افزایش قدرت پاسخ دفاعی میزبان است. چنین وضعیتی

(*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromona hydrophila*. *Aquaculture*, 275, 26-33.

Awad, E. and Austin, B., 2010. Use of lupin, *Lupinus perennis*, mango, *Mangifera indica*, and stinging nettle, *Urtica dioica*, as feed additives to prevent *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 33, 413-420.

Binaii, M., Ghiasi, M., Farabi, S.M., Pourgholamm, R., Fazli, H. and Safari., 2014. Biochemical and hemato-immunological parameters in juvenile beluga (*Huso huso*) following the diet supplemented with nettle (*Urtica dioica*). *Fish and Shellfish Immunology*, 36, 46-51.

Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F. and Wassermann, G.F., 2004. Hematologic and serum biochemical values for jundia' (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 30, 21-25.

Cosentino, M., Bombelli, R.A., Laura Colombo, M., Azzetti, A., Bergamaschi, A., Marino, F. and Lecchini, S. 2009. Antioxidant properties and in vitro immunomodulatory effects of peppermint (*Mentha piperita*.) essential oils in human leukocytes. *Journal of Pharmacology Sciences and Research*, 1(3), 33-43.

Dugenci, S.K., Arda, N. and Candan, A., 2003. Some medicinal plants as

محمد بینایی و سرکار خانم مهندس آذین زاهدی تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

احمدی، ک.، وثوقی، غ.، میروافقی، ع. ا.، عطایی مهر، ب. و بنایی، ب.، ۱۳۸۹. تاثیر عصاره خوراکی گیاه دارویی خار مریم (*Silybum marianum*) بر برخی فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی ماهی قزل آلابی رنگین کمان، مجله بیولوژی دریا، ۱۹-۲۶، ۲(۷).

پور غلام، ر.، شریف روحانی، م.، صفری، ر.، سعیدی، ع. ا.، بینایی، م.، نجفیان، ر.، بانکه ساز، ز.، تقوی، م. ج. و سپهداری، ا.، ۱۳۹۲. اثر عصاره سرخارگل (*Echinacea purpurea*) بر برخی شاخص‌های ایمنی و بازماندگی قزل آلابی رنگین کمان در برابر با استرپتوکوکوس اینیایی (*Streptococcus iniae*). مجله علمی شیلات ایران، ۱-۱۲، ۲۶(۳).

Alishahi, M., Ranjbar, M.M., Ghorbanpour, M., Peyghan, R., Mesbah, M. and Razi Jalali, M., 2010. Effects of dietary *Aloe vera* on some specific and nonspecific immunity in the common carp (*Cyprinus carpio*). *International Journal of Veterinary Research*, 4(3), 189-195.

Andrews, S.R., Sahu, N.P., Pal, A.K. and Kumar, S., 2009. Hematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: effect of dietary mannanoligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. *Aquaculture Research*, 41, 61-69.

Ardo, L., Yin, G., Xu, P., Varadi, L., Szigeti, G., Jeney, Z. and Jeney, G., 2008. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile Tilapia

