

## "مقاله پژوهشی"

## ارزیابی اثر اسانس اسطوخودوس (*Lavandula officinalis*) بر شاخص‌های بیوشیمی سرم خون و ایمنی موکوسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

فاطمه حسنعلی‌زاده چاری<sup>۱</sup>، رضا اکرمی<sup>\*</sup>، افشین قلیچی<sup>۱</sup>، پونه ابراهیمی<sup>۲</sup>

۱. گروه شیلات، واحد آزاد شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزاد شهر، ایران

۲. گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۱۰

### چکیده

به منظور تعیین اثر غلظت‌های مختلف اسانس اسطوخودوس در جیره غذایی بر شاخص‌های بیوشیمی سرم خون و ایمنی موکوسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی  $10 \pm 2$  گرم، آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با چهار تیمار در سه تکرار به اجرا درآمد. ماهیان به روش خوراکی با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌لیتر اسانس اسطوخودوس به ازای هر کیلوگرم غذا به مدت ۶۰ روز متوالی مورد تغذیه قرار گرفتند. تیمار شاهد نیز بدون افزودن اسانس به جیره غذایی در نظر گرفته شد. مطابق نتایج، میزان هر دو آنزیم آسپارات‌آمینوترانسفراز و آلانین‌آمینوترانسفراز، تری‌گلیسرید، کلسترول و گلوکز سرم‌خون ماهیان تغذیه شده با غلظت‌های مختلف اسانس اسطوخودوس به‌طور معنی‌داری کاهش یافتند ( $P < 0/05$ ). کمترین میزان این مشخصه‌ها مربوط به غلظت ۲ میلی‌لیتر اسانس در جیره پایه بود. اما میزان پروتئین کل و آلبومین ماهیان تحت تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس از روند افزایشی در مقایسه با شاهد برخوردار بودند ( $P < 0/05$ ). بیشترین میزان این ترکیبات به غلظت ۲ میلی‌لیتر اسانس اختصاص داشت. اما آنزیم لاکتات‌دهیدروژناز تحت تأثیر هیچیک از غلظت‌های اسانس قرار نگرفت ( $P > 0/05$ ). نتایج مشخصه‌های موکوس در بچه ماهیان نیز نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌ها از لحاظ میزان پروتئین کل، آلکالین فسفاتاز و لیزوزیم وجود داشت ( $P < 0/05$ ). در ماهیان تغذیه شده، غلظت ۲ میلی‌لیتر اسانس از بیشترین میزان پروتئین کل و آلکالین فسفاتاز به ترتیب به مقدار ۳۷۴ میلی‌گرم در دسی‌لیتر و ۱۴۴ واحد بر لیتر برخوردار بود. هم‌چنین دامنه تغییرات آنزیم لیزوزیم بین ۲۷ و ۴۴ واحد بر لیتر بود. کمترین و بیشترین مقدار این مشخصه به ترتیب مربوط به شاهد و اسانس ۰/۵ میلی‌لیتر بود. این در حالی است که اختلاف آن با غلظت ۱ میلی‌لیتر اسانس معنی‌دار نبود ( $P > 0/05$ ). در مجموع نتایج نشان داد که تجویز خوراکی غلظت‌های مختلف اسانس اسطوخودوس به‌ویژه ۲ میلی‌لیتر در کیلوگرم از جیره غذایی تأثیر مثبت و معنی‌داری بر مشخصه‌های بیوشیمی سرمی خون و ایمنی موکوسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دارد. لذا استفاده از آن به‌عنوان مکمل غذایی در جیره پایه پیشنهاد می‌شود.

**کلمات کلیدی:** اسانس اسطوخودوس، تجویز خوراکی، بیوشیمی سرم خون، ایمنی موکوسی، قزل‌آلای رنگین‌کمان

## مقدمه

یکی از پرطرفدارترین گونه‌های ماهی در دنیا به‌ویژه ایران، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد که اهمیت این ماهی به دلیل ارزش غذایی بالا و خصوصیات پرورشی منحصر به فرد آن می‌باشد. قزل‌آلای رنگین‌کمان با قابلیت سازگاری مناسب، در اکثر آب‌های شیرین که دارای دمای مناسب جهت رشد این گونه هستند، یکی از بهترین گونه‌های پرورشی است (نفیسی و همکاران، ۱۳۸۱).

ایران همراه با شیلی، نروژ و فرانسه جزء کشورهای برتر تولیدکننده قزل‌آلای رنگین‌کمان در دنیا است. به‌طوری‌که، ایران در تولید این ماهی در آب‌های شیرین، رتبه اول جهانی را در اختیار دارد (Dekamin *et al.*, 2015؛ Kalbasi *et al.*, 2013). در صنعت آبی‌پروری عوامل بیماری‌زا از عوامل کاهش‌دهنده تولید می‌باشد، برای حل این مشکل امروزه از محرک‌های سیستم ایمنی استفاده می‌کنند و از آنجایی که برخی گیاهان دارویی دارای طیف وسیعی از خواص مفید از جمله تحریک و تقویت سیستم ایمنی هستند، به‌همین علت استفاده از آن‌ها در مزارع پرورش ماهی سبب بهبود تولید می‌گردد.

یکی از رویکردهای جدید در صنایع پرورش دام، طیور و آبزیان جهت حفظ و افزایش تولید، استفاده از اسانس‌های گیاهی در جیره‌های غذایی می‌باشد. مطالعات اخیر نشان داده است که استفاده از اسانس‌های گیاهی موجب تقویت رشد، تحریک سیستم ایمنی و تغییر برخی فراسنجه‌های خون‌شناسی ماهی می‌گردد. در این رابطه گزارش شده است که تعدادی از گیاهان دارویی سبب تحریک اجزاء ایمنی غیراختصاصی از جمله سیستم عامل مکمل و لیزوزیم

می‌شوند. سیستم عامل مکمل از حدود ۳۵ پروتئین مجزا تشکیل شده است که از مهم‌ترین فعالیت‌های آن می‌توان به توانایی کشتن عوامل بیماری‌زا به‌وسیله ایجاد منفذ در سطح غشای آن‌ها اشاره کرد (Claier *et al.*, 2002).

