



## اثر سطوح مختلف عصاره آبی میوه گیاه پنیرباد (*Withania coagulans*) بر عملکرد رشد، فعالیت آنزیم‌های کبدی، شاخص‌های خونی و ایمنی غیراختصاصی ماهی کپور معمولی

علی تاسا<sup>۱</sup>، علی ارشادی<sup>۱\*</sup>، جواد میردار هریجانی<sup>۱</sup>، علی مقصودی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

<sup>۲</sup> گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

### نوع مقاله:

### چکیده

### پژوهشی

### تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۹/۱۰/۰۱

اصلاح: ۹۹/۱۰/۰۳

پذیرش: ۹۹/۱۰/۲۲

### کلمات کلیدی:

ایمنی غیراختصاصی  
خون‌شناسی  
کپور معمولی  
گیاه پنیرباد

در این تحقیق اثر عصاره آبی میوه پنیرباد (*Withania coagulans*) بر شاخص‌های رشد، آنزیم‌های کبدی، شاخص‌های خونی و ایمنی غیراختصاصی ماهی کپور معمولی مطالعه شد. تیمارها شامل غلظت‌های صفر، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم عصاره در هر کیلوگرم غذا (۳ تکرار) بوده و ماهیان به مدت ۵۶ روز غذایی شدند. در پایان دوره غذایی میزان رشد، لیزوزیم، ایمونوگلوبین، فعالیت آنزیم‌های کبدی و شاخص‌های خونی سنجیده شد. شاخص‌های رشد در تیمارهای حاوی عصاره نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشتند ( $p < 0.05$ ). همچنین میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی بین همه تیمارها دارای تفاوت معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ) که بیشترین و کمترین مقدار آن‌ها به ترتیب در تیمار شاهد و ۱۰۰۰ میلی‌گرم عصاره بود. بین شاخص‌های خونی، تفاوت معنی‌داری در تعداد گلبول‌های سفید بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد ( $p > 0.05$ )، اما گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، حجم متوسط گلبولی، لیزوزیم، ایمونوگلوبولین و هموگلوبین تحت تأثیر عصاره قرار گرفتند که در همه موارد تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم عصاره نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد ( $p < 0.05$ ). درصد نوتروفیل در تمام تیمارها نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ( $p < 0.05$ ). نتایج نشان داد که تغذیه با جیره حاوی عصاره میوه پنیرباد منجر به بهبود رشد، شاخص‌های خونی و ایمنی بچه ماهی کپور معمولی می‌گردد.

### مقدمه

آبزی‌پروری یکی از بخش‌های مهم تولید غذا با بیشترین رشد در دنیا است که از چهار دهه گذشته تاکنون (۱۹۷۰ تا ۲۰۱۶) متوسط رشد سالانه ۹/۲ درصدی داشته است. با کاهش میزان صید و صیادی در سال‌های اخیر، بیش از نیمی از نیازهای غذایی به آبزیان در دنیا (بیش از ۱۰ درصد از کل پروتئین حیوانی مورد نیاز بشر) از طریق آبزی‌پروری تأمین می‌گردد (FAO, 2014). عواملی از قبیل ازدحام جمعیت در استخرها، جابجایی و دست‌کاری‌های دوره‌ای، تغییرات ناگهانی دما، کاهش کیفیت آب و شرایط تغذیه‌ای ضعیف به همراه تغییرات فیزیولوژیک در ماهی مانند استرس، باعث افزایش حساسیت به انواع عفونت‌ها می‌شود. علاوه بر این فقدان اقدامات بهداشتی به گسترش عوامل بیماری‌زا کمک کرده و موجب افزایش میزان تلفات می‌گردد (Naylor et al., 2000; Quesada et al., 2013). محرک‌های ایمنی با افزایش قدرت دفاعی و متوقف کردن فعالیت عوامل

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: [arshadi@uoz.ac.ir](mailto:arshadi@uoz.ac.ir)

آسیب‌رسان فرصت‌طلب، موجب بهبود رشد و بقای آبزیان می‌شوند، بنابراین استفاده از آن‌ها در مزارع نقش مهمی در سلامت آبزیان ایفا می‌کند (Sakai, 1999). استفاده از محرک‌های ایمنی در تحریک ایمنی غیراختصاصی در ماهیان نسبت به حیوانات خونگرم نقش مؤثرتری دارد. همچنین با توجه به خطرات زیست‌محیطی و افزایش مقاومت باکتریایی آنتی‌بیوتیک‌ها (Harikrishnan *et al.*, 2003, Iwama and Nakanishi, 1996)، محرک‌های ایمنی می‌توانند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها و حتی واکسیناسیون در پیشگیری و کنترل بیماری‌ها باشند (Swain *et al.*, 2006). در بین محرک‌های ایمنی مختلف، استفاده از محرک‌های ایمنی با منشأ گیاهی به دلیل مزیت‌های متعدد از جمله کاهش خطرات زیست‌محیطی، عدم ایجاد مقاومت دارویی، ارزان و در دسترس بودن ارجحیت دارد (Chen *et al.*, 2003; Ardo *et al.*, 2008). گیاهان دارویی و مشتقات آن‌ها (اسانس‌ها و عصاره‌ها) دارای طیف گسترده‌ای از عملکردهای ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. به‌طوری که با وجود اثرگذاری کنند، به دلیل عواملی چون پایدارتر بودن اثر آن‌ها، عدم ایجاد مقاومت نسبی عوامل بیماری‌زا نسبت به آن‌ها، نداشتن اثرات سوء بر جانداران و محیط زیست، دسترسی آسان، خطر کمتر برای محیط زیست و تولید کم هزینه و کاربرد مقرون به صرفه آن‌ها از نظر اقتصادی در کشور، در مقایسه با سایر ترکیبات شیمیایی-دارویی بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته‌اند (Ghasemi Pirbaluti *et al.*, 2010). ترکیبات فنلی موجود در منابع گیاهی به عنوان یکی از بهترین منابع آنتی‌اکسیدانی شناخته می‌شوند. این ترکیبات به صورت مؤثری به عنوان دهنده هیدروژن عمل نموده، از این‌رو به عنوان آنتی‌اکسیدان نقش عمده‌ای در پاسخ‌های فیزیولوژیکی و دفاعی دارد (Golluce *et al.*, 2007; Andre *et al.*, 2009). اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاهان مختلف بر عملکرد رشد، فعالیت بیوشیمیایی آنزیم‌های خون، شاخص‌های خونی و ایمنی غیراختصاصی ماهیان، مانند استفاده از عصاره گیاه آویشن شیرازی و پونه (Akbari *et al.*, 2015)، پوست انار (Shafiei *et al.*, 2016)، عصاره نعناع فلفلی (Adel *et al.*, 2015)، داروش (Moradi *et al.*, 2018) و برگ خرما (Ahmadifar *et al.*, 2019) اشاره نمود.

گیاه پنیرباد با نام علمی *Withania coagulans* یکی از گیاهان دارویی از تیره سیب زمینیان است که تاکنون در طب انسانی، علوم دامی و طیور مورد مطالعه قرار گرفته است (Sarbishegi *et al.*, 2016). این گیاه در ایران منحصراً در مناطق محدودی از رویشگاه‌های استان سیستان و بلوچستان به خصوص اطراف شهرستان سراوان، گشت خاش، ایرانشهر، نیک شهر، قصرقند و سرباز دیده می‌شود (Valizadeh *et al.*, 2015). عمده ویژگی دارویی این گیاه مربوط به حضور ترکیبات پلی فنلی، فلاونوئیدها و گروهی از لاکتونهای استروئیدی به نام وی‌تان‌ولیدها<sup>۱</sup> می‌باشد که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد دیابتی، ضد اختلالات کبدی، ضد کلسترولی، ضد التهابی و ضد تکثیر و متاستاز سلول‌های سرطانی می‌باشد (Datta *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2019; Ojha *et al.*, 2014). فلاونوئیدهای عصاره این گیاه به طور مستقیم باعث مهار مولکول‌های فعال سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال‌های آزاد هیدروکسید و پراکسیل می‌گردد (Parihar and Hemani, 2003; Sharma *et al.*, 2012) و همچنین اثر بازدارندگی مسمومیت این مولکول‌ها بر تخریب DNA در فیبروبلاست را دارد، که حکایت از قابلیت آنتی‌اکسیدانی قوی و آنتی‌بیوتیک طبیعی علیه باکتری‌های گرم مثبت ترکیبات فعال زیستی عصاره اندام‌های مختلف گیاه پنیرباد از جمله برگ، میوه نرسیده، کاسه گل و میوه رسیده دارد (Singh and Singariya *et al.*, 2012; Salwan *et al.*, 2012; Bokaeian and Saeidi, 2015; Kumar, 2011).

ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به عنوان یکی از مهم‌ترین ماهیان پرورشی، نقش مهمی در افزایش نرخ تولیدات آبی‌پروری در سطح جهان ایفا می‌کند، همچنین به علت ویژگی‌های منحصر به فرد پرورشی در اکثر کشورهای دنیا کشت شده و در ایران نیز به‌عنوان یکی از گونه‌های با اهمیت اقتصادی بالا و پرطرفدار در اکثر مناطق کشور کشت می‌شود (Sharif *et al.*, 2016). از این‌رو از این ماهی در تحقیق حاضر به‌عنوان نماینده ماهیان گرمایی استفاده گردید. با توجه به اینکه مطالعه‌ای درباره تأثیر آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه پنیرباد بر آبزیان انجام نشده است، بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات عصاره میوه گیاه پنیرباد بر عملکرد رشد، فعالیت بیوشیمیایی آنزیم‌های کبد، شاخص‌های خونی و ایمنی غیراختصاصی در ماهی کپور معمولی انجام شده است.

<sup>1</sup> Withanolids

## مواد و روش‌ها

تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی کپور معمولی سالم با میانگین وزنی  $33/58 \pm 1/40$  گرم از استخر خاکی مرکز تکثیر و پرورش ماهیان بومی زهک صید و در مخازن فایبرگلاس ۲۰۰۰ لیتری مجهز به هواده با تعویض روزانه ۴۰ درصدی آب آزمایشگاه آبی‌پروری گروه شیلات در دانشگاه زابل منتقل گردیدند. پیش از شروع آزمایش، ماهی‌ها به مدت ۲ هفته با شرایط آزمایشگاهی دمایی  $24 \pm 2$  سانتی‌گراد، دوره‌ی نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، اکسیژن محلول  $5/2 \pm 1$  میلی‌گرم بر لیتر،  $0/3 \pm$  pH: ۷/۴ سازگار گردیدند. در طی دوره سازگاری، ماهی‌ها با جیره تجاری کپور (تهیه شده از شرکت اصفهان مکمل، اصفهان، ایران) به صورت دو بار در روز و معادل ۳ درصد وزن بدن تغذیه شدند. سپس ماهی‌ها به صورت تصادفی در ۱۲ عدد آکواریوم با ظرفیت ۶۰ لیتر آبیگری در ۴ تیمار با ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۱۰ قطعه ماهی تقسیم‌بندی شدند. میوه گیاه پنیرباد از طبیعت منطقه سراوان به صورت تازه به دست آمد و توسط کارشناسان گیاه‌شناسی دانشگاه تأیید هویت شد. میوه‌ها سپس خشک و توسط آسیاب برقی پودر شد. جهت استخراج عصاره آبی به‌وسیله امواج فراصوت، ابتدا مقدار ۵۰ گرم نمونه پودر شده میوه پنیرباد با نسبت ۱ به ۱۰ (وزنی/حجمی)، با ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال (آب مقطر) مخلوط گردید. نمونه و حلال به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با فرکانس ۳۷ کیلو هرتز در دستگاه اولتراسوند (Ultrasound 1500، شرکت Scientz کشور چین) قرار داده شد و برای جلوگیری از افزایش دما، از گردش آب سرد در مدت زمان استخراج استفاده شد. سپس مخلوط نمونه و حلال به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق روی شیکر قرار داده شد. پس از آن مخلوط حاصل با استفاده از پمپ خلأ و کیف بوخنر و کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ صاف گردید، در پلیت ریخته شد و در آن با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت تا عصاره کاملاً خشک و عاری از حلال شود. عصاره استخراجی تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در ظروف تیره درون فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (Goli et al., 2005). عصاره میوه گیاه پنیرباد مورد مطالعه با سه دوز ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم به‌عنوان غلظت‌های پایین، متوسط و بالای عصاره به ازای هر کیلوگرم جیره غذای ماهی کپور اضافه شد. در هر تیمار مقدار محاسبه شده عصاره برای دستیابی به دوزهای مورد نظر، ابتدا با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و سپس به صورت جداگانه بر روی غذاهای فرموله شده (پروتئین ۴۲٪، چربی ۱۱٪، فیبر ۴٪، رطوبت ۱۰٪ و خاکستر ۱۰٪) شرکت اصفهان مکمل با اندازه یک میلی‌متر اسپری شد. به منظور یکسان‌سازی شرایط، در مورد تیمار شاهد (فاقد عصاره آبی میوه پنیرباد) نیز ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر (فاقد عصاره) بر روی یک کیلوگرم غذا اسپری شد. غذاهای آماده شده در آن به مدت ۳ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. به منظور محافظت غذاها و جلوگیری از رها شدن عصاره آبی میوه پنیرباد و ورود آن به محیط آب، غذاهای آماده شده توسط لایه‌ای از ژلاتین گاوی پوشانده شدند. بدین ترتیب که ابتدا محلول ۱۰ درصد ژلاتین گاوی در آب مقطر تهیه شد و بعد از جوشاندن و شفاف شدن ژلاتین در دمای حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد بر روی هر یک از انواع غذاها (یک کیلوگرم) به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول ژلاتین به صورت یکنواخت اسپری شد (Ramsden et al., 2009). در پایان غذاها به مدت ۳ ساعت دیگر در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. ماهی‌ها طی سه مرحله روزهای اول، ۳۰ و ۵۶ مورد زیست‌سنجی قرار گرفته و با توجه به میانگین وزنی ۳ درصد وزن بدن با دو وعده در روز در ساعات ۸:۰۰ و ۱۷:۰۰ غذادهی شدند. بررسی شاخص‌های رشد و تغذیه از جمله وزن کسب شده، درصد افزایش وزن بدن<sup>۲</sup> (BWI)، میزان رشد روزانه<sup>۳</sup> (DGR)، شاخص وضعیت<sup>۴</sup> (CF)، نرخ رشد ویژه<sup>۵</sup> (SGR) و ضریب تبدیل غذایی<sup>۶</sup> (FCR) بر اساس رابطه‌های زیر و زیست‌سنجی‌های انجام شده در طول دوره محاسبه شد (Li et al., 2009). بدین ترتیب که پس از گرسنه نگه داشتن ۲۴ ساعته ماهیان، میزان وزن با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم و طول با خط کش با دقت ۱ میلی‌متر به صورت انفرادی اندازه‌گیری شدند. ماهیان قبل از زیست‌سنجی با پودر گل میخک به میزان ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر بی‌هوش شدند.

<sup>2</sup> Body Weight Increase

<sup>3</sup> Daily Growth Rate

<sup>4</sup> Condition Factor

<sup>5</sup> Specific Growth Rate

<sup>6</sup> Food Conversion Ratio

$100 \times [\text{وزن اولیه (گرم)} / \text{وزن اولیه (گرم)} - \text{وزن نهایی (گرم)}] = \text{درصد افزایش وزن بدن} (\%)$   
 $[\text{طول (سانتیمتر)} / \text{وزن نهایی (گرم)}] \times 100 = \text{شاخص وضعیت}$   
 $[\text{تعداد روزهای پرورش/لگاریتم طبیعی وزن اولیه (گرم)} - \text{لگاریتم طبیعی وزن نهایی (گرم)}] \times 100 = \text{نرخ رشد ویژه (درصد در روز)}$   
 $\text{افزایش وزن (گرم)} / \text{غذای مصرف شده (گرم)} = \text{ضریب تبدیل غذایی}$

