



## تأثیر پودر گلبرگ زعفران (*Crocus Sativus*) بر عملکرد رشد و برخی فاکتورهای ایمنی موکوس پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

مریم طلا\*<sup>۱</sup>، سجاد پورمظفر<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> استادیار گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قشم، قشم، ایران

<sup>۲</sup> استادیار ایستگاه تحقیقات نرم‌تنان خلیج فارس، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرلنگه، ایران

### چکیده

بدین منظور، تعداد ۶۰۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن  $0.19 \pm 0.06$  گرم به‌طور تصادفی در چهار گروه آزمایشی توزیع و به مدت ۸ هفته با جیره‌های حاوی غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد پودر خام گلبرگ زعفران تغذیه شدند. نتایج نشان داد تغذیه بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با جیره حاوی ۰/۵ درصد پودر گلبرگ زعفران منجر به بهبود معنی‌داری در شاخص‌های رشد شامل افزایش وزن بدن، ضریب رشد ویژه و ضریب چاقی در مقایسه با گروه شاهد شد. درحالی‌که، غلظت‌های بالاتر (۱/۵ و ۲ درصد) تأثیر معنی‌داری بر عملکرد رشد ماهی نداشت. آنالیز شاخص‌های ایمنی ذاتی موکوس پوست نیز نشان داد که فعالیت آنزیم لیزوزیم با افزایش غلظت پودر گلبرگ زعفران در جیره افزایش یافت، به‌طوری‌که بالاترین میزان شاخص فوق در تیمارهای تغذیه‌شده با جیره حاوی ۲ درصد پودر گلبرگ زعفران مشاهده شد. همچنین بالاترین میزان فعالیت هم‌آگلوتیناسیون و فعالیت ضدباکتریایی در برابر دو باکتری بیماری‌زای رایج در آبی‌پروری شامل باکتری برسینیا روکری و آئروموناس هیدروفیلا نیز مربوط به تیمار تغذیه‌شده با جیره حاوی ۲ درصد پودر گلبرگ زعفران بود. بنابراین، گلبرگ زعفران به ویژه در غلظت ۰/۵ درصد امکان استفاده به عنوان یک محرک رشد و سیستم ایمنی با منشأ طبیعی، ارزان قیمت، موثر و سازگار با محیط زیست در مزارع پرورش ماهی قزل-آلای رنگین‌کمان جهت ارتقا سطح سلامت آبی و افزایش مقاومت در برابر عفونت‌های باکتریایی شایع از جمله بیماری‌های دهان قرمزی و سپتی سمی هم‌رازی باکتریایی را دارد.

واژه‌های کلیدی:

ایمنی، رشد، قزل‌آلای رنگین‌کمان، گلبرگ زعفران، موکوس

### نوع مقاله:

پژوهشی اصیل

<https://doi.org/10.22034/jair.11.2.53>

### تاریخچه مقاله:

دریافت: ۰۲/۰۶/۰۵

پذیرش: ۰۲/۰۷/۱۹

### نویسنده مسئول مکاتبه:

مریم طلا، استادیار گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قشم، قشم، ایران.

ایمیل: [talaazad29@gmail.com](mailto:talaazad29@gmail.com)

### ۱ | مقدمه

محیط‌های آبی‌پروری و ظهور و گسترش سویه‌های مقاوم، سرکوب سیستم ایمنی ماهی، تجمع در بافت‌های ماهی و انتقال به مصرف‌کننده و در نتیجه تأثیر منفی بر بازار فروش و صادرات ماهی دارد (Sahu et al., 2012; Romero et al., 2008; al.,). از طرفی واکنش‌های ماهی در مقیاس انبوه دشوار و بسیار گران است. همچنین عملکرد واکنش‌ها در دمای پایین و در صورت وجود چندین عفونت به‌طور همزمان بسیار ضعیف می‌باشد، چون واکنش به‌طور اختصاصی عمل کرده و تنها روی یک عامل بیماری‌زا اثر دارد (Pasnik et al., 2005; Harikrishnan et al., 2011). امروزه با توجه به اهمیت آبی‌پروری سبز و پیامدهای زیست محیطی آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر داروهای شیمیایی، تحریک و بهبود سیستم ایمنی با استفاده از افزودنی‌های غذایی پایدار و سازگار با محیط زیست یکی از راهبردهای مدیریتی در پیشگیری از وقوع بیماری در صنعت پرورش ماهی و توسعه آبی‌پروری پایدار محسوب می‌شود

بروز بیماری‌ها از عوامل اصلی محدودکننده تولید در آبی‌پروری خصوصاً در شرایط پرورش متراکم است که با افزایش مرگ و میر، کاهش رشد و افزایش دوره پرورش ضررهای اقتصادی فراوانی را بر پرورش‌دهنده تحمیل می‌نماید. در سیستم‌های پرورش متراکم، ماهی ممکن است در معرض شرایط استرس‌زای فراتر از ظرفیت تحمل خود (به عنوان مثال تراکم بالا یا کمبودهای تغذیه‌ای) قرار گیرد که منجر به تضعیف سیستم ایمنی و در نتیجه افزایش حساسیت در مقابل عوامل بیماری‌زا شود (Stentiford et al., 2012; Tapia-Paniagua et al., 2014). بنابراین ضروری است تا با اتخاذ شیوه‌های مناسب، بقا و رشد ماهی را در چنین شرایطی حفظ کرد. اگرچه تاکنون داروهای شیمیایی زیادی از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها برای پیشگیری و درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته است، اما این داروها اثرات منفی زیادی از جمله مشکلات زیست محیطی، تخریب جوامع میکروبی در

ترکیبات سمی نسبتاً کمی در مقایسه با کلاله می‌باشد (Hosseini et al., 2018). بنابراین با توجه به اهمیت پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین-کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در ایران و ضرورت تولید جیره غذایی مناسب جهت توسعه پایدار این صنعت و قطب بودن این کشور از نظر تولید زعفران، مطالعه حاضر برای اولین بار پتانسیل استفاده از پودر گلبرگ زعفران را به عنوان یک مکمل غذایی گیاهی بومی و غنی از ترکیبات فلاونوئیدی، با تمرکز بر عملکرد رشد و پارامترهای سیستم ایمنی ذاتی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار می‌دهد. از طرف دیگر تمرکز اغلب مطالعات سیستم ایمنی ذاتی بر روی فاکتور-های ایمنی خون می‌باشد، اما در حال حاضر گرایش زیادی برای مطالعه موکوس پوست به‌عنوان یک تکنیک غیرتهاجمی برای مطالعه فاکتور-های ایمنی ذاتی وجود دارد. لذا هدف از مطالعه حاضر، بررسی پتانسیل استفاده از پودر گلبرگ زعفران به‌عنوان یک مکمل غذایی گیاهی بومی بر عملکرد رشد و برخی از پارامترهای سیستم ایمنی ذاتی موکوس (فعالیت لیزوزیم، فعالیت ضدباکتریایی و فعالیت هم‌آگلوتیناسیون) بچه-ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بود که در صورت داشتن چنین اثری، این تحقیق می‌تواند علاوه بر کاهش هزینه‌های تولید و افزایش بازدهی از طریق بالا بردن سطح ایمنی ماهی در سیستم پرورش مترکم، از هدر رفتن حجم وسیعی از یک محصول جانبی کشاورزی نیز جلوگیری کند.

## ۲ | مواد و روش‌ها

به منظور تهیه جیره‌های آزمایشی، ابتدا غذای تجاری پایه (خوراک اکسترود شرکت فرادانه، شهرکرد- ایران) با استفاده از میکسر کاملاً پودر و نرم شد. سپس پودر گلبرگ زعفران با توجه مطالعه رایسی و همکاران (Raissy et al., 2022) در چهار سطح ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد (گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم خوراک) با استفاده از محلول ژلاتین یک درصد به خوراک اضافه تا به شکل خمیر نرم و شکل‌پذیر درآید (فرض الهی و همکاران، ۱۳۹۹). سپس خوراک‌ها در در سایه و در معرض جریان هوا خشک و در کیسه‌های نایلونی بسته‌بندی و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور حفظ شرایط آزمایشی یکسان، به جیره گروه شاهد نیز مقدار مساوی ژلاتین اضافه شد. همچنین جهت حفظ کیفیت مواد مغذی، فرآیند آماده‌سازی جیره های غذایی آزمایشی هر دو هفته یکبار انجام شد.