اسانس گیاه دارویی اسطوخودوس دارای بیش از ۴۰ نوع ترکیب مختلف است که مهم‌ترین آن‌ها شامل لینالیل استات (Linalyl acetate)، سینئول (Cineole)، نرول (Nerol)، لینالول (Linalool) و بورنئول (Borneol) است. Ghelardini و همکاران (۱۹۹۹) گزارش نمودند که اسانس اسطوخودوس دارای ترپن‌ها و مونوترپن‌ها به میزان ۶۰-۵۰ درصد می‌باشد و لینالول و لینالیل استات از ترکیبات غالب آن است که محلول در چربی و دارای بخش آب‌دوست نیز می‌باشد، هم‌چنین در آن ترکیباتی نظیر اسید بوتیریک، اسید پروپوئیک، اسید والریک، لینالول آزاد، ژرامبول، تانن و فلاونوئیدها وجود دارد (Barazandeh *et al.*, 2002). اسانس در اندام‌های برگ و گل اسطوخودوس و هم‌چنین در کرک‌های ترش‌می مخصوص این گیاه سنتز و ذخیره می‌شود (Zheljazkov *et al.*, 2013).

به طور کلی شاخص‌های خونی به‌عنوان یک شاخص مهم وضعیت فیزیولوژیک اندام‌های داخلی مطرح است و به‌عبارت دیگر، آنالیز خون از نظر پارامترهای خون‌شناسی و بیوشیمیایی در تشخیص بسیاری از بیماری‌ها، مطالعات سم‌شناسی و متابولیک و هم‌چنین، کنترل روند زیستی موجودات زنده از جمله آبزیان از اهمیت بسزایی برخوردار است (Docan *et al.*, 2010).

مروری بر منابع نشان می‌دهد که تحقیقات زیادی در زمینه اثر ترکیبات اسانس اسطوخودوس بر

پوست ماهی به عنوان نخستین سد دفاعی بدن در برابر انواع تنش های شیمیایی، فیزیکی و زیستی مطرح است. موکوس اپیدرم در ماهیان شامل عوامل فعال زیستی متنوعی مثل لیزوزیم، آنزیم های پروتئولیتیک، فلاووآنزیم ها، ایمونوگلوبین ها و پپتیدهای ضد میکروبی می باشد. ترشحات موکوسی نه تنها با به دام انداختن غلظت بالای ترکیبات سمی مانع ورود آن ها به بدن ماهی می گردند، بلکه پروتئین های ایمنی ذاتی مانند لیزوزیم و ایمونوگلوبین M از طریق موکوس با عوامل بیماری زا مقابله می نمایند. هم چنین تجمع فلزات در موکوس ماهیان گزارش شده است و قرارگیری در معرض فلزات، تولید موکوس در پوست و آبشش را افزایش می دهد (Magnadottir, 2006). کمیت و کیفیت آن ها متأثر از عوامل مختلفی از جمله فاکتورهای ژنتیکی، سن ماهی، تغذیه، فاکتورهای محیطی و وجود یا عدم وجود استرس می باشند (Soltani, 1998).

به طور کلی، ترکیبات با منشأ طبیعی و مشتقات آن ها نظیر اسانس ها به دلیل نداشتن اثر سوء بر آبزیان، به عنوان محرک های سیستم ایمنی و عدم آلودگی های زیست محیطی ناشی از مصرف آن ها می تواند گزینه بسیار مناسب در صنعت آبی پروری از جمله تولید ماهی قزل آلائی رنگین کمان باشد. هم چنین با توجه تحقیقات اندک در مورد اثر اسانس ها به ویژه اسانس اسطوخودوس بر سیستم های بیوشیمیایی سرم خون و موکوس، لذا هدف از این تحقیق، ارزیابی اثر مقادیر مختلف اسانس اسطوخودوس در جیره غذایی بر شاخص های بیوشیمی سرم خون و ایمنی موکوسی ماهی قزل آلائی رنگین کمان بود.

پارامترهای مختلف ماهی قزل آلائی رنگین کمان انجام نشده است. در این زمینه حسنعلی زاده چاری و همکاران (۱۳۹۸) گزارش نمودند که افزودن اسانس اسطوخودوس به ویژه ۱ و ۲ میلی لیتر به جیره ماهی قزل آلائی رنگین کمان موجب تأثیر مثبت و معنی دار بر برخی از شاخص های رشد، فاکتورهای خونی و سیستم ایمنی آن ها شد. این امر احتمالاً به دلیل وجود ترکیباتی نظیر فنل ها، تانن ها و مونوترپن ها موجود در اسانس اسطوخودوس می باشد، لذا استفاده از آن به عنوان مکمل غذایی در جیره پایه پیشنهاد گردید.

Giovannini و همکاران (۲۰۱۶) اظهار داشتند که اسانس اسطوخودوس به وسیله تحریک کننده فاکوسیتوز پاسخ ایمنی ذاتی در باکتری ها را افزایش داده است که متعاقباً موجب کاهش واکنش التهابی شده است. بنابراین با متعادل نمودن واکنش های کلی ایمنی آن را مورد حمایت قرار می دهد. Hassiotis و همکاران (۲۰۱۴) گزارش نمودند که اسانس گیاه دارویی اسطوخودوس دارای اثرات آنتی اکسیدانی، ضد ویروسی، ضد درد، بی حسی، ضد تشنج می باشد و به صورت محلی برای فعالیت بیهوش کنندگی در اهداف طبی استفاده می شود و دارای مصارف بهداشتی آرایش نیز می باشد. گزارش شده است که ترکیب لینالول دارای خواص بیولوژیکی متفاوت از جمله اثر آنتی اکسیدانی و آرام بخشی می باشد (Cruz et al., 2006). Ahmady Abchin و همکاران (۲۰۱۲)، اثر ضد باکتریایی اسانس گیاه اسطوخودوس را روی باکتری های گرم منفی و مثبت بررسی و نشان دادند که اسانس اسطوخودوس (*Lavandula stoechas*) می تواند جایگزین داروهای شیمیایی برای درمان عفونت های میکروبی گردد.

