



مقاله پژوهشی

اثر پودر آویشن و رزماری بر بهبود سیستم ایمنی ماهی قزل آلی رنگین کمان
(*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با جیره غذایی آلوده به سموم
آفلاتوکسین ب ۱ و زیرانون

ساناز سلیمی^۱، کوروش سروی مغانلو^{۲*}، سید میثم ابطحی^۳، فرزانه نوری^۴، احمد ایمانی^۵

تاریخ دریافت: شهریور ۹۷

تاریخ پذیرش: آذر ۹۷

چکیده

یکی از چالش‌های صنعت آبی پروری، وجود سموم مایکوتوکسینی در جیره آبزیان و اثرات تخریبی آن بر ماهی است که برای تعدیل یا رفع این مشکل می‌توان از مواد آنتی‌اکسیدانی در جیره استفاده کرد. مطالعه حاضر با هدف بررسی نقش حفاظتی گیاهان آویشن و رزماری جیره غذایی در کاهش اثر سمی آفلاتوکسین ب ۱ و زیرانون جیره بر برخی شاخص‌های ایمنی ماهی قزل‌آلی رنگین کمان انگشت‌قد انجام پذیرفت. تعداد ۱۸۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلی رنگین کمان (3 ± 0.2 گرم) در سه تیمار شامل تیمار ۱ فاقد سم (تیمار شاهد)، تیمار ۲ حاوی $50 \mu\text{g/kg}$ آفلاتوکسین ب ۱ و $400 \mu\text{g/kg}$ زیرانون و تیمار ۳ حاوی $50 \mu\text{g/kg}$ آفلاتوکسین ب ۱ و $400 \mu\text{g/kg}$ زیرانون به همراه ۲٪ پودر رزماری و ۲٪ آویشن (در سه تکرار) به مدت ۴ هفته تیمار شدند. نتایج نشان داد که فعالیت لیزوزیم و کمپلمان، آنتی‌بادی و گلبول‌های قرمز و سفید تحت تاثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفتند ($P > 0.05$)، اما شاخص‌های تکثیر لنفوسیت، قدرت فاگوسیتوزی نوتروفیل‌ها و نسبت لنفوسیت به نوتروفیل تحت تاثیر تیمارهای مورد مطالعه قرار گرفتند ($P < 0.05$) و کمترین و بیشترین میزان این شاخص‌ها به ترتیب به تیمار دوم و سوم اختصاص داشت ($P < 0.05$). نتیجه آن که افزودن پودر گیاهان رزماری و آویشن به جیره غذایی، سبب بهبود سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلی رنگین کمان تغذیه شده با جیره‌های غذایی آلوده به سموم قارچی، به ویژه در شاخص‌های تکثیر لنفوسیت و نسبت لنفوسیت به نوتروفیل شد.

واژگان کلیدی: مایکوتوکسین، گیاهان دارویی، سیستم ایمنی، قزل‌آلی رنگین کمان.

- ۱- کارشناس ارشد شیلات، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
- ۲- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
- ۳- دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
- ۴- استادیار پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
- ۵- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

* نویسنده مسئول: k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir

مقدمه

Roberts et al., 1996; Santacroce and Zizzadoro, 2008). آفلاتوکسین‌ها می‌توانند موجب اختلال در چرخه تولید انرژی (سوخت و ساز کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها) شوند و یا در تداخل با اسیدهای نوکلئیک، موجب کاهش تولید پروتئین در سلول‌ها و از طرف دیگر با سرکوب سیستم ایمنی (خونی و سلولی) و اثرگذاری بر بافت‌های خون‌ساز، سرانجام موجب کاهش سرعت رشد و بازدهی حیوان شوند (خانی و همکاران، ۱۳۹۵). به عنوان مثال در مطالعه‌ای مشاهده شد که آفلاتوکسین ب ۱ باعث تغییر تعداد گلبول‌های قرمز، مقدار هماتوکریت و هموگلوبین، تعداد گلبول‌های سفید و همچنین بیوشیمی سرم می‌شود (Mohapatra et al., 2011).

زیرالنون سمی است که توسط قارچ‌های رشد یافته بر روی غلاتی مانند ذرت، گندم و جو تولید می‌شود و می‌تواند از طریق پوست به دام‌ها و انسان‌ها منتقل شود (Hueza et al., 2014). این سم به رقابت با گیرنده‌های استروژنی در بدن جانوران می‌پردازد و باعث هیپرتروفی رحم و آسیب به بافت اپی‌تلیوم واژن می‌شود. همچنین بر روی سیستم ایمنی، سیستم خونی و ژنتیک آن‌ها اثر می‌گذارد و

صنعت آبزی‌پروری، در بخش تولید مواد غذایی، از سریع‌ترین رشد در مناطق جهان برخوردار است (Subasinghe et al., 2009). یکی از چالش‌های این صنعت، مربوط به هزینه‌های ناشی از تامین جیره غذایی است که بیش از ۶۰ درصد هزینه‌های تولید ماهی قزل‌آلا در کشور را به خود اختصاص می‌دهد (سالک یوسفی، ۱۳۷۹). اخیراً به منظور کاهش هزینه‌های تولید، از منابع گیاهی به عنوان منابع ارزان‌قیمت‌تر، برای تامین پروتئین جیره استفاده می‌شود. همین امر خطر وجود یک یا چند نوع سم مایکوتوکسینی را در جیره آبزیان افزایش می‌دهد (Oliveira et al., 2013). مایکوتوکسین‌ها گروه مجزایی از متابولیت‌های ثانویه قارچ‌هایی هستند، که بر روی برخی محصولات کشاورزی رشد می‌کنند و رطوبت محیط و درجه حرارت از عوامل تعیین‌کننده به وجود آمدن آن‌ها است. دو نوع از فراوان‌ترین سموم مایکوتوکسینی در جیره‌های غذایی آفلاتوکسین‌ها و زیرالنون‌ها هستند (Oliveira et al., 2013).

