



## اثر عصاره الکلی پوست انار (*Punica granatum L.*) بر Hct, WBC, Hb و RBC

### خون بچه ماهیان کپور انگشت قد (*Cyprinus carpio*)

فریبا شفیعی<sup>۱\*</sup>، نصرالله محبوبی صوفیانی<sup>۲</sup>، عیسی ابراهیمی<sup>۳</sup>، امیر حسین گلی<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲- اسناد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۳- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۴- استادیار گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

fr.shafiei@yahoo.com

### چکیده

بهبود کارایی این سیستم با استفاده از انواع محرک ها یک روش مهم جهت تقویت ایمنی غیر اختصاصی و پیشگیری از بیماری ها می باشد. در بین محرک های ایمنی انواع گیاهی، به علت ایجاد آسیب کمتر به ماهی و محیط زیست بیشتر مورد توجه بوده اند. در این تحقیق اثر عصاره الکلی پوست انار (*Punica granatum L.*) بر برخی فاکتورهای خونی در ماهی کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور تعداد ۱۶۵ قطعه ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی ( $11/81 \pm 11/73$  gr) به صورت تصادفی در ۵ تیمار و هریک با سه تکرار تقسیم گردیده و با تیمارهای غذایی مختلف شامل غلظت های متفاوتی از عصاره الکلی پوست انار (صفر: A، B: ۵۰، C: ۱۵۰، D: ۳۰۰ و E: ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم غذا) به مدت ۱۰ هفته تغذیه شدند. در انتهای دوره آزمایش از ماهی ها خونگیری به عمل آمد و برخی فاکتورهای هماتولوژیک بین تیمارها مقایسه گردید. نتایج حاصل تفاوت معنی داری ( $p < 0/05$ ) را در پارامترهای Hct, Hb و RBC بین تیمارهای آزمایشی نشان داد. بر این اساس سطوح ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم عصاره الکلی پوست انار باعث افزایش و بهبود Hb، Hct و RBC در خون ماهیان مورد آزمایش نسبت به تیمار شاهد گردید. بنابراین ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم عصاره پوست انار در جیره غذایی برای بهبود پارامترهای هماتولوژی بچه ماهیان کپور انگشت قد توصیه می شود.

کلمات کلیدی: عصاره پوست انار، رشد، Hb، WBC، Hct، RBC، کپور معمولی



# همایش ملی گیاهان دارویی

رومیتکار و ... در آردن



دانشگاه آزاد اسلامی  
واحد علوم و تحقیقات آیت اعلی

## مقدمه:

تقاضای روز افزون بشر برای مصرف محصولات شیلاتی از یک سو و کاهش ذخایر طبیعی این جانوران از سوی دیگر موجب تلاش های گسترده برای توسعه صنعت آبی پروری در دنیا شده است. مسئله تغذیه آبزیان از جمله مسائل مهمی است که می تواند رشد مناسب، افزایش بقا، تقویت سیستم ایمنی در مقابله با شرایط بد و استرس را برای آبزیان فراهم آورد. علاوه بر این بهبود کارایی سیستم ایمنی یکی از روش های مهم پیشگیری از بیماری ها می باشد. در بین محرک های دستگاه ایمنی انواع طبیعی آن به ویژه عصاره های گیاهی، به علت ایجاد آسیب کمتر به ماهی و محیط زیست اخیراً بیشتر مورد توجه بوده اند. با توجه به تکامل بیشتر ایمنی غیر اختصاصی ماهی نسبت به ایمنی اختصاصی و جایگاه ویژه محرک ایمنی در تحریک ایمنی غیر اختصاصی، استفاده از محرک های ایمنی در آبزیان ارجحیت بیشتری نسبت به حیوانات خونگرم دارد. تحقیقات پیشین نشان داده که غذاهای غنی از ترکیبات فنولیک مجموعه ای از خصوصیات همانند خواص آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد جهش زایی، فعالیت ضد التهابی، تنظیم قند خون و غیره را دارا می باشند. نتایج چنین تحقیقاتی منجر به گرایش روز افزون به استفاده از ترکیبات گیاهی به جای محرک های شیمیایی سیستم ایمنی در سال های اخیر شده است. گونه ی انار خوراکی با نام علمی *Punica granatum* از خانواده *Punicaceae* یکی از این گیاهانی می باشد که بومی ایران و هند است. این میوه یکی از قدیمی ترین میوه های خوراکی شناخته شده می باشد که به طور وسیعی در ایران کشت شده و معمولاً به صورت تازه و یا فرآوری شده مصرف می گردد به طوریکه مطابق آمار اداره جهاد کشاورزی میزان تولید میوه انار در سال ۱۳۹۰ در ایران ۹۰۸۵۵۰ تن بوده است. بنابراین هر ساله هزاران تن پوست انار توسط کارخانجات فرآوری آب انار و کنسانتره به عنوان فرآورده جانبی غیر قابل استفاده و ضایعات تولید می شود. خصوصیات آنتی اکسیدانی پوست انار با ترکیبات فنولیک و آلکالوئیدی شامل *Pelletierine* و تانن های قابل هیدرولیز از