## مواد و روش‌ها

این آزمایش در مزرعه پرورشی شیرآباد از توابع شهر خان‌بین استان گلستان در سال ۱۳۹۶ انجام شد. برای این آزمایش، بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (O. mykiss) با وزن متوسط  $10 \pm 2$  گرم و میانگین طول  $18 \pm 1$  از مرکز تکثیری آقای مهدی‌نژاد واقع در روستایی از توابع شهر فاضل‌آباد از ماهیان تکثیری همان سال تهیه و به مدت ۲ هفته قبل از شروع آزمایش برای سازگاری در شرایط طبیعی استخر پرورشی (ریس‌وی) قرار گرفتند. در طی این مدت ماهی‌ها به میزان ۳ بار در روز با غذای تجاری تغذیه شدند. منبع آب مصرفی از آب رودخانه شیرآباد بود. ماهی‌ها در قفس‌های دست‌ساز به ابعاد ۸۰ در ۱۲۰ سانتی‌متر با تور و چوب

نراد (۱۲ عدد) و با تراکم ۲۳ قطعه ماهی به صورت تصادفی در هر قفس نگهداری شدند. قفس‌ها در داخل ریس‌وی با شرایط یکسان نگهداری شدند و سپس با قرار دادن پاره‌سنگی در کف آن‌ها ثابت گردیدند. سپس میزان اکسیژن محلول در آب، درصد اشباع اکسیژن محلول در آب، دمای آب، ضریب هدایت الکتریکی و کل جامدات محلول در آب، درصد شوری و pH تا انتهای دوره پرورش (۶۰ روز) هر ۱۰ روز یکبار مورد آزمایش و در پایان متوسط آن‌ها گزارش گردید (جدول ۱). منبع تأمین آب مصرفی ماهیان از رودخانه بوده، طوری که آب دائماً در جریان بود.

جدول ۱. مشخصات فیزیکی و شیمیایی آب محل آزمایش

مقدار	مشخصه
۷/۹۷	اکسیژن محلول در آب (میلی‌گرم بر لیتر)
۸۱/۷	درصد اشباع اکسیژن محلول در آب (درصد)
۱۲	دمای آب (درجه سانتی‌گراد)
۳۹۵	ضریب هدایت الکتریکی (میکرو زیمنس بر سانتی‌متر)
۱۸	کل جامدات محلول در آب (میلی‌گرم در لیتر)
۰/۱۹	شوری (درصد)
۸/۰۷	pH

باریج اسانس با خلوص ۱۰۰ درصد تهیه گردید (جدول ۳). برای تهیه غذای بچه ماهیان، اسانس اسطوخودوس با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ میلی‌لیتر در یک کیلوگرم جیره اسپری شد (Zeppenfeld *et al.*, 2015)، به طوری که کاملاً تمام سطوح آن‌ها را پوشش دهد. تیمار شاهد نیز بدون افزودن اسانس به جیره غذایی در نظر گرفته شد. برای حفاظت غذاها و جلوگیری از رها شدن اسانس‌ها

غذای کنسانتره تجاری مخصوص قزل‌آلای پرورشی فرموله شده از شرکت فرادانه تهیه شد (جدول ۲). در این رابطه توده زیستی ماهیان هر ۱۰ روز یکبار برآورد شد. تغذیه بچه ماهیان، روزانه ۳ بار به صورت دستی در ساعات ۰۶:۰۰، ۱۴:۰۰ و ۱۹:۰۰ براساس ۵-۳ درصد زیتوده صورت گرفت (Razeghi Mansour *et al.*, 2012). اسانس اسطوخودوس نیز از شرکت

خوراک آماده شده در کیسه های پلاستیکی زیپ دار تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد.

و ورود آن به محیط آب از ژلاتین گاوی ۱۰ درصد با کمک آب مقطر استفاده گردید ( Ramsden *et al.*, 2009). سپس غذای تهیه شده در دمای هوای اتاق نگهداری شد (جهت جلوگیری از بخار شدن اسانس).

جدول ۲. ترکیبات خوراک (خوراک آغازین SFT<sub>3</sub>)

میزان (درصد)	ترکیبات خوراک
۴۶-۵۰	پروتئین خام
۱۱-۱۵	چربی خام
۱/۵-۳	فیبر خام
۹-۱۳	خاکستر
۵-۱۱	رطوبت
۱-۱/۵	فسفر

جدول ۳. اجزاء تشکیل دهنده اسانس اسطوخودوس مورد بررسی

مقدار (درصد)	اجزاء	ردیف
۱۲/۲۴	Limonene (%)	۱
۳۶/۴۵	Cineole	۲
-	3-octanone	۳
۳۳/۰۴	Camphor	۴
۹/۶۹	Linalol	۵
-	2	۶
۰/۸۷	Terpine <sup>n</sup> e-4-ol	۷
-	Lavandul4yl acetate	۸
-	Lavan5dulol	۹
۰/۳۶	$\alpha$ -terp6ineol	۱۰

حاوی عصاره گل میخک (۵ میلی گرم در لیتر) به مدت ۲ دقیقه بیهوش گردیدند. سپس به کیسه پلاستیکی حاوی ۱۰ میلی لیتر کلرید سدیم ۵۰ میلی مولار، انتقال داده شد. به منظور جمع آوری موکوس، کیسه های پلاستیکی به مدت ۱ دقیقه به آرامی تکان داده شد.

پس از اتمام دوره غذایی، موکوس سطح بدن ماهی براساس روش Subramanian و همکاران (۲۰۰۷)، جمع آوری شد. جهت نمونه گیری موکوس، ماهیان ۲۴ ساعت قبل در معرض گرسنگی قرار داده شدند. سپس ۵ قطعه ماهی در هر تکرار در محلول

محلول در مقابل شاهد (کووت حاوی بافر فسفات پتاسیم) در طول موج ۴۵۰ نانومتر به مدت ۱۰ دقیقه، اثر کاهشی سلول‌های *M. lyzodeikticus* ثبت گردید.

در انتهای دوره آزمایش، به منظور ارزیابی تأثیر سطوح مختلف اسانس گیاه دارویی اسطوخودوس بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان و مقایسه بین تیمارهای مختلف، از هر تیمار ۱۲ نمونه (هر تکرار ۵ نمونه) خون محیطی از ورید ساقه دمی ماهیان جمع‌آوری گردید. مقدار ۱/۵ سی‌سی خون جهت اندازه‌گیری شاخص‌های خونی به ظروف حاوی ماده ضد انعقاد هپارین و ۰/۵ سی‌سی خون دیگر به ظروف فاقد ماده ضد انعقاد هپارین جهت اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی سرم منتقل گردید. سپس با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ با ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه نمونه‌های سرم جدا شد (Feldman *et al.*, 2000). در پایان نمونه‌ها در یک ظرف حاوی یخ خشک قرار داده و به دور از تکان‌های شدید به آزمایشگاه ویرومد واقع در استان گیلان ارسال گردید. لازم به ذکر است در هنگام خون‌گیری از مواد بی‌هوش‌کننده به علل احتمال تأثیر بر روی سطوح شاخص‌های خونی استفاده نگردید (Jalali-hajjabadi *et al.*, 2009).

