Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics

Online ISSN: 2345-427X
Print ISSN: 2345-4288

Oral administration of *Moringa oleifera* leaf powder on some hematological and serum parameters of rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*) before and after exposure to *Aeromonas hydrophila*

Narjes Sanchooli[1], Hamed Paknejad[*2], Mohammad Sudagar[3], Seyed Pezhman Hosseini Shekarabi[4], Abdolali Rahdari[5]

1. Dept. of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: sanchoolin@yahoo.com
2. Corresponding Author, Dept. of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: hkolangi@gmail.com
3. Dept. of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: sudagar.2015@gmail.com
4. Dept. of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. E-mail: hosseini.pezhman@yahoo.com
5. Department of Aquatic Sciences, Hamoun International Wetland Institute, Research Institute of Zabol, Zabol, Iran. E-mail: rahdari67@gmail.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 12.24.2022
Revised: 01.16.2023
Accepted: 01.24.2023

Keywords:
Aeromonas hydrophila,
Blood biochemistry,
Hematology,
Liver enzymes,
Moringa

ABSTRACT

To investigate the effect of oral administration of Moringa leaf powder, 360 rainbow trout (35.5 ± 0.5 g) were randomly divided into 12 tanks. The fish were fed with Moringa leaf powder levels of 0(control), 1, 2.5 and 5% for eight weeks. After the challenge test with *Aeromonas hydrophila* bacteria, the activity of alanine transaminase and aspartate aminotransferase enzymes in the 2.5% treatment significantly decreased compared to the control treatment ($P<0.05$). The optimal amount of Moringa leaf powder inclusion in the diet for aspartate aminotransferase enzyme based on polynomial regression analysis was 1.97% and 3.33% respectively for the periods before and after the challenge with bacteria. There was no significant change in the amount of alkaline phosphatase enzyme, the number of red blood cells, hemoglobin and hematocrit between all treatments compared to the control treatment in both periods before and after the challenge with bacteria ($P<0.05$). The amount of glucose showed a significant decrease in all treatments, especially in the 2.5% treatment compared to the control treatment in both stages ($P<0.05$). Regression analysis showed the optimal value of Moringa for this factor, 3.40% and 2.77%, respectively, before and after the challenge with bacteria. According to the results, moringa leaf powder at 2.5% can help reduce stress and possibly improve the general health of this fish. The appropriate dose was obtained from 1.97% to 3.4% based on polynomial regression model for serum biochemical parameters such as glucose and aspartate aminotransferase enzyme.

Cite this article: Sanchooli, Narjes, Paknejad, Hamed, Sudagar, Mohammad, Hosseini Shekarabi, Seyed Pezhman, Rahdari, Abdolali. 2023. Oral administration of *Moringa oleifera* leaf powder on some hematological and serum parameters of rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*) before and after exposure to *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 12 (3), 29-47.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2023.20918.1734
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا آنلاین: ۲۳٤٥-٤۲۷X
شاپا چاپی: ۲۳٤٥-٤۲۸۸

تجویز خوراکی پودر برگ مورینگا (*Moringa oleifera*) بر برخی پارامترهای خون‌شناسی و سرمی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhyncus mykiss*) قبل و بعد از مواجهه با *آئروموناس هیدروفیلا* (*Aeromonas hydrophila*)

نرجس سنچولی[۱]، حامد پاک‌نژاد*[۲]، محمد سوداگر[۳]، سید پژمان حسینی شکرابی[٤]، عبدالعلی راهداری[٥]

۱. گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: sanchoolin@yahoo.com

۲. نویسنده مسئول، گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: hkolangi@gmail.com

۳. گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: sudagar.2015@gmail.com

٤. گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. رایانامه: hosseini.pezhman@yahoo.com

٥. گروه علوم آبزیان، پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون، پژوهشگاه زابل، زابل، ایران. رایانامه: rahdari67@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۱/۱۰/۰۳
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۱/۱۰/۲٦
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۱۱/۰٤

