تاثیر پودر کرم خاکی (*Eisenia fetida*) و سیر (*Allium sativum*) خوراکی بر فراسنجه‌های خونی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

بهزاد رزاقی[۱]، سکینه یگانه[۱*]، عبدالصمد کرامت امیرکلایی[۱]، خسرو جانی‌خلیلی[۱]

*skyeganeh@gmail.com

۱. گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، صندوق پستی ۵۷۸، ساری، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۶

چکیده

با توسعه آبزی‌پروری، یافتن جایگزین برای پودر ماهی بدون تاثیر منفی در عملکرد ماهی از اهمیت خاصی برخوردار است. در این تحقیق، اثر سطوح مختلف جایگزینی پودر کرم خاکی (*Eisenia fetida*) همراه با پودر سیر (*Allium sativum*) بر فراسنجه‌های خونی و سرمی بچه‌ماهیان انگشت‌قد قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد بررسی قرار گرفتند. سطوح مختلف جایگزینی پودر کرم خاکی با پودر ماهی شامل صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد با یا بدون ۲/۵ درصد پودر سیر در جیره در نظر گرفته شدند. ماهیان با میانگین وزن ۰/۲۷±۳۰ گرم در قالب طرح کاملا تصادفی با ۸ تیمار و سه تکرار در شرایط یکسان به مدت ۵۶ روز پرورش داده شدند. در پایان دوره پرورش، نتایج بررسی فراسنجه‌های خونی و سرمی نشان داد که بالاترین میزان هموگلوبین در تیمار ۲۵ درصد جایگزینی به همراه سیر، بالاترین میزان هماتوکریت در تیمارهای حاوی ۲۵ درصد پودر کرم خاکی با و بدون سیر و کمترین میزان گلبول قرمز خون در تیمارهای ۵۰ درصد پودر کرم خاکی بدون سیر و ۷۵ درصد جایگزینی پودر کرم خاکی با و بدون سیر و بالاترین میزان گلبول سفید در تیمار ۷۵ درصد جایگزینی پودر کرم خاکی بدون سیر مشاهده شد. MCV، MCH و MCHC در تیمار بدون کرم خاکی به همراه سیر به طور معنی‌داری بیش از سایر تیمارها بجز تیمار شاهد بود ($P<0/05$). بالاترین میزان پروتئین تام در تیمار بدون جایگزینی به همراه سیر و ۲۵ درصد با و بدون سیر، کمترین میزان گلوکز و تری‌گلیسرید در تیمار ۲۵ درصد جایگزینی به همراه سیر و کمترین میزان کلسترول در تیمار ۷۵ درصد جایگزینی با و بدون سیر مشاهده شد. نتایج نشان داد که درصدهای مختلف جایگزینی پودر کرم خاکی با و یا بدون پودر سیر موجب بهبود میزان گلبول سفید، تری‌گلیسرید، گلوکز و کلسترول نسبت به تیمار شاهد شد. اثرات استفاده از مکمل پودر سیر همراه با پودر کرم خاکی بر تمام فراسنجه‌های سرمی معنی‌دار بود ($P<0/05$). در مجموع مشخص شد که کمترین تغییرات فراسنجه‌های خونی و سرمی در سطح ۲۵ درصد جایگزینی پودر کرم خاکی مشاهده شد و استفاده از مکمل پودر سیر توانست اثر منفی جایگزینی ۵۰ درصد پودر کرم خاکی را بر برخی از فراسنجه‌ها بهبود بخشد.

لغات کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، پودر کرم خاکی (*Eisenia fetida*)، فراسنجه‌های خونی و سرمی، سیر

*نویسنده مسئول

مقدمه

یکی از حیاتی‌ترین بخش بدن جانداران خون می‌باشد (Feist *et al*., 2004)، بسیاری از بیماری‌ها، نارسائی‌ها و شرایط غیر نرمال را می‌توان از طریق ارزیابی شاخص‌های خونی تشخیص داد (Flynn *et al*., 2006). شاخص‌های هماتولوژی در فیزیولوژی ماهی بسیار موثر است. از سوی دیگر، شرایط پرورش ماهی شامل تغذیه، آب، هوا و غیره نیز بر شاخص‌های خونی تاثیرگذار است (عطایی‌مهر و همکاران، ۱۳۹۰)، لذا آگاهی از وضعیت خونی ماهیان به ویژه در شرایط تغذیه‌ای متفاوت می‌تواند بیش از پیش در حفظ، تکثیر، نگهداری و پرورش این ماهیان موثر باشد.

آبزی‌پروری رشد سریعی در طی ۳۰ سال گذشته از خود نشان داده است. هدف اصلی آبزی‌پروری تامین سلامت ماهی و همچنین بهبود کارایی ماهی است و در این بین ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با دارا بودن قابلیت سازگاری مناسب، در اکثر آب‌های شیرین که دارای دمای مناسب جهت رشد این گونه هستند یکی از بهترین گونه‌های پرورشی است (نفیسی بهابادی و همکاران، ۱۳۸۸). ایران همراه با شیلی، نروژ و فرانسه، جزو کشورهای برتر تولید کننده قزل‌آلای رنگین‌کمان است و ایران در تولید قزل‌آلای رنگین‌کمان در آب‌شیرین، رتبه اول جهانی را در اختیار دارد (Kalbassi *et al*., 2013; Dekamin *et al*., 2015).

پودر ماهی به عنوان یکی از منابع اصلی تامین‌کننده پروتئین و اسیدهای آمینه در جیره آبزیان می‌باشد و با گذشت زمان و پیشرفت علم و تکنولوژی در دنیا جایگزین دیگری برای این ماده مهم در تغذیه آبزیان نشده است. هزینه بالا و همچنین کمبود منابع تأمین پودر ماهی نیاز به استفاده از سایر منابع جایگزین را افزایش داده است. از جمله آن می‌توان به پودر بچه قورباغه (Ayinla *et al*., 1994)، سیلاژ تخمیری ماهیان و انواع غذاهای زنده، اشاره کرد که در این بین استفاده از برخی کرم‌ها، کرمی‌شکلان و استفاده از کرم خاکی (Sogbesan *et al*., 2006) روند افزایشی پیداکرده است. کرم خاکی با ترکیبات پروتئینی (اسیدهای آمینه) و اسیدهای چرب خود قادر به تأمین نیازهای تغذیه‌ای آبزیان می‌باشد. میزان چربی نسبتاً کم آن (۱۱-۹ درصد) در مقایسه با سایر غذاهای زنده در کنار درصد بالای پروتئین آن (۶۳-۵۹ درصد) کرم خاکی را در ردیف غذاهای با ارزش قرار داده است. گزارش شده است که ترکیب و میزان اسیدهای آمینه ضروری و نیز اسیدهای چرب ضروری لینولئیک در کرم خاکی تقریباً به‌طور کامل قادر به تامین نیازهای تغذیه‌ای آبزیان پرورشی خواهد بود و میزان برخی از اسیدهای آمینه ضروری مانند هیستیدین (۲۳/۲ درصد) و متیونین (۳/۲ درصد) حتی بیش از نیاز تغذیه‌ای آبزیان می‌باشد (Ng *et al*., 2001).

افزودن سیر (*Allium sativum*) ممکن است با تحریک سیستم گوارش و افزایش فعالیت آنزیم‌ها، اثرات منفی ناشی از جایگزینی پودر ماهی را کاهش دهد (Lee *et al*., 2014). سیر دارای ترکیبات متنوعی از انواع مواد معدنی، ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه، فلاوونوئیدها، ترکیبات فرار و غیر فرار با ارزش دارویی و درمانی بسیار بالایی است (Martins *et al*., 2016) به طوری که سیر به عنوان یک گیاه با خاصیت آنتی بیوتیکی شناخته شده (Pour *et al*., 2014) و می‌تواند فعالیت ماکروفاژها و سیستم ایمنی را بهبود بخشد (خدادادی و همکاران، ۱۳۹۱). آلیسین موجود در سیر یک ترکیب سولفوره می‌باشد که نقش مهمی در خصوصیات آنتی‌بیوتیکی، ضد قارچی، و ضد اکسیدانی بازی می‌کند (گل آقایی و همکاران، ۱۳۹۵؛ Lanzotti, 2006; Corzo-Martínez *et al*., 2007).