اندازه‌گیری گلوکز به روش گلوکز اکسیداز، آلومین به روش بروموکرزول (Bromocresol green) و تری‌گلیسرید به روش آنزیمی لپاز (Lipase/GPO-PAP) صورت گرفت. سنجش آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)، لاکتات دهیدروژناز (LDH) و آلکالین فسفاتاز (ALP) به روش آنزیماتیک کینتیک طبق روش Shahsavani و همکاران (۲۰۱۰) صورت

سپس ماهی‌ها از کیسه‌های پلاستیکی خارج و به قفس‌ها منتقل شدند. موکوس بلافاصله به تیوب‌های ۱۵ میلی‌لیتری استریل منتقل و از دستگاه (5810R (Eppendorf, Engelsdorf, Germany)  $g \times 1500$ ) برای ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای سانتریفیوژ استفاده شد. سپس موکوس سطح میانی عاری از هر گونه آلودگی برای انجام مطالعات درون میکروتیوپ ۲ میلی‌لیتری و در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس درون یخدان یونولیتی (Subramanian *et al.*, 2007) به آزمایشگاه ویرومد (گیلان) ارسال گردید.

اندازه‌گیری پروتئین کل براساس روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) انجام شد. اندازه‌گیری بعد از اضافه کردن معرف رنگی فولین سیوکالتو به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق شده موکوس توسط دستگاه اسپکتروفتومتر با مدل Biochrom, Libra S22 انجام گرفت. با انتقال جذب نوری به منحنی استاندارد (آلبومین سرم گاوی)، میزان پروتئین محلول بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. میزان آلکالین فسفاتاز قلیایی موکوس نیز با استفاده از کیت‌های تولید شده توسط شرکت پارس آزمون و دستگاه اسپکتروفتومتر با مدل Biochrom, Libra S22 در طول موج ۴۰۵ نانومتر در مدت ۳ دقیقه محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت لیزوزیم براساس روش Esteban و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد. در این روش محاسبه لیزوزیم به روش کدورت‌سنجی و به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر با مدل Biochrom, Libra S22 انجام شد. برای این کار از باکتری لیوفلیزه *Micrococcus lyzodeikticus* حل شده در بافر فسفات پتاسیم به‌عنوان سوبسترا استفاده شد. جذب این

میلی لیتر اسانس اسطوخودوس بود که اختلاف معنی داری با غلظت ۲ میلی لیتر اسانس نشان نداد ( $P > 0/05$ ).

در مورد آنزیم لاکتات دهیدروژناز، این آنزیم در غلظت های مختلف اسانس اسطوخودوس اضافه شده به جیره پایه تغییر معنی داری نسبت به شاهد نشان نداد ( $P > 0/05$ ).

مطابق نتایج، میزان پروتئین کل ماهی قزل آلائی رنگین کمان با افزایش غلظت اسانس اسطوخودوس افزایش نشان داد، طوری که شاهد با مقدار ۲/۷۹ گرم بر دسی لیتر از کمترین مقدار برخوردار بود، اما اختلاف آن با غلظت ۰/۵ میلی لیتر اسانس اسطوخودوس معنی دار نبود. هم چنین این مطالعه نشان داد بیشترین میزان پروتئین کل مربوط به غلظت ۲ میلی لیتر اسانس اسطوخودوس (۳/۳۹ گرم بر دسی لیتر) بود.

همان طوری که نتایج نشان داد میزان تری گلیسرید در تیمارهای دریافت کننده اسانس اسطوخودوس نسبت به کنترل کاهش نشان داد ( $P < 0/05$ ). بیشترین کاهش تری گلیسرید مربوط به غلظت ۲ میلی لیتر اسانس اسطوخودوس بود.

در تحقیق حاضر، میزان آلومین سرم خون در اثر افزودن اسانس اسطوخودوس به جیره پایه افزایش نشان داد. میزان آلومین در حداکثر مقدار اسانس افزوده شده به مقدار ۱/۶۷ گرم در دسی لیتر به دست آمد.

نتایج هم چنین نشان داد که میزان گلوکز سرم خون با افزایش غلظت اسانس اسطوخودوس به جیره غذایی در مقایسه با شاهد کاهش نشان داد ( $P < 0/05$ ).

گرفت. هم چنین، میزان فعالیت لیزوزیم سرم از طریق جذب نوری و با استفاده از دستگاه بیوفتومتر (Sartorius, Germany) طبق روش Ellis (۱۹۹۰) اندازه گیری شد.

تجزیه واریانس داده ها توسط نرم افزار SAS با نسخه ۹/۳ انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد ( $P < 0/05$ ).

## نتایج

نتایج مقایسه میانگین پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون بچه ماهیان قزل آلائی رنگین کمان تحت غلظت های مختلف اسانس اسطوخودوس در ۶۰ روز پس از آزمایش در جدول ۴ ارائه شده است.

همان طوری که مشاهده می شود مقدار آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز تحت غلظت های مختلف اسانس ۰/۵، ۱ و ۲ میلی لیتر اسطوخودوس به طور معنی داری کاهش نشان داد. براساس نتایج، تیمار شاهد از بیشترین میزان آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز (۴۵۷/۵۰ واحد بر لیتر) برخوردار بود، این در حالی است که میزان این آنزیم در غلظت های اسانس اسطوخودوس اضافه شده به جیره پایه تغییر کاهشی معنی داری در انتهای دوره آزمایش در مقایسه با شاهد داشته است.

