اثرات خوراکی عصاره خشک خرفه (*Portulaca oleracea*) بر برخی از شاخص‌های رشد، کیفیت لاشه و فلور میکروبی روده بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

- **مهدی محمدعلیخانی**: گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- **مهدی شمسائی‌مهرجان***: گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- **مسعود حقیقی**: مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تنکابن، ایران
- **مهدی سلطانی**: گروه بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
- **ابوالقاسم کمالی**: گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۷

چکیده

در پژوهش حاضر اثر عصاره خشک گیاه خرفه (*Portulaca oleracea*) بر برخی از شاخص‌های رشد، آنالیز کیفیت لاشه و فلور میکروبی روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور از ۶۰۰ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۰/۱±۳/۳۰ گرم در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در ۵ سطح شامل ۰٪ (شاهد، T0)، ۰/۵٪ (T1)، ۱٪ (T2)، ۱/۵٪ (T3)، و ۲٪ (T4)، عصاره خشک خرفه در هر کیلوگرم غذا) به‌همراه سه تکرار در ۱۵ مخزن پلاستیکی ۳۰۰ لیتری (در هر مخزن ۴۰ عدد ماهی) مورد آزمایش قرار گرفتند. نمونه‌برداری از ماهیان در تیمارها پس از ۶۰ روز دوره آزمایش به‌صورت تصادفی ساده انجام شد. پس از نمونه‌برداری، برخی از شاخص‌های رشد (وزن و طول، ضریب تبدیل غذایی، درصد افزایش وزن بدن، ضریب رشد ویژه، شاخص وضعیت (ضریب چاقی)، درصد بازماندگی، رسوب پروتئین در بدن، نسبت بازده پروتئین، فلور میکروبی روده و آنالیز ترکیبات لاشه مورد سنجش قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره خشک خرفه در سطح ۱٪ موجب افزایش درصد وزن بدن و کاهش ضریب تبدیل غذایی نسبت به سایر تیمارها گردید (p<۰/۰۵). درصد بازماندگی بچه‌ماهی‌ها در تیمار ۰/۵٪ در مقایسه با دیگر تیمارها افزایش نشان داد (p<۰/۰۵). هم‌چنین، شاخص وضعیت یا ضریب چاقی در تیمار ۲٪ عصاره خشک خرفه کاهش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها نشان داد (p<۰/۰۵). از این‌رو، عصاره خشک خرفه در سطح ۱٪ جهت بهبود عملکرد رشد بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مناسب است. میزان پروتئین لاشه در تمامی تیمارهای آزمایشی به‌جز تیمار ۲٪ عصاره خشک خرفه نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت (p<۰/۰۵). میزان چربی لاشه در تمامی تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد به‌ویژه در تیمار ۱/۵٪ عصاره خشک خرفه کاهش نشان داد (p<۰/۰۵). میزان رطوبت لاشه به‌ترتیب در تیمارهای ۰/۵٪، ۰ و ۱٪ عصاره خشک خرفه در مقایسه با دیگر تیمارها بیش‌تر بود (p<۰/۰۵). هم‌چنین مقدار خاکستر لاشه در تیمارهای ۱/۵٪ و ۲٪ عصاره خشک خرفه بیش از سایر تیمارها بود (p<۰/۰۵). از دیگر نتایج مثبت عصاره خشک خرفه افزایش باکتری‌های مفید روده در تیمار ۱٪ بود (p<۰/۰۵). در مجموع نتایج این بررسی نشان می‌دهد که می‌توان از سطح ۱٪ عصاره خشک خرفه در ترکیب با غذا جهت بهبود عملکرد رشد و بهبود کارایی تغذیه‌ای در آبزیان استفاده نمود.

کلمات کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، گیاه خرفه، شاخص‌های رشد، فلور میکروبی روده، آنالیز لاشه

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: DrShamsaie@gmail.com

مقدمه

نظر به توسعه روزافزون ماهیان پرورشی در کشور، توجه به ارتقاء سلامت و پیشگیری از بروز انواع بیماری‌ها درماهیان مذکور امری اجتناب‌ناپذیر می‌باشد.باتوجه به این‌امر، استفاده‌ازمحرک‌های طبیعی رشد نظیر گیاهان دارویی و پروبیوتیک‌ها در تغذیه ماهیان پرورشی به‌عنوان یک جایگزین مناسب داروهای شیمیایی کاربرد یافته است (رجحان، ۱۳۸۷). علاوه بر آن استفاده از گیاهان دارویی با توجه به مزیت‌های متعدد ازجمله آثار جانبی کم‌تر بر موجودات زنده و محیط زیست، عدم ایجاد مقاومت دارویی، ارزان بودن، پایدار و در دسترس بودن، توجهات زیادی را در سطح جهان به‌ویژه کشورهای پیشرفته به خود جلب‌نموده است(رجحان، ۱۳۸۷). استفاده از ترکیبات فیتوژنیک به‌دلیل نقش بالقوه آن‌ها به‌عنوان جایگزین مناسب آنتی‌بیوتیک‌های محرک‌رشد در تغذیه حیوانات، اخیراً رو به افزایش بوده است و باتوجه به غنای تنوع گیاهان دارویی در کشور، تعیین‌کارایی یکی از مهم‌ترین گیاهان، با نام خرفه که در بسیاری از کشورهای دنیا به‌منظور اهداف گوناگونی ازجمله تغذیه انسان،صنایع تبدیلی و دارویی استفاده‌می‌شود و نیز به‌عنوان‌منبع غنی از اسیدهای چرب امگا-۳ کاربرد دارد، ضروری به‌نظر می‌رسد (Antonella Dalle و همکاران، ۲۰۱۵). خرفه یا پرپین با نام علمی *Portulaca oleracea* و نام انگلیسی Purslane از تیره پرتولاکاسه می‌باشد. این گیاه در مناطق جنوبی کشور به‌عنوان یک سبزی مهم مورد کشت و مصرف قرار می‌گیرد (رستگاری، ۱۳۷۸). خرفه یک گیاه یک‌ساله و گرمادوست و از خانواده Portulacacea است. بوته‌های خرفه، علفی، خوابیده و گوشتی بوده و هر بوته رشد یافته آن فضایی به‌قطر حدوداً ۶۰سانتی‌متر رااشغال می‌نماید(رستگاری، ۱۳۷۸). خرفه به‌علت دارا بودن ارزش تغذیه‌ای بالا و نیز خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی درآینده از اهمیت بیش‌تری در تغذیه دام، طیور و آبزیان برخوردار خواهدشد(Dkhil و همکاران، ۲۰۰۵).خرفه حاوی آب، مواد لعابی، پکتین، پروتئین، کربوهیدرات، کوآنزیم، مواد آنتی‌اکسیدانی و عناصر معدنی متعدد شامل آهن، مس، منگنز، پتاسیم، کلسیم و فسفر می‌باشد(زرگری، ۱۳۶۹).یک‌همبستگی‌مثبت بین رژیم‌غذایی مناسب و توانایی پیشگیری و جلوگیری از ظهور بیماری وجود دارد. بنابراین تعدادی ازگیاهان ازجمله خرفه به افزایش تولید برخی از آنزیم‌های گوارشی شناخته شده‌اند که می‌توانند سبب بهبود نرخ رشد گردند (Schuman، ۲۰۰۱). در تحقیقی Camara (۲۰۱۷) نشان داد که رژیم غذایی‌حاوی‌خرفه و مکمل غذایی غنی‌شده با پروبیوتیک Shewanella پس از ۳۰ روز سبب افزایش ظرفیت فاگوسیتوزی در لکوسیت‌های بخش قدامی کلیه، سطوح ایمونوگلوبولین موکوس پوست و فعالیت آنزیم‌های پروتئاز سرم و پروتئاز و آنتی‌پروتئاز روده ماهی سیم دریایی می‌شود و در مجموع نشان می‌دهد که رژیم غذایی حاوی خرفه دارای توانایی‌تعدیل و بهبود چندین پارامتر ایمنی ازجمله ایمنی سیستمیک و موکوسی ماهی سیم دریایی را دارد. مطالعات درخصوص بررسی اثرات گیاه خرفه در آبزیان بسیار اندک است و تاکنون بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان آزمایشی‌انجام‌نشده است.هدف‌از پژوهش حاضر، بررسی اثر عصاره گیاه خرفه بر برخی شاخص‌های رشد، فلور میکروبی روده و آنالیز لاشه در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود.

