



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره پنجم، شماره چهارم، زمستان ۹۶

<http://jair.gonbad.ac.ir>

تأثیر سطوح مختلف پودر نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) بر عملکرد رشد و برخی

پارامترهای ایمنی در موکوس پوست ماهی کلمه (*Rutilus caspicus* (Yakovlev, 1870)

سهیلا رستگاری^{*}، عبدالمجید حاجی مرادلو^۲ و حامد پاک‌نژاد^۳

^۱ دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

آستاد گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی

و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

آستادیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی

و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ ارسال: ۹۵/۰۴/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۹/۰۲

چکیده

هدف از این مطالعه ارزیابی تأثیر جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف پودر نعناع (*M. piperita*) بر شاخص‌های رشد و برخی پارامترهای ایمنی ماهی کلمه (*R. caspicus*) بود. ۵۴۰ قطعه بچه‌ماهی با میانگین وزن (۲/۴±۰/۱۲) گرم در ۱۲ تانک توزیع شده و در ۳ تکرار با جیره‌های غذایی حاوی سطوح ۰، ۳ و ۴ گرم در کیلوگرم پودر نعناع به مدت ۶۰ روز غذادهی شدند. انتهای دوره عملکرد رشد اندازه‌گیری شد. همچنین برخی پارامترهای ایمنی موکوس پوست (لیزوزیم، آلکالین فسفاتاز و پروتئین) نیز اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد افزایش وزن بدن و نرخ رشد ویژه در ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی نعناع افزایش معنی‌داری داشت. علاوه بر این، ضریب تبدیل غذایی ماهیان تیمار شده با نعناع در مقایسه با گروه شاهد به صورت معنی‌داری کاهش یافت. همچنین سطوح پروتئین محلول، فسفاتاز قلیایی و لیزوزیم موکوس پوست ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی پودر نعناع در مقایسه با گروه شاهد به صورت معنی‌دار افزایش یافت. نتایج نشان داد که جیره حاوی پودر نعناع اثرات مثبتی بر شاخص‌های رشد و پارامترهای ایمنی موکوس پوست ماهی کلمه (*R. caspicus*) داشته است.

واژه‌های کلیدی: *R. caspicus*، نعناع، عملکرد رشد، ایمنی موکوسی

* نویسنده مسئول: soheilarastegari@yahoo.com

مقدمه

به‌نظر می‌رسد افزایش سیستم ایمنی بدن، امیدوارکننده‌ترین روش برای جلوگیری از بیماری‌های ماهی باشد (Soltani *et al.*, 2010). موکوس پوست یک جزء کلیدی شامل ترکیبات متعددی از سیستم ایمنی ذاتی از جمله: لیزوزیم، پروتئازها، ایمونوگلوبولین‌ها، لکتین و آنزیم‌های پروتئولیتیک باشد (Subramanian *et al.*, 2007). موکوس پوست و اپیدرم ماهی به‌عنوان اولین سد در مقابل عوامل بیماری‌زا عمل می‌کند (Ellis, 2001; Ingram, 1980; Shephard, 1994). در آبی‌پروری محرک‌های ایمنی به‌طور گسترده در پرورش لاروی بکاربرده می‌شود و نمونه‌های بسیاری از استفاده موفقیت‌آمیز محرک‌های ایمنی برای بهبود ایمنی و تولید وجود دارد. یکی از کاربردهای اولیه محرک‌های ایمنی، استفاده از گل‌کان در پرورش ماهی آزاد (*Salmo salar*) است (Bricknell and Dalmo, 2005). استفاده از گیاهان یا فرآورده‌های حاصل از آنها در خوراک ماهیان، به‌عنوان یک راهکار مناسب برای افزایش رشد در ماهیان، مدنظر شده است (Bello *et al.*, 2012). این ترکیبات قادر به افزایش پاسخ ایمنی ماهی، بهبود مقاومت در برابر بیماری‌های عفونی و به حداقل رساندن خطر استفاده از عوامل شیمیایی می‌باشند (Magnadóttir, 2010). استفاده از این مکمل‌های خوراکی به‌عنوان محرک‌های ایمنی می‌تواند فعالیت مکانیسم‌های دفاعی ایمنی ذاتی را افزایش دهد (Bricknell and Dalmo, 2005; Harikrishnan *et al.*, 2011; Ringø *et al.*, 2012; Cook *et al.*, 2003).