در تحقیق حاضر، غلظت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز ماهی قزل آلائی رنگین کمان تحت کاربرد اسانس اسطوخودوس در مقایسه با شاهد کاهش نشان داد. بیشترین کاهش مربوط به کاربرد غلظت ۱

جدول ۴. مقایسه میانگین پارامترهای بیوشیمیایی (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) در بچه ماهیان قزل‌آلا

تحت غلظت‌های مختلف اسانس اسطوخودوس پس از ۶۰ روز

تیمارها (میلی‌لیتر در جیره پایه)	آنزیم آسپاراتات (واحد بر لیتر)	آنزیم آلانین (واحد بر لیتر)	آنزیم لاکتات دهیدروژناز (واحد بر لیتر)	پروتئین کل (گرم بر دسی لیتر)	تری‌گلیسیرید (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	کلسترول (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	آلبومین (گرم بر دسی لیتر)	گلوکز (میلی‌گرم بر دسی لیتر)
شاهد	$457/50 \pm 12/50^a$	$26/00 \pm 1/00^a$	$1715/00 \pm 155/00^{ab}$	$2/79 \pm 0/02^c$	$292/00 \pm 5/00^a$	$328/50 \pm 3/50^a$	$1/40 \pm 0/01^d$	$306/00 \pm 5/00^a$
اسانس ۰/۵	$383/00 \pm 5/00^b$	$22/00 \pm 1/00^b$	$1645/00 \pm 115/00^{ab}$	$2/82 \pm 0/07^c$	$279/00 \pm 4/00^b$	$299/50 \pm 7/50^b$	$1/45 \pm 0/04^c$	$233/00 \pm 1/00^b$
اسانس ۱	$388/00 \pm 3/00^b$	$19/00 \pm 1/00^c$	$1860/00 \pm 110/00^a$	$3/23 \pm 0/01^b$	$244/50 \pm 1/50^c$	$274/50 \pm 42/50^c$	$1/62 \pm 0/00^b$	$203/00 \pm 8/00^c$
اسانس ۲	$356/00 \pm 7/50^c$	$20/00 \pm 1/00^c$	$1527/50 \pm 57/50^b$	$3/39 \pm 0/01^a$	$166/00 \pm 4/00^d$	$252/50 \pm 3/50^d$	$1/67 \pm 0/00^a$	$189/00 \pm 8/00^d$

حروف لاتین متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است ( $P < 0/05$ ).

نتایج مقایسه میانگین مشخصه‌های موکوس بچه ماهیان تحت غلظت‌های مختلف اسانس گیاه دارویی اسطوخودوس در انتهای دوره آزمایش نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها از لحاظ میزان پروتئین، آلکالین فسفاتاز و لیزوزیم وجود داشت ( $P < 0/05$ ) (جدول ۵).

بیشترین میزان پروتئین موجود در موکوس مربوط به غلظت دو میلی‌لیتر اسانس اضافه شده به جیره پایه به مقدار ۳۷۴ میلی‌گرم در دسی لیتر بوده است. اما تیمار شاهد با مقدار ۱۲۸ میلی‌گرم بر دسی لیتر از کمترین مقدار برخوردار بود.

هم‌چنین نتایج به‌دست آمده نشان داد که دامنه تغییرات آلکالین فسفاتاز بین ۱۵۰/۵۰ و ۴۸ واحد بر

لیتر بود. کمترین و بیشترین مقدار به ترتیب مربوط به شاهد و اسانس یک میلی‌لیتر بود. این در حالی است که این مشخصه در حد بالا، اختلاف معنی‌داری با غلظت ۲ میلی‌لیتر اسانس نشان نداد ( $P > 0/05$ ).

در مورد آنزیم لیزوزیم موکوس، غلظت ۰/۵ میلی‌لیتر اسانس اسطوخودوس اضافه شده به جیره پایه از بیشترین این مشخصه (۴۴ واحد بر میلی‌لیتر در دقیقه) برخوردار بود که اختلاف معنی‌داری با غلظت ۱ میلی‌لیتر اسانس نشان ندادند ( $P > 0/05$ ). در مقابل شاهد از کمترین مقدار (۲۷ واحد بر میلی‌لیتر در دقیقه) برخوردار بود.

جدول ۵. مقایسه میانگین مشخصه‌های موکوس (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) در بچه ماهیان قزل آلا

تحت غلظت‌های مختلف اسانس اسطوخودوس پس از ۶۰ روز

تیمارها (میلی لیتر در جیره پایه)	پروتئین (میلی گرم در دسی لیتر)	آلکالین فسفاتاز (واحد بر لیتر)	فعالیت آنزیم لیزوزیم (واحد بر میلی لیتر در دقیقه)
شاهد	۱۲۸/۰۰ $\pm$ ۱۴/۰۰ <sup>d</sup>	۴۸/۰۰ $\pm$ ۵/۰۰ <sup>c</sup>	۲۷/۰۰ $\pm$ ۱/۰۰ <sup>c</sup>
اسانس ۰/۵	۲۴۸/۵۰ $\pm$ ۱۰/۵۰ <sup>c</sup>	۶۱/۰۰ $\pm$ ۳/۰۰ <sup>b</sup>	۴۴/۰۰ $\pm$ ۱/۰۰ <sup>a</sup>
اسانس ۱	۳۴۳/۰۰ $\pm$ ۶/۰۰ <sup>b</sup>	۱۵۰/۵۰ $\pm$ ۲/۵۰ <sup>a</sup>	۴۰/۰۰ $\pm$ ۴/۰۰ <sup>a</sup>
اسانس ۲	۳۷۴/۰۰ $\pm$ ۱۲/۰۰ <sup>a</sup>	۱۴۴/۰۰ $\pm$ ۳/۰۰ <sup>a</sup>	۳۵/۵۰ $\pm$ ۰/۵۰ <sup>b</sup>

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن

## بحث

نظیر لینالول، لینالول استات، ۱ و ۸ سینئول، کامفور، آلفا ترپین آل و بورن آل) و نیز افزایش میزان فنول کل آن‌ها باشد.

از آنجایی که آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز و آلانین ترانسفراز نقش مهمی در مراحل تجزیه پروتئین جهت تولید ATP دارند؛ افزایش فعالیت آن‌ها، نقش موثری در استفاده از اسیدهای آمینه در فرآیند اکسیداسیون یا گلوکوژنز بازی می‌کند (Banaee et al., 2011). در مطالعه‌ای Banaee و همکاران (۲۰۱۹) گزارش نمودند که افزایش در مقدار آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز، آلانین ترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز تحت نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید در ماهی کپور می‌تواند نتیجه آسیب به سلول‌ها باشد. Gholizadeh Zare و همکاران (۲۰۱۸) گزارش نمودند که تغییرات در فعالیت این آنزیم‌ها و افزایش آن‌ها می‌تواند بیانگر آسیب به غشای سلولی و در نتیجه آسیب به کبد باشد.

