مجله علوم و فنون شیلات
دوره ۱۱ شماره ۳، تابستان ۱۴۰۱، صفحات ۲۴۰ تا ۲۵۴

اثرات متقابل تراکم پرورش و تجویز خوراکی عصاره پوست انار (*Punica granatum* L.) بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی و ضداکسیدانی سرم خون ماهی کپور معمولی(*Cyprinus carpio*)

تکاور محمدیان[۲،۱]، سکینه مشجور[۳*]، سعیده لطفی[۱]، حسن بخشی[۱]، رضا قانعی مطلق[۱]

۱- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲-عضو قطب بهداشت و بیماری‌های ماهیان گرمابی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳-گروه علوم دارویی دریایی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران

چکـــیده

امروزه بنابر اثبات وجود ترکیبات پلی فنولی با خواص ضداکسیدان در پوست انار، بررسی پتانسیل‌های کاربردی آن در سلامت مواد غذایی و فرآورده‌های شیلاتی در کانون توجه محققین قرار گرفته است. در مطالعه حاضر، تأثیر تجویز خوراکی عصاره الکی پوست انار (*Punica granatum* L.) (غلظت: ۶۰۰ mg/kg) بر تغییرات عملکردی سیستم دفاع ضداکسیدانی و فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) طی یک مواجهه ۴۵ روزه با تنش تراکم ذخیره‌سازی پایش گردید. در این راستا، ماهیان در ۶ گروه (۳ گروه تیمار و ۳ گروه شاهد) با سطوح مختلف تراکم ذخیره‌سازی (۳، ۵ و ۱۰ کیلوگرم در مترمکعب) به صورت تصادفی و در سه تکرار دسته‌بندی شدند. در انتهای دوره تیمار، خون‌گیری از ماهیان و تهیه سرم انجام پذیرفت. نتایج این تحقیق افزایش معنی‌داری را در فراسنجه‌های بیوشیمیایی (فسفر، کلر، منیزیم، کلسیم و تری‌گلیسرید) و نیز سطوح فعالیت برخی آنزیم‌ها و ترکیبات ضداکسیدانی نظیر SOD و MDA سرم خون بچه ماهیان نسبت به گروه شاهد نشان نداد، ولی در مورد شاخص‌های استرسی چون گلوکز، کلسترول و نیز فعالیت ضداکسیدان‌ها نظیر CAT و GSH تغییرات معنی‌دار بود. بنابر یافته‌های ارائه شده تجویز خوراکی مکمل غذایی عصاره پوست انار، جهت مصرف در مراکز پرورش متراکم ماهیان کپور معمولی قابل توصیه می باشد.

کـــلید واژه‌ها: انار، تغذیه، تراکم ذخیره‌سازی، شاخص‌های خونی، تنش اکسیداتیو، ماهیان پرورشی گرمابی.

نوع مقـاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۰۱

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۱/۰۶/۱۵

***نویسنده مسول:**
sakynemashjoor@gmail.com

مقدمه

در سیستم‌های آبزی‌پروری، کیفیت تکثیر و پرورش آبزیان و بازده اقتصادی آن، تنها وابسته به بهگزینی گونه آبزی مورد نظر، کنترل کیفی آب و مواد غذایی نبوده، بلکه تا حد زیادی متاثر از تراکم ذخیره‌سازی در قیاس با نرخ غذادهی و مدیریت کارآمد آنها نیز می باشد [۱]. به علاوه در طراحی و مهندسی سیستم‌های تکثیر و پرورش، از مدیریت فضای پرورشی و کنترل استرس ناشی از تراکم ذخیره‌سازی ماهیان به عنوان پارامترهای کلیدی یاد می شود که متضمن سلامت، رشد و بقای آبزی است [۲]. در بسیاری از گونه‌های پرورشی ماهیان، میزان رشد ماهی در صورت تراکم بالای ذخیره‌سازی، به شدت کاهش می یابد که دلایل مختلفی چون روابط اجتماعی بین ماهیان، رقابت بر سر منابع غذایی و فضای زیستی مورد نیاز در بروز آن موثر بوده و منجر به ایجاد نوعی استرس مزمن خواهد شد که نهایتاً اثرات منفی بر رشد آبزی بر جای می گذارد [۳،۴]. لذا، استفاده از مکمل‌های غذایی و یا محرک‌های ریزمغذی که اثرات استرسی ناشی از تراکم را بر توده‌های پرورشی کاهش می دهند، در افزایش و حفظ رشد بهینه آبزی می تواند موثر باشد[۵]. محصولات و افزودنی‌های غذایی فیتوژنیک(Phytogenic feed additives) (با منشا گیاهی)، مشتمل بر پودر گیاه، اسانس‌ها و عصاره‌های آلی و یا بعضاً عصاره آبی هستند که به علت وجود ترکیبات زیست‌فعال گیاهی در ساختار بیوشیمیایی آن‌ها نظیر فنول‌ها و فلاوونوئیدها می‌توانند اثرات مفیدی را بر سلامت و بهبود کیفیت حیات آبزیان برجای گذارند[۵]. از این رو در دهه‌های اخیر آبزی پروری، این مکمل‌ها در سطحی گسترده در رژیم غذایی گونه‌های مختلف آبزیان مورد استفاده قرار گرفته‌اند[۶]. معمولاً هدف از افزودن این مواد گیاهی در سطوح بالا به جیره غذایی آبزیان، تامین منابع پروتئین، چربی، کربوهیدرات، انرژی و نیز ایفای نقشی به عنوان ترکیبات هم‌بند جیره

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-02-08]

است[۷]. از سوی دیگر هنگامی که مقادیر اندکی از این پودر یا عصاره‌های گیاهی به عنوان مکمل به جیره اضافه می شود، انتظار می‌رود در حفظ یا فعال‌سازی سلامت ماهی، بازدهی غذایی، رشد، فعالیت جاذبه‌ای، بهبود مقاومت به بیماری، افزایش رشد، افزایش اشتها، تحریک ترشح صفرا، بهبود فعالیت آنزیم‌های هضم‌کننده و هم‌چنین به عنوان ضداکسیدان، ضدمیکروب، ضدسرطان، مسکن و ضدانگل ایفای نقش نمایند [۴].

یکی از انواع افزودنی‌های فیتوژنیک، عصاره میوه و پوست انار است[۱۰-۱۸]. گونه‌ی انار خوراکی با نام علمی *Punica granutum* از خانواده Punicaceae می‌باشد که یکی از گیاهان بومی ایران و هند است[۱۱]. مطالعات پیشین اذعان داشته اند که خصوصیات ضداکسیدانی پوست انار با ترکیبات فیتوشیمیایی زیست فعال آن نظیر ترکیبات فنولی، آلکالوییدی و تانن‌های قابل هیدرولیز از قبیل گالیک اسید، لاژیک اسید و آنتوسیانین‌ها مرتبط بوده است[۱۲-۱۴]. با این حال، بنا بر این گزارش ها، ترکیبات پلی فنوله که بالاترین سهم از ترکیبات زیست فعال در پوست انار را به خود اختصاص داده اند، عمدتاً مشتمل بر ترکیباتی چون فلاونوئیدها (آنتوسیانین‌هایی چون Pelargonidin، Delphinidin، Cyanidin و دیگر مشتقات آنها و نیز آنتوگزانتین هایی چون Catechin، Epicatechin و Quercetin)، تانن‌ها (نظیر Ellagitannins و مشتقات الاژیک اسید نظیر Punicalagin، Punicalin و Pedunculagin) و اسید فنولیک (نظیر Chlorogenic acid، Caffeic acid، Syringic acid، Sinapic acid، P-coumaric acid، Gallic acid، Ferulic acid، Ellagic acid و Cinnamic acid) بوده اند [۱۵]. دیگر ترکیبات متابولیتی موجود در بخش‌های مختلف میوه و درخت انار مشتمل بر انواع قندها، اسیدهای آلی، آلکالوییدها، پلی فنل‌ها، فلاوونوییدها، آنتوسیانین‌ها، اسیدهای چرب، ویتامین‌ها و نظایر آن است[۱۶]. عمده قندهای موجود در آب انار گلوکز، فروکتوز، ساکاروز و مالتوز و ویتامین‌های موجود در آن نیز B2، B1، C و بتاکاروتن است[۱۷-۱۸]. علاوه بر این، اسیدسیتریک، اسیدمالیک، اسید سوکسینیک، اسید تارتاریک، اسید فوماریک و اسید اگزالیک نیز در زمره مهمترین اسیدهای آلی انار محسوب می شوند[۱۶،۱۸]. در کارخانه‌های فرآوری آب انار (یا تهیه نکتار میوه انار)، یکی از مهمترین محصولات جانبی، تولید حجم وسیعی از ضایعات پوست انار است که بسته به بازده تولید کارخانه، رقمی بالغ بر ۳۰ تا ۶۰٪ را پوشش می‌دهد. به دلیل اثبات وجود ترکیبات پلی فنولیکی و دارویی در پوست انار، کاربردهای عصاره آن در بحث سلامت بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است[۱۱] و تحقیقات بسیاری نیز، وجود ترکیبات پلی فنولیکی از جمله پونیکالجین (Punicalagin) و مشتقات آلاجیتانن‌ها (Ellagitannin) با خواص ضد اکسیدانی در پوست انار را اثبات نموده‌اند[۱۲، ۱۴].