مواد و روش‌ها

گیاه خرفه: پس‌از شناسایی گیاه‌خرفه توسط کارشناس پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، گیاه خرفه برداشت و جهت استخراج عصاره‌آبی-الکلی‌به آزمایشگاه‌دانشگاه‌آزاداسلامی واحد علوم تحقیقات تهران منتقل گردید. برای تهیه پودر ابتدا اندام‌های هوایی گیاه خرفه (ساقه و برگ آن) که در زمان گلدهی بیش‌ترین ترکیبات فنلی را دار می‌باشند،قطع گردیده و در خشک‌کن الکتریکی با دمای زیر ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. سپس توسط دستگاه آسیاب خرد گردید و برای عصاره‌گیری آماده شد. هم‌چنین به‌منظور تعیین ماده خشک خرفه از دستگاه آون استفاده گردید. در این مرحله بعد از جمع‌آوری گیاه خرفه آنرا به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۵۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا خشک شود و سپس با استفاده از روش AOAC (۲۰۰۰) ترکیبات موجود در خرفه اندازه‌گیری شد.

روش تهیه عصاره خشک گیاه خرفه: برای تهیه عصاره‌گیری ازگیاه‌خرفه از روش هضمی استفاده شد (باباخانلو و همکاران، ۱۳۷۷). مقدار معینی از گیاه خشک شده خرفه به‌وسیله آسیاب خرد شده و سپس به نسبت ۲ به ۱ با الکل اتانول ۸۰ درصد مخلوط گردید. پس از آن به‌مدت ۷۲ ساعت بر روی دستگاه شیکر جهت عصاره‌گیری بهتر قرار داده شد. در ادامه عصاره به‌دست آمده به دستگاه تقطیر منتقل و به‌مدت ۳ ساعت در دستگاه روتاری در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد جهت جلوگیری از خروج مواد مؤثره عصاره و استخراج حلال آلی قرار داده شد. در این مرحله حلال اتانول موجود در عصاره جدا و تغلیظ گردید.برای تولید عصاره خشک خرفه از مرکز رشد واحدهای فن‌آوری فرآورده‌های‌دارویی دانشکده‌داروسازی دانشگاه‌علوم پزشکی و خدمات درمانی دانشگاه تهران استفاده شد. پس از تولید عصاره خشک گیاه خرفه، از آن در ترکیب با غذا استفاده شد (Lakhsmi و Rajalakshmi، ۲۰۱۱).

تأمین ماهی و دورهٔ سازگاری: این پژوهش در ۲ مرحله صورت گرفت.درمرحله‌اول تهیه و تولیدعصاره آبی- الکلی خرفه در آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران و سپس

تغلیظ و تولید پودر از عصاره گیاه خرفه در مرکز رشد واحدهای فن‌آوری فرآورده‌های دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی دانشگاه تهران انجام گرفت. در مرحله دوم عملیات میدانی در مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی تنکابن، در بهمن ماه ۱۳۹۵ انجام شد. برای انجام عملیات از ۶۰۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با سلامت بالا و با میانگین وزنی ۳/۳±۰/۱ گرم از کارگاه تکثیر و پرورش واقع در تنکابن خریداری گردید و با رعایت استانداردهای حمل و نقل و اصول بهداشتی به مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی منتقل گردید. ماهیان به‌صورت تصادفی در ۱۵ مخزن ۳۰۰ لیتری (۴۰ عدد ماهی در هر مخزن) ذخیره‌سازی شدند. جهت سازگاری ماهی‌ها به‌مدت ۱۴ روز در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار داده شدند. آب روزانه به‌میزان ۸۰ درصد تعویض و فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب (میانگین دما ۱۳-۱۲ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۸-۷ میلی‌گرم/ لیتر، سختی آب ۱۰-۵ ppt و pH=۶/۷) اندازه‌گیری شد. در طول دوره سازگاری ماهیان با رژیم غذایی تجاری (فرادانه) به‌میزان ۳ درصد وزن بدن و به‌صورت دستی و پنج بار در روز از ساعت ۸ صبح تا ۴ بعد از ظهر و به فاصله ۲ ساعت در مخازن پرورش تغذیه شدند. پس از اتمام دوره سازگاری به‌مدت ۲ هفته، غذادهی قطع و زیست‌سنجی وزن اولیه به‌منظور انجام رقم‌بندی صورت گرفت. تمام ملاحظات اخلاقی آزمایش مطابق با استانداردهای مندرج در دستورالعمل‌های مراقبت و استفاده از حقوق حیوانات آزمایشگاهی و مؤسسات ملی بهداشت انجام پذیرفت.