مطابق نتایج، میزان پروتئین کل و آلبومین سرم خون تحت غلظت‌های مختلف اسانس اسطوخودوس از روند افزایشی برخوردار بود. پروتئین تام شامل آلبومین و گلوبولین است. اصولاً افزایش سطح پروتئین کل پلاسما

در مطالعه حاضر، مقادیر آنزیم‌های سرمی نظیر آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز و آلانین ترانسفراز تحت تأثیر معنی‌دار غلظت‌های مختلف اسانس گیاه دارویی اسطوخودوس قرار گرفت، طوری که میزان این مشخصه‌های سرمی با افزایش مقادیر اسانس، کاهش نشان دادند. کاهش میزان مشخصه‌های آنزیم‌های سرمی تحت غلظت‌های مختلف اسانس اسطوخودوس نشان‌دهنده ثبات غشای سلولی و در نتیجه سلامت کبد تحت کاربرد این تیمارها است. این امر می‌تواند به‌واسطه ترکیبات ترپنی حاضر در اسانس گیاه دارویی اسطوخودوس به‌ویژه سینئول و کامفر باشد. لذا این ترکیبات به‌واسطه دارا بودن خاصیت از بین بردن رادیکال‌های آزاد نظیر اکسیژن یکتایی و یا نوزاد (O.-)، آب اکسیژنه، سوپراکسید و هیدروکسی موجب افزایش کارایی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های کبدی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان می‌گردند. این نتایج مطابق با نتایج طاهانژاد و همکاران (۱۳۹۰) است. آن‌ها اظهار داشتند که با افزایش غلظت اسانس اسطوخودوس، میزان فعالیت ضد اکسایشی آن افزایش می‌یابد، که این امر می‌تواند ناشی از تأثیر افزایش درصد مواد مؤثره آن

بیانگر افزایش سطح پارامترهای ایمنی سلول‌ها که دارای ساختار پروتئینی می‌باشند. در این مطالعه، افزایش لیزوزیم موکوس دال بر این امر می‌باشد. پروتئین مهمترین ماده آلی است که برای ساخت و ترمیم بافت‌ها لازم است و نقش مهمی در تأمین انرژی ماهیان دارد (Binukumari *et al.*, 2017). لذا می‌توان نتیجه‌گیری نمود که احتمالاً افزایش فاکتور غیراختصاصی مثل لیزوزیم موکوس به دلیل افزایش قدرت باکتری‌کشی بوده است (علیشاهی و همکاران، ۱۳۹۶). افزایش مشخصه‌های ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تحت کاربرد انواع محرک ایمنی با منشاء گیاهی و مشتقات آن (اسانس و عصاره) توسط تعداد زیادی از محققین گزارش شده است (اکرمی و همکاران، ۱۳۹۶؛ Awad *et al.*, 2013).

برخلاف میزان پروتئین کل، میزان تری‌گلیسرید و کلسترول سرم خون از روند کاهشی در مقایسه با شاهد برخوردار بودند. به نظر می‌رسد کاربرد اسانس اسطوخودوس در جیره پایه بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان مانع از تجمع چربی در بافت‌ها شده باشد. با توجه به این که مهم‌ترین محل متابولیسم چربی‌ها در کبد است، کاهش میزان کلسترول از بار اضافی کبد جلوگیری می‌کند و در نتیجه از مستعد شدن ماهی برای ابتلا به بیماری‌هایی هم‌چون سندروم کبد چرب جلوگیری می‌نماید (Talpur and Ikhwanuddin, 2012). علاوه بر این رضایی و همکاران (۱۳۹۲)، گزارش نمودند که کاهش مقادیر کلسترول ممکن است فعالیت‌های قلبی و عروقی ماهی را افزایش دهد، در نتیجه اثر مفیدی بر سلامت ماهی خواهد داشت.

نتایج این مطالعه نشان داد که میزان غلظت گلوکز خون بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان تحت تأثیر عامل

تجویز خوراکی غلظت‌های مختلف اسانس اسطوخودوس قرار گرفت، به طوری که از روند کاهشی در مقایسه با شاهد برخوردار بود. این امر نشان‌دهند تأثیر مثبت بکارگیری اسانس اسطوخودوس بر گلوکز خون ماهی قزل‌آلای رنگین کمان است. کاهش در میزان گلوکز خون به بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های پانکراس در تولید انسولین نسبت داده می‌شود (Talpur *et al.*, 2013). افزایش سطح گلوکز خون یا هیپرگلیسمی نشان‌دهنده بروز اختلال در روند متابولیسم کربوهیدرات‌ها است که معمولاً ناشی از افزایش تجزیه گلیکوژن کبدی است. به عبارتی دیگر، کاهش ذخایر گلیکوژن کبدی و افزایش گلوکز خون یکی از معمولی‌ترین واکنش‌های ماهی‌ها در مسمومیت است (Banaee *et al.*, 2011). در واقع تحت چنین شرایطی، گلوکز ۶- فسفات حاصل از تجزیه‌ی گلیکوژن کبدی، به وسیله گلوکز ۶- فسفاتاز هیدرولیز شده و گلوکز حاصل به داخل خون آزاد می‌گردد (بنایی و همکاران، ۱۳۹۵).

نتایج به دست آمده نشان داد که میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز و لیزوزیم موکوس با افزایش غلظت‌های مختلف اسانس اسطوخودوس، از روند افزایشی برخوردار بود. موکوس پوست ماهیان به عنوان نخستین سد دفاعی ماهی به دلیل ترشح و جایگزینی مداوم مانع از تثبیت انگل‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا بر سطوح خارجی بدن ماهی می‌گردد (Esteban, 2012؛ Guardiola *et al.*, 2014).

لیزوزیم، به عنوان آنزیم ضدباکتریایی سیستم ایمنی ذاتی، در بافت‌ها و اعضای مختلفی از گونه‌های متعددی ماهی، که در تماس مداوم با میکروارگانیسم‌ها بوده‌اند که مورد مطالعه قرار گرفته است. هم‌چنین

صنعت آبی‌پروری باشد. البته انجام مطالعات بیشتر به منظور مقدار و نحوه مصرف، سن، عامل‌های محیطی و گونه این ماهی بایستی در نظر گرفته شود.

