فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال دهم، شماره سوم، پاییز ۱۴۰۱

مقاله پژوهشی

اثر تغذیه کوتاه مدت ترکیب زردچوبه (*Curcuma langa*) و فلفل سیاه (*Piper nigrum*) بر فراسنجه‌های خونی، ایمنی و آنزیم‌های کبدی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

سیده میترا عقیلی[۱]، فرید فیروزبخش[۲]*، سارا حق‌پرست[۳]، ایوب فرهادی[۴]

DOI: 10.22124/japb.2022.20710.1437

تاریخ دریافت: مهر ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۰

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی تاثیر تغذیه کوتاه مدت ترکیب پودر زردچوبه (*Curcuma langa*) و فلفل سیاه (*Piper nigrum*) بر فراسنجه‌های خونی، ایمنی و آنزیم‌های کبدی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) طی ۳۰ روز انجام شد. ۴۵۰ قطعه بچه ماهی با میانگین وزنی ۲۴/۹۵±۰/۷۰ گرم انتخاب و در ده گروه آزمایشی با جیره‌های حاوی ترکیبی از دو گیاه زردچوبه (ز) و فلفل سیاه (ف) در نسبت ترکیبی (ت) ۳۰، ۵۰ و ۷۰ درصد در سطوح (س) صفر (شاهد)، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد جیره تغذیه شدند. فراسنجه‌های با اثر مستقل شامل AST در سطح ۰/۲۵ درصد، فعالیت لیزوزیم و کمپلمان در سطح ۰/۵ درصد و گلبول قرمز و هماتوکریت در سطح ۱ درصد بیشترین میزان را داشتند. بیشترین میزان هموگلوبین، پروتئین کل و کمترین میزان تری‌گلیسیرید و کلسترول در نسبت بالاتر فلفل سیاه به زردچوبه (٪۳۰ز + ٪۷۰ف) در سطح ۱ درصد مکمل گیاهی گزارش شد. بیشترین میزان گلوبولین و ایمنوگلوبولین کل در سطح ۰/۲۵ درصد جیره و نسبت ترکیبی «٪۷۰ز + ٪۳۰ف» مشاهده شد. بهبود این فراسنجه‌ها می‌تواند ناشی از تاثیر مثبت ترکیب زردچوبه و فلفل سیاه بر ایمنی ماهی قزل آلای رنگین‌کمان باشد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود که از مکمل‌های گیاهی بالا عمدتا با نسبت بالاتر فلفل سیاه به زردچوبه (٪۳۰ز + ٪۷۰ف) به میزان ۱ درصد در جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده شود.

واژگان کلیدی: *قزل‌آلای رنگین‌کمان، زردچوبه، فلفل سیاه، ایمنی.*

۱- دکتری تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
۲- استاد گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
۳- استادیار گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
۴- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

* نویسنده مسئول: f.firouzbakhsh@sanru.ac.ir

مقدمه

امروزه تولیدات ماهیان در صنعت آبزی‌پروری به طور چشمگیری در حال افزایش است. ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) یکی از گونه‌های مهم اقتصادی است که در اکثر نقاط دنیا پرورش داده می‌شود. پرورش متراکم این ماهی با استرس‌های مختلف همراه خواهد بود که ماهی را در برابر بیماری‌های مختلف مستعد می‌کند (Bahram et al., 2005). یکی از روش‌های مقابله با بروز انواع بیماری‌ها و تاثیر استرس‌ها بر ماهی، استفاده از محرک‌های سیستم ایمنی است که نسبت به مواد شیمیایی ایمن‌تر و مطمئن‌تر هستند و تاثیر آنها در مقایسه با واکسیناسیون از دامنه وسیع‌تری برخوردار است. این مکمل‌های گیاهی علاوه بر بهبود شاخص‌های رشد، منجر به تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی، افزایش تحمل استرس های محیطی و مقاومت در برابر برخی بیماری-های عفونی آبزیان و در نهایت منجر به اقتصادی‌تر شدن تولید آبزیان پرورشی می‌شوند (Rao and Jacobson, 2006; Ganguly et al., 2010).

در بین گیاهان خوراکی زردچوبه از خانواده زنجبیل با نام علمی *Curcuma longa* و با نام انگلیسی Turmeric شناخته می‌شود. زردچوبه گیاهی علفی و پایا و دارای ریزومی متورم است که از ریزوم خشک شده آن در صنایع غذایی و دارویی استفاده می‌شود. پودر زردچوبه حاوی ۶/۳ درصد پروتئین، ۵/۱ درصد چربی، ۳/۵ درصد مواد معدنی، ۶۹/۴ درصد کربوهیدرات و ۱۳/۱ درصد رطوبت است (Chattopadhyay et al., 2004). ۳ تا ۵ درصد ماده موثره ریزوم گیاه زردچوبه یک رنگدانه زرد پلی‌فنولیک به نام کورکومین است که خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدسرطانی (Duvoix et al., 2005)، ضدمیکروبی و همچنین اثرات ضددیابتی (Saravanan and Pari, 2005) دارد. علاوه بر کورکومین، ترکیبات فنولی زردچوبه شامل اسید فرولیک و اسید پروتوکاتکویک است که بر خاصیت آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی آن می‌افزاید (Kumar et al., 2006). همچنین ترکیبات شیمیایی متعددی مانند روغن فرار، زینجیبرن، آلفا و بتا تورمرین و مواد دیگری از جمله آرابینوز، فروکتوز، گلوکز و نشاسته در ریزوم گیاه زردچوبه وجود دارد (Yang et al., 2009). رنگ زردچوبه مربوط به مواد رنگی مثل کورکومین، دس‌متوکسی کورکومین و بیس‌دس

متوکسی است (Ammon and Wahl, 1991). مطالعات مختلفی در مورد تاثیر زردچوبه بر گونه‌های مختلف ماهیان انجام شده است. Sahu و همکاران (۲۰۰۸) به بررسی افزودن زردچوبه در جیره غذایی ماهی روهو (*Labeo rohita rohu*) و تاثیر آن بر روی فعالیت آنزیمی و ایمنی ماهی روهو آلوده شده به *Aeromonas hydrophila* پرداختند و بیان داشتند که استفاده از زردچوبه به میزان ۱ گرم در کیلوگرم جیره بهترین عملکرد رشد را در ماهی روهو سبب شده است. Behera و همکاران (۲۰۱۱) اثرات ضدباکتریایی زردچوبه را در ماهی روهو آلوده شده با *Aeromonas hydrophila* نشان دادند. در مطالعه دیگر، افزودن ترکیب سیاه‌دانه (*Nigella sativa*) و زردچوبه سبب بهبود عملکرد رشد در ماهی انگشت قد باس دریایی آسیایی (*Lates calcarifer*) شد (Abdelwahab and El-Bahr, 2012). نشان دادند استفاده از ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم زردچوبه به مدت یک ماه سبب افزایش شاخص های ایمنی، بهبود فعالیت باکتریایی روده و افزایش مقاومت در برابر باکتری *Vibrio Harveyi* در میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) شد (Malar and Charles, 2013). بهترین عملکرد رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از ۵ گرم در کیلوگرم زردچوبه در ماهی قرمز (*Carassius auratus*) به دست آمد (Jiang et al., 2016).

فلفل سیاه با نام علمی *Pipper nigrum* از خانواده Piperaceae، از گونه‌های مهم فلفل که پودر آن حاوی ۲۵/۵ درصد پروتئین، ۵/۳ درصد چربی، ۱/۱۸ درصد مواد معدنی، ۳۷/۴ درصد کربوهیدرات و ۴/۷ درصد رطوبت است (Pradeep et al., 1993; Al-Jasass and Al-Jasser, 2012). میوه‌های این گیاه حاوی اسانس روغنی فرار و آلکالوئیدهایی به نام چاویسین، پی‌پرین (Piperin)، پی‌پریدین و اسیدهای چرب لینولیک، اولئیک و پالمیتیک است. پی‌پرین جزء فعال فلفل سیاه و مسبب مزه تند آن است. اثرات ضدالتهابی فلفل سیاه ناشی از خاصیت آنتی‌اکسیدان پی‌پرین است که می‌تواند از بافت ملتهب در برابر صدمات پراکسیداتیو محافظت کند (بابایی گرمخانی و همکاران، ۱۳۹۴). خواص ضدمیکروبی، آنتی موتاژن، از بین برنده رادیکال‌های آزاد، ضدتومور، ضدافسردگی، محافظت کننده کبد، محرک ایمنی، ضداسهال و ضداسپاسم برای فلفل سیاه گزارش شده است (بابایی گرمخانی و یوسف‌وند، ۱۳۹۴).

با وجود فواید گزارش شده از طریق مکانیسم‌های التهابی و آنتی‌اکسیدانی، یکی از مهمترین مشکلات مصرف زردچوبه به خودی خود، فراهمی زیستی (Bioavailability) ضعیف آن است و به سختی در خون جذب می شود (Anand et al., 2007) که به نظر می‌رسد ناشی از جذب ضعیف، متابولیسم سریع و حذف سریع آن است. پی‌پرین یک تقویت کننده فراهمی زیستی شناخته شده، به عنوان مولفه اصلی فعال فلفل سیاه است (Han, 2011) و با افزایش ۲۰۰۰ درصد در فراهمی زیستی قابل دسترس بودن کورکومین همراه است. در نتیجه، ترکیب پی‌پرین موجود در فلفل سیاه با کورکومین میزان جذب آن در بدن افزایش می-یابد (Hewlings and Kalman, 2017). بنابراین به نظر می‌رسد که مسئله دسترسی فراهمی زیستی ضعیف با افزودن عواملی مانند پی‌پرین که قابلیت دسترسی به فراهمی زیستی را افزایش می‌دهد، برطرف شود.

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات تغذیه با سطوح مختلف ترکیب پودر زردچوبه و فلفل سیاه بر شاخص‌های خونی و ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طراحی شد. با توجه به مطالب عنوان شده این پرسش‌ها مطرح می شود که آیا استفاده از پودر زردچوبه و فلفل سیاه می‌تواند جایگزین مناسبی در صنعت آبزی‌پروری برای بهبود عملکرد رشد باشد؟ آیا می‌توان با استفاده از این مواد گیاهی به بهبود سیستم ایمنی در ماهیان و بویژه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان امید داشت؟ بنابراین، یافتن پاسخ این سوالات از اصلی‌ترین اهداف این پژوهش است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی و شرایط آزمایشی

تعداد ۴۵۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن ۰/۷۰±۲۴/۹۵ گرم و طول بدن ۰/۲۵±۱۴/۳۲ سانتی‌متر از مرکز تکثیر و پرورش معتبر واقع در شهرستان ساری تهیه شد. ماهی‌ها پس از انتقال به سالن تکثیر و پرورش گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، در وان‌های فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری با حجم آب ۲۰۰ لیتر به مدت ۱۴ روز با شرایط محیطی سازگار شدند (۱۵ قطعه ماهی در هر وان).

