1052-AMIWR2019

اثر مکمل گیاهی بیوهربال (حاوی پودر زنجبیل و رازیانه) بر عملکرد آنزیم‌های کبد و گوارشی و شاخص‌های بیوشیمیایی ماهی کفال خاکستری (Mugil cephalus)

پریا اکبری*

استادیار گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران
Paria.akbary@gmail.com

چکیده:

تحقیق حاضر به‌منظور بررسی اثر سطوح مکمل گیاهی بیوهربال (پودر زنجبیل و رازیانه) فعالیت آنزیم‌های گوارشی (آمیلاز، لیپاز و پروتئاز) و کبدی (آسپارتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز) و شاخص‌های بیوشیمیایی (گلوکز، پروتئین تام، گلوبولین، آلبومین، کلسترول و تری‌گلیسرید) ماهی کفال خاکستری به مدت ۶۰ روز صورت گرفت. در این مطالعه، تعداد ۴۵۰ قطعه لارو کفال ماهی با میانگین وزنی ۰/۷۲±۰/۰۱ g در یک طرح کاملا تصادفی با ۵ تیمار آزمایشی و ۳ تکرار (با تعداد ۳۰ قطعه در هر تکرار) که شامل تیمار آزمایشی شاهد (بدون استفاده از بیوهربال) و در تیمارهای آزمایشی ۲، ۳، ۴ و ۵ میزان استفاده از این مکمل گیاهی به ترتیب g/kg ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ غذا بود مورد استفاده قرار گرفتند. در پایان آزمایش، نتایج حاصله نشان داد که بالاترین فعالیت آنزیم‌های پروتئاز (۱۲/۰۸±۳۴۱ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) آمیلاز (۱۱/۲۳±۴۰۴/۶۷ واحد بر میلی گرم پروتئین) و لیپاز (۰/۱۸±۵/۷۶ واحد بر میلی گرم پروتئین)، پایین ترین فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز (۱۳/۰۵±۹۲/۶۶ واحد بر میلی‌لیتر)، آلانین آمینوترانسفراز (۱/۱۵±۱۵/۳۳ واحد بر میلی‌لیتر) و آلکالین فسفاتاز (۲/۵۱±۶۶/۳۳ واحد بر میلی‌لیتردر تیمار حاوی g/kg ۱۵مکمل گیاهی مشاهده شد.که با تیمار شاهد دارای تفاوت معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). کمترین میزان کلسترول (۳/۷۸±۱۲۰/۶۶ میلی‌گرم بر دسی‌ایتر)، گلوکز (۱/۵۷±۸۰/۳۳ میلی-گرم بر دسی‌لیتر) و تری‌گلیسرید (۹/۰۱±۱۲۰/۰۶ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) و بیشترین میزان گلوبولین (۰/۱۵±۱/۵۲ گرم بر دسی‌لیتر) در تیمار ۴ گزارش شد. در مجموع بر اساس نتایج این تحقیق، افزودن g/kg ۲۰ مکمل گیاهی (زنجبیل و رازیانه) به جیره غذایی ماهی کفال خاکستری به‌منظور بهبود فعالیت آنزیم‌های شاخص عملکرد گوارش و کبد و شاخص های بیوشیمیایی در این ماهی پیشنهاد می شود.

واژه های کلیدی: کفال ماهی، بیوهربال،شاخص‌های بیوشیمیایی، آنزیم گوارشی، انزیم‌های شاخص عملکرد کبد

مقدمه

با گسترش سریع صنعت آبزی‌پروری، به منظور تامین نیازهای پروتئینی انسان استرس وحساسیت ماهی‌ها به بیماری در سیستم پرورش متراکم افزایش یافته است (Conte, 2004). لذا استفاده از بسیاری از مکمل‌های غذایی نظیر پزوبیوتیک‌ها، محرک‌های ایمنی و محصولات گیاهی برای مقابله با عوارض جانبی مرتبط با شرایط پرورش توسعه یافته است (Newaj- Fyzul and Austin, 2015). اکثر گیاهان دارویی به‌دلیل داشتن ترکیبات زیست فعال نظیر آلکانوئیدها، رنگدانه‌های فلاونوئیدها، فنول-ها، ترپنوئیدها، استروئیدها و روغن‌های ضروری دارای خواص مختلفی نظیر ضد استرس، محرک رشد، تحریک اشتها، تحریک سیستم ایمنی و خواص ضد میکروبی می‌باشند (Kumar Bairwa et al., 2012) لذا استفاده از این ترکیبات در رژیم غذایی ماهی‌ها و سخت‌پوستان توسعه یافته است (Banaee et al.,2011)

تحقیقات متعددی در ارتباط با اثر زنجبیل بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی در ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*) (جهان‌جو و همکاران،۱۳۹۴)، میگوی ببری سیاه (*Peneaus monodon*) (Venkataramalingam et al.,2011) و ماهی بنی

(*Mesopotamichthys sharpeyi*) (Rahimi Yadkoori et al., 2015) بر فعالیت آنزیم‌های کبدی در ماهی صبیتی (جهان‌جو و همکاران،۱۳۹۴)، قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (اکرمی و همکاران، ۱۳۹۷)، فیل ماهی (Gholipur Kanani et al.,2014; Vahedi et al.,2017) و گربه ماهی آسیایی (Kumar et al., 2014) و فراسنجه‌های بیوشیمیایی در ماهی سی باس آسیایی (*Lates calcarifer*)(Talpur et al.,2013)، فیل ماهی (حسن پور و همکاران، ۱۳۹۴ Vahedi et al., 2014; Gholipur Kanani et al.,2014;) و قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (Dugenci et al., 2003;اکرمی و همکاران، ۱۳۹۷) صورت گرفته است. به عنوان مثال Vahedi و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که استفاده از ۰/۵ و ۱/۵ درصد عصاره زنجبیل در جیره غذایی فیل ماهی موجب کاهش معنی دار میزان فعالیت آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز سرم خون ماهی در مقایسه با تیمار شاهد شد. Talpur و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که استفاده از پودر زنجبیل در جیره غذایی ماهی سی باس آسیایی (*Lates calcarifer*) منجر به کاهش معنی‌دار میزان کلسترول و تری‌گلیسیرید خون در مقایسه با تیمار شاهد شد. Venkataramalingam و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که تجویز خوراکی آرتمیای غنی شده با ۲۵ درصد زنجبیل به پست لارو میگوی ببری سیاه (*Peneaus monodon*) منجر به افزایش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم آمیلاز و پروتئاز در مقایسه با تیمار شاهد شد.