در سال‌های اخیر در صنعت آبزی‌پروی نیز به تاثیرگذاری رژیم غذایی غنی از عصاره الکلی پوست کامل انار بر بهبود شاخص‌های خونی و ایمنی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) [۹]، بر بهبود کیفیت و ماندگاری فیله کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) [۱۹]، بر تغییر رنگ پوست، گوشت و خون در ماهی قزل آلای رنگین‌کمان(*Oncorhynchus mykiss*) [۱۰] و بر تقویت سیستم ایمنی و بهبود فعالیت ضد میکروبی بدن سفره ماهی (*Paralichthys olivaceus*) [۲۰-۲۱] و ماهی کپور معمولی[۲۲] در برابر عوامل بیماری‌زای میکروبی، اشاره شده است. با این‌حال، در ارتباط با تاثیر عصاره الکی پوست انار بر عملکرد سیستم ایمنی و بیوشیمیایی بدن ماهیان تحت شرایط استرس‌زای ناشی از تراکم ذخیره‌سازی، تاکنون گزارشی ارائه نشده است. بدین منظور در تحقیق حاضر بر آن شدیم تا با افزودن عصاره‌ی اتانولی پوست انار به جیره‌ی غذایی ماهیان کپور معمولی که یکی از گونه‌های مقاوم و رایج در سیستم‌های تکثیر و پرورش ماهیان گرم آبی در ایران و بالاخص استان خوزستان می باشد، تغییرات عملکردی سیستم ضداکسیدان و فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون این ماهیان را تحت تیمار با سطوح مختلف تراکم ذخیره‌سازی به مدت ۴۵ روز مورد پایش قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در مرکز تحقیقات تکثیر و پرورش آبزیان واقع در منطقه چنیبه اهواز اجرا گردید. به منظور اجرای این طرح از ۱۲ مخزن فایبر گلاس ۳۰۰ لیتری استفاده گردید. پس از شستشو و ضدعفونی کردن مخازن، دو روز قبل از انتقال ماهیان، آبگیری مخازن انجام شده و به وسیله پمپ هوا اکسیژن دهی آب انجام پذیرفت.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-02-08]

به منظور اجرای تحقیق، ۷۲۰ قطعه بچه‌ماهی کپور معمولی (*C. carpio*) با وزن ۱۸/۱۲±۴۰/۸۴ گرم از مرکز تکثیر و پرورش شهید ملکی اهواز خریداری شد و با استفاده از کپسول اکسیژن و مخازن مخصوص حمل ماهی به مرکز تحقیقات تکثیر و پرورش چنیبه منتقل گردید. ماهی‌ها از نظر ظاهری و سلامت مورد بررسی کلینیکی قرار گرفته و در ادامه به منظور سازگاری با شرایط مرکز تحقیقات (دمای آب ۳°C±۲۶، اکسیژن ۰/۸±۵/۹ ppm و pH ۰/۲ ± ۷/۶) به مدت دو هفته در مخازن ۱۷۰۰ لیتری نگه داری شدند. غذادهی ماهیان در طول دوره سازگاری با جیره اصلی (جدول۱) انجام گرفت. غذادهی روزانه به میزان ۲/۵٪ وزن توده زنده و سه بار در روز انجام پذیرفت. اجزای جیره از شرکت بهدانه تهیه و به تفکیک با ترکیب ذکر شده در جدول یک ساخته شد. غذاهای تهیه شده در دمای معمولی آزمایشگاه به مدت ۲۴ ساعت خشک و در کیسه‌های پلاستیکی بسته‌بندی و در یخچال تا زمان مصرف نگهداری شدند. آنالیز تقریبی جیره در جدول ۲ گزارش شده است.

جدول ۱. ترکیبات مورد استفاده در جیره غذایی (درصد) در آزمایش

اجزاء غذایی جیره	آرد گندم	آرد سویا	آرد ماهی	روغن ماهی	روغن گیاهی (آفتابگردان)	ملاس	پرمیکس ویتامین	پرمیکس مواد معدنی
درصد	۲۵	۴۳	۲۳	۳	۳	۲	۰/۵	۰/۵

جدول ۲. آنالیز تقریبی غذا (درصد در وزن خشک)

انرژی خام (Kcal/kg)	پروتئین خام	چربی خام	فیبر	رطوبت	خاکستر
۳۵۰۰	۳۶-۳۸	۹-۱۰	۵	کمتر از ۸	۱۱-۱۲

تهیه عصاره الکلی از پوست انار

جهت تهیه عصاره الکلی پوست انار، ابتدا میوه انار کاملاً در آب شستشو داده شده و پوست آن جداسازی شده و در سایه خشک گردید. سپس پوسته‌های خشک انار پودر و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج عصاره الکلی با استفاده از روش Harikrishnan و همکاران [۲۲] انجام شد. برای این منظور، ۱۰۰ گرم از پودر پوست انار در ارلن دو لیتری استریل با یک لیتر اتانول ۹۸٪ مخلوط شده و سر ارلن با فویل آلومینیومی پوشش‌گذاری گردید و به مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و در انکوباتور شیکردار و در تاریکی نگه‌داری شد. عصاره الکلی با کاغذ صافی فیلتر شده و حلال با استفاده از دستگاه روتاری VDW (مدل Silver Reciproc ، آلمان) تغلیظ گردید.

تهیه جیره غذایی تیمار

ابتدا جیره‌ی غذایی ماهی کپور معمولی با استفاده از اقلام (پودر ماهی، پور سویا، آرد گندم، روغن آفتاب گردان، مخلوط ویتامین، مخلوط مواد معدنی) تهیه شد. در ادامه عصاره الکلی پوست انار با غلظت ۶۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم از جیره غذایی (۶۰۰ mg/kg) توزین و آماده سازی شد. سپس به منظور توزیع یکنواخت عصاره پوست انار در کل محتوای جیره، این میزان عصاره در مقادیر مناسبی از آب مقطر حل شده و با افزودن آن به کل مواد خشک جیره با استفاده از همزن برقی به خوبی با دیگر اجزای جیره همگن گردید. در ادامه با استفاده از چرخ گوشت این خمیر به صورت پلت غذایی با قطر ۲ میلی‌متر در آمده و پس از خشک شدن با استفاده از کاتر خرد گردید و با استفاده از الک اندازه آن تنظیم و یکنواخت شد، جیره‌ی آماده شده پس از بسته‌بندی تا زمان مصرف در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه داری شد.

تیمار بندی ماهیان

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-02-08]

پس از اتمام دوره سازگاری ماهیان با شرایط آزمایش، بچه ماهیان در سطوح مختلف تراکم ذخیره‌سازی (۳، ۵ و۱۰ کیلوگرم در مترمکعب) به گروه‌های تیمار و شاهد (مجموعاً ۶ گروه) در ۳ تکرار به صورت کاملاً تصادفی دسته‌بندی شدند که به قرار زیر می باشد:

۱- گروه شاهد در تراکم Kg/m^3 ۳ (تغذیه با جیره غذایی معمول ماهی کپور)

۲- گروه تیمار در تراکم Kg/m^3 ۳ (تغذیه با جیره حاوی ۶۰۰ میلی‌گرم عصاره الکلی پوست انار)

۳- گروه شاهد در تراکم Kg/m^3 ۵ (تغذیه با جیره غذایی معمول ماهی کپور)

۴- گروه تیمار در تراکم Kg/m^3 ۵ (تغذیه با جیره حاوی ۶۰۰ میلی‌گرم عصاره الکلی پوست انار)

۵- گروه شاهد در تراکم $Kg/m^3$۱۰ (تغذیه با جیره غذایی معمول ماهی کپور)

۶- گروه تیمار در تراکم Kg/m^3 ۱۰ (تغذیه با جیره حاوی ۶۰۰ میلی‌گرم عصاره الکلی پوست انار)

شرایط و مدت اجرای پرورش

پس از معرفی ماهیان به مخازن در سطوح مختلف تراکم ذخیره‌سازی برابر با ۳، ۵ و۱۰ کیلوگرم در مترمکعب، در دوره پیش تیمار، ابتدا به مدت دو روز ماهیان غذادهی نشدند تا میزان استرس آنها کاهش یابد و دستگاه گوارش نیز عاری از هرگونه مواد غذایی قبلی گردد. سپس به مدت ۵ روز بچه ماهی‌ها با خوراک پایه تغذیه شدند تا در سطوح مختلف تراکم ذخیره‌سازی نیز شرایط یکسانی برای همه ماهیان از منظر تغذیه فراهم گردد. در ادامه، یک دوره پرورشی تیماربندی شده ۴۵ روز در نظر گرفته شد که با تغذیه از خوراک غنی شده با عصاره الکی انار در هر تیمار صورت گرفت. در انتهای دوره تمامی ماهی‌ها صید شده، ابتدا به‌واسطه انتقال به سطل حاوی ۰/۲ میلی لیتر از داروی بیهوشی۲- فنوکسی اتانول به ازای هر لیتر از آب مخازن، بیهوش شدند. سپس خون‌گیری از ماهیان با استفاده از سرنگ هپارینه از ناحیه ساقه دمی ماهی در ۹ قطعه ماهی از هر تیمار (با احتساب سه تکرار) صورت پذیرفت. برای جداسازی سرم، نمونه‌های خون به مدت ۱۰ دقیقه با دور۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند، سپس نمونه‌های سرم از خون جدا شده و تا قبل از انجام آزمون‌های بیوشیمیایی در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند[۵].