پس از طی دوره سازگاری به مدت دو هفته و تغذیه با جیره تجاری پایه، تعداد ۶۰۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن  $0.19 \pm 0.06$  گرم در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و سه تکرار توزیع و به مدت ۸ هفته با جیره‌های حاوی غلظت‌های مختلف پودر خام گلبرگ زعفران (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد) تغذیه شدند. هر واحد آزمایشی شامل مخازن فایبرگلاسی ۷۷۰ لیتری حاوی ۵۰ قطعه بچه-ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با تراکم ذخیره‌سازی ۰/۴ گرم در هر لیتر بود. درصد غذادهی مطابق با دستور العمل شرکت فرادانه و بر اساس میانگین وزن ماهی و دمای آب بود. نوع و آنالیز تقریبی غذای پایه مصرفی در طی دوره آزمایش در جدول ۱-۲ ارائه شده است. پارامترهای فیزیکی‌وشیمیایی آب شامل دما ( $17.08 \pm 13.75$ )، pH ( $7.2 \pm 0.1$ )،

(Esteban, 2012). اخیراً گرایش زیادی به سمت استفاده از مکمل‌های گیاهی به صورت خام یا عصاره به دلیل مزایای زیادی از جمله قیمت پایین، دسترسی آسان، اثرات جانبی کمتر بر سلامت ماهی و کارایی بهتر در محیط آبی وجود دارد. گیاهان دارویی در آبی‌پروری نه تنها به عنوان یک جاذب غذایی در تحریک اشتها، محرک رشد و افزایش وزن استفاده می‌شوند بلکه تاثیر آنها به عنوان ترکیبات ضدقارچ، ضد-باکتری و همچنین به‌عنوان محرک سیستم ایمنی و افزایش مقاومت به بیماری در تعداد زیادی از گونه‌های ماهی و سخت‌پوستان نیز اثبات شده است (Gisbert et al., 2017; Reyes-Cerpa et al., 2018; Salomon et al., 2020; Huang et al., 2020; Dewi et al., 2021).

زعفران (*Crocus sativus*) گیاهی کوچک و چند ساله از خانواده زنبقیان (Iridaceae) است (Srivastava et al., 2010) که کلاله خشک آن در صنایع غذایی و صنایع دارویی استفاده می‌شود (Mirheidar, 2005). ایران به‌ویژه استان‌های خراسان جنوبی و خراسان رضوی یکی از مهم‌ترین قطب‌های تولید زعفران در دنیا محسوب می‌شود، به طوری که ارزش سالانه صادرات زعفران ایران بالغ بر ۳۰۰ میلیارد ریال (۹۰ درصد زعفران دنیا) در سال می‌باشد. در فرآیند تولید زعفران از قسمت کلاله و خامه گل به عنوان زعفران تجارتي استفاده می‌شود و سایر قسمت‌های گل از جمله گلبرگ‌ها به عنوان ضایعات دور ریخته می‌شود که از حجم بسیار بالایی برخوردار می‌باشد (سالانه بالغ بر ۲۰ هزار تن) (Jafari-Sales and Pashazadeh, 2020). با توجه به روند رو به افزایش تولید زعفران، پیش بینی می‌شود که این مقدار در سال‌های آینده نیز افزایش یابد (Sidiq and Shrivastava, 2020). امروزه تنها کاربرد گلبرگ زعفران استفاده از آن برای استخراج رنگ می‌باشد که هنوز توسعه و تجاری‌سازی نشده است (Goli et al., 2012). در حالی که طبق تحقیقات انجام شده، گلبرگ زعفران حاوی ترکیبات فعال بیولوژیکی متعددی است که خواص ضدسرطانی، آنتی‌اکسیدانی، مسکن و ضدالتهاب، ضدافسردگی و ضد میکروبی آن اثبات شده است (Gil et al., 2002). همچنین طبق آنالیز ترکیب تقریبی، گلبرگ زعفران حاوی مواد مغذی (۱۰/۲ درصد پروتئین و ۵/۳ درصد چربی) و عناصر معدنی ضروری متعددی می‌باشد که با توجه استاندارد تغذیه ایران برای غذای حیوانات، پتانسیل استفاده به عنوان مکمل غذایی در جیره غذایی دام را دارد (Khoshbakht Fahim et al., 2012). علاوه بر این، درصد فیبر موجود در گلبرگ زعفران امکان استفاده از آن را به عنوان یک منبع مناسب از فیبر برای غنی‌سازی جیره میسر می‌سازد (Ahmadian-Kouchaksaraie et al., 2016). با توجه به اینکه زعفران تنها در ایران و در چند کشور با تمدن کهن مانند اسپانیا، هند، یونان، مراکش کشت می‌شود، مطالعات بسیار محدودی در مورد پتانسیل استفاده از پودر خام یا عصاره‌های گلبرگ زعفران به‌عنوان محرک رشد یا ایمنی در جیره غذایی آبزیان انجام شده است. اغلب مطالعات در مورد کلاله زعفران و محدود به موجودات خونگرم می‌باشد، درحالی که گلبرگ آن در تناژ بالاتری در دسترس می‌باشد و طبق مطالعات سم‌شناسی، گلبرگ زعفران حاوی

برگردانده شدند. نمونه‌های موکوس به لوله‌های سانتریفیوژ استریل منتقل و با استفاده از تانک ازت به آزمایشگاه انتقال داده شدند. پس از انجمادزایی، نمونه‌های موکوس جمع‌آوری شده در بافر- فسفات سدیم (۴۰ mM NaCl، pH=۷/۴، ۵۰ mM PBS) با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ یخچال دار (Eppendorf 5810R Refrigerated centrifuge) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با نیروی ۲۸۶۰ g سانتریفیوژ شدند. سپس مایع‌رویی حاصل را به آرامی با سمپلر جمع‌آوری کرده و در میکروتیوپ‌هایی به حجم ۱/۵ سی‌سی تقسیم‌بندی شد. بعد از انجماد به مدت یک شبانه‌روز در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد، نمونه‌های موکوس با استفاده از دستگاه فریز درایر (Alfa 1-2 LDplus, Germany) لیوفیلیزه شدند. پودر موکوس لیوفیلیزه شده مجدداً در بافر فسفات (۵۰ mM NaCl، pH=۷/۴، ۴۰ mM PBS) حل و پروتئین‌های نامحلول با سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۸۶۰ g جدا و تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Sheikhzadeh et al., 2012).

فعالیت آنزیم لیزوزیم به روش کدورت‌سنجی و با استفاده از سوسپانسیون سلول‌های میکروکوکوس لئونوس (*Micrococcus luteus*) در بافر فسفات سدیم (۰/۰۲ مولار، pH=۵/۵) با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به عنوان سوبسترا اندازه‌گیری شد. ابتدا، ۲۰۰ میکرولیتر نمونه موکوس را به ۸۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری اضافه و محتویات کووت را به خوبی مخلوط کرده و کاهش در جذب سلول‌های *Micrococcus lysodeikticus* با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Biochrom Libra S12 UV-Vis Spectro-photometer) در مقابل بلانک هوا به مدت ۱۰ دقیقه در فواصل زمانی یک دقیقه در طول موج ۴۵۰ نانومتر ثبت و با استفاده از رابطه زیر میزان فعالیت آنزیم در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین محلول به دست آمد.

$$\text{Unit/mg protein} = \frac{\Delta A / \text{min} \times 3 \times \text{DF}}{0.001 \times 0.1 \times \text{mg protein in assay}}$$

فعالیت هم‌آگلوتیناسیون موکوس پوست به روش رقت‌های متوالی با استفاده از سوسپانسیون ۲/۵ درصد گلبول‌های قرمز جوجه در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی انجام شد. ۲۵ میکرولیتر نمونه موکوس با مقدار مساوی بافر فسفات سدیم رقیق‌سازی سپس ۲۵ میکرولیتر سوسپانسیون ۲/۵ درصد گلبول قرمز به تمام چاهک‌ها اضافه و میکروپلیت‌ها به مدت ۱ ساعت روی شیکر در دمای اتاق نگهداری شدند. چاهک کنترل فقط حاوی سوسپانسیون گلبول قرمز و بافر فسفات سدیم بود. چاهک‌هایی که گلبول‌های قرمز به حالت شبکه‌ای ته‌نشین شدند به عنوان فعالیت آگلوتیناسیون مثبت و چاهک‌های با رسوب دگمه‌ای شکل مرکزی به عنوان فعالیت آگلوتیناسیون منفی در نظر گرفته شدند. بررسی نتایج به صورت چشمی و به منظور تایید بیشتر با استفاده از میکروسکوپ نوری انجام شد. معکوس آخرین رقتی که فعالیت هم‌آگلوتیناسیون را نشان داد به عنوان تیترا هم‌آگلوتیناسیون در نظر

اکسیژن محلول (۰/۸۵ ± ۷/۸۱) و آمونیاک (کمتر از ۰/۰۲ میلی‌گرم بر لیتر) دو بار در هفته اندازه‌گیری و در محدوده استاندارد برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان حفظ شدند. منبع آب مورد استفاده مخلوط آب چاه و رودخانه و با دبی ۰/۳ لیتر بر ثانیه بود.