در پایان دوره آزمایش جهت مطالعه پارامترهای خونی و ایمنی، از هر آکواریوم به طور تصادفی ۳ عدد ماهی (سه نمونه خون به‌عنوان تکرار) با عصاره پودر گل میخک بی‌هوش و خون‌گیری از قسمت ساقه دمی با استفاده از سرنگ‌های پلاستیکی ۲ میلی‌متری و سرسوزن شماره ۲۱ انجام شد. بخشی از خون در لوله‌های معمولی (غیر هیپارینه) و بخشی دیگر جهت شمارش سلول‌های خونی به لوله‌های هیپارینه منتقل شد. نمونه‌های خون نگهداری شده در میکروتیوب فاقد ماده ضد انعقاد به مدت ۲ ساعت در یخچال نگهداری (Ghiasi *et al.*, 2015) و سپس سرم با استفاده از سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه) جدا شد. سنجش آنزیم‌های کبدی شامل آلکالین فسفاتاز (ALP)، لاکتات دهیدروژناز (LDH)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) با دستگاه اتوآنالایزر (Selectera مدل PROM، ساخت کشور هلند) در آزمایشگاه دامپزشکی دانشگاه زابل انجام شد (Acerete *et al.*, 2004). شمارش تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) با استفاده از پیپت ملانژور قرمز انجام شد. تعداد گلبول‌های قرمز بعد از رقیق‌سازی خون در محلول Lewis (۱ میلی‌لیتر فرمالین، ۹۹ میلی‌لیتر سترات سدیم و ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) توسط پیپت ملانژور با استفاده از لام هماتوسیتمتر نئوبار و با عدسی با بزرگنمایی ۴۰ شمارش شد (Blaxhall and Daisley, 1973). تعداد گلبول‌های سفید (WBC) با استفاده از پیپت ملانژور سفید و لام هماتوسیتمتر نئوبار و عدسی با بزرگنمایی ۴۰ پس از رقیق‌سازی خون هیپارینه به نسبت ۱ به ۲۰ در محلول Lewis شمارش شد (Blaxhall and Daisley, 1973). حجم هماتوکریت نمونه با استفاده از لوله‌های موئینه و سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه با دستگاه میکروسانتریفیوژ مدل (Hettich, Germany) انجام شد و حجم سلول‌های خونی به صورت درصد با استفاده از خط کش میکروهماتوکریت اندازه‌گیری شد (Řehulka, 2000). اندازه‌گیری هموگلوبین به روش استاندارد سیانو مت هموگلوبین انجام شد. ۵ میلی‌لیتر از محلول درابکین با ۲۰ میکرولیتر نمونه خون هیپارینه مخلوط و پس از ۱۰-۵ دقیقه نگهداری در محیط تاریک، مقدار جذب در دستگاه اسپکتروفتومتر (Unico, USA) در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری و میزان هموگلوبین بر حسب گرم بر دسی لیتر بر اساس رابطه زیر محاسبه شد (Řehulka, 2000).

$$\text{غلظت استاندارد} \times (\text{OD استاندارد} \times \text{OD نمونه}) = \text{HB (g/dl)}$$

میزان فعالیت لیزوزیم سرم در انتهای آزمایش با استفاده از روش کدورت سنجی و به روش توصیه شده توسط (Ellis, 1990) اندازه‌گیری گردید. برای اندازه‌گیری ایمنوگلوبولین تام سرم خون از روش Siwicki و همکاران (۱۹۹۴) استفاده شد. اساس کار به روش رنگ سنجی Bradford (۱۹۷۶) استوار بوده که میزان جذب نوری محلول G Blue Brilliant Coomassie-250 (به عنوان ماده رنگ‌پذیر) هنگام اتصال با پروتئین‌های سرم در طول موج ۵۹۵ نانومتر برای محاسبه میزان پروتئین‌ها به کار می‌رود. در این روش محلول استاندارد از غلظت‌های ۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin) استفاده گردید.

میانگین حجم یک گلبول قرمز (MCV) بر حسب فمتولیترا، میانگین هموگلوبین یک گلبول قرمز (MCH) بر حسب پیکوگرم و میانگین درصد غلظت هموگلوبین در یک گلبول قرمز (MCHC) بر حسب درصد بر اساس روابط زیر محاسبه شد (Klinger *et al.*, 1991):

$$\text{MCV (fl)} = 100 \times [\text{تعداد گلبول‌های قرمز (میلیون در میلی‌متر مکعب)} / \text{هماتوکریت (درصد)}]$$

$$\text{MCH (pg/cell)} = 100 \times [\text{تعداد گلبول‌های قرمز (میلیون در میلی‌متر مکعب)} / \text{هموگلوبین (گرم در دسی لیتر)}]$$

$$\text{MCHC (\%)} = 100 \times [\text{هماتوکریت (درصد)} / \text{هموگلوبین (گرم در دسی لیتر)}]$$

برای شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون (لنفوسیت، مونوسیت، نوتروفیل) نیز از نمونه خون حاوی ماده ضد انعقاد خون، از روش رنگ‌آمیزی گیمسا استفاده شد. گسترش خونی پس از تهیه با الکل اتانول تثبیت و با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی شد. نمونه‌ها به صورت حرکت زیگزاگ عدسی میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰ انجام گرفت، بر روی لام مشاهده شد و درصد افتراقی به واسطه طبقه‌بندی انواع مختلف گلبول‌های سفید بر اساس تفاوت‌های شکلی، طبق الگوی شکلی و خواص متفاوت رنگ‌پذیری تعیین شد (Blaxhall and Daisley, 1973).

آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (Version 18, IBM, USA) انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) انجام شد. ابتدا نرمال بودن داده‌ها با آزمون کولموگروف اسمیرنوف و همگنی واریانس‌ها توسط آزمون Levene آزمایش شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری Duncan در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

### نتایج

روند رشد ماهیان در طول مدت آزمایش در تیمارهای متفاوت یکسان نبود و اختلاف معنی‌داری بین تیمار شاهد با تیمار ۱۰۰۰ میلی گرم عصاره جیره مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). شاخص‌های رشد بچه ماهی کپور معمولی بعد از ۵۶ روز پرورش با جیره‌های متفاوت عصاره در جدول ۱ نشان داده شده است. شاخص‌های مختلف رشد ماهیان تیمارهای مختلف عصاره میوه پنبیرباد تغییر معنی‌داری نداشتند ولی تیمار حاوی ۱۰۰۰ میلی گرم عصاره با شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ( $p < 0.05$ ). طبق نتایج جدول ۲، کمترین و بیشترین مقدار فعالیت آنزیم‌های کبدی AST، ALT، ALP، و LDH سرم به ترتیب در تیمار ۱۰۰۰ میلی گرم عصاره و شاهد ملاحظه شد ( $p < 0.05$ ). این به معنی آن است که مقدار فعالیت آنزیم‌های کبدی با افزایش میزان عصاره روند کاهشی را نشان دادند.

طبق نتایج میزان فعالیت لیزوزیمی سرم خون ماهی کپور (به‌عنوان شاخص ایمنی ذاتی) در تیمار شاهد با تیمار ۲۵۰ میلی گرم عصاره تفاوت معنی‌داری نشان نداد ( $p > 0.05$ ). ولی با تیمارهای آزمایشی ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم عصاره تفاوت معنی‌دار را نشان داد ( $p < 0.05$ ) به شکلی که بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنزیم لیزوزیمی سرم خون به ترتیب در تیمار ۱۰۰۰ میلی گرم عصاره و تیمار شاهد بود. روند تغییرات میزان ایمنوگلوبولین با افزایش مقدار عصاره در مقایسه با تیمار شاهد افزایشی بود که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان دادند ( $p < 0.05$ ). با این وجود تیمار ۵۰۰ میلی گرم عصاره با تیمار ۱۰۰۰ میلی گرم عصاره میوه پنبیرباد تفاوت معنی‌داری نشان نداد ( $p > 0.05$ ).

