بررسی افزودن عصاره برگ درخت خرمالو (*Diospyros kaki*) در جیره غذایی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و تاثیر بر برخی فراسنجه‌های خونی و ایمنی غیراختصاصی

احسان احمدی فر*[1]، محسن شهریاری مقدم[2]، نجمه شیخ زاده[3]

[1]گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
[2]گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
[3]گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
*نویسنده مسئول: ehsan.ahmadifar@uoz.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۵/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۱۳

چکیده

امروزه از گیاهان دارویی به‌عنوان محرک ایمنی، رشد و تقویت کننده سیستم فیزیولوژیک آبزیان استفاده می‌شود. در این پژوهش اثر عصاره برگ درخت خرمالو (*Diospyros kaki*) بر فاکتورهای خونی و ایمنی ماهی کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفت. برای این هدف ۴۰۰ قطعه بچه ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی ۲/۷۵±۱۶/۱۱ گرم در چهار تیمار با سه تکرار به‌صورت تصادفی تقسیم شدند. عصاره برگ خرمالو به مقدار ۰، ۱، ۳ و ۵ درصد به جیره غذایی پایه اضافه و ماهیان به‌مدت ۶۰ روز به میزان ۳ درصد وزن بدن و در ۳ وعده تغذیه شدند. مقایسه شاخص‌های خونی نشان داد که بالاترین مقادیر هموگلوبین، هماتوکریت و گلبول قرمز در تیمار حاوی بالاترین غلظت عصاره بوده است ($P<0/05$). شمارش افتراقی گلبول‌های سفید نشان داد بیشترین مقادیر مونوسیت، لنفوسیت و نوتروفیل در تیمار حاوی ۵ درصد عصاره وجود داشته است. مقایسه شاخص‌های بیوشیمیایی نشان داد، مقادیر پروتئین کل و گلوکز در بین تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>0/05$)، مقدار کلسترول به‌طور معنی‌داری در تیمار ۵ درصد بیشتر از سایر تیمارها بود ($P<0/05$). فعالیت آنزیم‌های پروتئاز و آلکالین فسفاتاز و همچنین مقادیر ایمونوگلوبین و لیزوزیم در موکوس ماهیان در تیمارهای آزمایشی به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود و بیشترین مقدار آن در تیمار ۵ درصد مشاهده گردید ($P<0/05$). با توجه به نتایج این تحقیق عصاره برگ درخت خرمالو می‌تواند به‌عنوان یک مکمل غذایی مفید جهت تقویت شاخص‌های ایمنی در ماهی کپورمعمولی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: عصاره برگ خرمالو، شاخص ایمنی، خون‌شناسی، کپور معمولی.

مقدمه

امروزه گسترش آبزی‌پروری منجر به ایجاد استرس های اجتناب ناپذیری بر ماهیان پرورشی و به‌موجب آن حساسیت نسبت به بیمارها شده است، در نتیجه استفاده از مواد تقویت کننده سیستم ایمنی در آبزی-پروری رو به گسترش است. ترکیبات مختلفی از قبیل داروهای شیمیایی، فاکتورهای رشد و عصاره‌های گیاهی می‌توانند مکانیسم‌های ایمنی را تقویت کرده و منجر به بالا رفتن راندمان آبزی‌پروری شوند (Kumar *et al.*, 2017). طی سالیان گذشته استفاده غیر اصولی و بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به ایجاد سویه‌های مقاوم باکتریایی شده است. همچنین ورود این مواد به طبیعت موجب آلودگی محیط زیست و گوشت ماهیان پرورشی شده که در نتیجه آن خطر مصرف آبزیان برای انسان افزایش یافته است (Pohlenz and Gatlin, 2014). عصاره گیاهان دارویی از گذشته‌های دور برای درمان بیماری های مختلف استفاده شده‌اند. ترکیبات فعال موجود در این گیاهان دارای خواص زیستی مختلفی بوده و امروزه تمایل زیادی به استفاده از آن‌ها در آبزی‌پروری ایجاد شده است (Awad and Awaad, 2017) استفاده از گیاهان دارویی دارای مزیت‌های متعدد، از جمله خطرات جانبی کمتر بر موجود زنده و محیط زیست، عدم ایجاد مقاومت دارویی، قیمت کم و دسترسی آسان می‌باشد، در نتیجه توجه زیادی را در سطح جهان به‌ویژه کشورهای پیشرفته به‌خود جلب کرده و استفاده از آن‌ها در بین محرک‌های ایمنی مختلف دارای ارجحیت می‌باشند (Iwama and Nakanishi, 1996).

درخت خرمالو (*Diospyros kaki*) متعلق به خانواده Ebenacea و بومی کشور چین است و به‌طور

گسترده‌ای در هند، ژاپن وکره نیز یافت می‌گردد (Funayama and Hikino, 1979; Sun *et al.*, 2011). برگ درخت خرمالو دارای طیف وسیعی از خواص بیولوژیک و دارویی از قبیل آنتی اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد سرطان، ضد تومور و ایمینیولوژیک بوده و به‌صورت سنتی به‌عنوان دارو، نوشیدنی و محصولات آرایشی استفاده می‌شود. از برگ این گیاه برای درمان سرفه، ایجاد هموستازی، التهاب ریه و فشار خون، استفاده شده است. همچنین با توجه به غنی بودن عصاره برگ این گیاه از ویتامین C به‌عنوان نوشیدنی ضد پیری نیز استفاده می‌شود (Xie *et al.*, 2015). مطالعات نشان داده است فلاونوییدهای موجود در عصاره این می‌تواند توسط باکتری‌های روده متابولیزه شده و از طریق روده جذب شوند (Bae *et al.*, 2015). با وجود انجام مطالعات گسترده بر روی این گیاه در زمینه استفاده از عصاره برگ آن در صنعت آبزی‌پروری مطالعه‌ایی انجام نشده است.