عدم موفقیت در درمان بسیاری از بیماری‌ها، اثرات جانبی داروهای شیمیایی و مقاومت در برابر برخی از داروها به‌ویژه آنتی‌بیوتیک‌های رایج، گرایش محققین را نسبت به مطالعه در زمینه استفاده از محرک‌های ایمنی با منشأ گیاهی به‌دلیل قیمت پایین‌تر، خطرات کمتر برای محیط زیست و آبی و هم‌چنین در دسترس بودن، افزایش داده است (Dugenci *et al.*, 2003). این مکمل‌های خوراکی علاوه بر تحریک سیستم ایمنی غیر اختصاصی، منجر به بهبود شاخص‌های رشد، مقاومت در برابر برخی بیماری‌های عفونی و افزایش تحمل تنش‌های محیطی می‌گردند که همه این عوامل در نهایت منجر به اقتصادی‌تر شدن تولید آبزیان پرورشی می‌گردد (Rao *et al.*, 2006).

گیاه نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* و نام رایج Peppermint گیاهی علفی و از تیره نعناع می‌باشد (Iscon *et al.*, 2002). این گیاه بومی مناطق مدیترانه بوده و در اکثر نقاط ایران به‌ویژه مناطق شمالی پراکنده شده است (Hadian *et al.*, 2008). از جمله گیاهان دارویی مهم با خواص متعدد شامل: اثرات ضد میکروبی (Mahboubi and Haghi, 2008) اثرات آنتی‌اکسیدانی (Mimica-Dukic *et al.*, 2003)، تأثیرات قابل توجهی بر خون و پارامترهای ایمنی (Nobakht and Mehmannaavaz, 2010) دارد که مصارف گسترده‌ای در صنعت دارویی، غذایی و بهداشتی دارد (Iscon *et al.*, 2002). علاوه بر این، اثرات آن بر رشد و تحریک سیستم ایمنی بدن در انسان و حیوانات خونگرم ثابت شده است

(Cosentino et al., 2009). از مواد تشکیل دهنده مهم در این گیاه می‌توان به منتول، منتون و اتیل- استات اشاره نمود (Mahboubi and Haghi, 2008). بررسی‌های صورت گرفته نشان دهنده اثرات نعناع فلفلی به‌عنوان محرک رشد و ایمنی در گونه‌های آبزی مانند کپور معمولی (*Cyprinus caprio*)، سی‌باس (*Lates calcarifer*) و ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*) بوده است (Hajibeglou and (Sudagar, 2010; Talpur, 2014; Adel et al., 2015). با این‌حال، تاکنون تحقیقی در مورد تأثیر استفاده از نعناع در جیره غذایی ماهی کلمه، صورت نگرفته است. هدف از این مطالعه، تأثیر استفاده از این گیاه بر رشد و پارامترهای ایمنی در جیره غذایی ماهی کلمه بود.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و سازگاری به شرایط آزمایشگاهی: این آزمایش از تیرماه تا آذرماه سال ۹۴ در مرکز آبی‌پروری شهید ناصر فضلی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام گرفت. ۵۴۰ قطعه بچه ماهی کلمه با وزن متوسط 0.12 ± 0.04 گرم از مرکز تکثیر و پرورش سیجوال بندرت‌رکمن تهیه و به مرکز آبی‌پروری منتقل شد. پس از طی حدود ۲ هفته سازگاری با شرایط جدید، ماهیان به تعداد ۴۵ قطعه و به صورت تصادفی با چهار تیمار و سه تکرار در ۱۲ تانک توزیع شدند. آب تانک‌ها از آب لوله‌کشی همراه با هوادهی تأمین شدند.

خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب: خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب طی دوره ۸ هفته‌ای پرورش بچه‌ماهیان کلمه، در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار مقادیر اندازه‌گیری اکسیژن محلول، درجه حرارت، pH و شوری در آب حوضچه‌های آزمایش

شوری (ppt)	pH	دمای آب (درجه سانتی‌گراد)	اکسیژن محلول (mg/lit)
0.04 ± 0.07	7.71 ± 0.34	24.66 ± 0.38	5.8 ± 0.17

تهیه پودر نعناع و غذادهی: نعناع از بازار محلی گلستان خریداری شد. برگ‌های نعناع خشک شدند و با استفاده از آسیاب به شکل پودر تبدیل گردید و به‌صورت مستقیم با محتوی غذای مورد استفاده با عنوان تجاری بیومار (ساخت کشور فرانسه) (جدول ۲) برای دست یافتن به سه رژیم غذایی اصلاح شده در رژیم‌های غذایی ۲، ۳ و ۴ گرم بر کیلوگرم مخلوط شد (Talpur, 2014). پودر نعناع با ژلاتین ۴ درصد به‌عنوان همبند، مخلوط شده و به غذا اسپری شد. روزانه آب تانک‌ها از لحاظ کمیت و کیفیت

ارزیابی می‌گردید و به‌میزان ۳-۵ درصد وزن بدن، روزانه ۲ بار با جیره حاوی نعنای، تغذیه می‌شدند. ماهیان به‌مدت ۸ هفته غذادهی شدند.