زنجبیل با نام علمی *Zingiber officinale* یکی از گیاهان دارویی است که در آسیای میانی، چین، هند و پاکستان رشد می‌کند و به‌عنوان ادویه و دارو برای برخی بیماری‌ها در طب سنتی استفاده می‌شود (Zhang et al.,2009). ریشه زنجبیل حاوی ترکیبات متعددی نظیر جینجرول، شاگول‌ها، جینجردیون و جینجردیول است که دارای فعالیت بیولوژیکی نظیر آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و دارویی است (Zhao et al.,2011). جینجرولها از جمله ترکیبات زنجبیل است که محرک اشتها و ضدتهوع می-باشد (Talpur *et al.*, 2013)

رازیانه با نام علمی *Feniculum vulgare* به‌عنوان دارو برای طیف وسیعی از بیماری‌های مرتبط به سیستم گوارشی، غدد درون-ریز، تولید مثل و تنفسی در طب سنتی استفاده می‌شود (Shamkant et al.,2014). مطالعات فیتوشیمیایی حضور ترکیبات زیست فعال ارزشمند نظیر ترکیبات فرار، فلاونوئیدها، فنول‌ها، آنتول‌ها، اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه را در این گیاه تائید می‌کند. این ترکیبات موجود در رازیانه دارای خواص متعددی از جمله ضد ویروسی، ضد باکتری، ضد التهابی، آنتی اکسیدانی، ضد درد، ضد تومور، ضد اسپاسم، ضد تب، هیپولیپیدمی و هیپوگلیسمی هستند. لذا استفاده از این گیاه در چند دهه اخیر مورد توجه قرار گرفته است (Kwon *et al.*, 2002. ; Marino *et al.*, 2007).

با توجه به این‌که تاکنون در ارتباط با کاربرد پودر زنجبیل و رازیانه به‌صورت توام به‌عنوان مکمل گیاهی بیوهربال در پرورش ماهی کفال خاکستری و ماهیان دیگر منبع علمی در دسترس نیست. از این رو با توجه به وفور زنجبیل و رازیانه در ایران و نظر به این‌که ماهی کفال خاکستری دارای ارزش اقتصادی قابل توجهی است، لذا در این مطالعه به بررسی اثر مکمل گیاهی بیوهربال (پودر زنجبیل و رازیانه) بر روی فعالیت آنزیم‌های کبد و گوارشی و فراسنجه‌های بیوشیمیایی لارو کفال ماهی خاکستری پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

ماهی و شرایط پرورش

تحقیق حاضر، در بهمن ماه ۱۳۹۳ در کارگاه تکثیر و پرورش ماهی مرکز تحقیقات شیلات چابهار به‌مدت ۶۰ روز انجام شد. در این مطالعه از ۴۵۰ قطعه لارو ماهیان کفال خاکستری به‌ظاهر سالم که از اسکله رمین واقع در ۵ کیلومتری بندر چابهار صید و به محل آزمایش، انتقال داده شدند، استفاده گردید. جهت سازگاری ماهیان با شرایط آزمایشگاهی، لاروها در ۳ مخزن ۳۰۰ لیتری با تراکم ۱۵۰ قطعه لارو ماهی در هر مخزن به‌مدت دو هفته نگهداری و با غذای تجاری تغذیه شدند. پس از سازگاری اولیه، لاروها با میانگین وزنی ۰/۷۲±۰/۰۱ g و میانگین طولی ۴/۴۰±۰/۸۱ cm در ۱۵ مخزن ۶۰ لیتری، با تراکم ۳۰ قطعه

توزیع شدند. برای این‌که تیمارها و تکرارهای مختلف در شرایط یکسان محیط آزمایشگاهی قرار گیرند، مخازن به‌صورت کاملا تصادفی بر روی پایه چیدمان شدند. عوامل فیزیکی و شیمیایی آب به‌صورت روزانه اندازه‌گیری شد. به‌طور میانگین در کل دوره درجه حرارت آب ۰/۵±۲۸/۲درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۰/۸۷ ± ۷/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر و pH آب ۰/۴±۷/۸ بود. در طی دوره روشنایی به‌صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در نظر گرفته شد. به هر یک ازمخزن ها، جهت هوادهی و نیاز اکسیژن لاروها یک سنگ هوا که به منبع هواده متصل بود نصب گردید. در این بررسی از طرح کاملا تصادفی متعادل شامل تیمار شاهد که تنها با غذای تجاری (شرکت تعاونی تولیدی ۲۱ بیضاء، شیراز)، ۴ تیمار یا سطوح ۱۰،۵، ۱۵ و ۲۰ گرم مکمل بیوهربال در هر کیلوگرم غذا (محتوی نسبت مساوی پودر زنجبیل و رازیانه) بودند و در سه تکرار در طی یک دوره ۶۰ روزه استفاده قرار شد.

تهیه و آماده‌سازی جیره و غذادهی به ماهیان

گیاه زنجبیل مورد استفاده در این تحقیق از اطراف شیراز و گیاه رازیانه از اطراف شهرستان سمیرم جمع‌آوری شد و پس از تایید در مرکز هرباریوم دانشگاه شیراز، سرشاخه‌های آن‌ها در فضای آزاد خشک و توسط آسیاب کاملا به صورت پودر تبدیل شد. جیره‌های غذایی به‌صورت اکسترودر از شرکت تعاونی تولیدی ۲۱ بیضاء با قطر ۱/۸-۱/۶میلی‌متر با ۵۰ درصد پروتئین خام،۱۳/۵ درصد چربی خام،۱/۷درصد فیبر خام و۱۰ درصد رطوبت تهیه شد. برای تهیه جیره‌های غذایی برای دوره ۶۰ روزه، پس از توزین غذای کنسانتره و محاسبه میزان مکمل غذایی برای هر تیمار، ابتدا غذای کنسانتره به‌کمک میکسر پودر و نرم شد. سپس پودر مکمل گیاهی به آن با اضافه و با درصد مشخصی آب مقطر(۵۰۰ سی سی به ازای هر کیلوگرم) به حالت خمیر نرم و شکل‌پذیر درآمد. سپس به‌وسیله چرخ گوشت با قطر چشمه ۰/۵ میلی‌متر به رشته‌هایی تبدیل شد و در نهایت در سایه قرار گرفت تا با جریان هوا خشک شود و جیره تهیه شده تا زمان استفاده در فریزر در دمای ۲۰ $^{\circ}C$- نگهداری گردید (Arulvasu *et al.*, 2013). غذای آماده شده به میزان ۷ درصد وزن توده زنده در دو نوبت صبح و عصر به‌ماهیان به‌مدت ۶۰ روز در اختیار ماهیان قرار گرفت