تاکنون از گیاهان مختلفی برای افزایش راندمان رشد، مقابله با عوامل بیماری‌زا و تحریک سیستم ایمنی ماهیان استفاده شده است، که می‌توان به استفاده از پودر زنجبیل (*Zingiber officinale*) در جیره غذایی ماهی سفید دریای خزر (Zoheiri *et al.*, 2016)، استفاده از عصاره خرما در جیره کپور معمولی (Hoseinifar *et al.*, 2015)، استفاده از سیر (*Allium sativum*) در جیره غذایی ماهی باس آسیایی *Lates calcarifer* (Talpur *et al.*, 2012)، استفاده از جنسینگ در جیره غذایی ماهی *Oreochromis niloticus* (Goda *et al.*, 2010) و استفاده از چای سبز (*Camellia sinensis*) در جیره غذایی قزل آلای رنگین کمان (Sheikhzadeh *et al.*, 2011) اشاره کرد.

کپور معمولی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین ماهیان پرورشی، نقش مهمی در افزایش نرخ تولیدات آبزی پروری در سطح جهان ایفا می‌کند (Sharif Zadeh *et al.*, 2016). با این حال، افزایش تولید این گونه در واحد سطح موجب بروز مشکلات مختلفی از قبیل شیوع بیماری‌های عفونی در نتیجه استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی و در نتیجه به خطر افتادن سلامت مصرف کنندگان شده است (Nakanishi *et al.*, 2002). از آن‌جایی که کاهش میزان بقاء و ماندگاری در مراحل اولیه زندگی گونه های پرورشی از مهمترین معضلات پیش روی پرورش دهندگان ماهی است، تقویت سیستم دفاعی و ایمنی بچه ماهیان از اصلی ترین نیازهای پرورش دهندگان محسوب می‌شود (Liu *et al.*, 2014; Pohlenz *et al.*, 2014) در نتیجه جستجو برای یافتن ترکیباتی جایگزین برای تقویت سیستم دفاعی و ایمنی بچه ماهیان اهمیت شایانی دارد. با توجه به اهمیت بالای کپور معمولی در صنعت آبزی‌پروری و همچنین جستجو برای ترکیبات جایگزین برای آنتی بیوتیک‌ها، در این مطالعه تأثیر استفاده از عصاره برگ درخت خرمالو در جیره غذایی بر فاکتورهای ایمنی و آنتی اکسیدانی ماهی کپور معمولی مطالعه خواهد شد.

مواد و روش‌ها

شرایط آزمایش: تحقیق حاضر در بخش آبزی پروری اداره کل فنی‌حرفه‌ای استان گلستان (شهرستان گرگان) در تابستان ۱۳۹۶ صورت گرفت. تعداد ۴۰۰ قطعه ماهی کپور معمولی از مرکز پرورش کپور ماهیان در استان گلستان تهیه و به آزمایشگاه انتقال داده شدند و به مدت ۲ هفته جهت سازگار شدن با محیط جدید در تانک‌های پرورشی نگهداری شدند. در طی دوره آداپتاسیون ماهیان با غذای ویژه کپور ماهیان تغذیه شدند. پس از هم دمایی و زیست سنجی (اندازه گیری وزن و طول کل) و تعیین زی-توده، تعداد ۳۶۰ عدد ماهی کپور معمولی با میانگین وزن ۲/۷۵±۱۶/۱۱ گرم به ۱۲ عدد آکواریوم با حجم ۶۰ لیتر با تراکم ۳۰ عدد ماهی در هر آکواریوم منتقل شدند. برای حفظ کیفیت آب هر ۲ روز یک بار ۴۰ درصد حجم آب آکواریوم تعویض و به صورت روزانه ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آب شامل pH، اکسیژن محلول، نیتریت، سختی کل و دمای آب کنترل و ثبت گردید.

آماده‌سازی جیره و غذا دهی: عصاره برگ خرمالو بر طبق روش Esteban و همکاران (۲۰۱۴) تهیه شد. برای این منظور ۲۰۰ گرم برگ درخت خرمالو با استفاده از آب استریل شستشو شده و به قطعات کوچک خرد شد. سپس ۵۰۰ml آب به آن اضافه شده

و به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد همزده، سپس نمونه به‌دست آمده به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و سوپرناتانت جدا شده و به‌عنوان عصاره برگ درخت خرمالو استفاده شد. جهت ساخت جیره‌های غذایی آزمایشی، جیره پایه فرموله شده با سطوح ۱، ۳ و ۵ درصد عصاره برگ درخت خرمالو مکمل شده و پس از افزودن مقداری آب به صورت خمیری درآورده، سپس از چرخ گوشت عبور داده شد تا غذا به پلت‌های استوانه‌ای شکل تبدیل گردد. در نهایت پلت‌ها در خشک کن در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت خشک شدند. پس از انجام مراحل فوق جیره‌های آزمایشی در پلاستیک‌های دو جداره بسته بندی و در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری شدند (Abdel-Tawwab *et al.*, 2008). غذادهی ماهیان به‌صورت دستی و بر اساس ۳ درصد وزن توده زنده در ۳ نوبت به مدت ۶۰ روز انجام شد (Yanbo and Zirong 2006).