جدول ۲- ترکیب جیره تجاری استفاده شده در آزمایش

میزان (درصد)	ترکیبات
۴۳/۴۷	پودر ماهی
۱۳	پودر گوشت
۲۷/۵۳	پودر گندم
۳	روغن سویا
۶	روغن ماهی
۱/۵	متیونین
۱/۵	لیسین
۴	مخلوط ویتامین

سنجش پارامترهای رشد: ماهیان کُلمه هر دو هفته یک مرتبه، وزن‌کشی و پارامترهای رشد شامل میزان افزایش وزن بدن (WG)، ضریب رشد ویژه (SGR) و ضریب تبدیل غذایی (FCR)، با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه گردید (Turchini *et al.*, 2003).

رابطه ۱) میانگین وزن اولیه (گرم) - میانگین وزن ثانویه (گرم) = (WG) افزایش وزن بدن (گرم)
 رابطه ۲) افزایش وزن بدن (گرم) / مقدار غذای خورده شده (گرم) = (FCR) ضریب تبدیل غذایی
 رابطه ۳) $100 \times$ دوره پرورش به روز / میانگین وزن اولیه لگاریتم - میانگین وزن ثانویه لگاریتم = (SGR) ضریب رشد ویژه

نمونه‌برداری: جمع‌آوری موکوس براساس روش راس و همکاران (Ross *et al.*, 2000) با کمی اصلاحات انجام شد. از هر تانک ۲۰ قطعه ماهی به صورت تصادفی نمونه‌برداری و پس از بیهوشی با ۵۰ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک به صورت انفرادی درون کیسه‌های پلی‌اتیلنی (زیپ پلاست) حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سدیم کلرید ۵۰ میلی‌مولار قرار گرفتند. ماهیان از ۲۴ ساعت قبل از نمونه‌برداری غذادهی نشدند و پس از ۲ دقیقه، از کیسه‌ها خارج و درون آب پر از اکسیژن قرار گرفتند. موکوس جمع‌آوری شده به لوله‌های سانتریفیوژ استریل ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و با دور ۱۵۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. ماده بالایی به میکروتیوپ‌های ۱/۵ سی‌سی منتقل شد و نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش، درون فریزر با دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد، نگهداری شدند.

سنجش مقدار پروتئین محلول، فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در موکوس: برای اندازه‌گیری پروتئین محلول از روش لاورى و همکاران (Lowry *et al.*, 1951) و منحنی استاندارد آل‌بومین سرم

گاوی استفاده گردید. اندازه‌گیری با اضافه نمودن معرف رنگی فولین فنول سیوکالتیو به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق شده موکوس و استاندارد و قرائت نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل (Biochrom, Libera, S12) انجام گرفت. با انتقال جذب نوری به دست آمده به منحنی استاندارد، میزان پروتئین محلول برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. سطح آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی موکوس با استفاده از کیت‌های تولید شده توسط شرکت پارس و دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۰۵ نانومتر و اختلاف جذب نوری در مدت ۳ دقیقه تعیین گردید.

سنجش لیزوزیم: سنجش آنزیم لیزوزیم به روش کدورت‌سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر انجام شد (Subramanian et al., 2007) برای سنجش این آنزیم از باکتری *Micrococcus lysodeititicus* (ATCC 4698) به‌عنوان سویسترا استفاده گردید. برای تهیه این سوسپانسیون، باکتری لیوفیلیزه میکروکوکوس لیزودیکتیکوس در بافر فسفات پتاسیم (pH=7)، ۰/۰۴ مولار حل شده و جذب این محلول در مقابل شاهد (کووت حاوی بافر فسفات سدیم)، در طول موج ۴۵۰ نانومتر، برابر ۰/۶-۰/۷ تنظیم شد. سپس ۲/۵ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری به کووت اضافه شد. بعد از ۴-۵ دقیقه به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رسید، سپس به کووت شاهد ۰/۵ میلی لیتر بافر و به کووت نمونه ۰/۵ میلی لیتر نمونه موکوس اضافه شد. محتویات کووت به‌خوبی مخلوط گردید و کاهش در جذب سلول‌های میکروکوکوس لیزودیکتیکوس به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵ °C اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: این آزمایش با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در چهار سطح و سه تکرار انجام گرفت. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (one way ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-22 و رسم نمودارها با استفاده از Excel-2010 انجام شد.