سنجش آنزیم‌های کبد و گوارش

در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰)، جهت سنجش آنزیم‌های کبد و گوارشی از ماهیان نمونه‌گیری صورت گرفت. ۲۴ ساعت قبل از نمونه‌گیری تغذیه ماهیان قطع شد و سپس ۴۵ قطعه ماهی (۳ قطعه ماهی به ازای هر تکرار) به‌ظاهر سالم به‌صورت تصادفی انتخاب شد و پس از بیهوشی با پودر گل میخک (۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، ماهیان در مجاورت یخ جهت جلوگیری از تغییر فعالیت آنزیمی کالبد شکافی شده و روده و کبد آن‌ها با دقت جدا شد و روده در محور طولی با دقت بریده شد و محتویات داخل آن تخلیه و سپس با آب مقطر به‌خوبی شسته شد (Chitsaz et al.,2018). نمونه‌های کبد و روده بلافاصله در شرایط انجماد در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای سنجش میزان آنزیم‌های کبدی و گوارشی، نمونه‌های کبد و روده از شرایط انجماد خارج و وزن گردیدند. سپس روده هر ماهی با ۱۰۰ میلی‌مولار بافر تریس- اسید کلریدریک، ۰/۱ میلی مولار EDTA و ۰/۱ درصد تریتون X-۱۰۰ به نسبت ۹:۱ در pH ۷/۸ (Chitsaz et al.,2018). و کبد هر ماهی با محلول بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار، KCL ۱۰۰ میلی‌مولار و EDTA یک میلی‌مولار با PH: 7/4 به نسبت وزنی به حجمی ۱۰ برابر (۱/۱۰) توسط یک دستگاه یکنواخت کننده (هموژنایزر) (مدلUP200S،شرکت Hielscher آلمان) به‌خوبی یکنواخت شدند. هر مرحله در مجاورت یخ صورت گرفت. جهت جداسازی عصاره حاوی آنزیم مخلوط‌های یکنواخت شده، سانتریفیوژ روده با سرعت ۲۵۰۰۰ دور در هر دقیقه به‌مدت ۲۰ دقیقه و کبد با سرعت ۱۰۰۰۰ ذور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند (Gawlikca *et al.*,2000). در انتها محلول رویی در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری (با سه تکرار برای هر تیمار) به‌منظور سنجش آنزیمی جمع آوری شد. از

کیت‌های تهیه شده از شرکت پارس آزمون تهران و دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل DR600، ساخت HACH آمریکا) برای سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و کبدی استفاده شد.

میزان فعالیت آنزیم آمیلاز بر اساس روش Natalia و همکاران (۲۰۰۴) در طول موج ۵۴۰ نانومتر، میزان فعالیت آنزیم پروتئاز به روش King (۱۹۷۲) طول موج ۲۸۰ نانومتر و میزان فعالیت آنزیم لیپاز به‌روش Furne و همکاران (۲۰۰۵) در طول موج ۴۸۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفتند. فعالیت آنزیم‌ها بر اساس واحد بر میلی‌گرم پروتئین با سه تکرار برای هر نمونه محاسبه شدند.

سطح فعالیت آنزیم‌های اسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز سرم توسط دستگاه اتوآنالایزر (مدل CA-400، شرکت Furuno ژاپن) در آزمایشگاه تشخیص طبی با شیوه‌های خاص هر آنزیم انجام گرفت (Alamin and Zainab, 2006).

سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی

در پایان دوره آزمایش، برای سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی ۳۰ قطعه ماهی برای هر تکرار ۲ قطعه ماهی به‌صورت تصادفی برداشته و ماهیهای جمع آوری شده به صورت مجزا کاملا با سرم فیزیولوژی ۳ بار شسته شدند. سپس با ۱ حجم سرم فیزیولوژی در میکسر مخلوط گردید و با سرعت ۳۰۰۰ دور در هر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ کرده سپس محلول رویی دو بار دیگر با همین سرعت سانتریفوژ گردید. و محلول رویی از هر نمونه را در میکروتیوب-های ۱/۵ میلی لیتری (با سه تکرار برای هر تیمار) جمع آوری و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Hanif et al., 2004).

برای سنجش شاخص های بیوشیمیایی سرم خون استفاده شد. سنجش کلسترول به روش کلسترول اکسیداز (Burtis and Ashwood,1994) در طول موج ۵۱۰ نانومتر، تری گلیسیرید توسط آنزیم لیپاز، گلیسرول کیناز و پر اکسیداز (Burtis and Ashwood,1994)در طول موج ۵۱۰ نانومتر،گلوکز به‌روش واکنش پراکسیداز- اکسیداز گلوگز(Trinder,1969) و در طول موج ۵۰۰ نانومتر، پروتئین تام به‌روش بیوره (Wooton, 1964) در طول موج ۵۴۰ نانومتر، آلبومین به‌روش بروموکرزول سبز (Wooton, 1964) در طول موج ۶۳۰ نانومتر و از کسر پروتئین تام و آلبومین گلوبولین محاسبه شد (Kumar *et al*., 2005). نسبت آلبومین به گلوبولین از تقسیم آلبومین بر گلوبولین محاسبه شد (Sahoo *et al*.,1999).