نمونه‌گیری و خون‌گیری: تغذیه ماهیان ۲۴ ساعت قبل از خون‌گیری قطع و با استفاده از سرنگ ۲ میلی‌لیتری از طریق رگ ساقه دمی واقع در پشت باله مخرجی از هر تیمار ۳ عدد ماهی (مجموعاً ۱۲ نمونه) به‌صورت تصادفی خونگیری شدند. در هنگام خون-گیری از مواد بیهوش کننده به علت احتمال تأثیر بر شاخص‌های خونی استفاده نگردید (Torrecillas *et al.*, 2011). از نمونه های خون جمع آوری شده ۰/۵ میلی‌لیتر برای جداسازی سرم در لوله‌های اپندورف فاقد ماده ضد انعقاد هپارین و ۰/۵ میلی‌لیتر در لوله های اپندورف حاوی ماده ضد انعقاد هپارین (۱۰ میکرولیتربه ازای ۰/۵ میلی‌لیترخون) تقسیم گردید. جهت انجام مطالعات سرولوژی خون موجود در لوله-های اپندورف فاقد ماده ضد انعقاد هپارین توسط سانتریفوژ (مدل Labofuge ساخت شرکت Heraeus Sepatch آلمان) با دور ۳۰۰۰g در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده، سرم جدا و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. شاخص-های خونی شامل تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، تعداد گلبول‌های سفید (WBC)، هماتوکریت (PCV)، هموگلوبین (Hb)، شمارش افتراقی گلبول-های سفید شامل لنفوسیت، نوتروفیل و مونوسیت طبق روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شدند (Klontz, 1994).

جمع‌آوری موکوس بر اساس روش Ross و همکاران (۲۰۰۰) انجام شد. ماهیان پس از بیهوشی با ۵ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک به‌صورت جداگانه درون کیسه های پلی اتیلنی حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سدیم کلرید ۵۰ میلی‌مولار قرار گرفته و پس از ۲ دقیقه ماهی‌ها از کیسه ها خارج شدند. موکوس جمع‌آوری شده به لوله های سانتریفیوژ استریل ۱۵ میلی‌لیتری منتقل، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شده و سوپرناتانت جهت بررسی‌های بیشتر به میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل گردید. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش درون فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. برای تعیین سطح فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی از دستگاه اسپکتروفتومتر و کیت تجاری (پارس آزمون) استفاده گردید (Roosta and Hoseinifar, 2006). برای سنجش آنزیم لیزوزیم به روش کدورت سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد (Subramanian *et al.*, 2007). جهت اندازه-گیری ایمونوگلبولین کل از روش Siwicki و Anderson (۱۹۹۳) استفاده شد. همچنین فعالیت پروتئازی موکوس بر اساس روش هیدرولیز آزوکازئین پیشنهاد شده توسط Palashka و همکاران (۲۰۰۸) اندازه‌گیری شد.

سنجش گلوکز، کلسترول و پروتئین کل: جهت آنالیز میزان گلوکز، کلسترول و پروتئین کل، نمونه های خون بلافاصله در دمای اتاق سانتریفیوژ (۵ دقیقه، ۵۰۰۰ دور در دقیقه) و پلاسما جدا شده و در دمای ۲۰درجه سانتی‌گراد تا زمان آنالیز نگهداری شد. میزان گلوکز، کلسترول و پروتئین کل با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و کیت های تجاری (پارس آزمون، ایران) اندازه‌گیری شد.

روش آماری و تجزیه و تحلیل داده ها: ابتدا نرمال بودن داده‌ها با آزمون کولموگراف- اسمیرنوف بررسی شد. سپس به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از تجزیه واریانس یک‌طرفه (One- way ANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح معنی‌دار ۵ درصد استفاده گردید. از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ برای آنالیزهای آماری استفاده گردید.

نشان داده شده است. در شاخص‌های پروتئین کل و

جدول ۱- اجزای تشکیل‌دهنده و ترکیبات شیمیایی جیره استفاده شده).

اجزای تشکیل دهنده	میزان (درصد)
آرد ماهی	۴۰
آرد گندم	۲۱
آرد سویا	۱۳/۵
گلوتن	۵/۵
روغن سویا	۶
روغن ماهی	۶
مکمل معدنی	۳
مکمل ویتامینی	۲
همبند	۲
ضد قارچ	۰/۵
آنتی اکسیدان	۰/۵
نوع ترکیب	**میزان (درصد)**
ماده خشک	۹۲/۲۲
پروتیین خام	۳۶/۷۰
چربی خام	۱۱/۱۳
خاکستر	۳/۴۸

جدول ۲- مقایسه شاخص‌های خونی کپور ماهیان (*Cyprinus carpio*) درتیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش.

