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

میلاد 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 دریافت: آذر ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۳

چکیده

افزایش روز افزون مقاومت‌های باکتریایی نسبت به آنتی بیوتیک‌های 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 آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور ماهیان با میانگین وزنی ۳۲/۲±۰/۱۲ گرم در حوضچه‌های فایبرگلاس ۱۸۰۰ لیتر ی با تراکم ۸۰ عدد ماهی توزیع و طی مدت ۸ هفته، تیمارهای مختلف در۳ 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 آلای رنگین کمان می‌باشد. بنابراین، استفاده از عصاره این گیاه به ویژه در سطح ۳ درصد به عنوان محرک ایمنی در جیره ماهی قزل آلای رنگین کمان، توصیه می‌شود.

لغات کلیدی : قزل آلای رنگین کمان، نعناع فلفلی، شاخص‌های خونی، ایمنی، بیوشیمیایی.

*نویسنده مسئول

مقدمه

مقاومت دارویی میکروارگانیسم‌ها که ناشی از مصرف بی-رویه داروها، خود درمانی و تجویز آنتی بیوتیک توسط افراد غیر متخصص است، به عنوان یکی از معضلات مهم صنعت آبزی 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 آنتی بیوتیک‌های 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 آبزی 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 بیماری های عفونی آبزیان می‌گردند، که همه این عوامل در نهایت منجر به اقتصادی تر شدن تولید آبزیان پرورشی می‌گردد (Rao *et al*., 2006).

ماهی قزل آلای رنگین کمان به عنوان یکی از با ارزش-ترین ماهیان اقتصادی و مهمترین گونه سردآبی در صنعت آبزی 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*)، درواش (*Viscum album*)، آلوئه ورا (*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 قزل آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفته است (Haghighi & Sharif Rohani, 2013 ; Sheikhzadeh *et al*., 2011 ; پورغلام و همکاران، ۱۳۹۲).

گیاه نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* و نام رایج Peppermint گیاهی علفی، پایا و چند ساله از تیره نعناع می باشد. این گیاه بومی مناطق مدیتراته 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 تحریک کنندگی 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 نعناع فلفلی به عنوان محرک رشد و ایمنی در طیور و گونه‌های آبزی 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 قزل آلای رنگین کمان صورت نگرفته است. لذا در مطالعه حاضر تاثیر سطوح مختلف عصاره نعناع فلفلی جیره بر شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی و ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش کار

این مطالعه در یک دوره ۸ هفته ای 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 قزل آلای رنگین کمان با میانگین(±SD) وزنی ۳۲/۲±۰/۱۲ 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 فیزیک وشیمی آب در طی دوره پرورش شامل: اکسیژن محلول (۷/۸±/۶ میلی گرم در لیتر)، دما (۱۴/۲±۱/۲ درجه سانتیگراد)، pH (۷/۲±/۴ میلی گرم در لیتر) و هدایت الکتریکی (۵۷۳۶/۴±۱۲۷/۲ میلی موس در سانتیمتر) بود.

تهیه و آماده سازی عصاره نعناع فلفلی: در این مطالعه ۲ کیلوگرم از گیاه نعناع 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 قیف 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.

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 نعناع 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

نمونه برداری و خونگیری: در انتهای دوره آزمایش، به منظور ارزیابی تأثیر سطوح مختلف عصاره نعناع فلفلی بر برخی شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی و ایمنی بچه ماهیان قزل آلای 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 اندازه-گیری 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 Tutilige 7) با ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه نمونه‌های سرم جدا و تا 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 Borgesو همکاران (۲۰۰۴) صورت پذیرفت.

اندازه گیری شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی: اندازه گیری شاخص‌های گلوکز، پروتئین تام، آلبومین، ایمونوگلوبولین نوع M (IgM)، ALT، ALP، AST، C_3 و C_4 با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی (شرکت پارس آزمون، تهران) و بوسیله دستگاه