نتایج

برخی از شاخص‌های رشد در جدول ۳ نشان داده شده است. در این مطالعه، فاکتورهای رشد به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$) با مکمل غذایی نعناع در مقایسه با گروه شاهد بهبود یافت. به‌طوری که ماهیان تغذیه شده با سطح ۴ گرم/کیلوگرم نعناع، عملکرد رشد بهتری در مقایسه با گروه شاهد و دیگر تیمارها داشتند.

جدول ۳- (میانگین \pm انحراف معیار) میزان افزایش وزن، نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی در ماهی کلمه (*R. caspicus*) تغذیه‌شده با سطوح مختلف پودر نعناع

شاخص رشد	شاهد	۲ گرم/کیلوگرم	۳ گرم/کیلوگرم	۴ گرم/کیلوگرم
میزان افزایش وزن	۴/۰۸ \pm ۰/۴۷ ^a	۵/۱۵ \pm ۰/۲۴ ^{ab}	۵/۳۷ \pm ۰/۹۳ ^{ab}	۶/۰۳ \pm ۰/۷۷ ^b
نرخ رشد ویژه	۱/۶۱ \pm ۰/۱۳ ^a	۱/۹۱ \pm ۰/۰۲ ^{ab}	۱/۹۴ \pm ۰/۲۶ ^b	۲/۱۲ \pm ۰/۱۲ ^b
ضریب تبدیل غذایی	۱/۶۴ \pm ۰/۲۰ ^a	۱/۲۹ \pm ۰/۰۶ ^b	۱/۲۶ \pm ۰/۲۰ ^b	۱/۱۱ \pm ۰/۱۴ ^b

اعداد با حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد ($p < 0/05$)

نتایج به‌دست آمده از سطوح پروتئین محلول، فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز قلیایی و لیزوزیم در ماهی کلمه تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف پودر نعناع (جدول ۴) نشان دهنده افزایش معنی‌دار در میزان پروتئین محلول در تیمارهای آزمایشی ($p < 0/05$) با افزایش سطح نعناع بود. همچنین در موکوس ماهی کلمه تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی نعناع، فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و لیزوزیم، افزایش معنی‌داری در مقایسه با جیره شاهد نشان دادند ($p < 0/05$). با افزایش سطح نعناع جیره، روند افزایشی در میزان پروتئین و فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز قلیایی و لیزوزیم موکوس مشاهده گردید.

جدول ۴- (میانگین \pm انحراف معیار) میزان پروتئین محلول و فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و لیزوزیم در ماهی کلمه (*R. caspicus*) تغذیه‌شده با سطوح مختلف پودر نعناع

شاخص	شاهد	۲ گرم/کیلوگرم	۳ گرم/کیلوگرم	۴ گرم/کیلوگرم
پروتئین محلول (mg/ml)	۲/۱۱ \pm ۰/۳۳ ^a	۳/۲۰ \pm ۰/۵۰ ^b	۳/۹۰ \pm ۰/۴۹ ^b	۶/۹۱ \pm ۰/۸۱ ^c
آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی (IU/l)	۳۲/۰۸ \pm ۴/۱۳ ^a	۵۴/۵۴ \pm ۳ ^b	۵۵/۴۲ \pm ۱/۷۶ ^b	۷۲/۲۴ \pm ۷/۴۳ ^c
آنزیم لیزوزیم (μ g/ml)	۲۴/۷۸ \pm ۱۱/۱۴ ^a	۴۵/۷۷ \pm ۴/۲۵ ^a	۱۰۵/۷۸ \pm ۰/۱۸ ^b	۱۳۹/۲۸ \pm ۲۲/۳۰ ^c

اعداد با حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد ($p < 0/05$).

بحث و نتیجه‌گیری

گیاهان دارویی به‌عنوان عوامل ارتقاء دهنده رشد در حیوانات آبزی عمل می‌کنند (Sivaram *et al.*, 2004; Maqsood *et al.*, 2011). استفاده از افزودنی‌های غذایی در آبزی‌پروری، یکی از روش‌های متداول برای بهبود افزایش وزن، کارایی غذا و مقابله با بیماری‌ها در ماهیان پرورشی است (Lee, 2012). گیاهان و فرآورده‌های گیاهی باتوجه به مزیت‌های متعدد، از جمله خطرات زیست محیطی حداقل، عدم ایجاد مقاومت دارویی، در دسترس بودن و قیمت پایین‌تر، توجه زیادی را در سطح جهان به خود جلب نموده است (Karpagam and Krishnaveni, 2014; Madhuri *et al.*, 2012). مطالعات

بسیاری گزارش کرده‌اند که افزودنی‌های گیاهی، رشد ماهیان و نیز مقاومت آنها را در برابر عوامل بیماری‌زا افزایش می‌دهد (Johnson and Banerji, 2007; Sasmal *et al.*, 2005).