شاخص های خونی	سطوح مختلف عصاره برگ گیاه خرمالو			
	شاهد (۰ درصد)	۱ درصد	۳ درصد	۵ درصد
هموگلوبین (گرم در دسی لیتر)	۳/۹۵±۰/۸۲^{b}	۳/۱۸±۰/۳۵^{b}	۳/۲۵±۰/۴۰^{b}	۷/۵۲±۰/۶۱^{a}
هماتوکریت (درصد)	۱۳/۲±۱/۵۰^{b}	۱۰/۳±۱/۱^{b}	۱۰/۲±۱/۱^{b}	۲۲/۲±۲/۴^{a}
گلبول قرمز (تعداد×۱۰^{۶})	۱/۲۵±۰/۰۳^{b}	۱/۳۳±۰/۱۰^{b}	۱/۴۰±۰/۱۱^{b}	۱/۶۹±۰/۱۲^{a}
گلبول سفید (تعداد×۱۰^{۶})	۲۲۹۵۱/۲۱±۲۲۰/۴۲^{a}	۲۳۴۸۵/۳۰±۲۶۰/۱۰^{a}	۲۳۵۷۸/۴۲±۲۷۱/۲۴^{a}	۲۳۸۶۰/۶۲±۲۴۰/۱۱^{a}

حروف مشترک در هر ردیف نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است.

جدول ۳- شمارش افتراقی گلبول‌های سفید ماهی کپور معمولی (انحراف معیار±میانگین).

تیمارهای آزمایشی	مونوسیت (درصد)	لنفوسیت (درصد)	نوتروفیل (درصد)
شاهد (۰ درصد)	۴/۷۸±۰/۸۲	۷۲/۱۵±۱/۴۰	۱۷/۹۲±۱/۴۸
۱ درصد	۵/۴۰±۰/۸۸	۷۴/۶۷±۱/۳۶	۲۰/۵۶±۱/۴۴
۳ درصد	۵/۷۲±۰/۷۹	۷۲/۸۰±۱/۵۳	۲۲/۱۴±۱/۱۹
۵ درصد	۶/۶۲±۰/۲۰	۷۴/۷۱±۱/۵۰	۲۱/۸۰±۱/۳۵

نتایج

نتایج آنالیز اجزای تشکیل دهنده و ترکیبات شیمیایی (درصد) جیره استفاده شده در جدول ۱ آورده شده است. نتایج تاثیر پودر برگ خرمالو بر شاخص‌های خونی در جدول‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است. نتایج حاصل از مقدار هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول قرمز به‌ترتیب معادل ۷/۵۲±۰/۶۱، ۲۲/۲±۲/۴ و ۱/۶۹±۰/۱۲ مربوط به تیمار ۵ درصد عصاره خرمالو بود و تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها داشت ($P<۰/۰۵$).

نتایج آنالیز شاخص‌های بیوشیمیایی در جدول ۴ گلوکز تفاوت معنی‌داری در بین تیمارهای آزمایشی مشاهد نشد ($P>۰/۰۵$). میزان کلسترول در تیمارهای ۳ و ۵ درصد پودر برگ خرمالو به ترتیب۳/۲۰±۱۳۱/۱۰ و ۲/۶۱±۱۶۴/۳۸ و تفاوت معنی‌داری با تیمارهای شاهد و تیمار ۱ داشت پودر برگ خرمالو داشت ($P<۰/۰۵$).

نتایج شاخص‌های ایمنی موکوس (ایمونوگلوبین، لیزوزیم، پروتئاز و آلکالین فسفاتاز) در جدول ۵ آورده شده است. طبق نتایج بین تیمارهای آزمایشی با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P<۰/۰۵$).

جدول ۴ - مقایسه شاخص‌های بیوشیمیایی (انحراف معیار±میانگین) خون ماهی کپور معمولی تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی.

شاخص	سطوح مختلف عصاره برگ گیاه خرمالو			
	شاهد (۰ درصد)	۱ درصد	۳ درصد	۵ درصد
پروتئین کل (g/dl)	۴/۷۲±۰/۳۲^{a}	۴/۱۲±۰/۲۹^{a}	۴/۸۵±۰/۳۸^{a}	۴/۷۴±۰/۳۵^{a}
گلوکز (mg/dl)	۹۰/۲±۶/۴۲^{a}	۷۹/۸±۴/۳۱^{a}	۸۲/۳±۴/۵۰^{a}	۸۵/۴±۵/۳۴^{a}
کلسترول (mg/dl)	۱۵۲/۳۷±۳/۹۲^{b}	۱۵۵/۲۴±۲/۴۰^{b}	۱۳۱/۱۰±۳/۲۰^{c}	۱۶۴/۳۸±۲/۶۱^{a}

حروف مشترک در هر ردیف نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است.

جدول ۵ – شاخص‌های ایمنی موکوس ماهی کپور معمولی تغذیه شده با جیره های آزمایشی.

شاخص های ایمنی	سطوح مختلف عصاره برگ گیاه خرمالو			
	شاهد (۰ درصد)	۱ درصد	۳ درصد	۵ درصد
ایمونوگلوبین (mg/ml)	۸/۲±۱/۱^{b}	۱۲/۳±۱/۳^{a}	۱۳/۷±۱/۲^{a}	۱۵/۲±۱/۲^{a}
لیزوزیم (mg/pr)	۳۷/۲±۴/۵۰^{b}	۵۲/۶±۵/۱^{a}	۵۸/۱±۶/۰^{a}	۶۱/۴±۵/۷^{a}
پروتئاز (mg/pr)	۳۶/۵±۶/۱^{b}	۵۲/۳۶±۸/۱^{a}	۵۹/۹±۷/۹^{a}	۶۵/۸±۸/۰^{a}
آلکالین فسفاتاز (واحد بین المللی به ازای لیتر)	۱۲۲/۳±۱۲/۶^{b}	۱۹۸/۲۸±۱۴/۳^{a}	۲۰۸/۳۷±۱۴/۵^{a}	۲۱۱/۸۲±۱۳/۹^{a}

حروف مشترک در هر ردیف نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است.