تاکنون در مطالعات بسیاری از کرم خاکی به عنوان منبع پروتئینی (Stafford & Tacon, 1984; Nandeesha *et al*., 1988; Velasquez *et al*., 1991; Óscar Pereira & Gomes, 1995; Pucher *et al*., 2014; Dedeke *et al*., 2013) و سیر به عنوان مکمل (جوادزاده و همکاران، ۱۳۹۱؛ Shalaby *et al*., 2006; Nya & Austin, 2011; Tangestani *et al*., 2011) در جیره ماهیان استفاده شده است. با توجه به مطالب بیان‌شده در ارتباط با اهمیت جایگزینی پودر ماهی با سایر منابع پروتئینی و اثرات مثبت احتمالی پودر سیر و اینکه تاکنون در مورد اثر جایگزینی پودر کرم خاکی گونه *Eisenia fetida* با پودر ماهی همراه با استفاده از پودر سیر (*Allium*

sativum) در جیره بر فراسنجه‌های خونی و سرمی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مطالعه‌ای صورت نگرفته است، لذا در این تحقیق اثر جایگزینی پودر کرم خاکی گونه *Eisenia fetida* با پودر ماهی همراه با استفاده از پودر سیر در جیره غذایی بر فراسنجه‌های خونی و سرمی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

تهیه بچه‌ماهی و شرایط نگهداری آن‌ها

این آزمایش در مزرعه پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان در شهرستان آمل انجام گرفت. مخازن پرورش از جنس بتونی بوده و حجم آب در هر مخزن ۳۰۰ لیتر بود. آب مورد استفاده برای کارگاه آب چاه بوده و هوادهی از طریق پمپ هوا و سنگ هوا انجام شد. تعویض آب به صورت یکبار در روز و به میزان ۹۰-۸۰ درصد انجام گرفت. میانگین دما به صورت روزانه ثبت گردید، میزان pH، شوری، هدایت الکتریکی و میزان کل مواد جامد محلول آب هر دو هفته یک‌بار اندازه‌گیری شد. ۳۶۰ قطعه بچه‌ماهی انگشت‌قد قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن اولیه ۰/۲۷±۳۰ گرم از مرکز تکثیر و پرورش ماهی در شهرستان آمل تهیه شدند. ماهیان به مدت ۷ روز با شرایط محیط پرورشی آداپته شدند. در طی این مدت ماهیان، روزانه دو بار و تا حد سیری با جیره تجاری تهیه‌شده از کارخانه خوراک دام و طیور آبزیان مازندران تغذیه شدند. در پایان مدت ۷ روز، ماهیان جداسازی و در هر تکرار در مخازن پرورشی به صورت تصادفی، تعداد ۱۵ قطعه ماهی ذخیره‌سازی شدند. ماهیان به مدت ۵۶ روز با جیره آزمایشی روزانه سه بار (صبح، ظهر و عصر) و بر اساس میزان سیری تغذیه شدند.

ساخت جیره‌های غذایی و آنالیز جیره

مواد اولیه مورد نیاز، برای ساخت هر جیره به کمک ترازوی دیجیتالی وزن شده و در ظرف به خوبی مخلوط شدند تا شکل خمیری به خود گرفتند. سپس مخلوط حاصل به کمک چرخ گوشت خانگی به صورت رشته‌هایی با قطر ۲/۵ میلی‌متر درآمدند. رشته‌ها در داخل خشک‌کن در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت کاملا خشک شد و تا زمان مصرف در دمای ۱۸- درجه سانتی-گراد نگهداری شد. ترکیب و آنالیز جیره‌های ساخته‌شده در جدول ۱ گزارش شده است. تیمارهای مورد بررسی (۸ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار) در این آزمایش شامل تیمار C: تغذیه ماهی‌ها با جیره فاقد پودر کرم خاکی و پودر سیر، تیمار G: ۲/۵ درصد پودر سیر، تیمار 25WG: ۲۵ درصد پودر کرم خاکی به جای پودر ماهی+۲/۵ درصد پودر سیر، تیمار 25W: ۲۵ درصد پودر کرم خاکی به جای پودر ماهی، تیمار 50WG: ۵۰ درصد پودر کرم خاکی به جای پودر ماهی+۲/۵ درصد پودر سیر، تیمار 50W: ۵۰ درصد پودر کرم خاکی به جای پودر ماهی، تیمار 75WG: ۷۵ درصد پودر کرم خاکی به جای پودر ماهی+۲/۵ درصد پودر سیر و تیمار 75W: ۷۵ درصد پودر کرم خاکی به جای پودر ماهی بود (Farahi *et al.*, 2010; Habashy, 2012; Adhami *et al.*, 2017). مقدار رطوبت، پروتئین، چربی و خاکستر جیره بر اساس روش AOAC (۲۰۰۰) تعیین شد.

اندازه‌گیری فراسنجه‌های خونی و بیوشیمیایی سرم

در انتهای آزمایش، از هر واحد آزمایشی ۴ قطعه ماهی بصورت تصادفی و به آرامی بوسیله ساچوک صید شده و بلافاصله جهت به‌حداقل رساندن استرس با پودر گل میخک (۰/۵ گرم در لیتر) بیهوش شدند (Yarmohammadi *et al.*, 2012) خون‌گیری از قسمت ساقه دمی با استفاده از سرنگ‌های پلاستیکی ۲ میلی-متری با سرسوزن شماره ۲۱ انجام شد. نمونه خون‌های گرفته‌شده از ماهی، بخشی به لوله‌های هپارینه منتقل شده و پس از اینکه خوب مخلوط شد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد.

جدول ۱: ترکیب و آنالیز تقریبی جیره‌های مورد استفاده در طول دوره پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

Table 1: Proximate composition and analysis of diet during rainbow trout culture

مواد اولیه (درصد)	C	G	25WG	25W	50WG	50W	75WG	75W
کرم خاکی	۰	۰	۱۱/۲۵	۱۱/۲۵	۲۲/۵۰	۲۲/۵۰	۳۳/۷۵	۳۳/۷۵
پودرماهی	۴۵	۴۵	۳۳/۷۵	۳۳/۷۵	۲۲/۵۰	۲۲/۵۰	۱۱/۲۵	۱۱/۲۵
سبوس گندم	۲/۵۰	۰	۰	۲/۵۰	۰	۲/۵۰	۰	۲/۵۰
آرد گندم	۶/۵۰	۶/۵۰	۶/۵۰	۶/۵۰	۶/۵۰	۶/۵۰	۶/۵۰	۶/۵۰
گلوتن گندم	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
پودر ذرت	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴
پودرسویا	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵
روغن ماهی	۱۱	۱۱	۱۱	۱۱	۱۱	۱۱	۱۱	۱۱
مونوکلسیم فسفات	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
ویتامین[1]	۱/۵۰	۱/۵۰	۱/۵۰	۱/۵۰	۱/۵۰	۱/۵۰	۱/۵۰	۱/۵۰
مواد معدنی[2]	۱/۵۰	۱/۵۰	۱/۵۰	۱/۵۰	۱/۵۰	۱/۵۰	۱/۵۰	۱/۵۰
سیر	۰	۲/۵	۲/۵	۰	۲/۵	۰	۲/۵	۰
ملاس	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲
مواد مغذی								
ماده خشک	۹۳/۴۵±۰/۰۸	۹۳/۲۳±۰/۱۸	۹۴/۱۵±۰/۱۱	۹۴/۶۰±۰/۱۲	۹۳/۱۵±۰/۱۰	۹۳/۲۹±۰/۲۲	۹۳/۸۵±۰/۱۲	۹۴/۱۲±۰/۱۵
پروتئین	۴۲/۵۰±۱/۰۵	۴۲/۶۲±۰/۱۲	۴۱/۲۶±۰/۴۲	۴۱/۶۵±۰/۹۵	۴۲/۴۴±۱/۰۲	۴۱/۶۲±۱/۱۲	۴۱/۷۵±۰/۳۲	۴۱/۳۳±۰/۵۰
چربی	۱۹/۴۵±۰/۸۸	۱۹/۵۶±۰/۲۸	۲۰/۲۲±۱/۱۲	۱۹/۶۷±۰/۵۲	۱۹/۱۷±۱/۰۵	۱۹/۰۹±۱/۱۰	۱۸/۸۵±۰/۷۵	۱۹/۰۲±۰/۱۶
خاکستر	۱۰/۴۰±۰/۴۲	۱۰/۱۰±۰/۱۱	۱۰/۳۰±۰/۶۵	۱۰/۶۰±۱/۰۲	۱۰/۵۰±۰/۱۰	۱۰/۷۰±۰/۱۵	۱۰/۸۰±۰/۱۲	۱۰/۲۰±۱/۲۲