- Iscan, G., Demirci, F., Kirimer, N., Ku'rkcu'oglu, M. and Baser, K.H.C., 2002.** Antimicrobial screening: *Mentha piperita* essential oil. Journal of Agriculture Food Chemistry, 50, 3943–3946.
- Mahboubi, M. and Haghi, G., 2008.** Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. Journal of Ethnopharmacology, 19, 325–327.
- Racicot, J. G., Gaudet, M. and Leray, C., 1975.** Blood and liver enzymes in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) with emphasis on their diagnostic use: study of CC1, toxicity and a case of *Aeromonas* infection. Journal of Fish Biology, 7, 825-835.
- Rao, Y.Y., Das B.K., Iyotymayee, P. and Chakrabarti, R., 2006.** Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology, 20, 265-273.
- Shahsavani, D., Mohri, M. and Gholipour Kanani, H., 2010.** Determination of normal values of some blood serum enzymes in *Acipenser stellatus* Pallas. Fish Physiology and Biochemistry, 36, 39-43.
- Shalaby, A.M., Khattab, Y.A. and Abdel Rahman, A.M., 2006.** Effects of garlic (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile Tilapia immunostimulants for fish. Journal of Ethnopharmacology, 88, 99–106.
- Ellis, A.E., 1990.** Lysozyme assay, techniques in fish immunology. 2nd edn. Fair Haven, USA, pp. 100-102.
- Feldman, B.F., Zinkl, J.G. and Jian, N.C., 2000.** Schalm's veterinary hematology, 3rd edn. Lippincott Williams and Wilkins publication, Philadelphia, USA. pp. 32-36.
- Hadian, J., Ghasemnezhad, M. and Ranjbar, H., 2008.** Antifungal potency of some essential oils in control of postharvest decay of strawberry caused by *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger*. Journal of Essential Oil Research, 11, 553–562.
- Haghighi, M. and Sharif Rohani, M., 2013.** The effects of powdered ginger (*Zingiber officinale*) on the haematological and immunological parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Medicinal Plant and Herbal Therapy Research, 1, 8-12.
- Hajibeglou, A. and Sudagar, M., 2010.** Immune response of common carp (*Cyprinus caprio*) fed with herbal immunostimulants diets. Agricultural Journal, 5(3), 163-172.
- Hosseinifar, S.H., Zare, P. and Merrifield, D.L., 2010.** The effects of inulin on growth factors and survival of the Indian white shrimp larvae and post-larvae (*Fenneropenaeus indicus*). Aquaculture Research, 41(9), 348-352.

Society of Nutrition Sciences, 131, 1106-1108.

Talpur, A.D., 2014. *Mentha piperita* (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch) against *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, (420-421), 71-78.

Wiegertjes, G.F., Stet, R.J.M., Parmentier, H.K. and Van Muiswinkel, W.B., 1996. Immunogenetics of disease resistance in fish; a comparable approach. *Development Comparative Immunology*, 20, 365-371.

(*Oreochromis niloticus*). *Journal of Venom Animal Toxins and Tropical Diseases*, 12(2), 171-201.

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

Sivam, G.P., 2001. Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as supplement. *American*

The effect of different level of *Mentha piperita* on some of the hematological, biochemical and immune parameters of *Oncorhynchus mykiss*

Adel M.¹; Pourgholam R.¹; Zorriehzahra S.J.^{2*}; Ghiasi M.¹

*zorrieh@yahoo.com

1-Caspian Sea Ecology Research Center, P.O.Box: 961 Sari, Iran

2- Iranian Fisheries Science Research Institute, P.O.Box:13185-116 Tehran, Iran

Key words: *Oncorhynchus mykiss*, *Mentha piperita*, Hematological, Biochemical and Immune parameters

Abstract

Due to the increased bacterial resistance to common antibiotics, there is tendency towards using herbal extracts in order to increase the non-specific immune system. This study was conducted to evaluate the effects of different levels of *Mentha piperita* extract on hematological, biochemical and immune parameters of *Oncorhynchus mykiss*. For this purpose, fish with mean (\pm SD) weight of 32.2 ± 0.12 g were raised for 8 weeks in Vniro tanks (1800 l water), 80 fish to each tank and feeding with different levels of *M. piperita* (with concentrations of % 0, % 1, % 2.0 and % 3.0, three replicates were used for each concentration). At the end of the trial, blood samples were collected to determine some hematological, biochemical and immunity parameters in different groups and compared to one another. Results showed significant differences in RBC and WBC count, neutrophil percentage, haemoglobin (Hb), haematocrit (HCT) value, total protein (TP), IgM and lysozyme activity in fish fed *M. piperita* (especially with 2 and 3.0% concentrations) when compared with control group. The results suggest that *M. piperita* extract may enhance the non-specific immune system of *O. mykiss*. Thus, using this supplement especially at of 3.0% level as immunostimulants was recommended in *O. mykiss* diet.

*Corresponding author