سنجش فاکتورها

اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی پلاسمای خون نظیر غلظت کلر، فسفر، کلسیم و منیزیوم در گروه‌های تیمار و شاهد ماهی کپور معمولی با استفاده از کیت‌های تهیه شده از شرکت پارس آزمون و مطابق با دستورالعمل مربوط به هر کیت با دستگاه اسپکتوفتومتر UV/VIS یونیکو (ساخت آمریکا، مدل ۲۱۰۰)، بر حسب میلی‌گرم در دسی‌لیتر سنجش گردید.

غلظت گلوکز پلاسما براساس روش آنزیمی گلوکز اکسیداز سنجش گردید. در این روش، گلوکز موجود در نمونه پلاسما توسط آنزیم اختصاصی گلوکز اکسیداز به گلوکونیک اسید و آب اکسیژنه تبدیل شده و آب اکسیژنه نیز به روش تریندر(Trinder) اندازه‌گیری می‌گردد. در واکنش تریندر، آب اکسیژنه با یک ترکیب فنل و آمینوآنتی پایرن ((Aminoantipyrine (AAP)) و در حضور آنزیم پراکسیداز تشکیل کمپلکس قرمز رنگی به نام کینونیمین (Quinoneimine) داده که در طول موج ۵۱۰ نانومتر رنگ‌سنجی می‌گردد[۲۳]. برحسب میزان جذب نوری (OD) نمونه در قیاس با سطح گلوکز استاندارد و براساس فرمول ارائه شده در کاتالوگ کیت تهیه شده از شرکت پارس آزمون، نتایج محاسبه گردید.

اندازه‌گیری کلسترول براساس روش آنزیمی((Cholesterol oxidase/peroxidase aminophena-zone (CHO-PAP)) صورت گرفت. در این روش، ابتدا استرهای کلسترول توسط آنزیم کلسترول-استراز به کلسترول آزاد هیدرولیز می‌شوند. سپس کلسترول در حضور اکسیژن مولکولی اکسید و آب اکسیژنه تولید می‌گردد. سپس آب اکسیژنه به روش تریندر سنجش می‌شود. در واکنش تریندر، آب اکسیژنه با یکAAP و در حضور آنزیم پراکسیداز تشکیل محصول قرمز رنگی به نام کینونیمین می‌دهد که در طول موج ۵۱۰ نانومتر رنگ سنجی شد[۲۴]. نتایج برحسب میزان OD نمونه در قیاس با سطح کلسترول استاندارد و براساس فرمول ارائه شده در کاتالوگ کیت محاسبه شد.

اندازه‌گیری تری‌گلیسریدهای پلاسما براساس روش آنزیمی ((Glycerol phosphate oxidase (GPO-PAP) صورت پذیرفت. در این روش، تری‌گلیسرید توسط آنزیم لیپاز به گلیسرول و اسید چرب هیدرولیز می شود. سپس گلیسرول در طی چند واکنش متوالی منجر به تولید

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-02-08]

محصول فرعی آب اکسیژنه می‌گردد. آب اکسیژن تولید شده نیز توسط واکنش ترینذر انداه‌گیری می شود. در این واکنش، آب اکسیژنه با یک AAP و در حضور آنزیم پراکسیداز تشکیل محصول قرمز رنگی به‌نام کینوایمین می‌دهد که در طول موج ۵۱۰ نانومتر رنگ‌سنجی شده و برحسب میزان جذب نوری سطح تری‌گلیسرید استاندارد و براساس فرمول ارائه شده در کاتالوگ کیت محاسبه گردید[۲۴].

اندازه‌گیری فعالیت ضداکسیدانی پلاسما خون

میزان پروتئین کل

سنجش میزان پروتئین کل، پلاسمای خون با استفاده از روش Bradford [۲۵]، انجام پذیرفت. در این روش برای تعیین غلظت پروتئین، از منحنی استاندارد پروتئین آلبومین گاوی (Bovine serum albumin (BSA)) ۰/۲ mg/ml، استفاده گردید. در ادامه، طیف جذبی نمونه‌ها، توسط دستگاه میکروپلیت‌ریدر BioTek، در طول موج ۵۹۵ nm قرائت گردید. تمامی فعالیت ضداکسیدانی بر مبنای غلظت پروتئین پلاسما (میلی گرم از وزن پروتئین بافت‌تر) گزارش گردیده است.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز(CAT)

فعالیت آنزیم کاتالاز نمونه‌های سرم خون ماهیان در پژوهش حاضر، بر مبنای روش پیشنهادی Koroluk [۲۶]، سنجش گردید. در این روش آمونیوم مولیبدات با پراکسید هیدروژن موجود در محیط تشکیل کمپلکس زرد رنگی می دهد. غلظت آنزیم بر مبنای قرائت اختلاف جذب نوری(Δ) بین نمونه A(s) و کنترل A(c) در طول‌موج ۴۱۰ نانومتر، توسط دستگاه میکروپلیت‌ریدر BioTek بر حسب واحد میکرومول از آنزیم به ازای هر میلی‌گرم از وزن پروتئین بافت‌تر سنجش گردید.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز(SOD)

مطابق بر روش رنگ سنجی پیشنهادی Kono [۲۷]، در تحقیق حاضر، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) مبتنی بر مهار رادیکال‌های سوپراکسید تولیدی طی فرآیند اتوکسیداسیون هیدروکسیل آمین هیدروکلراید (Hydroxylamine hydrochloride) و احیا نیتروبلوتترازولیوم (Nitroblue tetrazolium (NBT))و نیز تشکیل کمپلکس آبی-بنفش رنگ فورمازان (Formazan) اندازه‌گیری گردید. فعالیت ویژه آنزیمیSOD بر حسب واحد میکرومول از آنزیم به ازای هر میلی گرم از وزن پروتئین بافت‌تر در زمان واکنش گزارش گردید.

میزان گلوتاتیون(GSH)

در مطالعه حاضر، سنجش میزان گلوتاتیون احیاء- γ (گلوتامیل سیستئینیل گلایسین) γ-glutamylcysteinylglycine) (Glutathione (or GSH)) به عنوان یک ترکیب ضد اکسیدان غیرآنزیمی به روش Ellman [۲۸]، انجام پذیرفت. در این روش از محلول -5,5′ dithiobis(2- nitrobenzoic) acid (DTNB)) موسوم به معرف اِلمن به منظوراحیای گلوتاتیون با این معرف و تشکیل کمپلکس زردرنگ استفاده می شود. این کمپلکس پرتوهای یکنواختی با طول موج ۴۱۲ نانومتر را جذب می کند. در نهایت غلظت گلوتاتیون در قیاس با جذب منحنی استاندارد سنجش گردید.

فعالیت پراکسیداسیون لیپیدی (LPO/MDA)

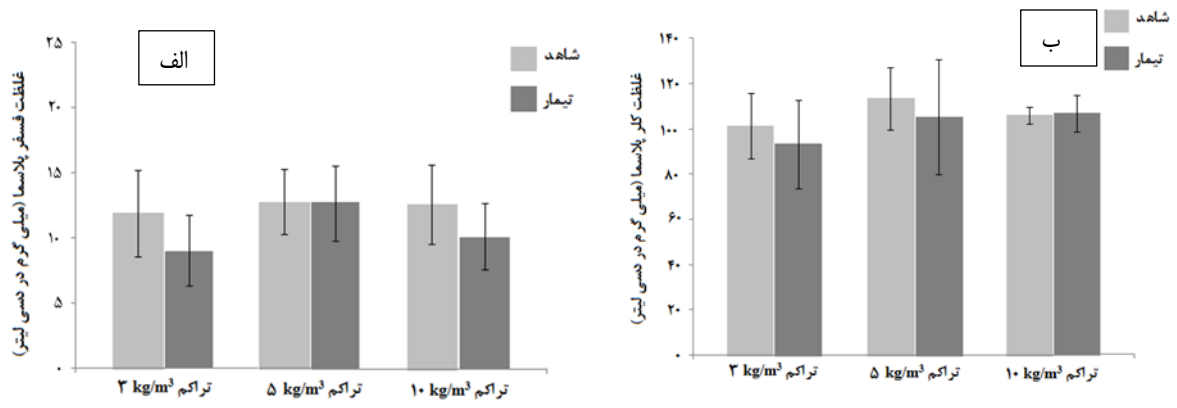
غلظت مالون دی آلدهید (MDA)، به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی بر مبنای واکنش آن با تیوباربیتوریک اسید و بر اساس روش گزارش شده Konukoglu [۲۹]، اندازه گیری شد. در این روش MDA با دو مولکول تیوباربیتوریک اسید واکنش می دهد و ترکیبی با رنگ متمایل به قرمز ایجاد می کند. سنجش جذب نوری در طول‌موج ۵۳۵ نانومتر، توسط دستگاه میکروپلیت‌ریدر قرائت گردیده و غلظت TBA–MDA درنمونه ها، بر اساس منحنی استاندارد(مبتنی بر هیدرولیز اسیدی۱،۱،۳،۳ تتراتوکسی پروپان محاسبه گردید و بر حسب واحد نهایی میکرومول (µM/L) MDAبه ازای هر میلی‌گرم از پروتئین بافتی (µmolMDA/mg) گزارش شد.

کلیه داده‌های جمع آوری شده در نرم افزار Excel ثبت و داده‌ها توسط نرم افزار SPSS 18 با استفاده از آزمون T جفتی و نیز آنالیز واریانس دو طرفه (Tow-way ANOVA) و پس آزمون دانکن مورد ارزیابی قرار گرفتند و وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین تیمارها و نیز بین گروه‌های تیمار نسبت به گروه‌های شاهد متناظر با آن، در سطح اطمینان ۹۵٪ سنجیده شد.