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده های حاصل از اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های کبد و گوارشی و فراسنجه‌های بیوشیمیایی ماهی با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون مقایسه چند دامنه ای دانکن، در سطح احتمال ۵ درصد بین تیمارهای مختلف صورت گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS 16 استفاده گردید. نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون کالموگراف اسمیرنوف و با تست لون برابری واریانس‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

فعالیت آنزیم‌های کبدی

تغییرات میانگین (± خطای معیار) فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینو ترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز کبد ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش در جدول ۱ داده شده است. با افزایش غلظت مکمل بیوهربال، میزان فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینو ترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز کاهش یافت و اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد ($P<۰/۰۵$). در حالی‌که تیمار ۴ و ۵ اختلاف معنی‌داری را میزان فعالیت آنزیم-های آلانین آمینو ترانسفراز و آلکالین فسفاتاز با یکدیگر نشان ندادند ($P>۰/۰۵$). کمترین میزان فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز در تیمار ۵ مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد($P<۰/۰۵$).

جدول ۱- تغییرات میانگین میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰)

فعالیت آنزیم	تیمار				
واحد بر میلی‌لیتر	۱	۲	۳	۴	۵
آسپارتات آمینو ترانسفراز (ASP)	^{a}۱۲۷/۱۲±۱۶/۱۸	^{b}۱۱۴/۶۶±۱۸/۵۲	^{b}۱۱۳/۳۳±۱۷/۵۲	^{c}۱۰۲/۳۳±۱۶/۶۵	^{d}۹۲/۶۶±۱۳/۰۵
آلانین آمینوترانسفراز (ALT)	^{a}۲۱±۱	^{b}۱۸±۱	^{b}۱۰/۳۳±۱/۱۵	^{c}۱۵±۱	^{c}۱۵/۳۳±۱/۱۵
آلکالین فسفاتاز (ALP)	^{a}۹۰/۳۳±۱/۵۲	^{a}۸۷/۱۳±۱/۲۳	^{b}۸۰±۲	^{c}۶۸±۱	^{c}۶۶/۳۳±۲/۵۱

حروف نامشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای آزمایشی است (P<۰/۰۵). میانگین داده‌ها بر اساس واریانس یکطرفه مورد مقایسه قرار گرفتند. تیمار ۱ تا ۵ به‌ترتیب حاوی ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرم مکمل بیوهربال بر کیلوگرم غذا است.

فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی

نتایج مربوط به میزان فعالیت آنزیم‌های لیپاز، آمیلاز و پروتئاز روده ماهی کفال خاکستری تغذیه شده با رژیم‌های غذایی مختلف در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰) در جدول ۲ آورده شده است. اضافه نمودن مکمل بیوهربال به جیره غذایی با غلظت‌های مختلف منجر به افزایش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم پروتئاز و آمیلاز در مقایسه با تیمار شاهد شد (P<۰/۰۵). بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و پروتئاز و لیپاز در روده ماهی کفال خاکستری تغذیه شده با ۲۰ گرم مکمل بیوهربال در هر کیلوگرم غذا مشاهده شد. (P<۰/۰۵).

جدول ۲- تغییرات میانگین فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰)

فعالیت آنزیم	تیمار				
واحد بر میلی‌گرم پروتئین	۱	۲	۳	۴	۵
آمیلاز	^{d}۱۲۳/۶۷±۱۲/۳۳	^{d}۳۳۴/۶۷±۱۰/۸۸	^{c}۳۴۹±۱۲/۰۸	^{b}۳۸۴/۵۷±۱۰/۸۸	^{a}۴۰۴/۶۷±۱۱/۲۳
لیپاز	^{e}۳/۲±۰/۲	^{d}۳/۸±۰/۱۲	^{c}۴/۶۳±۰/۱	^{b}۵/۲۳±۰/۱	^{a}۵/۷۶±۰/۱۸
پروتئاز	^{e}۲۷۴±۱۰/۵۷	^{d}۲۸۷/۶۷±۱۱/۸۸	^{c}۲۹۰/۲۳±۱۰/۶۲	^{b}۳۱۸±۱۱/۱۵	^{a}۳۴۱±۱۲/۰۸

حروف نامشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای آزمایشی است (P<۰/۰۵). میانگین داده‌ها بر اساس واریانس یکطرفه مورد مقایسه قرار گرفتند. تیمار ۱ تا ۵ به‌ترتیب حاوی ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرم مکمل بیوهربال بر کیلوگرم غذا است.

شاخص های بیوشیمیایی

میزان شاخص‌های بیوشیمیایی ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش در جدول ۳ آورده شده است. در تیمار حاوی ۲۰ گرم مکمل بیوهربال بر کیلوگرم غذا بیشترین میزان گلوبولین و کمترین میزان تری‌گلیسیرید، کلسترول و گلوکز سرم ماهی کفال خاکستری در مقایسه با سایر تیمارها مشاهده شد (P<۰/۰۵). میزان آلبومین در تیمار ۵ اختلاف معنی-داری را در مقایسه با شاهد نشان داد (P<۰/۰۵).

جدول۳. تغییرات میانگین (میانگین± خطای معیار) شاخص های بیوشیمیایی ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف درپایان دوره آزمایش

	تیمار				
	۱	۲	۳	۴	۵
پروتئین تام (گرم بر دسی لیتر)	^{b}۳/۴۱±۰/۰۸	^{ab}۳/۵۰±۰/۲۶	^{ab}۳/۴۷±۰/۳۶	^{a}۳/۵۶±۰/۱۰	^{ab}۳/۵۴±۰/۵۵
گلوکز (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	^{a}۹۶/۱۵±۳/۳۶	^{b}۸۵/۵۷±۲/۲۳	^{b}۸۴/۱۴±۱۰/۷۹	^{b}۸۴/۰۱	^{c}۸۰/۳۳±۱۰/۵۷
کلسترول(میلی‌گرم بر دسی لیتر)	^{a}۱۴۹/۶۶±۱۵/۲۷	^{b}۳۸±۱۴/۳۵	^{b}۱۳۶/۴۵±۱۵/۲۷	^{c}۱۲۷/۶۶±۱۳/۴۴	^{d}۱۲۰/۶۳±۱۳/۷۸
تری گلیسیرید (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	^{a}۲۴۶/۰۳±۱۰/۵۰	^{b}۲۳۰±۶	^{b}۲۳۴/۳۳±۶/۰۲	^{c}۲۰۹/۲۳±۹/۰۱	^{d}۱۲۰/۰۶±۹/۰۱
آلبومین (گرم بر دسی لیتر)	^{bc}۱/۸۱±۰/۴۷	^{c}۱/۷۹±۰/۱۵	^{bc}۱/۸۱±۰/۴۱	^{ab}۱/۸۷±۰/۲۳	^{a}۱/۹۰±۰/۵۱
گلوبولین (گرم بر دسی لیتر)	^{d}۱/۱۹±۰/۲۰	^{d}۱/۲۳±۰/۲۱	^{c}۱/۳۰±۰/۳۰	^{b}۱/۴۷±۰/۲۵	^{a}۱/۵۲±۰/۱۵