در مطالعه حاضر پودر نعناع موجب افزایش نرخ رشد ویژه، کاهش ضریب تبدیل غذایی و افزایش وزن شده است که اختلاف معنی‌داری بین سطوح مختلف با شاهد وجود داشت. تالپور (Talpur, 2014) گزارش کرد زمانی که دوزهای ۲، ۳، ۴ و ۵ گرم بر کیلوگرم پودر نعناع به جیره ماهی باس دریایی آسیایی اضافه می‌گردد، افزایش وزن بدن و نرخ رشد ویژه به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش می‌یابد. همچنین ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای حاوی پودر نعناع دارای میزان کمتر و دارای اختلاف معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد بود که با نتایج حاصل از آزمایش کنونی هم‌خوانی دارد. بچه ماهی سفید تغذیه شده با سطوح ۲ و ۳ درصد عصاره نعناع جیره در افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه و کاهش ضریب تبدیل غذایی نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نشان داده است که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (Adel *et al.*, 2015). در مطالعه‌ای تأثیر نعناع را بر کپور معمولی بررسی کردند و نتایج نشان داد که تیمار تغذیه شده با مکمل غذایی نعناع در مقایسه با گروه شاهد عملکرد رشد بهتری داشته است که با تحقیق کنونی هم سو است (Hajibeglou and Sudagar, 2010).

به‌طور کلی، اثر افزایش دهنده رشد با مکمل‌های گیاهی مورد استفاده، بستگی به غلظت مناسب، ترکیب رژیم غذایی و مدیریت پرورش دارد (Barreto *et al.*, 2008). به علاوه، جانسون و بانرجی (Johnson and Banerji, 2007) گزارش کردند که رشد در ماهی *Labeo rohita* تغذیه شده با مکمل گیاهی به‌علت بهبود مصرف غذا و سنتز پروتئین افزایش می‌یابد. از مطالعاتی که دارای نتایج مغایر با نتایج این مطالعه هستند، می‌توان به بررسی اثر پروبیوتیک گالاکتوالیگوساکارید به‌عنوان مکمل غذایی با سطوح ۰/۵، ۱ و ۲ درصد به مدت ۶ هفته در جیره غذایی ماهی قرمز توسط کلنگی میاندره و همکاران (Kolangi Miandare *et al.*, 2016) اشاره کرد.

تنوع در مقدار موکوس ترشح شده بر سطح پوست سبب اختلاف در مقاومت گونه‌ها در برابر پاتوژن‌ها می‌گردد (Subramanian *et al.*, 2007). سلول‌های کیسه‌ای شکل در موکوس ماهیان، با ترشح پروتئین‌هایی ماهیان را در برابر عفونت‌های ناشی از انگل‌های خارجی حفظ می‌کنند. لکتین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها از جمله این پروتئین‌ها هستند (Suzuki *et al.*, 2003). افزایش پروتئین محلول موکوس تحت تأثیر محرک‌های ایمنی از جمله مخمر ساکارومیسس سرروزیه، شیخ‌زاده و همکاران (Sheikhzadeh *et al.*, 2012a)، محرک ایمنی ارگوسان، شیخ‌زاده و همکاران (Sheikhzadeh *et al.*, 2012b) و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی، هراندز و همکاران (Hernandez *et al.*, 2010) به‌ترتیب در موکوس ماهی *O. mykiss*، *p. tetrazuna* و *P. gracilis* گزارش شده است که با نتایج تحقیق حاضر

مطابقت دارد. در تحقیقی دیگر تأثیر عصاره نعناع فلفلی بر میزان پروتئین محلول موکوس بررسی شد و نتایج حاصل از این بررسی با مطالعه حاضر همخوانی دارد (Adel *et al.*, 2015).