بحث

در مطالعه حاضر از عصاره برگ درخت خرمالو در جیره غذایی ماهی کپور معمولی استفاده شد. برگ این درخت به‌دلیل دارا بودن ترکیبات مختلفی از قبیل فلاونوییدها، تانین‌ها، فنول‌ها، اسیدهای ارگانیک و ویتامین C، مورد توجه بسیاری از محققین بوده است (Sun *et al.*, 2011). اندازه‌گیری شاخص‌های خونی اطلاعات ارزشمندی در زمینه سلامت ماهیان در اختیار پرورش دهندگان قرار می‌دهد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد تغذیه ماهیان با جیره حاوی عصاره برگ درخت خرمالو (۵ درصد) موجب افزایش معنی-دار میزان هموگلوبین و درصد هماتوکریت نسبت به تیمار شاهد و تیمارهای دارای مقدار کمتر عصاره (۱ و ۳ درصد) شده. استفاده از افزودنی‌های غذایی با خواص ضدمیکروبی می‌تواند منجر به افزایش تعداد گلبول‌های قرمز شود. در مطالعات صورت گرفته بر روی ماهیان آلوده به باکتری *Aeromonas hydrophila* نشان داده است، در ماهیان آلوده به دلیل تخریب گلبول‌های قرمز و هم‌چنین عدم فعالیت مناسب بافت‌های خون‌ساز میزان هموگلوبین خون کاهش می‌یابد، در حالی که پس از استفاده از عصاره گیاه *Azadirachta indica*، میزان هماتوکریت به صورت معنی‌دارای افزایش یافت، که آن را با خواص تنظیم کنندگی هموستازی عصاره استفاده شده در جیره مرتبط دانستند (Harikrishnan and Balasundaram, 2003). افزایش میزان هماتوکریت و هموگلوبین در مطالعه حاضر بر روی کپور معمولی را نیز می‌توان مرتبط با خواص تنظیم کنندگی هموستازی و همچنین ضد باکترایی عصاره برگ خرمالو دانست (Xie *et al.*, 2015). هم راستا با نتایج به‌دست آمده، نتایج مطالعات انجام شده بر ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) تغذیه شده با جیره غذایی غنی‌سازی شده با گیاه جنسینگ نشان دهنده تاثیر این گیاه بر افزایش تعداد گلبول های قرمز و هماتوکریت است (Ashraf and Goda, 2008). همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد علی‌رغم آن‌که در ماهیان تیمار شده با جیره حاوی عصاره برگ درخت خرمالو تعداد گلبول‌های سفید نسبت به ماهیان شاهد بیشتر بود، اما تفاوت معنی‌داری دیده نشد. نکته قابل توجه آن است که با افزایش غلظت عصاره اضافه شده به جیره تعداد گلبول‌های سفید نیز بیشتر شد، این می‌تواند نشان دهنده آن باشد که در صورت استفاده از غلظت‌های بالاتر عصاره امکان ایجاد تفاوت معنی‌دار نیز وجود دارد. استفاده از مکمل‌های گیاهی بر گلبول‌های سفید و پلاسمای خون ماهیان دارای اثرات دوگانه است. به‌عنوان مثال اضافه کردن عصاره گیاه مورخوش *Zhumeria majdae* در جیره گربه ماهی *Pangasianodon hypophrhalus*، تاثیر معنی-داری بر تعداد گلبول های سفید نداشت (Rezaei *et al.*, 2013)، نتایج مشابهی نیز در اضافه کردن پودر

سیر به جیره قزل‌آلای رنگین کمان به‌دست آمده است (Fazlolahzadeh *et al.*, 2011)، با این وجود برخی از مطالعات بیانگر اثرات معنی‌دار استفاده از عصاره‌های گیاهی بر گلبول های سفید است (Chobkar *et al.*, 2017).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان گلوکز خون در ماهیان تیمار شده با جیره حاوی عصاره برگ درخت خرمالو نسبت به تیمار شاهد کمتر بود، اگر چه اختلاف معنی‌داری دیده نشد. با توجه به آن‌که عصاره برگ درخت خرمالو دارای فلاونویئدی مختلف از قبیل کوئرستین و کامپفرول هستند و این ترکیبات در متابولیسم قندها و چربی‌ها دخیل می‌باشند (Liu *et al.*, 2006; Van *et al.*, 2013)، خواص ضد دیابتی آن را می‌توان به‌وجود این ترکیبات در عصاره برگ درخت خرمالو نسبت داد. همچنین بر اساس تحقیقات انجام شده، عصاره برگ خرمالو با جلوگیری از فعالیت آلفاگلوکوزیداز (Bae *et al.*, 2015) و آلفا آمیلاز (Kawakami *et al.*, 2010) منجر به کاهش قند خون می‌شوند. همچنین در مطالعه حاضر میزان کلسترول در ماهیان تیمار شده با غلظت‌های ۳ و ۵ درصد جیره حاوی نسبت تیمار شاهد و تیمار دارای غلظت کم عصاره اختلاف معنی‌داری نشان داد و مقدار آن در ماهیان تغذیه شده با غلظت ۳ درصد عصاره برگ خرمالو نسبت به دیگر تیمارها کمتر بود. تغییر میزان کلسترول در تیمارهای مختلف را می‌توان به دلیل نقش فلاونویدها بر متابولیسم چربی‌ها دانست. نتایج تحقیقات انجام شده نشان داده است که استفاده از برگ درخت خرمالو می‌تواند منجر به کاهش میزان کلسترول در موش‌های دیابتی شود (Bae *et al.*, 2015).