نتایج آنالیز جیره به صورت میانگین±انحراف معیار بیان شده‌اند.

[1]بر حسب میلی‌گرم بر کیلوگرم شامل؛ ویتامین آ: ۱۰۰۰۰ آیو (IU)، ویتامین دی ۳: ۲۰۰۰ آیو، ویتامین ای: ۱۰۰ میلی‌گرم، ویتامین کا: ۲۰ میلی‌گرم، ویتامین ب۱: ۴۰۰ میلی‌گرم، ویتامین ب۲: ۴۰ میلی‌گرم، ویتامین ب۶: ۲۰ میلی‌گرم، ویتامین ب۱۲: ۰/۰۴ میلی‌گرم، بیوتین: ۰/۲ میلی‌گرم، کولین کلراید: ۱۲۰۰ میلی‌گرم، فولیک اسید: ۱۰ میلی‌گرم، اینوسیتول: ۲۰۰ میلی‌گرم، نیاسین: ۲۰۰ میلی‌گرم، پانتوتنیک کلسیم (ب۵): ۱۰۰ میلی‌گرم

[2]بر حسب گرم بر کیلوگرم از مخلوط شامل؛ $MgS0_4.2H_20$: ۱۲۷/۵، KCl: ۵۰/۰، NaCl: ۶۰، $CaHPO_4.\ 2H_2O$: ۷۲۷/۸، $FeSO_4.\ 7H_2O$: ۲۵/۰، $ZnSO_4.\ 7H_2O$: ۵/۵، $CuSO_4.\ 5H_2O$: ۰/۷۸۵، $MnSO_4.\ 4H_2O$: ۲/۵۴، $CoSO_4.\ 4H_2O$: ۰/۴۷۸، $Ca\ (IO_3)_2.\ 6H_2O$: ۰/۲۹۵، $CrCl_3.\ 6H_2O$: ۰/۱۲۸.

بخش دیگر از خون، به لوله‌های معمولی منتقل شده و تا لخته‌شدن برای مدت ۳ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری و سپس عمل سانتریفوژ انجام شد. در ادامه سرم به داخل ویال‌های پلاستیکی ۲ میلی‌متری ریخته شده و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای شمارش گلبول‌های قرمز و سفید از روش هموسایتومتر استفاده شد (Campbell, 1995). غلظت هموگلوبین به روش سیان‌مت‌هموگلوبین و با استفاده از کیت شرکت زیست‌شیمی اندازه‌گیری شد. برای تعیین هماتوکریت (Hct) از روش میکروهماتوکریت استفاده گردید (Drabkin, 1946). شاخص‌های گلبول قرمز، میانگین حجم گلبول قرمز (MCV)، میانگین هموگلوبین گلبول قرمز (MCH)، میانگین غلظت هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) با استفاده از رابطه‌های استاندارد محاسبه شدند:

MCV =(مقدار هماتوکریت/گلبول قرمز در میلیون)×۱۰؛

MCH =(مقدار هموگلوبین/گلبول قرمز در میلیون)×۱۰؛

MCHC = (مقدار هموگلوبین/مقدار هماتوکریت)×۱۰۰)
قسمتی از نمونه‌های خون در لوله‌های فاقد ماده‌ی ضد انعقاد خون قرار گرفتند و پس از تشکیل لخته، سرم خون با استفاده از سانتریفوژ (به مدت ۱۵ دقیقه و دور rpm ۶۰۰۰) توسط سمپلر جداسازی شد و در میکروتیوپ‌های جداگانه قرار گرفت. نمونه‌های سرم جداسازی‌شده تا زمان انجام آزمایش‌های سرمی در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. اندازه‌گیری فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم از قبیل پروتئین تام، گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسیرید (Trinder, 1969, Lowry *et al*., 1952) با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی شرکت زیست‌شیمی انجام شد.

محاسبات آماری

تست نرمال‌بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov Smirnov test انجام شد. اثر سطوح مختلف پودر کرم خاکی و سیر در جیره بر فراسنجه‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی سرم با استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه در قالب آزمایش فاکتوریل با استفاده از نرم‌افزار SPSS16 انجام شد و مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون دانکن و درصد خطای ۰/۰۵ مقایسه شدند.

نتایج

در طول دوره میانگین دما، اکسیژن، pH، کل مواد جامد محلول، شوری و هدایت الکتریکی به ترتیب ۲/۱۴±۱۲/۲۸ درجه سانتی‌گراد، ۱/۱۲±۶/۳۲ میلی‌گرم بر لیتر، ۱/۱۲±۶/۳۲ میلی‌گرم بر لیتر، ۰/۴۴±۷/۷۲، ۲۳۲/۸۲±۷۵۰/۵۵ میلی‌گرم بر لیتر، ۰/۲۵±۰/۷۴ گرم بر لیتر و ۲۷۵/۹۵±۱۱۳۰/۰۵ میکروزیمنس بر سانتی‌متر مربع بود.

آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که اثر پودر سیر بر روی همه فاکتورهای خونی به جز MCH و اثر پودر کرم خاکی بر همه فاکتورهای مورد بررسی معنی‌دار بود (جدول ۲؛ P<۰/۰۵)، ولی اثر متقابل پودر سیر و پودر کرم خاکی به جز WBC بر روی سایر فراسنجه‌ها معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). در تمامی شاخص‌های خونی اندازه‌گیری شده بین تیمارهای مختلف، تفاوت معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۵) بالاترین میزان هماتوکریت خون در تیمار 25WG مشاهده شد که با تیمار 25W و G اختلاف معنی‌دار نشان نداد (P>۰/۰۵) ولی با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). بیشترین میزان هموگلوبین در تیمار 25WG مشاهده شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). بالاترین میزان گلبول سفید در تیمار شماره 75W و کمترین میزان آن در تیمار شماره G مشاهده شد (P<۰/۰۵). بالاترین میزان گلبول قرمز در تیمارهای 25WG مشاهده شد که با تیمارهای C، G، 25W و 50WG تفاوت معنی-داری نداشت (P>۰/۰۵). کمترین میزان آن در تیمار 75W به دست آمد که با تیمارهای 75WG و 50W تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). MCV، MCH و MCHC در تیمار G به طور معنی‌داری با سایر تیمارها بجز تیمار شاهد، اختلاف معنی‌دار داشته و بالاترین میزان را داشته است (P<۰/۰۵). کمترین هماتوکریت، هموگلوبین، قرمز، MCH و MCHC در تیمار 75W مشاهد شده شد که در تمام این شاخص‌ها با تیمار 75WG تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵).

آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که اثر پودر سیر، پودر کرم خاکی و اثر متقابل پودر سیر و کرم خاکی بر روی پروتئین کل خون، گلوکز، تری‌گلیسرید و کلسترول معنی-دار بود (جدول ۳؛ P<۰/۰۵). پروتئین تام در تیمار G بالاترین میزان پروتئین تام مشاهده شد که دارای اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد و سایر تیمارها به جز تیمارهای 25WG و 25W نشان داد (P<۰/۰۵). کمترین میزان گلوکز در تیمار 25WG و بالاترین میزان آن در تیمار C مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت (P<۰/۰۵). بالاترین میزان تری‌گلیسرید در تیمار C و کمترین آن در تیمار 25WG مشاهده شد که از لحاظ آماری با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار داشت (P≤۰/۰۵).

جدول ۲: فراسنجه‌های خونی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه‌شده با سطوح مختلف پودر کرم خاکی با و بدون پودر سیر

Table 2: Hematological parameters of rainbow trout fed with different levels of earthworm meal with and without garlic powder

شاخص ها							
MCHC (%)	MCH (pg)	MCV (fl)	RBC (10^6/mm^3)	WBC(10^3/mm^3)	Hb(g/dl)	Hct (%)	تیمار
۱۴/۵۵±۰/۲۷^{a}	۶۲/۱۴±۱/۰۶^{d}	۴۵۱±۱۱^{ab}	۱/۲۵±۰/۱۹^{cd}	۱۲/۰۲±۰/۹۵^{cd}	۵/۶۱±۰/۴۸^{cd}	۴۳/۲۲±۱/۵۶^{cd}	C
۱۴/۶۱±۰/۳۴^{a}	۶۲/۳۹±۱/۱۷^{d}	۴۶۳±۸^{a}	۱/۳۹±۰/۱۷^{d}	۱۱/۶۵±۰/۵۵^{f}	۶/۱۲±۰/۵۱^{b}	۴۵/۱۱±۰/۷۸^{ab}	G
۱۴/۳۰±۰/۲۶^{b}	۵۸/۳۲±۰/۷۶^{c}	۴۴۸±۱۱^{bc}	۱/۴۴±۰/۲۴^{cd}	۱۳/۷۴±۰/۷۴^{g}	۶/۶۶±۰/۲۰^{a}	۴۶/۲۲±۰/۶۶^{a}	25WG
۱۴/۲۳±۰/۲۰^{b}	۵۸/۱۶±۰/۵۷^{c}	۴۳۷±۲۴^{c}	۱/۲۳±۰/۱۲^{cd}	۱۳/۴۶±۰/۴۸^{e}	۶/۰۵±۰/۶۰^{bc}	۴۵/۳۳±۱/۸۰^{a}	25W
۱۳/۹۸±۰/۰۸^{c}	۵۲/۴۴±۰/۸۱^{b}	۳۹۰±۶^{d}	۱/۱۷±۰/۱۱^{bc}	۱۲/۳۶±۰/۷۰^{d}	۵/۶۵±۰/۵۷^{cd}	۴۳/۸۸±۱/۸۳^{bc}	50WG
۱۳/۷۹±۰/۱۷^{c}	۵۱/۹۲±۱/۰۷^{b}	۳۶۲±۹^{e}	۱/۰۶±۰/۲۲^{ab}	۱۴/۴۸±۰/۵۳^{bc}	۵/۴۱±۰/۳۷^{de}	۴۳/۱۱±۱/۶۹^{cd}	50W
۱۳/۳۷±۰/۱۲^{d}	۴۶/۵۴±۰/۵۹^{a}	۳۵۳±۱۱^{ef}	۰/۹۵±۰/۰۳^{a}	۱۳/۹۸±۰/۷۳^{b}	۵/۳۲±۰/۴۸^{de}	۴۲/۱۱±۰/۹۲^{de}	75WG
۱۳/۲۷±۰/۱۴^{d}	۴۵/۹۷±۰/۷۴^{a}	۳۴۲±۱۲^{e}	۰/۹۰±۰/۰۵^{a}	۱۵/۹۴±۰/۷۷^{a}	۵/۰۶±۰/۲۹^{e}	۴۰/۸۸±۰/۷۸^{e}	75W
							P value
❊۰/۰۴۴	۰/۰۷۴	❊۰/۰۰۰	❊۰/۰۰۸	❊۰/۰۰۰	❊۰/۰۰۰	❊۰/۰۰۰	پودر سیر
❊۰/۰۰۰	❊۰/۰۰۰	❊۰/۰۰۰	❊۰/۰۰۰	❊۰/۰۰۰	❊۰/۰۰۰	❊۰/۰۰۰	پودر کرم خاکی
۰/۸۰۸	❊۰/۸۷۰	۰/۱۳۵	۰/۸۸۷	❊۰/۰۰۰	۰/۵۵۲	۰/۶۰۳	پودر سیر ×پودر کرم خاکی

نتایج به صورت میانگین±خطای معیار بیان شده‌اند. حروف غیر همنام در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارهای آزمایشی است (P<۰/۰۵). تیمار C: تغذیه ماهی‌ها با جیره فاقد پودر کرم خاکی و پودر سیر، تیمار G: ۲/۵ درصد پودر سیر، تیمار 25WG: ۲۵ درصد پودر کرم خاکی به جای پودر ماهی+۲/۵ درصد پودر سیر، تیمار 25W: ۲۵ درصد پودر کرم خاکی به جای پودر ماهی، تیمار 50WG: ۵۰ درصد پودر کرم خاکی به جای پودر ماهی+۲/۵ درصد پودر سیر، تیمار 50W: ۵۰ درصد پودر کرم خاکی به جای پودر ماهی، تیمار 75WG: ۷۵ درصد پودر کرم خاکی به جای پودر ماهی+۲/۵ درصد پودر سیر و تیمار 75W: ۷۵ درصد پودر کرم خاکی به جای پودر ماهی

جدول ۳: فاکتورهای سرمی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه‌شده با سطوح مختلف پودر کرم خاکی با و بدون پودر سیر

Table 4: Serum biochemical parameters of rainbow trout fed with different levels of earthworm meal with and without garlic powder

شاخص‌ها				
کلسترول (mg/dl)	تری‌گلیسرید (mg/dl)	گلوکز (mg/dl)	پروتئین تام (g/dl)	تیمار
۱۳۰/۱۰±۰/۶۰^{h}	۷۴/۴±۰/۷۰^{a}	۹۴/۵±۰/۶۰^{a}	۵/۰۰±۰/۱۲^{c}	C
۱۲۱/۲۰±۱/۱۰^{e}	۴۵/۳۰±۰/۶۰^{e}	۷۵/۳۰±۰/۳۰^{e}	۵/۵۶±۰/۲۹^{d}	G
۱۱۶/۳۰±۰/۱۰^{d}	۳۲/۳۰±۰/۶۰^{f}	۷۴/۰۰±۱/۷۰^{f}	۵/۴۴±۰/۲۶^{d}	25WG
۱۲۸/۴۰±۲/۱۰^{g}	۶۰/۱۰±۱/۱۰^{b}	۹۰/۰۰±۱/۵۰^{c}	۵/۳۲±۰/۲۳^{d}	25W
۱۱۳/۳۰±۱/۸۰^{c}	۳۰/۳۰±۰/۳۰^{g}	۸۰/۰۰±۱/۱۰^{d}	۵/۰۲±۰/۱۶^{c}	50WG
۱۲۳/۶۰±۱/۶۰^{f}	۵۸/۲۰±۰/۷۰^{c}	۹۲/۰۰±۱/۰۰^{b}	۴/۶۷±۰/۲۳^{b}	50W
۹۰/۷۰±۱/۴۰^{a}	۲۸/۲۰±۱/۲۰^{h}	۷۹/۶۰±۱/۶۰^{d}	۴/۴۴±۰/۳۳^{a}	75WG
۹۵/۷۰±۱/۸۰^{a}	۵۵/۰۰±۰/۶۰^{d}	۹۱/۸۰±۱/۶۰^{b}	۴/۳۲±۰/۲۲^{a}	75W
				***P* value**
❊۰/۰۰۰	❊۰/۰۰۰	❊۰/۰۰۰	❊۰/۰۰۰	پودر سیر
❊۰/۰۰۰	❊۰/۰۰۰	❊۰/۰۰۰	❊۰/۰۰۰	پودر کرم خاکی
❊۰/۰۰۰	❊۰/۰۰۷	❊۰/۰۰۰	❊۰/۰۲۵	پودر سیر ×پودر کرم خاکی