محققان تأثیر پودر سیر را روی ماهی کلمه بررسی کردند که نتایج حاصل از مطالعه ما را تأیید می‌کند و بیان کردند که پروتئین محلول موکوس در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی این محرک ایمنی افزایش یافته است (Ghehdarijani *et al.*, 2016). افزودن محرک ایمنی گالاکتوالیگوساکارید در جیره غذایی ماهی قرمز منجر به افزایش معنی‌دار پروتئین محلول موکوس نسبت به گروه شاهد شده است که با نتایج حاصل از مطالعه کنونی هم سو است (Kolangi Miandare *et al.*, 2016). در افزودن مخمر ساکارومیسس سروریه به جیره غذایی تایگر بارب و قزل‌آلای رنگین‌کمان، تفاوت معنی‌داری در فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید (Sheikhzadeh *et al.*, 2012a). در تحقیق کنونی نیز با استفاده از پودر نعناع در جیره فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی موکوس ماهی کلمه نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشت که این نتیجه بر افزایش مقاومت سیستم ایمنی ذاتی از طریق استفاده از محرک ایمنی تأکید دارد. بالاترین میزان فسفاتاز قلیایی در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های ۴ گرم بر کیلو گرم پودر نعناع دیده شد. این نتایج با مطالعات انجام شده روی ماهی سفید مطابقت دارد (Adel *et al.*, 2015) و بیان می‌کنند که بالاترین میزان فسفاتاز قلیایی با ۳ درصد عصاره نعناع دیده شده است. اثر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس روی موکوس پوست در جیره غذایی ماهی تایگر بارب بررسی شد و سبب افزایش معنی‌دار در میزان فسفاتاز قلیایی می‌شود، که این نتیجه با مطالعه ما همخوانی دارد (Hoseinifar *et al.*, 2015). همچنین نتایج حاصل از تحقیقی روی ماهی کلمه نشان داد که میزان فسفاتاز قلیایی در ماهیانی که از ویتامین C استفاده کرده بودند نسبت به گروه شاهد بالاتر بود. نتایج حاصل از بررسی آنها با مطالعه حاضر همخوانی دارد اگرچه بین تیمارهای تغذیه شده تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (Roosta *et al.*, 2014).

افزایش فعالیت لیزوزیم در موکوس ماهی، سرم و بافت‌های سرشار از لوکوسیت گزارش شد (Ellis, 1999). این آنزیم، یک آنزیم ضدباکتریایی بوده که پیوندهای پپتیدوگلیکان موجود در دیواره سلولی باکتری‌ها را شکسته و در حالت کلی مولکول دفاعی مهم در سیستم ایمنی ذاتی ماهی به‌شمار می‌رود (Choi *et al.*, 2008). نتایج به‌دست آمده حاکی از این موضوع بود که میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم به‌صورت مطلوبی افزایش یافته و بیشترین سطح مربوط به بچه‌ماهیان تغذیه‌شده با جیره حاوی ۴ گرم/کیلوگرم نعناع می‌باشد. نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر مشابه با نتایج به‌دست آمده از فعالیت آنزیم لیزوزیم موجود در موکوس بسیاری از گونه‌های ماهی می‌باشد (Guardiola *et al.*, 2015; Subramanian *et al.*, 2007).

در تحقیقی تاثیر محرک ایمنی گالاکتوالیگوساکارید در جیره غذایی ماهی قرمز بررسی شد که نتایج حاصل از مطالعه ما را تأیید می کند و بیان کردند که میزان آنزیم لیزوزیم در ماهیان تغذیه شده با گالاکتوالیگوساکارید افزایش یافته است (Kolangi Miandare *et al.*, 2016). اختلاف در میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم می تواند به عواملی از قبیل پاسخ به استرس های موجود، بلوغ، تغذیه، جنسیت، تنوع گونه ها و تنوع ژنتیکی بستگی داشته باشد (Balfry and Iwama, 2004). تغییرات دمایی و استرس های ناشی از دستکاری ها و تراکم های بالای ماهی ها، می تواند آثار سرکوب کننده بر فاکتورهای ایمنی ذاتی داشته باشد در حالی که بسیاری از افزودنی های خوراکی و محرک های ایمنی می توانند عوامل دخیل در ایمنی ذاتی را بهبود بخشند (Magnadóttir, 2006).

پودر نعناع با بهبود عملکرد رشد با دوز پیشنهادی ۴ گرم بر کیلوگرم جیره برای ماهی کلمه، همچنین به عنوان محرک ایمنی با تقویت سیستم ایمنی ذاتی از طریق ارتقاء پروتئین محلول، فعالیت لیزوزیم و آنزیم فسفاتاز قلیایی مناسب می باشد. لایه موکوس، اولین سد دفاعی در مقابل پاتوژن هاست و حاوی عوامل ایمنی غیر اختصاصی مختلفی است. ترکیبات موکوس اپیدرم در گونه های مختلف ماهیان متفاوت بوده و این امر سبب تفاوت در مقاومت ماهیان در برابر بیماری ها می شود.