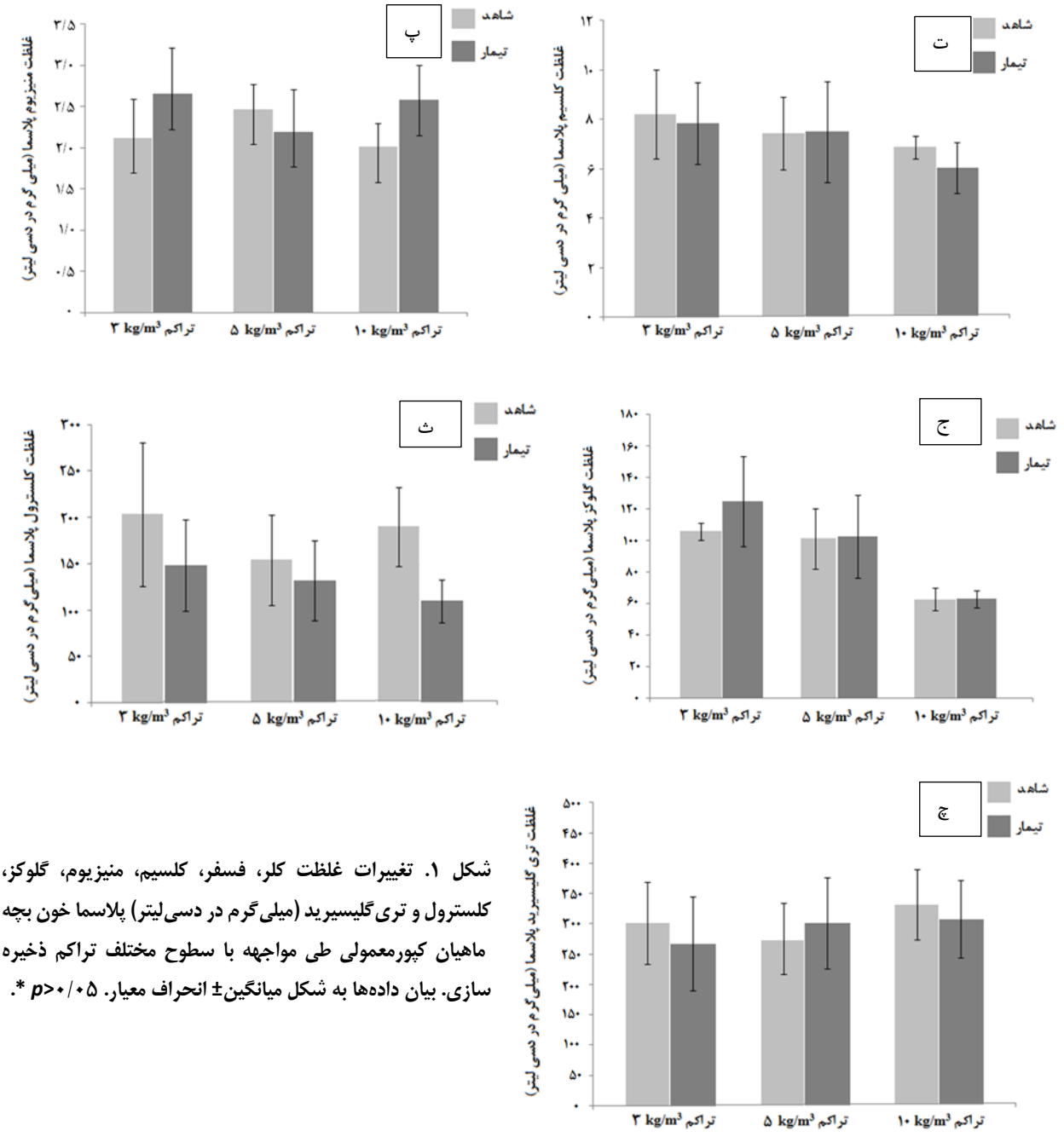
[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-02-08]

نتایج

در تحقیق حاضر، در طی دوره آزمایش در هیچ یک از گروه‌های تیمار و شاهد در سطوح مختلف تراکم ذخیره سازی (۳، ۵ و۱۰ کیلوگرم در مترمکعب) مرگ و میری مشاهده نشد. نتایج تغییرات میزان فسفر سرم خون بچه ماهیان (تغذیه شده با جیره حاوی عصاره الکلی پوست انار)، در طول بازه زمانی ۴۵ روزه آزمایش در قیاس با گروه‌های شاهد متناظر با آن، حاکی از آن است که با افزایش سطح تراکم ماهیان در گروه‌های تیمار، نرخ افزایش سطح فسفر سرم خون، معنی‌دار نبوده است ($p >$ ۰/۰۵) (شکل ۱– الف). نتایج مربوط به مقادیر کلرید سرم خون نیز نشان داد که روند افزایشی غلظت کلر خون ماهیان در میان گروه‌های تیمار در سطوح مختلف تراکم ذخیره سازی و نیز در قیاس با گروه‌های شاهد متناظر، معنی دار نبوده است ($p >$ ۰/۰۵) (شکل ۱– ب). شیب کاهشی منیزیم سرم خون نیز طی تیمار ماهیان تحت سطوح مختلف تراکم ذخیره سازی اختلاف معنی داری را بین گروه‌ها به نمایش نمی‌گذارد($p >$ ۰/۰۵) (شکل ۱– پ). در تحقیق حاضر سنجش مقادیر کلسیم سرم نشان داد که با افزایش سطح استرس ناشی از تراکم در ماهیان گروه‌های تیمار، روند کاهشی غلظت کلسیم خون، اختلاف معنی‌داری را به نمایش نمی گذارد ($p >$ ۰/۰۵) (شکل ۱– ت). مقدار کلسترول سرم خون نیز در تمامی گروه‌های تیمار به‌واسطه مصرف جیره غذایی حاوی عصاره انار نسبت به گروه شاهد روند کاهشی داشته است (شکل ۱– ث). اما در میان گروه‌های تیمار با افزایش سطح تراکم ماهیان، اختلاف معنی‌داری در غلظت کلسترول خون آن‌ها مشاهده نگردید ($p >$ ۰/۰۵) (شکل ۱– ث). تغییرات غلظت گلوکز در گروه‌های تیمار در طول دوره آزمایش نیز، با افزایش سطح استرس ناشی از تراکم کاهش معنی‌داری داشته است($p <$ ۰/۰۵) (شکل ۱– ج). اما به جز سطح تراکم ۳ Kg/m^3 در الباقی گروه‌ها، اختلافی در مقادیر گلوکز سرم خون نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد($p >$ ۰/۰۵) (شکل ۱– ج). اگرچه در تمامی گروه‌ها به جز سطح تراکم ۵ Kg/m^3، مقادیر تری‌گلیسریدهای سرم خون پس از مصرف جیره حاوی عصاره انار نسبت به گروه شاهد کاهش خفیفی داشته است. اما متعاقب روند افزایشی غلظت تری‌گلیسریدها در پاسخ به افزایش سطح استرس ناشی از تراکم ماهیان، اختلاف معنی‌داری در میان گروه‌های تیمار مشاهده نگردید ($p >$ ۰/۰۵) (شکل ۱– چ).



[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-02-08]