بر اساس مطالعات به عمل آمده در میان انواع مختلف آفلاتوکسین، آفلاتوکسین ب ۱ از بالاترین میزان سمیت برخوردار است

مشکلاتی از جمله آسیب‌های بافتی، ناباروری و سقط جنین را ایجاد می‌کند (Zinedine et al., 2007). در پژوهشی، تاثیر زیرالنون بر تولیدمثل ماهی گورخری مورد بررسی قرار گرفت و کاهش همآوری و قابلیت لقاح و افزایش سطح ویتلوژنین پلاسما گزارش شد (Zinedine et al., 2007).

بالا بردن سطح ایمنی آبزیان، یکی از راه‌های افزایش مقاومت آن‌ها در برابر عوامل عفونی و بیماری‌زا است. امروزه استفاده از ترکیباتی همچون پودر و عصاره‌های گیاهی که محرک سیستم ایمنی هستند (Mohapatra et al., 2013)، برای تقویت این سیستم موثر واقع می‌شود و از آنجایی که برخی گیاهان دارویی دارای طیف وسیعی از خواص مفید از جمله تحریک و تقویت سیستم ایمنی هستند به همین علت استفاده از آن‌ها در مزارع پرورش ماهی سبب بهبود تولید می‌شود (Ghasemi Pirbalooti, 2009). یکی از این گیاهان، گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis*) متعلق به خانواده نعناعیان (Pintore et al., 2002) و دیگری آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora* (Ashtaral et al., 2007) است. رزماری و آویشن به علت داشتن دی‌ترین‌های فنولی

فعالیت ضدباکتریایی، ضدقارچی، محافظت کنندگی و آنتی‌اکسیدانی دارند (Pintore et al., 2004; Badi et al., 2002). در مطالعه‌ای تاثیر اسانس آویشن شیرازی بر سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی شد و نتایج نشان دهنده افزایش معنی‌دار سطح کمپلمان ماهی نسبت به تیمار شاهد بود (سلطانی و همکاران، ۱۳۹۱). در مطالعه‌ای که اثر عصاره رزماری بر عملکرد رشد و سیستم ایمنی فیل‌ماهیان جوان بررسی شد، محتوای پروتئین کل سرم و آلبومین در تیمارهای حاوی عصاره رزماری، افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد (Pintore et al., 2002).

با توجه به افزایش مصرف مواد اولیه گیاهی در جیره غذایی آبزیان، احتمال افزایش آلودگی جیره‌های آن‌ها با سموم قارچی وجود دارد، به ویژه آفلاتوکسین و زیرالنون که بیش‌ترین مقدار در جیره آبزیان برای این سموم گزارش شده است (Roberts et al., 1996; Santacroce and Zizzadoro, 2008). از این رو، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر حفاظتی گیاهان آویشن و رزماری که بر اساس مطالعات، اثر زیادی بر بهبود و حفاظت از دستگاه ایمنی دارند (سلطانی و همکاران،

تهیه جیره‌های آزمایشی

برای ساخت جیره پایه، اقلام غذایی شامل پودر ماهی کیلکا (آسیاب شده)، روغن ماهی، نشاسته ژلاتینه، مکمل‌های معدنی و ویتامینی تهیه و جیره مورد نظر بر اساس نیازهای غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۴۰ درصد پروتئین خام، ۲۰ درصد چربی خام و ۱۵ درصد کربوهیدرات، مکمل‌های ویتامینی و معدنی هر کدام در حد ۲ درصد) تنظیم شد (جدول ۱).

جدول ۱: ترکیب مواد غذایی در جیره پایه

درصد	اقلام غذایی
۶۷/۷	پودر ماهی
۱۳/۱۹	روغن ماهی
۱۵	نشاسته
۲	مکمل ویتامینی
۲	مکمل معدنی
۰/۱	کولین کلراید
۰/۰۱	ویتامین C محافظت شده

برای تهیه تیمارهای آزمایشی، سموم آفلاتوکسین ب ۱، زیرالنون و همچنین ترکیبات حفاظتی شامل ۴٪ پودرهای گیاهی (۲٪ آویشن و ۲٪ رزماری) به جیره پایه افزوده شد. به این ترتیب که تیمار ۱ فاقد سم و پودر

۱۳۹۱؛ Pintore et al., 2002)، در کاهش سمیت آفلاتوکسین ب ۱ و زیرالنون بر برخی شاخص‌های ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طرح‌ریزی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و شرایط انجام آزمایش

در مطالعه حاضر، ۱۸۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با میانگین وزنی 31.0 ± 0.2 گرم از یکی از مزارع پرورش ماهی در شهرستان ارومیه (آذربایجان غربی) تهیه و به سالن تکثیر و پرورش آبزیان پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه منتقل شدند. سپس بچه‌ماهیان با محلول نمک ۳ درصد ضد عفونی شدند (ستاری، ۱۳۹۳) و به مدت یک هفته قبل از شروع آزمایش با شرایط جدید سازگار شدند. پس از آن، بچه‌ماهیان با تراکم ۲۰ قطعه به صورت تصادفی بین ۹ مخزن فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری، حاوی ۲۰۰ لیتر آب با اکسیژن محلول 8.4 ± 0.2 میلی‌گرم در لیتر (HANNA Instrument, Oximeter، آمریکا) و دمای 14.5 ± 0.5 درجه سانتی-گراد (دماسنج دیجیتال، PT100، TENMA، انگلستان) ذخیره‌سازی شدند.