جدول ۱- آنالیز تقریبی غذای تجاری ماهی قزل‌آلای شرکت فرادانه

SFT1	SFT3	SFT2	ترکیب شیمیایی (درصد)
۴۰-۴۴	۵۰-۴۶	۴۶-۵۰	پروتئین خام
۱۲-۱۶	۱۱-۱۵	۱۱-۱۵	چربی خام
۲-۴	۱/۵-۲	۱/۵-۲	فیبر خام
۷-۱۱	۹-۱۳	۹-۱۳	خاکستر
۵-۱۱	۵-۱۱	۵-۱۱	رطوبت
۱-۱/۵	۱-۱/۵	۱-۱/۵	فسفر
	نیمه شناور	نیمه شناور	فرم خوراک
۳ ± ۰/۳	۲/۴ ± ۰/۲	۲ ± ۰/۲	اندازه خوراک (میلی متر)
۱۵-۲۵	۱۵-۸	۴-۸	وزن ماهی (گرم)
۵	۶	۷	دفعات خوراک دهی

به منظور سنجش شاخص‌های رشد و تغذیه، در پایان دوره آزمایش، تعداد ۱۰ قطعه ماهی از هر تکرار به طور تصادفی صید و طول و وزن آنها با استفاده از خط‌کش با دقت میلی‌متر و ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم و تخته زیست‌سنجی اندازه‌گیری و شاخص‌های فوق با استفاده از فرمول‌های ذیل محاسبه گردید (Hoseinifar et al., 2014). لازم به ذکر است به منظور جلوگیری از بروز استرس و تلفات احتمالی، تغذیه ماهی‌ها ۲۴ ساعت قبل و بعد از انجام عملیات زیست‌سنجی قطع شد.

WG (g) = (W <sub>f</sub> - W <sub>i</sub> )	افزایش وزن بدن:	۱
WGR (%) = (W <sub>f</sub> - W <sub>i</sub> ) / W <sub>i</sub> × 100	درصد افزایش وزن بدن:	۲
TL (cm) = (L <sub>f</sub> - L <sub>i</sub> )	افزایش طول بدن:	۳
SGR (% day <sup>-1</sup> ) = (lnW <sub>f</sub> - lnW <sub>i</sub> ) / T × 100	ضریب رشد ویژه:	۴
DGR (g day <sup>-1</sup> ) = (W <sub>f</sub> - W <sub>i</sub> ) / T	نرخ رشد روزانه:	۵
CF (g/cm <sup>3</sup> ) = 100 × [W/TL <sup>3</sup> ]	شاخص وضعیت:	۶
SR (%) = (N <sub>f</sub> /N <sub>i</sub> ) × 100	درصد بازماندگی:	۷

W<sub>i</sub>: وزن اولیه (گرم)، W<sub>f</sub>: وزن نهایی (گرم)، L<sub>i</sub>: طول اولیه (سانتی-متر)، L<sub>f</sub>: طول نهایی (سانتی-متر)، T: مدت زمان دوره پرورش (روز)، N<sub>i</sub>: تعداد اولیه ماهی، N<sub>f</sub>: تعداد ماهی زنده در زمان مورد نظر

جمع‌آوری نمونه‌های موکوس در پایان دوره آزمایش و مطابق با روش ابوالفتحی و همکاران (Abolfathi et al., 2022) با اندکی تغییرات انجام شد. تغذیه ماهیان ۲۴ ساعت پیش از نمونه‌برداری قطع گردید. پس از مشاهده وضعیت عمومی هر ماهی و اطمینان از سالم بودن آن‌ها، ۵ قطعه ماهی از هر تکرار (۱۵ قطعه از هر تیمار) به طور تصادفی صید و با استفاده از محلول ۱۰۰ ppm گل میخک بیهوش (Ghafarifarsani et al., 2021) و به کیسه‌های پلی‌اتیلنی حاوی ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم (۴۰ mM NaCl، pH=۷/۴، ۵۰ mM PBS) منتقل شدند. سپس کیسه‌ها را به آرامی به مدت ۱-۲ دقیقه تکان داده و پس از جمع‌آوری موکوس، ماهی‌ها به تانک‌های بازیابی

ویک بررسی گردید. پس از حصول اطمینان از نرمال بودن داده‌ها، جهت بررسی تاثیر سطوح مختلف پودر گلبرگ زعفران بر نرخ بازماندگی، شاخص‌های رشد و فاکتورهای ایمنی ذاتی موکوس پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از روش تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان  $\alpha = 0.05$  انجام شد. تمام آنالیزهای آماری به کمک نرم‌افزار SPSS-22 و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel-2016 انجام شد. نتایج تاثیر سطوح مختلف پودر گلبرگ زعفران بر شاخص‌های رشد و بازماندگی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در طی دوره ۶ هفته‌ای آزمایش در جدول ۲ ارائه شده است. شاخص‌های افزایش وزن بدن، درصد افزایش بدن، ضریب رشد روزانه، ضریب رشد ویژه و ضریب چاقی در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ درصد پودر گلبرگ زعفران به طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد بود ( $p < 0.05$ ). در حالی که، غلظت‌های بالاتر پودر گلبرگ زعفران تاثیر معنی‌داری بر شاخص‌های فوق نداشتند ( $p > 0.05$ ). در مورد شاخص طول بدن، اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد و تیمارهای تغذیه شده با سطوح مختلف گلبرگ زعفران مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ). نتایج درصد بازماندگی نیز نشان داد که هیچ مرگ و میری در اثر استفاده از جیره‌های حاوی سطوح مختلف گلبرگ زعفران در سرتاسر دوره آزمایش مشاهده نشد و میزان آن برای تمام گروه‌های آزمایشی ۱۰۰ درصد بود.

گرفته شد (Sheikhzadeh et al., 2012). فعالیت ضدباکتریایی موکوس در مقابل دو باکتری گرم منفی (PTCC NO: 1890) *Yersinia hydrophila* (PTCC NO:1888) و *ruckeri* به روش انتشار دیسک با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد ارزیابی شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری (کدورت معادل استاندارد نیم مک‌فارلند- $10^8 \times 1/5$ ) با استفاده از میله شیشه‌ای L شکل استریل به‌طور یکنواخت روی پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس ۳۰ میکرولیتر از نمونه موکوس به دیسک‌های بلانک استریل اضافه و پس از ۵ دقیقه آغشته‌شدن، روی محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی باکتری قرار گرفت. پس از انکوباسیون به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای اتاق، میزان حساسیت یا مقاومت باکتری‌ها نسبت به نمونه‌های مختلف موکوس با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد با استفاده از ابزار کولیس بر حسب میلی‌متر مورد سنجش قرار گرفت. از دیسک استاندارد جنتامایسین (GM10) به‌عنوان کنترل مثبت و دیسک آغشته به بافر-فسفات سدیم نیز به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد (Mansouri Taei et al., 2017). غلظت پروتئین محلول نمونه‌های موکوس مطابق با روش (Lowry, 1951) با استفاده از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد. تمام ارزیابی‌ها در سه تکرار انجام شد. قبل از انجام آزمون‌های آماری، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو

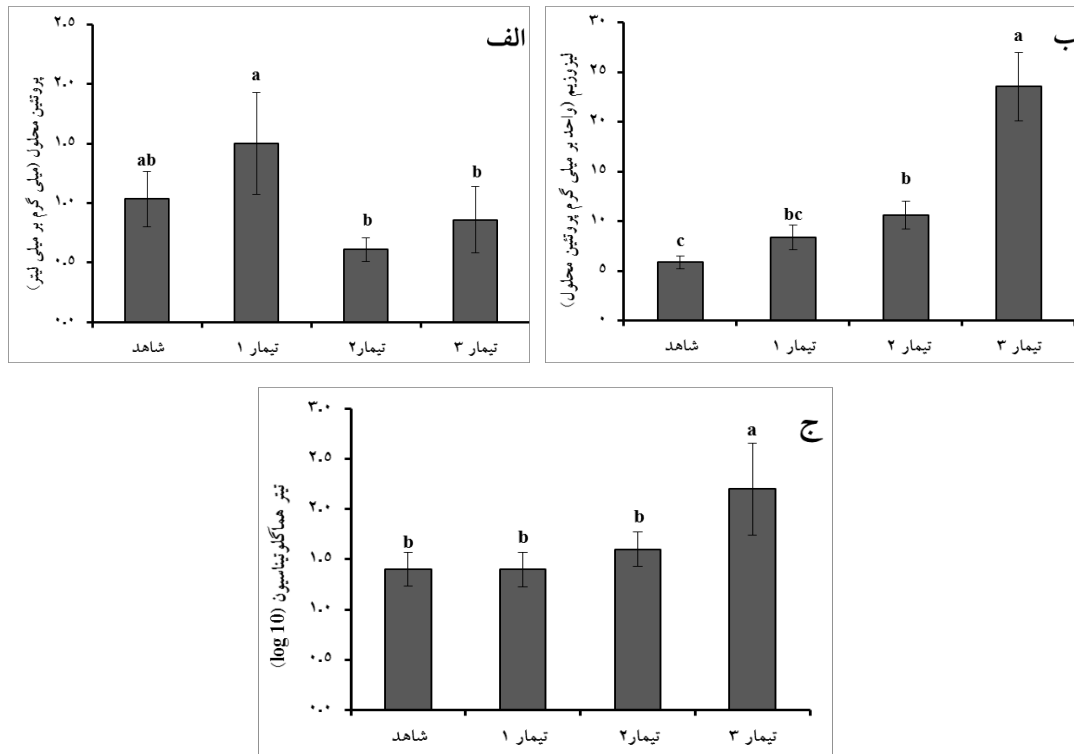
جدول ۲- شاخص‌های رشد و نرخ بازماندگی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف پودر گلبرگ زعفران در پایان دوره آزمایش

شاخص	تیمار	شاهد	تیمار ۱ (۰/۵ درصد گلبرگ زعفران)	تیمار ۲ (۱ درصد گلبرگ زعفران)	تیمار ۳ (۲ درصد گلبرگ زعفران)
افزایش طول بدن (LG)	$5.35 \pm 0.3$	$5.88 \pm 0.39$	$6.17 \pm 0.17$	$6.47 \pm 0.46$	$6.19 \pm 0.17$
افزایش وزن بدن (WG)	$16.85 \pm 0.49$	$22.85 \pm 1.24$	$17.2 \pm 0.98$	$18.55 \pm 0.76$	$17.2 \pm 0.98$
درصد افزایش بدن (WGR)	$244.2 \pm 39.62$	$358.5 \pm 21.89$	$261 \pm 9.94$	$241.6 \pm 11.74$	$261 \pm 9.94$
ضریب رشد ویژه (SGR)	$2.93 \pm 0.26$	$3.62 \pm 0.11$	$3.5 \pm 0.6$	$2.92 \pm 0.8$	$3.5 \pm 0.6$
ضریب رشد روزانه (DGR)	$0.4 \pm 0.1$	$0.54 \pm 0.03$	$0.4 \pm 0.2$	$0.37 \pm 0.1$	$0.4 \pm 0.2$
ضریب چاقی (CF)	$0.17 \pm 0.05$	$0.1 \pm 0.06$	$0.192 \pm 0.03$	$0.9 \pm 0.06$	$0.192 \pm 0.03$
درصد بازماندگی (SR)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

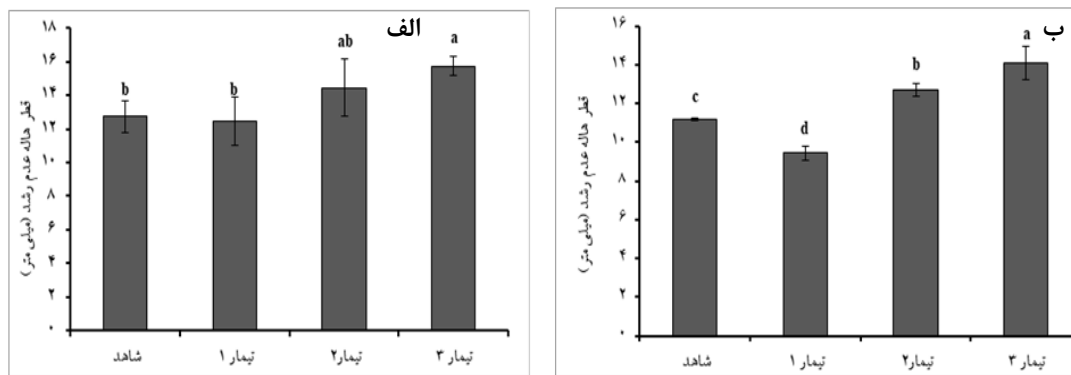
مقادیر به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده‌اند ( $n=10$ ). حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $p > 0.05$ ).

شده با جیره حاوی ۲ درصد پودر گلبرگ به طور معنی‌داری بالاتر از سایر گروه‌های آزمایشی بود ( $p < 0.05$ ). در حالی که جیره‌های حاوی ۰/۵ و ۱ درصد پودر گلبرگ زعفران تاثیری بر فعالیت هم‌گلوکوتیناسیون موکوس پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نداشتند ( $p > 0.05$ ) (شکل ۱ ج). همچنین، فعالیت ضدباکتریایی موکوس پوست در مقابل باکتری-های مورد آزمایش (آئروموناس هیدروفیلا و یرسینیا روکری) در گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۲ درصد پودر گلبرگ زعفران به طور معنی-داری بالاتر از سایر گروه‌های آزمایشی بود ( $p < 0.05$ ) (شکل ۲). هر چند در مورد باکتری یرسینیا روکری، اختلاف بین دو گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۱ درصد و ۲ درصد پودر گلبرگ زعفران معنی‌دار نبود ( $p > 0.05$ ) (شکل ۲ ج).

آنالیز فاکتورهای ایمنی ذاتی موکوس پوست قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف پودر گلبرگ زعفران نشان داد که میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم با افزایش میزان پودر گلبرگ زعفران در جیره به‌طور معنی‌داری افزایش یافت به طوری که بالاترین میزان فعالیت در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۲ درصد پودر گلبرگ زعفران (تیمار ۳) مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). هر چند افزایش میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم در گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۱ درصد پودر گلبرگ زعفران (تیمار ۲) در مقایسه با جیره حاوی ۰/۵ درصد پودر گلبرگ زعفران (تیمار ۱) معنی‌دار نبود ( $p > 0.05$ )، اما در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ) (شکل ۱-ب). فعالیت هم‌گلوکوتیناسیون نیز در گروه تغذیه



شکل ۱- پارامترهای ایمنی ذاتی موکوس پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف پودر گلبرگ زعفران. الف) پروتئین محلول، ب) لیپوزیم، ج) فعالیت هم‌آگلوتیناسیون. مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده‌اند ( $n=3$ ). حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $p>0.05$ ).



شکل ۲- فعالیت ضد میکروبی موکوس پوست قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف پودر گلبرگ زعفران در پایان دوره آزمایش. الف) *Yersinia ruckeri* (ب) *Aeromonas hydrophil*

#### ۴ | بحث و نتیجه‌گیری

به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین بالاترین میزان فعالیت هم‌آگلوتیناسیون و فعالیت ضد باکتریایی موکوس در برابر دو باکتری بیماری‌زای رایج در آبزی‌پروری شامل آئروموناس هیدروفیلا و یرسینیا روکری نیز در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی بالاترین سطح پودر گلبرگ زعفران (۲ درصد) مشاهده شد.

عملکرد رشد شامل شاخص‌های وزن نهایی، درصد افزایش وزن بدن و نرخ رشد ویژه بیانگر وضعیت تغذیه آبزی و یکی از پارامترهای ضروری برای ارزیابی تاثیر گیاهان دارویی در نظر گرفته می‌شود (حسین‌زاده صحافی و همکاران، ۱۳۸۷). تاثیر گیاهان دارویی بر رشد و بقای موجودات آبزی متغیر و بحث برانگیز می‌باشد. هر چند، مطالعات متعددی گزارش کرده‌اند که مکمل‌های گیاهی منجر به بهبود عملکرد

تجویز خوراکی، رایج‌ترین شیوه استفاده از گیاهان دارویی در آبزی-پروری است که از نظر اقتصادی مناسب‌ترین تکنیک و از نظر فیزیولوژیکی کمترین استرس را برای ماهی با هر اندازه‌ای دارد، اما به دلیل جذب آهسته، تاثیر آن کند و مستلزم مصرف طولانی مدت می‌باشد (Haghighi et al., 2019; Soltani et al., 2014; Azizi et al., 2016; Van Doan et al., 2020). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز خوراکی پودر گلبرگ زعفران به‌عنوان یک مکمل غذایی بومی و غنی از ترکیبات فلاونوئیدی در غلظت پایین (۰/۵ درصد) منجر به بهبود عملکرد رشد بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان شد، در حالی که، بررسی پارامترهای ایمنی ذاتی موکوس پوست نشان داد که میزان فعالیت آنزیم لیپوزیم با افزایش غلظت پودر گلبرگ زعفران در جیره

کاهش هضم و جذب مواد مغذی داشته و به طور چشمگیری رشد آبی را مختل می‌کند (Buyukcapar *et al.*, 2007).