طراحی آزمایش: در سالن نگه‌داری بچه‌ماهی‌ها، تعداد ۶۰۰ عدد بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد زیست‌سنجی طول و وزن قرار گرفتند. سپس ماهیان در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و یک شاهد (T_0 =٪۰، T_1 =٪۰/۵، T_2 =٪۱، T_3=٪۱/۵ و T_4=٪۲) و سه تکرار در ۱۵ مخزن پلاستیکی ۳۰۰ لیتری (در هر مخزن ۴۰ عدد ماهی) مورد آزمایش قرار گرفتند. زیست‌سنجی وزن و طول از ماهیان هر ۱۵ روز یک‌بار (در روزهای ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰) انجام پذیرفت. در پایان دوره ۶۰ روز پس از تیمار با عصاره خشک خرفه نمونه‌برداری از ماهیان به‌صورت تصادفی و به تعداد ۱۰ عدد ماهی از هر مخزن انجام شد. ماهیان صید شده پس از بی‌هوشی با عصاره پودر گل میخک به‌مقدار ۱۵۰ppm، مورد زیست‌سنجی طول کل و وزن بدن قرار گرفته و داده‌ها ثبت شدند.

شاخص‌های رشد: به‌منظور اندازه‌گیری وزن از ترازوی دقیق با دقت ۰/۱ گرم و برای اندازه‌گیری طول بدن ماهی از خط‌کش زیست‌سنجی با دقت یک میلی‌متر استفاده شد. شاخص‌های بیولوژیک از قبیل طول و وزن اولیه و نیز طول و وزن نهایی ماهیان، شاخص وضعیت، ضریب تبدیل غذایی، درصد افزایش وزن بدن، ضریب رشد ویژه، درصد بقاء، نسبت بازده پروتئین و رسوب پروتئین در بدن انجام شد (Shepherd و Bromag، ۱۹۹۲).

اندازه‌گیری طول و وزن ماهی:

= میانگین وزن (گرم)

تعداد کل ماهیان مخزن/ وزن کل ماهیان برداشت شده از هر مخزن

شاخص وضعیت (ضریب چاقی): $CF= W/TL^3$

درصد افزایش وزن: ۱۰۰× $WGP (\%) = (BWf-BWi)/BWi\times100$

ضریب تبدیل غذا: $FCR= F/ (Wf-Wi)\times100$

شاخص رشد ویژه: $SGR (\%) = (lnWf-lnWi)/t\times100$

= (SR) درصد بقاء

۱۰۰× تعداد ماهی در ابتدای دوره پرورش/تعداد ماهی در پایان دوره پرورش

سنجش فلور میکروبی روده: جهت بررسی فلور باکتریایی روده بچه‌ماهیان و حضور باکتری در روده، از هر تکرار به‌طور تصادفی پس از گذشت ۲۰ ساعت از زمان قطع تغذیه، ۵ عدد ماهی صید شد. پس از بی‌هوش نمودن ماهی، در شرایط استریل روده از محوطه شکمی برداشته شد و پس از تخلیه روده‌ها همگن گردید. برای شمارش باکتری‌های روده و باکتری‌های اسیدلاکتیک که در آزمایشگاه تخصصی ویرومد واقع در رشت انجام گرفت. نمونه‌ها در محلول سرم فیزیولوژیک حداکثر تا $۱۰^{-۷}$ رقیق شدند. بدین‌منظور از ۷ عدد لوله آزمایش که هرکدام حاوی ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل، که از قبل شماره‌گذاری و آماده شده بود، استفاده و مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول آماده شده اولیه به لوله اول اضافه و به‌خوبی تکان داده شد تا محتویات آن همگن شود. سپس ۱ میلی‌لیتر از لوله اول به لوله دوم انتقال داده شد و سپس طی مراحل ذکر شده عمل رقیق‌سازی برای تمامی لوله‌ها انجام شد، به‌طوری‌که لوله آخر رقت $۱۰^{-۷}$ بود. ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مورد نظر توسط پیپت استریل به‌داخل پلیت‌های استریل منتقل و با حرکت دورانی یا ۸ لاتین، نمونه کاملاً با محیط کشت (تریپتیک سوی آگار) TSA (Triptic Soy Agar) مخلوط شد. هرکدام از پلیت‌ها ۵ بار در جهت عقربه‌های ساعت و ۵ بار در خلاف جهت عقربه‌های ساعت بر روی سطح میز گردانده شد. بعد از این‌که محیط جامد شد، پلیت به‌مدت ۲۴ ساعت به‌صورت وارونه داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعداز سپری شدن زمان ذکر شده، از کلنی‌های باکتریایی ظاهر شده به‌طور تصادفی برداشته و در ۳ پلیت نوترینت آگار گسترانده شد تا کشت خالص به‌دست آید. در نهایت میانگین باکتری‌های شمارش شده سه پلیت در عکس رقت مورد نظر ضرب گردید تا مقدار کل باکتری‌ها محاسبه شود. شکل، حرکت، واکنش‌های کاتالاز و اکسیداز

و تخمیر گلوکز تمام کشت‌های خالص به‌دست آمده براساس رنگ‌آمیزی گرم مشاهده شدند (Pollock و همکاران، ۲۰۰۲).

آنالیز لاشه: برای تعیین ترکیبات لاشه در پایان دوره ۶۰ روز، از هر تکرار تعداد ۵ قطعه بچه‌ماهی به‌طور تصادفی صید و پس از خشک کردن آب آن‌ها و خالی نمودن محتویات شکم و قطع سر و باله‌ها، چرخ شدو پس از تهیه مخلوط همگن، بسته‌بندی و در یخچال نگه‌داری شد. جهت تجزیه شیمیایی لاشه، نمونه‌ها به آزمایشگاه تخصصی ویرومد واقع در رشت منتقل شد. برای تعیین میزان رطوبت (درصد ماده تر) از دسیکاتور باخلاء استفاده شد. برای تعیین رطوبت لاشه مقدار ۵ گرم از فیله گوشت جدا و آب سطحی آن خشک گردید و درون پتری‌دیش قرار داده شد و برای مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در هاون چینی به‌شکل پودر در آمد. سپس بامحاسبه اختلاف وزن تر و خشک نمونه‌ها درصد رطوبت آن‌ها محاسبه شد. برای تعیین میزان خاکستر نمونه‌ها، از کوره الکتریکی (Gallenkamp, England) استفاده شد. ابتدا بوته‌های چینی خالی در آون با دمای ۱۹۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک ساعت قرار داده شدند و پس ازسرد شدن در دسیکاتور، توزین گردیدند. سپس یک گرم از نمونه که رطوبت آن گرفته شده بود، در بوته‌های چینی ریخته شد. وزن بوته‌ها همراه با نمونه اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها در کوره با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ ساعت سوزانده شدند. پس از سوزانده شدن، نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه درون دسیکاتور سرد شده و سپس با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم توزین و از رابطه زیر محاسبه گردید:

=درصد خاکستر

۱۰۰ × (وزن نمونه / وزن بوته چینی - وزن بوته همراه با نمونه نهایی)

میزان پروتئین نمونه‌ها با روش کجلدال (Bushi, Switzerland)، تعیین گردید. بدین‌منظور یک گرم از هر نمونه (با سه تکرار) در درون بالن هضم ریخته شد، به هر بالن ۱۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ همراه با کاتالیزور اضافه گردید. پس از قراردادن بالن‌ها در دستگاه مورد نظر، ابتدا حدود ۳۰ دقیقه نمونه با دمای کم جوشیده و کف ایجاد شده از آن خارج گردید. سپس دما افزایش یافته تا نمونه‌ها هضم گردند. هضم نمونه حدود ۴ ساعت به‌طول انجامید. پس از انجام هضم نمونه‌ها و سرد نمودن آن‌ها، مقداری آب مقطر به هر بالن اضافه گردید و در قسمت تیتراسیون دستگاه کجلدال توسط اسیدسولفوریک ۰/۱ نرمال تیتر شد، پروتئین خام از طریق تعیین نیتروژن کل و براساس فرمول N=CP×6.25 % تعیین شد. عدد حاصل نشان‌دهنده پروتئین خام است.