گیاهی (تیمار شاهد)، تیمار ۲ حاوی $50 \mu\text{g/kg}$ آفلاتوکسین ب ۱ و $400 \mu\text{g/kg}$ زیرالنون و تیمار ۳ حاوی $50 \mu\text{g/kg}$ آفلاتوکسین ب ۱ و $400 \mu\text{g/kg}$ زیرالنون به همراه ۲٪ پودر رزماری و ۲٪ آویشن (هر تیمار با سه تکرار) به عنوان ترکیب حفاظتی بود (Imani et al., 2017; Knutsen et al., 2017). در مرحله بعد با افزودن رطوبت به میزان مورد نیاز، خمیر به دست آمده به کمک چرخ گوشت صنعتی به صورت رشته‌های نازک با طول و قطر تقریبی ۲mm در آمد و پس از خشک شدن در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در کیسه‌های پلاستیکی بسته‌بندی و تا زمان استفاده در یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. ماهی‌ها به مدت ۴ هفته، هر روز در سه وعده و در هر وعده یک درصد وزن بدن (۳ درصد روزانه)، با جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند. طی این دوره، دوره نوری سالن پرورش ۱۰ ساعت تاریکی و ۱۴ ساعت روشنایی و دبی آب ورودی به مخازن ۶/۵ لیتر در دقیقه بود.

ppm ۲۵۵ (اخلاقی و بروجردی، ۱۳۷۸) بیپوش شدند. سپس، توسط سرنگ‌های آغشته به هیپارین از سیاهرگ ساقه دمی ماهیان خون‌گیری به عمل آمد. نمونه‌های خون جمع‌آوری شده از تکرارهای هر تیمار با هم مخلوط شدند. سپس نمونه‌های خون درون یونولیت به همراه یخ، به آزمایشگاه منتقل شدند. درصد گلبول‌های سفید (WBC) و قرمز خون (RBC) با روش‌های استاندارد (Stec et al., 2008) تعیین شد و برای شمارش تفریقی گلبول‌های سفید (DWBC) قبل از مخلوط کردن خون با ماده ضدانعقاد، با قرار دادن یک قطره خون بر روی لام، اقدام به تهیه گسترش شد. گسترش‌های تهیه شده با الکل متیلیک تثبیت و با استفاده از رنگ گیمسا به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. پس از پایان رنگ‌آمیزی و شستشوی لام و خشک‌کردن گسترش، تعداد صد گلبول سفید مورد شمارش و درصد هر یک از انواع گلبول‌های سفید محاسبه و ثبت شد (Schaperclaus et al., 1991).

بررسی شاخص‌های خون‌شناسی و ایمنی

پس از پایان ۴ هفته دوره پرورش، از هر تیمار تعداد ۶ قطعه ماهی به طور تصادفی انتخاب و در محلول پودر گل میخک با غلظت

شاخص‌های تکثیر لنفوسیت توسط آزمون MTT (3-[4,5Dimethylthiazol-2-YI]- (2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) و قدرت فاگوسیتوزی سلول‌های نوتروفیل توسط

تکثیر لنفوسیت (LPI) بر اساس رابطه ۱ محاسبه شد (Motlagh et al., 2015).

رابطه ۱:

$$LPI = (OD_F - OD_B) / (OD_{NF} - OD_B)$$

OD_B: جذب نمونه بلانک؛ OD_F: جذب نمونه حاوی فیتوهماگلوتینین؛ OD_{NF}: جذب نمونه فاقد فیتوهماگلوتینین.

اساس کار آزمون برداشت NR بر مبنای جذب رنگ در لیزوزوم سلول‌های زنده بود که توسط دستگاه الایزا قرائت شد. به طوری که میزان OD به دست آمده نشانگر مقدار نور جذب شده توسط سلول‌های زنده است (Motlagh et al., 2015).

برای سنجش شاخص‌های ایمنی سرم، ابتدا نمونه‌های خون با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (HS-18500، فرزانه آرمان، ایران) شدند تا سرم جدا شود. سپس سرم به دست آمده تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Tukmechi et al., 2011).