نتایج به صورت میانگین±خطای معیار بیان شده‌اند. حروف غیر همنام در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارهای آزمایشی است (P<۰/۰۵). تیمار C: تغذیه ماهی‌ها با جیره فاقد پودر کرم خاکی و پودر سیر، تیمار G: ۲/۵ درصد پودر سیر، تیمار 25WG: ۲۵ درصد پودر کرم خاکی به جای پودر ماهی+۲/۵ درصد پودر سیر، تیمار 25W: ۲۵ درصد پودر کرم خاکی به جای پودر ماهی، تیمار 50WG: ۵۰ درصد پودر کرم خاکی به جای پودر ماهی+۲/۵ درصد پودر سیر، تیمار 50W: ۵۰ درصد پودر کرم خاکی به جای پودر ماهی، تیمار 75WG: ۷۵ درصد پودر کرم خاکی به جای پودر ماهی+۲/۵ درصد پودر سیر و تیمار 75W: ۷۵ درصد پودر کرم خاکی به جای پودر ماهی

کمترین میزان کلسترول در تیمار 75WG و بیشترین میزان آن در تیمار C مشاهده شد و با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵).

بحث

مطالعات قبلی نشان داده است که کرم خاکی به دلیل میزان پروتئین بالا، چربی کم و ترکیب اسیدهای آمینه‌ی آن (Ng *et al*., 2001)، ۵-۳۰ درصد قابلیت اضافه‌شدن به جیره ماهی‌ها را داشته و جایگزینی کرم خاکی در سطوح پایین کاهش کارایی رشد و تغذیه ماهی را به دنبال ندارد (Hilton, 1983; Stafford & Tacon, 1985). دلایل کاهش رشد با افزایش درصدهای جایگزینی کرم خاکی را به عوامل مختلفی نظیر وجود ترکیبات کاهنده اشتها یا بد طعم در گونه *E. foetida*، کمبود آمینواسیدهای گوگردی (متیونین و سیستئین) در کرم خاکی و جیره‌های حاوی کرم خاکی (Hilton, 1983)، حضور مواد ضد تغذیه‌ای در مایع سلومی (Coelomic Fluid) کرم خاکی نسبت داده‌اند به طوری که سمی بودن مایع سلومی برای ۴۲ گونه از مهره‌داران آبزی به اثبات رسیده است (Kobayashi *et al*., 2001). مایع سلومی خود از ترکیبات متنوعی تشکیل شده است، اما ماده سمی آن لایزنین است، لایزنین با چسبیدن به sphingomyelin-liposome (از ترکیبات دیواره سلولی مهره‌داران باعث مرگ سلول می‌شود و به دلیل عدم وجود sphingomyelin-liposome در بی‌مهرگان، لایزنین برای بی‌مهرگان از جمله خود کرم خاکی بی‌خطر بوده و به عنوان آنتی‌بیوتیک مانع از آلودگی باکتریایی کرم خاکی می‌شود (Hirigoyenberry *et al*., 1992). افزودن میزان کرم خاکی باعث کاهش انرژی جیره شده و پیرو آن انرژی جیره و رشد ماهی‌ها کاهش پیدا می‌کند (Nandeesha *et al*., 1988). سیر به عنوان محرک زیست‌فعال ایمنی‌شناسی بوده (Eggset *et al*., 1997) و به دلیل وجود ترکیبات ویژه و یا از طریق اثر بر فلور میکروبی دستگاه گوارش و آنزیم‌های گوارشی (Talpur & Ikhwanuddin, 2012) با تاثیر بر تغذیه می‌تواند بر فاکتورهای خونی و سرمی موثر باشد.

تعداد گلبول قرمز، تحت تاثیر سطوح مختلف پودر کرم خاکی و سیر قرار گرفت (p<۰/۰۵)، اما اثر متقابل دیده نشد. با افزایش سطح پودر کرم خاکی بیش از ۲۵ درصد تعداد گلبول‌های قرمز خون کاهش و در صورت وجود پودر سیر در غذا افزایش پیدا کرد، اگرچه در سطوح مختلف جایگزینی، این افزایش معنی‌دار نبود. به طوری که بالاترین حد گلبول قرمز نیز در تیمار 25WG و کمترین آن در تیمار 75W مشاهده شد. افزودن سیر در تیمار ۵۰ درصد جایگزینی کرم خاکی توانست میزان گلبول قرمز را بدون اختلاف معنی‌دار با شاهد حفظ کند. گزارش شده است مایع سلومی کرم *E. fetida* حاوی فاکتور مخرب سلول‌های قرمز خون به نام همولایزین می‌باشد (Andrews & Kukulinsky, 1975; Roch *et al*., 1981). همولایزین‌ها به دسته‌ای از پروتئین‌ها و چربی‌ها گفته می‌شود که باعث شکسته‌شدن و تخریب غشای سلولی گلبول‌های قرمز می‌شوند. همولایزین کرم خاکی به عنوان عامل کشنده برای گلبول‌های قرمز برای قورباغه، گوسفند و انسان گزارش شده است (Roch *et al*., 1981). همزمان با کاهش سلول‌های قرمز خون، هماتوکریت، هموگلوبین، MCV، MCHC و MCH نیز کاهش پیدا کرد، بنابراین کاهش تعداد سلول‌های قرمز خون و متعاقب با آن افت فراسنجه‌های خونی با افزایش سطح جایگزینی کرم خاکی را می‌توان به افزایش همولایزین در تیمارها نسبت داد.

از سوی دیگر، سیر به‌علت دارا بودن سولفور قوی و ترکیبات فنلی، می‌تواند بر تحریک سیستم ایمنی و عملکرد برخی از ارگان‌های دخیل در تشکیل سلول‌های خونی مثل تیموس، طحال و مغز استخوان تاثیرگذار باشد. یکی از مواد موثره سیر، فلاونوئید است که اثر آنتی-اکسیدانی آن به حفاظت در برابر استرس‌های اکسیدکننده که از صدمات رادیکال‌های آزاد منشا می‌گیرند، کمک می-کند. فلاونوئیدهای فنلی موجود در سیر، خاصیت آنتی-بیوتیکی قوی دارند. پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها با حفظ سلول‌ها در برابر آسیب‌های احتمالی رادیکال‌های اکسیداتیو اثر می‌گذارد (Noroozi *et al*., 1998; Nuutila *et al*., 2003; Zaefarian *et al*., 2017).