تهیه جیره غذایی و تغذیه ماهی

ریزوم زردچوبه از عطاری بازار شهرستان ساری تهیه شد، سپس آسیاب و توسط الک مناسب یکنواخت شد. پودر به دست آمده تا زمان ساخت جیره در داخل پلاستیک‌های زیپ

دار در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. میوه فلفل سیاه نیز که به صورت خشک شده به دانه فلفل معروف است از عطاری بازار شهرستان ساری تهیه و آسیاب شد. سپس پودر به دست آمده الک و تا زمان ساخت جیره در داخل پلاستیک‌های زیپ‌دار در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای تهیه جیره‌های آزمایشی از غذای تجاری مخصوص قزل‌آلا (FFT1، فرادانه، ایران) استفاده شد. ابتدا پلیت‌ها آسیاب و سپس از ترکیب دو گیاه زردچوبه (ز) و فلفل سیاه (ف) در نسبت ترکیبی (ت) ۳۰، ۵۰ و ۷۰ درصد در سطوح (س) صفر، ۰/۲۵، ۰/۵و ۱ درصد به جیره پایه اضافه شد (جدول ۱). از ترکیب به دست آمده با افزودن آب خمیر تهیه و با چرخ گوشت به صورت پلیت تبدیل شد. جیره‌ها پس از خشک شدن تا زمان مصرف در بسته‌های مجزا در یخچال نگهداری شدند (Diab et al., 2014; Hewlings and Kalman, 2017). ماهیان سه بار در شبانه روز به مدت ۳۰ روز در ۱۰ تیمار (با سه تکرار) با جیره‌های تهیه شده طبق جدول ۱ غذادهی شدند.

جدول ۱: تیماربندی ماهیان مورد آزمایش

تیمار	سطوح گیاهی در جیره (درصد)	نسبت ترکیب دو گیاه زردچوبه و فلفل سیاه	نام اختصاری
۱	۰	۰	س:۰
۲	۰/۲۵	۷۰٪ زردچوبه + ۳۰٪ فلفل سیاه	س:۰/۲۵- ت:۷۰ز+۳۰ف
۳	۰/۲۵	۵۰٪ زردچوبه + ۵۰٪ فلفل سیاه	س:۰/۲۵- ت:۵۰ز+۵۰ف
۴	۰/۲۵	۳۰٪ زردچوبه + ۷۰٪ فلفل سیاه	س:۰/۲۵- ت:۳۰ز+۷۰ف
۵	۰/۵	۷۰٪ زردچوبه + ۳۰٪ فلفل سیاه	س: ۰/۵- ت:۷۰ز+۳۰ف
۶	۰/۵	۵۰٪ زردچوبه + ۵۰٪ فلفل سیاه	س: ۰/۵- ت:۵۰ز+۵۰ف
۷	۰/۵	۳۰٪ زردچوبه + ۷۰٪ فلفل سیاه	س: ۰/۵- ت:۳۰ز+۷۰ف
۸	۱	۷۰٪ زردچوبه + ۳۰٪ فلفل سیاه	س: ۱- ت:۷۰ز+۳۰ف
۹	۱	۵۰٪ زردچوبه + ۵۰٪ فلفل سیاه	س: ۱- ت:۵۰ز+۵۰ف
۱۰	۱	۳۰٪ زردچوبه + ۷۰٪ فلفل سیاه	س:۱- ت:۳۰ز+۷۰ف

س: سطح گیاه در جیره؛ ت: ترکیب؛ ز: زردچوبه؛ ف: فلفل سیاه.

بررسی شاخص‌های کیفی آب

در طول دوره پرورش، شاخص‌های کیفی آب شامل دما (۱۳/۸۰±۰/۷۸ درجه سانتی‌گراد) توسط دماسنج، pH (۷/۳۰±۰/۲) با استفاده از pHمتر (Cd500، Wpa، انگلستان) سختی آب (۶۰۰/۵۲±۲۲/۲۶ میلی‌گرم در لیتر) با استفاده از شوری سنج (Senciun-Hach، آمریکا) و میزان اکسیژن محلول (۷/۱۴±۰/۱۳ میلی‌گرم در لیتر) توسط اکسیژن‌متر (AL15، Aqualytic، آلمان) به صورت روزانه اندازه‌گیری و ثبت شدند.

اندازه‌گیری شاخص‌های خونی

برای ارزیابی شاخص‌های خونی، ایمنی و بیوشیمیایی سرم، از هر تکرار سه قطعه ماهی در انتهای دوره پرورش به طور تصادفی انتخاب و خون‌گیری انجام گرفت. به این ترتیب که ابتدا به مدت ۲۴ ساعت غذادهی ماهیان قطع شد. سپس عملیات خون‌گیری پس از بیهوش کردن ماهیان با استفاده از پودر گل میخک به میزان ۳۵۰ میلی‌گرم در لیتر (Bohlouli et al., 2012) از طریق سیاهرگ ساقه دمی صورت گرفت.

شمارش کلی گلبول‌های سفید (WBC) و قرمز (RBC) با استفاده از لام هموسیتومتر نئوبار و محلول رقیق کننده نات- هریک (Nath-Herrick) انجام شد (Stoskopf, 1993). هموگلوبین (Hb) به روش سیان‌مت هموگلوبین و هماتوکریت (PCV) به روش میکروهماتوکریت اندازه‌گیری شد. سپس شاخص‌های گلبولی شامل MCV (حجم متوسط گلبول قرمز)، MCH (مقدار متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز) و MCHC (غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز) با استفاده از رابطه‌های ۱ تا ۳ محاسبه شد (Campbell and Ellis, 2007).

رابطه ۱:

$$\mathbf{MCV\ (fL) = [PCV / RBC\ (per\ million)] \times 10}$$

رابطه ۲:

$$\mathbf{MCH\ (pg) = [Hb / RBC\ (per\ million)] \times 10}$$

رابطه ۳:

$$\mathbf{MCHC\ (g/dL) = (Hb / PCV) \times 100}$$

شمارش افتراقی گلبول‌های سفید پس از تهیه گسترش خون و رنگ‌آمیزی با گیمسا با شمارش یکصد گلبول سفید و تعیین درصد هر یک از انواع گلبول‌های سفید تعیین شد (Khadjeh et al., 2010).

اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی سرم

برای تهیه سرم، نمونه‌های خون در لوله‌های فاقد ماده ضدانعقاد خون ریخته شدند. پس از تشکیل لخته، سرم خون با استفاده از سانتریفیوژ (به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰rpm) جداسازی و با استفاده از سمپلر از لخته جدا شد و در میکروتیوب‌های جداگانه ریخته شد. نمونه‌های سرم تا زمان انجام آزمایش‌های سرمی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

شاخص‌های ایمنی سرم شامل فعالیت لیزوزیم با روش Ellis (۲۰۰۱)، اندازه‌گیری ایمونوگلبولین کل با روش Siwicki و Anderson (۱۹۹۳) و فعالیت کمپلمان (ACH50) با روش Yano (۱۹۹۲) و Amar و همکاران (۲۰۰۰) بررسی شد.

پروتئین کل به روش بیورت با استفاده از کیت تشخیصی (پارس آزمون، ایران) و دستگاه الایزا ریدر (ELx800، BioTec، آمریکا) اندازه‌گیری شد. مقدار آلبومین پلاسما با کیت تشخیصی (پارس آزمون، ایران) و بر اساس شیوه رنگ‌سنجی در طول موج ۶۲۰ نانومتر تعیین شد. محتوای گلوبین کل با تفریق آلبومین از پروتئین کل به دست آمد (Kumar et al., 2006). آنزیم‌های کبدی سرم شامل اسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) و همچنین تری‌گلیسیرید و کلسترول با کمک کیت‌های تشخیصی (پارس آزمون، ایران) مورد بررسی قرار گرفتند.

اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی بدن ماهی

بررسی ترکیبات شیمیایی لاشه در پایان دوره انجام شد. میزان پروتئین با روش کجلدال، چربی با روش سوکسله، رطوبت با قرار دادن نمونه‌ها در آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد، ماده خشک با قرار دادن نمونه‌ها در آون در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و خاکستر با حرارت دادن نمونه‌ها در کوره با دمای ۵۵۰ درجه سانتی گراد) تعیین شد (AOAC, 1997).

تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش در قالب طرح کاملا تصادفی و آزمایش فاکتوریل با در نظر گرفتن دو عامل شامل سطوح افزودن مکمل گیاهی (س) به جیره (۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد جیره) و نسبت ترکیب (ت) دو گیاه (۳۰ درصد زردچوبه و ۷۰ درصد فلفل‌سیاه، ۵۰ درصد زردچوبه و ۵۰ درصد فلفل‌سیاه ، ۷۰ درصد زردچوبه و ۳۰ درصد فلفل‌سیاه) برنامه‌ریزی و اجرا شد. ضمنا

یک تیمار شاهد منفی به منظور بررسی میزان اثرگذاری هر یک از تیمارهای حاوی مکمل گیاهی نسبت به شرایط صفر (بدون مکمل گیاهی) در نظر گرفته شد. برای بررسی توزیع نرمال داده‌های به دست آمده از بررسی شاخص های رشد، خون‌شناسی و ایمنی سرم از آزمون شاپیرو- ویلک استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده از آزمایش فاکتوریل با روش تحلیل واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA) در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد. سپس مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت. برای آن دسته از داده‌هایی که نرمال نبودند از آزمون کروسکال- والیس برای مقایسه گروه‌های مختلف استفاده شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شد. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار R انجام شد.

نتایج

فراسنجه‌های خونی

نتایج آزمون فاکتوریل برای فراسنجه‌های خونی معنی‌دار بودن اثر مستقل عامل درصد افزودن دو گیاه برای مقادیر گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، MCV، MCH، مونوسیت و همچنین معنی‌دار بودن اثر متقابل عامل اول (درصد افزودن دو گیاه) و عامل دوم (نسبت ترکیب دو گیاه) بر میزان هموگلوبین و MCHC در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با دو گیاه زردچوبه و فلفل سیاه را نشان داد (P<۰/۰۵؛ جدول‌های ۲ و ۳). با افزایش درصد مکمل گیاهی نسبت به تیمار شاهد در جیره غذایی ماهیان، تعداد گلبول‌های قرمز، درصد هماتوکریت، MCV و MCH افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵) به طوری که بیشترین مقادیر گلبول‌های قرمز، MCH و هماتوکریت در سطح ۱ درصد جیره و بالاترین مقدار MCV در سطوح ۰/۵ و ۱ درصد مشاهده شد. بر اساس نتایج به دست آمده، با افزایش درصد افزودن مکمل گیاهی به جیره قزل‌آلای رنگین‌کمان، میزان هموگلوبین در هر یک از سطوح نسبت ترکیبی دو گیاه به طور معنی‌داری بالاتر رفت (P<۰/۰۵)، اما میان سطوح مختلف نسبت ترکیبی در سطوح صفر و ۰/۵ درصد افزودن مکمل گیاهی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵) و تنها در سطح ۱ درصد، ماهیان تغذیه شده با نسبت «٪۳۰ز + ٪۷۰ف» میزان هموگلوبین بیشتری داشتند.