جدول ۱. اثر سطوح مختلف عصاره میوه پنبیرباد جیره بر شاخص‌های رشد و تغذیه بچه ماهی کپور معمولی طی ۵۶ روز

(خطای استاندارد  $\pm$  میانگین)

شاخص‌های رشد	صفر	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰
وزن اولیه (گرم)	۳۲/۹۷ $\pm$ ۱/۲۷ <sup>a</sup>	۳۳/۴۰ $\pm$ ۱/۰۲ <sup>a</sup>	۳۴/۸۰ $\pm$ ۱/۰۱ <sup>a</sup>	۳۳/۱۵ $\pm$ ۱/۹۸ <sup>a</sup>
طول اولیه (سانتیمتر)	۱۲/۳۳ $\pm$ ۰/۲۵ <sup>a</sup>	۱۲/۱۸ $\pm$ ۰/۳۱ <sup>a</sup>	۱۲/۵۸ $\pm$ ۰/۳۸ <sup>a</sup>	۱۲/۱۴ $\pm$ ۰/۴۰ <sup>a</sup>
وزن نهایی (گرم)	۴۵/۰۸ $\pm$ ۱/۳۷ <sup>a</sup>	۴۹/۴۶ $\pm$ ۱/۰۹ <sup>ab</sup>	۵۳/۱۸ $\pm$ ۴/۴۶ <sup>ab</sup>	۵۵/۶۳ $\pm$ ۷/۷۲ <sup>b</sup>
طول نهایی (سانتیمتر)	۱۳/۴۴ $\pm$ ۰/۳۱ <sup>a</sup>	۱۴/۱۵ $\pm$ ۰/۳۹ <sup>ab</sup>	۱۴/۴۴ $\pm$ ۰/۲۸ <sup>b</sup>	۱۴/۸۵ $\pm$ ۰/۸۴ <sup>b</sup>
ضریب چاقی	۱/۸۶ $\pm$ ۰/۸۳ <sup>a</sup>	۱/۷۵ $\pm$ ۰/۱۶ <sup>a</sup>	۱/۷۷ $\pm$ ۰/۱۳ <sup>a</sup>	۱/۷۸ $\pm$ ۰/۱۵ <sup>a</sup>
افزایش وزن بدن (درصد)	۳۶/۸۷ $\pm$ ۷/۱۲ <sup>a</sup>	۴۸/۱۵ $\pm$ ۹/۲۳ <sup>ab</sup>	۵۳/۱۲ $\pm$ ۱۶/۹۸ <sup>ab</sup>	۶۷/۳۴ $\pm$ ۱۴/۹۶ <sup>b</sup>
نرخ رشد روزانه (گرم در روز)	۰/۲۲ $\pm$ ۰/۰۳ <sup>a</sup>	۰/۲۹ $\pm$ ۰/۰۲ <sup>ab</sup>	۰/۳۳ $\pm$ ۰/۰۱ <sup>ab</sup>	۰/۴۰ $\pm$ ۰/۱۱ <sup>b</sup>
نرخ رشد ویژه (درصد در روز)	۰/۵۶ $\pm$ ۰/۰۴ <sup>a</sup>	۰/۷۰ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>b</sup>	۰/۷۵ $\pm$ ۰/۱۹ <sup>b</sup>	۰/۹۱ $\pm$ ۰/۱۶ <sup>b</sup>
ضریب تبدیل غذایی	۱/۹۸ $\pm$ ۰/۱۶ <sup>a</sup>	۲/۳۰ $\pm$ ۰/۱۶ <sup>b</sup>	۲/۵۰ $\pm$ ۰/۱۱ <sup>bc</sup>	۲/۶۸ $\pm$ ۰/۱۰ <sup>c</sup>
بازماندگی (درصد)	۱۰۰ <sup>a</sup>	۱۰۰ <sup>a</sup>	۱۰۰ <sup>a</sup>	۱۰۰ <sup>a</sup>

حروف کوچک متفاوت (a, b, c) در هر سطر نشانگر تفاوت معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) بین تیمارهای مختلف می‌باشد.

**جدول ۲.** اثر سطوح مختلف عصاره میوه پنبیرباد جیره بر میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی، فعالیت لیپوزیمی و ایمونوگلوبولین سرم خون بچه ماهی کپور معمولی طی ۵۶ روز (خطای استاندارد  $\pm$  میانگین)

شاخص‌ها	میزان عصاره میوه پنبیرباد (میلی‌گرم در کیلوگرم غذا)			
	صفر	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰
آسپارات آمینوترانسفراز (واحد بین المللی الیتر)	۴۷۶/۰۰ $\pm$ ۲۰/۵۲ <sup>d</sup>	۳۶۱/۶۷ $\pm$ ۴/۰۴ <sup>c</sup>	۳۳۹/۶۷ $\pm$ ۱۷/۰۱ <sup>b</sup>	۲۲۶/۰۰ $\pm$ ۹/۱۷ <sup>a</sup>
آلاتین آمینوترانسفراز (واحد بین المللی الیتر)	۱۲/۰۰ $\pm$ ۱/۰۰ <sup>c</sup>	۷/۰۰ $\pm$ ۲/۰۰ <sup>b</sup>	۵/۰۰ $\pm$ ۱/۰۰ <sup>b</sup>	۱/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>a</sup>
آلکالین فسفاتاز (واحد بین المللی الیتر)	۲۰۸/۰۰ $\pm$ ۳/۰۰ <sup>d</sup>	۱۳۵/۶۷ $\pm$ ۵/۵۱ <sup>c</sup>	۱۲۰/۶۷ $\pm$ ۳/۰۶ <sup>b</sup>	۹۹/۶۷ $\pm$ ۲/۰۸ <sup>a</sup>
لاکتات دهیدروژناز (واحد بین المللی الیتر)	۴۷۲۲/۷۰ $\pm$ ۶۴/۵۲ <sup>d</sup>	۳۳۱۳/۳۰ $\pm$ ۱۰۱/۱۹ <sup>c</sup>	۲۷۱۷/۷۰ $\pm$ ۴۹/۰۵ <sup>b</sup>	۱۸۷۸/۷۰ $\pm$ ۴/۱۶ <sup>a</sup>
فعالیت لیپوزیم (میکروگرم/میلی‌لیتر)	۶/۱۶ $\pm$ ۱/۱۵ <sup>a</sup>	۷/۵۷ $\pm$ ۱/۰۲ <sup>a</sup>	۱۰/۳۴ $\pm$ ۰/۸۵ <sup>b</sup>	۱۲/۷۴ $\pm$ ۰/۸۳ <sup>c</sup>
ایمونوگلوبولین (mg/ml)	۸/۰ $\pm$ ۴/۳۷ <sup>a</sup>	۹/۰ $\pm$ ۶/۴۸ <sup>b</sup>	۱۰/۰ $\pm$ ۶/۲۴ <sup>c</sup>	۱۰/۰ $\pm$ ۸/۳۹ <sup>c</sup>

حروف کوچک متفاوت (a, b, c) در هر سطر نشانگر تفاوت معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) بین تیمارهای مختلف می‌باشد.

با توجه به داده‌های جدول ۳، مقدار هموگلوبین تیمارهای حاوی عصاره با شاهد تفاوت معناداری وجود داشت ( $p < 0.05$ ) و با افزایش میزان عصاره میوه گیاه پنبیرباد در جیره، میزان هموگلوبین روند افزایشی نشان داد. درصد هماتوکریت تیمارهای مختلف با یکدیگر تفاوت معناداری را نشان دادند ( $p < 0.05$ )، به طوری که با افزایش میزان عصاره، تغییرات درصد هماتوکریت نیز روند افزایشی نشان داد. با افزایش میزان عصاره، تغییرات گلبول‌های قرمز خون نیز روند افزایشی داشت. گلبول‌های قرمز خون در تیمار ۲۵۰ میلی‌گرم عصاره با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ( $p > 0.05$ ) ولی تیمارهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم عصاره با یکدیگر و با تیمارهای ۲۵۰ میلی‌گرم عصاره و شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند ( $p < 0.05$ ). بیشترین و کمترین مقدار میانگین غلظت هموگلوبین گلبول‌های قرمز را به ترتیب تیمار شاهد و تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم عصاره داشتند ( $p < 0.05$ ) و تیمارهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم عصاره با تیمارهای ۲۵۰ میلی‌گرم عصاره و شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند ( $p < 0.05$ ). مقدار میانگین حجم گلبول‌های قرمز تمام تیمارها با هم تفاوت معنی‌داری نشان ندادند ( $p > 0.05$ ).