سیستم ایمنی موکوسی از بخش‌های مهم سیستم ایمنی غیراختصاصی در ماهی‌ها است. نتایج مطالعه حاضر حاکی از افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیم لیزوزیم در موکوس پوست بچه ماهیان کپور معمولی تغذیه شده با جیره حاوی عصاره برگ خرمالو بود. عصاره برگ خرمالو دارای خواص تحریک کننده سیستم ایمنی است (Kotani *et al.*, 2000). سیستم ایمنی توسط جیره غذایی استفاده شده، مانند فلاونویدهای موجود در جیره غذایی تحریک می‌شوند. فلاونویدها گروه گسترده‌ایی از ترکیبات شیمیایی با وزن کم هستند و متابولیت‌های ثانویه فنولی گیاهان محسوب شده و نقش مهمی در سلامت ایفا می‌کنند (Middleton and Kandaswami, 1992). ترکیبات فلاونویئدی مختلفی از قبیل کاتچین، کامپفرول و کوئرسین در برگ گیاه خرمالو شناسایی شده است. افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم لیزوزیم در مطالعه حاضر را می‌توان به‌دلیل خواص تحریک کننده سیستم ایمنی و به‌خصوص وجود مقدار بالا از فلاونوییدها در عصاره برگ خرمالو مرتبط دانست. Zoheiri و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که به کارگیری پودر زنجبیل در جیره غذایی ماهی سفید سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم لیزوزیم موکوس می‌شود. هم راستا با این گزارش‌ها، Dehghanian و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه‌ایی بر روی بچه ماهیان کپور معمولی گزارش کردند که افزودن پودر سیاه دانه به جیره غذایی سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم لیزوزیم پوست می‌شود.

ایمونوگلوبین‌ها جز آنتی بادی‌های طبیعی بوده، در غیاب محرک آنتی ژنیک خارجی تولید می‌شوند و محافظت فوری، بلافاصله و گسترده‌ای را در برابر عوامل بیماری‌زا ایجاد می‌کنند و این مورد آن‌ها را به‌عنوان یکی از بخش‌های حیاتی سیستم ایمنی غیر اختصاصی ماهی تبدیل کرده است. تغییر در سطوح ایمونوگلوبین سرم خون در مطالعات بسیاری به‌تبع استفاده از محرک های ایمنی گزارش شده است (Nayak *et al.*, 2003). اگر چه تا کنون اثرات پودر برگ خرمالو جیره بر سطوح ایمنوگلوبین کل موکوس پوست در بچه ماهی‌های کپور بررسی نشده است. نتایج این تحقیق موید افزایش معنی‌دار سطوح ایمونوگلوبین کل موکوس پوست در بچه ماهی‌های کپور تغذیه شده با پودر برگ خرمالو بود. به نظر می رسد افزایش سطوح ایمونوگلوبین موکوس پوست نشان دهنده اثرات مثبت پودر برگ خرمالو بر ایمنی موکوس پوست ماهی کپور معمولی است.

در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در موکوس پوست بچه ماهی کپور تغذیه شده با پودر برگ خرمالو افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان داد. آنزیم فسفاتاز قلیایی به دلیل فعالیت هیدرولیتیکی به‌عنوان یک عامل ضد باکتریایی شناخته شده و همچنین در بهبود زخم و عفونت‌های

انگلی نیز دخیل است (Subramanian *et al.*, 2007; Ross *et al*., 2000). اطلاعات محدودی در رابطه با تاثیر محرک‌های ایمنی بر میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در موکوس ماهیان وجود دارد و تاکنون گزارشی در خصوص اثرات احتمالی پودر برگ خرمالو گزارش نشده است. مطالعات انجام شده نشان داده است استفاده از مکمل‌های غذایی که محرک سیستم ایمنی می‌باشند منجر به افزایش فعالیت این آنزیم در موکوس ماهیان می‌شود (Roosta and Hoseinifar, 2016; Zoheiri *et al.*, 2016; Sheikhzadeh *et al.*, 2011). افزایش میزان فعالیت این آنزیم در مطالعه حاضر را می‌توان مرتبط با خواص تحریک کنندگی سیستم ایمنی توسط عصاره استفاده شده دانست. اگرچه مکانیسم اثرگذاری آن بر فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی نیاز به مطالعه دقیق دارد.

پروتئازها یکی دیگر از عوامل موجود در موکوس ماهی‌ها هستند، پروتئازهایی مانند تریپسین، کاتپسین‌بی‌ال (سیستین پروتئاز)، کاتپسین‌دی (اسپارتیک پروتئاز) و متالو پروتئازها در موکوس پوست ماهیان شناسایی شده است. در خصوص اثرات مکمل غذایی بر فعالیت پروتئاز موکوس Sheikhzadeh و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با جیره حاوی چای سبز سبب افزایش فعالیت پروتئاز موکوس شد. از طرفی Khodadadian همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند جیره حاوی پودر (*Agaricus bisporus*) قارچ سبب تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهی کپور معمولی شد و افزایش معنی‌داری در پروتئاز موکوس در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شد که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. چنین به‌نظر می‌رسد افزایش پروتئاز موکوس ناشی از بهبود وضعیت ایمنی موکوسی باشد، به‌طوری‌که در بررسی سایر شاخص‌های ایمنی نیز روند مشابهی مشاهده شد.