در راستای این آزمایش Tangestani و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی اثر اسانس سیر بر فراسنجه‌های هماتولوژیک و ایمنی سلولی فیل‌ماهیان جوان به نتیجه‌ای مشابه رسیدند که نشان داد افزودن سیر سبب افزایش معنی‌دار میزان هموگلوبین، گلبول قرمز، افزایش تعداد لنفوسیت و نوتروفیل شده است و این امر تاثیر معنی‌داری بر ارتقا سیستم ایمنی در مقایسه با گروه شاهد داشت.
Shalabyو همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که افزودن سیر به جیره غذایی ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*)، میزان هموگلوبین و تعداد گلبول‌های سفید را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد (Shalaby *et al*., 2006). همچنین در مطالعه Martins و همکاران (۲۰۰۲) میزان هموگلوبین و گلبول سفید در ماهی تغذیه‌شده با جیره حاوی سیر افزایش یافت.
در این مطالعه، تعداد گلبول سفید تحت‌تاثیر سطوح مختلف پودر کرم خاکی و سیر و اثر متقابل آن‌ها قرار گرفت، با افزایش سطح پودر کرم خاکی تعداد گلبول‌های سفید خون افزایش و در صورت وجود پودر سیر در غذا کاهش پیدا می‌کرد، به نحوی که، بیشترین میزان گلبول-های سفید در تیمار 75W مشاهده شد که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با تمام تیمارهای آزمایشی داشت. افزایش گلبول سفید، نشان‌دهنده افزایش تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهی می‌باشد. با توجه به افزایش گلبول‌های سفید در پژوهش حاضر، می‌توان گفت که پودر کرم خاکی نقش بسزایی در افزایش پاسخ ایمنی غیراختصاصی در ماهیان قزل‌آلا داشته است. برخی از مطالعات قبلی تقویت پارامترهای خون‌شناسی را در نتیجه افزودن پودر سیر گزارش نموده و دلیل اثرپذیری فاکتورهای خونی را با ترکیبات قوی فنلی موجود در سیر مرتبط دانستند (Talpur & Ikhwanuddin, 2012). Zaefarian و همکاران (۲۰۱۷) عدم تاثیر پودر سیر (۱، ۲ و ۳ درصد) را بر فاکتورهای خون‌شناسی ماهی آزاد دریای خزر گزارش نموده‌اند و دلیل این امر را به شرایط آزمایش و گونه ماهی نسبت داده‌اند. زیرا فراسنجه‌های خون‌شناسی تحت تاثیر شرایط استرس‌زای محیطی قرار می‌گیرد (Talpur & Ikhwanuddin, 2012).

در مطالعه حاضر، پودر سیر و کرم خاکی بر میزان کلسترول، تری‌گلیسرید، پروتئین تام و گلوکز از لحاظ آماری اثر معنی‌داری داشت. همچنین اثر متقابل بین سطوح مختلف کرم خاکی و سیر مشاهده شد. گلوکز سرم به طور معنی‌داری با افزایش سطح جایگزینی کرم خاکی با پودر ماهی افزایش پیدا کرد. با افزوده‌شدن پودر سیر به تیمارها، کاهش گلوکز سرمی مشاهده شد. این نتایج مشابه با نتایج بدست‌آمده در مطالعات قبلی است (Kumar & Reddy, 1999; Thomson & Ali, 2003; Zaefarian *et al*., 2017). از گلوکز پلاسما یا سرم به عنوان شاخص غیراختصاصی استرس یاد می‌شود (Hunn & Greer, 1991) و مقادیر زیاد گلوکز خون نشان‌دهنده حرکت گلوکز از بافت‌ها به خون می‌باشد (Shalaby *et al*., 2006). عوامل مختلفی مانند فصل، فاکتورهای زیست‌محیطی، رژیم غذایی و زمان آخرین وعده غذایی بر ذخایر گلیکوژن تاثیر گذاشته و باعث تغییر میزان گلوکز می‌گردند (عطایی‌مهر و همکاران، ۱۳۹۰).
میزان تری‌گلیسرید با افزایش سطح پودر کرم خاکی و یا سیر به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. پروتئین سرم، به صورت دقیقی شرایط موجود زنده و تغییرات موثر بر آن را نشان می‌دهد. جنسیت، تخم‌ریزی، غذا، فشار اسمزی، دما، نور، سن، نبود اکسیژن و تغییرات فصلی عواملی هستند که میزان پروتئین سرمی در ماهی را تعیین می‌کنند (Booke, 1964). پروتئین تام با افزایش سطح کرم خاکی سیر نزولی داشت، به طوری که کمترین پروتئین تام در تیمار 75W مشاهده شد. اما اضافه‌شدن سیر به جیره‌ها باعث افزایش معنی‌دار پروتئین تام شد. افزایش پروتئین تام در جیره‌های حاوی سیر را می‌توان به افزایش سطح ایمنوگلوبولین و غلظت گلوبولین کل نسبت داد (Hussein, 1996). Nya و Austin (۲۰۰۹) بیان نموده-اند که سیر موجب افزایش فعالیت آنتی‌پروتئازها شده و در نتیجه میزان پروتئین را افزایش می‌دهد.
کاهش معنی‌دار چربی خون در تیمارهای حاوی پودر سیر مشابه با نتایج حاصل از مطالعه صورت گرفته روی تیلاپیای نیل است (Shalaby *et al*., 2006). همچنین انسان‌هایی که با سیر و یا روغن ماهی تغذیه شده بودند،

نیز کاهش سطح چربی و کلسترول خون را نشان دادند (Adler & Holub, 1997). در مطالعه‌ای نیز با تجویز سیر برای موش‌های آلبینو مجموع چربی سرم کاهش پیدا کرد (Hussein, 1996). Metwally (۲۰۰۹) در یک دوره سه‌ماهه اثر سیر را در فعالیت آنتی‌اکسیدانی تیلاپیای نیل مورد بررسی قرار داد که در نتیجه آن پروتئین کل در سرم تیمارهای حاوی سیر افزایش یافت، درحالی‌که گلوکز، تری‌گلیسرید و کلسترول در تیمار شاهد کاهش یافت. در مطالعه Hilton (۱۹۸۳) اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای صفر، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد جایگزینی کرم خاکی با پودر ماهی در سطح گلوکز، پروتئین و هموگلوبین مشاهده نشد. تغییرات مشاهده‌شده در میزان فاکتورها می‌تواند به دلیل ترکیبات موثره موجود در پودر سیر یا کرم خاکی باشد.

به طور کلی نتایج به دست آمده از بررسی فاکتورهای خونی و سرمی ماهیان مورد مطالعه در این تحقیق نشان داد که درصدهای مختلف جایگزینی پودر کرم خاکی با و یا بدون پودر سیر موجب بهبود میزان گلبول سفید، تری-گلیسرید، گلوکز و کلسترول نسبت به تیمار شاهد شد و کم‌ترین تاثیر در سطح جایگزینی ۲۵ درصد پودر کرم خاکی مشاهده شد. به علاوه، استفاده از پودر سیر همراه با پودر کرم خاکی توانست اثرات منفی حاصل از سطح ۵۰ درصد جایگزینی کرم خاکی (به تنهایی) را بر برخی فراسنجه‌ها خنثی نماید.

منابع

جوادزاده، م.، سالارزاده، ع.، یحیوی، م.، حافظیه، م. و درویش پور، ح. ۱۳۹۱. تاثیر عصاره سیر بر فاکتورهای رشد و بازماندگی در پست لاروهای میگوی وانامی (*Littopenaeus vannamei*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۱ (۱): ۴۶-۳۹.

خدادادی، م.، پیغان، ر. و حمیداوی، ا. ۱۳۹۱. بررسی تاثیر افزودنی پودر سیر خام (*Allium sativum*) بر روی شاخص‌های رشد ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران، ۶(۲): ۲۶-۱۷.

عطایی‌مهر، ب.، حبیبی، ک.، صفاییان، ش. و میرزایی، ن.، ۱۳۹۰. بررسی اثر مصرف عصاره سیر (*Allium sativum*) به شکل خوراکی بر غلظت کورتیزول و گلوکز خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. مجله دامپزشکی ایران، ۷ (۳): ۲۹-۲۳.