**جدول ۳.** اثر سطوح مختلف عصاره میوه پنبیرباد جیره بر شاخص‌های خونی بچه ماهی کپور معمولی طی ۵۶ روز (خطای استاندارد  $\pm$  میانگین)

شاخص‌ها	میزان عصاره میوه پنبیرباد (میلی‌گرم در کیلوگرم غذا)			
	صفر	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰
هموگلوبین Hb (g/dl)	۶/۸۰ $\pm$ ۰/۵۳ <sup>a</sup>	۷/۷۶ $\pm$ ۰/۵۲ <sup>ab</sup>	۷/۹۶ $\pm$ ۰/۷۵ <sup>ab</sup>	۸/۳۰ $\pm$ ۰/۸۶ <sup>b</sup>
درصد هماتوکریت Hct (%)	۱۶/۷۴ $\pm$ ۱/۵۸ <sup>a</sup>	۱۹/۳۴ $\pm$ ۰/۸۳ <sup>b</sup>	۲۴/۴۶ $\pm$ ۱/۳۴ <sup>c</sup>	۲۷/۴۶ $\pm$ ۱/۱۲ <sup>d</sup>
گلبول‌های قرمز خون RBC ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	۱/۰۱ $\pm$ ۰/۰۲ <sup>a</sup>	۱/۱۲ $\pm$ ۰/۰۳ <sup>a</sup>	۱/۵۴ $\pm$ ۰/۰۸ <sup>b</sup>	۱/۸۱ $\pm$ ۰/۱۴ <sup>c</sup>
میانگین غلظت هموگلوبین گلبول‌های قرمز MCHC (gd <sup>-1</sup> )	۴۱/۰۱ $\pm$ ۶/۵۶ <sup>b</sup>	۴۰/۱۲ $\pm$ ۱/۰۰ <sup>b</sup>	۳۲/۵۰ $\pm$ ۱/۳۸ <sup>a</sup>	۳۰/۲۵ $\pm$ ۲/۸۳ <sup>a</sup>
میانگین حجم گلبول‌های قرمز MCV (fl)	۱۶۶/۱۳ $\pm$ ۱۳/۲۶ <sup>a</sup>	۱۷۲/۴۱ $\pm$ ۱۲/۰۹ <sup>a</sup>	۱۵۹/۷۴ $\pm$ ۱۶/۳۷ <sup>a</sup>	۱۵۲/۴۱ $\pm$ ۹/۶۷ <sup>a</sup>
گلبول‌های سفید خون WBC ( $\mu\text{l}$ )	۲۲۸۲۹/۰۰ $\pm$ ۲۸۴/۶۵ <sup>a</sup>	۲۳۵۳۳/۰۰ $\pm$ ۸۴۵/۷۵ <sup>a</sup>	۲۳۶۶۸/۰۰ $\pm$ ۴۶۰/۲۶ <sup>a</sup>	۲۴۱۱۸/۰۰ $\pm$ ۵۴۸/۶۰ <sup>a</sup>
درصد لنفوسیت	۷۸/۲۲ $\pm$ ۲/۲۵ <sup>b</sup>	۷۴/۵۰ $\pm$ ۱/۷۹ <sup>ab</sup>	۷۲/۰۷ $\pm$ ۱/۹۴ <sup>a</sup>	۷۲/۶۹ $\pm$ ۲/۳۷ <sup>a</sup>
درصد نوتروفیل	۱۶/۵۴ $\pm$ ۱/۴۱ <sup>a</sup>	۲۰/۴۴ $\pm$ ۱/۷۲ <sup>b</sup>	۲۱/۱۴ $\pm$ ۰/۶۹ <sup>b</sup>	۲۱/۲۹ $\pm$ ۱/۷۹ <sup>b</sup>
درصد مونوسیت	۴/۵۱ $\pm$ ۰/۴۰ <sup>a</sup>	۵/۵۴ $\pm$ ۰/۷۸ <sup>b</sup>	۶/۵۴ $\pm$ ۰/۳۷ <sup>c</sup>	۶/۳۲ $\pm$ ۰/۳۶ <sup>bc</sup>

حروف کوچک متفاوت (a, b, c) در هر سطر نشانگر تفاوت معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) بین تیمارهای مختلف می‌باشد.

طبق نتایج شمارش گلبول‌های سفید خونی، همه تیمارهای آزمایشی با یکدیگر تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند ( $p > 0.05$ ). در شمارش افتراقی گلبول سفید، تفاوت معناداری در تعداد لنفوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و نوتروفیل بین تیمارهای مختلف وجود داشت. بیشترین درصد لنفوسیت مربوط به تیمار شاهد بود که با تیمار ۲۵۰ میلی‌گرم عصاره تفاوت معنی‌داری نشان نداد ( $p > 0.05$ ). ولی با تیمارهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم عصاره تفاوت معنی‌داری نشان داد ( $p < 0.05$ ). کمترین درصد

نوتروفیل و مونوسیت مربوط به تیمار شاهد بود که با تیمارهای آزمایشی تغذیه شده با عصاره تفاوت معنی‌داری نشان داد ( $p < 0/05$ ). با افزایش میزان عصاره جیره، میزان نوتروفیل و مونوسیت‌ها روند افزایشی نشان دادند به طوری که بیشترین درصد نوتروفیل و مونوسیت به ترتیب مربوط به تیمار ۱۰۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم عصاره بود که با سایر تیمارهای آزمایشی تغذیه شده با عصاره تفاوت معنی‌داری نشان ندادند ( $p > 0/05$ ).

### بحث

استفاده از محرک‌های ایمنی با منشأ گیاهی با توجه به آثار جانبی کمتر بر موجود زنده و محیط زیست، عدم ایجاد مقاومت دارویی، ارزان بودن، پایدار و در دسترس بودن، در سال‌های اخیر جایگاه ویژه‌ای در تحقیقات آبی‌پروری یافته است. عصاره گیاه پنیرباد به دلیل دارا بودن ترکیبات فیتوشیمیایی مانند آنتوسیانین، پلی فنول‌ها (فلاونوئیدها) و گروهی از لاکتون‌های استروئیدی به نام ویتانولونیدها (ویتافرین A)، آنتی‌اکسیدانی دارای اثرات تحریک‌کننده سیستم ایمنی، ضد میکروبی و ضدالتهابی و ضد سرطان می‌باشد (Lateef and Qureshi, 2016; Sarbishegi *et al.*, 2016). با این حال استفاده از آن در صنعت آبی‌پروری تاکنون مورد توجه قرار نگرفته است.

همانطور که در بخش نتایج نشان داده شد، بررسی شاخص‌های رشد در مطالعه حاضر نشان داد تغذیه بچه ماهی کپور به مدت ۸ هفته با جیره غذایی حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم عصاره آبی میوه گیاه پنیرباد نسبت به تیمار شاهد به طور معنی‌داری سبب افزایش شاخص‌های رشد (افزایش وزن، افزایش طول و ضریب رشد ویژه) شد ( $p < 0/05$ ). بر اساس مرور منابع به عمل آمده تاکنون هیچ مطالعه‌ای در آبی‌پروری در خصوص استفاده از عصاره پنیرباد در جیره غذای آبزیان و اثرات آن بر شاخص‌های رشد ماهی انجام نشده است. با این حال به نظر می‌رسد بهبود شاخص‌های رشد در بچه ماهی‌های تغذیه شده با عصاره پنیرباد، ناشی از وضعیت تغذیه بهتر ایجاد شده توسط مکمل غذایی عصاره پنیرباد است. گزارش‌های متعدد از قابلیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجه ترکیبات فیتوشیمیایی گیاه پنیرباد وجود دارد (Lateef and Qureshi, 2016; Sarbishegi *et al.*, 2016). ترکیبات پلی فنولی عصاره‌های گیاهی، منجر به بهبود فعالیت‌های متابولیک بدن می‌گردند که روند کاتابولیسم گلیکوژن و گلوکز به سمت تأمین انرژی مورد نیاز فعالیت‌های طبیعی بدن پیش می‌رود و این امر می‌تواند افزایش رشد را در پی داشته باشد (Banee *et al.*, 2011). در این مطالعه نتایج حاصل از رشد، احتمالاً ناشی از امحاء عوامل سمی غذا توسط عصاره پنیرباد بود که منجر به بهبود فعالیت‌های متابولیک، عملکرد کبد و تقویت شاخص‌های ایمنی ماهی و در نتیجه تحریک رشد شده است (Jian and Wu, 2004). ولی بهترین ضریب تبدیل غذایی در تیمار شاهد حاصل گردید. همچنین در طی دوره آزمایش، میزان بازماندگی در تیمار شاهد و تیمارهای تغذیه شده با عصاره پنیرباد ۱۰۰ درصد بود و هیچ تلفاتی در حین آزمایش مشاهده نشد. این امر نشان‌دهنده بهینه بودن شرایط پرورش شامل کیفیت آب، تغذیه و غیره است.

تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم عصاره میوه گیاه پنیرباد طبق نتایج، کمترین مقدار آنزیم‌های کبدی AST، ALT، ALP و LDH را نسبت به شاهد نشان داد، به طوری که با افزایش سطح عصاره آبی میوه گیاه پنیرباد کاهش معنی‌دار آنزیم‌های کبدی مشاهده گردید. برخی ترکیبات گیاهی ممکن است در غشای سلولی تثبیت شوند و از سلول‌های کبد در برابر عوامل مخرب و آسیب رادیکال آزاد محافظت کنند (Lateef and Qureshi, 2016). آنزیم‌های AST و ALT نقش مهمی در مراحل نهایی تجزیه پروتئین جهت تولید ATP ایفا می‌کنند (Petrovic *et al.*, 1996). به عبارت دیگر افزایش سطح فعالیت این آنزیم‌ها، نقش مؤثری در استفاده از اسیدهای آمینه در فرآیند اکسیداسیون یا گلوکوژن‌سازی می‌کنند و می‌توانند شاخص بالینی مناسبی جهت تشخیص آسیب‌های وارده به کبد محسوب شوند، لذا هرگونه آسیب خفیف، التهاب یا نکروز سلول‌های کبد موجب آزاد شدن این آنزیم‌ها و افزایش سطح آن‌ها در پلاسما می‌گردد (Rao, 2006). بر اساس نتایج تحقیق حاضر، احتمالاً کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود فعالیت‌های متابولیک سلول‌های کبدی در تیمارهای تغذیه شده با عصاره پنیرباد بخصوص تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم، در مقایسه با تیمار شاهد، منجر به کاهش تولید آنزیم‌های کبدی و بهبود عملکرد بافت‌های تولیدکننده این آنزیم‌ها شده است. ترکیبات موجود در گیاه پنیرباد، نظیر پلی فنول‌ها و ویتافرین A به‌طور گسترده‌ای به عنوان ترکیبات فعال آنتی‌اکسیدانی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون پروکسیداز تأثیر مثبت

داشته و باعث کاهش رادیکال‌های آزاد می‌شود (Prasad *et al.*, 2010). در مطالعه Qureshi و Lateef (۲۰۱۴) تمام دوزهای ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره متانولی میوه پنیرباد، اثرات سمی بر کبد و قلب خرگوش نداشت و سطح ALT در همه گروه‌ها نرمال بود که این یافته نیز مطابق با یافته‌های مطالعه حاضر است. مشابه با نتایج به دست آمده در این مطالعه، Nejjati و Zamini (۲۰۱۷) گزارش کردند که به کارگیری عصاره هیدرو الکلی بابونه و رازیانه به میزان ۱ درصد در جیره غذایی بچه ماهیان کپور معمولی سبب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های کبدی ALT و AST شد.

ایمنی یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های فیزیولوژیک برای مقابله با عوامل بیماری‌زا و حفظ هموستازی بدن است. یکی از بخش‌های مهم سیستم ایمنی غیراختصاصی در ماهی‌ها، میزان فعالیت لیزوزیم سرم می‌باشد (Sakai, 1999) که افزایش فعالیت آن بعد از تجویز محرک‌های ایمنی، واکسن‌ها و برخی پروبیوتیک‌ها در ماهی گزارش گردیده است (Alishahi *et al.*, 2011). بررسی‌ها نشان می‌دهد که میزان لیزوزیم با افزایش تعداد سلول‌های بیگانه‌خوار افزایش می‌یابد (Sahoo *et al.*, 2005). نتایج مطالعه حاضر حاکی از افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم لیزوزیم سرم بچه ماهیان کپور معمولی تغذیه شده با جیره حاوی عصاره پنیرباد بود. با توجه به اینکه نوتروفیل از عوامل تولید لیزوزیم می‌باشند، در شمارش افتراقی گلبول‌های سفید بیشترین درصد نوتروفیل‌ها نیز مربوط به تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم عصاره بود که احتمالاً این خود دلیل افزایش سطح لیزوزیم در تیمار مذکور می‌باشد. نتایج مطالعات Wu و Jian (۲۰۰۴) و Ahmadifar و همکاران (۲۰۱۹) نیز مطابق نتایج این تحقیق بود که به ترتیب مکمل‌های خشک گیاهی و عصاره برگ درخت خرما در جیره غذایی ماهی کپور معمولی به دلیل دارا بودن ترکیبات فلاونوئیدی باعث بهبود میزان فعالیت لیزوزیم و شاخص‌های خونی این ماهی شدند.

ایمنوگلوبولین‌ها جز آنتی‌بادی‌های طبیعی هستند که در غیاب محرک آنتی‌ژنیک خارجی تولید می‌شوند و محافظت فوری و گسترده‌ای را در برابر عوامل بیماری‌زا ایجاد می‌کنند و به‌عنوان یکی از بخش‌های حیاتی سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهی است. استفاده از محرک‌های ایمنی باعث تغییر در سطوح ایمنوگلوبولین سرم خون می‌شود (Nayak *et al.*, 2007). ایمنوگلوبولین‌ها دسته‌ای از گلیکوپروتئین‌ها هستند که در سرم و مایعات بافتی تمام مهره‌داران یافت شده و کاهش سطح آن‌ها می‌تواند منجر به تضعیف سیستم ایمنی ماهی‌ها شود (Alishahi *et al.*, 2011). میزان ایمنوگلوبولین کل سرم متناسب با افزایش میزان عصاره آبی میوه پنیرباد روند افزایشی نشان داد که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد داشت ( $p < 0.05$ ). وجود ترکیبات دارای خواص آنتی‌اکسیدانی نظیر فلاونوئید، آنتوسیانین و پلی‌فنول‌ها در عصاره میوه پنیرباد، می‌تواند توجیه‌کننده افزایش برخی از فاکتورهای سیستم ایمنی نظیر ایمنوگلوبولین کل سرم در بچه ماهی کپور معمولی باشد (Azizian Shermeh *et al.*, 2018).

وظیفه اصلی سلول‌های قرمز خون یا اریتروسیت‌ها، حمل و انتقال گاز در سراسر بدن است. تعداد گلبول‌های قرمز در یک گونه ماهی به وضع بهداشت و سلامت ماهی بستگی دارد (Harikrishnan *et al.*, 2003). لذا به نظر می‌رسد که می‌توان از این فاکتور به عنوان یک شاخص جهت تأیید وضعیت بهداشت و سلامت ماهیان در تیمارهای مختلف تا پایان دوره آزمایش استفاده نمود. در کپور سالم، تحت شرایط دمایی مناسب، تعداد اریتروسیت‌ها بین ۱۸۰۰۰۰۰ - ۱۱۰۰۰۰۰ عدد می‌باشد (Soltani *et al.*, 2010). افزایش معنی‌دار Hb، Hct و RBC در تیمارهای آزمایشی ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم عصاره پنیرباد نشان‌دهنده تأثیر مثبت عصاره بر شاخص‌های خونی در ماهی کپور است که احتمالاً می‌تواند ناشی از اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره بر کاهش همولیز پراکسیداسیون چربی‌های موجود در غشای گلبول‌های قرمز خون و یا اثر حفاظتی پلی‌فنول‌ها در برابر پراکسید هیدروژن ناشی از اکسیداسیون در گلبول‌های قرمز باشد (Singh and Kumar, 2011). پلی‌فنول‌های موجود در ترکیبات گیاهی می‌توانند با فلزات و یون‌های فلزی مانند آهن کمپلکس‌هایی تشکیل دهند و این پتانسیل را دارند که در واکنش‌های فیزیولوژیکی مربوط به آهن و دیگر فلزات واسطه دخل و تصرف کنند، بنابراین این احتمال وجود دارد که دسترسی به آهن مورد نیاز بدن را تسهیل کنند (Lanping *et al.*, 2000). با توجه به در نظر گرفتن اثرات آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنول‌ها بر سطح غشای گلبول‌ها، این مواد می‌توانند یک مانع فیزیکی در برابر رادیکال‌های آزاد محلول فراهم کنند (Lanping *et al.*, 2000)؛ بنابراین دلیل احتمالی افزایش گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت با مصرف جیره حاوی عصاره آبی میوه