منابع

- Adel M., Amiri A.A., Zorriehzakra J., Nematolahi A., Esteban M.Á. 2015. Effects of dietary peppermint (*Mentha piperita*) on growth performance, chemical body composition and hematological and immune parameters of fry Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*). *Fish and Shellfish Immunology*, 45: 841-847.
- Balfry S.K., Iwama G.K. 2004. Observation on the inherent variability of measuring lysozyme activity in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 138: 207-211.
- Barreto M.S.R., Menten J.F.M., Racanicci A.M.C., Pereira P.W.Z., Rizzo P.V. 2008. Plant extracts used as growth promoters in broilers. *Brazilian Journal Poultry Science*, 10: 109-115.
- Bello O.S., Emikpe B.O., Olaifa F.E. 2012. The body weight changes and gut morphometry of *Clarias gariepinus* juveniles on feed supplemented with walnut (*Tetracarpidium conophorum*) leaf and onion (*Allium cepa*) bulb residues. *International Journal of Morphology*, 30: 253-257.
- Bricknell I., Dalmo R.A. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*, 19: 457-472.
- Cho S.H., Lee S.M. 2012. Onion powder in the diet of the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*): effects on the growth, body composition and lysozyme activity. *The World Aquaculture Society Journal*, 43: 30-38.

- Choi S.H., Park K.H., Yoon T.J., Kim J.B., Jang Y.S., Choe C.H. 2008. Dietary Korean mistletoe enhances cellular non-specific immune responses and survival of Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Fish and Shellfish Immunology*, 24: 67-73.
- Cook M.T., Hayball P.J., Birdseye L., Bagley C., Nowak B.F., Hayball J.D. 2003. Isolation and partial characterization of a pentraxin-like protein with complement-fixing activity from snapper (*Pagrus auratus*, *Sparidae*) serum. *Developmental and Comparative Immunology*, 27: 579-588.
- Cosentino M., Bombelli R., Conti A., Colombo M.L., Azzetti A., Bergamaschi A., Lecchini S. 2009. Antioxidant properties and in vitro immunomodulatory effects of peppermint (*Mentha piperita*) Essential oils in human leukocytes. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1: 33-43.
- Dugenci S.K., Arda N., Candan A. 2003. Some medicinal plants as immunostimulants for fish. *Ethnopharmacology*, 88: 99-106.
- Ellis A. 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunology*, 9: 291-308.
- Ellis A. E. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, 25: 827-839.
- Ghehdarijani M.S., Hajimoradloo A., Ghorbani R., Roohi Z. 2016. The effects of garlic-supplemented diets on skin mucosal immune responses, stress resistance and growth performance of the Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish and Shellfish Immunology*, 49: 79-83.
- Guardiola F.A., Dioguardi M., Parisi M.G., Trapani M.R., Meseguer J., Cuesta A., Esteban M.A. 2015. Evaluation of waterborne exposure to heavy metals in innate immune defences present on skin mucus of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish and Shellfish Immunology*, 45: 112-123.
- Hadian J., Ghasemnezhad M., Ranjbar H. 2008. Antifungal potency of some essential oil in control of postharvest decay of strawberry caused by *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11: 553-562.
- Hajibeglou A., Sudagar M. 2010. Immune response of common Carp (*Cyprinus carpio*) fed with herbal immunostimulants diets. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9: 1837-1847.
- Harikrishnan R., Balasundaram C., Heo M.S. 2011. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, 317: 1-15.
- Hernandez L.H.H., Barrera T.C., Mejia J.C., Mejia G.C., Carmen M., Dosta M., Del Lara Andrade, R., Sotres, J.A.M. 2010. Effects of the commercial probiotic *Lactobacillus casei* on the growth, protein content of skin mucus and stress resistance of juveniles of the Porthole livebearer *Poecilopsis gracilis* (poecilidae). *Aquaculture Nutrition*, 16: 407-411.