گل آقایی، م.، عادل، م. و حافظیه، م. ۱۳۹۵. تاثیر مصرف پودر سیر خام (*Allium sativum*) بر شاخص‌های رشد، بازماندگی و ترکیب بدن میگوی پا سفید (*Littopenaeus vannamei*) پرورش یافته با آب دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران، ۲۵(۲): ۱۵۱-۱۴۳.

نفیسی‌بهابادی، م.، سلطانی، م. و فلاحتی‌مروست ع.، ۱۳۸۸. بررسی میزان رشد و برخی شاخص‌های بیوشیمیایی خون ماهیان جوان قزل‌آلای رنگین‌کمان در شوری‌های مختلف آب. نشریه علوم دانشگاه خوارزمی، ۹ (۴): ۲۴-۱۲.

Adhami, B., Keramat Amirkolaie, A., Oraji, H. and Esmaeilzadeh Kenari, R., 2017. Growth performance, nutrient digestibility and lipase activity in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed fat powder in diet containing emulsifiers (cholic acid and Tween-80). Aquaculture Nutrition, 23(5):1153-1159. DOI: 10.1111/anu.12484.

Adler, A.J. and Holub, B.J., 1997. Effect of garlic and fish-oil supplementation on serum lipid and lipoprotein concentrations in hypercholesterolemic men. The American Journal of Clinical Nutrition, 65:445-450. DOI: 10.1093/ajcn/65.2.445.

Andrews, E. and Kukulinsky, N. 1975. Hemolysis of vertebrate erythrocytes with tissue extracts of earthworms (*Eisenia foetida*). Journal of the Reticuloendothelial Society, 17:170-176.

Andrews, E. and Kukulinsky, N. 1975. Hemolysis of vertebrate erythrocytes with tissue extracts of earthworms (*Eisenia foetida*). Journal of the Reticuloendothelial Society, 17:170-176.

AOAC, 2000. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. (17 ed.) Gaithersburg, Maryland, USA.

Ayinla, O., Kayode, O., Idoniboye-Obu, T., Oresegun, A. and Adindu, V., 1994. Use of tadpole meal as a substitute for fishmeal in the diet of *Heterobranchus bidorsalis* (Geofrey St. Hillaire, 1809). Journal of Aquaculture in the Tropics, 9:25-33.

Booke, H. E. 1964. A review of variations found in fish serum proteins. NY Fish Game J, 11:47-57.

Campbell, T.W. 1995. Avian hematology and cytology, Iowa State University Press.

Corzo-Martínez, M., Corzo, N. and Villamiel, M. 2007. Biological properties of onions and garlic. Trends. Food Science and Technology, 18:609-625. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.07.011.

Dedeke, G.A., Owa, S.O., Olurin, K.B, Akinfe, A.O. and Awotedu, O.O. 2013. Partial replacement of fish meal by earthworm meal (*Libyodrilus violaceus*) in diets for African catfish, *Clarias gariepinus*. International Journal of Fisheries and Aquaculture, 5:229-223.

Dekamin, M., Veisi, H., Safari, E., Liaghati, H., Khoshbakht, K. and Dekamin, M.G. 2015. Life cycle assessment for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) production systems: a case study for Iran. Journal of Cleaner Production, 91:43-55. DOI: 10.1016/j.jclepro.2014.12.006.

Drabkin, D.L. 1946. Spectrophotometric studies XIV. The crystallographic and optical properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other species. Journal of Biological Chemistry, 164:703-723 .

Eggset, G., Mikkelsen, H. and Killie, J.A. 1997. Immunocompetence and duration of immunity against *Vibrio salmonicida* and *Aeromonas salmonicida* after vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) at low and high temperatures. Fish and Shellfish Immunology, 7:247-260. DOI: 10.1006/fsim.1997.0080.

Farahi, A., Kasiri, M., Sudagar, M., Iraei, M.S. and Shahkolaei, M.D. 2010. Effect of garlic (*Allium sativum*) on growth factors, some hematological parameters and body compositions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). AACL Bioflux, 3:317-323.

Feist, G., Van Enennaam, J.P., Doroshove, S.I. and Schreck, C.B. 2004. Early indenification of sex in cultured white strugeon (*Acipenser transmontanus*) using plasma steroid levels. Aquaculture, 232:581-590.DOI: 10.1016/S0044-8486(03)00486-1.

Flynn, S.R., Matsuoka, M. and Reith, M. 2006. Gynogenesis and sex determination in shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* Lesuere. Aquaculture, 253:721-727 DOI:

10.1016/j.aquaculture.2005.09.016.

Habashy, M. 2012. Effect of dried earth worm (*Aporrectodea caliginosa*) as replacement of fish meal on growth and survival rate of the freshwater prawn, *Macrobrachioum rosenbergii* (DE MAN 1879) larvae. Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries, 16(1):105-114. DOI: 10.21608/ejabf.2012.2116.

Hilton, J. 1983. Potential of freeze-dried worm meal as a replacement for fish meal in trout diet formulaions. Aquaculture, 32:277-283. DOI: 10.1016/0044-8486(83)90224-7.

Hirigoyenberry, F., Lassegues, M.and Roch, P. 1992. Antibacterial activity of Eisenia fetida andrei coelomic fluid: immunological study of the two major antibacterial proteins. Journal of Invertebrate Pathology, 59:69-74. DOI: 10.1016/0022-2011(92)90113-I.

Hunn, J. and Greer, I. 1991. Influence of sampling on the blood chemistry of Atlantic salmon. The Progressive Fish-Culturist, 53:184-187. DOI: 10.1577/1548-8640(1991)053<0184:IOSOTB>2.3.CO;2.

Hussein, S. 1996. Electrophoretic pattern of serum protein and immunoglobulin level in chickens in relation of age. Benha Veteronary Medicinal Journal, 7:95-107.

Kalbassi, M.R., Abdollahzadeh, E. and Salari-Joo, H. 2013. A review on aquaculture development in Iran. ECOPERSIA, 1(2):159-178.

Kobayashi, H., Ohtomi, M., Sekizawa, Y. and Ohta, N. 2001. Toxicity of coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida* to vertebrates but not invertebrates: probable role of sphingomyelin. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 128: 401-411. DOI: 10.1016/S1532-0456(00)00213-1.

Kumar, G. R. and Reddy, K. P. 1999. Reduced nociceptive responses in mice with alloxan induced hyperglycemia after garlic (*Allium sativum* Linn.) treatment. Indian Journal of Experimental Biology, 37:662-6.

Lanzotti, V. 2006. The analysis of onion and garlic. Journal of Chromatography A, 1112:3-22. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.12.016.

Lee, D.H., Lim, S.R., Han, J.J., Lee, S.W., Ra, C.S. and Kim, J.D. 2014. Effects of dietary garlic powder on growth, feed utilization and whole body composition changes in fingerling Sterlet Sturgeon, *Acipenser ruthenus*. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 27:1303–1310. DOI: 10.5713/ajas.2014.14087.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1952. Protein measurement with folin phenol reagent. Biological Chemistry, 193-256.

Martins, M.L., Moreas, F.R., Miyazaki, D.M., Brum, C.D., Onaka, E.M., Fenerick, J.J.R. and Bozzo, F.R. 2002. Alternative treatment for *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea: Dactylogyridae) infection in cultivated pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae)

M. and Oksman-Caldentey, K.M. 2003. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. Food Chemistry, 81:485-493. DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00476-4.

Nya, E.J. and Austin, B. 2009. Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Disease, 32:963–970. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2009.01100.x.

Nya, E.J. and Austin, B. 2011. Development of immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Aeromonas hydrophila* after the dietary application of garlic. Fish & Shellfish Immunology, 30:845-850. DOI: 10.1016/j.fsi.2011.01.008.