جدول ۲: اثرات متقابل فراسنجه‌های خونی در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سطوح مختلف ترکیب زردچوبه و فلفل سیاه در پایان روز سی‌ام غذادهی (میانگین ± انحراف معیار)

فراسنجه	نسبت ترکیب دو گیاه	سطوح افزودن مکمل گیاهی (درصد)			
		۰	۰/۲۵	۰/۵	۱
هموگلوبین ($g.dL^{-1}$)	(۳۰٪ز + ۷۰٪ف)	۸/۴۸±۰/۳۶ Aa	۸/۲۹±۰/۴۱ Aa	۱۰/۴۰±۰/۹۰ Ba	۱۴/۱۷±۱/۲۸ Cb
	(۵۰٪ز + ۵۰٪ف)	۸/۴۱±۰/۲۳ Aa	۸/۱۰±۰/۱۴ Aa	۱۰/۱۷±۱/۰۸ Ba	۱۳/۰۲±۰/۴۳ Cab
	(۷۰٪ز + ۳۰٪ف)	۸/۵۰±۰/۲۶ Aa	۱۰/۱۶±۰/۷۸ Bb	۱۰/۶۲±۰/۶۳ Ba	۱۲/۳۱±۰/۴۳ Ca
MCHC (٪)	(۳۰٪ز + ۷۰٪ف)	۲۶/۸۷±۱/۰۲ Aa	۲۵/۸۹±۲/۵۶ Aa	۲۹/۵۶±۳/۴۵ ABa	۳۳/۴۸±۲/۴۳ Ba
	(۵۰٪ ز + ۵۰٪ف)	۲۶/۸۰±۰/۹۴ Aa	۲۴/۶۸±۱/۹۵ Aa	۲۸/۳۱±۳/۴۵ ABa	۳۱/۵۶±۰/۷۹ Ba
	(۷۰٪ز + ۳۰٪ف)	۲۶/۹۰±۰/۸۷ Aa	۳۱/۱۷±۳/۱۸ Bb	۲۸/۳۱±۱/۰۷ ABa	۳۰/۴۲±۰/۲۶ Ba
گلبول سفید ($\times 10^3/\mu L$)	(۳۰٪ز + ۷۰٪ف)	۱۱/۴۸±۱/۰۶ Aa	۱۲/۰۱±۰/۷۵ Aa	۱۴/۵۸±۰/۸۶ Aa	۱۸/۹۵±۰/۲۶ Aa
	(۵۰٪ز + ۵۰٪ف)	۱۱/۴۸±۱/۰۶ Aa	۱۱/۹۵±۱/۰۱ Aa	۱۴/۳۶±۱/۳۵ Aa	۱۸/۷۶±۱/۰۳ Aa
	(۷۰٪ز + ۳۰٪ف)	۱۱/۴۸±۱/۰۶ Aa	۱۱/۹۸ ±۰/۵۱ Aa	۱۳/۷۹±۰/۸۶ Aa	۱۷/۶۹±۰/۶۴ Aa
نوتروفیل (٪)	(۳۰٪ز + ۷۰٪ف)	۱۳/۳۳±۱/۵۳ Aa	۱۳/۳۳±۱/۵۳ Aa	۱۵/۰۰±۱/۰۰ ABa	۱۶/۰۰±۱/۰۰ Ba
	(۵۰٪ز + ۵۰٪ف)	۱۳/۲۶±۱/۴۵ Aa	۱۳/۳۳±۱/۵۳ Aa	۱۴/۶۷±۱/۵۳ Aa	۱۴/۶۷±۱/۵۳ Aa
	(۷۰٪ز + ۳۰٪ف)	۱۳/۴۰±۱/۲۰ Aa	۱۷/۳۳±۱/۵۳ Cb	۱۶/۳۳±۱/۵۳ BCa	۱۳/۶۷±۱/۵۳ ABa
لنفوسیت (٪)	(۳۰٪ز + ۷۰٪ف)	۸۳/۰۰±۱/۰۰ Ba	۸۲/۳۳±۱/۵۳ Bb	۷۹/۳۳±۱/۵۳ Aa	۷۹/۰۰±۱/۰۰ Aa
	(۵۰٪ز + ۵۰٪ف)	۸۳/۱۳±۰/۸۶ Ba	۸۲/۶۷±۲/۵۲ Bb	۷۹/۰۰±۱/۰۰ Aa	۸۰/۳۳±۱/۵۳ ABa
	(۷۰٪ز + ۳۰٪ف)	۸۳/۲۰±۰/۹۴ Ba	۷۶/۶۷±۱/۵۳ Aa	۷۷/۳۳±۱/۵۳ Aa	۸۱/۳۳±۱/۵۳ Ba
ائوزینوفیل (٪)	(۳۰٪ز + ۷۰٪ف)	۰/۰۰±۱/۰۰ Aa	۰/۶۷±۱/۵۳ Aa	۰/۰۰±۱/۰۰ Aa	۰/۶۷±۱/۵۳ Aa
	(۵۰٪ز + ۵۰٪ف)	۰/۰۰±۱/۰۰ Aa	۰/۶۷±۱/۵۳ Aa	۱/۳۳±۱/۵۳ Aa	۰/۶۷±۱/۵۳ Aa
	(۷۰٪ز + ۳۰٪ف)	۰/۰۰±۱/۰۰ Aa	۰/۶۷±۱/۵۳ Aa	۰/۰۰±۱/۰۰ Aa	۰/۶۷±۱/۵۳ Aa

حروف بزرگ متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین سطوح افزودن مکمل گیاهی در هر سطح از نسبت ترکیب مکمل گیاهی و حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین سطوح نسبت ترکیب مکمل گیاهی در هر سطح از افزودن مکمل گیاهی است ($P<0/05$).

ز: زردچوبه؛ ف: فلفل سیاه.

جدول ۳: مقایسه فراسنجه‌های خونی در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سطوح مختلف ترکیب زردچوبه و فلفل سیاه در پایان روز سی‌ام غذادهی (میانگین ± انحراف معیار)

فراسنجه	سطوح افزودن مکمل گیاهی (درصد)			
	۰	۰/۲۵	۰/۵	۱
گلبول قرمز (×۱۰^۶/μL)	۰/۹۲±۰/۰۳ a	۰/۹۵±۰/۰۳ a	۰/۹۹±۰/۰۴ b	۱/۰۸±۰/۰۳ c
هماتوکریت (٪)	۳۱/۵۵±۰/۳۴ a	۳۲/۵۷±۱/۵۳ a	۳۶/۲۶±۱/۵۳ b	۴۱/۳۳±۱/۲۱ c
MCV (fL)	۳۴۳/۲۹±۱۳/۰۵ a	۳۴۳/۲۳±۲۰/۱۷ a	۳۶۸/۵۰±۲۳/۷۹ b	۳۸۳/۲۹±۱۲/۹۶ b
MCH (pg)	۹۲/۳۱±۵/۶۶ a	۹۳/۰۰ ±۹/۲۱ a	۱۰۵/۷۷±۱۰/۵۸ b	۱۲۲/۰۱±۸/۸۸ c
مونوسیت (٪)	۳/۳۳±۱/۳۲ a	۴/۰۰±۱/۶۶ a	۵/۵۶±۱/۳۳ b	۴/۳۳±۱/۳۲ ab

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین سطوح افزودن مکمل گیاهی در هر فراسنجه است (P<۰/۰۵).

نتایج به دست آمده از مقایسه تغییرات MCHC میان سطوح ترکیبی دو گیاه، افزایش معنی‌دار MCHC را در هر سه سطح ترکیبی با افزایش درصد افزودن مکمل گیاهی به جیره غذایی ماهی نشان داد (P<۰/۰۵). اما بین سطوح مختلف نسبت ترکیبی در هر یک از سطوح افزودن مکمل گیاهی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و تنها در سطح ۰/۲۵ درصد اختلاف معنی‌دار داشت. ماهیان تغذیه شده با نسبت «٪۳۰ز + ٪۷۰ف» با سطح افزودن ۱ درصد در مقایسه با دو ترکیب دیگر بیشترین میزان MCHC را داشتند.

اثرات متقابل دو عامل و اثرات مستقل هر یک از آنها بر تغییرات تعداد گلبول‌های سفید و درصد ائوزینوفیل معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

بر اساس نتایج با افزایش درصد افزودن مکمل گیاهی به جیره، روند تغییرات نوتروفیل در سه سطح از نسبت ترکیبی دو گیاه متفاوت بود، به طوری که در سطح ترکیبی «٪۳۰ز + ٪۷۰ف» با افزایش درصد افزودن مکمل گیاهی میزان نوتروفیل بالاتر رفت و بیشترین مقدار نوتروفیل در سطوح افزودن ۰/۵ و ۱ درصد مشاهده شد. در سطح ترکیبی یکسان (٪۵۰ز + ٪۵۰ف) اختلاف معنی‌داری میان سطوح افزودن مکمل گیاهی مشاهده نشد (P>۰/۰۵) و در سطح ترکیبی با زردچوبه بیشتر (٪۷۰ز + ٪۳۰ف) بالاترین میزان نوتروفیل در سطح ۰/۲۵ درصد جیره گزارش شد که با سطح ۰/۵ درصد اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵)، ولی با سطوح دیگر صفر و ۱ درصد تفاوت معنی‌داری

را نشان داد (P<۰/۰۵). همچنین میان سطوح مختلف نسبت ترکیبی در هر یک از سطوح افزودن مکمل گیاهی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد و تنها در ماهیان تغذیه شده با سطح ۰/۲۵ درصد، با زردچوبه بیشتر نسبت به فلفل سیاه (٪۷۰ز + ٪۳۰ف) بیشترین میزان نوتروفیل را داشتند.

بر اساس نتایج به دست آمده با افزایش درصد افزودن مکمل گیاهی به جیره غذایی ماهی، میزان لنفوسیت در سطوح نسبت ترکیبی از دو گیاه یعنی «٪۳۰ز + ٪۷۰ف» و «٪۵۰ز + ٪۵۰ف» به طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵). ولی در سطح ترکیبی «٪۷۰ز + ٪۳۰ف» با افزایش درصد افزودن مکمل گیاهی تا ۰/۵ درصد میزان لنفوسیت کاهش یافت و پس از آن دوباره در سطح ۱ درصد به طور معنی‌داری افزایش داشت (P<۰/۰۵). همچنین میان سطوح مختلف نسبت ترکیبی در هر یک از سطوح افزودن مکمل گیاهی، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و تنها در سطح ۰/۲۵ درصد، ماهیان تغذیه شده با درصد بالاتر فلفل سیاه نسبت به زردچوبه (٪۳۰ز + ٪۷۰ف) و یا نسبت برابر میان این دو مکمل (٪۵۰ز + ٪۵۰ف) میزان لنفوسیت بیشتری داشتند.

تیمارهای تغذیه شده با ۰/۵ درصد جیره بالاترین مقادیر مونوسیت را نسبت به سطوح دیگر افزودن مکمل گیاهی نشان دادند و پایین ترین مقادیر مونوسیت در تیمارهایی با سطح صفر و ۰/۲۵ درصد جیره گزارش شد.