۱۰۰× (وزن نمونه / مقدار اسید مصرفی ۰/۱ نرمال) = درصد ازت

۶/۲۵× پروتئین خام = درصد ازت

برای به‌دست آوردن چربی کل، از دستگاه سوکسله (Bushi, Switzerland) استفاده گردید. مقدار یک گرم نمونه توزین گردیده و درون کاغذ صافی که از قبل وزن شده بود، قرار داده شد. کاغذ صافی حاوی نمونه، درون کارتوش قرار گرفته و در محل مخصوصی در دستگاه قرار داده شد. سپس دستگاه را روشن نموده و چربی به‌وسیله اتر شسته شد و تنها چربی در بالن باقی ماند. در مرحله بعد، وزن کاغذ صافی همراه با نمونه، اندازه‌گیری و در فرمول قرار داده شد و درصد چربی نمونه به‌دست آمد (AOAC، ۲۰۰۰).

تجزیه و تحلیل آماری: ارقام هر یک از شاخص‌های اندازه‌گیری شده در پایان هر دوره به‌صورت (میانگین±انحراف استاندارد) بیان شدند. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smironov مورد ارزیابی قرار گرفت و با استفاده از واریانس یک‌طرفه ، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و در صورت معنی‌دار بودن اختلافات بین تیمارهای مختلف، از آزمون چند دامنه مقایسه میانگین‌های دانکن برای تعیین سطح تیمارها نسبت به یکدیگر استفاده شد. تفاوت آماری بین گروه‌ها در سطح ($p<۰/۰۵$) درنظر گرفته شد. تمام داده‌ها با استفاده از بسته آماری SPSS ۱۶ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel استفاده شد .

نتایج

شاخص‌های رشد: نتایج حاصل از پژوهش در مورد اثرات عصاره گیاه خرفه بر برخی شاخص‌های رشد از قبیل طول و وزن ماهیان، شاخص وضعیت، ضریب تبدیل غذایی، درصد افزایش وزن بدن، ضریب رشد ویژه، درصد بقاء، نسبت بازده پروتئین و رسوب پروتئین در بدن بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف آزمایش مورد بررسی قرار گرفت و در جدول ۱ آورده شده است.

آنالیز لاشه: نتایج حاصل از پژوهش در مورد اثرات عصاره گیاه خرفه (*Portulaca oleracea*) بر آنالیز لاشه (درصد رطوبت، خاکستر، چربی و پروتئین) بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف آزمایش مورد بررسی قرار گرفت و در جدول ۲ آورده شده است.

فلور میکروبی روده: نتایج حاصل از پژوهش اثرات عصاره گیاه خرفه بر شمارش کلی باکتری‌های روده و باکتری‌های لاکتوباسیلوس بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف آزمایش مورد بررسی قرار گرفت و در جدول ۳ آورده شده است. در بررسی باکتری‌های روده، میزان باکتری‌ها در تیمارهای T_1، T_2، T_3 و T_4 به‌ترتیب (۲/۰±۵۷/۰۷)، (۲/۰±۶۱/۰۵)، (۲/۰±۶۷/۰۴) و (۲/۰±۷۰/۰۳) $logcfu/g^{-1}$ در مقایسه با گروه شاهد (۲/۰±۸۳/۰۲) کاهش معنی‌دار نشان دادند ($P<۰/۰۵$). بیش‌ترین کاهش باکتری‌های روده در تیمار T_4 مشاهده شد. درحالی‌که تعداد باکتری‌های لاکتوباسیلوس روده در تیمار T_2 نسبت به سایر تیمارها افزایش نشان داد ($p< ۰/۰۵$).

جدول ۱: نتایج حاصل از میانگین تغییرات شاخص‌های رشد در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در پایان دوره۶۰ روزه پس از تغذیه با عصاره خشک گیاه خرفه

تیمارخرفه / شاخص	$T_{0=0\%}$	$T_{1=0/5\%}$	$T_{2=1\%}$	$T_{3=1.5\%}$	$T_{4=2\%}$
وزن اولیه (گرم)	۹/۰±۳۷/۱^{a}	۹/۰±۴/۲^{a}	۹/۰±۳۷/۴^{a}	۹/۰±۳۷/۲^{a}	۹/۰±۳۷/۳^{a}
وزن نهایی (گرم)	۶۷/۱±۶۶/۳^{b}	۶۴/۲±۶۳/۱^{b}	۶۵/۱±۷۶/۲^{b}	۶۶/۰±۴۲/۹^{b}	۶۵/۱±۵۰/۳^{b}
طول اولیه بدن (سانتی‌متر)	۹/۰±۳۸/۲۵^{a}	۹/۰±۳۸/۲۰^{a}	۹/۰±۳۸/۲۰^{a}	۹/۰±۳۸/۳۰^{a}	۹/۰±۳۸/۳۰^{a}
طول نهایی بدن (سانتی‌متر)	۱۶/۰±۶۳/۶^{a}	۱۶/۰±۵۱/۵^{a}	۱۷/۰±۰۹/۲^{a}	۱۷/۰±۰۸/۲^{a}	۱۷/۰±۹۳/۹^{a}
افزایش وزن (گرم)	۵۸/۱±۲۹/۱^{a}	۵۵/۱±۲۳/۵^{a}	۵۶/۱±۳۹/۴^{a}	۵۷/۰±۰۵/۹^{a}	۵۶/۱±۱۳/۱^{a}
درصد افزایش وزن (WGP)	۶۲۲/۱۱±۰۹/۷^{b}	۵۸۷/۱۵±۵۵/۲^{b}	۷۰۱/۱۴±۸۱/۵^{a}	۶۰۸/۱۹±۸۵/۱^{b}	۵۹۹/۱۱±۰۳/۶^{b}
شاخص رشد ویژه (SGR)	۳/۰±۲۹/۲۰^{a}	۳/۰±۲۰/۲۵^{a}	۳/۰±۲۵/۳۰^{a}	۳/۰±۲۶/۳۲^{a}	۳/۰±۲۵/۲۵^{a}
ضریب چاقی (CF)	۱/۰±۴۷/۰۱^{b}	۱/۰±۴۳/۰۵^{b}	۱/۰±۳۱/۰۲^{b}	۱/۰±۳۳/۰۱^{b}	۱/۰±۱۳/۰۹^{a}
ضریب تبدیل غذایی (FCR)	۰/۰±۷۴/۰۰۱^{b}	۰/۰±۷۶/۰۰۹^{b}	۰/۰±۶۵/۰۰۳^{a}	۰/۰±۷۴/۰۰۱^{b}	۰/۰±۷۵/۰۰۹^{b}
درصد بازماندگی (SR)	۹۴/۰±۱۶/۶^{b}	۹۸/۰±۳۳/۳^{a}	۹۴/۰±۱۶/۶^{b}	۹۵/۰±۰۰/۱^{b}	۹۵/۰±۸۳/۳^{b}