موکوس اپیدرم به عنوان جز کلیدی سیستم ایمنی ذاتی و اولین سد دفاعی ماهی در مقابل هجوم عوامل بیماری‌زا محسوب می‌شود. از این رو، پارامترهای ایمنی ذاتی موکوس نظیر ایمونوگلوبولین، پروتئین‌های مکمل، لکتین، لیزوزیم، فسفاتاز قلیایی، انواع مختلف پروتئازها و سایر پروتئین‌ها و پپتیدهای ضد میکروبی (Fan *et al.*, 2015; Ren *et al.*, 2015; Xia *et al.*, 2016; Cordero *et al.*, 2015; Sanahuja *et al.*, 2019) به عنوان نشانگرهای زیستی قابل اعتماد برای ارزیابی وضعیت سلامت عمومی ماهی شناخته می‌شوند که ممکن است در پاسخ به فاکتورهای محیطی نظیر تغذیه، استرس، آلودگی‌های محیطی و آسیب فیزیکی تغییر کند (Brinchmann, 2016; Carda-Diéguez *et al.*, 2017; Cordero *et al.*, 2017). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم به‌عنوان قوی‌ترین آنزیم ضد باکتریایی سیستم ایمنی ذاتی در موکوس پوست بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با افزایش غلظت پودر گلبرگ زعفران در جیره غذایی افزایش یافت، به طوری که بالاترین میزان شاخص فوق در تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی ۲ درصد پودر گلبرگ زعفران مشاهده شد. با توجه به اطلاعات ما، تاکنون هیچ مطالعه‌ای در مورد پتانسیل استفاده از گلبرگ زعفران به‌عنوان یک ماده محرک ایمنی در آبزیان صورت نگرفته یا منتشر نشده است. هر چند، افزایش فعالیت لیزوزیم موکوس پوست قزل‌آلای رنگین‌کمان در اثر تغذیه با سایر مکمل‌های گیاهی نظیر عصاره‌های شیرین‌بیان، پونه، آویشن، بلوط، فلفل آبی، گزنه، ترخون، روغن سیاه دانه، پودر موسیر و گل همیشه بهار نیز گزارش شده است (Awad *et al.*, 2013; Adel *et al.*, 2020; Ghafarifarsani *et al.*, 2021; Gholamhosseini *et al.*, 2020; Darvishi *et al.*, 2022; Hosseini Shekarabi *et al.*, 2022; Raissy *et al.*, 2022; Ghafarifarsani *et al.*, 2023). هر چند، منصوری طائی و همکاران (Mansouri Taei *et al.*, 2017) تفاوت معنی‌داری را در فعالیت لیزوزیم موکوس پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با غلظت‌های مختلف عصاره مورد (۱/۵، ۱ و ۰/۵ درصد) در طی یک دوره تغذیه ۶۰ روزه در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند. علاوه بر لیزوزیم، موکوس پوست ماهی حاوی فاکتورهای ایمنی دیگری از جمله آگلوتینین‌ها می‌باشد. آگلوتینین‌ها گروهی از گلیکوپروتئین‌های مربوط به سیستم ایمنی ذاتی هستند که قادر به آگلوتینه کردن سلول‌ها، گلیکوکونژوگه‌ها و مولکول‌ها می‌باشند (Jung *et al.*, 2012). آگلوتینین‌های با فعالیت ضد میکروبی از جمله لکتین‌ها در موکوس پوست گونه‌های مختلف ماهی گزارش شده است (Arasu *et al.*, 2017; Mu *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2019; Rubeena *et al.*, 2019). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان دادند که تیتراهماگلوتیناسیون در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۲ درصد پودر گلبرگ زعفران در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت، در حالی مصرف جیره‌های حاوی غلظت‌های پایین‌تر (۱ و ۰/۵ درصد) تاثیری بر میزان فعالیت هماگلوتیناسیون موکوس پوست قزل‌آلای رنگین‌کمان نداشت.

رشد و تغذیه در آبزیان می‌شوند (Firoozbakhsh *et al.*, 2021; Hosseini Shekarabi *et al.*, 2022; Raissy *et al.*, 2023; Ghafarifarsani *et al.*, 2023). با این حال، برخی از مطالعات نیز نشان دادند که مکمل غذایی که منجر به تقویت سیستم ایمنی و مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا می‌شود، ضرورتاً تاثیر مثبت بر رشد ندارد (Celik Altunoglu *et al.*, 2017; Baba *et al.*, 2018; Yousefi *et al.*, 2021). عصاره‌های گیاهی رشد ماهی را به صورت وابسته به دوز تحت تاثیر قرار می‌دهند. به عبارت دیگر، رشد تا یک سطح گنجاندن عصاره گیاهی خاص (غلظت بهینه) افزایش و سپس با افزایش سطح گنجاندن به جیره ثابت یا کاهش می‌یابد. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که تغذیه بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با جیره حاوی ۰/۵ درصد پودر گلبرگ زعفران به مدت ۸ هفته منجر به افزایش معنی‌داری در شاخص‌های رشد شامل افزایش وزن بدن، ضریب رشد ویژه و ضریب چاقی در مقایسه با گروه شاهد شد. در حالی که، غلظت‌های بالاتر (۱/۵ و ۲ درصد) تاثیر معنی‌داری بر عملکرد رشد ماهی نداشت. به طور مشابهی، شیخ و همکاران (Sheikh *et al.*, 2023) نیز نشان دادند تغذیه جوجه‌های گوشتی با جیره‌های حاوی ۰/۱۵ و ۰/۲ درصد پودر گلبرگ زعفران به مدت ۷ هفته منجر به بهبود شاخص‌های رشد و تغذیه نظیر افزایش وزن بدن و ضریب تبدیل غذایی گردید. ابوالفتحی و همکاران (Abolfathi *et al.*, 2020) نیز گزارش کردند که افزودن عصاره اتانولی گلبرگ زعفران به میزان ۲ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم خوراک به مدت ۶ هفته منجر به بهبود شاخص‌های افزایش وزن، سرعت رشد ویژه و نرخ رشد روزانه در بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان شد، هر چند عصاره آبی گلبرگ زعفران تاثیر معنی‌داری بر عملکرد رشد ماهی نداشت. بر خلاف مطالعه حاضر، احمدی‌فر و همکاران (Ahmadifar *et al.*, 2018) نشان دادند که ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) تغذیه شده با جیره‌های حاوی غلظت‌های بالای پودر گلبرگ زعفران (۲-۴ درصد) بهترین عملکرد را در ارتباط با شاخص‌های رشد نظیر وزن نهایی، افزایش وزن، فاکتور وضعیت و کارایی تبدیل غذا داشت. تفاوت در نتایج مطالعه فوق با یافته‌های مطالعه حاضر می‌تواند در ارتباط با عادت غذایی دو گونه مورد مطالعه باشد. قزل‌آلای رنگین‌کمان یک گونه گوشتخوار است، بنابراین اضافه کردن ترکیبات گیاهی به جیره غذایی آن از لحاظ طبیعی محدود خواهد بود. مطالعات متعددی نشان دادند که استفاده از سطوح بالای مواد گیاهی در جیره غذایی به ویژه در مورد ماهیان گوشتخوار به دلیل درصد بالای سلولز و تاثیر منفی آن بر مزه غذا، کیفیت فیزیکی پلیت، تعادل مواد مغذی جیره و همچنین قابلیت هضم منجر به تاخیر در رشد ماهی می‌شود (Irkin *et al.*, 2014; Madalla *et al.*, 2013; Yilmaz and Ergün, 2018). از طرف دیگر، گلبرگ زعفران نیز همانند بسیاری از گیاهان دارویی حاوی مواد ضد تغذیه‌ای نظیر آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، پلی‌فنول‌ها، ترپننوئیدها و تانن‌ها می‌باشد (Bagherzade and Manzari Tavakoli, 2016) که در غلظت‌های بالا تاثیر منفی بر تعادل مواد مغذی و خوش خوراک جیره و همچنین

ضدمیکروبی موکوس در نتیجه تغذیه از پودر گلبرگ زعفران ممکن است به دلیل تحریک ترشح و افزایش فعالیت شاخص‌های ایمنی ذاتی موجود در موکوس از جمله آنزیم لیزوزیم و فعالیت هم‌گلوکوتیناسیون در اثر ترکیبات زیست‌فعال متعدد موجود در پودر گلبرگ زعفران نظیر ترکیبات فلاونوئیدی (کوئرستین، کامپفرول و میرستین)، کاروتنوئیدها (کروسین، آنتوسیانین (دلفینیدین، پتونیدین و مالویدین)، پلی‌فنول ها، کاروتنوئیدها، آلکالوئیدها و ترپنوئیدها باشد (Gil et al., 2002).