اتوآنالایزر (مدل Eurolyser, Belgium) صورت گرفت. اندازه گیری گلوکز به روش گلوکز اکسیداز، پروتئین تام به روش بیوره (Biuret)، آلبومین به روش بروموکرزول (Bromocresol green)، IgM بر اساس روش ایمونوتوربیدی متریک و تری گلیسرید به روش آنزیمی لیپاز (Lipase/GPO-PAP) صورت گرفت. سنجش آنزیم های کبدی آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات 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 varianc) 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 نعناع فلفلی بر شاخص‌های خونی ماهیان قزل آلا در جدول (۳) آمده است. نتایج نشان داد که افزودن نعناع فلفلی به جیره غذایی تاثیر معناداری بر تعداد گلبول‌های سفید (WBC) و گلبول‌های قرمز خون (RBC)، درصد هماتوکریت (HCT) و غلظت هموگلوبین (Hb) داشته و تفاوت معنی داری بین تیمار تغذیه شده با ۲ و ۳ درصد عصاره نعناع فلفلی در جیره با تیمار شاهد و تیمار تغذیه شده با ۱ درصد عصاره نعناع فلفلی در جیره مشاهده شد ($p\leq 0.05$). مقایسه نتایج حاصل از آنالیز لکوسیت های خون ماهیان در انتهای آزمایش (جدول ۲) بیشترین درصد نوتروفیل را در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۳ درصد عصاره نعناع فلفلی نشان داد که از نظر آماری تفاوت معنی داری را با تیمار شاهد و تیمار ۱ درصد عصاره نعناع 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 نعناع فلفلی دریافت کرده بودند از درصد لنفوسیت و مونوسیت بیشتری نسبت به تیمار شاهد برخوردار بودند.

جدول۲: مقایسه میانگین(±SD) شاخص‌های خونی قزل آلای تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره نعناع فلفلی در جیره:

شاخص	شاهد	نعناع فلفلی ۱ ٪	نعناع فلفلی ۲ ٪	نعناع 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±۱/۴۲^{b}	۹/۱۶±۱/۱۸^{b}	۱۰/۸۲±۲/۳۶^{a}	۱۱/۱۲±۱/۸۷^{a}
هماتوکریت (درصد)	۳۱/۱±۱/۵^{c}	۳۰/۸±۱/۲^{c}	۳۲/۶±۱/۴۶^{b}	۳۴/۴±۱/۵^{a}
لنفوسیت (٪)	۹۶/۲±۱/۶۲^{a}	۹۳/۲±۰/۸۴^{a}	۹۱/۲±۲/۰۸^{a}	۸۸/۷±۱/۳۸^{a}
نوتروفیل (٪)	۲/۲±۰/۸^{b}	۵/۵±۲/۲^{b}	۶/۷±۱/۸^{ab}	۸/۶±۲/۵۶^{a}
مونوسیت (٪)	۱/۲±۰/۱^{a}	۱/۳±۰/۶^{a}	۱/۴±۰/۴۵^{a}	۱/۷±۰/۶^{a}

حروف غیریکسان در یک بازه آزمون نشان دهنده اختلاف معنی دار تیمارها می باشد ($p\leq$۰/۰۵)

مقادیر برخی از آنزیم‌های سرمی خون ماهیان تغذیه شده با سطوح متفاوت نعناع فلفلی در جدول (۳) آمده است. بررسی آماری نشان دهنده آن است که اختلاف معناداری در مقادیر آنزیم‌های سرمی بین تیمارهای مختلف در مقایسه با گروه شاهد وجود ندارد ($p>0.05$). هر چند که مقادیر آنزیم های ALT و ALP در تیمار ۲ درصد بیشتر از سایر تیمارها بوده است (جدول ۳).

جدول ۳: میانگین(±SD) مقادیر برخی آنزیم‌های کبدی خون ماهی قزل آلای تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره نعناع فلفلی

تیمار / 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	۳۸/۶۲±۷/۱	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>۰/۰۵).

مقادیر برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی سرمی قزل آلای جوان تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره نعناع 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 نعناع فلفلی در جیره بیشتر از تیمار شاهد بوده است.

جدول ۴: تاثیر سطوح مختلف نعناع فلفلی بر برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی قزل آلای رنگین کمان در انتهای دوره (Mean±SD)

تیمار / 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}	۱/۶۶±۰/۴۸^{a}	۰/۸۲±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}	۳/۵۶±۳/۳۲^{b}	۳/۹۳±۱/۴۶^{ab}	۴/۰۸±۲/۵۴^{a}
لایزوزیم سرم (میلی‌گرم/ دسی لیتر)	۳/۱۶±۰/۳۶^{c}	۴/۳۴±۰/۴۶^{b}	۵/۲۸±۰/۵۸^{a}	۵/۳۴±۰/۶۴^{a}
C_3 (میلی‌گرم/ میلی لیتر)	۲۶/۵۷±۵/۳۸^{a}	۲۵/۸۶±۳/۵۲^{a}	۲۹/۲±۵/۱۶^{a}	۲۸/۳۹±۶/۱^{a}
C_4 (میلی‌گرم/ 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 می باشد(p≤۰/۰۵)