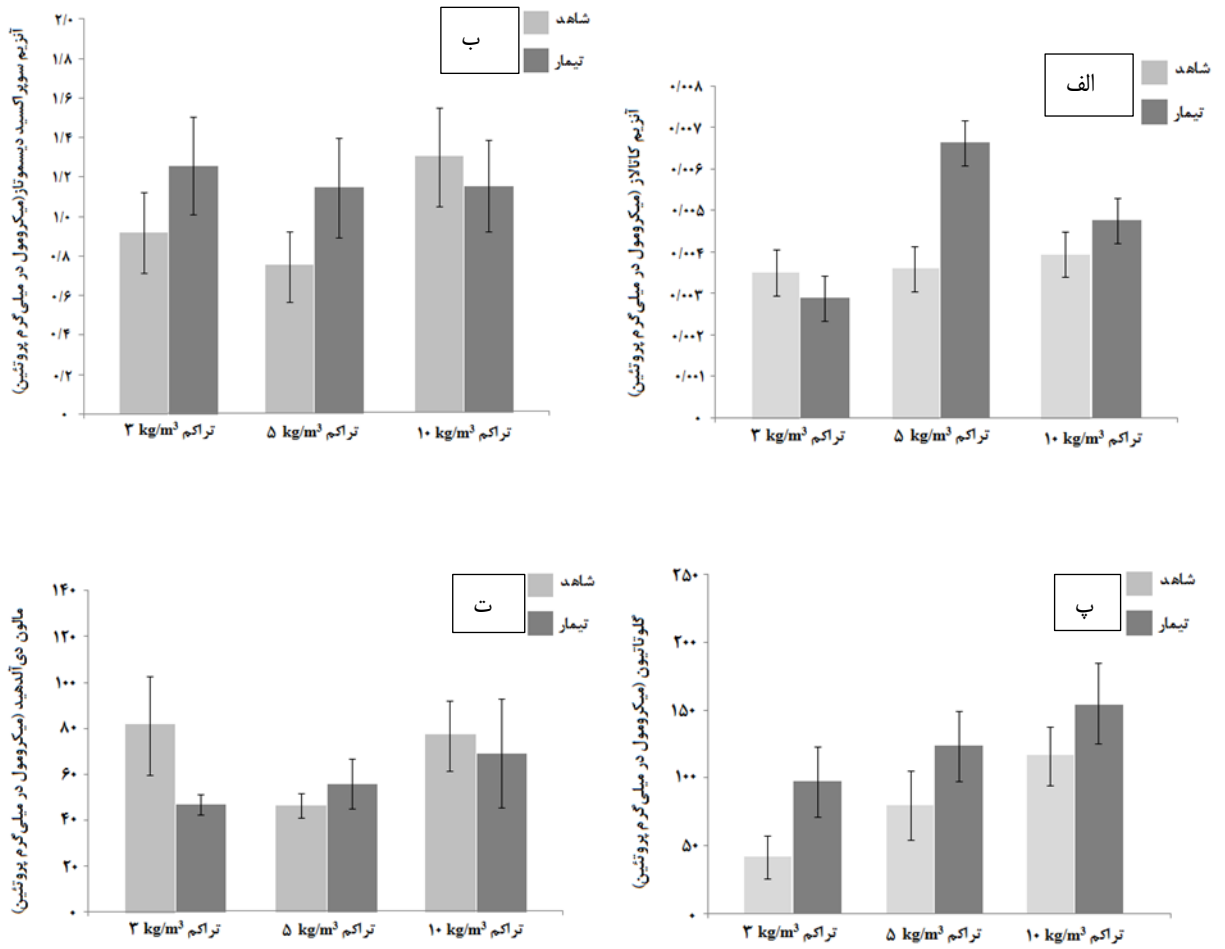


شکل ۱. تغییرات غلظت کلر، فسفر، کلسیم، منیزیوم، گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسیرید (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) پلاسما خون بچه ماهیان کپورمعمولی طی مواجهه با سطوح مختلف تراکم ذخیره سازی. بیان داده‌ها به شکل میانگین± انحراف معیار. $p<۰/۰۵$ *.

نتایج مربوط به سنجش تغییرات غلظت آنزیم SOD در شکل ۲ نشان می دهد که در طول دوره ۴۵ روزه تیمار ماهیان با جیره غذایی محتوی عصاره الکلی انار، با افزایش سطح استرس ناشی از تراکم ماهیان، غلظت آنزیم SOD در تمامی گروه‌های تیمار به جز سطح تراکم ۱۰ Kg/m^3 نسبت به گروه شاهد نرخ افزایشی داشته است (شکل ۲- الف)، اما اختلاف معنی داری میان گروه‌های تیمار مشاهده نگردید ($p>۰/۰۵$) (شکل ۲- الف). نتایج مربوط به سنجش میزان آنزیم کاتالاز سرم خون ماهیان حاکی از آن بود که به‌واسطه مصرف عصاره الکلی انار در جیره غذایی به مدت ۴۵ روز و افزایش سطح تراکم ماهیان در مخازن تیماربندی، افزایش غلظت این آنزیم در تمامی گروه‌ها نسبت به گروه شاهد مشهود بوده لیکن این افزایش تنها در گروه تیمار سطح تراکم ۵ Kg/m^3 معنی دار بوده است($p<۰/۰۵$) (شکل ۲- ب). تعیین مقادیر MDA به عنوان

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-02-08]

شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در تحقیق حاضر نشان داد که با افزایش سطح استرس ناشی از تراکم ماهیان، نرخ پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلولی روند افزایشی داشته ولی به‌واسطه مصرف جیره غنی شده با عصاره انار به جز سطح تراکم Kg/m^3 ۳، اختلاف میان تیمارها معنی دار نبوده است(p >۰/۰۵) (شکل ۲- پ). نرخ تغییرات فعالیت ترکیبات ضداکسیدانی غیرآنزیمی نظیر GSH در شکل ۲ حاکی از آن بوده است که با افزایش سطح استرس ناشی از تراکم ماهیان، غلظت GSH نرخ افزایشی را نسبت به گروه شاهد به نمایش گذارده است و اختلاف بین گروه‌های تیمار نیز معنی‌دار بوده است (p <۰/۰۵) (شکل ۲- ت).



شکل ۲. تغییرات غلظت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، گلوتاتیون و مالون دی‌آلدهید (میکرومول در میلی‌گرم پروتئین) پلاسما خون بچه‌ماهیان کپورمعمولی طی مواجهه با سطوح مختلف تراکم ذخیره سازی. بیان داده‌ها به شکل میانگین± انحراف معیار. p>۰/۰۵ *.

بحث

امروزه علی‌رغم پیشرفت‌های چشمگیر در فناوری‌های آنالیز بیوشیمیایی سرم خون و حصول درک بهتر از وضعیت سلامت فیزیولوژیک جانداران، به دلیل تنوع بسیار بالای گونه‌های آبزیان، متغیر بودن این پارامترها در محیط‌های آبی و بالاخص برخی اختصاصات گونه‌ای، کماکان بهره‌گیری از این فناوری در کنترل تغییرات فیزیوبیوشیمیایی آبزیان در مواجهه با استرس‌های محیطی نظیر تراکم ذخیره‌سازی چندان شناخته شده نمی

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-02-08]

باشد[۳۰-۳۱]. در آبزی پروری علاوه بر کنترل کیفیت تغذیه، بهداشت و سلامت آبزیان، ارکان مهم دیگری نظیر تراکم ذخیره‌سازی نیز بر بازده تولید و سودآوری پرورش گونه‌های مختلف از جمله کپورماهیان بسیار تاثیرگذار بوده است[۳۲-۳۴]. نتایج گزارش‌های اخیر نشان می دهد که در بسیاری از گونه‌های پرورشی، تراکم ذخیره‌سازی رابطه معکوسی با شاخص‌های رشد ماهی، ضریب تبدیل غذایی و تغییرات فیزیولوژیکی پلاسمای خون داشته و بروز این تغییرات با افزایش سطح استرس‌های مرتبط با روابط متقابل ماهیان، رقابت بر سر فضای زیستی و منابع غذایی مرتبط است[۳۳،۳۵]. از سویی دیگر، یکی از راهکارهای پیشنهادی به منظور افزایش سطح پایدار بازده تولید گونه‌های پرورشی، بهره‌گیری از مکمل‌های غذایی فیتوژنیک بوده است که در این میان عصاره پوست انار ضمن اثربخشی بر افزایش مقاومت به میکروب‌ها[۱]، باکتری‌ها و عوامل بیماری‌زا [۲۰-۲۱،۳۶] و بهبود فعالیت گوارشی[۳۷-۳۸]، بر افزایش ضریب رشد[۱] و کیفیت گوشت ماهیان [۱۰،۱۹،۳۹] نیز تاثیرگذار بوده است. به علاوه کنترل شاخص‌های استرس اکسیداتیو و شرایط اکسیدان/ضداکسیدان کبد (یا هپاتوپانکراس) ماهیان پرورشی با استفاده از مکمل‌های غذایی گیاهی با خواص آنتی‌اکسیدانی نظیر عصاره پوست انار، می تواند نقش مهمی در بهبود عملکرد سیستم ایمنی و اندوکرینی و نهایتاً حفظ و ارتقای سلامت ماهی داشته است[۴۰].