به‌طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز خوراکی پودر گلبرگ زعفران در سطح ۰/۵ درصد و به‌مدت ۶ هفته منجر به بهبود شاخص‌های عملکرد رشد شامل افزایش وزن، ضریب رشد ویژه و ضریب چاقی در مقایسه با گروه شاهد شد. درحالی که تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۲ درصد بهترین عملکرد را در ارتباط با پارامترهای ایمنی ذاتی موکوس نظیر فعالیت آنزیم لیزوزیم، فعالیت هم‌گلوکوتیناسیون و فعالیت ضد باکتریایی در مقابل دو باکتری بیماری‌زای رایج در آبزی-پروری شامل باکتری یرسینیا روکری و آئروموناس هیدروفیلا نشان داد. بنابراین، گلبرگ زعفران به‌ویژه در غلظت ۰/۵ درصد پتانسیل استفاده به عنوان یک محرک رشد و ایمنی با منشأ طبیعی، ارزان‌قیمت، موثر و سازگار با محیط‌زیست در مزارع پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان جهت ارتقا سطح سلامت آبزی و افزایش مقاومت در برابر عفونت‌های باکتریایی شایع از جمله بیماری‌های دهان قرمزی و سپتی‌سمی هموراژیک باکتریایی را دارد.

مقاله حاضر بر گرفته از طرح پژوهشی با شماره ۱۵۱۳۶۴۷۲ با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد قشم است.

#### پست الکترونیک نویسندگان:

talaazad29@gmail.com

مریم طلا:

sajjad5550@gmail.com

سجاد پورمظفر:

#### REFERENCES

- Abolfathi M., Akbarzadeh A., Hajimoradloo A., Joshaghani H.R., Ross N.W. 2022. Seasonal variations in the skin epidermal structure and mucosal immune parameters of rainbow trout skin (*Oncorhynchus mykiss*) at different stages of farming. *Fish & Shellfish Immunology*, 127: 965-974.
- Abolfathi M., Zahedi S., Faizi H., Aqli N., Kaveh H. 2017. Evaluation of the antibacterial properties of aqueous and alcoholic extracts of saffron petals on some aquatic pathogenic bacteria. The fifth national saffron conference. Torbat Heydarieh University.
- Abolfathi M., Zahedi S., Feizi H., Kaveh H., Ebrahimi A.L. 2020. The effect of aqueous and ethanol extract of saffron (*Crocus Sativus*) petal on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth performance. In: 4<sup>th</sup> International Congress of Fisheries and Aquatic Research (ICFAR).
- Adel M., Dawood M.A., Shafiei S., Sakhaie F., Shekarabi S.P.H. 2020. Dietary Polygonum minus extract ameliorated the growth performance, humoral immune parameters, immune-related gene expression and

فاژیو و همکاران (Fazio et al., 2021) نشان دادند که افزودن عصاره زنجبیل تا غلظت ۱/۵ درصد به جیره غذایی کپور هندی رهو (*Labeo rohita*) منجر به افزایش معنی‌داری در میزان فعالیت هم‌گلوکوتیناسیون موکوس در مقایسه با گروه شاهد شد، در حالی که غلظت‌های بالاتر عصاره منجر به کاهش تیترا هم‌گلوکوتیناسیون شد. اگرچه به تحقیقات بیشتری برای شناسایی مکانیسم‌های تقویت سیستم ایمنی موکوس پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با پودر گلبرگ زعفران نیاز می‌باشد، اما طبق یافته‌های موجود بر روی موجودات خونگرم و همچنین مطالعات *in vitro*، بهبود پارامترهای ایمنی موکوس پوست قزل‌آلای رنگین‌کمان از جمله فعالیت آنزیم لیزوزیم و هم‌گلوکوتیناسیون ممکن است به دلیل ترکیبات تعدیل‌کننده و محرک ایمنی موجود در گلبرگ زعفران نظیر ترپنوئیدها، پلی‌فنول‌ها و فلاونوئیدها باشد که اثر تحریک‌کنندگی بر لکوسیت‌ها و فاگوسیتوز دارند، باشد (Awad et al., 2017; Panase et al., 2018).

بیماری‌های یرسینیوزیس یا دهان قرمزی و سپتی‌سمی هموراژیک باکتریایی از مهم‌ترین بیماری‌های باکتریایی شایع در صنعت پرورش ماهیان آب شیرین از جمله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد که سالانه خسارات اقتصادی فراوانی را بر پرورش‌دهنده گان تحمیل می‌کنند (Wrobel et al., 2019; Linke Pennisi, 2020). نتایج تست آنتی‌بیوگرام نشان داد که تجویز خوراکی پودر گلبرگ زعفران در غلظت ۲ درصد به طور معنی‌داری فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های موکوس پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را در برابر هر دو باکتری یرسینیا روکری و آئروموناس هیدروفیلا افزایش داد که می‌توانند نشان‌دهنده تقویت سیستم ایمنی ذاتی موکوس و افزایش مقاومت در برابر بروز بیماری‌های یرسینیوزیس یا سپتی‌سمی باکتریایی باشد. هر چند، غلظت‌های پایین‌تر به ویژه ۰/۵ درصد تأثیری بر فعالیت ضدباکتریایی موکوس در برابر باکتری‌های مذکور نداشت. خاصیت ضد باکتریایی عصاره‌های آبی و الکلی گلبرگ زعفران در مقابل باکتری‌های آئروموناس هیدروفیلا و یرسینیا روکری جدا شده از قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز توسط ابوالفتحی و همکاران (۱۳۹۷) در شرایط *in vitro* بررسی و نتایج نشان داد که خاصیت ضد باکتری عصاره آبی گلبرگ زعفران نزدیک به قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی رایج از جمله جنتامایسین بود. بنابراین می‌تواند به عنوان یک جایگزین مناسب آنتی‌بیوتیک یا مکمل آنتی‌بیوتیکی (البته در صورت تأیید عدم وجود خاصیت بازدارندگی این عصاره بر آنتی‌بیوتیک مورد استفاده) در پیشگیری یا درمان بیماری‌های سپتی‌سمی هموراژیک باکتریایی و دهان‌قرمزی در مزارع پرورش آبزیان پیشنهاد شود. منصوری طائی و همکاران (Mansouri Taei et al., 2017) و غفاری‌فارسانی و همکاران (Ghafariarsani et al., 2020) نیز گزارش کردند فعالیت ضد باکتریایی موکوس پوست قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر باکتری‌های آئروموناس هیدروفیلا و یرسینیا روکری با افزایش غلظت عصاره مورد تا ۱/۵ درصد و عصاره بلوط تا ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در جیره غذایی در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. بهبود خاصیت