حروف انگلیسی غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری (P<۰/۰۵) است.

جدول ۲: نتایج حاصل از آنالیز لاشه در ماهی قزل آلای رنگین کمان در پایان دوره ۶۰ روزه پس از تغذیه با عصاره گیاه خرفه

تیمارخرفه / شاخص	$T_{4=2\%}$	$T_{3=1.5\%}$	$T_{2=1\%}$	$T_{1=0/5\%}$	$T_{0=0\%}$
چربی (درصد)	۱/۸۸±۰/۰۸^{a}	۱/۶۳±۰/۰۷^{b}	۱/۶۱± ۰/۰۷^{b}	۱/۲۴± ۰/۰۵^{c}	۱/۴۳± ۰/۰۶^{d}
پروتئین (درصد)	۱۸/۹۸ ±۲/۶۴^{a}	۱۹/۰۳±۳/۰۱^{b}	۱۹/۵۱±۳/۹۲^{c}	۱۹/۲۹ ±۳/۱۲^{d}	۱۸/۸۵ ±۲/۵۸^{e}
رطوبت (درصد)	۷۶/۲۳ ±۴/۸۱^{a}	۷۷/۰۶ ±۵/۵۹^{b}	۷۶/۰۳ ±۳/۸۸^{c}	۷۶/۲۳ ±۴/۸۱^{a}	۷۶/۱۶ ±۴/۶۵^{a}
خاکستر (درصد)	۱/۸۱ ±۰/۰۸^{a}	۱/۸۳ ± ۰/۰۹^{a}	۱/۸۰ ±۰/۰۷^{a}	۲/۰۰ ±۱/۸^{b}	۲/۰۲ ±۰/۲^{b}

حروف انگلیسی غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری (P<۰/۰۵) است.

جدول ۳: نتایج حاصل از شمارش کلی باکتری‌های روده (log CFU / g-1) و باکتری‌های اسیدلاکتیک (log CFU/ g-1) در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در پایان دوره ۶۰ روزه پس از تغذیه با عصاره گیاه خرفه

تیمار ها / باکتری روده ($logCFU/g^{-1}$)	$T_{0=0\%}$	$T_{1=0.5\%}$	$T_{2=1\%}$	$T_{3=1.5\%}$	$T_{4=2\%}$
تعداد کل باکتری‌ها (TVC)	۲/۸۳ ±۰/۰۲^{a}	۲/۵۷ ±۰/۰۷^{b}	۲/۶۱ ±۰/۰۵^{c}	۲/۷۰ ±۰/۰۳^{d}	**۲/۶۷ ±۰/۰۴^{e}**
تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB)	۰/۸۴±۰/۰۱^{b}	۰/۹۳±۰/۰۳^{b}	۱/۱±۰/۰۳^{a}	۰/۸۹±۰/۰۲^{b}	**۰/۸۸±۰/۰۱^{b}**

حروف انگلیسی غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری (P<۰/۰۵) است.

بحث

در مطالعه حاضر اثر عصاره خشک گیاه خرفه (*Portulaca oleracea*) بر برخی شاخص‌های رشد، فلورمیکروبی روده و آنالیز لاشه در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که هیچ‌یک از سطوح مصرفی عصاره خشک خرفه در این مطالعه تأثیری بر وزن، طول، شاخص وضعیت و شاخص رشد ویژه بچه‌ماهیان در پایان دوره ۶۰ روز نداشتند ولی مصرف ۱٪ عصاره خشک خرفه موجب افزایش معنی‌دار درصد وزن و کاهش ضریب تبدیل غذایی گردید. میزان درصد بازماندگی با سطح ۰/۵٪ عصاره خشک خرفه بیش از سایر تیمارها بود. عصاره خشک خرفه در سطح ۲٪ موجب کاهش شاخص وضعیت (ضریب چاقی) بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان گردید. با توجه به این نتایج به‌نظر می‌رسد که افزودن ۱٪ عصاره خشک خرفه به جیره غذایی ماهی جهت بهبود عملکرد رشد مناسب باشد. Camara (۲۰۱۷) در بررسی اثرات گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.) به تنهایی و یا در ترکیب با پروبیوتیک *Shewanell* در جیره غذایی ماهی سیم دریایی (*Sparus aurata L.*) نشان داد که فعالیت آنزیم پروتئاز سرم ۱۵ روز پس از تغذیه با جیره غذایی حاوی خرفه به‌مقدار قابل توجهی در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت. اما فعالیت آنزیم آنتی‌پروتئاز سرم هیچ تغییر قابل توجهی را در سرم تیمارهای مختلف آزمایشی