در مجموع نتایج نشان داد که تجویز خوراکی غلظت‌های مختلف اسانس اسطوخودوس به‌ویژه ۲ میلی‌لیتر در کیلوگرم از جیره غذایی تأثیر مثبت و معنی‌داری بر مشخصه‌های بیوشیمی سرمی خون و ایمنی موکوسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دارد. لذا استفاده از آن به‌عنوان مکمل غذایی در جیره پایه پیشنهاد می‌شود.

### سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم که از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

### منابع

۱. اکرمی، ر.، احمدی، ز.، چیت‌ساز، ح.، شاملوفر، م.، حبیبی‌نوده، ف.، صادقیه اصل، ن.، زرینی، ن.، ۱۳۹۶. تأثیر عصاره زنجبیل (*Zingiber officinale*) بر برخی شاخص‌های رشد، خون، بیوشیمی و ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله تحقیقات دامپزشکی. ۷۳(۲)، ۱۶۳-۱۵۵.
۲. بنایی، م.، نعمت‌دوست حقی، ب.، شوکت، پ.، ۱۳۹۵. تأثیر عصاره پونه (*Mentha longifolia*) بر فاکتورهای بیوشیمیایی خون و شاخص‌های رشد ماهی کپور (*Cyprinus carpio*). نشریه توسعه آبی‌پروری، ۱(۳)، ۵۵-۳۹.

آلکالین فسفاتاز آنزیمی است که نقش حمایتی را در گونه‌های مختلف ماهی در طی استرس، آلودگی‌های انگلی و ترمیم زخم بر عهده دارد (Sheikhzadeh et al., 2012). آلکالین فسفاتاز، آنزیمی است که در بافت‌های مختلف سراسر بدن از جمله کبد، مغز استخوان، کلیه و روده یافت می‌شود.

با توجه به افزایش فعالیت آنزیم لیزوزیم و آلکالین فسفاتاز تحت غلظت‌های مختلف اسانس اسطوخودوس، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که افزایش در میزان فعالیت آنزیم‌های مختلفی مانند آلکالین فسفاتاز و لیزوزیم ترشح شده به مخاط در تمام ماهیان تیمار شده، به تنهایی یا به‌همراه دیگر مواد ایمنی موجود در مخاط که در برخورد با پاتوژن‌ها ایجاد می‌شوند، رخ می‌دهد. به‌طور کلی گیاهان دارویی و مشتقات آن‌ها (اسانس‌ها و عصاره‌ها) دارای طیف گسترده‌ای از عملکردهای ضد میکروبی (انواع پاتوژنیک و مولد فساد در مواد غذایی) و ضد اکسیدانی می‌باشند. به‌طوری که با وجود اثرگذاری کند، به‌دلیل عواملی چون پایدارتر بودن اثر آن‌ها، عدم ایجاد مقاومت نسبی عوامل بیماری‌زا نسبت به آن‌ها، نداشتن اثرات سوء بر جانداران و محیط زیست در مقایسه با سایر ترکیبات شیمیایی - دارویی مورد توجه می‌باشند (قاسمی پیربلوطی و همکاران، ۱۳۹۰).

با توجه به تأثیر مثبت تجویز خوراکی اسانس اسطوخودوس در جیره پایه بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌ویژه ۲ میلی‌لیتر در کیلوگرم از جیره غذایی بر مشخصه‌های بیوشیمی سرمی خون و ایمنی موکوسی، لذا استفاده از محرک‌های ایمنی با منشاء گیاهی به‌دلیل عدم تأثیر جانبی، عدم ایجاد مقاومت دارویی و پایدار می‌تواند به‌عنوان گزینه‌ای مناسبی در

۳. حسنعلی زاده چاری، ف.، اکرمی، ر.، قلیچی، ا.، ابراهیمی، پ.، ۱۳۹۸. تجویز خوراکی اسانس اسطوخودوس (*Lavandula officinalis*) بر شاخص‌های رشد، خونی و ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری، ۱۱(۴)، ۱۹۷-۲۰۶.
۴. رضایی، م.ه.، سوری‌نژاد، ا.، سلطانیان، س.، یوسف‌زادی، م.، ۱۳۹۲. تأثیر عصاره گیاهی مورخوش (*Zhumeria majdae*) در جیره غذایی بر شاخص‌های رشد، خون‌شناسی و ایمنی‌شناسی گربه ماهی پنگوسی (*Pangasianodon hypophthalmus*). بوم‌شناسی آبزیان، ۳، ۱۹-۸.
۵. طاهانژاد، م.، برزگر، م.، سحری، م.، نقدی بادی، ح.، ۱۳۹۰. ارزیابی فعالیت ضداکسایشی اسانس اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*) در سامانه روغن خام سویا. فصلنامه گیاهان دارویی، ۱۱(۸)، ۱۲۷-۱۴۰.
۶. علیشاهی، م.، مصباح، م.، شیرالی، ط.، ۱۳۹۶. مقایسه تأثیر تجویز خوراکی و تزریقی عصاره گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea*) بر برخی شاخص‌های خونی و ایمنی ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*). مجله تحقیقات دامپزشکی، ۷۲(۲)، ۲۵۹-۲۵۱.
۷. قاسمی پیربلوطی، ع.، پیرعلی، ا.، پیشکار، غ.ر.، جلالی، س.م.ع.، رئیسی، م.، جعفریان دهکردی، م.، حامد، ز.ب.، ۱۳۹۰. اثر اسانس چند گیاه دارویی بر سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). فصلنامه داروهای گیاهی، ۲، ۱۵۵-۱۴۹.
۸. نفیسی بهابادی، م.، شریفیان، م.، دهموبد، د.، ۱۳۸۱. پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در استخرهای خاکی آب شور در استان یزد. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی شماره ۸۱/۳۶۸ موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۴۷ صفحه.
9. Ahmady Abchin, S., Nasrolahi Omran, A., Jafari, N., Mostafapour, M.J., 2012. Antibacterial effects of Lavandula Stoechas Essential Oil, on Gram Positive and Negative Bacteria In Vitro. Journal of Laboratory Sciences, 6(2), 35-41.
10. Awad, E., Austin, D., Lyndon, A.R., 2013. Effect of black cumin seed oil (*Nigella sativa*) and nettle extract (Quercetin) on enhancement of immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 388(391), 193-197.
11. Barazandeh, M.M., 2002. Essential oil composition of *Lavandula latifolia* Medik from Iran. Journal of Essential Oil Research, 12, 103-104.
12. Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A.R., Rafei, G.R., 2011. Effects of long-term silymarin oral supplementation on the blood biochemical profile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiology and Biochemistry, 37, 887-896.
13. Banaee, M., Tahery, S., Nematdoost Haghi, B., Shahafve, Sh., Vaziriyani, M., 2019. Blood biochemical changes in common carp (*Cyprinus carpio*) upon co-exposure to titanium dioxide nanoparticles and paraquat. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 18(2), 242-255.
14. Binukumari, S., Anusiya Devi, K., Vasanthi, J., 2017. Applications in environmental risk assessment of biochemical analysis on the Indian fresh water fish, Labeo rohita exposed to monocrotophos pesticide. Environmental Toxicology and Pharmacology, 47, 200-205.
15. Claire, M., Holland, H., Lambris, J.D., 2002. The complement system in teleost. Fish and shellfish immunology, 12, 399- 420.
16. Cruz, T., Cabo, M.M., Castillo, M.J., Jimenez, J., Ruiz, C., Ramos-Cormenzana, A., 2006. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of different