- resistance against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 519:734-738.
- Ahmadifar A., Adineh A., Fadaei Raini R., Moghadamfar S. 2018. The effect of saffron petal powder on growth performance, nutrition and antioxidant enzyme activity of herbivorous carp larvae (*Ctenopharyngodon idella*). *Scientific Journal of Iranian Fisheries*, 28: 33-45.
- Arasu A., Kumaresan V., Palanisamy R., Arasu M.V., Al-Dhabi N.A., Ganesh M.-R., Arockiaraj J. 2017. Bacterial membrane binding and pore formation abilities of carbohydrate recognition domain of fish lectin. *Developmental & Comparative Immunology*, 67: 202-212.
- Awad E., Austin D., Lyndon AR. 2013. Effect of black cumin seed oil (*Nigella sativa*) and nettle extract (Quercetin) on enhancement of immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture*, 388:19-37
- Awad E., Awaad A. 2017. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 67: 40-54.
- Azizi E., Firouzbakhsh F., Janikhalili K. 2016. Effects of dietary Supplemental thyme essence (*Thymus vulgaris* L.) on growth, hematological and serum biochemical parameters of Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Journal of Applied Ichthyological Research*, 4(2):45-61.
- Baba E., Acar U., Yilmaz S., Zemheri F., Ergun S. 2018. Dietary olive leaf (*Olea europaea* L.) extract alters some immune gene expression levels and disease resistance to *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish & Shellfish Immunology*, 79: 28-33.
- Brinchmann M.F. 2016. Immune relevant molecules identified in the skin mucus of fish using -omics technologies. *Molecular BioSystems*, 12:2056-2063.
- Büyükçapar H.M., Yanar M., Yanar Y. 2007. Pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with carotenoids from marigold flower (*Tagetes erecta*) and red pepper (*Capsicum annuum*). *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 31(1):7-12.
- Carda-Diéguez M., Ghai R., Rodríguez-Valera F., Amaro C. 2017. Wild eel microbiome reveals that skin mucus of fish could be a natural niche for aquatic mucosal pathogen evolution. *Microbiome*, 5: 16-20.
- Celik Altunoglu Y., Bilen S., Ulu F., Biswas G. 2017. Immune responses to methanolic extract of black cumin (*Nigella sativa*) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 67:103-109.
- Cordero H., Brinchmann M.F., Cuesta A., Esteban M.A. 2017. Chronic wounds alter the proteome profile in skin mucus of farmed gilthead seabream. *BMC Genomics*, 18: 93-99.
- Cordero H., Brinchmann M.F., Cuesta A., Meseguer J., Esteban M.A. 2015. Skin mucus proteome map of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Proteomics*, 15: 4007-4020
- Darvishi M., Shamsaie Mehrgan M., Khajehrahimi A.E. 2022. Effect of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) extract as an immunostimulant on serum and skin mucus immune parameters, transcriptomic responses of immune-related gene, and disease resistance against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Frontiers in Veterinary Science*, 9:81-86.
- Dewi N.R., Huang H.T., Wu Y.S., Liao Z.H., Lin Y.J., Lee P.T., Nan F.H. 2021. Guava (*Psidium guajava*) leaf extract enhances immunity, growth, and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* in white shrimp *Penaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 118: 1-10.
- Fan C., Wang J., Zhang X., Song J. 2015. Functional C1q is present in the skin mucus of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Integrative Zoology*, 10: 102-110.
- Fardh Elahi L., Sarvi Mughanlou K., Imani A., Azizi Basir M. 2019. The separate and combined effects of chicory (*Cichorium intybus*) and tea grass (*Hypericum perforatum*) extracts on growth indicators and digestive enzyme activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal physiology and development*, 13: 29-40.
- Fazio F., Naz S., Habib S.S., Hashmi M.A.H., Ali M., Saoca C., Ullah M. 2021. Effect of fortified feed with phyto-extract on the first physical barrier (Mucus) of *Labeo rohita*. *Animals*, 11:13-28.
- Firouzbakhsh F., Haghparast S., Memarzadeh M.R. 2021. Study on the effects of red pepper (*Capsicum annuum*) extract on immune responses and resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles against *Yersinia ruckeri*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 20:1573-1588.
- Ghafariarsani H., Hoseinifar S.H., Molayemraftar T., Raeeszadeh M., Van Doan H. 2023. Pot Marigold (*Calendula officinalis*) Powder in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Feed: Effects on Growth, Immunity, and *Yersinia ruckeri* Resistance. *Aquaculture Nutrition*, 49:2163-2174.
- Ghafariarsani H., Rashidian G., Sheikhlari A., Naderi Farsani M., Hoseinifar S.H., Van Doan H. 2021. The use of dietary oak acorn extract to improve haematological parameters, mucosal and serum immunity, skin mucus bactericidal activity, and disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*, 52: 2518-2527.
- Gholamhosseini A., Adel M., Dawood M.A.O., Banaee M. 2020. The Potential Benefits Ofmentha Longifolia on Growth Performance and Innate Immunity Parameters in Caspian Kutum (*Rutilus frisii kutum*). *Aquaculture Research*, 51:5212-5227.
- Gil M.I., Tomas-Barberan F.A., Hess-Pierce B., Kader A.A. 2002. Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 4976-4982.
- Gisbert E., Andree K.B., Quintela J.C., Caldach-Giner J.A., Ipharraguerre I.R., Pérez-Sánchez J. 2017. Olive oil bioactive compounds increase body weight, and improve gut health and integrity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *British Journal of Nutrition*, 117: 351-363
- Goli S.A.H., Mokhtari F., Rahimmalek M. 2012. Phenolic compounds and antioxidant activity from Saffron

- (*Crocus sativus* L.) petal. Journal of Agriculture Science, 4:175-181.
- Harikrishnan R., Kim M.C., Kim J.S., Balasundaram C., Heo M.S. 2011. Protective effect of herbal and probiotics enriched diet on haematological and immunity status of *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & schegel) against *Edwardsiella tarda*. Fish & Shellfish Immunology, 30: 886-893.
- Hoseinifar S.H., Sharifian M.J., Vesaghi Khalili M., Esteban M.A. 2014. The effects of dietary xylooligosaccharide on mucosal parameters, intestinal microbiota and morphology and growth performance of Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) fry. Fish & shellfish immunology, 39: 231-236
- Hosseini Shekarabi S.P., Javarsiani L., Mehrgan M.S., Dawood M.A., Adel M. 2022. Growth performance, blood biochemistry profile, and immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed dietary Persian shallot (*Allium stipitatum*) powder. Aquaculture, 548:72-79.
- Hosseini A., Razavi B.M., Hosseinzadeh H. 2018. Saffron (*Crocus sativus*) petal as a new pharmacological target: a review. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 21: 1091-1099
- Huang H.T., Lee P.T., Liao Z.H., Chen H.Y., Nan F.H. 2020. Effects of *Phyllanthus amarus* extract on nonspecific immune responses, growth, and resistance to *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology, 107:1-8.
- Huang L., Bai L., Chen Y., Wang Q., Sha Z. 2019. Identification, expression profile and analysis of the antimicrobial activity of collectin 11 (CL-11, CL-K1), a novel complement-associated pattern recognition molecule, in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Fish & Shellfish Immunology, 95: 679-687.
- Irkin L.C., Yigit M., Yilmaz S., Maita M. 2014. Toxicological evaluation of dietary garlic (*Allium sativum*) powder in European sea bass *Dicentrarchus labrax* juveniles. Food and Nutrition Sciences, 5: 81-89.
- Jafari-Sales A., Pashazadeh M. 2020. Antibacterial effect of methanolic extract of saffron petal (*Crocus sativus* L.) on some standard gram positive and gram negative pathogenic bacteria in vitro. Current Perspectives on Medicinal and Aromatic Plants, 3: 1-7.
- Khoshbakht Fahim N., Janati F., Sadat S., Feizy J. 2012. Chemical composition of agriproduct saffron (*Crocus sativus* L.) petals and its considerations as animal feed. The Journal of Food, 37:197-201.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biology & Chemistry, 193: 265-275.
- Madalla N., Agbo N.W., Jauncey K. 2013. Evaluation of aqueous extracted moringa leaf meal as a protein source for Nile tilapia juveniles. Tanzania Journal of Agricultural Science, 12: 53-64
- Mansouri Taei H., Hajimoradloo A., Hoseinifar S.H., Ahmadvand H. 2017. Dietary Myrtle (*Myrtus communis* L.) improved non-specific immune parameters and bactericidal activity of skin mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings, Fish & Shellfish Immunology, 64: 320-324
- Mirheidar H. 2005. Maaref giahi (Plant Knowledge). Tehran, Iran, Daftare Nashre Farhange Eslami, 11:172-173.
- Mu L., Yin X., Liu J., Wu L., Bian X., Wang Y., Ye J. 2017. Identification and characterization of a mannose-binding lectin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish & Shellfish Immunology, 67: 244– 253.
- Panase P., Tpdacho P. 2018. Preliminary use of *Polygonum minus* Linn. Leaf extract on growth performance, feed utilization, and some hematological indices of *Anabas testudineus* (Bloch, 1792). Comparative Clinical Pathology, 27: 147-153.
- Pasnik D.J., Evans J.J., Panangala V.S., Klesius P.H., Shelby R.A., Shoemaker C.A. 2005. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. Fish Disease, 28: 205-212.
- Raissy M., Ahmadi Kabootarkhani M., Sanisales K., Mohammadi M., Rashidian G. 2022. The Synergistic Effects of Combined Use of *Mentha longifolia*, *Thymus carmanicus*, and *Trachyspermum copticum* on Growth Performance, Feed Utilization, and Expression of Key Immune Genes in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Frontiers in Veterinary Science, 8:1596-1603.
- Ren Y., Zhao H., Su B., Peatman E., Li C. 2015. Expression profiling analysis of immune-related genes in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin mucus following Flavobacterium columnare challenge. Fish & Shellfish Immunology, 46: 537-542
- Reyes-Cerpa S., Vallejos-Vidal E., José Gonzalez-Bown M., Morales-Reyes J., PérezStuardo D., Vargas D., Imarai M., Cifuentes V., Spencer E., María Sandino A., Reyes-López F.E. 2018. Effect of yeast (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) and plant (Saint John's wort, lemon balm, and rosemary) extract based functional diets on antioxidant and immune status of Atlantic salmon (*Salmo salar*) subjected to crowding stress. Fish & Shellfish Immunology, 74: 250-259
- Romero J., Feijoó C.G., Navarrete P. 2012. Antibiotics in aquaculture—use, abuse and alternatives. Health and environment in aquaculture, 159:159-198.
- Rubeena A.S., Divya M., Vaseeharan B., Karthikeyan S., Ringø E., Preetham E. 2019. Antimicrobial and biochemical characterization of a C-type lectin isolated from pearl spot (*Etroplus suratensis*). Fish & Shellfish Immunology. 87: 202- 211.
- Salomón R., Firmino J.P., Reyes-López F.E., Andree K.B., González-Silvera D., Esteban M.A., Tort L., Quintela J.C., Pinilla-Rosas J.M., Vallejos-Vidal E., Gisbert E. 2020. The growth promoting and immunomodulatory effects of a medicinal plant leaf extract obtained from *Salvia officinalis* and *Lippia citriodora* in gilthead seabream (*Sparus aurata*). Aquaculture, 524:735-741.
- Sanahuja I., Fernández-Alacid L., Ordóñez-Grande B., Sánchez-Nuño S., Ramos A., Araujo R.M., Ibarz A. 2019. Comparison of several non-specific skin mucus immune defences in three piscine species of