# همایش ملی گیاهان دارویی

رومیتکاران و دانشجویان



قبیل punigluconin، pedunculagin، punicalagin، punicalin ، گالیک اسید، لاژیک اسید و آنتوسیانین مرتبط است. به نظر می رسد استفاده از محصولات فرعی حاصل از صنایع فراوری میوه انار در خوراک های آبزیان به دلیل غنی بودن از مواد پلی فنوله بتوانند نقش مهمی را در تولید انواع جیره های غذایی حاوی ترکیبات موثره دارویی گیاهی ایفا نمایند. بنابراین بررسی چگونگی استفاده از عصاره این گیاه در مقیاس آزمایشگاهی می تواند تجربه علمی و اطلاعات ارزشمندی را برای اجرای چنین برنامه غذایی در مقیاس تجاری و در سطح کارگاه های پرورشی فراهم نماید.

## مواد و روشها :

ماهیان انگشت قد کپور معمولی از یک مزرعه تکثیر و پرورش آبزیان واقع در کرسکان اصفهان خریداری گردید. این ماهیان به مدت ۲۰ روز با شرایط کارگاه پرورش سازگار و با جیره ی تجاری تغذیه شدند. در انتهای دوره ی سازگاری، ۱۶۵ عدد از ماهیان سالم (از نظر ظاهری) با میانگین وزنی در حدود ۱۱ گرم جهت آغاز آزمایش انتخاب گردیدند. این مطالعه در قالب یک طرح تصادفی در پنج تیمار و سه تکرار شامل ۱۵ واحد آزمایشی و تعداد ۱۱ عدد ماهی در هر واحد به اجرا درآمد. در این آزمایش از یک سیستم مدار بسته استفاده شد. مقدار عصاره اناری که در جیره استفاده شد عبارتست از: **A: ۵۰، B: ۱۵۰، C: ۳۰۰، D: ۶۰۰** میلی گرم بر هر کیلوگرم غذا. مدت زمان آزمایش ۷۵ روز بود. ترکیب جیره غذایی مورد استفاده در این آزمایش در جدول ۱ ارائه گردیده است. این مواد پس از مخلوط نمودن با استفاده از دستگاه پلت زن آزمایشگاهی تبدیل به پلت با قطر ۲/۵ میلی متر گردید. در طول دوره ی پرورش، غذادهی به میزان ۳/۵ درصد وزن توده ی زنده در هر تانک انجام شد. این میزان بصورت دو وعده ی یکسان در ساعت های ۸ صبح و ۴ بعد از ظهر در تانک های پرورش توزیع می گردید. در ابتدا و انتهای دوره آزمایش، تمامی ماهیان به صورت انفرادی زیست سنجی شدند و در روزهای ۱۵ و ۳۰ و ۴۵ و ۶۰ دوره پرورش، زیست توده کل ماهیان هر واحد آزمایشی در هر تانک توزین و میزان غذای مورد نیاز هر واحد با توجه به میانگین وزنی جدید تعیین شد. پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب



# همایش ملی گیاهان دارویی

رومینگان و رومینگان در آرد



شامل: درجه حرارت، اکسیژن بصورت روزانه، pH و آمونیاک آب بصورت هفتگی اندازه گیری شدند که به ترتیب ۲۷-۲۰ درجه سانتی گراد، ۶/۸-۸/۵ (ppm)، ۷/۲-۷/۶ و کمتر از ۰/۰۱ (ppm) بودند. جهت تهیه عصاره پوست میوه کاملاً در آب شستشو و در سایه خشک شده، سپس پودر و تا زمان استفاده در ۲۰°C- نگهداری شد. استخراج عصاره با استفاده از روش Harikrishnan و همکاران (۲۰۰۵) به شرح ذیل انجام شد: صد گرم از پودر میوه در فلاسک ۲ لیتری استریل با ۱ لیتر اتانول ۹۸٪ مخلوط شده و سر فلاسک با فویل آلومینیومی پوشش داده شد و به مدت ۷ روز در دمای اتاق نگه داری شد. عصاره با پارچه‌ی نازک و استریل فیلتر و حلال با استفاده از vacuum evaporator چرخشی تغلیظ شد.

جدول ۱- اجزای فرمول جیره آزمایشی مورد استفاده در تغذیه کپور معمولی با سطوح مختلف عصاره. مقادیر موجود در جدول بر حسب درصد می باشد.

E	D	C	B	A	ترکیب غذایی
۴۱	۴۱	۴۱	۴۱	۴۱	آرد ماهی
۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	آرد ذرت
۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	آرد گندم
۶/۹۴	۶/۹۷	۶/۹۸۵	۶/۹۹۵	۷	سبوس برنج
۹	۹	۹	۹	۹	مالس نشکر
۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	مکمل ویتامینه
۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	مکمل معدنی
۰/۰۶۰۰	۰/۰۳۰۰	۰/۰۱۵۰	۰/۰۰۵۰	۰	عصاره مصرفی

در انتهای دوره تقریباً ۰/۵ میلی لیتر از خون ساقه دمی ماهی‌ها گرفته شد. خون در دمای ۴ °C با استفاده از هیپارین به عنوان ماده ضد انعقاد نگهداری شد. سپس تعداد سلول‌های قرمز خون (RBC) در رقت ۱:۲۰۰ و تعداد گلبولهای سفید خون (WBC) در رقت ۱:۱۰۰ از نمونه خون با Neubauer hemocytometer شمارش شد. سنجش متوسط microhematocrits با استفاده از روش Snieszko Larsen انجام گرفت. میزان هموگلوبین (Hb: گرم بر دسی لیتر) توسط cyanhemoglobin تعیین شد. غلظت هموگلوبین در طول موج ۵۴۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر مشخص شد.

هر تانک به عنوان یک واحد آزمایشی در نظر گرفته شد و داده‌های آماری به صورت میانگین خطای استاندارد گزارش شد. در این مطالعه کلیه محاسبات آماری در دو نرم افزار SPSS 19 و Microsoft Office Excel 2007 انجام گرفت. از آزمون Kologomorov-Smirnove به منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها و سپس از



آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) و از آزمون دانکن برای بررسی وجود یا عدم اختلاف معنی دار بین میانگین تیمارها استفاده شد.