حروف نامشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای آزمایشی است (P<۰/۰۵). میانگین داده‌ها بر اساس واریانس یکطرفه مورد مقایسه قرار گرفتند. تیمار ۱ تا ۵ به‌ترتیب حاوی ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرم مکمل بیوهربال بر کیلوگرم غذا است.

بحث

افزایش و کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی و شاخص‌های عملکر کلیه نشان‌دهنده آسیب‌های بافت کبد و کلیه هستند (Abdelhalim and Moussa, 2013) فعالیت این آنزیم‌ها تحت تاثیر عوامل مختلف شامل عوامل شیمیایی، بیولوژیکی، فیزیولوژیکی و اختلال در چرخه کربس تغییر می‌کند (Jirle et al.,1990). آسیب‌های بافت کبد منجر به رهاسازی آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و آلانین آمینوترانسفراز از سیتوزول کبد به پلاسما خون می‌شود (اکرمی و همکاران،

۱۳۹۴). تغییرات فعالیت آنزیم‌های شاخص عملکرد کبد در بین تیمارهای مختلف در این تحقیق، نشان داد که در پایان دوره آزمایش، اضافه نمودن مقادیر مختلف مکمل گیاهی بیوهربال (پودر زنجبیل و رازیانه) منجر به کاهش معنی‌داری در میزان فعالیت آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز در مقایسه با تیمار شاهد شد ($p<۰/۰۵$) و کمترین میزان فعالیت آنزیم‌های مذکور در تیمارهای حاوی ۱۵ و ۲۰ گرم مکمل بیوهربال در هر کیلوگرم غذا مشاهده شد. همچنین کمترین میزان فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوتررانسفراز در تیمار حاوی ۲۰ گرم مکمل بیوهربال در هر کیلوگرم غذا مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان دادند. می‌توان گفت ترکیبات زیست فعال موجود در زنجبیل و رازیانه شامل فنول‌ها، فلاونوئیدها، تانن ها و ساپونین می‌توانند از عفونت بافت کبد به واسطه ایمنی آن جلوگیری نموده و این امر از پراکسیداسیون سلول‌های بافت چربی جلوگیری نموده و مانع آزادسازی آنزیم‌های مذکور به پلاسما می‌گردند (Gholipur Kanani et al., 2014; Shamkant et al.,2014). اکرمی و همکاران (۱۳۹۷) نشان دادند که اگرچه کمترین میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی در ماهی‌های قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با ۵ درصد عصاره زنجبیل مشاهده شد اما تفاوت معنی‌داری بین تمام تیمارهای حاوی عصاره زنجبیل با تیمار شاهد مشاهده نشد. همچنین Gholipur و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که افزودن ۱ گرم پودر زنجبیل به‌ازای ۱۰۰ گرم غذا به جیره فیل ماهی (*Huso huso*) در مقادیر آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینو ترانسفراز در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری ایجاد ننمود که با نتایج حاصل از این تحقیق هم‌خوانی نداشتند. که دلیل این تفاوت ممکن است مربوط به گونه ماهی، شرایط محیطی، غلظت مورد استفاده مکمل گیاهی و طرز استفاده از این مکمل (عصاره یا پودر) باشد. Vahedi و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که استفاده از ۰/۵ و ۱/۵ درصد عصاره زنجبیل در جیره غذایی فیل ماهی موجب کاهش معنی دار میزان فعالیت آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز سرم خون ماهی در مقایسه با تیمار شاهد شد. همچنین Kumar و همکاران(۲۰۱۴) گزارش کردند که استفاده از ۰/۵ گرم بر کیلوگرم غذای گربه ماهی آسیایی(clarias bacrachus) منجر به کاهش معنی‌دار آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز در مقایسه با تیمار شاهد شد که با تحقیق حاضر همخوانی داشتند. از آن‌جایی که تحقیق در ارتباط با اثر رازیانه بر آنزیم‌های کبدی ماهیان صورت نگرفته است اما تحقیق بر روی موش آزمایشگاهی که در معرض سمیت کبد با تتراکلرید کربن قرار گرفته بود، نشان داد که استفاده از اسانس رازیانه منجر به کاهش معنی‌دار آنزیم‌های AST،ALT و ALP در سرم موش در مقایسه با تیمار شاهد شد. به‌نظر می رسد آنتوسیانین‌ها به‌عنوان یکی از ترکیبات موجود در فلاونوئیدهای موجود در گیاهان دارویی دارای اثر حفاظتی بر سلول‌های کبدی می‌باشد (Salmanian et al.,2014).