در مطالعه حاضر با تجویز خوراکی عصاره الکلی پوست انار تغییرات معنی داری در اکثریت فراسنجه‌های بیوشیمیایی (فسفر، کلر، منیزیم، کلسیم و تری‌گلیسرید) سرم خون بچه‌ماهی کپور معمولی تیمار شده در قیاس با گروه شاهد مشاهده نگردید، ولی بعضاً در فاکتورهای مرتبط با شاخص‌های استرس ناشی از تراکم نظیر گلوکز و کلسترول تغییرات معنی‌دار بوده است. در پژوهش حاضر در طول دوره ۴۵ روزه با افزایش سطح تراکم ذخیره‌سازی مقادیر کلر و فسفر در قیاس با گروه های شاهد روند افزایشی داشته ولیکن کلسیم و منیزیم شیب کاهشی را به نمایش گذارده اند، اگرچه تفسیر دقیق تغییرات مقادیر الکترولیت‌ها تحت شرایط استرس در ماهیان مختلف متغییر بوده و نیاز به مطالعات بیشتری است ولی به نظر می‌رسد این هیپوکلسمی خفیف با اختلال در ورود الکترولیت‌ها از آبشش و اختلال در عملکرد کلیه[۴۱]، به دلیل افزایش تراکم ذخیره‌سازی، کاهش فضای زیستی/تحرکی ماهیان و تغییرات آبشش‌ها متاثر از افت سطح اکسیژن و نیز با افزایش سطح مواد دفعی (آمونیاک) در واحد حجم مرتبط بوده[۴۲] و نهایتاً سطوح جذبی یون‌ها را در خون بچه‌ماهی کپور معمولی تقلیل بخشیده است. اگرچه در توافق با نتایج مطالعه حاضر، کاهش میزان کلسترول سرمی (هیپوکلسترومی) به دنبال افزایش استرس ناشی از تراکم ذخیره‌سازی در بچه ماهیان تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*) نیز سابقاً گزارش شده بود[۴۲]. اما با توجه به تجویز خوراکی عصاره پوست انار با خواص ضداکسیدانی در غذای بچه ماهیان کپور معمولی در تحقیق حاضر، این احتمال نیز قابل طرح است که این سطوح کاهشی کلسترول با تغییرات هیدروبیک (آماس) بافتی و مهار تبدیل کلسترول استرهای هیدروپراکسید ((Cholesterol ester hydroperoxide (CEOOH)) به کلسترول نیز مرتبط باشد[۴۳]. زیرا کلسترول استرهای هیدروپراکسید یکی از محصولات اصلی پراکسیداسیون لیپیدی است که مشتمل بر لیپوپروتئین‌های اکسید شده با چگالی کم ((Low-density lipoprotein (LDL)) می باشد[۴۴]. در توافق با این فرضیه، همانطور که در شکل های ۱- ث و ۲- پ مشاهده گردید، علی رغم اینکه روند تغییرات سطوح MDA در شرایط استرس ناشی از تراکم ذخیره‌سازی در بچه ماهیان تیمار شده معنی دار نیست اما به نظر می رسد افزودن ضداکسیدان‌هایی چون عصاره انار به جیره غذایی ماهیان در گروه تیمار توانسته، سطوح پراکسیداسیون لیپیدی و دیگر محصولات فرعی آن نظیر کلسترول را در قیاس با گروه شاهد تقلیل بخشد[۴۴-۴۵]. با این‌حال، افزایش سطح تراکم ذخیره سازی با افزایش ترشح هورمون‌های استرسی نظیر کورتیزول نیز همسو است[۴۲] و از آنجا که کلسترول به عنوان بخش ساختاری اصلی از غشای سلولی و لایه خارجی لیپوپروتئین‌های پلاسما، پیش ساز تمامی هورمون‌های استروئیدی از جمله کورتیزول است این کاهش کلسترول می‌تواند متاثر از افزایش سطح کورتیزول نیز باشد[۴۶]. گلوکز خون ماهیان، به‌عنوان یک شاخص پاسخ به استرس، عموماً پارامتری بسیار متغییر است که در میان گونه‌های مختلف ماهیان و حتی بین افراد یک گونه هم بعضاً تفاوت‌هایی را به نمایش می‌گذارد که شدیداً تحت‌تاثیر شرایط محیطی آبزی می باشد[۴۷]. با این وجود، هنگامی‌که بدن ماهیان مقابله با عامل چالشی استرس‌زا را آغاز می کند، به‌طور معمول، قند خون یک افزایش سطح اولیه را نشان داده ولی با تداوم بلند مدت عامل تنش، سطح قندخون نیز افت می‌کند[۴۸]. در تحقیق حاضر، این کاهش سطح انرژی (گلوکز) می تواند متاثر از مواجهه ۴۵

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-02-08]

روزه ماهیان با تنش افزایش سطح تراکم ذخیره‌سازی در مخازن تیماربندی باشد ولیکن این احتمال نیز قابل طرح است که غلظت پیشنهادی ۶۰۰ mg/kg از مکمل‌های غذایی مصرفی (عصاره الکلی پوست انار) نتوانسته در مقابله با استرس ناشی از تراکم ذخیره سازی کاملاً موثر واقع شده و افت سطح انرژی ماهیان را مهار نماید. در ارتباط با تری گلیسریدها نیز در پژوهش حاضر، اگرچه با افزایش سطح استرس متاثر از تراکم ماهیان، مقادیر تولیدی آنها اندکی افزایش داشته است. ولی سطوح کاهشی تری گلیسریدها در گروه تیمار در قیاس با گروه شاهد نیز کاملاً مشهود است که تا حدودی با نتایج گلوکز همخوانی دارد، زیرا احتیاجات انرژی در ماهیان تحت تنش منجر به افزایش سنتز و فراخوانش مداوم تری گلیسریدها به عنوان قطرات چربی و مصرف آن‌ها در فرآیند بیوژنز غشایی خواهد گردید[۴۹] و این مصرف و کاهش تری گلیسریدها در گروه تیمار نسبت به شاهد، احتمالاً در جهت جبران افت گلوکز به عنوان دیگر منبع انرژی بوده است.

ماهیان تحت تاثیر شرایط استرس‌زای محیط، با افزایش سطح متابولیسم و عدم تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species (ROS)) و خنثی سازی سلولی آن‌ها مواجه می‌گردند که نهایتاً تلاش در جهت پاکسازی آکسی‌رادیکال‌های آزاد، تنظیم و تعدیل آن‌ها، مصرف آنزیم و تخریب ساختار آنزیمی طی مقابله با سوپررادیکال‌های فعال را در پی خواهد داشت. لذا در این موقعیت، نخستین سد دفاعی ماهیان در برابر رخداد تنش اکسیداتیو، تحریک سیستم دفاعی و ایمنی بدن آبزی است که مشتمل بر آنزیم‌های ضداکسیدانی از قبیل کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و ضداکسیدان‌های غیرآنزیمی چون گلوتاتیون است که مسبب تبدیل آنیون سوپراکسید (O^{2-}) به پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و سپس به آب و اکسیژن خواهد بود، از این‌رو، افزایش فعالیت این آنزیم‌ها نشان دهنده حذف رادیکال‌های آزاد و غلبه بر شرایط استرس اکسیداتیو است[۵۰]. نتایج گزارش شده در مطالعه حاضر نیز، اگرچه ارتقای سطوح عملکردی سیستم دفاع ضداکسیدانی و افزایش سطوح فعالیت SOD، CAT و GSH و کاهش نرخ پراکسیداسیون لیپیدی غشا (تولید MDA) در گروهای تیمار تحت تنش تراکم ذخیره سازی را در قیاس با گروه شاهد تایید نموده است. ولیکن حفظ و تقویت سطوح القایی فعالیت ضداکسیدانها در طول کل بازه زمانی آزمایش را می توان مرهون وجود احتمالی ترکیبات زیست فعال پلی فنوله در مکمل غذایی گیاهی مصرفی در جیره (عصاره پوست انار) و خصوصیات ضداکسیدانی آنها دانست[۵۱،۱۵-۵۲].

آنتوسیانین‌های موجود در عصاره پوست انار، یکی از مهمترین گروه‌های رنگدانه‌های طبیعی قرمز و ارغوانی بوده که از جمله ترکیبات پلی فنلی است و دردسته فلاونوئیدها طبقه بندی می شود [۱۱]. پژوهش Elswijk و همکاران [۵۳] نیز، شناسایی و سنجش سه ترکیب فلاوونوئیدی نظیر لوتئولین، کمپفرول و کوئرستین را در عصاره الکلی پوست انار گزارش نمودند و این محققین اذعان داشتند که راندمان استخراج ترکیبات فنوله از پوست انار بسیار متاثر از نوع حلال‌ها، ترکیب و قطبیت آن‌ها نیز است.

در توافق با نتایج پژوهش حاضر، مطالعات انسانی و حیوانی (مدل موش) نیز تاثیر مصرف آب انار در بهبود شرایط ضد اکسیدانی بدن را تایید نموده اند[۵۴-۵۵]. در مطالعه Hamed و Abdel-Tawwab [۵۶] نیز، تجویز خوراکی پودر خشک (آرد) پوست انار (۵٪) در جیره غذایی ماهیان تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) توانست پاسخ‌های سیستم ایمنی، ضداکسیدانی و هماتوبیوشیمیایی آنان در مواجهه با اثرات مخرب کبدی-کلیوی نانوذرات نقره طی یک دوره تیمار تحت حاد ۶ هفته ای را تخفیف داده و توان دفاعی آنان را ارتقا بخشد. در این مطالعه شاخص‌های استرس (تغییرات غلظت گلوکز و کورتیزول)، نشانگرهای آسیب‌های اکسیداتیو بافت کبد (تغییرات سطوح فعالیت آنزیم های آلانین و آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST/ALT))، شاخص آسیب‌های بافت کلیه (تغییرات کراتین و اسید اوریک)، شاخص ایمنی (تغییرات فعالیت لیزیوزیم، انفجار تنفسی و مقادیر تام ایمونوگلوبولین‌ها) و نشانگرهای سیستم دفاع ضداکسیدانی (تغییرات SOD، CAT، GSH و MDA)، همگی بر نقش موثر مکمل غذایی پوست انار در تعدیل پارمترهای مرتبط با استرس صحه گذاشتند. بنابر گزارش شفیعی و همکاران [۹]، تجویز خوراکی عصاره الکلی پوست انار (۳۰۰ mg/kg) توانست سطوح محرکه فاکتورهای خونی و ایمنی (سطوح پروتئین تام سرم و فعالیت لیزوزومی) را در ماهی کپور معمولی انگشت قد طی یک دوره تیمار ۷۵ روزه بهبود بخشد. تقوی اصل سوق و همکاران [۳۹] نیز گزارش نمودند که با افزایش غلظت افزونه عصاره اتانولی پوست انار به گوشت چرخ شده ماهی کپور معمولی، میزان فعالیت ضدمیکروبی و ضد اکسیدانی فیله و به تبع آن سلامت این ماده غذایی برای مصرف کننده ارتقا می یابد. در دیگر حیوانات پرورشی نظیر جوجه‌های گوشتی نیز، تاثیر افزودن خوراکی عصاره پوست انار بر بهبود

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-02-08]

صفات عملکردی، شاخص‌های رشد و بازماندگی، شاخص‌های خونی، افزایش خوراک مصرفی و گوارش‌پذیری ماده غذایی، فلور میکروبی روده و سیستم ایمنی برای جاندار مطلوب گزارش شده است [۵۷،۸]. در یک پژوهش جالب توجه نیز Zamora-López و همکاران [۵۸] اذعان نمودند که مکمل غذایی روغن هسته انار(PSO[1]) که عمدتاً غنی از اسید پونیک(PA[2]) و امگا–۵ است، یک ضداکسیدان قوی با اثرات مفید بر شاخص‌های سندرم متابولیک در موش‌ها بوده است. زیرا PSO با افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب در سلولهای کبدی و القای بیان ژن‌های ضداکسیدان‌ها توانسته تجمع سلول‌های چربی را در موش‌ها تعدیل بخشد.