- Hoseinifar S.H., Roosta Z., Hajimoradloo A., Vakili F. 2015. The effects of *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). *Fish and Shellfish Immunology*, 42: 533-538.
- Ingram G.A. 1980. Substances involved in the natural resistance of fish to infection—a review. *Journal of Fish Biology*, 16: 23-60.
- Iscan G., KIrimer N.E.S.E., Kürkcüoglu M., Baser H.C., Demirci F. 2002. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3943-3946.
- Johnson C., Banerji A. 2007. Influence of extract isolated from the plant *Sesuvium portulacastrum* on growth and metabolism in freshwater teleost (*Labeo rohita*). *Fishery Technology*, 44: 229-234.
- Karpagam B., Krishnaveni N. 2014. Effect of supplementation of selected plant leaves as growth promoters of tilapia fish (*Oreochromis mossambicus*). *Research Resent Sciences*, 3: 120-123.
- Kolangi Miandare H., Farvardin S., Shabani A., Hoseinifar S.H., Ramezanzpour S.S. 2016. The effects of galactooligosaccharide on systemic and mucosal immune response, growth performance and appetite related gene transcript in goldfish (*Carassius auratus gibelio*). *Fish and Shellfish Immunology*, 55: 479-483.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Madhuri S., Sahni Y.P., Pandey G. 2012. Herbal feed supplements as drugs and growth promoter to fishes. *International Research Pharmacy*, 3: 30-33.
- Magnadóttir B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*, 20: 137-151.
- Magnadóttir B. 2010. Immunological control of fish diseases. *Marine Biotechnology*, 12: 361-379.
- Mahboubi M., Haghgi G. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 19: 325-327.
- Maqsood S., Singh P., Samoon M.H., Munir K. 2011. Emerging role of immunostimulants in combating the disease outbreak in aquaculture. *International Aquatic Research*, 3: 147-163.
- Mimica-Dukic N., Bozin B., Sokovic M., Mihajlovic B., Matavulj M. 2003. Antimicrobi and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Medica*, 69: 419-413.
- Nobakht A., Mehmannaavaz Y. 2010. Investigation the effects of using of *Thymus vulgaris* lamiaceae menthapiperita, *Oreganum vulgare* medicinal plants on

- performance, egg quality, blood and immunity parameters of laying hens. Iranian Journal of Applied Animal Science, 41: 129–136.
- Rao Y.Y., Das B.K., Iyotymayee P., Chakrabarti R. 2006. Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with fish; a comparable approach. Development Comparative Immunology, 20: 365-371.
- Ringø E., Olsen R.E., Vecino J.G., Wadsworth S., Song S.K. 2012. Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture-a review. Journal of Marine Science Research and Development, 2(1): 1-32.
- Roosta Z., Hajimoradloo A., Ghorbani R., Hoseinifar S.H. 2014. The effects of dietary vitamin C on mucosal immune responses and growth performance in Caspian roach (*Rutilus caspicus*) fry. Fish Physiology and Biochemistry, 40: 1601-1607.
- Ross N.W., Firth J.K., Wang A., Burka F., Johnson S.C. 2000. Change in hydrolytic enzyme activities of naïve Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin mucus due to infection with the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) and cortisol implantation. Diseases of Aquatic Organisms, 41: 43-51.
- Sasmal D., Babu C.S., Abraham T.J. 2005. Effect of garlic (*Allium sativum*) extract on the growth and disease resistance of *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758). Indian Journal of Fisheries, 52: 207-214.
- Sheikhzadeh N., Heidarieh M., Karimi Pashaki A., Nofouzi K., Ahrab Farshbafi M., Akbari M. 2012a. Hilyses, Fermented *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the growth performance and skin non-specific immune parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology, 32: 407-410.
- Sheikhzadeh N., Karimi Pashaki A., Nofouzi K., Heidarieh M., Tayefi-Nasrabadi H. 2012b. Effects of dietary Ergosan on cutaneous mucosal immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology, 32: 407-410.
- Shephard K.L. 1994. Functions for fish mucus. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 4: 401-429.
- Sivaram V., Babu M.M., Immanuel G., Murugadass S., Citarasu T., Marian M.P. 2004. Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelu tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. Aquaculture, 237: 9-20.
- Soltani M., Sheikhzadeh N., Ebrahimzadeh-Mousavi H.A., Zargar A. 2010. Effects of *Zataria multiflora* essential oil on innate immune responses of common carp (*Cyprinus carpio*) Journal of Fisheries and Aquatic Science, 5: 191-199.
- Subramanian S., MacKinnon S.L., Ross N.W. 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comparative Biochemistry and Physiology, 148: 256-263.

- Suzuki Y., Tasumi S., Tsutsui S., Okamoto M., Suetake H. 2003. Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 136: 723-730.
- 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.
- Turchini G.M., Gunasekera R.M., De Silva S.S. 2003. Effect of crude oil extracts from trout offal as a replacement for fish oil in the diets of the Australian native fish Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*). *Aquaculture Research*, 34: 697-708.