- aquaculture interest. *Fish & Shellfish Immunology*, 89: 428-436.
- Sheikh G.G., Malik N.A., Sheikh A.A., Ganai A.M., Khan A.A., Haq Z., Farooq J., Rather A.M. 2023. Saffron petals (*Crocus sativus* L.) enhance productive performance and carcass quality in broiler birds by improving their immunity, antioxidant status and biochemical profile. *Journal of Agriculture and Food Research*, 12: <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100562>.
- Sheikhzadeh N., Karimi Pashaki A., Nofouzi K., Heidarieh M., Tayefi-Nasrabadi H. 2012. Effects of dietary Ergosan on cutaneous mucosal immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 32: 407-410.
- Sidiq S., Shrivastava P. 2020. Antimicrobial, antioxidant, and anticancer activities of saffron (*Crocus sativus*): a review. *Journal of Emerging Technology and Innovative Research*, 7:41-48
- 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.
- Srivastava R., Ahmed H., Dixit R.K., Saraf S.A. 2010. *Crocus sativus* L.: a comprehensive review. *Pharmacognosy reviews*, 4: 200-208
- Stentiford G., Neil D., Peeler E., Shields J., Small H., Flegel T., Vlaskovic J., Jones B., Morado F., Moss S. 2012. Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors. *Journal of invertebrate pathology*, 110: 141-157
- Jung T.S., Del Castillo C.S., Javaregowda P.K., Dalvi R.S., Nho S.W., Park S.B., Jang H.B., Cha I.S., Sung H.W., Hikima J.I., Aoki T. 2012. Seasonal variation and comparative analysis of non-specific humoral immune substances in the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Developmental & Comparative Immunology*, 38:295-301.
- Tapia-Paniagua S., Vidal S., Lobo C., Prieto-Álamo M., Jurado J., Cordero H., Cerezuela R., de la Banda I.G., Esteban M., Balebona M. 2014. The treatment with the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 of specimens of *Solea senegalensis* exposed to high stocking densities to enhance their resistance to disease. *Fish & shellfish immunology*, 42: 209-221
- Van Doan H., Hoseinifar S.H., Jaturasitha S., Dawood M.A., Harikrishnan R. 2020. The effects of berberine powder supplementation on growth performance, skin mucus immune response, serum immunity, and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Aquaculture*, 520(30): [DOI:10.1016/j.aquaculture.2020.734927](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734927).
- Wrobel A., Leo J.C., Linke D. 2019. Overcoming fish defences: the virulence factors of *Yersinia ruckeri*. *Genes*. 10:700.
- Xia H., Liu W., Wu K., Wang W., Zhang X. 2016. SlgZ exhibited maternal transmission in embryonic development and played a prominent role in mucosal immune response of *Megalabrama amblycephala*. *Fish & shellfish immunology*, 54: 107-117.
- Yılmaz S., Ergün S. 2018. Trans-cinnamic acid application for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): I. Effects on haematological, serum biochemical, non-specific immune and head kidney gene expression responses. *Fish & Shellfish Immunology*, 78: 140-157.
- Yousefi M., Adineh H., Reverter M., Hamidi M.K., Vatnikov Y.A., Kulikov E.V., Hoseinifar S.H., Van Doan H. 2021. Protective effects of black seed (*Nigella sativa*) diet supplementation in common carp (*Cyprinus carpio*) against immune depression, oxidative stress and metabolism dysfunction induced by glyphosate. *Fish & shellfish immunology*, 109:12-19.

#### نحوه استناد به این مقاله:

طلا م.، پورمظفر س. تأثیر پودر گلبرگ زعفران (*Crocus Sativus*) بر عملکرد رشد و برخی فاکتورهای ایمنی موکوس پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی دانشگاه گنبدکاووس. ۱۴۰۲، ۶۴-۵۴ (۲): ۱۱.

Tala M., Pormozaffar S. Effect of saffron (*Crocus Sativus*) petal powder on growth performance and some epidermal mucus immune parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Ichthyological Research*, University of Gonbad Kavous. 2023, 11(2): 54-64.

## Effect of saffron (*Crocus Sativus*) petal powder on growth performance and some epidermal mucus immune parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Tala M<sup>1\*</sup>, Pormozaffar S<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Assistant Prof., Dept. of Fisheries, Islamic Azad University, Qeshm Branch, Qeshm, Iran.

<sup>2</sup> Assistant Prof., of Persian Gulf Normatnan Research Station, Persian Gulf and Sea of Oman Ecology Research Institute, Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization. Bandarlange, Iran.

### Type:

Original Research Paper

<https://doi.org/10.22034/jair.11.2.53>

### Paper History:

Received: 27-08-2023

Accepted: 11-10- 2023

### Corresponding author:

Tala M. Assistant Prof., Dept. of Fisheries, Islamic Azad University, Qeshm Branch, Qeshm, Iran.

Email: talaazad29@gmail.com

### Abstract

The aim of this study was to investigate the potential of using saffron petal powder on the growth performance and innate immune parameters of the skin mucus of rainbow trout. For this purpose, 600 rainbow trout juvenile ( $6.6 \pm 0.19$  g) were randomly divided into four experimental groups and fed with diets containing 0, 0.5, 1 and 2% raw powder of saffron petals for 8 weeks. The results showed that feeding juvenile with a diet containing 0.5% saffron petal powder led to a significant improvement in growth indicators including gain weight, specific growth rate and factor condition compared to the control group. The results showed that the juvenile fed with a diet containing 0.5% saffron petal powder led to a significant improvement in growth indicators including weight gain, specific growth rate and condition factor feed conversion ratio compared to the control group, while, higher concentrations (1.5 and 2%) had no significant effect on the growth performance. The analysis of the innate immune parameters of the skin mucus also showed lysozyme enzyme had a dose-dependent increase, so that its highest level was observed in the treatments fed with ration containing 2% saffron petal powder. The analysis of the innate immune parameters of the skin mucus also showed that the lysozyme enzyme had a dose-dependent increase, so that its highest level was observed in the treatments fed with a diet containing 2% saffron petal powder. Also, the highest level of hemagglutination activity and antibacterial activity against two common pathogenic bacteria in aquaculture, including *Yersinia rookeri* and *Aeromonas hydrophila*, was related to the treatment fed with a diet containing 2% saffron petal powder. Therefore, saffron petal powder, especially at a concentration of 0.5%, has the potential to be used as a growth and immune stimulant with natural origin, cost-effective, efficient, and eco-friendly immunostimulant in rainbow trout farms to improve the level of aquatic health and increase resistance to common bacterial infections, including enteric redmouth disease and bacterial hemorrhagic septicemia.

**Keywords:** immune, growth, rainbow trout, saffron petals, mucus.