## نتایج و بحث:

مطالعه حاضر به بررسی اثر عصاره پوست میوه انار بر فاکتورهای هماتولوژی ماهی کپور معمولی پرداخته است. شاخص Hb, RBC و Hct پس از ده هفته در تیمارهای D و E به صورت معنی داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش نشان داد ( $P < 0/05$ ). در حالیکه شاخص WBC نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی داری نداشت (جدول ۲). عبدالظاهر و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی خود بر تاثیر گیاه شمبلیله (*Trigonella foenum*) در ماهیان تیلاپپای نیل نیز افزایش Hb, RBC و Hct در ماهیان تغذیه شده با این گیاه را بطور معنی داری نسبت به تیمار شاهد گزارش کردند. علیشاهی و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که آلوئه ورا در سطح ۰/۵ درصد در جیره کپور معمولی تاثیری بر فاکتورهای خونی ندارد که مطابق با یافته های مطالعه حاضر نیست. این تفاوت احتمالا می تواند ناشی از تفاوت در نوع گیاه و مقدار و نوع ترکیبات موجود در آن باشد. به طور کلی، عوامل موثر بر تعداد سلول های قرمز خون شامل گونه، سن یا وزن، جنس، فصل، دما و غیره هستند (۷). میزان هموگلوبین و هماتوکریت تابعی از تغییر تعداد گلبول های قرمز بوده و رابطه مستقیم با آن دارد. در تحقیق حاضر اعداد به دست آمده برای پارامترهای خونی در محدوده نرمال برای کپور ماهیان بوده (۴) همچنین هیچ گونه دفرمیتی و اندازه غیر عادی نیز که ناشی از دوز سمی پلی فنول ها باشد در سلول های خونی مشاهده نشد. هموگلوبین سنجش دقیقی از ظرفیت حمل اکسیژن خون است. مقدار بالاتر گلبول قرمز و هموگلوبین می تواند نشان دهنده ظرفیت بالای حمل اکسیژن باشد که معمولا این حالت می تواند به خاطر فعالیت بدنی و یا متابولیسمی زیاد و یا در شرایط کمبود اکسیژن ایجاد شود لذا با توجه به میزان مناسب اکسیژن موجود در محیط در مطالعه حاضر افزایش تعداد گلبول قرمز و هموگلوبین ناشی از کمبود اکسیژن در محیط نیست. افزایش معنی دار Hb, RBC و Hct در تیمار D, E در تحقیق حاضر احتمالا نشان دهنده تاثیر



# همایش ملی گیاهان دارویی

رومیتکاران و رومیان آردن



مثبت عصاره پوست انار بر فاکتور های هماتولوژی و وضعیت تنفسی در ماهی کپور است که ناشی از اثر آنتی اکسیدان های موجود در پوست انار بر کاهش همولیز پراکسیداسیون چربی های موجود در غشای سلول های قرمز خون است. با توجه به در نظر گرفتن اثرات آنتی اکسیدانی پلی فنول ها بر سطح غشا گلوبول ها، این مواد می توانند یک مانع فیزیکی را در برابر رادیکال های آزاد محلول فراهم کنند و در مطالعه حاضر احتمالا تعداد گلوبول های قرمز نیز با توجه به همین مکانیسم می تواند افزایش یافته باشد. بررسی تغییر تعداد گلوبول های سفید حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمار های مورد مطالعه در این تحقیق است ( $P < 0/05$ ) Harikrishnan و همکاران ۲۰۱۰ گزارش کردند سلول های سفید خون (WBC) در ماهی گلد فیشی که با رژیم غذایی حاوی ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم از مخلوط عصاره های گیاهی تغذیه شده به طور قابل توجهی نسبت به شاهد افزایش نشان داد ( $P < 0/05$ ). این اختلاف احتمالا می تواند ناشی از تفاوت نوع ماهی و گیاه مصرفی باشد. Kumar (۲۰۰۷) نشان داد که افزایش تعداد گلبول های سفید بخشی از دفاع سیستم ایمنی ماهی می باشد، ولی همیشه میزان محافظت ماهی در برابر عوامل عفونی با تعداد لکوسیت های ماهی ارتباط مستقیم ندارد.