بر اساس نتایج حاصله میزان پروتئین تام سرم در تیمار ۲ و ۳ درصد تفاوت معنی داری را با تیمار شاهد و ۱ درصد نشان داد (p≤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 C_3 و C_4 کمپلمان در انتهای دوره به ترتیب در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۲ و ۳ درصد عصاره نعناع فلفلی مشاهده شد، هر چند که تفاوت معنی داری بین تیمارهای مختلف در اجزای کمپلمان مشاهده نشد (p> 0.05). بررسی میزان فعالیت لایزوزیم سرم خون ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف نعناع فلفلی در پایان دوره پرورش نشان دهنده آن است که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف وجود دارد (p≤ 0.05) و عصاره تجویز شده تاثیر معنی داری بر فعالیت لازوزیم سرم ماهیان داشته است، بطوری‌که بیشترین میزان فعالیت لایزوزیم در تیمار دو و سه درصد مشاهده شده است که تفاوت معنی داری را با تیمار شاهد و یک درصد نشان می‌دهد (p≤ 0.05).

بحث

از جمله اهداف تکثیر و پرورش ماهی قزل آلای 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 تاثیر 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 ایمونوگلبولین‌های 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 تاثیر 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 آلای 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 آلای 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-هایی 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 پربیوتیک‌ها در ماهی مشاهده شده است (Alishahi *et al*., 2010). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن سطوح مختلف عصاره نعناع فلفلی تاثیر 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 تاثیر 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 آلای 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 متاثر از فاکتورهای فیزیکی وشیمیایی 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 تاثیر سطوح مختلف عصاره نعناع فلفلی اضافه شده به جیره ماهیان قرار نگرفت، هر چند که مقادیر آنزیم‌های

ALT و ALP 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 شاخصه‌های سرمی ALT، AST و ALP مشاهده نمی شود (در نقطه مقابل، به دنبال مصرف عصاره سیر در ماهی نیل تیلاپیا تفاوت معنی‌داری در شاخصه‌های سرمی AST و ALT مشاهده شده است (Shalaby *et al*., 2006). عدم تاثیر عصاره نعناع 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 نعناع فلفلی در بین تیمارهای مختلف نشان نداد. نتایج مشابهی به هنگام استفاده از سطوح مختلف نعناع فلفلی در جیره ماهی باس دریایی گزارش شده است (Talpur, 2014)، در نقطه مقابل، متعاقب مصرف این گیاه در جیره کپور معمولی تفاوت معنی داری در میزان گلوکز، آلبومین و گلوبولین مشاهده شده است (Hajibeglou & Sudagar, 2010). اختلافات به دست آمده در این نتایج را می‌توان به تفاوت-های گونه‌ای، سن ماهیان، فرمولاسیون جیره غذایی، درجه خلوص و دوز مورد استفاده از این گیاه نسبت داد.

افزایش سطح پروتین‌های 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 نعناع 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 نیز متعاقب مصرف پودر نعناع فلفلی در ماهی کپور معمولی، عصاره زنجبیل (Dugenci *et al*., 2003; Haghighi & Sharif Rohani, 2013) در ماهی قزل آلای 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 می باشد. در مطالعه حاضر، بیشترین غلظت جزء C_3 و C_4 کمپلمان در انتهای دوره به ترتیب در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی دو و سه درصد نعناع فلفلی مشاهده شد، هر چند که تفاوت معناداری بین تیمارهای مختلف در اجزای کمپلمان مشاهده نشد. تحریک فعالیت اجزای C_3 یا C_4 کمپلمان در ماهی قزل آلای 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 نعناع فلفلی به ویژه در سطح ۳ درصد جیره، بر روی برخی از شاخص‌های خونی و ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان تاثیر گذار می‌باشد. بنابراین استفاده از این مکمل خوراکی بعنوان محرک سیستم ایمنی در جیره غذایی قزل آلای رنگین کمان توصیه می-شود. 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

محمد بینایی و سر کار 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 mariamum***) بر برخی فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی ماهی قزل آلای رنگین کمان، مجله بیولوژی دریا، ۲۶-۱۹ ، (۷)۲.

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 آلای رنگین کمان در برابر با استرپتوکوکوس اینیایی (*Streptococcus iniae*)، مجله علمی شیلات ایران، ۱۲-۱ ،(۳)۲۶.

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 (*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

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 (*Salrno gairdneri* Rich.) with emphasis on their diagnostic use: study of CC1, toxlcity 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 Ethnopharamacology, 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, 3nd 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.

(*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 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.

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-Capian 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 (±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