27. Hassiotis, C.N., Ntana, F., Lazari, D.M., Poullos, S., Vlachonassios, K.E., 2014. Environmental and developmental factors affect essential oil production and quality of *Lavandula angustifolia* during flowering period. *Industrial Crops and Products*, 62, 359–366.
28. Jalali-hajiabadi, M.A., Sadeghi, A.A., Mahbobi Sofiyani, N., Chamani, M., Riyazi, Gh., 2009. The effect of dietary L-carnitine supplementation on blood factors and growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 47, 105-115.
29. Kalbasi, M.R., Abdollahzadeh, E., Salari-Joo, H., 2013. A review on aquaculture development in Iran. *Ecopersia*, 1(2), 159-178.
30. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265- 75.
31. Magnadottir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*, 20, 137-151.
32. Ramsden, S.R., Smith, T.J., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2009. Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): No effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. *Ecotoxicology*, 18, 939- 951.
33. Razeghi Mansour, M., Akrami, R., Ghobadi, S.H., Amani Denji, K., Ezatrahimi, N., Gharaei, A., 2012. Effect of dietary mannan oligosaccharide (MOS) on growth performance, survival, body composition and some hematological parameters in giant sturgeon juvenile (*Huso huso*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38, 829-835.
34. Shamsavani, D., Mohri, M., Gholipour Kanani, H., 2010. Determination of normal values of some blood serum enzymes in *Acipenser stellatus* Pallas. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36, 39-43.
35. Subramanian, S., MacKinnon, Sh.L., Ross, N.W., 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 148, 256-263.
36. Sheikhzadeh, N., Karimi Pashaki, A., Nofouzi, K., Heidarieh, M., Tayefi-Nasrabadi, H., 2012. Effects of dietary Ergosan on cutaneous samples of *Thymus baeticus* boiss. *Phytotherapy Research*, 7(1), 92-94.
17. Dekamin, M., Veisi, H., Safari, E., Liaghati, H., Khoshbakht, K., Dekamin, M.G., 2015. Life cycle assessment for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) production systems: a case study for Iran. *Journal of Cleaner roduction*, 91, 43-55.
18. Docan, A., Cristea, V., Grecu, I., Dediu, L., 2010. Haematological response of the European catfish, *Silurus glanis* reared at different densities in flow-through production system. *Archiva Zootechnica*, 13, 63- 70.
19. Ellis, A.E., 1990. Lysozyme assay, techniques in fish immunology. 2<sup>nd</sup> edn. Fair Haven, USA, pp. 100- 102.
20. Esteban, M.A., Cuesta, A., Ortuno, J., Meseguer, J., 2001. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Fish and Shellfish Immunology*, 11(4), 303- 315.
21. Esteban, M.A., 2012. An Overview of the immunological defenses in fish skin. *Immunology*, 29p, doi:10.5402/2012/853470.
22. Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jian, N.C., 2000. Schalm's veterinary hematology. Lippincott Williams and Wilkins publication, Canada, pp. 1120-1125.
23. Ghelardini, C., Galeotti, N., Salvatore, S., Mazzanti, G., 1999. Local Anaesthetic Activity of the Essential Oil of *Lavandula angustifolia*. *Planta Medica*, 65, 700-703.
24. Giovannini, D., Gismondi, A., Basso, A., Canuti, L., Braglia, R., Canini, A., Mariani, F., Cappelli, G., 2016. *Lavandula angustifolia* Mill. Essential oil exerts antibacterial and anti-inflammatory effect in macrophage mediated immune response to *Staphylococcus aureus*. *Immunological Investigation*, 45, 11–28.
25. Gholizadeh Zare Tavana, B., Banaee, M., Yousefi Jourdehi, A., Nematdoost Hagh, B., Seyed Hassani, M., 2018. Effects of selenium (Sel-Plex) supplement on blood biochemical parameters of juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 17(2), 300-312.
26. Guardiola, F.A., Cuesta, A., Abellan, E., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2014. Comparative analysis of the humoral immunity of skin mucus from several marine teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 40, 24-31.

- mucosal immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 32, 407-410.
37. Soltani, M., 1998. Antibacterial properties of fish skin mucus. *Journal of Veterinary Medicine*, Tehran University, 1, 30-34.
38. Talpur, M.A.D., Ikhwanuddin, M., 2012. Effects of stress tests on larvae of blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758). *Advances in Environmental Biology*, 6(7), 1909-1915.
39. Talpur, A.D., Ikhwanuddin, M., Ambok Bolong, A. 2013. Nutritional effects on giger (*Zingiber officinal*) on immune response of Asian sea bass (*Lates calcarifer*) and disease resistance against *Vibrio harveeyi*. *Aquaculture*, 400(401), 46-52.
40. Zeppenfeld, C.C., Hernández, D.R., Santinon, J.J., Heinzmann, B., Da Cunha, M.A., Schmidt, D., Baldisserotto, B., 2015. Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Journal of Aquaculture Nutrition*, 22(4), 933-940.
41. Zheljaskov, V.D., Cantrell, C.L., Astatkie, T., Jeliaskova, E., 2013. Distillation time effect on lavender essential oil yield and composition. *Journal of Oleo Science*, 62(4), 195-199.