شاخص‌های فعالیت مسیر فرعی کمپلمان بر اساس همولیز گلوبول‌های قرمز خرگوش (Amar et al., 2001)، میزان پروتئین کل سرم با استفاده از کیت تشخیص کمی Total

آزمون برداشت (Neutral Red) NR اندازه‌گیری شد (Motlagh et al., 2015). به این صورت که برای سنجش تکثیر لنفوسیت، سوسپانسیونی حاوی 1×10^6 سلول به ازای هر میلی‌لیتر از بافر RPMI-1640 (Sigma، آمریکا) حاوی ۱۰٪ FBS (Fetal Bovine Serum) تهیه و $100 \mu\text{L}$ از آن در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته شد. برای هر نمونه سه تکرار در حضور $50 \mu\text{L}$ از محلول فیتوهماگلوتینین (1 mg/mL) و سه تکرار بدون حضور فیتوهماگلوتینین در نظر گرفته شد. به عنوان بلانک نیز در سه چاهک تنها از محیط RPMI-1640 استفاده شد. بعد از ۷۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور حاوی $5\% \text{ CO}_2$ ، به هر چاهک $25 \mu\text{L}$ محلول MTT افزوده و به مدت ۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. در این مدت، احیای ماده MTT توسط سلول‌های زنده و در حال تکثیر، سبب تشکیل بلورهای فورمازون شد که با افزودن $100 \mu\text{L}$ DMSO (دی‌متیل سولفوکسید) به حالت محلول درآمد. سپس شدت رنگ در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. شاخص

صورت میانگین \pm خطای استاندارد گزارش شد.

نتایج

میانگین شاخص‌های تعداد گلبول‌های قرمز و سفید و نسبت لنفوسیت به نوتروفیل در بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف در جدول ۲ ارائه شده است. بر این اساس تفاوت معنی‌داری در تعداد گلبول‌های سفید و قرمز بین تیمارهای مختلف وجود نداشت ($P > 0.05$)، در حالی که نسبت لنفوسیت به نوتروفیل در تیمار حاوی سموم آفلاتوکسین ب ۱ و زیرالنون نسبت به تیمار شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$) و ترکیب حفاظتی حاوی آویشن و رزماری باعث بهبود این شاخص شد. به طوری که کمترین میزان آن در تیمار حاوی سموم و بالاترین میزان آن در تیمار سموم-ترکیب حفاظتی مشاهده شد ($P < 0.05$).

Protein (پارس آزمون، ایران) و با روش فتومتریک (Lowry et al., 1951)، میزان آنتی‌بادی سرم (Sunyer et al., 1997) و میزان فعالیت لیزوزیم سرم بر مبنای تخریب باکتری گرم مثبت حساس به آنزیم لیزوزیم (*Micrococcus luteus*) اندازه‌گیری شد (Clerton et al., 2001).

تجزیه و تحلیل‌های آماری

برای بررسی آماری داده‌های مورد مطالعه از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ استفاده شد و در صورت معنی‌داری نتایج از پس‌آزمون توکی برای مقایسه میانگین تیمارهای مختلف استفاده شد. در این مطالعه سطح اطمینان آزمون‌های آماری ۹۵ درصد در نظر گرفته شد و نتایج نهایی به

جدول ۲: شاخص‌های خونی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف (میانگین \pm خطای استاندارد؛ $n=3$)

تیمارها	شاخص‌ها	گلبول‌های قرمز (%)	گلبول‌های سفید (%)	نسبت لنفوسیت به نوتروفیل*
تیمار شاهد		۸۶/۳۲ \pm ۵/۱۹	۱۳/۶۷ \pm ۵/۱۹	۱۳/۹۹ \pm ۰/۵۳ ^a
تیمار با سموم		۸۷/۰۰ \pm ۱/۲۸	۱۳/۰۰ \pm ۱/۲۸	۴/۶۶ \pm ۰/۱۷ ^b

آفلاتوکسین + زیرالنون

تیمار با سموم + پودر آوبیشن

۸۱/۸۰±۳/۳۲

۱۸/۱۹±۳/۳۲

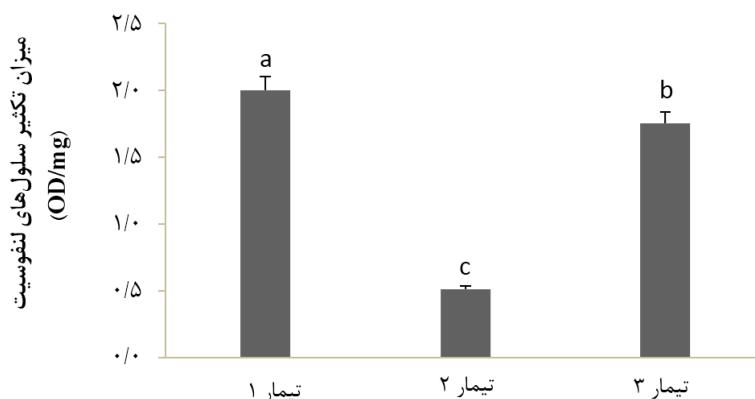
۱۵/۵۵±۱/۰۳^a

و رزماری

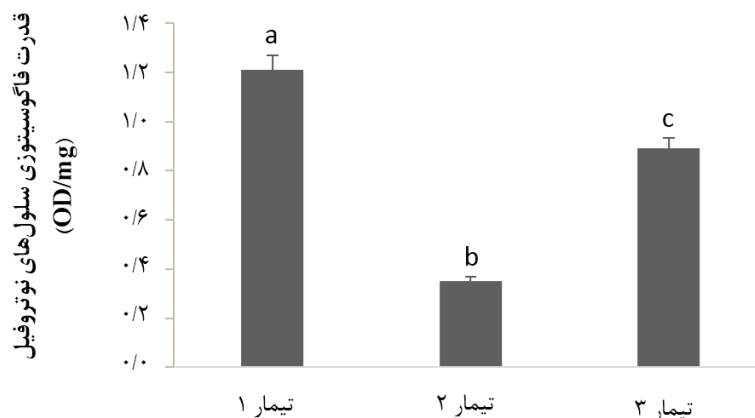
*: حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار آماری است ($P < 0.05$).