هضم، به‌عنوان ابزار کلیدی جهت مطالعه شرایط تغذیه، دسترسی موجود به مواد غذایی و سازگاری موجود با تغییر رژیم غذایی شناخته شده است (Gisbert et al.,2009). گیاهان دارویی حاوی ترکیبات زیست فعالی هستند که منجر به افزایش اشتهاء و افزایش کارایی گوارش می‌شوند و در نهایت به‌عنوان محرک هضم، با ترشح صفرا و تسهیل فعالیت آنزیم‌های موجود در پانکراس منجر به بهبود نرخ رشد می‌گردند (Barreto et al.,2008). می‌توان گفت ترکیبات فعال زنجبیل شامل جینجرول، شاگول، پرادول و زینجرون ممکن است موجب تحریک فعالیت دستگاه گوارش و در نهایت تسهیل عمل هضم و جذب مواد غذایی گردد (Grzanna *et al.*, 2005) همچنین آنتول موجود در رازیانه، ممکن است موجب کاهش یا توقف اسپاسم‌های دستگاه گوارش، تشدید ترشح شیره گوارشی و در نتیجه بالا رفتن کیفیت هضم گردد (Karampoor *et al.*, 2014). Venkataramalingam و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که تجویز خوراکی آرتمیای غنی شده با ۲۵ درصد زنجبیل به پست لارو میگوی ببری سیاه (*Peneaus monodon*) منجر به افزایش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم آمیلاز و پروتئاز در مقایسه با تیمار شاهد شد که با تحقیق حاضر همخوانی داشت. همچنین جهان جو و همکاران (۱۳۹۴) گزارش کردند که بیشترین فعالیت آنزیم آمیلاز در تیماری حاوی یک درصد پودر زنجبیل در جیره غذایی ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*) مشاهده شد و بیشترین فعالیت آنزیم لیپاز در تیمار ۱ درصد زنجبیل و ۱ درصد زنجبیل و سیر (*Allium sativum*) مشاهده شد که با نتایج این تحقیق نیز همخوانی

داشت می‌توان گفت که زنجبیل نقش مهمی در تحریک سیستم عصبی داشته که منجر به تحریک فعالیت کوله سیستوکینین شده و در نهایت این امر موجب تحریک روده و پانکراس و افزایش ترشح آمیلاز در روده می‌گردد (Rahimi Yadkoori et al.,2015).

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که کمترین میزان کلسترول، تری‌گلیسیرید و گلوکز در تیمار حاوی ۲۰ گرم مکمل بیوهربال در هرکیلوگرم غذا مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با شاهد نشان دادند. می‌توان گفت که ترکیبات فلاونوئید و ساپونین موجود در رازیانه و زنجبیل علاوه بر خواص آنتی اکسیدانی بسیار قوی، موجب تثبیت غشای سلولی و افزایش گلوتاتیون سلولی می‌شود که احتمالا در کاهش جذب روده‌ای کلسترول و کاهش قند خون و بهبود متابولیسم کبدی موثر است (Yadkoori et al.,2015; Shamkant et al.,2014) Akhani وهمکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که عصاره زنجبیل منجر به کاهش میزان گلوکز خون و افزایش سطح انسولین می‌گردد این موضوع نشان می‌دهد که ترکیبات جینجرول و شاگول موجود در زنجبیل منجر به تسهیل تولید انسولین توسط سلول‌های پانکراس می‌گردد و ترشح انسولین منجر به افزایش مصرف گلوکز از بافت عضله و چربی می‌گردد. همچنین وجود عناصری نظیر کلسیم، پتاسیم و کرومیوم موجود در ترکیب زنجبیل و رازیانه احتمالا نقش مهمی در رهاسازی انسولین توسط سلول‌های B پانکراس داشته که منجر به مهار فعالیت آنزیم گلوکز ۶ فسفاتاز شده و در نهایت تبدیل گلوکز فسفات به گلوکز را کاهش می‌دهد (Rahimi Yadkoori et al.,2015; Zhang and Tan, 2003). در بسیاری مواقع، تغییرات غلظت گلوکز با آسیب‌های وارده به کلیه و اختلالات کبدی مرتبط است (Banaee et al.,2011). افزایش سطح گلوکز نیز ناشی اختلال در روند متابولیسم کربوهیدرات نیز می‌باشد به‌گونه‌ای که با افزایش تجزیه گلیکوژن کبد میزان گلوکز خون افزایش می‌یابد (Banaee et al., 2011). این موضوع نشان می‌دهد که استفاده از سطوح مختلف مکمل بیوهربال سبب هیپرگلیسمی و اختلال در روند متابولیسم کربوهیدرات نشد. Talpur و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که استفاده از پودر زنجبیل در جیره غذایی ماهی سی باس آسیایی (*Lates calcarifer*) منجر به کاهش معنی‌دار میزان کلسترول و تری‌گلیسیرید خون در مقایسه با تیمار شاهد شد همچنین Vahidi وهمکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که استفاده از ۱ درصدعصاره زنجبیل منجر به کاهش معنی‌دار میزان کلسترول در فیل ماهی شد که با نتایج حاضر همخوانی داشت. می‌توان گفت ساپونین موجود در ترکیبات زیست فعال زنجبیل منجر به کاهش کلسترول، بهبود هایپر لیپیدی، کاهش قندخون نقش دارد (Talpur et al.,2013). اکرمی و همکاران (۱۳۹۷) نشان دادند که کمترین مقدار کلسترول، تری‌گلیسیرید و گلوکز در تیمار حاوی ۵ درصد عصاره زنجبیل در جیره غذایی ماهی قزل الای رنگین کمان به‌دست آمد اما تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای عصاره زنجبیل با مشاهده نشد که با نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی نداشت که علت تفاوت در نتیجه تحقیقات را می‌توان به‌دلیل تفاوت گونه‌ای، شرایط محیطی پرورش، نوع مکمل گیاهی، آماده‌سازی و تاثیر گونه ماهی در پاسخ به مکمل گیاهی ربط داد (اکرمی و همکاران، ۱۳۹۷).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بیشترین میزان آلبومین و گلوبولین در تیمارحاوی ۲۰ گرم مکمل بیوهربال بر کیلوگرم غذا مشاهده شد و با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد و میزان پروتئین در تیمار حاوی ۱۵ گرم مکمل بیوهربال در هر کیلوگرم تفاوت معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان داد. می‌توان گفت افزایش سطح پروتئین تام نشان‌دهنده افزایش قدرت پاسخ دفاعی میزبان است. همچنین پروتئین تام پلاسما شامل پروتئین آلبومین و گلوبولین است و افزایش آن‌ها در ارتباط با تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی میزبان است (Dugenci et al.,2003). چنین وضعیتی متعاقب مصرف ۱ درصد عصاره زنجبیل در جیره غذایی ماهی قزل آلای رنگین کمان مشاهده شد (Dugenci et al., 2003) که با نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی داشت. این موضوع نشان می‌دهد که افزایش میزان آلبومین احتمالا می‌تواند باعث دسترسی سریع‌تر ترکیبات زیست فعال مکمل بیوهربال به بافت‌های مختلف ماهی گردد. همچنین افزایش گلوبولین نیز احتمالا منجر به افزایش سطح گلوبولین-های حامل (آلفا و بتا) و یا گاماگلوبولین‌های فعال در سطح ایمنی ماهی می‌گردد (Banaee et al.,2011). Gholipur Kanani و

همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که استفاده از ۱ گرم پودر زنجبیل در ۱۰۰ گرم غذا در جیره غذایی فیل ماهی منجر به افزایش معنی‌دار گلوبولین شد و تفاوت معنی‌داری از نظر میزان آلبومین و پروتئین تام سرم بین تیمارهای حاوی زنجبیل و تیمار شاهد مشاهده نشد که با تحقیق حاضر از نظر میزان آلبومین و پروتئین تام همخوانی نداشت. همچنین حسن پور و همکاران (۱۳۹۴) نشان دادند که استفاده از سطوح مختلف عصاره زنجبیل (۰، ۰/۵، ۱و ۱/۵ درصد) در جیره غذایی فیل ماهی اختلاف معنی‌داری را از نظر میزان آلبومین، گلوبولین و پروتئین تام بین تیمارهای مختلف با گروه شاهد ایجاد نکرد که با تحقیق حاضر همخوانی نداشت که دلیل این تفاوت می-تواند مربوط به گونه ماهی، میزان غلظت مکمل غذایی، دوره پرورش، شرایط محیطی باشد. می‌توان گفت اثرات آنتی‌اکسیدانی مربوط به فلاونوئید اصلی آن در کوئرستین (Shamkant et al.,2014) در رازیانه و جینجرول در زنجبیل (Gabor et al., 2012) در تحقیق حاضر منجر به غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن و در نهایت افزایش سطح ایمنی ماهی می‌گردد

در کل، نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که استفاده از پودر مکمل بیوهربال (زنجبیل و رازیانه) در سطح بهینه ۲۰ گرم بر کیلوگرم غذا بر فعالیت آنزیم‌های کبد و گوارشی و شاخص بیوشیمیایی ماهی کفال خاکستری تاثیرگذار می‌باشد. بنابراین استفاده از پودر مکمل بیوهربال به‌عنوان محرک سیستم ایمنی و بهبود فعالیت آنزیم‌های شاخص کبد و گوارشی در ماهی کفال خاکستری توصیه می‌گردد.

تقدیر وتشکر

بدین وسیله از همکاری ریاست و پرسنل محترم مرکز تحقیقات شیلات چابهار و کارشناس محترم آزمایشگاه پاتوبیولوژی صدف چابهار تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

حسن پور، م. ۱۳۹۴. تاثیر تجویز خوراکی عصاره زنجبیل بر شاخص‌های بیوشیمی سرم و پارامترهای ایمنی فیل ماهی (*Huso huso*) پرورشی، پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، موسسه آموزش عالی غیر انتفاعی خزر محمود آباد، ۵۵ صفحه.

جهان‌جو، و.، یحیوی، م.، اکرمی،ر. و هوشنگ بحری، ا. ۱۳۹۶. اثرات مجزا و توام پودر سیر و زنجبیل بر شاخص کبدی، ترکیب شیمیایی لاشه، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و میزان بچه ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*). فصلنامه علمی- پژوهشی علوم و فنون شیلات، دوره ۶، شماره ۲، صفحه ۲۹-۱۷.

اکرمی، ر.، احمدی، ز.، چیت ساز، ح.، شاملوفر، م.، حبیبی توده، ف.، صادقی اصل، ف. و زرینی، ن. ۱۳۹۷. تاثیر عصاره زنجبیل (*Zingiber officinale*) بر برخی شاخص‌های رشد، خون، بیوشیمی و ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۷۳، شماره ۲، صفحه ۱۶۳-۱۵۵.

Abdelhalim, M.M. and Moussa, S.A. 2013. The biochemical changed in rat's blood serum levels exposed to different gamma radiation doses. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 7(15):785-792.

Akhani, S.P., Vishwakarma, S.L. and Goyal, R.K. 2004. Anti-diabetic activity of *Zingiber officinalein* Streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. Journal of Pharmacy Pharmacology, 56 (1): 101-105.

Alamin, Zainab,M. 2006. Anti diabetic and hypolipidaemic properties of ginger *Zingiber officinalein* Streptozotocin induced diabetic Rats. British Journal of Nutrition,96: 660-666.

Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A.R . and Rafei, G.R. 2011. Effects of long-term silymarin oral supplementation on the blood biochemical profile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiology and Biochemistry, 37: 887-896

Barreto, M.S.R., Menten, J.F.M., Racanicci, A.M.C., Pereira, P.W.Z. and Rizzo, P.V. 2008. Plant extracts used as growth promoters in broilers. Brazilian Journal of Poultry Science, 10 (2): 109-115.

Burtis, C. A. and Ashwood, E. R. 1994. Tietz Textbook of Clinical Chemistry (5thed.). Philadelphia. USA;W.B.Sunders Company: P. 560-568.

Chitsaz, H., Oraji, H., Keramat Amirkolaie, A. and Akrami , R. 2018. Effect of garlic peel on haematological, biochemical and digestive enzyme activity in beluga juvenile (*Huso huso*). Iranian Journal of Aquatic Animal Health, 4(1): 13-28.

Conte, F.S. 2004. Stress and the welfare of cultured fish. Applied Animal Behavior Science, 86: 205–223.

Furne, M., Hidalgo, M.C., López, A., García-Gallego, M., Morales, A.E., Domenzain, A., Domezain, J. and Sanz, A. 2005. Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study, Aquaculture, 250(1-2): 391-398.

Gabor, E.F., Ichim, O. and Suteu, M. 2012. Phyto-additives in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Nutrition. Biharean Biologist, 6:134-139.

Dugenci, S.K., Arda, N. and Candan, A. 2003. Some medicinal plants asimmunostimulants for fish. Journal of Ethnopharamacology, 88: 99–106.