در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از آن است که استفاده از عصاره برگ خرمالو بر روی برخی از شاخص‌های خونی و ایمنی کپور معمولی تاثیرگذار است. بنابراین استفاده از این گیاه دارویی به‌عنوان محرک سیستم ایمنی در جیره غذایی کپور معمولی توصیه می‌شود، انجام مطالعات بیشتر به‌منظور تعیین سطح بهینه استفاده از این عصاره در جیره غذایی، اثر گذاری آن بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی، فعالیت آنتی اکسیدانی، ترکیبات بدن و میزان مقاومت ماهی در برابر باکتری‌های بیماری‌زای شایع ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت مالی دانشگاه زابل (Grant code:UOZ-GR-9517-94) برای انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Abdel-Tawwab M., Abdel-Rahman A.M., Ismael N.E. 2008. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 280(1-4), 185-189.

Ashraf M.A., Goda S. 2008. Effect of dietary Ginseng herb (Ginsana-G115) supplementation on growth, feed utilization and hematological indices of Nile tilapia, *Orechromis niloticus*, fingerlings. *Journal of World Aquaculture Society* 39, 205-214.

Awad E., Awaad A. 2017. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. *Fish and Shellfish Immunology* 67, 40-54.

Bae U.J., Park S.H., Jung S.Y., Park B.H., Chae S.W. 2015. Hypoglycemic effects of aqueous persimmon leaf extract in a murine model of diabetes. *Molecular Medicine Reports* 12(2), 2547-2554.

Chobkar N., Kakolaki SH., Rezaei Manesh M., Mohammadi F., Safarkhanlou L.E. 2017. The effect of *Zataria multiflora* powder supplementation on growth performance, serum parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). *Veterinary Clinical Pathology* 11, 20.

Dehghanian S.H. 2014. The dietary effects of black Cumin seed (*Nigella sativa*) powder on some mucosal immunity parameters, growth, survival and resistance against salinity stress in Caspian roach (*Rutilus caspicus*). M.Sc. thesis, Gorgan University of Agricultural Science Natural Resources, Gorgan, Iran.

Esteban M.A., Cordero H., Martínez-Tomé M., Jiménez-Monreal A.M., Bakhrouf A., Mahdhi A. 2014. Effect of dietary

Kotani M., Matsumoto M., Fujita A., Higa S., Wang W., Suemura M., Tanaka T. 2000. Persimmon leaf extract and astragalin inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 106(1), 159-166.

Kumar S., Prakash C., Gupta S.K., Chadha N.K., Jain K.K., Ghughuskar M.M., Pandey P.K. 2017. Effects of dietary anthraquinone extract on growth, metabolic and haemato-immunological responses of *Cirrhinus mrigala* (Hamilton, 1822) Fingerlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 87(1), 243-252.

Liu Y.J., Zhan J., Liu X.L., Wang Y., Ji J., He Q.Q. 2014. Dietary flavonoids intake and risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Clinical Nutrition* 33(1), 59-63.

Magnadottir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology* 20, 137-151.

Middleton Jr.E., Kandaswami C. 1992. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochemical Pharmacology* 43(6), 1167-1179.

Nakanishi K.M Taniguchi T., Ranganathan V., New H.V., Moreau L.A., Stotsky., Mathew C.G., Kastan M.B., Weaver D.T., Dandrea A.D. 2002. Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nature Cell Biolgy* 4, 913-920.

Nayak S., Swain P., Mukherjee S. 2007. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major Carp, *Labeo rohita* (Ham). *Fish and Shellfish Immunology* 23, 892-896.

Palashka K.J., Shin G.W., Kim Y.R., Jung T.S. 2008. Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish and Shellfish Immunology* 24, 479-488.

Pohlenz C., Gatlin D.M. 2014. Interre-lationships between fish nutrition and health. *Aquaculture* 431, 111-117.

Rezaei M.H., Syrinezhad A., Soltanian S., Yousefzadi M. 2013. The effect of the extract (*Zhumeria majdae*) in the diet on growth, hematology and immunology catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Journal of Aquatic Ecology* 3(1), 8- 19.

Roosta Z., Hoseinifar S.H. 2016. The effects of crowding stress on some epidermal mucus immune parameters, growth performance and survival rate of Tiger barb (*Pentius tetrazona*). *Aquaculture Research* 47, 1682-1686.

Ross N.W., Firth K.J., Wang A., Burka J.F., supplementation of probiotics and palm fruits extracts on the antioxidant enzyme gene expression in the mucosae of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.*). Fish and Shellfish Immunology* 39(2), 532-540.

Fazlolahzadeh F., Keramati K., Nazifi S., Shirian S., Seifi S. 2011. Effect of garlic (*Allium sativum*) on hematological parameters and plasma activities of ALT and AST of rainbow trout in temperature stress. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 5(9), 84-90.

Funayama S., Hikino H. 1979. Hypotensive principles of *Diospyros kaki* leaves. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 27(11), 2865-2868.

Goda A. 2008. Effect of dietary Ginseng herb (Ginsana® G115) supplementation on growth, feed utilization, and hematological indices of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), fingerlings. *Journal of the World Aquaculture Society* 39(2), 205-214.

Harikrishnan R., Rani M.N., Balasundaram C. 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture* 221(1-4), 41-50.

Hoseinifar S.H., Khalili M., Rufchaei R., Raeisi M., Attar M., Cordero H., Esteban M.Á. 2015. Effects of date palm fruit extracts on skin mucosal immunity, immune related genes expression and growth performance of common carp (*Cyprinus carpio*) fry. *Fish and Shellfish Immunology* 47(2), 706-711.