نتیجه گیری کلی

نتایج مطالعه تجربی حاضر نشان می دهد که بهره‌گیری از نشانگرهای زیستی بالقوه در آبزی‌پروری، توانسته به نحوی کارآمد تاثیرات متقابل و توامان پارامتر زیستی مختلف نظیر اثرات سطوح مختلف تراکم ذخیره‌سازی ماهیان و تجویز جیره غذایی غنی شده با افزودنی‌های فیتوژنیک را بر سلامت بچه ماهیان کپور معمولی رهگیری و آشکار نماید. بنابر یافته‌های ارائه شده در پژوهش حاضر، افزونه مکمل غذایی عصاره پوست انار با توجه به خواص ضداکسیدانی و محتوای ترکیبات زیست فعال احتمالی آن، توانسته موجبات تحریک و تقویت سیستم ایمنی بچه ماهیان کپور معمولی بالاخص در سطوح بالای تراکم ذخیره‌سازی را فراهم نماید و از منظر دوز مصرفی نیز، تجویز این مکمل غذایی با غلظت ۶۰۰ mg/kg در سیستم‌های پرورش متراکم بچه‌ماهیان کپور معمولی تا سطح ذخیره‌سازی ۱۰ Kg/m^3، اثربخشی مطلوبی را بر سیستم دفاع ضداکسیدانی و فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون این ماهیان به نمایش گذارده است. با این‌حال، تجویز خوراکی این مکمل و سطوح غلظتی بهینه آن در جیره غذایی ماهیان پرورشی، نیازمند مطالعات بیشتر و تکمیلی است.

تاییدیه های اخلاقی

موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع

موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع مالی/ حمایت ها

این پژوهش با حمایت های مالی دانشگاه شهید چمران اهواز صورت پذیرفته است.

منابع

1. Moradi S.E, Kazeminiya S, Shabani A, Mansuori P. Mutual effect surveys of culture density, temperature and water volume on feed consumption, food conversion ratio and growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics. 2013; 12(2): 107-119.
2. Backiel T, LeCren E.D. Some density relationship for the population parameters. In: Ecology of freshwater fish production (ed. S.D. Gerkings), Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1978. pp. 279- 302.
3. Gholipoor F, Allame S.K, Mohamadi Arani M, Nasre Esfahani M. Effect of density on growth and feed conversation ratio in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Research and development in livestock and aquaculture. 2006; 23-27.
4. van Speybroeck M. Fresh water fish larvae culture: experimental set up to investigate quantitative feed requirements. In: Agh, N.; Sorgeloos, P. (Ed.). First Regional Workshop on Techniques for Enrichment of Live Food for Use in Larviculture (Valenciennes 1840) at the weaning time. Aquaculture Research. 2005; 39: 24-32.
5. Mohammadian T, Mashjoor S, Ghanei-Motlagh R, Khaj H, Robatkarimi. Effect of diet administration of Myrtus essential oils (*Myrtus communis* L.) on biochemical and antioxidant parameters of Common carp (*Cyprinus carpio*) blood serum. Journal of Aquaculture Development. 2020; 14 (3):113-126.
6. Peterson B.C, Bosworth B.G, Li M.H, Beltran R, Santos G.A. Assessment of a phytogenic feed additive (Digestarom PEP MGE) on growth performance, processing yield, fillet composition, and survival of channel catfish. Journal of the World Aquaculture Society. 2014; 45(2): 206-212.

Pomegranate seed oil (PSO)-1

Punicic acid (PA)-2

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-02-08]

7. Abdel-Tawwab M, Ahmad M.H, Khattab Y.A. Shalaby A.M. Effect of dietary protein level, initial body weight, and their interaction on the growth, feed utilization, and physiological alterations of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Aquaculture. 2010; 298(3): 267-274.
8. Abedi S, Hosseini-Vashan S. J, Farhangfar S. H, Ghiasi S.E. Effect of pomegranate peel extract supplementation on performance traits, blood metabolites, small intestine morphology and meat stability in broiler chicks fed diet supplemented with canola oil. Animal Production Research. 2019; 8 (3):13-24.
9. Shafiei F, Soofiani N. M, Ebrahimi E, Nematollahi A Mohebbi A. Effect of alcoholic extract of pomegranate peel (*Punica granatum* L.) on blood parameters of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerling. Journal of Fisheries Science and Technology. 2016; 5 (2):59-72.
10. Avazeh A., Emadi H, Negarestan H, Jani Khalili K. Effect of pomegranate peel meal on the change in the fillet, blood and skin color of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Marine Science and Technology Research .2015; 10(1):1-9.
11. Zarezadeh Mehrizi R.A, Emam-Djomeh Z, Shahedi Bagh Khandan M, Loni E, Akhavan H.R, Biabani J. Identification and quantification of anthocyanins in pomegranate peel extract. Iranian Journal of Food Science and Technology 2015; 49(12):31-40.
12. Qu W, Breksa A.P, Pan Z, Ma H. Quantitative determination of major polyphenol constituents in pomegranate products. Food Chemistry. 2012; 132: 1585-1591.
13. Fisher U.A, Carle R, Kammerer D.A. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juiced by HPLC-DADESI/MS. Food Chemistry. 2011; 127: 807-821.
14. Singh R.P, Murthy K.N.C, Jayakrapasha G.H. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extraction using in vitro model. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 2002; 50, 81-86.
15. Singh B, Singh J.P, Kaur A, Singh N. Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (Punica granatum L.) peel: A review. Food Chemistry. 2018; 261:75-86.
16. Poyrazog E, Kmenw W, Artik N. Organic acids and phenolic compounds in Pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. Journal of Food Composition and Analysis. 2002;15(5):567-575.
17. Ozkan M, Karca A, Cemero B. Effects of hydrogen peroxide on the stability of ascorbic acid during storage in various fruit juices. Food Chemistry. 2004; 88(4):591-597.
18. Melgarejo P, Salazar D, Artes F. Organic acids and sugars composition of harvested Pomegranate fruits. European Food Research and Technology. 2000; 211(3): 185–190.
19. Tarkhasi A, Zakipour Rahimabadi E, Alizadeh doughikollaee E, Yousef Elahi M. Effect of edible coating containing pomegranate (*Punica granatum*) peel extract on the quality and shelf life of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillet during refrigerated storage. Journal of Fisheries Science and Technology. 2016; 5 (2):17-27.
20. Harikrishnan R, Kim M, Sangkim J, Jaehan Y, Heoa M.S. Effect of a mixed herb–enriched diet on the innate immune response and disease resistance of *Paralichthys olivaceus* against *Philasterides dicentrarchi* infection. Journal of Aquatic Animal Health. 2010; 22:235–243.
21. Harikrishnan R, Kima J, Kima M, Balasundaramb C, Heoa M.S. Pomegranate enriched diet enhances the hematology, innate immune response, and disease resistance in olive flounder against *Philasterides dicentrarchi*. Veterinary Parasitology. 2012; 187: 147-156.
22. Harikrishnan R, Balasundaram C, Bhuvaneswari R. Restorative effect of Azadirachta indicab aqueous leaf extract dip treatment on haematological parameter changes in *Cyprinus carpio* (L.) experimentally infected with *Aphanomyces invadans* fungus. Journal of Applied Ichthyology. 2005; 21: 410–413.
23. Sacks D. B. Carbohydrates. Burtis, C.A., Ashwood, E. R., (eds). Tietz Textbook of Clinical Chemistry. (3rd ed). W.B Saunders Company.Philadelphia, USA. 1999. pp. 750-808.
24. Rifai N, Bachorik P.S, Albers J.J. Lipids, Lipoproteins and Apolipoproteins. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Burtis, C.A., Ashwood, E.R., (eds.). (3rd ed.) W.B Saunders Company. Philadelphia, USA. 1999. pp. 809-61.
25. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976; 72: 248-254.
26. Koroluk M, Ivanova L, Maiorova I. The method of definition of the activeness of catalase, Laboratorial work. 1988; 1:16-19.
27. Kono Y. Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1978; 186(1): 189-195.
28. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1959; 82(1): 70-77.
29. Konukoglu D, Akçay T, Dinçer Y, Hatemi H. The susceptibility of red blood cells to autoxidation in type 2 diabetic patients with angiopathy. Metabolism. 1999; 48:1481-1484.
30. Martos-Sitcha J.A. Mancera J.M. Prunet P, Magnoni L.J. Editorial: welfare and stressors in fish: challenges facing aquaculture. Frontiers Physiology. 2020; 11: 162.
31. Campbell T.W. Clinical chemistry of fish and amphibians. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry, Pennsylvania: Lippincott Williams and Wilkins. 2004. pp. 499-517.
32. Larson D.L, Faisal M, Tempelman R.J, Yu H, Scribner K.T. Effects of hatchery rearing density, handling, and nutrition on *Renibacterium salmoninarum* infection prevalence in juvenile Chinook salmon. Journal of Aquatic Animal Health. 2020; 32(3):116-126.
33. Tolussi C.E, Hilsdorf A.W.S, Caneppele D, Moreira R.G. The effect of stocking density in physiological parameters and growth of the endangered teleost species Piabanba (*Brycon insignis* Steindachner, 1877). Aquaculture. 2010; 310: 221–228.
34. Ruane N.M, Carballo E.C, Komen, J. Increased stocking density influences the acute physiological stress response of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Aquaculture Research. 2002; 33:777-784.
35. Martelli R, Parisi G, Lupi P, Bonelli A, Zotte A.D, Franci O. Effect of rearing system on body traits and fillet quality of Meagre (*Argyrosomus Regius*, Asso 1801) chilled for a short time. Italian Journal of Animal Science. 2013; 12(e30):186-195.
36. Ahmadniaye Motlagh H, Rokhnareh Z, Safari O, Selahvarzi Y. Growth performance and intestinal microbial changes of *Carassius auratus* in response to pomegranate (*Punica granatum*) peel extract-supplemented diets. Journal of the World Aquaculture Society. 2020; https://doi.org/10.1111/jwas.12754.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-02-08]