پنیرباد، اثرات آنتی‌اکسیدانی پلی فنول های عصاره می‌باشد. مشاهدات Shafiei و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی تأثیر عصاره پوست انار بر فاکتورهای خونی ماهی انگشت قدکیور معمولی با این پژوهش همخوانی دارد. طبق نتایج جدول شماره ۳ در تحقیق حاضر، اعداد به دست آمده برای تعداد گلبول‌های قرمز خون نزدیک به محدوده مناسب برای کپور ماهیان است (Tripathi *et al.*, 2004). همچنین هیچ گونه تغییر شکل و اندازه غیرعادی که ناشی از دوز سمی پلی فنول های عصاره آبی میوه پنیرباد باشد نیز در سلول‌های خونی مشاهده نشد. اگر چه تعداد گلبول‌ها قرمز و هماتوکریت به طور معنی‌داری در تیمارهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم عصاره آبی میوه گیاه پنیرباد نسبت به سایر تیمارها افزایش نشان داد، با این حال مقدار MCV در تیمار شاهد با تیمارهای با دوز مختلف عصاره آبی میوه پنیرباد اختلاف معنادار نشان نداد. این در حالی است که مقدار عددی MCV در تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم عصاره آبی میوه پنیرباد بیشتر از سایر تیمارها بود. بر این اساس، تغییرات هموگلوبین در مطالعه حاضر احتمالاً نمی‌تواند ناشی از تورم گلبول‌های قرمز باشد (Wepener *et al.*, 1992). در مطالعه Alishahi و همکاران (۲۰۱۱) که تجویز خوراکی عصاره گیاه خار مریم بر پاسخ ایمنی ماهی کپور معمولی را انجام دادند، نتایج نشان داد که بین MCV، MCH، MCHC و در میزان Hb تیمار ایمن شاهد و تیمار تجویز عصاره گیاه خار مریم اختلاف معنی‌دار وجود نداشتند. اختلاف بین نتایج احتمالاً می‌تواند ناشی از تفاوت گونه ماهی، غلظت و نوع عصاره مصرفی، سن ماهی و طول دوره آزمایش باشد. ایجاد عفونت یا استرس در بدن به تغییر تعداد گلبول‌های سفید خون (WBC) یا سرکوب فعالیت‌های آن منجر می‌شود. بررسی تغییر تعداد گلبول‌های سفید حاکی از نبود اختلاف معنادار بین تیمارهای مورد مطالعه در این تحقیق است؛ البته تعداد گلبول‌های سفید در مطالعه حاضر در محدوده مناسب برای کپور ماهیان ۲۲۸۰۰-۲۴۱۰۰ در میکرولیتر بود (Tripathi *et al.*, 2004). نتایج مطالعه حاضر با مطالعات Soltani و همکاران (۲۰۱۰) تأثیر اسانس روغنی آویشن شیرازی جیره بر ماهی کپور معمولی، Shafiei و همکاران (۲۰۱۶) اثر عصاره الکلی پوست انار با ترکیبات فلاونوئیدی بر فاکتورهای خون ماهی انگشت قد کپور معمولی، Heidarieh و Sheikhzadeh (۲۰۲۰) اثر ترکیب پلی فنول کاتشین چای سبز بر عملکرد رشد، برخی شاخص‌های خونی ماهی کاراس معمولی مطابقت دارد.

در برخی گیاهان، فعالیت آنتی‌اکسیدانی ممکن است به علت وجود ترکیب‌های ناشناخته یا برهم کنش‌های سینرژیک (همیاری) بین مواد مختلف باشد. ساپونین‌ها، فنول‌ها و فلاونوئیدها از آنتی‌اکسیدان‌های مشهور گیاهی هستند. هر گیاه دارای طیف وسیعی از ترکیب‌های فنولی متفاوت است و خاصیت آنتی‌اکسیدانی هر کدام از این مواد وابسته به ساختار شیمیایی آن‌ها می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان چنین استدلال کرد که ترکیبات زیست فعال موجود در عصاره آبی میوه گیاه پنیرباد به ویژه ترکیبات دارای خواص آنتی‌اکسیدانی نظیر فلاونوئید، آنتوسیانین و پلی فنول‌ها می‌توانند با از بین بردن رادیکال‌های آزاد و همچنین تقویت سیستم ایمنی از اثرات سوء هر گونه عوامل خارجی که ممکن است وارد سیستم پرورشی شود جلوگیری کنند (Azizian Shermeh *et al.*, 2018؛ Valizadeh *et al.*, 2015). با توجه به توسعه کمی پرورش ماهیان گرمابی در کشور و محدودیت‌های استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و ضرورت استفاده از ظرفیت‌های مختلف در افزایش بهره‌وری در پرورش آبزیان، استفاده از محرک‌های رشد و ایمنی به‌عنوان راهکاری در توسعه کیفی این صنعت ضروری به نظر می‌رسد. نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که عصاره آبی میوه گیاه پنیرباد باعث بهبود شاخص‌های خونی، تحریک ایمنی و رشد بچه ماهی کپور در محدوده وزنی بررسی شده می‌گردد، البته بهترین نتایج را تیمار دریافت کننده بیشترین دوز عصاره میوه پنیرباد (۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره غذایی) نشان داد که ممکن است مقادیر بالاتر عصاره قادر باشد اثرات مطلوب تری داشته باشد.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه زابل و پژوهانه (Grant Code) با کد: UOZ-GR-9618-73 اجرا گردیده است.

### منابع

Acerete, L., Balasch, J.C., Espinosa, E., Josa, A., Tort, L. 2004. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. The Journal of Aquaculture. 273(1-4): 167-178.

- Adel, M., Pourgholam, R., Zorriehzahra, S.J., Ghiasi, M. 2015. The effect of different level of *Mentha piperita* on some of the hematological, biochemical and immune parameters of *Oncorhynchus mykiss*. Iranian Scientific Fisheries Journal. 24(1): 37-46. (in Persian).
- Ahmadifar, E., Shahriari Moghadam, M., Sheikhzadeh, N. 2019. The effect of persimmon leaf extract (*Diospyros kaki*) as feed additive on some blood parameters and non-specific immune response in Common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Aquaculture Sciences. 7(11): 27-36. (in Persian).
- Akbary, P., Ghareghani poor, M., Fereidouni, M.S. 2015. Effects of *Zataria multiflora* boiss and *Mentha pulegium* extracts on phagocytosis, lysozyme, respiratory burst and blood cells of rainbow trout. Journal of Veterinary Research. 70(4): 447-454. (in Persian).
- Alishahi, M., Soltani, M., Mesbah, M., Esmaeilli Rad, A. 2011. Effects of dietary *Silybum marianum* extract on immune parameters of the Common carp. Journal of Veterinary Research. 66(3): 255-263. (in Persian).
- Andre, C.M., Schafleitner, R., Leagy, S., Lefever, I., Aliaga, C.A.A., Nomberto, G., Hoffman, L., Hausman, J.F., Larondelle, Y., Evers, D. 2009. Gene expression change related to the production of phenolic compounds in potato tubers grown under drought stress. Phytochemistry. 70(9): 1107-1116.
- Ardo, L., Yin, G., Xu, P., Varadi, L., Szigeti, G., Jeney, Z., Jeney, G. 2008. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the nonspecific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophyla*. Aquaculture. 275: 26-33.
- Azizian Shermeh, O., Taherizadeh, M., Valizadeh, M., Qasemi, A. 2018. Antioxidant Activities and Determining Phenolic and Flavonoid Contents of the Extracts of Five Species from Different Families of the Medicinal Plants Grown in Sistan and Baluchestan Province. Journal of Fasa University of Medical Sciences. 7(4): 465-479. (in Persian).
- 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. Fish Physiology Biochemistry. 37: 887-896.
- Blaxhall, P.C., Daisley, K.W. 1973. Routine hematological methods for use with fish blood. Journal of Fish Biology. 5: 771-781.
- Bokaeian, M., Saeidi, S. 2015. Evolution of antimicrobial activity of leaf extract of *Withania somnifera* against antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 17(7): 29-32.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantitation of protein utilizing the principal of protein- dye binding. Annals of Clinical Biochemistry. 72: 248-254.
- Chen, X., Wu, Z., Yin, J. 2003. Effects of four species of herbs on immune function of *Carassius auratus gibelio*. Journal of Fishery Sciences of China. 10: 36-40.
- Datta, A., Bagchi, C., Das, S., Mitra, A., Pati, A.D., Tripathi, S.K., Datta, A. 2013. Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of hydro alcoholic extract of *Withania coagulans* Dunal dried fruit in experimental rat models. Journal of Ayurveda and Integrative Medicine. 4(2): 99-106.
- Ellis, A.E. 1990. Lysozyme assays. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Robertson, B.S., Van Muiswinkel, W.B. (eds.). *Techniques in Fish Immunology*, SOS publication, Fair Haven, NJ, USA. pp. 101-103.
- FAO. 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rom, www.fao.org/publications. 243 p.
- Ghasemi Pirbaluti, A., Pir Ali, E., Pishkar, G.R., Jalali, S.M.A., Raisi, M., Jafarian D.M., Behzad, H. 2010. Effect of some medicinal plants essential oils on the immune system of rainbow trout. Quarterly Herbs. 2: 149-155. (in Persian).
- Ghiasi, M., Aghajani, S., Binaii, M., Pourgholam, R., Amiri, B. 2015. Effect of aqueous extracts of *Hypericum perforatum* on hematoserological parameters and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under thermal stress. Scientific Research Journal. 4(2): 91-101.
- Goli, A.H., Barzegar, M., Sahari, M.A. 2005. Antioxidant activity and total phenolic compound of pistachio (*Pistachia vera* L.) Hull extracts. Journal of Food Chemistry. 92: 521-525.

- Golluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A., Ozken, H. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. Food Chemistry. 103: 1449-1456.
- Harikrishnan, R., Nisha, M.R., Balasundaram, C. 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture. 221: 41-50.
- Heidarieh, H., Sheikhzadeh, N. 2020. Effects of polyphenolic compound green tea catechin on growth performance, some biochemical and mucosal indices in *Carassius carassius*. Journal of Fisheries. 72(3): 259-269. (in Persian).
- Iwama, G., Nakanishi, T. 1996. Innate immunity in fish. In: The Fish Immune System. Academic Press, London, UK. pp: 73-114.
- Jian, J., Wu, Z. 2004. Influences of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity of *Cyprinus carpio*. Fish and Shellfish Immunology. 16: 185-191.
- Khan, S.A., Adhikari, A., Ayub, K., Farooq, A., Mahar, S., Qureshia, M.N., Rauf, A., Khan, S.B., Ludwig, R., Mahmood, T. 2019. Isolation, characterization and DFT studies of epoxy ring containing new withanolides from *Withania coagulans* Dunal. Spectrochemical Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 217: 113-121.
- Klinger, H.E., Robin, J.P., Dewasmes, G., Le Maho, Y., Froustoso, J., Minaire, Y. 1991. Fasting induced rise in locomotor activity in rate coincides with increased protein utilization. Physiology and Behavior. 50: 337-343.
- Lanping, M. A., Zaiqun, L., Bo, Z., Li, Y., Zhongli, L. 2000. Inhibition of free radical induced oxidative hemolysis of red blood cells by green tea polyphenols. Chinese Science Bulletin. 45(22): 2052-2056.
- Lateef, T., Qureshi, A. 2014. Ameliorative Effect of *Withania coagulans* on Experimentally-induced Hyperlipidemia in Rabbits. Journal of Natural Remedies. 14(1): 83-88.
- Lateef, T., Qureshi, A. 2016. *Centratherum anthelminticum* and *Withania coagulans* Improves Lipid Profile and Oxidative Stress in Triton X-100 induced Hyperlipidemic Rabbits. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research. 8(6): 933-940.
- Li, K., Wangmi, Y., Zheng, Z., Jinag, R., Xie, N. 2009. Replacing fish meal with rendered animal protein ingredients in diets for Malabar grouper, *Epinephelus malabaricus*, reared in net pens. Journal of the World Aquaculture Society. 40: 67-75.
- Moradi, M., Falahatkar, B., Sattari, M., Alishahi, M. 2018. Effect of different levels of hydroalcoholic extract of *Viscum album* on growth and hematological indices in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). Journal of Aquaculture Sciences. 6(9): 1-12. (in Persian).
- Nayak, S., Swain, P., Mukherjee, S. 2007. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major Carp, *Labeo rohita* (Ham). Fish and Shellfish Immunology. 23: 892- 896.
- Naylor, R.L., Goldburg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., Troell, M. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. Nature. 405: 1017-1024.
- Nejatsanati, A.R., Zamini, A.A. 2017. Effects of hydro-alcoholic extract of *Matricaria recutita* and *Foeniculum vulgare* on indices of hematology and immunity parameters of *Cyprinus carpio*. Journal of Aquaculture Development. 11(4): 105-121.
- Ojha, S., Alkaabi, J., Amir, N., Sheikh, A., Agil, A., Fahim, M.A., Adem, A. 2014. *Withania coagulans* fruit extract reduces oxidative stress and inflammation in kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2014: 1-9.
- Parihar, M.S., Hemani, T. 2003. Phenolic antioxidants attenuate hippocampal neuronal cell damage against kainic acid induced excitotoxicity. Journal of Biosciences. 28: 121-128.
- Petrovic, S., Ozretic, B., Krajnovic-Oaretic, M. 1996. Cytosolic Aspartate Aminotransferase from grey mullet (*Mugil auratus*) Red Muscle: Isolation and Properties. International Journal of Biochemchemistry Cell Biology. 28(8): 873-881.
- Prasad, S., Kumar, R., Patel, D., Hemalatha, S. 2010. Wound healing activity of *Withania coagulans* in streptozotocin-induced diabetic rats. Pharmaceutical Biology. 48(12): 397-404.

- Quesada, S.P., Paschoal, J.A., Reyes, F.G.R. 2013. Considerations on the aquaculture development and on the use of veterinary drugs: special issue for fluoroquinolones A review. *Food Science*. 78: 1321-1333.
- Ramsden, S.R., Smith, T.J., Shaw, B.J., Handy, R.D. 2009. Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout: No effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. *Ecotoxicology*. 18: 939-951.
- Rao, J.V. 2006. Toxic effects of novel organophosphorus insecticide (RPR-V) on certain biochemical parameters of euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 86: 78-84.
- Řehulka, J. 2000. Influence of astaxanthin on growth rate, condition and some blood indices of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. 190: 27-47.
- Sahoo, P.K., Kumarij, J., Mishra, K. 2005. Nonspecific immune responses in juveniles of Indian Major Carp. *Journal of Applied Ichthyology*. 21: 151-155.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*. 172: 63-92.
- Salwan, C., Kumar, R., Mann, A.S. 2012. Evolution of antioxidant activity of leaves of *Withania coagulans* Dunal. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 1(1): 126-132.
- Sarbishegi, M., Khani, M., Salimi, S., Valizadeh, M., Sargolzaei Aval, F. 2016. Antiproliferative and Antioxidant Effects of *Withania coagulans* Extract on Benign Prostatic Hyperplasia in Rats. *Nephro Urol Mon*. 8(1):1-7.
- Shafiei, F., Soofiani, N.M., Ebrahimi, E., Nematollahi, A., Mohebbi, A. 2016. Effect of alcoholic extract of pomegranate peel (*Punica granatum* L.) on blood parameters of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerling. *Fisheries Science and Biotechnology*. 5(2): 59-72. (in Persian).
- Sharif Zadeh S.A., Khara H., Ghobadi S.H. 2016. Effect of riboflavin vitamin on growth, resistance of blood parameters and immunity of Common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Aquaculture Development*. 10(2): 57-63.
- Sharma, R.K., Samant, S.S., Sharma, P., Devi, S. 2012. Evaluation of antioxidant activities of *Withania somnifera* leaves growing in natural habitats of north-west Himalaya, India. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6(5): 657-661.
- Singariya, P., Mourya, K.K., Kumar. P. 2012. Antimicrobial Activity of the Crude Extracts of *Withania somnifera* and *Cenchrus setigerus* In-vitro. *Pharmacognosy Journal*. 27(4): 60-65.
- Singh, G., Kumar, P. 2011. Evaluation of antimicrobial efficacy of flavonoids of *Withania somnifera*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 73(4): 473-478.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Rumsey, G.L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 14: 125-139.
- Soltani, M., Sheikhzadeh, N., Ebrahimzadeh-Mousavi, H.A., Zargar, A. 2010 Effect of *Zataria multiflora* essential oil on innate immune responses of common carp. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 5(3):191-199.
- Swain, P.S., Dash, P.K., Sahoo, P., Routray, S.K., Sahoo, S.D., Gupta, P.K., Meher, N. 2006. Nonspecific immune parameters of brood *Labeo rohita* and their seasonal variations. *Fish and Shellfish Immunology*. 22: 38-43.
- Tripathi, P., Dubey, N.K. 2004. Exploitation of Natural Products as an Alternative Strategy to Control Postharvest Fungal Rotting of Fruit and Vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. 32: 235-245.
- Valizadeh, M., Bagheri, A., Valizadeh, J., Mirjalili, M.H., Moshtaghi, N. 2015. Phytochemical investigation of *Withania coagulans* (Stocks) Dunal in natural habits of Sistan and Baluchestan province of Iran. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 31(3): 406-417.
- Wepener, V., Van Vuren, J.H.J., Du Preez, H.H. 1992. The effect of hexavalent chromium at different pH values on the haematology of *Tilapia sparmani*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 101: 375-381.