فراسنجه‌های بیوشیمیایی و ایمنی سرم

نتایج آزمون فاکتوریل فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم، معنی‌دار بودن اثر متقابل دو عامل را در میزان پروتئین کل، آلبومین، تری گلیسیرید، کلسترول و آنزیم کبدی ALP نشان داد (P<۰/۰۵؛ جدول ۴). نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری میزان پروتئین کل در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های غذایی مختلف نشان داد که با افزایش درصد افزودن مکمل گیاهی، میزان پروتئین کل به طور معنی‌داری افزایش داشت (P<۰/۰۵) و در نسبت‌های ترکیبی بالاتر زردچوبه (٪۷۰ز + ٪۳۰ف) و نسبت برابر میان دو مکمل گیاهی در سطوح ۰/۵ و ۱ درصد و در نسبت ترکیبی بالاتر فلفل سیاه در سطوح ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد از مکمل گیاهی بالاترین مقادیر پروتئین کل مشاهده شد که با سطح صفر درصد اختلاف آماری معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵). همچنین میان سطوح مختلف نسبت ترکیبی در هر یک از سطوح افزودن مکمل گیاهی اختلاف

معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵) و تنها در سطح ۱ درصد، ماهیان تغذیه شده با نسبت بالاتر فلفل سیاه (٪۳۰ز + ٪۷۰ف) و یا نسبت برابر با زردچوبه بیشترین میزان پروتئین کل را داشت.

جدول ۴: اثرات متقابل فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم درماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سطوح مختلف ترکیب زردچوبه و فلفل سیاه در پایان روز سی‌ام غذادهی (میانگین ± انحراف معیار)

فراسنجه	نسبت ترکیب دو گیاه	سطوح افزودن مکمل گیاهی (درصد)			
		۰	۰/۲۵	۰/۵	۱
پروتئین کل (g.dL^{-1})	(۳۰٪ز + ۷۰٪ف)	۳/۲۲±۰/۰۹ Aa	۳/۲۵±۰/۱۲ Aa	۳/۵۵±۰/۰۸ ABa	۴/۰۶±۰/۵۲ Bb
	(۵۰٪ز + ۵۰٪ف)	۳/۲۵±۰/۱۲ Aa	۳/۲۴±۰/۰۷ Aa	۳/۵۲±۰/۰۵ Ba	۳/۶۰±۰/۰۳ Bab
	(۷۰٪ز + ۳۰٪ف)	۳/۱۹±۰/۰۵ Aa	۳/۳۷±۰/۱۳ ABa	۳/۵۵±۰/۰۸ Ba	۳/۴۱±۰/۱۲ ABa
آلبومین (g.dL^{-1})	(۳۰٪ز + ۷۰٪ف)	۱/۳۴±۰/۰۴ Aa	۱/۳۶±۰/۰۳ Aa	۱/۴۸±۰/۰۵ Ba	۱/۶۶±۰/۱۰ Cb
	(۵۰٪ز + ۵۰٪ف)	۱/۳۴±۰/۰۴ Aa	۱/۳۷±۰/۰۴ Aa	۱/۵۰±۰/۰۴ Ba	۱/۴۸±۰/۰۷ Ba
	(۷۰٪ز + ۳۰٪ف)	۱/۳۴±۰/۰۴ Aa	۱/۴۲±۰/۰۳ ABa	۱/۵۰±۰/۰۱ Ba	۱/۳۸±۰/۰۸ Aa
تری گلیسیرید (mg.dL^{-1})	(۳۰٪ز + ۷۰٪ف)	۱۸۸/۰۰±۸/۸۹ Aa	۲۰۷/۳۳±۸/۵۰ Ba	۲۰۳/۰۰±۴/۵۸ Ba	۱۹۹/۰۰±۳/۶۱ ABa
	(۵۰٪ز + ۵۰٪ف)	۱۸۷/۸۵±۵/۳۹ Aa	۲۳۲/۳۳±۴/۰۴ Cb	۲۰۹/۳۳±۷/۶۴ Ba	۲۵۰/۰۰±۱۷/۰۶ Cb
	(۷۰٪ز + ۳۰٪ف)	۱۸۸/۲۳±۷/۶۶ Aa	۲۲۱/۰۰±۷/۲۱ Bab	۲۳۱/۶۷±۵/۶۹ BCb	۲۳۵/۶۷±۷/۰۲ Cb
کلسترول (mg.dL^{-1})	(۳۰٪ز + ۷۰٪ف)	۲۴۶/۶۷±۳۰/۱۴ Aa	۲۸۴/۶۷±۱۱/۰۲ Ba	۳۴۶/۳۳±۲۰/۱۱ Ca	۲۶۲/۶۷±۴/۰۴ ABa
	(۵۰٪ز + ۵۰٪ف)	۲۴۶/۵۴±۲۵/۱۰ Aa	۲۹۷/۶۷±۱۳/۳۲ Bab	۳۲۱/۶۷±۵/۸۶ Ba	۳۱۲/۳۳±۱/۵۳ Bc
	(۷۰٪ز + ۳۰٪ف)	۲۴۶/۶۰±۲۷/۸۰ Aa	۳۱۵/۳۳±۲/۵۲ Cb	۳۲۶/۶۷±۳/۰۶ Ca	۲۷۹/۳۳±۲/۰۸ Bb
ALP (U.L^{-1})	(۳۰٪ز + ۷۰٪ف)	۶۲۱/۶۷±۱۷/۳۹ Ba	۶۳۶/۳۳±۱۱/۰۲ Ba	۶۹۱/۳۳±۹/۵۰ Ca	۵۹۳/۰۰±۱۱/۳۶ Aa
	(۵۰٪ز + ۵۰٪ف)	۶۲۱/۵۶±۱۴/۹۴ Aa	۶۹۷/۳۳±۷۰/۶۱ Aa	۵۹۷/۳۳±۱۵/۶۳ Aa	۵۹۴/۳۳±۷۴/۲۲ Aa
	(۷۰٪ز + ۳۰٪ف)	۶۲۱/۷۱±۱۶/۰۸ Aa	۶۹۰/۶۷±۴۷/۶۰ Ba	۶۵۳/۳۳±۸/۵۰ ABa	۶۲۵/۶۷±۱۱/۰۲ Aa
ALT (U.L^{-1})	(۳۰٪ز + ۷۰٪ف)	۵/۳۲±۱/۴۳ Aa	۵/۰۰±۱/۰۰ Aa	۵/۳۳±۱/۵۳ Aa	۵/۰۰±۱/۰۰ Aa
	(۵۰٪ز + ۵۰٪ف)	۵/۲۸±۱/۶۲ Aa	۵/۳۳±۱/۵۳ Aa	۴/۳۳±۱/۵۳ Aa	۶/۰۰±۱/۰۰ Aa
	(۷۰٪ز + ۳۰٪ف)	۵/۴۱±۱/۰۲ Aa	۷/۳۳±۱/۵۳ Aa	۵/۳۳±۱/۵۳ Aa	۴/۳۳±۱/۵۳ Aa

حروف بزرگ متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین سطوح افزودن مکمل گیاهی در هر سطح از نسبت ترکیب دو گیاه و حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین سطوح نسبت ترکیب دو گیاه در هر سطح افزودن مکمل گیاهی است (P<۰/۰۵).

ز: زردچوبه؛ ف: فلفل سیاه.

با افزایش درصد افزودن مکمل گیاهی به جیره، میزان آلبومین در نسبت‌های ترکیبی دو گیاه (٪۳۰ز + ٪۷۰ف و ٪۵۰ز + ٪۵۰ف) تا سطح ۱ درصد جیره به طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵). در سطح ترکیبی «٪۷۰ز + ٪۳۰ف» با افزایش درصد افزودن مکمل گیاهی تا سطح ۰/۵ درصد جیره روند افزایشی و سپس در سطح ۱ درصد کاهش یافت. همچنین میان سطوح مختلف نسبت ترکیبی در هر یک از سطوح افزودن مکمل گیاهی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و تنها در سطح ۱ درصد، ماهیان تغذیه شده با نسبت بالاتر فلفل سیاه به زردچوبه (٪۳۰ز + ٪۷۰ف) بیشترین میزان آلبومین را داشتند.

با افزایش درصد افزودن مکمل گیاهی، روند تغییرات میزان گلوبولین افزایشی بود و بیشترین میزان گلوبولین در ماهیان تغذیه شده با سطح ۱ درصد از مکمل گیاهی دیده شد (جدول۵).

با افزایش درصد افزودن مکمل گیاهی به جیره، روند تغییرات میزان تری‌گلیسیرید در نسبت «٪۳۰ز + ٪۷۰ف» به طور معنی‌داری افزایشی بود، به طوری که در سطوح ۰/۲۵ ، ۰/۵ افزایش و در سطح ۱ درصد کاهش یافت. در نسبت برابر فلفل سیاه و زردچوبه روند تغییرات تری‌گلیسیرید به صورت سینوسی بود و ابتدا در سطح ۰/۲۵ درصد افزایش، سپس در سطح ۰/۵ درصد کاهش و پس از آن در سطح ۱ درصد به طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵).

جدول ۵: مقایسه فراسنجه‌های ایمنی سرم و آنزیم AST درماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سطوح مختلف ترکیب زردچوبه و فلفل سیاه در پایان روز سی‌ام غذادهی (میانگین ± انحراف معیار)

فراسنجه	سطوح افزودن مکمل گیاهی (درصد)			
	۰	۰/۲۵	۰/۵	۱
گلوبولین ($g.dL^{-1}$)	۱/۸۸±۰/۰۹ ^{a}	۱/۹۱±۰/۱۱ ^{ab}	۲/۰۵±۰/۰۸ ^{bc}	۲/۱۸±۰/۲۹ ^{c}
فعالیت لیزوزیم ($U.mL^{-1}.min^{-1}$)	۲۵/۰۰±۱/۷۳ ^{a}	۲۶/۴۴±۱/۹۴ ^{ab}	۲۹/۷۸±۲/۱۱ ^{c}	۲۸/۳۳±۳/۳۹ ^{bc}
کمپلمان (U%)	۱۳۱/۰۰±۰/۸۷ ^{a}	۱۳۱/۴۴±۱/۳۳ ^{a}	۱۳۲/۷۸±۱/۲۰ ^{b}	۱۳۲/۱۱±۱/۰۵ ^{ab}
ایمنوگلبولین کل ($mg.mL^{-1}$)	۱۸/۰۳±۰/۳۶ ^{a}	۱۹/۱۷±۰/۷۷ ^{b}	۱۹/۷۴±۰/۵۷ ^{bc}	۱۹/۹۶±۱/۰۶ ^{c}
AST ($U.L^{-1}$)	۱۵/۳۳±۲/۱۸ ^{ab}	۱۷/۶۷±۱/۵۰ ^{c}	۱۶/۶۷±۱/۳۲ ^{bc}	۱۴/۷۸±۱/۲۰ ^{a}

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین سطوح افزودن مکمل گیاهی در هر فراسنجه است (P<۰/۰۵).