37. Toutou M.M, Osman A.G.M, Farrag M.M.S, Badrey A.E.A, Moustafa M.A. Growth performance, feed utilization and gut histology of monosex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with varying levels of pomegranate (*Punica granatum*) peel residues. AACL Bioflux. 2019; 12 (1): 298-309.
38. Badawi M.E, Gomaa A.M. Influence of diets supplemented with pomegranate peel extract on performance in Oreochromus niloticus. Japanese Journal of Veterinary Research. 2016; 64(2): 87-94.
39. Taghavi F, Alipour Eskandani M, Saadati D, Arshadi A. Effects of aqueous and ethanol extracts of pomegranate peel (*Punica granatum*) on the growth of inoculated Escherichia coli in (*Cyprinus carpio*) minced meat. Journal of Fisheries (Iranian Journal of Natural Resources). 2020; 73(3):3837-394.
40. Harikrishnan R, Heo J, Balasundaram C, Kim M.C, Kim J.S, Han Y.J, Heo M.S. Effect of *Punica granatum* solvent extracts on immune system and disease resistance in *Paralichthys olivaceus* against *lymphocystis disease* virus (LDV). Fish and Shellfish Immunol. 2010; 29(4):668-73.
41. Mohammadian T, Ghanei-Motlagh R, Hosseini S.S, Robatkarimi S, Emam M, Alijani N, Bakhshi H. Investigation of effect of variouslevels of Lactobacillus acidophilus on serum oxidative stress response and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to lead in diet. Veterinary Researches and Biological Products. 2018; 121: 91-105.
42. Sayed Hassani M.H, Alipour A, Yousefi Jourdehi A, Yeganeh H. The Effect of stocking density on growth and stress indices of fingerlings and juvenile *Acipen serbaerii* reared in fiberglass tanks. Quarterly Journal of Physiology and Animal Development. 2018; 11(3):27-40.
43. Choi S.H, Sviridov D, Miller Y.I. Oxidized cholesteryl esters and inflammation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids. 2017; 1862(4):393-397.
44. Ito J, Shimizu N, Kato S, Ogura Y, Nakagawa K. Direct separation of the diastereomers of cholesterol ester hydroperoxide using LC-MS/MS to evaluate enzymatic lipid oxidation. Symmetry. 2020; 12(7): 1127.
45. Kulig W, Olżyńska A, Jurkiewicz P, Kantola A.M, Komulainen S, Manna M, Pourmousa M, Vazdar M, Cwiklik L, Rog T, Khelashvili G, Harries D, Telkki V.V, Hof M, Vattulainen I, Jungwirth P. Cholesterol under oxidative stress—How lipid membranes sense oxidation as cholesterol is being replaced by oxysterols. Free Radical Biology and Medicine. 2015; 84:30-41.
46. Xu C, Li E, Xu Z, Su Y, Lu M, Qin J.G, Chen L, Wang X. Growth and stress axis responses to dietary cholesterol in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in brackish water. Frontiers Physiology. 2018; 9: 254.
47. Navarro I, Gutiérrez J. Fasting and starvation. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. 1995; 4: 393-434.
48. Yousefian M, Sheikholeslami M, Amiri M, Hedayatifard A.A, Dehpour H, Fazli M, Najafpour S.H. Serum biochemical parameters of male and female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* cultured in Haraz River, Iran. World Journal of Fish and Marine Sciences. 2010; 2: 513-518.
49. Javed M, Ahmad M.I, Usmani N, Ahmad M. Multiple biomarker responses (serum biochemistry, oxidative stress, genotoxicity and histopathology) in *Channa punctatus* exposed to heavy metal loaded waste water. Scientific Reports. 2017; 7:1675.
50. Yadav S.S, Kumar R, Khare P, Madhu Tripathi M. Oxidative stress biomarkers in the freshwater fish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) exposed to sodium fluoride: Antioxidant defense and role of ascorbic acid. Toxicology International. 2015; 22(1): 71–76.
51. García P, Fredes C, Cea I, Lozano-Sánchez J, Leyva-Jiménez F.J, Robert P, Vergara C, Jimenez P. Recovery of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel using pressurized liquid extraction. Foods (Basel, Switzerland). 2021; 10(2): 203.
52. Aguilar-Zárate P, Wong-Paz J.E, Michel M, Buenrostro-Figueroa J, Díaz H.R, Ascacio J.A, Contreras-Esquivel J.C, Gutiérrez-Sánchez G, Aguilar C.N. Characterisation of pomegranate-husk polyphenols and semi-preparative fractionation of punicalagin. Phytochemical Analysis. 2017; 28:433–438.
53. Elswijk D.A, Schobel U.P, Lansky E.P, Irth H, Jan van der Greef J.D. Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. Phytochemistry. 2004; 65(2):233-41.
54. Matthaiou C.M, Goutzourelas N, Stagos D, Sarafoglou E, Jamurtas A, Koulocheri S.D, Haroutounian S.A, Tsatsakis A.M, Kouretas D. Pomegranate juice consumption increases GSH levels and reduces lipid and protein oxidation in human blood. Food and Chemical Toxicology. 2014; 73: 1-6.
55. Chidambara Murthy K.N, Jayaprakasha G.K, Singh R.P. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002; 50(17): 4791–4795.
56. Hamed H.S, Abdel-Tawwab M. Dietary pomegranate (*Punica granatum*) peel mitigated the adverse effects of silver nanoparticles on the performance, haemato-biochemical, antioxidant, and immune responses of Nile tilapia fingerlings. Aquaculture. 2021; 540: 736742.
57. Rezvani M.R, Rahimi S. Effects of adding pomegranate peel extract and commercial antioxidant to diets on performance, nutrient digestibility, gastrointestinal micro flora and antibody titer of broilers. Journal of Veterinary Research. 2017; 72(2):147-156.
58. Zamora-López K, Noriega L.G, Estanes-Hernández A, Escalona-Nández I, Tobón-Cornejo S, Tovar A.R, Barbero-Becerra V, Pérez-Monter C. Punica granatum L.-derived omega-5 nanoemulsion improves hepatic steatosis in mice fed a high fat diet by increasing fatty acid utilization in hepatocytes. Scientific Reports. 2020; 10: 15229.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-02-08]

Journal of Fisheries Science and Technology
Volume11, Issue 3, Summer 2022
Pages: 240-254

Mutual effect of culture density and diet administration of pomegranate peel (*Punica granatum* L.) extracts on biochemical and antioxidant parameters of common carp (*Cyprinus carpio*) blood serum

Mohammadian, T[1,2]; Mashjoor S[3*]; Lotfi S[1]; Bakhshi H[1]; Ghanei-Motlagh R[1]

[1]Department of Clinical sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

[2]Member of Excellence Center of Warm Water Fish Health, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

[3] Department of Marine Pharmaceutical Science, Faculty of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

ABSTRACT

Today, due to the confirmation of the existence of polyphenolic compounds with antioxidant properties in pomegranate peel, the study of its application potential in food health and fishery products has been the focus of researchers. In the present study, the effects of oral administration of ethanolic extract of pomegranate peel (*Punica granatum* L.) (Dose: 600 mg/kg) on functional changes of antioxidant system and biochemical parameters of blood serum of common carp (*Cyprinus carpio*) during a 45-day exposure against stocking density stress was monitored. In this regard, fish were randomly divided into 6 groups (3 treatment groups and 3 control groups with different levels of stocking density (3, 5, and 10 kg / m^3) and three replications. At the end of the exposure period, fish bloodletting and serum preparation were performed. The results of this study did not show a significant increase in biochemical parameters (phosphorus, chlorine, magnesium, calcium, and triglycerides) as well as the activity level of some enzymes and antioxidant compounds such as SOD and MDA in fish serum compared to the control group. However, for stress indicators such as glucose and cholesterol and antioxidant activity such as CAT and GSH, production level has been significant. According to the findings, oral administration of pomegranate peel extract dietary supplement is recommended for consumption in dense aquaculture centers of common carp fish.

KEYWORDS: Pomegranate, Nutrition, Storage density, Blood indices, Oxidative stress, Hydrothermal fish farming.

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received: 21 April 2022

Accepted: 23 August 2022

ePublished: 6 September 2022

* Corresponding Author:
Email address: sakynemashjoor@gmail.com

© Published by Tarbiat Modares University
ISSN:

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-02-08]