مربوط به مقایسه شاخص میزان قدرت فاگوسیتوزی سلول‌های نوتروفیل در تیمارهای مختلف (شکل ۲) نشان دهنده آن است که این شاخص تحت تاثیر سم آفلاتوکسین ب ۱ و زیرالنون کاهش یافت ولی با افزودن ترکیب حفاظتی، این شاخص افزایش یافت. به طوری که کمترین میزان در تیمار سموم و بالاترین میزان در تیمار شاهد مشاهده شد ($P < 0.05$). با توجه به نتایج به دست آمده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه، هیچ یک از شاخص‌های ایمنی هومورال (جدول ۳) سنجیده

بر اساس آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه مشخص شد که شاخص تکثیر لنفوسیت و همچنین شاخص بررسی توانایی فاگوسیتوزی سلول‌های نوتروفیل (آزمون برداشت NR) تحت تاثیر تیمارهای مختلف غذایی قرار گرفتند و تغییرات معنی‌داری را نشان دادند ($P < 0.05$). همان طور که از نمودار مقایسه میانگین میزان تکثیر سلول‌های لنفوسیت در تیمارهای مختلف (شکل ۱) پیدا است، کمترین میزان آن در تیمار حاوی سموم مشاهده شد و بالاترین میزان آن به تیمار شاهد اختصاص داشت ($P < 0.05$). نمودار



شکل ۱: میزان تکثیر سلول‌های لئفوسیت در تیمارهای مختلف (میانگین \pm خطای استاندارد). تیمار ۱: تیمار شاهد؛ تیمار ۲: حاوی سموم آفلاتوکسین ب ۱ و زیرالنون؛ تیمار ۳: حاوی سموم آفلاتوکسین ب ۱ و زیرالنون) و ترکیب حفاظتی (آویشن و رزماری). حروف متفاوت نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار آماری است ($P < 0.05$).



شکل ۲: میزان قدرت فاگوسیتوزی سلول‌های نوتروفیل در تیمارهای مختلف (میانگین \pm خطای استاندارد). تیمار ۱: تیمار شاهد؛ تیمار ۲: حاوی سموم آفلاتوکسین ب ۱ و زیرالنون؛ تیمار ۳: حاوی سموم آفلاتوکسین ب ۱ و زیرالنون) و ترکیب حفاظتی (آویشن و رزماری). حروف متفاوت نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار آماری است ($P < 0.05$).

جدول ۳: شاخص‌های ایمنی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف (میانگین \pm خطای استاندارد؛ $n=3$)

لیزوزیم ($\mu\text{g/mL}$)	آنتی‌بادی سرم (mg/mL)	پروتئین کل سرم (mg/dL)	فعالیت کمپلمان (U/mL)	شاخص‌ها تیمارها
۱۹/۶۶±۳/۸۴	۰/۳۶±۰/۰۷	۷۴/۰۰±۰/۱۵	۸/۰۰±۰/۵۷	تیمار شاهد
۱۷/۵۰±۰/۵۰	۰/۳۵±۰/۰۱	۷۱/۰۰±۰/۱۹	۶/۰۰±۲/۰۰	تیمار با سموم آفلاتوکسین + زیرالنون
۲۱/۰۰±۰/۵۷	۰/۳۸±۰/۰۳	۷۶/۰۰±۰/۰۷	۳/۰۰±۰/۵۷	تیمار با سموم + پودر آویشن و رزماری

تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها وجود نداشت ($P > 0/05$).

چشم‌گیری نشان داد که با تیمار شاهد برابری می‌کرد. مطالعات نشان داده‌اند که نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها نقش مهمی در ایجاد فعالیت-های سیستم ایمنی بدن ایفا می‌کنند و کورتیکواستروئیدها تاثیر زیادی بر نوسان تعداد این سلول‌ها دارند. به طوری که در زمان بروز تنش و ترشح کورتیکواستروئیدهایی مانند کورتیزول، پدیده کاهش لنفوسیت‌ها و افزایش نوتروفیل‌ها مشاهده می‌شود که این تغییرات با نوسانات سطوح کورتیزول خون دقیقا مطابقت دارد (زارع و همکاران، ۱۳۹۱). همچنین مطالعات دیگری نشان داده‌اند که ترشح کورتیزول تحت تاثیر تنش، طول عمر لنفوسیت‌ها را کاهش داده، مرگ برنامه‌ریزی شده آن‌ها را تسریع می‌کند (Wyets et al., 1998). این طور می‌توان بیان کرد که احتمالا در مطالعه حاضر به دلیل وجود ترکیب حفاظتی رزماری و آویشن که خود آن‌ها دارای

شده در این آزمایش، یعنی میزان فعالیت کمپلمان، میزان پروتئین کل پلاسما، میزان آنتی‌بادی پلاسما و لیزوزیم، تحت تاثیر تیمارهای مختلف غذایی قرار نگرفتند و تغییر معنی‌داری را نشان ندادند ($P > 0/05$). نتایج سنجش این شاخص‌ها در جدول ۳ آورده شده است.