در نسبت بالاتر زردچوبه به فلفل سیاه روند تغییرات تری‌گلیسیرید مشخصا افزایشی بود و کمترین میزان تری‌گلیسیرید ابتدا در سطح صفر و سپس در سطح ۱ درصد با نسبت بالاتر فلفل سیاه به زردچوبه بود. بیشترین میزان آن در سطح ۱ درصد با نسبت برابر فلفل سیاه به زردچوبه ثبت شد. همچنین اختلاف معنی‌داری میان سطوح مختلف نسبت ترکیبی در هر یک از سطوح ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد وجود داشت (P<۰/۰۵) و کمترین و بیشترین میزان آن در هر یک از سطوح یاد شده به ترتیب در نسبت بالاتر فلفل سیاه به زردچوبه (٪۳۰ز + ٪۷۰ف) و نسبت‌های برابر و یا بالاتر زردچوبه نسبت به فلفل سیاه (٪۷۰ز + ٪۳۰ف) گزارش شد.

میزان کلسترول در هر یک از سه سطح نسبت ترکیبی دو گیاه با افزایش درصد افزودن مکمل گیاهی به جیره قزل‌آلای رنگین‌کمان، اختلاف معنی‌داری داشت و روند تغییرات آن در نسبت برابر از ترکیب دو گیاه مشخصا به صورت افزایشی و در نسبت‌های بالاتر فلفل سیاه به زردچوبه (٪۳۰ز + ٪۷۰ف) و یا نسبت پایین‌تر فلفل سیاه به زردچوبه (٪۷۰ز + ٪۳۰ف) تا سطح ۰/۵ درصد افزایش داشت و سپس در سطح ۱ درصد به طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵). همچنین میان سطوح مختلف نسبت ترکیبی در هر یک از سطوح صفر و ۰/۵ درصد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵) و ماهیان تغذیه شده با نسبت بالاتر فلفل سیاه و یا برابر با زردچوبه در سطوح ۰/۲۵ و ۱ درصد، میزان کلسترول کمتری داشتند.

در نسبت بالاتر فلفل سیاه به زردچوبه (٪۳۰ز + ٪۷۰ف) روند تغییرات میزان ALP با افزودن درصد مکمل گیاهی تا سطح ۰/۵ درصد جیره افزایشی بود و در سطح ۱ درصد به طور معنی‌داری کاهشی شد (P<۰/۰۵) و در نسبت پایین‌تر فلفل سیاه به زردچوبه (٪۷۰ز + ٪۳۰ف) در سطح ۰/۲۵ درصد جیره افزایش و سپس در سطح ۱ درصد کاهش یافت. در نسبت برابر فلفل سیاه و زردچوبه اختلاف معنی‌داری در سطوح مختلف درصد مکمل گیاهی به استثنای سطح صفر درصد، وجود نداشت (P>۰/۰۵). همچنین میان سطوح مختلف نسبت ترکیبی در هر یک از سطوح افزودن مکمل گیاهی نیز اختلاف معنی‌داری از لحاظ میزان ALP وجود نداشت (P>۰/۰۵).

هیچ یک از اثرات متقابل دو عامل و اثرات مستقل هر یک از آنها بر تغییرات آنزیم کبدی ALT معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

نتایج آزمون فاکتوریل برای آنزیم کبدی AST معنی‌دار بودن اثر مستقل عامل اول

(درصد افزودن دو گیاه) را نشان داد (P<۰/۰۵؛ جدول ۵)، در حالی که اثر متقابل میان دو عامل و نیز اثر مستقل عامل دوم (نسبت ترکیب دو گیاه) معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). نتایج نشان داد میزان AST با افزایش درصد مکمل گیاهی با روند کاهشی همراه بود، به طوری که بالاترین میزان آن در سطح ۰/۲۵ درصد (۱۷/۶۷±۱/۵۰) بود و سپس با روند کاهشی در سطح ۱ درصد به کمترین میزان خود (۱۴/۷۸±۱/۲۰) رسید.

نتایج آزمون فاکتوریل برای فراسنجه‌های ایمنی سرم (فعالیت لیزوزیم، ایمنوگلوبولین‌کل و تست کمپلمان)، حاکی از معنی‌دار بودن اثر مستقل عامل اول (درصد افزودن دو گیاه) و عدم معنی‌داری اثر متقابل میان دو عامل و نیز اثر مستقل عامل دوم (نسبت ترکیب دو گیاه) بود. روند تغییرات فعالیت لیزوزیم، ایمنوگلوبولین‌کل و تست کمپلمان در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سطوح مختلف ترکیب زردچوبه و فلفل سیاه با افزودن درصد مکمل گیاهی به طور معنی‌داری افزایشی بود (P<۰/۰۵)، به طوری که بالاترین میزان آنها در سطوح ۰/۵ و ۱ درصد جیره گزارش شد.

ترکیب لاشه

نتایج به دست آمده از ارزیابی آزمایش فاکتوریل در ترکیب لاشه نشان داد که به استثنای پروتئین، اثر متقابل میان دو عامل و نیز اثرات مستقل هر یک از عامل‌ها بر روی ترکیبات دیگر لاشه شامل چربی، ماده خشک، رطوبت و خاکستر معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). در بررسی اثر متقابل دو عامل یعنی سطوح درصد افزودن دو گیاه با سطوح نسبت ترکیب دو گیاه، اختلاف معنی‌داری در میزان پروتئین لاشه مشاهده شد (P<۰/۰۵؛ جدول ۶). با افزایش درصد افزودن مکمل گیاهی به جیره قزل‌آلای رنگین‌کمان، میزان پروتئین در نسبت‌های ترکیبی «٪۷۰ز + ٪۳۰ف» و «٪۵۰ز + ٪۵۰ف» دو گیاه به طور معنی‌داری بالاتر رفت (P<۰/۰۵) و همچنین میان سطوح مختلف نسبت ترکیبی در هر یک از سطوح افزودن مکمل گیاهی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵) و تنها در سطح ۱ درصد، ماهیان تغذیه شده با نسبت بالاتر فلفل سیاه و یا برابر با زردچوبه میزان پروتئین بیشتری داشتند.

جدول ۶: ترکیب لاشه در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سطوح مختلف ترکیب زردچوبه و فلفل سیاه در پایان روز سی‌ام غذادهی (میانگین ± انحراف معیار)

فراسنجه	نسبت ترکیب دو گیاه	سطوح افزودن مکمل گیاهی (درصد)			
		۰	۰/۲۵	۰/۵	۱
پروتئین (گرم)	(۳۰٪ز + ۷۰٪ف)	۳۰/۵۱±۱/۱۷ Aa	۳۱/۹۱±۱/۸۴ Aa	۳۱/۶۲±۰/۸۶ Aa	۳۰/۸۶±۱/۴۹ Aa
	(۵۰٪ز + ۵۰٪ف)	۳۱/۱۵±۱/۰۸ Aa	۳۱/۱۵±۰/۹۱ Aa	۳۱/۰۳±۲/۱۱ Aa	۳۵/۱۲±۰/۵۶ Bb
	(۷۰٪ز + ۳۰٪ف)	۳۰/۴۲±۰/۷۴ Aa	۳۱/۰۳±۰/۹۶ Aa	۳۰/۸۶±۰/۹۰ Aa	۳۴/۰۷±۱/۵۳ Bb
چربی (گرم)	(۳۰٪ز + ۷۰٪ف)	۲۷/۵۱±۱/۴۸ Aa	۲۹/۰۳±۱/۵۳ Aa	۲۸/۳۰±۰/۵۰ Aa	۲۸/۶۷±۱/۱۰ Aa
	(۵۰٪ز + ۵۰٪ف)	۲۶/۸۲±۱/۰۵ Aa	۲۷/۹۷±۱/۹۳ Aa	۲۹/۴۰±۰/۷۷ Aa	۲۷/۷۰±۴/۱۰ Aa
	(۷۰٪ز + ۳۰٪ف)	۲۷/۳۰±۱/۵۳ Aa	۲۸/۶۷±۱/۱۰ Aa	۲۷/۷۹±۰/۷۱ Aa	۲۶/۲۷±۲/۷۹ Aa
خاکستر (گرم)	(۳۰٪ز + ۷۰٪ف)	۵/۵۹±۰/۵۶ Aa	۴/۲۶±۰/۱۵ Aa	۲/۹۹±۰/۰۱ Aa	۳/۲۷±۰/۰۷ Aa
	(۵۰٪ز + ۵۰٪ف)	۵/۷۰±۰/۳۲ Aa	۳/۹۲±۰/۰۱ Aa	۶/۴۷±۰/۵۶ Aa	۴/۹۳±۰/۵۶ Aa
	(۷۰٪ز + ۳۰٪ف)	۵/۴۳±۰/۷۳ Aa	۳/۰۰±۰/۰۱ Aa	۵/۸۸±۰/۱۹ Aa	۶/۱۱±۰/۸۶ Aa
ماده خشک (گرم)	(۳۰٪ز + ۷۰٪ف)	۲۴/۳۰±۲/۱۳ Aa	۲۳/۵۶±۱/۹۱ Aa	۲۴/۲۲±۰/۷۹ Aa	۲۳/۶۱±۰/۳۷ Aa
	(۵۰٪ز + ۵۰٪ف)	۲۴/۶۴±۱/۹۲ Aa	۲۴/۸۸±۰/۵۵ Aa	۲۴/۶۹±۱/۲۹ Aa	۲۴/۰۵±۰/۶۵ Aa
	(۷۰٪ز + ۳۰٪ف)	۲۴/۵۸±۱/۸۰ Aa	۲۴/۲۷±۰/۷۴ Aa	۲۴/۵۰±۱/۰۲ Aa	۲۳/۲۷±۱/۳۸ Aa
رطوبت (گرم)	(۳۰٪ز + ۷۰٪ف)	۷۵/۷۰±۲/۱۳ Aa	۷۶/۴۴±۱/۹۱ Aa	۷۵/۷۸±۰/۷۹ Aa	۷۶/۳۹±۰/۳۷ Aa
	(۵۰٪ز + ۵۰٪ف)	۷۵/۸۵±۱/۶۳ Aa	۷۵/۱۲±۰/۵۵ Aa	۷۵/۳۱±۱/۲۹ Aa	۷۵/۹۵±۰/۶۵ Aa
	(۷۰٪ز + ۳۰٪ف)	۷۵/۶۴±۱/۸۷ Aa	۷۵/۷۳±۰/۷۴ Aa	۷۵/۵۰±۱/۰۲ Aa	۷۶/۶۲±۲/۲۰ Aa

حروف بزرگ متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین سطوح افزودن مکمل گیاهی در هر سطح از نسبت ترکیب مکمل گیاهی و حروف کوچک متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین سطوح نسبت ترکیب مکمل گیاهی در هر یک از سطوح افزودن مکمل گیاهی است ($P<0/05$).

ز: زردچوبه؛ ف: فلفل سیاه.