Gawlicka, A., Parrent, B., Horn,M.H., Ross,N., Opstad,I. and Torrissen, O.J. 2000. Activity of digestive enzyme in yolk- sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) indication of readiness for first feeding. Aquaculture, 184 (1-2): 304-314.

Gisbert, E., Giménez, G., Fernández, I., Kotzamanis, Y. and Estévez, A. 2009. Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. Aquaculture, 287 (3-4): 381-387.

Grzanna, R., Lindmark. L and Frondoza, C., 2005. Ginger-an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. Journal of Medicinal Food, 8(2): 125-13.

Hanif, V. and Bakopoulos, G.J. 2004. DimitriadisMaternal transfer of humoral specific and non-specificimmune parameters to sea bream (*Sparus aurata*) larvae. Fish and Shellfish Immunology, 17:411-435.

Jirle, R.L., Anschor, M.S. and Alati, T. 1990. Radiation sensitively of liver, In: Altman, H. and Lett, J.F., (eds). Advance in radiation biology. Vol. 14, Relative radiation sensitives of human organ systems, part II, Academic press, San Diego, 369-411.

Karampoor, P., Azarnia, M., Mirabolghasemi, G and, Alizadeh, F. 2014. The Effect of hydroalcoholic extract of Fennel (Foeniculum vulgare) seed on serum levels of sexual hormones in female Wistar rats with Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS). Arak Medical University Journal; 17(86): 70-78.

King, J. 1972. Practical clinical enzymology. 2nd ed, London:the University of Michigan press;. P. 250-286

Kwon, Y.S., Choi, W.G., Kim, W.J., Kim, W.K., Kim, M.J., Kang, W.H. and Kim, C.M. 2002. Antimicrobial constituents of *Foeniculum vulgare*. Archives of Pharmacal Research, 25: 154– 157.

Kumar, S., Sahu, N. P., Pal, A. K., Choudhury, D,. Yengkokpam, S. and Mukherjee, S. C. 2005. Effect of dietary carbohydrate on haematology, respiratory burst activity and histological changes in *Labeo rohita* juveniles. Fish and Shellfish Immunology, 19(4): 331 -344.

Kumar Bairwa, M., Kumar Jakhar, J., Satyanarayana,Y. and Devivaraprasad Reddy, A. 2012. Animal and plant originated immunostimulantsused in aquaculture. Journal of Natural Products Plant Resources, 2(3): 397-400

Kumar, I. V., Chelladurai, G., Veni, T., Peern, S. H. and Mohanray, J .2014. Medicinal plants as immunostimulants for heath management in Indian catfish. Journal of costal life medicine,2(6): 426-430.

Marino, S.D., Gala, F., Borbone, N., Zollo, F., Vitalini, S., Visioli, F. and Iorizzi, M. 2007. Phenolic glycosides from *Foeniculum vulgare* fruit and evaluation of antioxidative activity. Phytochemistry, 68: 1805-1812.

Natalia, Y., Hashim, R., Ali, A. and Chong, A. 2004. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). Aquaculture, 233(1-4): 305–320.

Newaj-Fyzul, A. and Austin, B. 2015. Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases. Journal of fish diseases, 38(11): 937-55.

Sahoo, P.K., Mohanty, J. and Mukherjee, S.C. 1999. The three imuunomodulators on haemotological parameters and immunity level in rohu (*Labeo rohita*) fingerlings. Journal of Aquaculture Tropics, 14: 127–135.

Salmanian, H., Sadeghi Mahoonak, A.R., Alami, M. and Ghorbani, M. 2014. Evaluation of total phenolic flavonoid anthocyanin compounds antibacterial and antioxidant activity of hawthorn *Crataegus elbursensis* fruit acetonic extract. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences,13: 53-66.

Shamkant, B. B., Vainav V. p. and Atmaram, H. B. 2014. *Foeniculum vulgare* Mill: A Review of Its Botany, Phytochemistry, Pharmacology, Contemporary Application, and Toxicology, BioMedicine Research International,2014: 1-32.

Talpur, A.D., Ikhwanuddin, M. and Ambok Blong, A. 2013. Nutritional effects og ginger (*zingiber officinale* roscoe) on immune response of asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) and disease resistance against *vibrio harveyi*. Aquaclture, 400-401:46-52.

Trinder, P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor Annual Clinical Biochemistry, 6, 24-27.

Vahedi, A.H., Hasanpour, M., Akrami, R. and Chitsaz, H. 2017. Effect of dietary supplementation with ginger (*Zingiber officinale*) extract on growth, biochemical and hemato-immunological parameters in juvenile beluga (*Huso huso*). Iranian Journal of Aquatic Animal Health, 3(1): 26-46.

Venkataramalingam, K., Godwin, C.J. and Citarasu T. 2007. *Zingiber officinalis*, an herbal appetizer in the tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius) larviculture. Aquaculture Nutrition 13 (6): 439-443.

Wootton, L. I. 1962. Micro-analysis in medical biochemistry in micrometer, 4th.ed. London: Churchill press; P. 264-267.

Rahimi Yadkoori, N., Zanguee, N. Mousavi, S.M. Zakeri, M. 2015. Effects of Ginger (*Zingiber officinale*) Extract on Digestive Enzymes and Liver Activity of *Mesopotamichthys sharpeyi* Fingerlings.Journal of the Persian Gulf, (Marine Science), 6 (19):1-10.

Zhang, X.F. and Tan, B.K.H. 2003. Effects of an ethanolic extract of *Gynura procumbenson* serum glucose, cholesterol and triglyceride levels in normal and streptozotocin- induced diabetic rats .Singapore Medical Journal ,41 (1): 9-13

Zhang, G.F., Yang, Z.B., Wang, Y., Yang, W.R., Jiang, S.Z. and Gai, G.S. 2009. Effects of gingerroot (Zingiber officinale) processed to different particle sizes on growth performance, antioxidant status, and serum metabolites of broiler chickens.Poultry Science, 88:2159-2166.

Zaho, X., Yang, Z.B., Yang, W.R., Wang, Y., Jiang, S.Z. and Zhang, G.G. 2011. Effects of ginger root (*Zingiber officinale*) on laying performance and antioxidant status of laying hens and on dietary oxidation stability.Poultry Science, 90: 1720-1727.