جدول ۲- شاخص های هماتولوژی خون بچه ماهی کپور معمولی (خطای استاندارد میانگین)

تیمار	A	B	C	D	E
Hb (g/dl)	۳/۸۳±۱/۰۹ <sup>a</sup>	۳/۰۶±۰/۳۱ <sup>a</sup>	۳/۱۰±۰/۴۵ <sup>a</sup>	۷/۴۳±۰/۴۴ <sup>b</sup>	۷/۸۰±۰/۹۵ <sup>b</sup>
RBC (×10 <sup>6</sup> /μ L)	۱/۰۰±۰/۰۲ <sup>a</sup>	۱/۱۱±۰/۱۰ <sup>a</sup>	۱/۱۳±۰/۰۷ <sup>a</sup>	۱/۵۷±۰/۱۵ <sup>b</sup>	۱/۷۹±۰/۰۲ <sup>b</sup>
Hct/.	۱۳±۳/۲۱ <sup>a</sup>	۱۰±۱/۰۰ <sup>a</sup>	۱۰±۲/۰۸ <sup>a</sup>	۲۳±۱/۱۵ <sup>b</sup>	۲۳/۳۳±۲/۹۶ <sup>b</sup>
WBC (/ μ L)	۲۲۸۴۱/۶۶±۲۶۳/۸۳	۲۳۲۹۵/۶۶±۴۰۳/۱۸	۲۳۳۰۴/۶۶±۳۳۵/۳۲	۲۳۶۴۸±۴۱۸/۹۸	۲۳۷۵۷±۶۱۹/۰۸

حروف مشابه در هر ردیف نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار می باشد ( $P < 0/05$ )

گزارش حاضر نشان داد که تغذیه کپور ماهی با جیره ای حاوی سطوح ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر هر کیلو گرم، باعث افزایش و بهبود Hct, Hb و RBC در خون ماهیان مورد آزمایش نسبت به تیمار شاهد گردید اما تفاوت معنی داری در WBC بین تیمارها دیده نشد ( $P < 0/05$ ). براساس یافته های حاصل از این تحقیق سطوح ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم عصاره پوست انار در جیره غذایی برای بهبود پارامترهای هماتولوژی بچه ماهیان



کپور انگشت قد توصیه می شود. بنابر این مطالعات بیشتری برای کشف توانایی های انار به عنوان یک محرک گیاهی برای تقویت سیستم ایمنی با توجه به گونه های ماهی توصیه می شود.

## منابع

1. علیشاهی، م، رنجبر، م، قربانی، م، پیغان، ر، مصباح، م، و راضی، ج. ۱۳۸۹. اثر تجویز خوراکی گیاه آلوئه ورا بر ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی ماهی کپور معمولی. مجله طب دامی ایران. ۱۸۹-۱۹۵.
2. abdelZaher, A., Mostafa, M., Ahmad, M., Mousallamy, A., and Samir, A. 2009. Effect of Using Dried Fenugreek Seeds as Natural Feed Additives on Growth Performance, Feed Utilization, Whole-body Composition and Entropathogenic *Aeromonas Hydrophila*-challenge of Monsex Nile Tilapia *O. Niloticus* (L) Fingerlings. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(2): 1234-1245
3. Harikrishnan, R., Balasundaram, C., and Heo M. 2010. Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 28(2):354-61.
4. Kumar Jha, A., Pal, A.K., Sahu, N.P., Kumar, S., and Mukherjee, S.C. (2007). Haemato-immunological responses to dietary yeast RNA, fatty acid and  $\beta$ - carotene in *Catla catla* juveniles. *Fish Shellfish Immunol.* 23: 917-927.
5. Tripathi, N. K., Latimer, K., and Burnley, V. 2004. Hematological reference intervals for koi (*Cyprinus carpio*), including blood cell morphology, cytochemistry, and ultrastructure. *Vet Clin Pathol.* 33 : 74 – 83 .
6. Wu, F. C., Chen, M. L., and Ting, Y. 2006. Hematological analysis in cultured healthy mullet (*Mugil cephalus*) Bull. *Tainan Fish Cult. Stn. TFRI.* 4:27-36.