بحث

فراسنجه‌های خون‌شناسی شامل تعداد گلبول قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت و شاخص‌های مشتق شده از آنها مانند MCV، MCH و MCHC به عنوان شاخصی از وضعیت گلبول‌های قرمز و توانایی آنها در حمل اکسیژن

در ماهی شناخته شده‌اند. گلبول‌های سفید خون همراه با فراسنجه‌های بیوشیمیایی مثل پروتئین‌های سرم، کمپلمان و لیزوزیم نقش مهمی در سیستم ایمنی ذاتی ماهی بویژه تحت شرایط استرس‌زا (مثل بیماری، عدم تعادل رژیم غذایی، تراکم زیاد و استرس‌های محیطی) بازی می‌کنند (Roberts, 1978). نتایج به دست آمده از این بررسی به تاثیر معنی‌دار ترکیب زردچوبه و فلفل سیاه بر فراسنجه‌های خون‌شناسی ماهیان قزل‌آلا بعد از ۳۰ روز تغذیه اشاره دارد. میزان هموگلوبین تابعی از تغییرات گلبول قرمز است و با آن رابطه مستقیم دارد. بررسی روند تغییرات میانگین هموگلوبین در تیمارها نشان دهنده غلظت بیشتر هموگلوبین در نسبت بالاتر فلفل سیاه به زردچوبه (٪۳۰ز + ٪۷۰ف) در سطح ۱ درصد جیره بود که نشان دهنده برتری وضعیت تنفسی در این نسبت بود. زیرا بالا رفتن میزان هموگلوبین باعث افزایش انتقال گازهای تنفسی می‌شود. بر اساس برخی مطالعات میزان هماتوکریت در ماهی تحت تاثیر استرس‌های فیزیکی افزایش می‌یابد (Barton et al., 1985). این افزایش ممکن است به علت جذب آب در گلبول‌های قرمز باشد. طبق نظر Franclin و همکاران در سال ۱۹۹۲، افزایش سطح هماتوکریت می‌تواند عکس العملی بر پاسخ به استرس و همچنین می‌تواند بیانگر افزایش ظرفیت انتقال اکسیژن در خون باشد که در مطالعه حاضر، اثر مستقل عامل اول در سطح درصد مکمل گیاهی جیره نشان داد که بالاترین میزان هماتوکریت در سطح ۱ درصد جیره بوده است که با مطالعات Gharghanipoor و همکاران (۲۰۱۴) مطابقت دارد. نتایج مطالعه حاضر در بهبود شاخص‌های گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در سطح ۱ درصد مکمل گیاهی جیره در ماهیان تغذیه شده با سطوح متفاوت ترکیبات مختلف زردچوبه و فلفل سیاه بر توانایی این گیاهان در تحریک تولید گلبول‌های قرمز تاکید دارد که به دنبال آن به افزایش توانایی حمل اکسیژن و قدرت دفاعی بدن در برابر استرس‌ها منجر می‌شود.

گلبول‌های سفید نقشی مهم در دفاع غیراختصاصی دارند و به عنوان شاخصی برای سلامتی شناخته شده‌اند (Fazlolahzadeh et al., 2011)، نتایج به دست آمده از اثر متقابل بین دو عامل در تغییرات میزان نوتروفیل و لنفوسیت نشان داد که به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار نوتروفیل و لنفوسیت در نسبت پایین‌تر فلفل سیاه به زردچوبه (٪۷۰ز + ٪۳۰ف) و در سطح ۰/۲۵ درصد مکمل گیاهی گزارش شد. افزایش تعداد نوتروفیل‌ها به دنبال

مصرف این محرک گیاهی، وابسته به بتاگلوکان هایی است که قادر به تشخیص گیرنده‌های ویژه ای بر روی گلبول‌های سفید خون هستند (Andrews et al., 2009). زمانی که این گیرنده‌ها توسط گلوکان‌ها اشغال شوند، فعالیت گلبول‌های سفید در احاطه کردن، کشتن و گوارش باکتری‌های بیماری‌زا بیشتر شده که همه این عوامل موجب بهبود سیستم دفاعی میزبان می‌شود (Andrews et al.,2009). به نظر می‌رسد این تغییرات، حاصل اثرات محرک ایمنی ترکیبات بیوشیمیایی سازنده زردچوبه و فلفل سیاه باشد. احتمالا این ترکیبات قادر هستند ایمنی غیراختصاصی بدن را با افزایش تعداد کل سلول‌های فاگوسیت کننده و تحریک عمل فاگوسیتوز ارتقا دهند (Choi and Chung, 2003).

افزایش سطح پروتئین‌های سرم به عنوان شاخص مناسبی برای بررسی وضعیت دفاع ایمنی ماهی مطرح است. پروتئین کل پلاسما شامل پروتئین‌های آلبومین و گلوبولین است. تصور می‌شود که افزایش میزان آلبومین و پروتئین سرم بیشتر در ارتباط با تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی میزبان باشد (Wiegertjes et al., 1996). اندازه‌گیری پروتئین کل آزمون مفیدی برای تشخیص بسیاری از نارسایی‌ها است (Bernet et al., 2001). افزایش در میزان پروتئین‌های سرمی می‌تواند ناشی از افزایش در تعداد گلبول‌های سفید باشد که منبع اصلی تولید پروتئین‌های سرمی هستند (Misra et al., 2006). آلبومین سرم فراوان‌ترین پروتئین در پلاسمای خون است و عملکرد آن به عنوان حامل انواع مواد مغذی، متابولیت‌ها و البته به عنوان حامل اصلی روی در پلاسما شناخته شده است (Peters, 1995). در مطالعه حاضر، بالاترین مقدار پروتئین کل و آلبومین در سطح ۱ درصد مکمل گیاهی و در نسبت بالاتر فلفل سیاه به زردچوبه و بیشترین گلوبولین در سطح ۱ درصد جیره گزارش شد. نتایج مطالعه حاضر هم‌راستا با نتایج به دست آمده از مطالعات Fawole و همکاران (۲۰۱۶) بود که افزایش معنی‌دار پروتئین‌های سرمی (پروتئین کل و آلبومین) را در بچه ماهیان کپور هندی (*Labeo rohito*) تغذیه شده با دو گیاه *Psidium guajava* و *Mangifera indica* گزارش کردند. گزارش‌هایی از افزایش پروتئین کل به دنبال استفاده از محرک‌های ایمنی وجود دارد (Nootash et al., 2013) که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد.

کلسترول جزء اصلی ساختمان غشای سلولی و پیش‌سازی برای هورمون‌های استروئیدی و اسیدهای صفراوی است که در سلول‌ها ساخته و از طریق مواد غذایی جذب بدن می‌شود. در مطالعه حاضر نتایج به دست آمده از مقایسه روند تغییرات میزان کلسترول و تری‌گلیسیرید نشان داد که کمترین میزان این فراسنجه‌ها در نسبت بالاتر فلفل سیاه به زردچوبه (٪۳۰ز + ٪۷۰ف) و در سطح ۱ درصد جیره بود. Fallah و Mirzaei (۲۰۱۶) بیان کردند کورکومین موجود در زردچوبه باعث کاهش تری‌گلیسرید پلاسما می‌شود و دلیل احتمالی آن را نقش کورکومین در افزایش کاتابولیسم لیپید و کاهش رسوبات چربی اعلام کردند. این تاثیرگذاری به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی کورکومین، کنترل سطوح بعضی هورمون‌ها و مهار فعالیت برخی از لیپازها است. Mahmoud (۲۰۱۷) نشان داد که ۲ درصد زردچوبه و فلفل پاپریکا در ماهی کپور معمولی در مدت سه هفته باعث کاهش معنی‌دار چربی در مقایسه با گروه شاهد شد. Fujiwara و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند کورکومین تولیدات گلوکز کبدی را کاهش می‌دهد. آنها بیان کردند کورکومین می تواند از گلوکونئوژنز و گلیکوژنولیز کبدی از طریق سرکوب فعالیت های گلوکز ۶- فسفاتاز و فسفوآنول پیروات کربوکسی‌کیناز جلوگیری کند. به نظر می‌رسد گیاه زردچوبه دارای اثر هیپوکلسترولمی باشد. به این ترتیب که باعث افزایش کلسترول دفعی در صفرا و افزایش چربی‌های مدفوع می‌شود. این بدین معنی است که کورکومین سبب می شود کلسترول بیش از حد رژیم غذایی دفع شود (Fujiwara et al., 2008). بنابراین، در مطالعه حاضر، کورکومین مورد استفاده در مقایسه با ماهیانی که در جیره غذایی آنها کورکومین وجود نداشت، سبب مهار تجمع کلسترول و تری گلیسرید اضافی و کاهش سطح آنها در دستگاه گوارش شد که نتایج مطالعات بالا با مطالعه حاضر مطابقت ندارد که دلیل آن می‌تواند ترکیبات مختلف زردچوبه با فلفل سیاه باشد که باعث عدم تاثیرگذاری زردچوبه در رسوب چربی ها شد.

آنزیم‌های کبدی از جمله آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) جزء آنزیم‌های مهم در بررسی وضعیت سلامتی ماهیان هستند. این آنزیم‌ها در انتقال گروه‌های آمینی از آلفا آمین به آلفاکتواسیدها در مراحل نهایی تجزیه پروتئین برای تولید ATP نقش ایفا می‌کنند و افزایش سطح فعالیت این آنزیم‌ها،

نقش موثری در استفاده از اسیدهای آمینه در فرایند اکسیداسیون یا گلوکوژنز بازی می‌کند (Murray et al., 2003). تغییر در میزان فعالیت و ترشح آنها می‌تواند متاثر از شاخص های فیزیکوشیمیایی آب، تراکم، شرایط پرورشی، نوع جیره مصرفی، سن، جنس و وضعیت سلامت ماهیان باشد (Racicot et al., 1975). در مطالعه حاضر بیشترین افزایش آنزیم های کبدی ALP و AST در نسبت برابر فلفل سیاه و زردچوبه و در سطح ۰/۲۵ درصد جیره غذایی ثبت شد که نشانه اثر فراهمی زیستی فلفل سیاه بر زردچوبه است. گزارش‌های مستند و کافی در مورد تاثیرات ترکیبات غذایی و بویژه گیاهان دارویی روی آنزیم‌های کبدی سرم خون در ماهیان پرورشی ارائه نشده است و مقادیر این آنزیم‌ها اغلب در محیط‌های طبیعی مورد بررسی و سنجش قرار گرفته است. به طور کلی اتفاق نظر پژوهشگران بر این است که شاخص‌های خونی و سرمی ماهیان در گونه‌های مختلف با هم تفاوت داشته، ارتباط و وابستگی زیادی با شرایط محیطی، تغذیه‌ای، سن و غیره دارد (Ross and Ross, 2008).

لیزوزیم یک آنزیم موکولیتیک با منشا لکوسیتی است که خاصیت دفاعی در برابر تهاجم میکروب‌ها دارد و از شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی است. لیزوزیم توسط گلبول‌های سفید منتشر می‌شود و در ترشحات موکوسی، آبشش‌ها، بافت‌های کلیه، طحال، دستگاه گوارش و سرم خون یافت می‌شود (سلیقه‌زاده و همکاران، ۱۳۹۴). نتایج به دست آمده از اندازه گیری اثر مستقل تغییرات فعالیت لیزوزیم در سطح افزودن درصد مکمل گیاهی نشان داد که بیشترین میزان آن در سطح ۰/۵ درصد جیره و در هر سه سطح از نسبت ترکیب دو گیاه بوده است. در راستای این نتایج می‌توان به مطالعه Malar و Charles (۲۰۱۳) اشاره کرد. در مطالعه آنها از جیره حاوی ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم زردچوبه در تغذیه میگوی ببری سیاه به مدت یک ماه استفاده شد و در نهایت نشان داده شد که افزایش در میزان فعالیت لیزوزیم گروه‌های تغذیه شده با زردچوبه نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود. همچنین Abdelrazek و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند افزودن ۲ گرم در کیلوگرم زردچوبه به صورت مکمل به جیره غذایی ماهی تیلاپیای نیل سبب تقویت سیستم ایمنی و بهبود شاخص‌های ایمنی از طریق تغییراتی در تعداد لنفوسیت‌ها و تقویت فعالیت ضدباکتریایی آنزیم‌هایی مثل لیزوزیم می‌شود.