بحث

در پژوهش حاضر، بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با قرار گرفتن در معرض سموم آفلاتوکسین ب ۱ و زیرالنون افت شدید در تعداد لنفوسیت‌ها و افزایش در تعداد نوتروفیل‌ها را نشان دادند و نسبت لنفوسیت به نوتروفیل در این تیمار (تیمار سموم) به شدت کاهش یافت، اما در تیماری که علاوه بر سموم مذکور دارای ترکیب حفاظتی آویشن و رزماری نیز بود نسبت لنفوسیت به نوتروفیل افزایش

که گیاهان آویشن و رزماری موجود در ترکیب حفاظتی این پژوهش دارای ماده موثره کارواکرول و تیمول هستند می‌توان اظهار کرد که این مطالعه با پژوهش حاضر موافق است. همچنین در مطالعه حاضر، سلول‌های لنفوسیت در ماهیانی که در معرض سموم آفلاتوکسین ب ۱ و زیرالنون قرار گرفته بودند، به میزان کمتری تکثیر داشتند که میانگین آن در این تیمار دچار کاهش شد. اما در تیماری که علاوه بر سموم مذکور دارای ترکیب حفاظتی نیز بود تکثیر سلول‌های لنفوسیت افزایش چشم‌گیری را نشان داد که با تیمار شاهد برابری می‌کرد. بدین ترتیب می‌توان احتمال داد که پودر آویشن و رزماری موجود در ترکیب حفاظتی توانسته است با ترکیبات فنلی موجود در خود، سیستم ایمنی ماهی را تحریک و تقویت کرده، از اثرات ضدتقسیمی آفلاتوکسین‌ها جلوگیری کند و میزان آن‌ها را کاهش دهد. بنابراین از این طریق باعث بهبود ایمنی ماهی شده و مانع از کاهش میانگین تکثیر سلول‌های لنفوسیت آن‌ها می‌شود. با توجه به نقص اطلاعات در این زمینه، منبعی برای تایید یا رد نتایج به دست آمده در دست نبود.

ترکیبات فنلی هستند و محرک رشد و سیستم ایمنی محسوب می‌شوند، از اثر سم جلوگیری شده است. روزی و همکاران (۱۳۹۲) با افزودن دارچین در سطوح ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ و ۱ درصد به جیره ماهی گرین ترور (*Andinoacara rivulatus*) اظهار کردند که ماهیان تغذیه شده با جیره ۱ درصد پودر دارچین در تعداد گلبول‌های سفید و درصد لنفوسیت و نوتروفیل اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشتند که با مطالعه حاضر همخوانی دارد. همسو با مطالعه حاضر، علیزاده دوغیکلایی و همکاران (۱۳۹۰) پی بردند که اسانس سیر در سطح ۰/۱۵ گرم بر کیلوگرم جیره، اثر مثبتی بر شاخص‌های ایمنی سلولی در فیلم ماهی داشت. به طوری که سبب افزایش معنی‌دار گلبول‌های سفید و درصد لنفوسیت، مونوسیت و ائوزینوفیل شد، ولی در تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. احمدی‌فر و همکاران (۱۳۸۹) بیان کردند که کاربرد مکمل Enhance 150 Next (حاوی کارواکرول و تیمول) در سطوح ۰، ۱، ۲ و ۳ گرم در کیلوگرم جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به استثنای درصد لنفوسیت تفاوت معنی‌داری را در شاخص‌های خونی ایجاد نکرد و از این لحاظ

ترکیب حفاظتی بود، با کاهش اثرات تخریبی آفلاتوکسین توسط عملکرد گیاهان رزماری و آویشن، موجب پیشگیری از این وضعیت شد. با توجه به نقص اطلاعات در این زمینه، منبعی برای تایید یا رد نتایج به دست آمده در دست نبود.

به طور کلی، با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان چنین بیان کرد که سموم آفلاتوکسین ب ۱ و زیرالنون موجب تضعیف سیستم ایمنی بچه‌ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان شده‌اند که این امر احتمالاً می‌تواند منجر به بروز بیماری و نهایتاً تلفات در مزارع پرورشی ماهی‌ها شود. اما در تیمار سوم در این پژوهش، به علت دارا بودن ترکیب حفاظتی و ترکیبات فنلی موجود در گیاهان آویشن و رزماری از اثرات تخریبی سموم جلوگیری شده، سیستم ایمنی ماهیان به ویژه در شاخص‌های تکثیر لنفوسیت و قدرت فاگوسیتوزی نوتروفیل‌ها و نسبت لنفوسیت به نوتروفیل، تقویت و بهبود یافت.

در پژوهش حاضر، ماهیانی که در معرض سموم آفلاتوکسین ب ۱ و زیرالنون قرار گرفته بودند قدرت کمتری برای فاگوسیتوز کردن نوتروفیل‌ها داشتند که میزان برداشت NR توسط سلول فاگوسیت کننده در این تیمار (تیمار سموم) دچار کاهش شد. اما در تیماری که علاوه بر سموم مذکور دارای ترکیب حفاظتی نیز بود، قدرت فاگوسیتوز سلول‌های نوتروفیل افزایش چشم‌گیری نشان داد که با تیمار شاهد برابری می‌کرد. آزمون NR ارتباط مستقیم با غشای سلولی دارد و غشای سلولی مرکب از فسفولیپید و پروتئین‌ها است. این احتمال وجود دارد که در تیماری که فقط سموم را دارا است به دلیل اثر مستقیم آفلاتوکسین بر نحوه تشکیل پروتئین‌ها از طریق مهار رونویسی و جلوگیری از انتقال اسید آمینه و ترجمه mRNA مانع ساخت پروتئین شود، ساختار غشایی سلول‌های نوتروفیل را دچار اختلال کند و توانایی آن‌ها را برای فاگوسیتوز کردن کاهش دهد (Jindal et al., 2005). اما تیماری که علاوه بر سموم دارای