Óscar Pereira, J. and Gomes, E.F. 1995. Growth of rainbow trout fed a diet supplemented with earthworms, after chemical treatment. Aquaculture International, 3:36-42.

Pour, F., Maniat, M., Vahedasl, A. and Ghayem, S. 2014. Enhancement of growth performance and body composition in molly fish (*Poecilia sphenops*) associated with dietary intake of garlic (*Allium sativum*). International Journal of Bioscience, 5(8):115-121.

Pucher, J., Ngoc, T.N., Thihanhyen, T., Mayrhofer, R., El-Matbouli, M. and Focken, U. 2014. Earthworm meal as fishmeal replacement in plant based feeds for common carp in semi-intensive in Brazil and its haematological effects. Parasite, 9:175-180. DOI: 10.1051/parasite/2002092175.

Martins, N., Petropoulos, S. and Ferreira, I. C. 2016. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: A review. Food Chemistry, 211:41-50. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.05.029.

Metwally, M. 2009. Effects of garlic (*Allium sativum*) on some antioxidant activities in tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). World Journal of fish and Marine Sciences, 1:56-64.

Nandeesha, M., Srikanth, G., Basvaraja, N., Keshavanath, P., Varghese, T., Bano, K., Ray, A. and Kale, R.D. 1988. Influence of earthworm meal on the growth and flesh quality of common carp. Biological Wastes, 26:189-198. DOI: 10.1016/0269-7483(88)90165-6.

Ng, W.K., Liew, F.L., Ang, L.P. and Wong, K.W. 2001. Potential of mealworm (*Tenebrio molitor*) as an alternative protein source in practical diets for African catfish, *Clarias gariepinus*. Aquaculture Research, 32:273-280. DOI: 10.1046/j.1355-557x.2001.00024.x

Noroozi, M., Angerson, W.J. and Lean, M. 1998. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. The American Journal of Clinical Nutrition, 67:1210-1218. DOI: 10.1093/ajcn/67.6.1210.

Nuutila, A.M., Puupponen-Pimiä, R., Aarni,

aquaculture in rural Northern Vietnam. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 14:557-565. DOI: 10.4194/1303-2712-v14_2_27.

Roch, P., Valembois, P., Davant, N. and Lassegues, M. 1981. Protein analysis of earthworm coelomic fluid—II. Isolation and biochemical characterization of the Eisenia fetida andrei factor (EFAF). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 69:829-836. DOI: 10.1016/0305-0491(81)90390-4.

Shalaby, A., Khattab, Y. and Abdel Rahman, A. 2006. Effects of garlic *(Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 12:172-201. DOI: 10.1590/S1678-91992006000200003.

Sogbesan, A.O., Ugwumba, A.A.A. and Madu, C.T. 2006. Nutritive potentials and utilization of garden snail (*Limicolaria aurora*) meat meal in the diet of *Clarias gariepinus* fingerlings. African Journal of Biotechnology, 5(20):1999-2003.

S**tafford, E.A. and Tacon, A.G.J. 1984.** Nutritive value of the earthworm, Dendrodrilus subrubicundus, grown on domestic sewage, in trout diets. Agricultural Wastes, 9:249-266. DOI: 10.1016/0141-4607(84)90084-2.

Stafford, E.A. and Tacon, A.G.J. 1985. The nutritional evaluation of dried earthworm meal (*Eisenia foetida*, Savigny, 1826) included at low levels in production diets for rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Aquaculture Research, 16:213-222. DOI: 10.1111/j.1365-2109.1985.tb00310.x.

T**alpur, A.D. and Ikhwanuddin, M. 2012.** Dietary effects of garlic (*Allium sativum*) on haemato-immunological parameters, survival, growth, and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). Aquaculture, 364:6-12. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2012.07.035.

Tangestani, R., Doughikollaee, E.A., Ebrahimi, E. and Zare, P. 2011. Effects of garlic essential oils as an immunostimulant on hematological indices of juvenile beluga (*Huso huso*). Journal of Veterinary Research, 66:209-216.

Thomson, M. and Ali, M. 2003. Garlic [*Allium sativum*]: a review of its potential use as an anti-cancer agent. Current Cancer Drug Targets, 3:67-81. DOI: 10.2174/1568009033333736.

Trinder, P. 1969. Determination of glucose concentration in the blood. Annals of Clinical Biochemistry, 6-24.

Velasquez, L., Ibañez, I., Herrera, C. and Oyarzun, M. 1991. A note on the nutritional evaluation of worm meal (*Eisenia fetida*) in diets for rainbow trout. Animal Production, 53:119-122. DOI: 10.1017/S000335610000605X.

Yarmohammadi, M., Shabani, A., Pourkazemi, M., Soltanloo, H. and Imanpour, M. 2012. Effect of starvation

and re-feeding on growth performance and content of plasma lipids, glucose and insulin in cultured juvenile Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897). Journal of Applied Ichthyology, 28:692-696. DOI: 10.1111/j.1439-0426.2012.01969.x.

Zaefarian, A., Yeganeh, S. and Adhami, B. 2017. Dietary effects of garlic powder (*Allium sativum*) on growth, blood indices, carcass composition and lysozyme activity in brown trout (*Salmo caspius*) and resistance against *Yersinia ruckeri* infection. Aquaculture International, 25(6):1987-1996. DOI: 10.1007/s10499-017-0169-3.

Effects of dietary earthworm (*Eisenia fetida*) meal and garlic (*Allium sativum*) powder on hematological parameters of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Razzaghi R.[1], Yeganeh S.[1]*, Keramat Amirkolaie A.[1], Janikhalili[1] K.

*skyeganeh@gmail.com

1-Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

Abstract

Finding the suitable substitution for fish meal without any negative effect on fish performance is especially important for aquaculture development. In this research, the effect of substitution of fish meal with different levels of earthworm (*Eisenia fetida*) meal and garlic (*Allium sativum*) powder were studied on hematological and serum parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. For this purpose, various diets were prepared containing different levels of substitution of fish meal with 0, 25, 50 and 75% of earthworm meal accompanied by 0 and 2.5% of garlic powder. Fingerlings with the average initial body weight of 30±0.27 g were reared in equal conditions for 56 days in 8 treatments and each treatment had three replicates. At the end of the experiment, the results of blood and serum biochemical indices assessments showed that the highest amounts of hemoglobin, hematocrit and WBC were observed in the treatments containing 25% earthworm meal with garlic powder, 25% earthworm meal with and without garlic powder and 75% earthworm meal without garlic powder, respectively whereas the lowest amount of RBC was observed in the treatment containing 50% earthworm meal without garlic powder. MCV, MCH and MCHC values in the treatment containing 0% earthworm meal with 2.5% garlic powder were significantly higher as compared to those of the other treatments except the control treatment ($P<0.05$). The highest serum protein level was observed in the treatments containing 0% earthworm meal with 0 and 2.5% garlic powder. The lowest amounts of serum glucose and triglyceride were observed in the treatment containing 25% earthworm meal with 2.5% garlic powder. The lowest amount of cholesterol was observed in the treatments containing 75% earthworm meal with 0 and 2.5% garlic powder. Results showed that different levels of earthworm meal with or without garlic powder improved the amounts of WBC, triglyceride, glucose and cholesterol as compared to those of the control treatment. Serum biochemical indices were significantly affected by the diets containing earthworm meal and garlic powder ($P<0.05$). It was found that the lowest variations in blood and serum parameters were observed in the treatments containing 25% earthworm meal, whereas garlic powder supplementation improved the negative effects of substitution of fish meal with 50% earthworm meal on some of the hematological parameters.

Keywords: Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), earthworm meal (*Eisenia fetida*), blood and serum parameters, garlic

*Corresponding author