نشان نداد. هم‌چنین نتایج به‌دست آمده از موکوس پوست ماهیان سیم دریایی تغییرات قابل توجهی را در فعالیت پروتئاز و آنتی‌پروتئاز در زمان‌های مختلف آزمایش (۱۵ یا ۳۰ روز) نشان نداد. با توجه به محدود بودن تحقیقات انجام شده در مورد اثرات گیاه دارویی خرفه برکارایی رشد و بازماندگی در گونه‌های مختلف آبزیان، مطالعاتی در رابطه با اثر این گیاه دارویی بر رشد و اشتهای انواعی از طیور گزارش شده است.در بررسی که توسط زینلی و همکاران (۱۳۹۱) در مورد اثر گیاه خرفه بر عملکرد رشد و خصوصیات لاشه بلدرچین ژاپنی انجام شد، نشان داد که وزن نسبی در پرندگانی که گیاه خرفه را دریافت کرده بودند، به‌طور معنی‌داری نسبت به پرندگان تیمار شاهد افزایش یافته‌است.اما در ارتباط با دیگر صفات لاشه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در تحقیقی دیگر که توسط قربانی و همکاران (۱۳۹۲) در مورد تأثیر گیاه خرفه بر عملکرد و خصوصیات لاشه‌های جوجه‌های گوشتی انجام گرفت، نتایج آزمایش نشان داد که استفاده از سطوح مختلف خرفه در دوره آغازین تأثیر معنی‌داری بر میانگین مصرف خوراک، افزایش وزن بدن و ضریب تبدیل غذایی ندارد. اما در دوره دوم پرورش و کل دوره، استفاده از خرفه در سطوح ۱ و ۲ درصد به‌صورت قابل ملاحظه‌ای مصرف خوراک و وزن بدن را نسبت به گروه شاهد افزایش داد.خرفه دارای سطوح بالای پروتئین است(براساس گزارش‌های مختلف بین ۱۷ تا ۲۷ درصد) که در مقام مقایسه با سایر منابع تجاری با ارزش پروتئین گیاهی نظیر یونجه قرار داده می‌شود (Iravan و همکاران، ۲۰۰۳). خرفه دارای ترکیبات فعالی نظیر کومارین‌ها، ویتامین‌های A، C، E، بتاکاروتن، ملاتونین، دوپامین، نورآدرنالین و نیز گلوتاتیون می‌باشد (Dogan و Aydin، ۲۰۱۰؛ Movahedian و همکاران، ۲۰۰۷؛ Quah و Lim، ۲۰۰۷) که همگی می‌توانند بر میزان رشد و اشتهای آبزیان تأثیرگذار باشد. گزارش‌هایی مبنی بر وجود گیاهان دارویی دارد که دارای خواص محرک اشتها، محرک رشد، محرک سیستم ایمنی، ضد باکتری، ضدویروس، ضدانگل و ضداسترس در آبزیان هستند.این خواص می‌توانند ناشی از وجود مواد فعالی هم‌چون آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، تانن‌ها، ساپونین‌ها، گلیکوسیدها، فلانوئیدها، فنولیک‌ها، استروئیدها و اسانس‌های روغنی در گیاهان دارویی باشد (Chakraborty و Hancz، ۲۰۱۱). تنوع مولکولی عصاره‌های گیاهی باعث می‌شود که به‌ندرت باعث ایجاد مقاومت دارویی در میکروب‌ها شوند و هم‌چنین ترکیبات حاصل از گیاهان دارویی به نسبت داروهای صناعی راحت‌تر تجزیه می‌شوند (Olusola و همکاران، ۲۰۱۳؛ Blumenthal و همکاران، ۲۰۰۰؛ Logambal و همکاران، ۲۰۰۰). نتایج این بررسی نشان داد که استفاده از عصاره گیاه خرفه می‌تواند ترکیبات شیمیایی لاشه را در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دستخوش تغییر نماید، به‌طوری‌که در این بررسی میزان پروتئین در تیمارهای T_1، T_2 و T_3 نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشتند که این فزایش میزان پروتئین در تیمار خرفه ۱٪ بیش از سایر تیمارهای آزمایشی بود. در بررسی میزان چربی لاشه کاهش معنی‌داری در تیمارهای T_3 و T_4 در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شد ولی کاهش چربی در T_3 بیش‌تر از T_4 بود. هم‌چنین، میزان رطوبت لاشه در تمامی تیمارهای آزمایشی به‌خصوص در تیمار T_1 کاهش نشان داد. میزان خاکستر نیز در تمامی تیمارهای آزمایشی به‌ویژه تیمار T_4 در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی‌دار بود. ترکیب شیمیایی بدن همواره تحت تأثیر ترکیب جیره غذایی و حتی درصد و مقدار غذادهی روزانه است. ترکیبات مختلف غذایی اثرهای متفاوتی بر ترکیب لاشه ماهیان دارند. به‌طوری‌که گزارش شده گیاه مرزنگوش یونانی (*Orijgamum heracleoticum*) افزایش میزان پروتئین لاشه در گربه‌ماهی کانال (*Ictalurus punctatus*) گردید. وجود مقادیر بالای تیمول و کارواکرول در اسانس مرزنگوش را موجب رسوب پروتئین و افزایش پروتئین لاشه دانسته‌اند(Zheng و همکاران، ۲۰۰۶). هم‌چنین در تحقیقی که توسط Shalaby و همکاران (۲۰۰۶) بر روی تیلاپیا صورت گرفت، به این نتیجه رسیدند که افزودن ترکیبی از سیر و کلرامفنیکل به جیره غذایی تیلاپیا سبب افزایش معنی‌دار مقدار پروتئین خام و کاهش معنی‌دار میزان چربی کل در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۳۰ گرم سیر و ۱۵ میلی گرم کلرامفنیکل به‌ازای هر کیلوگرم غذا شده است، که علت این امر را وجود مواد زیست فعال در جیره غذایی بیان کردند.نتایج این تحقیق با نتایج مطالعه مهدوی و همکاران (۱۳۹۳) مبنی بر مؤثر بودن مکمل اسانس رازیانه (*Foeniculm vulgarue*) بر بچه‌ماهی سفید (به‌جز در مقدار چربی لاشه) هم‌سو می‌باشد. تجویز گیاهان دارویی می‌تواند سبب تغییر فلور باکتریایی روده، افزایش رشد و بهبود کیفیت لاشه جانوران گردد (Tekeli و همکاران، ۲۰۰۸؛ Gue و همکاران، ۲۰۰۴). علاوه بر آن در نتایج این تحقیق مشخص شد که استفاده از عصاره گیاه خرفه می‌تواند در تعداد باکتری‌های مفید روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مؤثر باشد، به‌طوری‌که شمارش باکتری‌های بی‌هوازی (لاکتوباسیلوس) در محیط کشت MRS در تیمار T_1 بیش از دیگر تیمارها بود($P>0/05$).از طرفی تعداد باکتری‌های هوازی تمامی تیمارهای آزمایش در مقایسه با تیمار شاهد در محیط کشت TSA کاهش معنی‌دار مشاهده گردید($P<0/05$). مشخص شده است که فعالیت پراکسیداز با استفاده از قدرت آنتی‌اکسیدانی پراکسید هیدروژن تولید شده در واکنش‌های دیگر به‌منظور تولید هیپوکلریت می‌باشد که در نهایت منجر به تولید کلرامین‌ها می‌گردد. تمام این ترکیبات حاوی مواد اکسیداتیو می‌باشند که قادرند به غشاءهای میکروارگانیسم‌ها حمله‌ور شوند(Ellis، ۲۰۰۱).هم‌چنین گزارش شده است که فلاونوئید، کومارین‌ها و آلکانوئیدها مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی گیاه خرفه می‌باشند (Awad و همکاران، ۲۰۱۵). کاملاً واضح است که فلور میکروبی

روده ماهیان در موازات با تغییرات محیطی و از گونه‌ای به گونه دیگر تغییر می‌نماید (Hagi و همکاران، ۲۰۰۴؛ Holben و همکاران، ۲۰۰۲). میزان حضور باکتری‌ها در روده ماهی بازتابی از محل زندگی ماهی و نوع غذای مصرفی آن می‌باشد. به‌طور عمده در روده ماهیان، 10^{9}-10^{3} عددباکتری‌درهرگرم‌روده مشاهده می‌شود (Lartseva و Bormotova، ۱۹۹۸). ترکیبات مفید ازجمله ویتامین‌ها و برخی از آنزیم‌ها، موجب افزایش فعالیت‌های گوارشی و آنزیمی شده و به‌دنبال آن افزایش رشد و توسعه سطوح غذایی را به‌همراه دارد (Austin، ۲۰۰۷). با توجه به افزودن‌درصدهای مختلف عصاره به جیره غذایی در تیمارهای مختلف، به‌نظر می‌رسد که افزایش میزان باکتری‌های بی‌هوازی در این تیمارها در مقایسه با گروه شاهد، احتمالاً تحت تأثیر مواد مغذی موجود در عصاره‌باشد.از نتایج این تحقیق می‌توان دریافت‌که کاربردعصاره خرفه به‌عنوان یک مکمل غذایی می‌تواند نقش بسیار مفیدی را در افزایش میزان‌رشد و نیز بهبودمیکروفلور مفیدروده نسبت به گروه شاهد ایجاد نماید و به‌عنوان یک ماده افزودنی در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان‌مورداستفاده قرار گیرد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که گیاهان دارویی می‌توانند انتخاب مناسبی جهت بهبود روند رشد و افزایش میزان بازماندگی در آبزیان مورد استفاده قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

با توجه به انجام عملیات میدانی این تحقیق در مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی تنکابن بدین‌وسیله از همکاری کلیه کارکنان آن مرکز کمال تشکر و قدردانی را دارد.

منابع

۱. **باباخانلو، پ.؛ میرزا، م.؛ سفیدکن، ف.؛ احمدی، ل.؛ برازنده، م.م. و عسگری، ف.، ۱۳۷۷.** بررسی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس زیره کرمان (*Bunium persicum Boiss*). تحقیقات گیاهان دارویی و معطر. جلد ۱: صفحات ۱۵ تا ۲۷.

۲. **بابایی، ز.؛ محسنی، م.؛ بنایی، م.؛ نعمت‌دوست‌حقی، ب. و شوکت، پ.، ۱۳۹۳.** تأثیرعصاره گیاه‌ختمی (*Althaea officinalis*) بر بهبودتوان‌فیزیولوژیکی ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با سرب و کادمیوم. بهره‌برداری و پرورش آبزیان. جلد۳ شماره ۳، صفحات ۱ تا ۱۵.

۳. **رجحان، م.، ۱۳۸۷.** دارو و درمان گیاهی. انتشارات فرهیختگان علوی. چاپ پنجم. ۲۸۷ صفحه.

۴. **رستگاری،م.ع.،۱۳۷۸.**علف‌های‌هرز و روش‌کنترل‌آن‌ها. انتشارات مرکز نشر دانشگاهی. چاپ دوم. ۱۲۰ صفحه.

۵. **زینلی، پ.؛ لطفی، ا.؛ نعیمی‌پوریونسی، ح. و جعفری‌آهنگری، ی.، ۱۳۹۱.** بررسی اثر گیاه خرفه (*Portulaca oleracea*. L.) بر عملکرد رشد و خصوصیات لاشه بلدرچین ژاپنی. مجله دام و طیور. جلد ۱، شماره ۲، صفحات ۲۹ تا ۳۴.

۶. **قربانی، م.ر.م.؛ بوجارپور، م.؛ میاحی، ج.؛ فیاضی، س.ر. و طباطبایی، و.س.ص.، ۱۳۹۲.**تأثیرگیاه‌خرفه‌برعملکردوخصوصیات لاشه جوجه‌های گوشتی. مجله دامپزشکی ایران. جلد ۹، شماره ۴، صفحات ۸۸ تا ۹۸.

۷. **قربانی، م.ر.م.؛ بوجارپور، م.؛ میاحی، ج.؛ فیاضی، س.ر. و طباطبایی، و. س.ص.، ۱۳۹۳.**تأثیراستفاده‌از پودر خرفه بر سیستم ایمنی، جمعیت میکروبی سکوم جوجه‌های گوشتی و خصوصیات لاشه جوجه‌های گوشتی. نشریه پژوهش‌های علوم دامی ایران. جلد ۶، شماره ۲، صفحات ۱۵۰ تا ۱۵۶.

۸. **مهدوی، س.؛ سکینه، ی.؛ فیروزبخش، ف. و خلیلی، خ.، ۱۳۹۳.** تأثیر مکمل اسانس رازیانه (*Foeniculum vulgare*) بر شاخص‌های رشد، بازماندگی، ترکیب لاشه و فراسنجه‌های خونی بچه‌ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*). فصلنامه علمی پژوهشی علوم و فنون شیلات. جلد ۳، شماره ۳، صفحات ۷۹ تا ۹۰.

۹. **ناظریان، س.؛ قلی‌پورکنعانی، ح.؛ جعفریان، ح.؛ سلطانی، م. و اسماعیل‌ملا، ع.، ۱۳۹۲.** تأثیر تغذیه‌ای پودر سیر بر شاخص‌های هماتولوژیک فیل‌ماهی *(Huso huso)*. فصلنامه علوم تکثیر و آبزی پروری. جلد ۱، شماره ۳، صفحات ۶۹ تا ۷۱.

۱۰. **Abolaji, O.A.; Adebayo, A.H. and Odesanmi, O.S., 2007.** Nutritional Qualities of three medicinal plant parts (*Xylopia aethiopica, Bilighia sapida and Parinari polyandra*) commonly used by pregnant woman in the western part of Nigeria. Pakistan Journal of Nutrition.Vol. 6, pp: 665-668.

۱۱. **Alishahi, M.; Ranjbar, M.M.; Ghorbanpour, M.; Peyghan, R.; Mesbah, M. and Razi Jalali, M., 2010.** Effects of Dietary Aloe vera on Some Specific and Nonspecific Immunity in the *Common carp* (*Cyprinus carpio*). Int. J. Vet. Res. Vol. 3, pp: 189-195.

۱۲. **Antonella Dalle, Z.; Francesco, T. and Igino, A., 2005.** The dietary inclusion of *Portulaca oleracea* to the diet of laying hens increases the n-3 fatty acids content and reduces the cholesterol content in the egg yolk, Italian journal of animal science. Vol. 1, pp: 1- 3.

۱۳. **Austin, B. and Austin, D., 2007.** Bacterial fish pathogens: diseases of farmed and wild fish. 4th (revised) ed. Godalming: Springer Praxis.

۱۴. **AOAC. 2000.** Official Methods of Analysis. 17th Edn. Association of Official Analytical Chemistry, Arlington, Virginia, USA.

۱۵. **Awad, E.; Awaad, A.S. and Esteban, M.A., 2015a.** Effects of dihydroquercetin obtained from deodar (*Cedrus deodara*) on immune status of gilthead seabream (*Sparus aurata L.*). Fish amd Shellfish Immunology. Vol. 43, pp: 43-50.

۱۶. **Aydin, R. and Dogan, I., 2010.** Fatty Acid Profile and cholesterol content of egg yolk from chickens fed diets supplemented with purslance (*portulaca oleracea*). Journal of the science of Food and Agriculture. Vol. 90, pp:1759-1763.

۱۷. **Blumenthal, M.; Goldberg, A.; Brinckmann, J.; Foster, S.; Tyler, A. and Varro, E., 2000.** Herbal medicine. Integrative Medicine Communications, Newton (Mass). 2000 p.

۱۸. **Camara, R., 2017.** Effects of purslane (*Portulaca oleracea L.*) and Shewanella putrefaciens probiotic enriched diet on gilthead seabream (*Sparus aurata L.*), Universidade Do Algarve, Faculdade de, Cienciase Tecnologia. 63 p.

۱۹. **Chakraborty, S.B. and Hancz, C., 2011.** Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. Aquaculture. Vol 3, pp: 103-119.

۲۰. **Dkhil, M.A.; Abdel Moniem, A.E.; AI-Quraishy, S. and Saleh, R.A., 2011**. Antioxidant effect of purslane (*Portulaca oleracea*) and its mechanism of action J. Mechanism of action. J. Medicinal Plants Res. Vol. 5, No. 9, pp: 1589-1563.

۲۱. **Ellis, A.E., 2001.** The function of teleost fish lymphocytes in relation to inflammation. Int. Journal Tissue. Vol. 8, pp: 263-270.

۲۲. **Guo, F.C.; Kwakkel, R.P.; Soede, j.; Williams, B.A. and Verstegen, M.W., 2004.** Effect of a Chinese herb medicine formulation, as an alternative for antibiotics, onperformance of broilers. Br. poult. Sci. Vol. 45, No. 6, pp :793-797.

۲۳. **Guanghong, W.U.; Yuan, C.O.; Shen, M.; Tang, Y.L.; Dongm, L.I.; SUN, F.F.; Huang, C. and Han, X., 2007.** Immunological and biochemical parameters in carp (*Cyprinus carpio*) qompesell feed ingredients for long term administration. Microb-Ecol. Vol. 44, No. 2, pp: 175-185.

۲۴. **Hagi, T.; Tanaka, D.; Iwamura, Y. and Hoshino, T., 2004.** Diversity and seasonal changes in latic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. Aquaculture. Vol 234, pp: 335-346.

۲۵. **Holben, W.E.; Williams, P.; Saarinen, M.; Sarkilahti, L.K. and Apaja Lahti, J.H.A., 2002.** Phylog-enetic analisis of intestinal microflora indicates in novel Mycoplasma phylotype in farmed and wild salmon. Microb-Ecol. Vol. 44, No. 2, pp: 175-185.

۲۶. **Iravan, D.; Hariyadi, P. and Wijaya, H., 2003.** The potency of Krokot (*Portulaca oleracea*) as functional food ingredients. Indonesian Food and Nutrition Progress. Vol. 10, No. 1, pp: 1-12.

۲۷. **Lartseva, L.V. and Bormotova, M., 1998.** Sanitary Microbiological examination of yung sturgeon in the Volga delta, Bull. Eur. Fish Pathol. Vol. 18, No. 3, pp: 102.

۲۸. **Lakhsmi, P.T.V. and Rajalakshmi, P., 2011.** Identification of phyto-components and its biologicalactivities of Aloe vera (L.) through Gas Chromatography-Mass Spectrometry. International Research Journal of Pharmacy. Vol 2, pp: 247-249.

۲۹. **Lim, Y.Y. and Quah E.P.L., 2007.** Antioxidant properties of difrent cultivars of *portulaca oleracea*. Food Chem. Vol. 103, pp: 734-740.

۳۰. **Logambal, S.M.; Venkatalakshmi, S. and Michael, R.D., 2000.** Immunostimulatory effect of leaf extract of Ocimum sanctum Linn in (*Oreochromis mossambicus*) (Peters). Hydrobiologia. Vol. 430, pp: 113-120.

۳۱. **Movahedian, A.; Ghannadi, A. and Vashirnia, M., 2007.** Hypocholesterolemic effects of *Purslane* extract on serum lipids in *rabbits* fed with high cholesterol levels. International Journal of Pharmacology. Vol. 3, No. 3, pp: 285-289.

۳۲. **Olusola, S.E.; Emikpe, B.O. and Olaifa, F.E., 2013.** The potentials of medicinal plants extracts as bioantimicrobial in aquaculture. International Journal of Medicinal and Aromatic Plants. Vol. 3, pp: 404-412.

۳۳. **Pollock, R.A.; Finlay, L.; Mondschein, W. and Modesto, R.R., 2002.** Laboratory exercises in microbiology. 232 p.

۳۴. **Schuman, M., 2001.** Overview of purslane edible and medicinal Herb.Nnfa today. Vol. 115, No. 6, pp: 132-145.

۳۵. **Shepherd, J. and Bromage, N., 1992.** Intensive fish farming. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England. 416 p.

۳۶. **Shalaby, A.M.; Khattab, Y.A. and Abdel Rahman, A.M., 2006**. Effects of Garlic (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical. Vol. 12, pp: 172-201.

۳۷. **Tekeli, A.; Kutlu, H.R.; Celik, L.; Yurdakul, E. and Avcy, A., 2008.** The use of propolis as an alternative to antibiotic growth promoters in broiler diets. Proceedings of 23th Worlds Poulry Congress. Vol. 2, pp: 482-482.

۳۸. **Xie, Z.F., 2002.** Classified dictionary of traditional Chinese Medicine. Foreign Language Press, Beijing, China. 1057 p.

۳۹. **Zheng, Z.L.; Tan, J.Y.W.; Liu, H.Y.; Zhou, X.H.; Xiang, X. and Wang, K.Y., 2009.** Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum L.*) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctuatus*). Aquaculture. Vol. 229, pp: 214-218.

۴۰. **Zar, J.H., 1999.** Biostatistical analysis. Prentic Hall. (4th Edition) New Jersey. 663 p.