منابع

- احمدی‌فر ا.، اکرمی ر.، پورعلی مطلق س.، قلیچی ا. و نوری س. ۱۳۸۹. استفاده از افزودنی NEXT Enhance150 (تیمول و کارواکرول) به منظور بررسی کارایی رشد، ترکیبات مغذی بدن و شاخص‌های خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) شیلات، ۴(۴): ۸۳-۹۰.
- اخلاقی، م.، بروجردی، م.م. ۱۳۷۸. بررسی اثر بیپوشی‌کنندگی گل‌میخک در ماهی و تعیین LC50 آن. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۵۴(۲): ۴۹-۵۲.
- خانی س.، سروی مغانلو ک.، ایمانی ا.، آق‌ن. و رازی م. ۱۳۹۵. اثر حفاظتی افزودن اسانس دارچین (*Cinnamomum verum*) به جیره غذایی در کاهش سمیت آفلاتوکسین ب ۱ در بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). پژوهش و سازندگی، ۱۱۴: ۱۸۲-۱۷۳.
- روزی ی.، مورکی ن.، ذریه زهرا ج.، حقیقی م. ۱۳۹۲. بررسی اثر سطوح مختلف پودر دارچین (*Cinnamomum zeylanicum*) در جیره غذای ماهی گرین‌ترور (*Andinocara rivulatus*) بر شاخص‌های خونی، گلوکز خون و میزان بقا. مجله علوم تکثیر و آبیاری پروری، ۱: ۴۱-۵۲.
- زارع ر.، بهمنی م.، یآوری و.، کاظمی ر.، فاضلی ن.، پوردهقانی م. و محمدیان ت. ۱۳۹۱. اثرات تراکم پرورش بر گلبول‌های سفید و سطوح کورتیزول پلاسمای خون تاس ماهی سبیری (*Acipenser baerii*). مجله دامپزشکی ایران، ۸(۲): ۳۲-۲۲.
- سالک یوسفی م. ۱۳۷۹. تغذیه آبزیان پرورشی (ماهیان سردآبی، ماهیان گرمابی و میگو). انتشارات اصلانی، ۳۲۰ صفحه.
- ستاری م. ۱۳۹۳. بهداشت و بیماری‌های آبزیان (۲). انتشارات حق‌شناس، ۷۳۶ صفحه.
- سلطانی م.، ظریف‌منش ط. و ذریه زهرا س.ج. ۱۳۹۱. مطالعه تاثیر اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر میزان فعالیت سیستم عامل مکمل و لیزوزیم خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. مجله علمی شیلات ایران، ۲۱(۴): ۲۳-۱۳.
- علیزاده دوغیکلابی ا.، ابراهیمی ع. و زارع پ. ۱۳۹۰. اثر اسانس گیاه سیر بر شاخصه‌های هماتولوژیک فیل‌ماهیان جوان پرورشی. مجله تحقیقات دامپزشکی (دانشگاه تهران)، ۳(۳): ۲۱۶-۲۰۹.
- Amar E.C., Kiron V., Satoh S., Okamoto N. and Watanabe T. 2001. Effects of dietary β carotene on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fisheries Science, 66(6): 1068-1075.

- Ashtaral N.L., Mohammadirad A., Yasa N., Minaie B., Nikfar S.H., Ghazanfari G.H., Zamani M.J., Dehghan G.H., Jamshidi H.R., Shetab B.V., Khorasani R. and Abdollahi M. 2007.** Benefits of *Zataria multiflora* Boiss in experimental model of mouse inflammatory bowel disease. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 4: 43–50.
- Badi H.N., Yazdani D., Ali S.M. and Nazari F. 2004.** Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality of oil in thyme. Industrial Crops and Products, 19(3): 231–236.
- Clerton P., Troutaud D., Verlhac V., Gabaudan J. and Deschaux P. 2001.** Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: Effect on gut and on head kidney leucocytes. Fish and Shellfish Immunology, 11(1): 1–13.
- Ghasemi Pirbalooti A. 2009.** Medicinal and aromatic plants (recognition and evaluation of their effects). Islamic Azad University Press, P: 500.
- Hueza I.M., Raspantini P.C.F., Raspantini L.E.R., Latorre A.O. and Gorniak S.L. 2014.** Zearalenone, an estrogenic mycotoxin, is an immunotoxic compound. Toxins, 6(3): 1080–1095.
- Imani A., Bani M.S., Noori F., Farzaneh M. and Sarvi Moghanlou K. 2017.** The effect of bentonite and yeast cell wall along with cinnamon oil on aflatoxicosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Digestive enzymes, growth indices, nutritional performance and proximate body composition. Aquaculture, 476: 160–167.
- Jindal N., Mahipal S.K. and Mahajan N.K. 2005.** Toxicity of aflatoxin B₁ in broiler chicks and its reduction by activated charcoal. Research in Veterinary Science, 56: 37–40.
- Knutsen H.K., Alexander J., Barregard L., Bignami M., Bruschweiler B., Ceccatelli S. and Hogstrand C. 2017.** Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. European Food Safety Authority Journal, 15(7): 48–51.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farrand A.L. and Randall R.J. 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265–275.
- Mohapatra S., Chakraborty T., Kumar V., DeBoeck G. and Mohanta K.N. 2013.** Aquaculture and stress management: A review of probiotic intervention. Animal Physiology and Animal Nutrition, 97: 405–430.