Iwama G., Nakanishi T. 1996. The fish immune system. Academic, London. Chapter 6: Innate immunity in fish. pp: 73-114.

Kawakami K., Aketa S., Nakanami M., Iizuka S., Hirayama M. 2010. Major water-soluble polyphenols, proanthocyanidins, in leaves of persimmon (*Diospyros kaki*) and their α-amylase inhibitory activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74(7), 1380-1385.

Khodadadian Zou H., Hoseinifar S.H., Kolangi-Miandare H., Hajimoradlo A. 2016. *Agaricus bisporus* powder improved cutaneous mucosal and serum immune parameters and up-regulated cytokines gene expression in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings). *Fish and Shellfish Immunology* 34, 601-606.

Klontz G.W. 1994. Fish hematology. In: J.S. Stolen, T.C. Fletcher, A.F. Rowley, T.C. Kelikoff, S.L. Kaatari, S.A. Smith (eds). Techniques in fish immunology, Vol. 3. SOS Publication. Fair Haven, New Jersey, USA. pp: 121-132.

Johnson S.C. 2000. Changes in hydrolytic enzyme activities of naive Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. *Diseases of aquatic organisms*, 41(1), 43-51.

Ross N.W., Firth K.J., Wang A., Burka J.F. Johnson S.C. 2000. Changes in hydrolytic enzyme activities of naive Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. *Diseases of Aquatic Organisms* 41(1), 43-51.

Sharif Zadeh S.A., Khara H., Ghobadi SH. 2016. Effect of riboflavin vitamin on growth, resistance of blood parameters and immunity of Common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Aquaculture Development* 10(2), 57-63.

Sheikhzadeh N., Nofouzi K., Delazar A., Oushani A.K. 2011. Immunomodulatory effects of decaffeinated green tea (*Camellia sinensis*) on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology* 31(6), 1268-1269.

Siwicki A.K., Anderson D.P. 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish: II. Potential killing activity of neutropphil and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin level in serum. *Fish Disease Diagnosis and Prevention Methods Olsztyn*, Poland, 193, 105-120.

Subramanian S., Mackinnon S.H.L., Ross N.W. 2007. Acomparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Bichemistry and Physiology* 148, 256- 263.

Sun L., Zhang J., Lu X., Zhang L., Zhang Y. 2011. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology* 49(10:و 2689-2696.

Talpur A.D., 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). *Aquacultur*e 36, 6-12.

Torrecillas S., Makol A., Caballero M. J., Montero D., Gines R., Sweetman J., zquierdo M.S. 2011. Improved feed utilization, intestinal mucus production and immune parameters in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). *Aquaculture Nutrition* 17(2), 223-233.

Van Dam R.M., Naidoo N., Landberg R. 2013. Dietary flavonoids and the development of type 2 diabetes and cardiovascular diseases: review of recent findings. *Curr Opin Lipidol* 24, 25-33.

Xie C., Xie Z., Xu X., Yang D. 2015. Persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves: a review on traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties. *Journal of Ethnopharmacology* 163, 229-240.

Yanbo W., Zirong X. 2006. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Animal Feed Science and Technology* 127, 283.292.

Zoheiri F., Imanpour M.R., Hajimoradlo A., Hoseinifar S.A. 2016. Effect of *Zingibar officinale* on growth, immunity mucosal and hematological factors in *Rutilus kutum.* *Journal of Applied Ichthyological research* 5(1), 12.19.

The effect of persimmon leaf extract (*Diospyros kaki*) as feed additive on some blood parameters and non-specific immune response in Common carp (*Cyprinus carpio*)

Ehsan Ahmadifar[*1], Mohsen Shahriari Moghadam[2], Najmeh Sheikhzadeh[3]

[1]Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran
[2]Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran.
[3]Department of Food Hygiene and Aquatic Animals, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
*Corresponding author: ehsan.ahmadifar@uoz.ac.ir
Received: 2018/8/6 Accepted: 2019/2/2

Abstract

Nowadays the herbal drugs products and their derivates are used as an immunostimulants, growth promoters and physiological booster in aquatic animals. In this research, the effect of persimmon leaf extract (*Diospyros kaki*) on the hematological and immunity indices of juvenile's common carp have been investigated. For this purpose, a total of 400 juvenile common carp with an average weight of 16.11±2.75 were randomly divided into four groups with three replicates. Persimmon leaf extract in values of 0, 1, 3 and 5% were added into diets and fish were fed with 3% of body weight for 60 days at 3 times. Comparison of the blood parameters indicated that the highest levels of hemoglobin, hematocrit and red blood cell were observed in the treatment containing the high concentration of persimmon leaf extract (P<0.05). The differential count of white cells indicated that highest concentrations of monocytes, lymphocytes and neutrophils were found in the treatment containing 5% of leaf extract. There was no significant difference between total protein and glucose in experimental and control treatments (P>0.05). The level of cholesterol was significantly higher in 5% treatment (P<0.05). The activity of protease and alkaline phosphatase enzymes, as well as the levels of immunoglobulin and lysozyme in mucus of fish, were significantly higher in treatments than in control and the highest amount was observed in 5% treatment (P<0.05). Based on the results, it can be concluded that the leaf extract can be used as a nutritional supplement to strengthen safety indicators in common carp.

Keywords: Persimmon leaf extract, Immune index, Hematology, Common carp.