سیستم کمپلمان از اصلی‌ترین اجزای پاسخ ایمنی هومورال است که در بروز خطر در سیستم

ایمنی نقش مهمی دارد. مهم‌ترین وظایف سیستم کمپلمان شامل از بین بردن میکروارگانیسم‌ها از طریق شرکت و همراهی در فرآیندهای فاگوسیتوز، واکنش‌های التهابی، پاکسازی کمپلکس‌های ایمنی، القا و بهبود پاسخ‌های آنتی‌بادی است (Mauri et al., 2011). در این مطالعه نتایج مربوط به اندازه گیری تغییرات اثر مستقل کمپلمان در سطح درصد افزودن مکمل گیاهی نشان داد که بیشترین میزان در سطح ۰/۵ درصد جیره و در هر سه سطح از نسبت فلفل سیاه و زردچوبه بوده است. لیزوزیم یک آنزیم کاتیونی است که توانایی تجزیه عمده باکتری‌های گرم مثبت را دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که سطح ۰/۵ درصد جیره با هر نسبت از ترکیب دو گیاه زردچوبه و فلفل سیاه باعث افزایش معنی‌دار در میزان فعالیت کمپلمان و لیزوزیم شد. فعالیت کمپلمان در ماهیان نقش مهمی در باکتری‌کشی سرم و موکوس ایفا می‌کند و به عنوان اپسونین با اتصال به بخش‌های اختصاصی عامل مهاجم در سطح بدن میزبان در بیگانه‌خواری دخیل است. در مطالعه‌ای که توسط مشکینی و همکاران (۱۳۹۳) بر روی تاثیر سطوح مختلف لوامیزول بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد، تفاوت معنی‌داری در فعالیت کمپلمان بین تیمارهای مختلف در یک دوره ۳۰ روزه مشاهده نشد. Tang و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی اثرات مخلوطی از پودر گیاهان چینی در ماهی تیلاپیای نیل پس از چهار هفته نشان دادند که همه تیمارهای تغذیه شده با مکمل گیاهی از لحاظ لیزوزیم سرم اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشتند. Talpur (۲۰۱۴) نیز افزایش معنی‌دار فعالیت لیزوزیمی خون را در ماهیان باس دریایی آسیایی تغذیه شده با عصاره نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) طی ۴ هفته غذادهی نشان داد. Musthafa و همکاران (۲۰۱۷) نیز تاثیر مصرف ۴ تا ۶ گرم پودر دانه کدو در هر کیلوگرم جیره به مدت ۳۰ روز را در افزایش فعالیت کمپلمان و لیزوزیم نشان دادند. افزایش سطح پروتئین کل و گلوبولین سرم شاخص مناسبی برای بررسی وضعیت دفاع ایمنی و سلامت ماهی است (Siwicki and Anderson, 1993). هر چند غلظت پادتن (آنتی‌بادی) ضد یک آنتی‌ژن خاص نشان دهنده ایمنی اختصاصی است، ولی میزان پروتئین کل و ایمونوگلوبولین کل در ماهیان نشان دهنده ایمنی غیراختصاصی است. در بسیاری از مطالعات از میزان IgM کل به عنوان شاخص ایمنی غیراختصاصی یاد شده است (Alishahi et al., 2011). نتایج به دست آمده از بررسی

ایمنوگلوبولین کل نشان داد که بیشترین میزان آن در سطح ۰/۲۵ درصد مکمل گیاهی بود. قدرت باکتری‌کشی سرم بیشتر تحت تاثیر مواد ضدمیکروبی سرم، لیزوزیم، کمپلمان و دیگر مواد موثر در تخریب دیواره سلولی باکتری‌ها است. افزایش شاخص‌های ایمنی موجب افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا، تحریکات محیطی و استرس‌ها می‌شود که این امر می‌تواند باعث افزایش فعالیت سوخت و ساز و نهایتا بهبود رشد، کاهش میزان مرگ و میر و افزایش میزان بازماندگی شود.

ترکیب شیمیایی بدن همواره تحت تاثیر ترکیب جیره غذایی و حتی درصد و مقدار غذادهی روزانه است. بیشترین میزان پروتئین در سطح ۱ درصد جیره و در نسبت برابر فلفل سیاه و زردچوبه گزارش شد. نتایج به دست آمده از بررسی چربی، خاکستر، ماده خشک و رطوبت لاشه نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها با شاهد وجود نداشت. ابراهیمی و همکاران (۱۳۹۱) با مطالعه اسانس سیر در ۶ سطح تفاوت معنی‌داری را در میزان پروتئین، چربی و خاکستر در بین تیمارها نسبت به شاهد نیافتند. نتایج به دست آمده در مطالعات مختلف با مشتقات گیاهی متفاوت می‌تواند ناشی از تفاوت در ترکیبات، درصد مواد موثره موجود در گیاهان مختلف، گونه ماهی و ترکیبات جیره پایه باشد. مطالعه حاضر نشان داد که پی‌پرین موجود در فلفل سیاه به عنوان یک تقویت کننده فراهمی زیستی باعث در دسترس قرار گرفتن کورکومین موجود در زردچوبه شد و میزان جذب کورکومین در ترکیب با پی‌پرین در بدن افزایش یافت.

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان داد که شاخص‌های خون‌شناسی، بیوشیمیایی و ایمنی سرم و ترکیب شیمیایی بدن ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تاثیر مکمل‌سازی جیره با گیاهان زردچوبه و فلفل سیاه قرار گرفت، به طوری که ماهیان تغذیه شده با پودر این گیاهان بعد از ۳۰ روز تغذیه اختلاف معنی‌داری را در شاخص‌های یاد شده نسبت به گروه شاهد نشان دادند. میزان فراسنجه‌های خونی، سرمی و ایمنی در تیمارها با توجه به اثر متقابل بین دو عامل و یا اثر مستقل آن‌ها متفاوت بود. بیشترین میزان فراسنجه‌های خونی و بیوشیمیایی سرم شامل هموگلوبین، MCHC، پروتئین کل و آلبومین و کمترین میزان شامل تری‌گلیسیرید و کلسترول در نسبت بالاتر فلفل سیاه به زردچوبه در سطح ۱ درصد مکمل گیاهی گزارش شد. بهبود این فراسنجه‌ها در سطوح ترکیبی دو گیاه و سطح افزودن درصد مکمل گیاهی می‌تواند

ناشی از تاثیر مثبت ترکیب زردچوبه و فلفل سیاه بویژه اثرگذاری بیشتر فلفل سیاه در ترکیب با زردچوبه بر ایمنی‌زایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان باشد. بنابراین می‌توان پیشنهاد کرد که از مکمل‌های گیاهی فوق در سطح ۱ درصد در جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده شود.

تشکر و قدردانی

از تمام عزیزانی که در انجام این پژوهش ما را همراهی و پشتیبانی نمودند تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

ابراهیمی ع.، تنگستانی ر.، علیزاده دوغیکلایی ا. و زارع پ. ۱۳۹۱. اثرسطوح مختلف اسانس سیر بر شاخص‌های رشد، تغذیه و ترکیب شیمیایی لاشه فیل‌ماهی (*Huso huso*) جوان پرورشی. مجله علوم و فنون دریایی، ۱۱(۱۲): ۱-۴.

بابایی گرمخانی س. و یوسف‌وند ن. ۱۳۹۴، اثر مصرف خوراکی پودر فلفل قرمز و فلفل سیاه بر مقادیر سرمی هورمون‌های محور هیپوفیز-گناد در موش نر. فصلنامه گیاهان دارویی، ۱۴(۵۶): ۴۵-۵۴.

بابایی گرمخانی س.، یوسف‌وند ن.، نسودی گ. و حاتمی ک. ۱۳۹۴. اثر مصرف خوراکی پودر فلفل قرمز (*Capsicum annuum*) و فلفل سیاه (*Piper nigrum*) بر مقادیر سرمی کلسترول خون در موش کوچک آزمایشگاهی. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۱۰(۳): ۲۰-۱۳.

سلیقه‌زاده ر.، یاوری و.، موسوی م. و ذاکری م. ۱۳۹۴. اثر مکمل غذایی جلبک اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) بر شاخص‌های ایمنی کمپلمان و لیزوزیم ماهی بنی انگشت‌قد (*Mesopotamichthys sharpeyi*). مجله بوم شناسی آبزیان، ۵(۱): ۵۰-۴۴.

مشکینی س.، ایمانی م.، احسانی ع.، توکمه‌چی ا.، فرهنگ‌پژوه ف. و قیاسی ی. ۱۳۹۳. تاثیر استفاده از عصاره سیر (*Allium sativa*) و سرخارگل (*Echinacea purpurea*) بر روی فاکتورهای خونی و مقاومت در برابر آلودگی باکتریایی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). نشریه محیط زیست جانوری، ۶(۲): ۵۲-۴۱.

Abdelrazek H.M.A., Tag H.M., Kilany O.E., Reddy P.G. and Hassan A.M. 2017. Immuomodulatory effect of dietary turmeric supplementation on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture Nutrition, 23(5): 1048–1054.

Abdelwahab A.M. and El-Bahr S.M. 2012. Influence of black cumin seeds (*Nigella sativa*) and turmeric (*Curcuma longa* Linn.) mixture on performance and serum biochemistry of Asian sea bass, *Lates calcarifer*. World Journal of Fish and Marine Sciences, 4(5): 496–503.

Alishahi M., Soltani M., Mesbah M. and Esmaeilli Rad A. 2011. Effects of dietary *Silybum marianum* extract on immune parameters of the common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Veterinary Research, 66(3): 255–263.

Al-Jasass F.M. and Al-Jasser M.S. 2012. Chemical compositon and fatty acid content of some spices and herbs under Saudi Arabia

conditions. Science World Journal, 2012: 1–5.

Ammon H.P. and Wahl M.A. 1991. Pharmacology of *Curcuma longa*. Planta Medica, 57: 1–7.

Anand P., Kunnumakkara A.B., Newman R.A. and Aggarwal B.B. 2007. Bioavailability of curcumin: Problems and promises. Molecular Pharmaceutics, 4: 807–818.

Andrews S.R., Sahu N.P., Pal A.K. and Kumar S. 2009. Hematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: Effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and *Chlorella*. Aquaculture Research, 41: 61–69.

AOAC. 1997. Official Methods of Analysis of AOAC International. Association of Official Analytical Chemists, USA. P: 1058–1059.

Bahram S., Vahabzadeh Roudsari H., Nazari R.M. and Javadian S.R. 2005. Effect of levamisole on survival rate of the Persion sturgeon (*Acipenser persicus*) fry. Journal of Marine Science and Technology, 4(1-2): 1–9.

Barton B.A., Weiner G.S. and Schreck C.B. 1985. Effect of prior acid exposure on physiological responses of juvenile rainbow trout (*Salmo gairdnen*) to acute handling stress. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 42: 710–717.

Behera T., Swain P., Sahoo S.K., Mohapatra D. and Das B.K. 2011. Immunostimulatory effects of curcumin in fish, *Labeo rohita* (H.). Indian Journal of Natural Products and Resources, 2: 184–188.

Bernet D., Schmidt H., Wahli T. and Burkhardt-Holm P. 2001. Effluent from a sewage treatment works causes changes in serum chemistry of brown trout (*Salmo trutta* L.). Ecotoxicology and Environmental Safety, 48(2): 140–147.

Bohlouli Oskoii S., Tahmasebi Kohyani A., Parseh A., Salati A.P. and Sadeghi E. 2012. Effects of dietary administration of *Echinacea purpurea* on growth indices and biochemical and hematological indices in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. Fish Physiology and Biochemistry, 38(4): 1029–1034.

Campbell T.W. and Ellis C.K. 2007. Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology. Blackwell Scientific Publications, USA. 286P.

Chattopadhyay I., Biswas K., Bandyopadhyay U. and Banerjee R.K. 2004. Turmeric and curcumin, Biological Actions and Medicinal Applications, 87: 44–53.

Choi S. and Chung M.H. 2003. A review on the relationship between *Aloe vera* components and their

biologic effects. Seminars in Integrative Medicine, (1): 53–62.

Diab A.M., Saker O.A., Eldakroury F. and Elseify M.M. 2014. Effects of garlic (*Allium sativum*) and curcuin (Turemric, *Curcuma longa* Linn) on Nile tilapia immunity. Veterinary Medical Jounal-Giza, 60: 1–19.

Duvoix A., Blasius R., Delhalle S., Schnekenburger M., Morceau F., Henry E. and Diederich M. 2005. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. Cancer Letters, 223: 181–190.

Ellis A.E. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. Developmental and Comparative Immunology, 25(8-9): 827–839.

Fallah R. and Mirzaei E. 2016. Effect of dietary inclusion of turmeric and thyme powders on performance, blood parameters and immune system of broiler chickens. Journal of Livestock Science, 7: 180–186.

Fawole F.J., Sahu N.P., Pal A.K. and Ravindran A. 2016. Haematoimmunological response of *Labeo rohito* (Hamilton) fingerlings fed leaf extracts and challenged by *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture Research, 47(12): 3788–3799.

Fazlolahzadeh F., Keramati K., Nazifi S., Shirian S. and 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.

Franclin C.E., Forster M.E. and Davision W. 1992. Plasma cortisol and osmoregulatory changes in sockeye salmon transferred to sea water: Comparision between successful and unsuccessful adaptation. Journal of Fish Biology, 41(1): 113–122.

Fujiwara H., Hosokawa M., Zhou X., Fujimoto S., Fukuda K., Toyoda K., Nishi Y., Fujita Y., Yamada K., Yamada Y. and Seino Y. 2008. Curcumin inhibits glucose production in isolated mice hepatocytes. Diabetes Research and Clinical Practice, 80: 185–191.

Ganguly S., Paul I. and Mukhopadhayay S.K. 2010. Application and effectiveness of immunostimulants, probiotics, and prebiotics in aquaculture: A review. The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 62(3): 130–138.

Gharghanipoor M., Akbary P., Akhlaghi M. and Fereidouni M.S. 2014. Non-specific immune responses and immune related genes expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) fed *Zataria multiflora* Boiss extract. Bulletin of Enviroment,

Pharmacology and Life Sciences, 3(5): 140–146.

Han H.K. 2011. The effects of black pepper on the intestinal absorption and hepatic metabolism of drugs. Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology, 7: 721–729.

Hewlings S.J. and Kalman D.S. 2017. Curcumin: A review of its'effects on human health. Foods, 6(10): 1–11 (92).

Jiang J., Wu X.Y., Zhou X.Q., Feng L., Liu Y., Jiang W.D. and Zhao Y. 2016. Effects of dietary curcumin supplementation on growth performance, intestinal digestive enzyme activities and antioxidant capacity of crucian carp *Carassius auratus*. Aquaculture, 463: 174–180.

Khadjeh G.H., Mesbah M., Nikmehr S. and Sabzevarizadeh M. 2010. Effect of sex on the haematological parameters of reared shirboatfish (*Barbus grypus*). Journal of Veterinary Research, 65(3): 217–224.

Kumar G.S., Nayaka H., Dharmesh S.M. and Salimath P.V. 2006. Free and bound phenolic antioxidants in amla (*Emblica officinalis*) and turmeric (*Curcuma longa*). Journal of Food Composition and Analysis, 19: 446–452.

Mahmoud A.M. 2017. Influence of different levels of turmeric (*Curcuma longa*) and red paprika (*Capsicum annum* L.) supplements on growth promoter and chemical composition of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Jordan Journal of Agricultural Science, 13(1): 55–64.

Malar H.V. and Charles P.M. 2013. Effect of turmeric *Curcuma longa* Linn. extract on immunity and resistance to *Vibrio harveyi* in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. International Journal of Research in Zoology, 3: 21–26.

Mauri I., Romero A., Acerete L., Mackenzie S., Roher N., Callol A., Cano I., Alvarez M.C. and Tort L. 2011. Changes in complement responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) under crowding stress, plus viral and bacterial challenges. Fish and Shellfish Immunology, 30: 182–188.

Misra C.K., Das B.K., Mukherjee S.C. and Meher P.K. 2006. The immunomodulatory effects of tuftsin on the non-specific immune system of Indian Major carp, *Labeo rohita*. Fish and Shellfish Immunology, 20: 728–738.

Murray R., Bender D., Botham K.M., Kennell P.J., Rodwell V. and Weil P.A. 2003. Harpers Illustrated Biochemistry. Mc Graw Hill Education, Canada. 818P.

Musthafa M.S., Jawahar Ali A.R., Arun Kumar M.S., Paray B.A., Al Sadoon M.K., Ba-Lasundaram C. and Harikrishnan R. 2017. Effect of *Cucurbita mixta* (L.) seed meal enrichment diet on growth, immune response and disease resistance in *Oreochromis mossambicus*. Fish and Shellfish Immunology, 68: 509–515.

Nootash S.H., Sheikhzadeh N., Baradaran B., Khani Oushani A., Maleki Moghadam M.R., Nofouzi K., Monfaredan A., Aghebati L., Zare F. and Shabanzadeh S. 2013. Green tea (*Camellia sinensis*) administration induces expression of immune relrvant genes and biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology, 35: 1916–1923.

Peters Jr. T. 1995. All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. Academic Press, USA. 432.

Pradeep K.U., Geervani P. and Eggum B.O. 1993. Common Indian spices: Nutrient composition, consumption and contribution to dietary value. Plant Foods for Human Nutrition, 44: 137–148.

Racicot J.G., Gaudet M. and leray C. 1975. Blood and liver enzymes in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) with emphasis on their diagnostic use: Study of CCl4 toxicity and a case of *Aeromonas* infection. Journal of Fish Biology, 7: 825–835.

Rao M.S. and Jacobson M. (Eds.). 2006. Developmental Neurobiology. Springer, Germany. 436P.

Roberts R.J. 1978. The pathophysiology and systematic pathology of teleost. P: 55–91. In: Robert R.J. (Ed.). Fish Pathology. Bailliere Tindal, UK.

Ross L.G. and Ross B. 2008. Anasthetic and Sedative Thchniques for Aquatic Animals. Blackwell, UK. 228P.

Sahu S., Das B.K., Mishra B.K., Pradhan J., Samal S.K. and Sarangi N. 2008. Effect of dietary *Curcuma longa* on enzymatic and immunological profiles of rohu, *Labeo rohita* (Ham.), infected with *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture Research. 39(16): 1720–1730.

Saravanan R. and Pari L. 2005. Antihyperlipidemic and anti-peroxidative effect of Diasulin, a polyherbal formulation in alloxan induced hyperglycemic rats. BMC Complementary and Alternative Medicine, 5: 1–8 (14).

Siwicki A.K. and Anderson D.P. 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish: Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and argans and total

immunoglobulin level in serum and Organs. P: 105–111. In: Siwicki A.K., Anderson D.P. and Waluga J. (Eds.). Fish Disease Diagnosis and Prevention Methods. FAO, Poland.

Stoskopf M.K. 1993. Fish Medicine. W.B. Sanders, USA. 902P.

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 harvayi* infection. Aquaculture, (420-421): 71–78.

Tang J., Cai J., Liu R., Wang J., Lu Y., Wu Z. and Jian J. 2014. Immunostimulatory effects of artificial feed supplemented with a Chinese herbal mixture on *Oreochromis niloticus* against *Aeromonas hyrphila*. Fish and Shellfish Immunology, 39(2): 401–406.

Wiegertjes G.F., Stet R.J.M., Parmentier H.K. and Van Muiswinkel W.B. 1996. Immuno-genetics of disease resistance in fish, acomparable approach. Development Comparative Immunology, 20: 365–371.

Yang C., Zhang X., Fan H. and Liu Y. 2009. Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia. Brain Research, 1282: 133–141.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 10, No. 3, Autumn 2022

Research Paper

The effect of short-term nutrition of turmeric (*Curcuma langa*) and black pepper (*Piper nigrum*) combination on blood parameters, immunity and liver enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Seyedeh Mitra Aghili[1], Farid Firouzbakhsh[2]*, Sara Haghparast[3], Ayoub Farhadi[4]

Received: October 2021 Accepted: January 2022

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of short-term feeding of turmeric (*Curcuma langa*) and black pepper (*Piper nigrum*) on blood and immune parameters and liver enzymes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during 30 days. A total of 450 fish with an average weight of 24.95±0.70g were selected and in ten experimental groups, fed with diet containing turmeric (C) and black pepper (P) in a combined ratio (R) of 30, 50 and 70% at levels (L) of 0 (control), 0.25, 0.5 and 1%. Parameters with independent effect including AST at the level of 0.25%, lysozyme and complement at the level of 0.5% and RBC and hematocrit at the level of 1% had the highest levels. The highest amount of hemoglobin, total protein and the lowest amount of triglyceride and cholesterol were reported in the higher ratio of black pepper to turmeric (30%C + 70%P) at the level of 1% of plant supplement. The highest amount of globulin and total immunoglobulin was observed at the level of 0.25% of the diet and the combined ratio of 70%C + 30%P. Improvement of these parameters can be due to the positive effect of turmeric and black pepper combination on the immunity of rainbow trout. Therefore, it can be suggested that the 1% herbal supplements be used in the diet of rainbow trout.

Key words: Oncorhynchus mykiss, *Turmeric, Black Pepper, Immunity*.

1- Ph.D. in Reproduction and Breeding of Aquatic Animals, Department of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
2- Professor in Department of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
3- Assistant Professor in Department of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
4- Associate Professor in Department of Animal Science, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

*Corresponding Author: f.firouzbakhsh@sanru.ac.ir