- Mohapatra S., Sahu N.P., Pal A.K., Prusty A.K., Kumar V. and Kumar S. 2011.** Haemato-immunology and histo-architectural changes in *Labeo rohita* fingerlings: Effect of dietary aflatoxin and mould inhibitor. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37: 177–186.
- Motlagh B.M., Ahangaran N.A. and Froushani S.M.A. 2015.** Calcitriol modulates the effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on macrophage functions. *Iranian Journal of Basic Medical Science*, 18(7): 672–676.
- Oliveira C.A.F., Bovo F., Corassin C.H., Jager A.V. and Reddy K.R. 2013.** Recent trends in microbiological decontamination of aflatoxins in foodstuffs. P: 59–92. In: Razzaghi-Abyaneh M. (Ed.). *Aflatoxins- Recent Advances and Future Prospects*. IntechOpen, UK.
- Pintore G., Usai M., Bradesi P., Juliano C., Boatto G., Tomi F., Chessa M., Cerri R. and Casanova J. 2002.** Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(1): 15–19.
- Roberts T.A., Tompkin R.B. and Baird-Parker A.C. 1996.** *Microorganisms in Foods, Vol 5: Microbiological Specifications of Food Pathogens*. Springer, Germany. 513P.
- Santacroce M.P. and Zizzadoro C. 2008.** Aflatoxins in aquatic species: Metabolism, toxicity and perspectives. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 18: 99–130.
- Schaperclaus W., Kulow H. and Schreckenbach K. 1991.** Hematological and serological technique. P: 71–108. In: Kothekekar V.S. (Ed.). *Fish Disease. Connaught Circus, Gulab Pramlani, Oxonian Press. India.*
- Stec J., Rachubik J., Szczotka M. and Kuzmak J. 2008.** Effects of *Penicillium* mycotoxins: Citrinin, ochratoxin A, and patulin on in vitro proliferation of bovine lymphocytes. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 52: 163–167.
- Subasinghe R., Soto D. and Jia J. 2009.** Global aquaculture and its role in sustainable development. *Reviews in Aquaculture*, 1(1): 2–9.
- Sunyer J.O., Ort L.T. and Lambris J.D. 1997.** Diversity of the third form of complement, C3, in fish: Functional characterization of five forms of C3 in the diploid fish (*Sparus aurata*). *Biochemical Journal*, 326(3): 320–326.
- Tukmechi A., Andani H.R.R., Manaffar R. and Sheikhzadeh N. 2011.** Dietary administration of

beta-mercapto-ethanol treated *Saccharomyces cerevisiae* enhanced the growth, innate immune response and disease resistance of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish and Shellfish Immunology, 30: 923–928.

Wyets F., Flikt G. and Verburg B. 1998. Cortisol inhibits apoptosis in carp neutrophilic granulocytes.

Developmental and Comparative Immunology, 22: 563–572.

Zinedine A., Soriano J.M., Molto J.C. and Manes J. 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. Food and Chemical Toxicology, 45(1): 1–18.



Research Paper

The effect of thyme and rosemary powder to improve the immunity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed by aflatoxin B₁ and zearalenone contaminated diet

Sanaz Salimi¹, Kourosh Sarvi Moghanlou^{2*}, Sayed Meysam Abtahi³, Farzaneh Noori⁴, Ahmad Imani⁵

Received: September 2018

Accepted: December 2018

Abstract

Nowadays, the aquaculture industry is challenged with dietary mycotoxin contamination and their undesirable effects on fish. It is believed that feed containing antioxidants might be useful to modulate or even eradicate such problems. This study was to investigate the protective role of thyme and rosemary powder in the diet to reduce the toxic effects of dietary aflatoxin B₁ and zearalenone contamination on some immune indices of rainbow trout fingerlings. Total number of 180 fish (3±0.2g) were allotted into three treatments including treatment one as control group (without toxin), treatment two received feed containing 50µg/kg aflatoxin B₁ + 400µg/kg zearalenone and treatment three fed diet contaminated with 50µg/kg aflatoxin B₁ + 400µg/kg zearalenone and contained 2% rosemary and 2% thyme powder (triplicate) for 4 weeks. The results showed that lysozyme and complement activity, serum total antibody content along with red and white blood cell counts were not affected by experimental diets (P>0.05). While lymphocyte proliferation and neutrophils phagocytosis indices and lymphocyte to neutrophil ratio were affected by treatments (P<0.05), as the lowest and the highest level of these indices, belonged to treatments two and three, respectively (P<0.05). The results showed that adding rosemary and thyme powder to mycotoxin contaminated diet could improve immune parameters of rainbow trout especially lymphocyte proliferation and lymphocyte to neutrophil ratio.

Key words: *Mycotoxin, Medicinal Herbs, Immune System, Oncorhynchus mykiss*.

1- M.Sc. in Fisheries, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

2- Associate Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

3- Associate Professor in Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

4- Assistant Professor in Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran.

5- Associate Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

*Corresponding Author: k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir