(DOI): 10.22092/ISFJ.2026.135182 34(6) 55-72 Iranian Scientific Fisheries Journal

Effect of microencapsulated hydroalcoholic extract of dwarf elder (*Sambucus ebulus*) leaf on hematological, biochemical, immunological parameters and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Yersinia ruckeri*

Ghiasi M.[1*]; Bahadori F.[2]; Azimi Atargoleh R.[3]; Binaei M.[1]; Habibi F.[1]; Taghavi M.J.[1]

*ghiasimaryam4@gmail.com

1-Caspian Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Sari, Iran
2-Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Semnan Province, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Semnan, Iran
3-Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Received: October 2025 Accepted: December 2025 Published: March 2026

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Introduction

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is one of the most widely farmed fish species in Iran and globally, valued for its economic and nutritional significance. However, intensive aquaculture practices often lead to physiological stress, liver dysfunction, and increased susceptibility to bacterial infections such as yersiniosis, caused by *Yersinia ruckeri*. The emergence of biotype 2 strains with reduced sensitivity to conventional vaccines has raised concerns about vaccine failure and disease outbreaks in trout farms (Austin *et al.,* 2003; Kumar *et al.,* 2017). In recent years, medicinal plants have gained attention as natural immunostimulants and hepatoprotective agents in aquaculture. Elderberry (*Sambucus ebulus*) is one such plant, known for its flavonoid compounds with antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and immune-boosting properties (Ivanova *et al.,* 2014; Ngugi *et al.,* 2015). Previous studies have demonstrated the positive effects of dietary elderberry leaf supplementation on blood parameters, serum biochemistry, immune response, and disease resistance in rainbow trout (Ghiasi *et al.,* 2023). Despite promising findings, previous research suggests that this plant has strong potential to be introduced as a dietary immunostimulant and growth enhancer in aquaculture. The aim of this study was to evaluate the effects of encapsulated elderberry leaf extract as a dietary supplement to promote growth and immunity. As a complementary strategy alongside conventional vaccines, it may play a significant role in reducing mortality and enhancing trout production in Iran.

Methodology

To prepare the herbal extract, *S. ebulus* leaves were collected from Sefrabad (Sari, Iran) and authenticated by the Semnan Agricultural Research Center. After shade-drying, the leaves were extracted using a modified Soxhlet method with 70% ethanol (Păvăloiu *et al.,* 2020). The concentrated extract was freeze-dried and microencapsulated with gelatin through high-speed homogenization. Encapsulation efficiency and extract yield were assessed spectrophotometrically (Shu *et al.,* 2006). Experimental diets were formulated weekly by spraying the dissolved microcapsules onto commercial trout feed (GF1, Beyza Co., Iran), followed by air-drying and cold storage. A total of 280 rainbow trout (*O. mykiss*, 59.11 ± 2.55 g) were randomly assigned to 12 fiberglass tanks. After a 2-week acclimation, fish were fed for 8 weeks with diets containing 0, 0.1, 0.25, and 0.5% extract, adjusted to 2–2.5% of body weight daily. At weeks 4 and 8, blood samples were collected from anesthetized fish to evaluate hematological and immunological responses. Standard methods were used to measure RBC, WBC, Hct, Hb, MCV, MCH, and MCHC (Blaxhall and Daisley, 1973; Seiverd, 1964), while differential leukocyte counts were performed on Giemsa-stained smears (Lee *et al.,* 1998). Respiratory burst activity was assessed using luminol-based chemiluminescence (Binaii *et al.,* 2022). Serum levels of TP, Alb, Chol, Tri, ALT, AST, total IgM, and lysozyme activity were measured using commercial kits and turbidimetric assays (Ellis, 1990; Binaii *et al.,* 2014). At the end of the trial, fish were challenged with *Y. ruckeri* strain MT968739 via intraperitoneal injection (Ghiasi *et al.,* 2023). Mortality was monitored for 14 days, and survival rates were calculated. All data were statistically analyzed using one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range tests at a 95% confidence level (Zar, 1994).

Results

Microencapsulation showed strong formulation performance, yielding 92% with an encapsulation efficiency of 78%. Hematological profiles at weeks 4 and 8 revealed no significant differences in RBC count, hemoglobin, hematocrit, MCV, MCH, or MCHC between treated and control groups, though treated fish tended to display slightly higher values. In the 0.25% group, WBC count and neutrophil percentage increased, accompanied by a reduction in lymphocytes, while other treatments followed similar but non-significant trends. Serum biochemistry remained stable for AST and albumin across all groups, yet treated fish generally exhibited improved profiles. Cholesterol declined slightly at week 4 and significantly by week 8 in all treatments. Triglycerides consistently decreased, while total serum protein rose in the 0.25% and 0.5% groups. ALT levels were lower in all treatments, suggesting enhanced liver function. Immunological responses were strengthened, with IgM levels significantly elevated in all treated groups at both time points. Lysozyme activity increased in the 0.25% group at week 4 and further in the 0.25% and 0.5% groups by week 8, while the 0.1% group showed a non-significant rise. Respiratory burst activity was consistently higher, with the 0.25% group showing the strongest response at week 4 and sustained elevations across treatments by week 8. Upon challenge with Y. ruckeri, survival improved markedly in all supplemented groups. Fish receiving 0.1%, 0.25%,

and 0.5% supplementation achieved survival rates of 56.67%, 73.33%, and 66.67%, respectively, compared to only 23.33% in controls.

Discussion and conclusion

This study shows that dietary supplementation with microencapsulated herbal extract can enhance both physiological and immunological status in rainbow trout. While hematological indices did not differ significantly, treated fish generally displayed improved profiles. Biochemical changes, including reduced ALT and triglycerides together with higher total protein, point to better liver function and metabolic stability. Immunological outcomes such as elevated IgM, lysozyme activity, and respiratory burst highlight strengthened innate immunity, especially in the 0.25% and 0.5% groups. Most importantly, survival after *Y.ruckeri* challenge was markedly higher in all supplemented groups, confirming the protective effect of the extract. Overall, the formulation proved effective in supporting fish health and disease resistance, with the 0.25% dose delivering the most consistent benefits

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgment

This article is derived from a dedicated research project entitled “Evaluation of the effects of free and microencapsulated hydroalcoholic extract of elderberry (*S. ebulus*) leaves on growth, immunity, and disease resistance of rainbow trout against *Y. ruckeri*”, approved under project number 001292-101-12-76-2. We sincerely thank all colleagues at the Iranian Fisheries Science Research Institute and the Caspian Sea Ecology Research Center for their valuable scientific and laboratory support throughout this study.

مجله علمی شیلات ایران ۳٤ (٦) ٥٥-٧٢ (DOI): 10.22092/ISFJ.2026.135182

مقاله علمی – پژوهشی:

تأثیر عصاره هیدروالکلی ریزپوشانی‌شده برگ گیاه آقطی سفید (*Sambucus ebulus*) بر شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی، ایمنی و مقاومت قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در برابر باکتری *Yersinia ruckeri*

مریم قیاسی*[۱]، فرزانه بهادری[۲]، راضیه عظیمی اترگله[۳]، محمد بینائی[۱]، فرشیده حبیبی[۱]، محمدجواد تقوی[۱]

*ghiasimaryam4@gmail.com

۱- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

۲ - مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، سمنان، ایران

۳ - موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: مهر ۱٤۰٤ تاریخ پذیرش: آذر ۱٤۰٤ تاریخ چاپ: اسفند ۱٤۰٤

چکیده

با توجه به نقش کلیدی قزل‌آلا در صنعت آبزی‌پروری ایران و کاهش اثربخشی آنتی‌بیوتیک‌ها در کنترل بیماری‌هایی مانند Yersiniosis، استفاده از گیاهان دارویی به عنوان راهکاری نوین برای تقویت ایمنی و افزایش مقاومت ماهیان، ضروری به‌نظر می‌رسد. هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی اثرات عصاره هیدروالکلی کپسوله شده گیاه آقطی بر شاخص‌های ایمنی، خون، بیوشیمیایی و مقاومت در برابر باکتری *Yersinia ruckeri* بوده است. بدین‌منظور، عصاره هیدروالکلی برگ گیاه آقطی به صورت ریزپوشانی‌شده با ژلاتین در غلظت‌های ۰ (شاهد)، ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد به جیره غذایی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (میانگین وزنی ۲/۵۵±۵۹/۱۱ گرم) افزوده شده و ماهیان به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. در پایان هفته‌های ۴ و ۸ آزمایش، از ۸ عدد برای سنجش شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی و ایمنی خون‌گیری انجام گرفت. در پایان هفته ۸ نیز به ۳۰ عدد ماهی از هر تیمار، ۰/۱ میلی‌لیتر از باکتری *Y. ruckeri* به صورت داخل صفاقی تزریق شد. نتایج این بررسی نشان داد که تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین، حجم متوسط گلبولی، میزان هموگلوبین گلبولی و غلظت متوسط هموگلوبین گلبولی ، آلبومین، آسپارتات آمینوترانسفراز تفاوت معنی داری در پایان هفته‌های ۴ و ۸ آزمایش بین شاهد و تیمارها نشان ندادند. تعداد گلبول‌های سفید، کلسترول، تری‌گلیسرید، پروتئین تام سرم، آلانین آمینوترانسفراز، IgM تام سرم، لیزوزیم، انفجار تنفسی، در گروه‌های تیمار در مقایسه با شاهد بهبود معنی‌داری داشتند. در مواجهه با باکتری، درصد بازماندگی در تیمارهای ۰ (شاهد)، ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد به‌ترتیب ۲۳/۳، ۵۶/۷، ۶۶/۷ و ۷۳/۳ درصد بودند. نتایج این بررسی نشان داد که عصاره گیاه آقطی از توانائی بسیار خوبی در بهبود شاخص‌های بیوشیمیائی، ایمنی و مقاومت ماهیان قزل آلا دارد در برابر باکتری بیماریزا برخوردار بوده و بهترین دوز مصرفی ۰/۲۵ درصد است.

لغات کلیدی: آقطی، قزل آلای رنگین کمان، *Yersinia ruckeri*، پروتئین تام سرم، ایمنی، لیزوزیم

*نویسنده مسئول

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

مقدمه

قزل‌آلای رنگین‌کمان یکی از مهم‌ترین گونه‌های آزادماهیان پرورشی در جهان به‌شمار می‌رود به‌طوری‌که تولید جهانی آن طی دو دهه گذشته از حدود ۴۹۵ هزار تن در سال ۲۰۰۰ به بیش از ۹۵۹ هزار تن در سال ۲۰۲۲ افزایش یافته است (FAO, 2024). ایران با تولید ۲۰۸۸۰۰ تن در سال ۱۴۰۱، بیش از ۲۸ درصد تولید جهانی این ماهی در آب شیرین به‌خود اختصاص داده و طی دهه اخیر تولید آن از یک رشد ۱/۹ برابری برخوردار بوده و از ۱۲۶۰۰۰ تن در سال ۱۳۹۳ به ۲۳۷۷۱۰ تن در سال ۱۴۰۲ رسیده است (Iran Fisheries Organization, 2024) در آبزی‌پروری نوین، تمرکز بر پرورش متراکم و افزایش بهره‌وری است. اما این رویکرد با افت کیفیت شرایط محیطی همراه بوده که با ایجاد استرس و تضعیف ایمنی ماهیان، آنها در برابر بیماری‌های عفونی به‌خصوص عفونت‌های باکتریایی آسیب‌پذیر نموده است و صنعت پرورش قزل آلا را با خسارات اقتصادی جدی روبرو می‌سازد (Ramesh and Souissi, 2018; Zhou *et al.,* 2018). بیماری Yersiniosis یکی از مهم‌ترین بیماریهای عفونی مسبب تلفات در ماهیان قزل‌آلا در آب شیرین و قفس‌های دریائی است. این بیماری با نرخ بالای مرگ‌ومیر و ابتلا شناخته شده و تلفات زمانی که ماهیان در معرض عوامل استرس‌زا (کیفیت پایین آب، تراکم بالا) و جیره غذائی نامناسب قرار می‌گیرند، بسیار بیشتر است. علائم بالینی این بیماری شامل خونریزی و قرمزی در ناحیه دهان، فک‌ها و پایه باله‌ها، بیرون‌زدگی چشم‌ها همراه با لکه‌های خونی و تیرگی پوست است. این بیماری در تمامی سنین گزارش شده، ولی تلفات بیماری وابسته به سن است به‌طوری‌که بیماری در بچه ماهیان به صورت حاد و در ماهیان پرواری و مولدین به صورت تحت حاد تا مزمن بروز می‌کند. با توجه به تلفات بالای ناشی از این بیماری، کنترل و پیشگیری از آن برای کاهش خسارات اقتصادی، امری حیاتی تلقی می‌شود (Abdel-Latif *et al.,* 2025). در ایران، طبق گزارش سازمان دامپزشکی کشور، Yersiniosis پس از Streptococcosis دومین بیماری مهم باکتریایی در مزارع سردآبی است و از نظر میزان خسارت اقتصادی و شیوع، جایگاه بالایی دارد (Banihashemi *et al.,* 2025).

در حال حاضر، رایج‌ترین راه‌حل در کنترل بیماری‌های عفونی استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای شیمیایی است. استفاده گسترده از این ترکیبات برای کنترل بیماری‌های عفونی در آبزی‌پروری، با پیامدهای جدی روبرو است که شامل مقاومت دارویی باکتری‌ها، افزایش هزینه تولید، اختلال در فلور میکروبی آب و آسیب به محیط زیست، باقی‌مانده دارویی در گوشت ماهی و تهدید سلامت مصرف‌کنندگان و تجارت بین‌المللی و صادرات است. با وجود تلاش‌هایی چون بهبود کیفیت آب، ارتقاء ایمنی زیستی، استفاده از گله‌های عاری از بیماری‌های خاص (SPF)[1] و واکسیناسیون، وابستگی به آنتی‌بیوتیک‌ها همچنان پابرجاست و نیاز فوری به جایگزین‌های ایمن و پایدار احساس می‌شود (Lulijwa *et al.,* 2020; Bondad-Reantaso *et al.,* 2022; Caputo *et al.,* 2022). طی دهه‌های اخیر، استفاده از گیاهان دارویی و مشتقات آنها در صنعت آبزی‌پروری به عنوان جایگزینی مؤثر برای آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل خواص ضدمیکروبی، تحریک سیستم ایمنی، تقویت دفاع آنتی‌اکسیدانی، بهبود شاخص‌های رشد، خون، سرم و افزایش مقاومت ماهیان در برابر بیماری‌های عفونی (به‌خصوص عفونت‌های باکتریایی)، بسیار مورد توجه گسترده قرار گرفته است. شواهد علمی نشان می‌دهند که این ترکیبات به‌واسطه سهولت تهیه و مصرف، قیمت ارزان، فاقد عوارض جانبی برای سلامت عمومی و عدم آسیب به محیط زیست، یکی از راهکارهای کلیدی در کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری به‌شمار می‌آیند (Tadese *et al.,* 2021; Abdel-Latif *et al.,* 2025).

آقطی سفید (*Sambucus ebulus*) گیاهی با پیشینه‌ای کهن در پزشکی و تغذیه است. فرآورده‌های این گیاه قرن‌ها در اروپای غربی مورد استفاده بوده و در طب سنتی ایران نیز جایگاه ویژه‌ای داشته است به‌طوری‌که از تمام قسمت‌های آن (برگ، گل، میوه و ریزوم)، برای درمان

1 - Specific pathogen free

انواع بیماری‌ها بهره گرفته می‌شد. این گیاه در کشورهای بالکان به‌ویژه بلغارستان، رومانی و ترکیه، بسیار ارزشمند است و امروزه در تولیدات دارویی این کشورها کاربرد دارد (Tasinov *et al.,* 2013). این گیاه به صورت کاملاً وحشی در مناطق مرطوب و نیمه مرطوب شمال ایران به‌ویژه استان‌های مازندران، گلستان و گیلان، رشد می‌کند. زیستگاه طبیعی آن شامل حاشیه شهرها، جاده‌ها، راه‌آهن، بوته‌زارها، جنگل‌ها و رودخانه‌ها بوده و در شرایط نیمه‌سایه یا نور مستقیم خورشید قابل رشد است. این گیاه به آلودگی‌های محیطی و باد شدید مقاوم است و از طریق ریزوم خزنده و منشعب خود به‌راحتی تکثیر می‌شود. بی‌نیازی به کشت صنعتی و فراوانی آن در زیستگاه‌های طبیعی، موجب شده است که تهیه و استفاده از این گیاه در ایران از نظر اقتصادی مقرون‌به‌صرفه باشد (Amini *et al.,* 2019; Kaya *et al.,* 2019). وجود ترکیبات متنوعی چون انواع کربوهیدرات‌ها، فیبرها، ویتامین‌ها، مواد معدنی و ترکیبات زیست‌فعال (آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و گلیکوزیدها)، ارزش دارویی بالایی به این گیاه بخشیده است. همچنین مقادیر بالای اسید کلروژنیک، اسید اورسولیک، لکتین‌ها و پروتئین‌های ضدریبوزومی (ابولین و ابولیتین) به آن اثرات ضدسرطانی قابل‌توجهی داده‌اند. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که عصاره برگ و سایر بخش‌های گیاه دارای اثرات ضدمیکروبی قوی بوده و از توانایی مقابله با باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک (MAR)[1] برخوردار است. غنی بودن این گیاه از ترکیبات فلاونوئیدی، آن را به گزینه‌ای ارزشمند برای تولید داروهای ضدعفونی‌کننده و جایگزین طبیعی برای آنتی‌بیوتیک‌ها تبدیل کرده است (Jabbari *et al.,* 2017; Kaya *et al.,* 2019). گیاهان دارویی و معطر حاوی طیف گسترده‌ای از ترکیبات زیست فعال (آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، ساپونین‌ها، اسانس‌ها، رزین‌ها، اولئورزین‌ها، سسکوئی‌ترپن، لاکتون‌ها، روغن‌ها و رنگدانه‌ها)، هستند. اما متأسفانه استفاده از این ترکیبات طبیعی و ارزشمند به دلیل طعم ناخوشایند، فراهمی زیستی کم، تبخیر شدن و حساسیت به دما، اکسیداسیون و اثرات مخرب اشعه ماوراء بنفش بر آنها و نیز ناپایداری در داخل بدن محدودیت در استفاده دارند. یکی از راهکارهای مناسب برای غلبه بر این مسائل، ریزپوشانی کردن مواد فعال گیاهی است. از این‌رو، می توان از فناوری ریزپوشانی برای به دست آوردن محصولات گیاهی با ویژگی‌های مطلوب استفاده کرد. تکنیک‌های ریزپوشانی مواد گیاهی و سایر محصولات طبیعی به طور گسترده در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی استفاده می شود. ریزپوشانی به عنوان فناوری تعریف می‌شود که در آن مواد در حالت جامد، مایع یا گاز (که هسته نامیده می‌شود.) در یک دیواره یا ماتریس از مواد پلیمری (که دیوار یا پوسته نامیده می‌شود.)، محبوس می‌شوند (Mudrić *et al.,* 2018). مواد ایده‌آل برای ریزپوشانی باید ویژگی‌هایی چون سازگاری خوب، عدم واکنش پذیری با هسته، افزایش دوام، قیمت ارزان، قابلیت دسترسی بالا، توانائی رهاسازی کنترل‌شده در محیط‌های خاص (دمای بالا یا محیط اسیدی)، انعطاف‌پذیری، نفوذناپذیری و پایداری باشند. عمده ترکیباتی که برای این کار به فراوانی مورد استفاده قرار می‌گیرند عبارتند از نشاسته اصلاح شده، صمغ عربی، بتا گلوکان، ژلاتین، مالتودکسترین، اینولین یا مخلوطی از دو یا چند عدد آنهاست (Huang and Zhou, 2019). هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی اثرات عصاره هیدروالکلی کپسوله شده با ژلاتین گیاه آقطی سفید بر شاخص‌های ایمنی، خون، سرم و مقاومت در برابر باکتری *Yersinia ruckeri* بود.

مواد و روش کار

آماده‌سازی عصاره

برگ گیاه آقطی سفید (*S. ebulus*) که پیش‌تر در مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان سمنان تأیید هویت شده بود از منطقه صفرآباد (۵ کیلومتری شهرستان ساری) برداشت گردید. پس از خشک‌سازی در سایه به مدت دو هفته، برگ‌ها برای عصاره‌گیری به مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان سمنان ارسال شدند . فرآیند عصاره‌گیری با استفاده از روش اصلاح‌شده Pâvâloiu و همکاران (۲۰۲۰) و دستگاه سوکسله انجام شد. در این مرحله، ۵۰ گرم برگ پودر شده در کاغذ صافی بسته‌بندی و با ۵۰۰

[1] - Multi antibiotic resistance

میلی‌لیتر الکل ۷۰ درصد (نسبت ۱: ۱۰) در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ تا ۴ ساعت استخراج گردید. پس از پایان استخراج، عصاره با دستگاه روتاری تغلیظ و سپس به مدت ۳-۲ روز در آون ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. محصول نهایی به‌صورت ماده‌ای قیری و نسبتاً سفت به‌دست آمد. برای ریزپوشانی، ابتدا ۴ گرم ژلاتین در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد گرم شد. پس از خنک‌سازی محلول تا ۴۵ درجه، ۱ گرم عصاره به آن افزوده و مخلوط حاصل با دستگاه هموژنایزر (اولتراورتکس) در سرعت ۱۹۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۰ دقیقه و فشار ۴۰ میلی‌پاسکال هموژن گردید. فرآیند خشک‌سازی و کپسولاسیون با استفاده از روش فریز درایر در دمای ۵۰-درجه سانتی‌گراد و تحت خلأ انجام شد. در ادامه، بازده تولید (EY)[1] و راندمان کپسولاسیون (EE)[2] مورد ارزیابی قرار گرفت. برای محاسبه EY، نسبت جرم میکروکپسول نهایی به مجموع جرم مواد اولیه (عصاره و ژلاتین) محاسبه شد. برای تعیین EE، مقدار عصاره محصور شده در محصول نهایی با استفاده از استخراج با هگزان و اندازه‌گیری اسپکتروفتومتری پس از حل‌کردن ۲۰ میلی‌گرم نمونه در آب مقطر، تعیین گردید (Shu *et al.,* 2006).

آماده‌سازی جیره غذائی ماهیان و تیماربندی

در این مرحله، ابتدا مقادیر مورد نظر عصاره کپسوله براساس تیمار بندی با استفاده از ترازوی دیجیتال (با دقت ۰/۰۱) توزین گردید. مقادیر توزین شده به طور مجزا در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شده و بعد از مخلوط شدن با استفاده از شیکر (برای تسریع در روند ایجاد محلول یکنواخت) بر جیره تجاری (GF شرکت ۲۱ بیضا، ایران) به صورت یکنواخت اسپری شد. سپس غذا به مدت ۲۴ ساعت تا خشک شدن کامل در دمای آزمایشگاه قرار گرفت و در کیسه‌های پلاستیکی جمع‌آوری شده و تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. تهیه جیره برای همه تیمارها به صورت هفتگی انجام شد. تعداد ۲۸۰ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۱۱/۵۵±۵۹/۲ گرم از شهرستان قائم‌شهر خریداری شده و پس از انتقال به سالن پرورش پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، در ۱۲ تانک فایبرگلاس ۲۰۰۰ لیتری (با حجم آب ۱۸۰۰ لیتر) (برای هر تیمار دو ونیرو و در هر ونیرو ۳۳ عدد ماهی) به صورت تصادفی توزیع شدند. تعویض آب روزانه به میزان ۴۰-۳۰ درصد انجام گرفت. شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب طی دوره پرورش شامل: اکسیژن محلول (۰/۶±۷/۸ میلی گرم در لیتر)، دما (۱/۲±۱۴/۲ درجه سانتی‌گراد)، pH (۱/۴±۷/۰) بود. پیش از آغاز آزمایش، ماهیان پس گروه‌بندی به مدت دو هفته نگهداری و با جیره تجاری GF1 (شرکت ۲۱ بیضا، ایران) تغذیه شدند. پس از پایان دوره سازگاری، ماهیان چهار تیمار با دو تکرار به شرح ذیل تقسیم‌بندی شدند (Hossaini Shekrabi *et al*., 2021; Ghiasi *et al.,* 2023):

تیمار ۱: جیره فاقد عصاره آقطی (شاهد)(C)

تیمار ۲: جیره حاوی ۰/۱درصد عصاره (۱ گرم در کیلو گرم جیره)

تیمار ۳: جیره حاوی ۰/۲۵درصد عصاره (۲/۵ گرم در کیلو گرم جیره)

تیمار ۴: جیره حاوی ۰/۵درصد عصاره (۵ گرم در کیلو گرم جیره)

ماهیان در تیمارهای مختلف به مدت ۸ هفته با جیره‌های غذایی فرموله‌شده تغذیه شدند. در آغاز دوره، وزن ماهیان در هر تکرار اندازه‌گیری شد تا اختلاف وزنی بین تانک‌ها به حداقل برسد. میزان غذای روزانه بر اساس وزن بدن، دمای آب و جدول تغذیه قزل‌آلای رنگین‌کمان، ۲/۵-۲ درصد وزن بدن تنظیم گردید. وعده‌های غذایی به صورت جداگانه توزین و در ظروف مخصوص قرار داده شد. تغذیه دستی در سه نوبت (صبح، ظهر، عصر) انجام گرفت. نظافت تانک‌ها هر سه روز یک‌بار و تعویض آب به صورت روزانه انجام شد (Adel *et al.,* 2016).

[1]- Encapsulation yield
[2] - Encapsulation efficiency

نمونه‌برداری و انجام آزمایش‌ها

در انتهای هفته‌های ۴ و ۸ آزمایش، پس از ۲۴ ساعت قطع غذا، از هر تیمار ۸ ماهی (از هر تکرار ۴ ماهی) به صورت تصادفی انتخاب و پس از بیهوشی با پودر گل‌میخک، خون‌گیری از ساقه دمی آنها انجام شد. نمونه‌های خون به دو گروه میکروتیوب‌های حاوی و فاقد هپارین انتقال داده شد (Ghiasi *et al.,* 2023). از نمونه‌های خون هپارینه برای بررسی شاخص‌های خونی شامل شمارش گلبول‌های قرمز (RBC) و سفید (WBC)، هماتوکریت (Hct)، هموگلوبین (Hb)، حجم متوسط گلبولی (MCV)، میزان هموگلوبین گلبولی (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبولی (MCHC) محاسبه شد. شمارش گلبول‌های قرمز و سفید به روش دستی و لام هموسیتومتر انجام شد. اندازه گیری هماتوکریت با روش میکروهماتوکریت و هموگلوبین با روش سیانومت هموگلوبین انجام شد. محاسبه MCV، MCH و MCHC براساس فرمول انجام شد (Blaxhall and Daisley, 1973). شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون (نوتروفیل، لنفوسیت) نیز با تهیه گسترش خون و رنگ آمیزی با رنگ گیمسا طبق روش توصیه شده Lee و همکاران (۱۹۹۸) صورت گرفت. برای سنجش انفجار تنفسی (تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن)، از محلول هنکس، لومینول و ردامین در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده شد و قرائت با دستگاهLuminoscan Ascent (Finland,Thermo) انجام گرفت (بینائی و همکاران، ۱۴۰۱). نمونه‌های خون غیرهپارینه برای سنجش شاخص‌های سرمی و ایمنی شامل پروتئین تام (TP)، آلبومین (Alb)، کلسترول (Chol)، تری‌گلیسرید (Tri)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، IgM تام و فعالیت لیزوزیم به‌کار رفت. ابتدا نمونه‌های خون سانتریفیوژ و پس از جداسازی سرم، سرم‌ها تا زمان آزمایش در دمای ۲۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سنجش TP،Alb، Chol، Tri، ALT، AST، IgM تام سرم با استفاده از کیت‌های تجاری (شرکت پارس آزمون، تهران) و دستگاه اتوآنالایزر (مدل Belgium,Eurolyser) انجام شد (Binaii *et al.*, 2014). برای تعیین میزان فعالیت لیزوزیم سرم از روش Ellis (۱۹۹۰) استفاده شد. سطح فعالیت لیزوزیم به روش کدورت سنجی و با استفاده از سوسپانسیون باکتری *Micrococcus lysodeikticus* (سیگما، آمریکا) و آنزیم مورآمیداز صورت گرفت.

مواجهه با باکتری *Y. ruckeri*

پس از پایان دوره آزمایش (پایان هفته ۸ آزمایش) ماهیان تیمارهای مختلف با باکتری *Y. ruckeri* (شماره MT968739) که از ماهیان بیمار استان مازندران جداسازی شده بود، مواجهه داده شدند. به منظور ایجاد عفونت، پس از بیهوشی، به ۳۰ ماهی از هر تیمار، ۰/۱ میلی‌لیتر باکتری با غلظت $1/2\times10^{7}$ CFU/ml به صورت داخل‌صفاقی تزریق شد. قبل از تزریق ماهیان به سالن مواجهه منتقل شدند و طی ۱۴ روز پس از تزریق، تلفات روزانه ثبت گردید. برای جلوگیری از انتشار باکتری، آب تانک‌ها پس از سیفون، کلرینه و دفع شد. در پایان، درصد بازماندگی با استفاده از فرمول استاندارد محاسبه شد (Ghiasi *et al.,* 2023).

روش تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

در ارزیابی نتایج، تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۲۰ و با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) و مقایسه میانگین بین گروه‌های مختلف بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncans Multiple- range test) در سطح اطمینان ۹۵ درصد تعیین گردید ($p<۰/۰۵$).

نتایج

ریزپوشانی

در ارزیابی نتایج ریزپوشانی عصاره مشخص گردید که میزان راندمان تولید محصول (EY) ۹۲ درصد و میزان کارائی (EE) ۷۸ درصد بود.

نتایج خونشناسی

نتایج تجزیه‌وتحلیل خون شناسی در هفته ۴ و ۸ آزمایش در جدول ۱ ارائه شده است. ارزیابی نتایج در پایان هفته ۴ و ۸ آزمایش نشان داد که میانگین شمارش گلبول‌های قرمز، میزان هموگلوبین، هماتوکریت، MCV، MCH و MCHC تفاوت معنی‌داری در بین گروه شاهد و تیمارها نداشت ولی مقدار عددی آنها در گروه‌های تیمار نسبت به شاهد در هفته ۴ و ۸ بیشتر بود (p >۰/۰۵). میزان گلبول‌های سفید در هفته ۴ و ۸ در تیمار ۰/۲۵ درصد افزایش معنی‌دار در مقایسه با شاهد داشت (p <۰/۰۵). این در حالی بود که دو تیمار دیگر (۰/۱ و ۰/۵ درصد) به رغم افزایش عددی تفاوت معنی داری با شاهد نداشتند (p>۰ /۰۵).

جدول ۱: مقایسه میانگین شاخص‌های خون‌شناسی ماهیان قزل آلا تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره کپسوله آقطی در پایان هفته ۴ و ۸ آزمایش. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند. حروف غیرمشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنادار در سطح ۵ درصد است (p<۰/۰۵).

Table 1: Comparison of mean hematological indices in rainbow trout fed different levels of encapsulated elderberry extract at the end of weeks 4 and 8 of the experiment. Data represent as mean ± SE. Data in the same columns with different superscriptare significantly different (p<0.05).

Neutrophil (٪)	Lymphocyt (٪)	MCHC (٪)	MCH (pg)	MCV (fL)	Hb (gdL^{-1})	Hct (٪)	WBC (mm^{-3} cell)	RBC (10^6 cell mm^{-3})	Treatment	Sampelling Time
6.00 ± 2.22 ab	93.83 ± 1.86 ab	16.42 ± 0.44 a	46.77 ± 1.91 a	285.53±5.28 a	5.97 ± 0.29 a	36.83 ± 0.91 a	7950.00 ± 3.05 a	1.27 ± 0.53 a	0.1	End of 4 Week
8.00 ± 1.86 b	92.00 ± 1.45 a	16.50 ± 0.33 a	46.58 ± 1.57 a	284.48±6.41 a	6.12 ± 0.23 a	36.67 ± 0.88 a	9866.67 ± 650.47b	1.30 ±a 0.32	0.25	
4.17 ±1.44 ab	95.83 ±1.42 ab	16.10 ± 0.43 a	46.80 ± 1.61 a	292.17±6.36 a	6.01 ± 0.18 a	37.00 ± 0.93 a	7566.67 ±609.19 a	1.27 ± 0.60 a	0.5	
1.50 ± 0.43 a	98.50 ± 1.90 b	16.10 ± 0.47 a	47.48 ± 2.91 a	295.20±5.51 a	5.89 ± 0.17 a	36.00 ± 1.12 a	6666.67 ±672.64 a	1.25 ± 0.38 a	C	
7.67 ± 1.61 ab	92.33 ± 1.61 ab	16.78 ± 0.28 a	42.15 ± 0.66 a	251.35±3.77 a	5.86 ± 0.25 a	36.50 ± 1.99 a	7916.67 ±256.15 a	1.32 ± 0.06 a	0.1	End of 8 Week
11.17 ± 2.07 b	88.83 ± 2.07 a	17.06 ± 0.35 a	43.43 ± 1.10 a	254.53±3.60 a	5.54 ± 0.21 a	37.67 ± 2.04 a	9333.33 ±257.77 b	1.28 ± 0.07 a	0.25	
9.83 ± 3.80 b	90.17 ±3.80 a	16.65 ± 0.27 a	43.68 ± 1.73 a	262.00±7.77 a	5.44 ± 0.24 a	32.83 ± 1.93 a	8166.66 ±190.90 a	1.43 ± 0.13 a	0.5	
1.83 ± 0.48 a	98.17 ± 1.17 b	14.77 ± 0.38 a	43.07 ± 1.74a	291.95±6.58 a	5.31 ± 0.28 a	32.67 ± 1.93 a	7533.33 ±295.15 a	1.20 ± 0.03 a	C	

RBCگلبول قرمز، WBC :گلبول سفید، Hct: هماتوکریت، Hb: هموگلوبین

RBC, Red blood cells; WBC, White blood cells; Htc, Hematocrit; Hb, Hemoglobin concentration

درصد نوتروفیل در نتایج ارزیابی شمارش تفریقی گلبول‌های سفید در تیمار ۰/۲۵ درصد در هفته ۴ و در تیمار ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد در هفته ۸ افزایش معنی‌دار در مقایسه با شاهد داشتند. در همین زمینه، میزان لنفوسیت در تیمار ۰/۲۵ درصد در هفته ۴ و در تیمار ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد در هفته ۸ کاهش معنی داری در مقایسه با شاهد داشت.

نتایج بیوشیمیایی سرم

نتایج تجزیه‌وتحلیل بیوشیمی خون در هفته ۴ و ۸ آزمایش در جدول ۲ ارائه شده است. ارزیابی نتایج شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون نشان داد که میزان آنزیم AST و آلبومین در پایان هفته ۴ و ۸ آزمایش از تفاوت معنی داری بین تیمارها و شاهد برخوردار نبودند (p>۰/۰۵). هرچند از نظر عددی گروه‌های تیمار در مقایسه با شاهد شرایط بهتری داشتند. در هفته ۴ آزمایش میزان کلسترول در بین گروه‌های تیمار و شاهد تغییر معنی‌داری را نشان نداد (p>۰/۰۵) ولی از نظر عددی میزان این شاخص در تیمارها کمتر از شاهد بود. ولی در پایان هفته ۸، این شاخص در تمام تیمارها کاهش معنی داری در مقایسه با شاهد داشت (p<۰/۰۵). میزان تری‌گلیسرید در پایان هفته ۴ و ۸ در گروه‌های تیمار بطور معنی‌داری کمتر از شاهد بود (p<۰/۰۵). مقادیر پروتئین تام سرم در دو تیمار ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد افزایش معنی داری در هفته ۴ و ۸ در مقایسه با شاهد داشت (p ۰/۰۵ >). میزان ALT نیز در پایان هفته ۴ و ۸ در تمام تیمارها بطور معنی‌داری کمتر از شاهد بود (p <۰/۰۵).

نتایج ایمنی شناسی سرم

ارزیابی نتایج ایمنی شناسی نشان داد که میزان IgM تام سرم درپایان هفته ۴ و ۸ آزمایش در گروه‌های تیمار به طور معنی‌داری بیشتر از شاهد بود (p <۰/۰۵) (شکل ۱). مقدار لیزوزیم در هفته ۴ آزمایش در تیمار ۰/۲۵ درصد بطور معنی‌داری بیشتر از شاهد بود (p <۰/۰۵) ولی در دو تیمار دیگر در مقایسه با شاهد افزایش عددی وجود داشت (p >۰/۰۵). نتایج این شاخص در پایان هفته ۸ آزمایش افزایش معنی دار در دو تیمار ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد در مقایسه با شاهد داشت (p <۰/۰۵) و تیمار ۰/۱ درصد افزایش عددی در مقایسه با شاهد نشان داد (p>۰ /۰۵) (شکل ۲). نتایج انفجار تنفسی (تولید رادیکال آزاد اکسیژن) در پایان هفته ۴ آزمایش نشان داد که میزان این شاخص در تیمارها بطور معنی‌داری بیشتر از شاهد بوده است (p<۰/۰۵) و در بین تیمارها، تیمار ۰/۲۵ درصد بطور معنی‌داری بالاترین میزان را داشت (p<۰/۰۵). در هفته ۸ میزان این شاخص در تمام تیمارها بطور معنی‌داری بیشتر از شاهد بود (p<۰/۰۵) (شکل ۳).

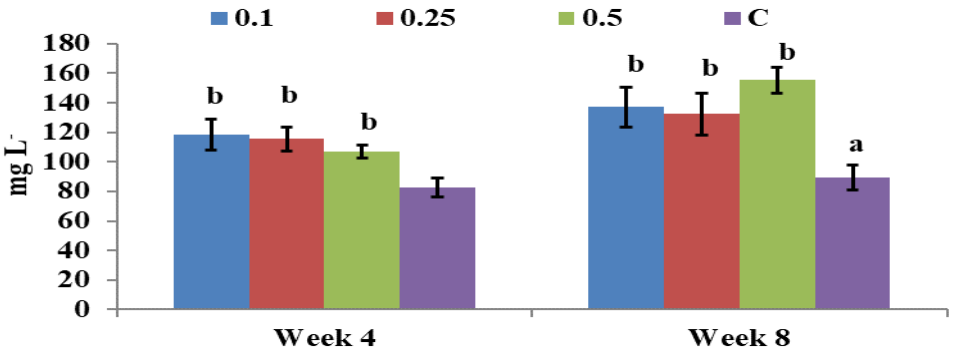
جدول ۲: مقایسه میانگین شاخص‌های بیوشیمیائی سرم ماهیان قزل آلا تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره کپسوله آقطی در پایان هفته ۴ و ۸ آزمایش. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند. حروف غیرمشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنادار در سطح ۵ درصد است (p<۰/۰۵).

Table 2: Comparison of mean serum biochemical indices in rainbow trout fed different levels of encapsulated elderberry extract at the end of weeks 4 and 8 of the experiment. Data represent as mean ± SE. Data in the same columns with different superscriptare significantly different (p <0.05).

AST $IUdL^{-1}$	ALT $IUdL^{-1}$	Alb gdL^{-1}	TP gdL^{-1}	Tri $mgdL^{-1}$	Chol $mgdL^{-1}$	Treatment	Sampelling Time
255.45±9.29 ^{a}	5.02 ± 0.39 ^{a}	2.30 ± 0.78 ^{a}	4.27 ± 0.24 ^{ab}	210.33±17.49 ^{a}	222.75±6.978 ^{a}	0.1	End of 4 Week
235.47±8.31 ^{a}	5.53 ± 0.27 ^{a}	2.60 ± 0.73 ^{a}	4.75 ± 0.18 ^{b}	217.87±12.58 ^{a}	223.60±13.75 ^{a}	0.25	
227.83±11.93 ^{a}	5.28 ± 0.28 ^{a}	2.58 ± 0.91 ^{a}	4.63 ± 0.18 ^{b}	205.88±15.68 ^{a}	226.13±15.258 ^{a}	0.5	
267.55±9.76 ^{a}	6.60 ± 0.55 ^{b}	2.37 ± 0.99 ^{a}	4.05 ± 0.23 ^{a}	273.08±13.15 ^{b}	264.65±15.66 ^{a}	C	
225.02±13.07 ^{a}	4.13 ± 0.29 ^{a}	2.58 ± 0.19 ^{a}	4.25 ± 0.58 ^{a}	209.17±12.72 ^{a}	198.80±7.36 ^{a}	0.1	End of 8 Week
208.72±20.07 ^{a}	4.87 ± 0.58 ^{a}	2.55 ± 0.15 ^{a}	6.17 ± 0.37 ^{b}	199.05±8.30 ^{a}	206.57±6.91 ^{a}	0.25	
190.75±19.03 ^{a}	4.25 ± 0.38 ^{a}	2.80 ± 0.15 ^{a}	5.35 ± 0.57 ^{b}	211.18±16.88 ^{a}	198.80±11.98 ^{a}	0.5	
236.17±20.93 ^{a}	6.43 ± 0.44 ^{b}	2.38 ± 0.28 ^{a}	4.05 ± 0.35 ^{a}	304.27±14.04 ^{b}	238.70±8.91 ^{b}	C	

Chol: کلسترول، Tri: تریگلیسرید، TP: پروتئین تام سرم، Alb: آلبومین، ALT: آلانین آمینو ترانسفراز، AST: آسپارتات آمینو ترانسفراز

Chol, Cholesterol; Tri, Triglysrid; TP, Total protein; Alb, Albumin; ALT, Alanine aminotransferase; AST, Aspartate aminotransferase

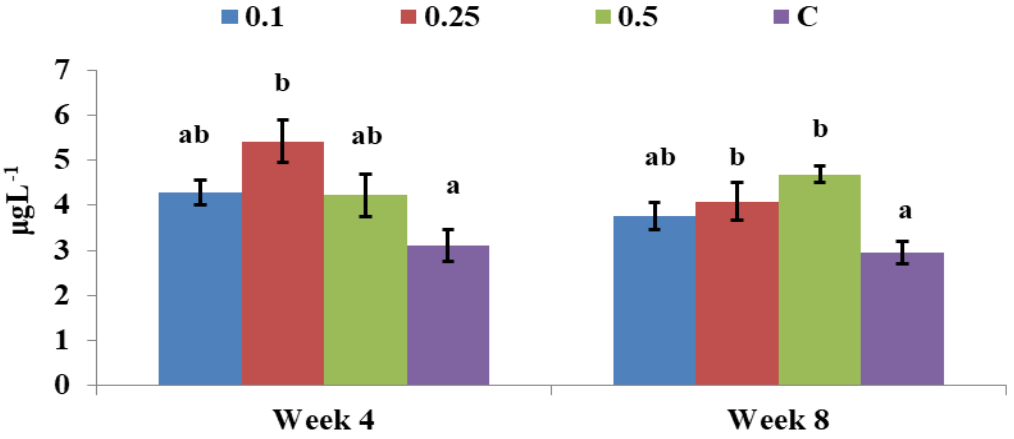


شکل ۱: مقایسه میانگین میزان IgM تام ماهیان قزل آلا تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره کپسوله آقطی در پایان هفته ۴ و ۸ آزمایش. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند. حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنادار در سطح ۵ درصد است (p<۰/۰۵).

Figure 1: Comparison of total IgM levels in rainbow trout fed different levels of encapsulated elderberry extract at the end of weeks 4 and 8 of the experiment. Data represent as mean ± SE. Data in the same columns with different superscriptare significantly different (p<0.05).

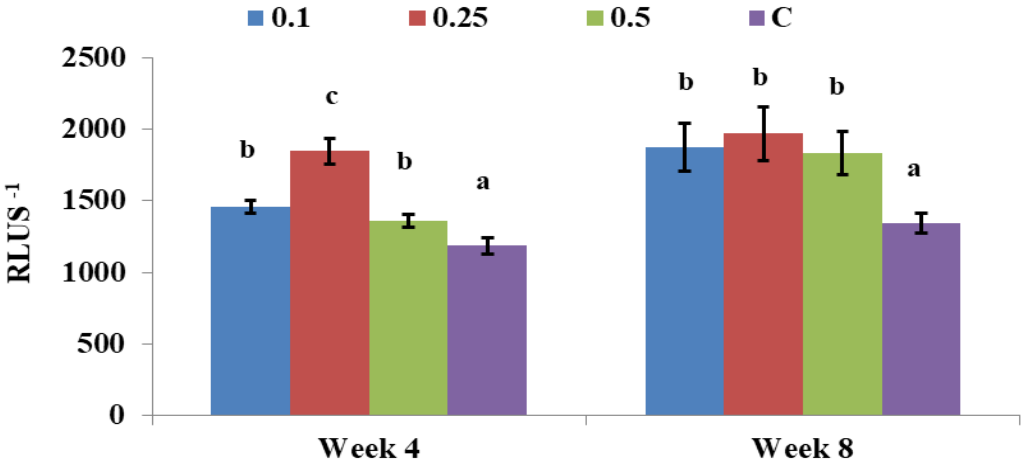
نتایج مواجهه با باکتری *Y. ruckeri*

نتایج حاصل از مواجهه ماهیان با باکتری *Y. ruckeri* نشان داد که بالاترین درصد بازماندگی مربوط به گروه‌های تیمار بوده است بطوریکه درصد بازماندگی مربوط به تیمارهای ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد به ترتیب ۵۶/۶۷، ۷۳/۳۳ و ۶۶/۶۷ درصد بود در حالیکه میزان بازماندگی در گروه شاهد ۲۳/۳۳ درصد بود (شکل ۴).



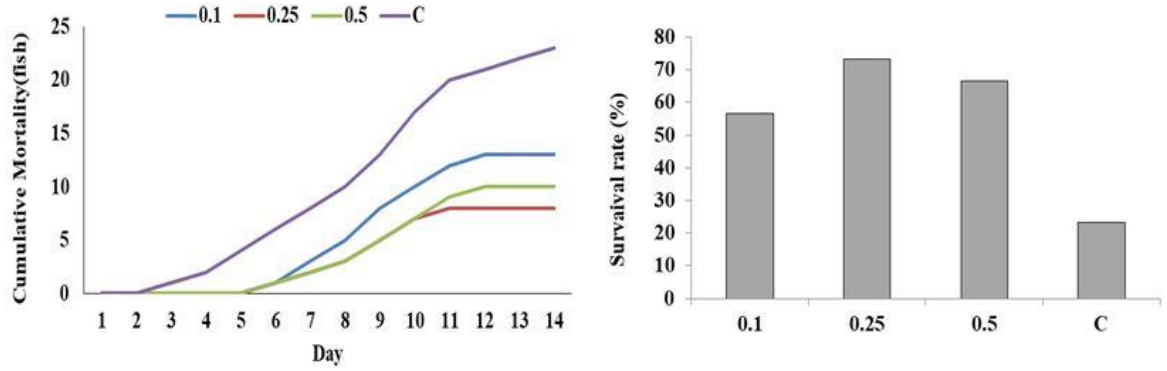
شکل ۲: مقایسه میانگین میزان لیزوزیم تام ماهیان قزل آلا تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره کپسوله آقطی در پایان هفته ۴ و ۸ آزمایش. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند. حروف غیرمشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنادار در سطح ۵ درصد است (p<۰/۰۵).

Figure 2: Comparison of mean lysozyme levels in rainbow trout fed different levels of encapsulated elderberry extract at the end of weeks 4 and 8 of the experiment. Data represent as mean ± SE. Data in the same columns with different superscriptare significantly different (p<0.05).



شکل ۳: مقایسه میانگین میزان انفجار تنفسی (تولید رادیکال آزاد اکسیژن) ماهیان قزل آلا تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره کپسوله آقطی درپایان هفته ۴ و ۸ آزمایش. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند. حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنادار در سطح ۵ درصد است (p<۰/۰۵).

Figure 3: Comparison of mean respiratory burst activity in rainbow trout fed different levels of encapsulated elderberry extract at the end of weeks 4 and 8 of the experiment. Data represent as mean ± SE. Data in the same columns with different superscriptare significantly different (p<0.05).



شکل ۴: مقایسه درصد بقا (راست) و تلفات تجمعی (چپ) ماهیان قزل آلا شاهد و تیمار پس از مواجهه با باکتری *Yersinia ruckeri* در پایان هفته ۸ آزمایش

Figure 4: Comparison of survival rate (right) and cumulative mortality (left) in control and treated rainbow trout following exposure to *Yersinia ruckeri* at the end of week 8 of the experiment

بحث

در سال‌های اخیر، بهره‌گیری از گیاهان دارویی به عنوان راهکاری پایدار و طبیعی برای ارتقاء سلامت و افزایش مقاومت آبزیان، توجه بسیاری از پژوهشگران را به‌خود جلب کرده است. ترکیبات زیست‌فعال موجود در این گیاهان با تقویت سیستم ایمنی و کاهش استرس اکسیداتیو، موجب بهبود عملکرد فیزیولوژیک ماهیان می‌شوند. بنابراین، مطالعه حاضر به بررسی اثر تغذیه با عصاره ریزپوشانی شده گیاه آقطی (*S. ebulus*) بر شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی، ایمنی و بقاء ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرداخته است. ارزیابی شاخص‌های خونی نظیر تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت و اندیس‌های مرتبط (MCV، MCH، MCHC)، یکی از روش‌های معتبر برای سنجش وضعیت سلامت ماهیان به‌شمار می‌رود (Başusta, 2005). در این مطالعه، هرچند تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه‌های تیمار و شاهد مشاهده نشد، اما مقادیر عددی شاخص‌های خونی در تیمارها بیشتر بود. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که افزودن گیاهان دارویی چون علف هفت بند[1] (Adel *et al.,* 2020)، گشنیز[2] (Naderi Farsani *et al.,* 2019)، گل پنیرک[3] (Rashidian *et al.,* 2020)، سماق[4] (Gharaei *et al.,* 2020)، ترخون[5] (Gholamhosseini *et al.,* 2020)، اسانس پوست پرتقال (D – لیمونن) (Gültepe, 2020)، نعناپونه[6] (Heydari *et al.,* 2020)، فلفل گلدانی[7] (Firouzbakhsh *et al.,* 2021) و بلوط ایرانی یا بلوط زاگرس[8] (Ghafarifarsani *et al.,* 2021) به جیره غذایی ماهیان قزل‌آلا می‌تواند موجب بهبود شاخص‌های اریتروسیتی شوند. در مطالعه Ghiasi و همکاران (۲۰۲۳) مشخص شد که افزودن برگ خشک گیاه آقطی سفید (*S. ebulus*) به جیره‌ی غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به مدت ۸ هفته به‌ویژه در دوز ۰٫۵٪، موجب بهبود نسبی در شاخص‌های خونی گردید، هرچند این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار نبودند. اثرات مثبت احتمالی گیاهان دارویی بر شاخص‌های اریتروسیتی ممکن است ناشی از حضور ترکیبات مغذی مانند ویتامین C، آهن، افزایش جذب مواد از دستگاه گوارش و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی باشد که با جلوگیری از تخریب گلبول‌های قرمز، موجب افزایش طول عمر آنها می‌شوند (Binaii *et al.,* 2014; Adel *et al.,* 2016; Heydari *et al.,* 2020; Gharaei *et al.,* 2020; Rashidian *et al.,* 2020; Ghafarifarsani *et al.,* 2021). ارزیابی تعداد و

[1] *Polygonum minus*
[2] *Coriandrum sativum*
[3] *Malvae sylvestris*
[4] *Rhus coriaria*
[5] *Artemisia dracunculus*
[6] *Mentha longifolia*
[7] *Capsicum annuum*
[8] *Quercus brantii*

ترکیب گلبول‌های سفید نمایانگر وضعیت ایمنی ماهی است. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که گیاهان دارویی با خاصیت محرک ایمنی، می‌توانند موجب افزایش تعداد گلبول‌های سفید شوند (Elumalai *et al.,* 2020; Hoseinifar *et al.,* 2020). نتایج این بررسی نشان داد میزان گلبول‌های سفید در هفته ۴ و ۸ در تیمار ۰/۲۵ درصد افزایش معنی دار در مقایسه با شاهد داشت ولی در دو تیمار دیگر (۰/۱ و ۰/۵ درصد) به رغم افزایش عددی تفاوت معنی داری با شاهد نداشتند. یکی از مکانیسم‌های احتمالی مطرح در افزایش تعداد گلبول‌های سفید بعد از تجویز گیاهان داروئی، وجود ترکیبات فلاونوئیدی در آنهاست. مطالعات نشان داده است که این ترکیبات سیتوکین‌های مشتق از لنفوسیت‌های Th-1[1] مانند IL-2 (اینترلوکین ۲) و INFγ (اینترفرون گاما) را تعدیل می‌کنند. به عبارت دیگر، ترکیبات فلاونوئیدی ممکن است به عنوان بیوکاتالیست در تولید و افزایش گلبول‌های سفید به عنوان بخشی از ایمنی سلولی غیر اختصاصی عمل کنند (Nugroho *et al.,* 2019). با توجه به غنی بودن این گیاه از ترکیبات فلاونوئیدی (روتین، کوئرستین و کلروژنیک اسید) (Jabbari *et al.,* 2017)، این تاثیر بر افزایش گلبول‌های سفید را می‌توان به این موضوع مرتبط دانست. نوتروفیل‌ها از مهم‌ترین سلول‌های ایمنی در ماهیان استخوانی هستند که با خاصیت فاگوسیتوز و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، نقش مؤثری در مقابله با عوامل بیماری‌زا دارند. در شرایط عادی تعداد آنها کمتر از لنفوسیت‌هاست، اما در مواجهه با استرس یا عفونت افزایش می‌یابند (Kordon *et al.,* 2018). در مطالعه حاضر، درصد نوتروفیل در تیمارهای ۰/۲۵ درصد (هفته ۴) و ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد (هفته ۸) نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. در مطالعه Ghiasi و همکاران (۲۰۲۳) مصرف برگ خشک آقطی موجب افزایش معنی‌دار درصد نوتروفیل در تیمارهای ۵ و ۱۰٪ در هفته چهارم و در تمامی تیمارها در هفته ۸ شد. این افزایش احتمالاً ناشی از ترکیباتی مانند فلاونوئیدهای گلیکوزیدی و فیتواسترول‌ها (به‌ویژه β-سیتوسترول) است که با تحریک مهاجرت نوتروفیل‌ها از اندام‌های لنفاوی به خون، موجب تقویت پاسخ ایمنی می‌شوند (Akbay *et al.,* 2003; Shokrzadeh and Saeedi Saravi, 2010). فعالیت انفجار تنفسی و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، یکی از شاخص‌های کلیدی ایمنی ذاتی در ماهیان محسوب می‌شود که سلول‌هایی مانند نوتروفیل، مونوسیت، ماکروفاژ و لنفوسیت‌های B آن را به‌عهده دارند. این مکانیسم با شناسایی عوامل بیماری‌زا از طریق گیرنده‌های TLR فعال می‌شود و در نوتروفیل‌ها به صورت آزادسازی مستقیم در خون و در سایر سلول‌ها به‌صورت داخل سلولی عمل می‌کنند (Biller and Takahashi, 2018). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که مصرف گیاهان دارویی مختلف توانسته است، موجب تقویت این پاسخ ایمنی در ماهیان قزل‌آلا شود (Adel *et al.,* 2016; Saeidi Asl *et al.,* 2017; Altunoglu *et al.,* 2017; Tafi *et al.,* 2018; Uluköy *et al.,* 2018; Adel *et al.,* 2019; Gholamhosseini *et al.,* 2020; Gültepe, 2020; Heydari *et al.,* 2020). ارزیابی تاثیر برگ خشک گیاه آقطی بر میزان تولید رادیکال آزاد اکسیژن نشان داد که در هفته ۴ آزمایش افزایش معنی‌داری این شاخص در تیمارهای ۵ و ۱۰٪ وجود داشته است ولی در پایان هفته ۸ آزمایش میزان این شاخص در تمام تیمارها افزایش معنی‌دار در مقایسه با شاهد نشان داد (Ghiasi *et al.,* 2023). لیزوزیم یک آنزیم ایمنی ذاتی است که با تجزیه پیوندهای گلیکوزیدی در دیواره سلولی باکتری‌های گرم‌مثبت، موجب نابودی آنها می‌شود. در باکتری‌های گرم‌منفی نیز پس از تخریب لایه بیرونی، به طور غیرمستقیم باعث مرگ سلولی می‌گردد. این آنزیم با تحریک فاگوسیتوز نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها نقش مهمی در دفاع ایفاء می‌کند. نوتروفیل‌ها، تولیدکننده اصلی لیزوزیم در ماهی هستند و این پروتئین عمدتاً در کلیه قدامی، آبشش، پوست، دستگاه گوارش، تخم و مخاط بدن ماهیان یافت می‌شود. همچنین لیزوزیم در جلوگیری از انتقال عمودی برخی عوامل بیماری‌زای باکتریایی نقش دارد (Firdaus-Nawi and Zamri-Saad, 2016; Grishin *et al.,* 2020). نتایج نشان داد،

[1] - T helper1

مقدار لیزوزیم در تیمار ۰/۲۵ درصد در هفته ۴ و در تیمارهای ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد در هفته ۸ به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود. در هفته ۴ آزمایش با برگ خشک آقطی، تفاوت معنی‌داری در عملکرد لیزوزیم مشاهده نشد، اما در هفته ۸ تیمارهای ۵ و ۱۰٪ افزایش معنی‌داری در این شاخص نشان دادند (Ghiasi *et al.,* 2023). در ماهی کپور، عصاره هیدروالکلی آقطی موجب افزایش معنی‌دار این شاخص در تمامی تیمارها به‌ویژه در دوزهای ۰/۵ و ۱ درصد شد (Hosseini Shekarabi *et al.*, 2021). همچنین تغذیه ماهیان کپور با عصاره میوه گیاه آقطی با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ درصد جیره، بیان ژن مولد لیزوزیم را افزایش می‌دهد. در همین تحقیق بیان شده است که ترکیبات فنولی (کورستین، کامفرول، میریستین و روتین)، می‌توانند با تحریک سلول‌های تولیدکننده لیزوزیم، موجب تقویت عملکرد ایمنی غیر اختصاصی شوند (Zare *et al.,* 2023). ایمونوگلوبولین‌ها از اجزاء کلیدی سیستم ایمنی ماهیان هستند و IgM رایج‌ترین نوع آن در ماهیان استخوانی است. این ایمونوگلوبولین به صورت تترامر یا منومر در سرم و ترشحات موکوسی قابل شناسایی است و با فعال‌سازی سلول‌های T و B افزایش می‌یابد. IgM در ایمنی ذاتی و اکتسابی نقش دارد و از طریق فعال‌سازی کمپلمان، لیز دیواره پاتوژن‌ها و تسهیل فاگوسیتوز، به حذف عوامل بیماری‌زا کمک می‌کند (Firdaus-Nawi and Zamri-Saad, 2016; Mashoof and Criscitiello, 2016). نتایج این بررسی نشان داد که میزان IgM تام سرم در هفته‌های ۴ و ۸ در تیمارها به طور معنی‌داری بیشتر از شاهد بود. مطالعه Ghiasi و همکاران (۲۰۲۳) نشان داد که برگ خشک آقطی موجب افزایش معنی‌دار IgM تام سرم در تیمار ۵٪ در هفته ۴ و در تمامی تیمارها (۲/۵، ۵ و ۱۰ درصد)، در هفته ۸ شد. همچنین عصاره آقطی در ماهی کپور نیز باعث افزایش معنی‌دار IgM در تمام دوزها شد (Hosseini Shekarabi *et al.,*2021). ترکیبات فعال گیاهان دارویی (پلی‌پپتیدهای ضدمیکروبی، پلی‌ساکاریدها، فنول‌ها، اسانس‌ها و ساپونین‌ها)، با سمیت پایین، می‌توانند عملکرد ایمونوگلوبولین‌ها را در مقابله با عوامل بیماری‌زا تقویت کنند (Ahmadifar *et al.,* 2021). پروتئین تام سرم شامل آلبومین و گلوبولین‌هاست. آلبومین در کبد ساخته می‌شود و دارای نقش حامل ترکیبات و تنظیم فشار اسمزی است. میزان آن تحت تأثیر تحرک، تغذیه، فصل و بلوغ جنسی بوده و در ماهیان پرتحرک بیشتر است (Andreeva, 2010). گلوبولین‌ها اجزاء اصلی سیستم ایمنی ماهی بوده و شامل ایمونوگلوبولین‌ها، کمپلمان، لیزوزیم و سایر پروتئین‌های ایمنی هستند (Biller and Takahashi *et al.,* 2018). این دو بخش نقش مکملی در سلامت و ایمنی ماهیان ایفاء می‌کنند. در مطالعه حاضر، میزان پروتئین تام سرم در دو تیمار ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد افزایش معنی‌داری در هفته ۴ و ۸ در مقایسه با شاهد داشت. مصرف برگ گیاه آقطی در جیره غذایی ماهی قزل‌آلا موجب افزایش معنی‌دار پروتئین تام سرم در هفته‌های ۴ و ۸ و افزایش آلبومین در تمام تیمارها شد (Ghiasi *et al.,* 2023). سایر گیاهان دارویی مانند گل قاصدک (Hosseini Shekarabi *et al.,* 2021) آلوئه‌ورا (Alishahi *et al.,* 2017)، نعناپونه (Heydari *et al.,* 2020) و گشنیز (Naderi Farsani *et al.,* 2019) نیز اثر مشابهی در افزایش پروتئین تام و نشان داده‌اند. باتوجه به این‌که پروتئین تام در برگیرنده گلبولین‌ها (بخش عمده پروتئین‌های دخیل در ایمنی) و آلبومین (حامل ترکیبات و تنظیم فشار اسمزی)، افزایش این شاخص می‌تواند نشانگر بهبود سلامت و تقویت ایمنی ماهی در اثر مصرف گیاهان دارویی باشد (Wang *et al.,* 2016; Awad and Awaad, 2017; Alagawany *et al.,* 2020). آنزیم‌های ALT و AST از شاخص‌های بیوشیمیایی مهم برای ارزیابی سلامت کبد و وضعیت فیزیولوژیک ماهیان هستند و افزایش آنها نشانه آسیب کبدی است (Wangkahart *et al.,* 2022). در نتایج مطالعه حاضر، تفاوت معنی‌داری در میزان AST در پایان هفته ۴ و ۸ آزمایش بین تیمارها و شاهد وجود نداشت و میزان ALT در پایان هفته ۴ و ۸ در تمام تیمارها به طور معنی‌داری کمتر از شاهد بود. مصرف برگ گیاه آقطی کاهش معنی‌دار ALT در ماهیان قزل‌آلا در هفته‌های ۴ و ۸، بدون تغییر معنی‌دار در AST

سبب شد (Ghiasi *et al.,* 2023). همچنین تجویز اسید کلروژنیک (Ghafarifarsani *et al.,* 2023) و عصاره لاله مردابی حاوی کوئرستین و روتین (Li *et al.,* 2020) موجب کاهش ALT و AST در مدل‌های حیوانی شده است. به نظر می‌رسد، وجود ترکیبات فلاونوئیدی (اسید کلروژنیک، کوئرستین و روتین) (Jabbari *et al.,* 2017)، سبب اثرات محافظتی این گیاه بر سلول‌های کبدی شده باشد. کلسترول، ترکیبی حیاتی در ساختار غشاء سلولی و سنتز هورمون‌های استروئیدی است که عمدتاً در کبد تولید می‌شود و مقدار آن تحت تأثیر تغذیه، جنسیت و وضعیت رشد جنسی قرار دارد. تری‌گلیسیریدها نیز لیپیدهای ذخیره‌ای اصلی بدن هستند و سطح سرمی آنها بازتابی از مصرف چربی در رژیم غذایی است (Pastorino *et al.,* 2022). در این بررسی، میزان کلسترول در پایان هفته ۴ تفاوت معنی‌داری بین تیمار و شاهد نشان نداد، ولی در پایان هفته ۸ کاهش معنی‌داری در تیمارها نسبت به شاهد نشان داد. همچنین سطح تری‌گلیسیرید در هر دو مرحله نمونه‌برداری در تیمارها به طور معنی‌داری کاهش یافت. مصرف برگ گیاه آقطی موجب کاهش معنی‌دار کلسترول در هفته‌های ۴ و ۸ و کاهش تری‌گلیسیرید در هفته ۸ در تیمارهای ۵ و ۱۰٪ شد (Ghiasi *et al.,* 2023). همچنین یافته‌های مشابهی با مصرف آقطی در انسان (Ivanova *et al.,* 2014) و عصاره ریحان و ترخون بر ماهی قزل‌آلا گزارش شده است (Gholamhosseini *et al.,* 2020; Pastorino *et al.,* 2022). مکانیسم‌های این اثرات به فلاونوئیدهایی مانند اسید کلروژنیک، کوئرستین و روتین موجود در این گیاه نسبت داده می‌شود که با خاصیت چربی‌زدایی و آنتی‌اکسیدانی، در تنظیم لیپیدهای سرمی نقش دارند (Ngugi *et al.,* 2015). *Yersinia ruckeri* عامل بیماری دهان قرمز در قزل‌آلاست که با ظهور بیوتیپ مقاوم O_2، اثربخشی برخی واکسن‌های رایج را کاهش داده است. تولید واکسن‌های چندظرفیتی با سویه‌های بومی و استفاده از گیاهان دارویی برای تقویت ایمنی، راهکارهای مکمل مؤثر در کنترل بیماری هستند (Kumar *et al.,* 2017; Soltani *et al.,* 2018). در مطالعه حاضر، درصد بازماندگی پس از مواجهه با *Y. ruckeri* در تیمارهای شاهد،۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد به‌ترتیب ۲۳/۳۳، ۵۶/۶۷، ۷۳/۳۳ و ۶۶/۶۷ درصد بود. در بسیاری از مطالعات انجام شده با مصرف جیره‌ای گیاهانی چون نعناع فلفلی، علف هفت بند، آلوئه ورا، ترخون، اسانس پوست پرتقال (D – لیمونن)، نعناپونه، گزنه، آلوی اروپائی، سیاه دانه، مرزنگوش و موسیر، افزایش بازماندگی ماهیان قزل‌آلا پس از مواجهه با باکتری *Y. ruckeri* گزارش شده است (Adel *et al.,* 2016; Saeidi Asl *et al.,* 2017; Altunoglu *et al.,* 2017; Uluköy *et al.,* 2018; Adel *et al.,* 2019; Gholamhosseini *et al.,* 2020; Gültepe, 2020; Heydari *et al.,* 2020). در تجویز جیره‌ای برگ گیاه آقطی نیز میزان بازماندگی ماهیان پس از مواجهه با باکتری *Y. ruckeri* بیش از ۷۰ درصد بود (Ghiasi *et al.,* 2023). به‌نظر می‌رسد، نتایج به‌دست آمده از شاخص‌های ایمنی (IgM تام سرم، میزان فعالیت لیزوزیم، تولید رادیکال آزاد اکسیژن، پروتئین تام سرم، تعداد گلبول‌های سفید و درصد نوتروفیل)، در گروه‌های تیمار در مقایسه با شاهد که در واقع، حاکی از بهبود سیستم ایمنی ماهیان است، موجب افزایش مقاومت و بازماندگی ماهیان تیمار در مقایسه با شاهد شده باشد.

نتایج تحقیق حاضر، نشان داد که افزودن عصاره ریزپوشانی شده برگ گیاه آقطی سفید به جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، با بهبود شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی، ایمنی و افزایش درصد بقاء، نقش مؤثری در ارتقاء سلامت عمومی و افزایش مقاومت در برابر بیماری Yersiniosis ایفاء می‌کند. همچنین کاهش معنی‌دار ALT، کلسترول و تری‌گلیسیرید، همراه با افزایش آلبومین و پروتئین تام سرم، بیانگر اثرات محافظتی و تنظیمی ترکیبات زیست‌فعال موجود در آقطی به‌ویژه فلاونوئیدها بر عملکرد کبد و تقویت سیستم ایمنی ماهی است. این یافته‌ها، ضرورت بهره‌گیری از گیاهان دارویی را به عنوان راهکاری مکمل و پایدار در مدیریت سلامت آبزیان، در کنار استفاده از واکسن‌های رایج، برجسته می‌سازد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از پروژه خاص تحت عنوان ارزیابی تاثیر عصاره هیدروالکلی (آزاد و ریزپوشانی شده) برگ گیاه آقطی (*S. ebulus*) بر شاخص‌های رشد، ایمنی و مقاومت قزل آلای رنگین کمان در مواجهه با *Y. ruckeri* با شماره مصوب ۲-۷۶-۱۲-۱۰۱-۰۰۱۲۹۲ بوده است. بدین‌وسیله از کلیه عزیزانی که در موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور و پژوهشکده اکولوژی دریای خزر زمینه‌های علمی و آزمایشگاهی این تحقیق را فراهم کرده‌اند، صمیمانه سپاسگزاری می‌نماییم.

منابع

Abdel-Latif, H.M.R., Citarasu, T., Turgay, E., Yilmaz, E., Yousefi, M., Hosseini Shekarabi, P., Ahmadifar, E., Nowosad, J., Kucharczyk, D., and Yilmaz, S., 2025. Control of yersiniosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: Innovative non-antibiotic feed-based strategies – a review. *Annals of Animal Science*, 25(3):793–814. DOI:10.2478/aoas-2024-0087

Adel, M., Pourgholam, R., Zorriehzahra, J. and Ghiasi, M., 2016. Hemato-Immunological and biochemical parameters, skin antibacterial activity, and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following the diet supplemented with *Mentha piperita* against *Yersinia ruckeri*. *Fish and Shellfish Immunology*, 55:267-273. DOI:10.1016/j.fsi.2016.05.040

Adel, M., Dawood, M.A.O., Shafiei, S., Sakhaie, F. and Hosseini Shekarabi, S.P., 2019. Dietary polygonum minus extract ameliorated the growth performance, humoral immune parameters, immune-related gene expression and resistance against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture,* 519:734-738. DOI:10.1016/j.aquaculture.2019.734738

Ahmadifar, E., Pourmohammadi Fallah, H., Yousefi, M., Dawood, M.A.O., Hoseinifar, S.H., Adineh, H., Yilmaz, S., Paolucci, M. and Doan, H.V., 2021.The gene regulatory roles of herbal extracts on the growth, immune system, and reproduction of fish. *Animals*, 11:2167. DOI:10.3390/ani11082167

Akbay, P., Basaran, A. A., Undeger, U. and Basaran, N., 2003. *In vitro* immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioica* L. *Phytotherapy Research*, 17:34–37. DOI:10.1002/ptr.1068

Alagawany, M., Farag, M. R., Salah, A.S. and Mahmoud, M.A., 2020. The role of oregano herb and its derivatives as immunomodulators in fish. *Reviews in Aquaculture*, 12(4):2481-2492. DOI:10.1111/raq.12453

Alishahi, M., Tulaby Dezfuly, Z., Mesbah, M. and Mohammadian, T., 2017. Effects of *Aloe vera* crude extract on growth performance and some hemato-immunological indices of *Oncorhynchus mykiss* in farm scale. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 11(4):383-393. DOI:10.22059/ijvm.2017.231790.1004806

Altunoglu, Y.C., Bilen, S., Ulu, F. and Biswas, G., 2017. Immune responses to methanolic extract of black cumin (*Nigella sativa*) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 67:103-109. DOI:10.1016/j.fsi.2017.06.002

Amini, E., Nasrollahi, F., Sattarian, A., Isazadeh-Araei, M., Habibi, M., 2019. Systematic and molecular biological study of *Sambucus* L. (Caprifoliaceae) in Iran. *Thaiszia – Journal of Botany*, 29(2):133-150.

Andreeva, A.M., 2010, Structure of fish serum albumins. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 46:135–144.

Awad, E. and Awaad, A., 2017. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 67:40-54. DOI:10.1016/j.fsi.2017.05.034

Banihashemi, E.A., Gholamhosseini, A., Soltanian, S. and Banaee, M., 2025. Investigation of growth, biochemical and immunity indicators of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to *Yersinia ruckeri*. *Journal of Aquaculture Development*, 18(4):102-116. (In Persian)

Başusta, G.A., 2005. Fish hematology and hematological techniques. In: Karatas, M. (ed.) Research techniques in fish biology. Nobel Publications, Ankara, pp. 275–300.

Biller, J.D. and Takahashi, L.S., 2018. Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 90(4):3403-3414 DOI:10.1590/0001-3765201820170730.

Binaii, M., Ghiasi, M., Farabi, S. M. V., Pourgholam, R., Fazli, H., Safari, R., Alavi, SE., Taghavi, MJ. and Bankehsaz, Z. 2014. Biochemical and hemato-immunological parameters in juvenile beluga (*Huso huso*) following the diet supplemented with nettle (*Urtica dioica*). *Fish and Sellfish Immunology*, 36:46-51. DOI:10.1016/j.fsi.2013.10.001.

Blaxhall, P.C. and Daisley, W., 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*. 5: 771-81.

Bondad-Reantaso, M.G., MacKinnon, B., Karunasagar, I., Fridman, S., Alday-Sanz, V., Brun, E., Groumellec, M.L., Li, A., Surachetpong, W., Karunasagar, I., Hao, B., Dall'Occo, A., Urbani, R. and Caputo, A., 2022. Review of alternatives to antibiotic use in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 15(4):1421-1451. DOI:10.1111/raq.12786

Caputo, A., Bondad-Reantaso, M.G., Karunasagar, I., Hao, B., Gaunt, P., Verner-Jeffreys, D., Fridman, S. and Dorado-Garcia, A., 2022. Antimicrobial resistance in aquaculture: A global analysis of literature and national action plans. *Reviews in Aquaculture*, 15:568–578. DOI:10.1111/raq.12741

Ellis, A.E., 1990. Lysozyme assay. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Robertson, B.S. and Van Muiswinkel, W.R. (eds) Techniques in fish immunology. SOS Publications, Fair Haven, NJ, USA. pp. 101–103.

Elumalai, P., Kurian, A., Lakshmi, S., Faggio, C., Esteban, M.A. and Ringø, E., 2020. Herbal immunomodulators in aquaculture. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture,* 7(29):33-57 DOI:10.1080/23308249.2020.1779651

FAO, 2024. The state of world fisheries and aquaculture 2024 – blue transformation in action. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Available at: https://www.fao.org/family-farming/detail/en/c/1696402/ (accessed on 12 November 2025). 266 P.

Firdaus-Nawi, M. and Zamri-Saad, M., 2016. Major components of fish immunity: a review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 39(4):393–420.

Firouzbakhsh, F., Haghparast, S. and Memarzadeh, M.R., 2021. Study on the effects of red pepper (*Capsicum annuum*) extract on immune responses and resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles against *Yersinia ruckeri*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 20(6):1573 - 1588. DOI:10.22092/ijfs.2021.350686.0

Ghafarifarsani, H., Rashidian, G., Sheikhlar, A., Naderi Farsani, M., Hoseinifar, S.H. and Van Doan, H., 2021. The use of dietary oak acorn extract to improve haematological parameters, mucosal and serum immunity, skin mucus bactericidal activity, and disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*, 52(6):1–10. DOI:10.1111/are.15101

Ghafarifarsani, H., Nedaei, S., Hoseinifar, S.H. and Van Doan, H., 2023. Effect of different levels of chlorogenic acid on growth performance, immunological responses, antioxidant defense, and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Hindawi Aquaculture Nutrition*, 19:3679002. DOI:10.1155/2023/3679002

Gharaei, A., Shafiei, M., Mirdar Harijani, J., Hassanein, P. and Arshadi, A., 2020. Immune responses and haematological parameters changes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under effects of dietary administration of sumac (*Rhus coriaria* L.). *Journal of Agricultural Science and Technology*, 22(1):173-186.

Ghiasi, M. Binaii, M. Mirmazlomi, S., Adel, M. and Khara. H., 2023. Effect of dwarf elder (*Sambucus ebulus*) to improve hemato-immunological and biochemical parameters and resistance against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 22(4): 871-892. DOI:10.22092/ijfs.2023.129996

Gholamhosseini, A., Hosseinzadeh, S., Soltanian, S., Banaee, M. and Sureda, A., Rakhshaninejad, M., Heidari, A.A. and Anbazpour, H., 2020. Effect of dietary supplements of *Artemisia dracunculus* extract on the haemato-immunological and biochemical response, and growth performance of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*, 52(5):1–13. DOI:10.1111/are.15062

Grishin, A.V., Karyagina, A.S., Vasina, D.V., Vasina, I.V., Gushchin, V.A. and Lunin, V.G., 2020. Resistance to peptidoglycan-degrading enzymes. *Critical Reviews in Microbiology*, 46:703–726. DOI:10.1080/1040841X.2020.1825333

Gültepe, N., 2020. Protective effect of D-limonene derived from orange peel essential oil against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout. *Aquaculture Report*, 18(5):100417. DOI: 0.1016/j.aqrep.2020.100417

Heydari, M., Firouzbakhsh, F. and Paknejad, H., 2020. Effects of *Mentha longifolia* extract on some blood and immune parameters, and disease resistance against yersiniosis in rainbow trou. *Aquaculture*, 515:734586. DOI:10.1016/j.aquaculture.2019.734586

Hoseinifar, S.H., Sun, Y.Z., Zhou, Z., Van Doan, H., Davies, S.J. and Harikrishnan, R., 2020. Boosting immune function and disease bio-control through environment-friendly and sustainable approaches in finfish

aquaculture: herbal therapy scenarios. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 28:303-321. DOI:10.1080/23308 249.2020.1731420

Hosseini Shekarabi, S. P., Shahrokni, S., Nazari, K., Shamsaie Mehrgan, M. and Toutounchi Mashhour, S., 2021. Effects of dietary dwarf elder (*Sambucus ebulus*) extract on growth performance, survival rate and immunological responses of common carp (*Cyprinus carpio*). *Iranian Scaitific Fisheris Journal*, 30(1):83-92. DOI:10.22092/ISFJ.2021.123980 (In Persian).

Hosseini Shekarabi, S.P., Mostafavi, Z.S., Shamsaie Mehrgan, M. and Rajabi Islami, H., 2021. Dietary supplementation with dandelion (*Taraxacum officinale*) flower extract provides immunostimulation and resistance against *Streptococcus iniae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 118:180-187. DOI:10.1016/j.fsi.2021.09.004

Huang, Y. and Zhou, W., 2019. Microencapsulation of anthocyanins through two-step emulsification and release characteristics during in vitro digestion. *Food Chemistry*, 278:357–363. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.11.073

Iran Fisheries Organization, 2024. Iran fisheries statistical yearbook 1403. Iran Fisheries Organization, Tehran, Iran. 300 P.

Ivanova, D., Tasinov, O. and Kiselova-Kaneva, Y. 2014. Improved lipid profile and increased serum antioxidant capacity in healthy volunteers after *Sambucus ebulus* L. fruit infusion consumption. *International Journal of Food Science and Nutritiona*, 65(6):740-744.

Jabbari, M., Daneshfard, B., Emtiazy, M., Khiveh, A. and Hashempur, M.H., 2017. Biological effects and clinical applications of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L): A review. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 22(4):996-1001.

Kaya, Y., Kelil Haji, E., Arvas, Y.E. and Aksoy, H.M., 2019. *Sambucus ebulus* L.: Past, present and future. paper presented at the 2nd international conference on Biosciences and medical engineering (ICBME2019), Langkawi, Malaysia, 2155(1):020030. March 2019. DOI:10.1063/1.5125534

Kordon, A.O., Karsi, A. and Pinchuk, L., 2018. Innate immune responses in fish: Antigen presenting cells and professional phagocytes. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 18:1123-1139. DOI:10.4194/1303-2712-v18_9_11

Kumar, G., Humme, K., Welch, T.J., Razzazi-Fazeli, E. and El-Matbouli, M., 2017. Global proteomic profiling of *Yersinia ruckeri* strains, *Veterinary Resarch*, 25(278): 357-363 DOI:10.1186/s13567-017-0460-3.

Lee, R.G., Foerster, J., Jukens, J., Paraskevas, F., Greer, J.P., Rodgers, G.M., 1998. Wintrobe'sclinical hematology. 10th ed. New York: Lippincott Williams and Wilkins.pp: 2600

Li, C., He, Y., Yang, Y., Gou, Y., Li, S., Wang, R., Zeng, S. and Zhao, X., 2020. Antioxidant and inflammatory effects of *Nelumbo nucifera* Gaertn. Leaves. *Hindawi Aquaculture Nutrition*, 28:8375961. DOI:10.1155/2021/8375961

Lulijwa, R., Rupia, E.J. and Alfaro, A.C., 2020. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental

risks: a review of the top 15 major producers. *Reviews in Aquaculture*, 12:640–663. DOI:10.1111/raq.12344.

Mashoof, S. and Criscitiello, M.F., 2016, Fish Immunoglobulins. *Biology,* 5:45. DOI:10.3390/biology5040045

Mudrić, J., Ibrić, S. and Đuriš, J., 2018. Microencapsulation methods for plants biologically active compounds - a review. *Lekovite Sirovine*, 38:62-67. DOI:10.5937/leksir1838062M

Naderi Farsani, M., Hoseinifar, S.H., Rashidian, G., Ghafari Farsani, H., Ashouri, G. and Van Doan, H., 2019. Dietary effects of *Coriandrum sativum* extract on growth performance, physiological and innate immune responses and resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Yersinia ruckeri*, *Fish and Shellfish Immunology,* 91:233-240. DOI:10.1016/j.fsi.2019.05.031

Ngugi, C.C., Oyoo-Okoth, E., Mugo-Bundi, J., Sagwe Orina, P., Jepyegon Chemoiwa, E. and Aloo, P.A., 2015. Effects of dietary administration of stinging nettle (*Urtica dioica*) on the growth performance, biochemical, hematological and immunological parameters in juvenile and adult Victoria Labeo (*Labeo victorianus*) challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 44(2):533-541. DOI:10.1016/j.fsi.2015.03.025

Nugroho, R.A., Hardi, E.H., Sari, Y.P. and Rudianto, R. A., 2019. Growth performance and blood profiles of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) fed leaves extract of *Myrmecodia tuberosa*. *Nusantara Bioscience*, 11(1):89-96. DOI:10.13057/nusbiosci/n110115

Pastorino, P., Bergagna, S., Vercelli, C., Pagliasso, G., Dellepiane, L., Renzi, M., Barbero, R., Re, G., Elia, A.C. and Dondo, A., 2022. Changes in serum blood parameters in farmed rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss*) fed with diets supplemented with waste derived from supercritical fluid extraction of sweet basil (*Ocimum basilicum*). *Fishes*, 7(2):89. DOI:10.3390/fishes70200

Păvăloiu, R.D., Sháat, F., Bubueanu, C., Deaconu, M., Neagu, G., Sháat, M., Anastasescu, M., Mihailescu, M., Matei, C., Nechifor, G. and Berger, D., 2020. Polyphenolic extract from *Sambucus ebulus* L. leaves free and loaded into lipid vesicles. *Nanomaterials*, 10(1):56. DOI:10.3390/nano10010056.

Ramesh, D. and Souissi, S., 2018. Antibiotic resistance and virulence traits of bacterial pathogens from infected freshwater fish, *Labeo rohita*. *Microbial Pathogenesis*, 116:113-119. DOI:10.1016/j.micpath.2018.01.019

Rashidian, G., Kajbaf, K., Prokić, M.D. and Faggio, C., 2020. Extract of common mallow (*Malvae sylvestris*) enhances growth, immunity, and resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings against *Yersinia ruckeri* infection. *Fish and Shellfish Immunology,* 96: 254-261.DOI:10.1016/j.fsi.2019.12.018

Saeidi Asl, M.R., Adel, M., Caipang, C.M.A and Dawood, M.A.O., 2017. Immunological responses and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles following dietary administration of stinging nettle (*Urtica dioica*), *Fish and Shellfish Immunology*, 71:230-238. DOI:10.1016/j.fsi.2017.10.016

Shokrzadeh, M. and Saeedi Saravi, S.S., 2010. The chemistry, pharmacology and clinical properties of *Sambucus ebulus*: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2):095-103. DOI:10.5897/JMPR09.026

Shu, B., Yu, W., Zhao, Y. and Liu, X., 2006. Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 76:664–669. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2005.05.062

Soltani, M., Lymbery, A., Song, S.K. and Hosseini Shekarab, P., 2018. Adjuvant effects of medicinal herbs and probiotics for fish vaccines. *Reviews in Aquaculture*, 11(4): 1325-1341. DOI:10.1111/raq.12295.

Tadese, D.A., Song, C., Sun, C., Liu, B., Liu, B., Zhou, Q., Xu, P., Ge, X., Liu, M., i Xu, X., Tamiru, M., Zhou, Z., Lakew, A. and Kevin, N.T., 2021. The role of currently used medicinal plants in aquaculture and their action mechanisms: a review. *Review in Aquaculture*, 14(2):816 -847. DOI:10.1111/raq.12626.

Tafi, A.A., Meshkini, S., Tukmechi, A., Alishahi, M. and Noori, F., 2018. Immunological and antistreptococcal effects of *Salvia officinalis* and *Aloe vera* extracts supplemented feed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi Journal*, 24(3):365-370. DOI:10.9775/kvfd.2017.18973

Tasinov, O., Kiselova-Kaneva, Y. and Ivanova, D., 2013. *Sambucus ebulus* from traditional medicine to recent studies. *International Journal of Medical Science*: 45:36-42.

Uluköy, G., Kubilay, A., Didinen, B.I., Metin, S., Altun, S., Diler, Ö, Mammadov, R. and Dulluç, A., 2018. Immunostimulant effects of geophyte plant extract on non-specific defence mechanisms of rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research*, 4(1):36-41. DOI:10.17216/LimnoFish.376404

Wang, E., Chen, X., Wang, K., Wang, J., Chen, D., Geng, Y., Lai, W. and Wei, X., 2016. Plant polysaccharides used as immunostimulants enhance innate immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* infection in fish, *Fish and Shellfish Immunology*, 59:196-202. DOI:10.1016/j.fsi.2016.10.039

Wangkahart, E., Wachiraamonloed, S., Lee, P.T., Subramani, P.A., Qi, Z. and Wang, B., 2022. Impacts of Aegle marmelos fruit extract as a medicinal herb on growth performance, antioxidant and immune responses, digestive enzymes, and disease resistance against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 120:402-410. DOI:10.101B/j.fsi.2021.11.015

Zare, M., Esmaeili, N., Paolacci, S. and Stejskal, V., 2023. Nettle *(Urtica dioica*) Additive as a growth promoter and immune stimulator in fish. *Aquaculture Nutrition*, 21:8261473. DOI:10.1155/2023/8261473

Zhou, L., Limbu, S., Shen, M, Zhai, W., Qiao, F., He, A., Du, Z.Y. and Zhang, M., 2018. Environmental concentrations of antibiotics impair zebrafish gut health. *Environmental Pollution*, 235:245-254. DOI:10.1016/j.envpol.2017.12.073