واژه‌های کلیدی:
آنزیم کبدی،
آئروموناس هیدروفیلا،
بیوشیمی خون،
مورینگا،
هماتولوژی

چکیده

جهت بررسی اثر تجویز خوراکی پودر برگ مورینگا تعداد ۳٦۰ ماهی قزل‌آلا (۰/۵ ± ۳۵/۵ گرم) به طور تصادفی در ۱۲ مخزن تقسیم شدند. ماهی‌ها با سطوح پودر برگ مورینگا به میزان صفر(شاهد)، ۱، ۲/۵ و ۵ درصد به مدت هشت هفته تغذیه شدند. پس از آزمایش چالش با باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*، فعالیت آنزیم‌های آلانین ترانس آمیناز و آسپارتات آمینو ترانسفراز در تیمار ۲/۵ درصد به‌طور قابل‌توجهی نسبت به تیمار شاهد کاهش نشان داد (P<۰/۰۵). مقدار بهینه گنجاندن پودر برگ مورینگا در جیره برای آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز بر اساس آنالیز رگرسیون چند جمله‌ای به ترتیب مقادیر ۱/۹۷ و ۳/۳۳ درصد برای مراحل قبل و بعد از چالش با باکتری بود. تغییر معنی‌داری در مقدار آنزیم آلکالین فسفاتاز، تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت بین همه تیمارها در مقایسه با تیمار شاهد در هر دو مرحله قبل و بعد از چالش با باکتری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). مقدار گلوکز در همه تیمارها به ویژه در تیمار ۲/۵ درصد در مقایسه با تیمار شاهد در هر دو مرحله کاهش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). آنالیز رگرسیون مقدار بهینه مورینگا را برای این فاکتور به ترتیب ۳/٤۰ و ۲/۷۷ درصد برای قبل و بعد از چالش با باکتری نشان داد. با توجه به نتایج، پودر برگ مورینگا به میزان ۲/۵ درصد می‌تواند به کاهش استرس و احتمالاً بهبود سلامت عمومی این ماهی کمک کند. دوز مناسب

براساس مدل رگرسیون چندجمله‌ای برای پارامترهای بیوشیمیایی سرم مانند گلوکز و آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز از ۱/۹۷ تا ۳/٤ درصد به‌دست آمد.

استناد: سنچولی، نرجس، پاک‌نژاد، حامد، سوداگر، محمد، حسینی شکرابی، سید پژمان، راهداری، عبدالعلی (۱۴۰۲). تجویز خوراکی پودر برگ مورینگا (*Moringa oleifera*) بر برخی پارامترهای خون‌شناسی و سرمی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhyncus mykiss*) قبل و بعد از مواجهه با *آئرومونا هیدروفیلا* (*Aeromonas hydrophila*). *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۲ (۳)، ۴۷-۲۹.
DOI: 10.22069/japu.2023.20918.1734

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به‌دلیل رشد سریع، پرورش آسان، تقاضای زیاد در بازار و تحمل شرایط نامساعد محیطی یکی از رایج‌ترین گونه‌های ماهی سردآبی پرورشی در ایران و جهان است (۱). به‌منظور پرورش پایدار ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ایجاد یک رژیم غذایی مصنوعی مقرون به صرفه برای دستیابی به رشد سریع و حفظ سلامت ماهی ضروری است. در سال‌های اخیر با تولید ماهی در سیستم‌های متراکم، ماهی‌ها در معرض عوامل استرس‌زا مانند ازدحام بیش از حد، حمل‌ونقل، جابجایی، درجه‌بندی و کیفیت پایین آب قرار گرفته که به کاهش سلامت ماهی و به شیوع بیماری در این شرایط کمک می‌کند و در نهایت منجر به کاهش رشد، تلفات و کاهش تولید ماهی شده است (۲ و ۳). به‌منظور کاهش هزینه‌های تولید، صنعت آبزی‌پروری تجاری استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی را برای پیشگیری و درمان بیماری‌ها ترجیح داده است (٤). با توجه به توسعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مشکلات زیست‌محیطی ناشی از استفاده مواد شیمیایی و تجمع مواد شیمیایی در بافت ماهی، بررسی روش‌های مدیریتی مناسب ضروری است. بنابراین، یک رویکرد جایگزین برای آبزی‌پروری پایدار، استفاده از گیاهان دارویی به عنوان جایگزین مواد شیمیایی به منظور حفظ سلامت عمومی حیوان و انسان است (۵ و ٦). محصولات گیاهی و عصاره‌های آن‌ها مقرون به صرفه‌تر و از نظر زیست‌محیطی ایمن‌تر از آنتی‌بیوتیک‌ها هستند (۷). ترکیبات فعال زیستی موجود در گیاهان می‌توانند مصرف خوراک و هضم غذا را در ماهی تحریک کنند، اثرات مخرب شرایط استرس‌زا را کاهش داده و پاسخ‌های ایمنی را فعال کنند (۸ و ۹). در اکثر مطالعات، آزمایش‌های چالشی به‌عنوان روشی برای آزمایش مقاومت به بیماری در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های گیاهی استفاده می‌شود، اطلاعات بیوشیمیایی، هماتولوژیک و پارامترهای ایمونولوژیک پس از عفونت معمولاً نادیده گرفته می‌شود. تغییر این پارامترها پس از عفونت می‌تواند اطلاعات مفیدی در مورد درجه بیماری ارائه دهد (۱۰).

گیاه مورینگا (*Moringa oleifera*) یک گیاه بومی در شمال هند و پاکستان است که به صورت وحشی رشد می‌کند. این گیاه به دلیل داشتن مواد مغذی مانند مواد معدنی (آهن، کلسیم، سلنیوم و روی)، ویتامین‌ها (به‌عنوان مثال A، C، E، B_1، B_2، B_3، B_6)، پروتئین از جمله دارای اسیدهای آمینه ضروری مانند متیونین و سیستئین (۱۱ و ۱۲) و ترکیباتی مانند فنل‌ها، فلاونوئیدها (مریستین، کوئرستین و کامفرول)، آلکالوئیدها، گلیکوزیدها و ایزوتیوسیانات‌ها (۱۳) به عنوان یک جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی پیشنهاد می‌شود. مطالعات انجام گرفته روی انسان نشان داده مورینگا دارای اثرات متعددی مانند کاهش استرس، محافظت از کبد، ضد فشار خون، ضد التهاب، آنتی‌اکسیدان، آنتی‌بیوتیک، کاهش‌دهنده کلسترول، ضد دیابت، ضد اسپاسم، تحریک‌کننده سیستم ایمنی و خاصیت ضد ویروسی است (١٤). مطالعات متعددی اثرات مثبت گیاهان دارویی مختلف را به عنوان افزودنی خوراک در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان برای کاهش اثرات مضر استرس‌های محیطی و جهت بهبود سلامت عمومی از جمله عصاره گشنیز (*Coriandrum sativum*) (۱۵)، گیاه هفت‌بند (*Polygonum minus*) (١٦)، گل (*Taraxacum officinale*) (۱۷)، بارهنگ

نیزه‌ای (*Plantago lanceolata*) (۱۸)، چای کوهی (*Stachys lavandulifolia Vahl*) (۱۹) و بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) (۲۰) نشان داده است. در آبزی‌پروری، گبادا‌موسی و همکاران (۲۰۱٦ و ۲۰۱۷) (۲۱ و ۲۲) نشان دادند که مکمل غذایی پودر برگ مورینگا به عنوان عامل محافظت‌کننده کبد و کاهنده استرس به ترتیب در تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) و گربه‌ماهی آفریقایی انگشت‌قد (*Clarias gariepinus*) در مواجهه با استرس ناشی از حمل‌ونقل و هم‌چنین با باکتری آئروموناس هیدروفیلا مناسب بوده است. هم‌چنین، تجویز خوراکی کنجاله برگ مورینگا باعث پاسخ استرس آنتی‌اکسیدانی در ماهی تیلاپیای نیل پس از قرار گرفتن تحت چالش گرسنگی یک هفته‌ای شد (۲۳). برای بهبود پارامترهای خون‌شناسی، عملکرد کبد و کلیه در ماهی تیلاپیای نیل، مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره مورینگا توصیه شده است (۲٤). در مطالعه اخیر ما، مکمل‌سازی جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با پودر برگ مورینگا به میزان ۲۵ گرم در کیلوگرم اثرات مثبتی بر پارامترهای ایمنی هومورال و موکوس پوست و هم‌چنین مقاومت در برابر بیماری پس از آلودگی با باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* (*Aeromonas hydrophila*) داشت و هیچ‌گونه اثر منفی روی عملکرد رشد نشان نداد (۲۵). به نظر می‌رسد تاکنون، هیچ داده‌ای در مورد تأثیر پودر برگ مورینگا در رژیم غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در القای پاسخ بهتر ماهی به شرایط استرس‌زا، مانند عفونت با *A. hydrophila* و تغییرات برخی پارامترهای خونی و بیوشیمیایی سرم پس از آلودگی با باکتری در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان وجود ندارد. از این‌رو هدف از این مطالعه ارزیابی اثر پودر برگ مورینگا بر تغییرات شاخص‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی قبل و بعد از عفونت با *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و شرایط پرورش: ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (وزن اولیه ۰/۵ ± ۳۵/۵ گرم) از یک مزرعه خصوصی پرورش ماهی واقع در کرمان تهیه و به آزمایشگاه پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون واقع در پژوهشگاه زابل منتقل شدند. سازگاری با شرایط جدید به مدت سه هفته انجام و در این مدت ماهی‌ها با جیره پایه (جیره شاهد؛ جدول ۱) تغذیه شدند. پس از دوره سازگاری، ۳٦۰ عدد ماهی به طور تصادفی در ۱۲ مخزن پلی‌اتیلن (۱ متر قطر × ۱/۳ متر ارتفاع، ٤۵۰ لیتر) به چهار گروه با سه تکرار (۳۰ ماهی در هر مخزن، ۹۰ ماهی در هر تیمار) توزیع شدند. منبع تامین آب مخازن، آب شهری کلرزدایی شده با تیوسولفات سدیم و هوادهی مداوم بود. تیمار شاهد با جیره بدون پودر برگ مورینگا و تیمارهای ۲، ۳ و ٤ به ترتیب با جیره‌های حاوی ۱، ۲/۵ و ۵ درصد پودر برگ مورینگا به مدت ۸ هفته تحت شرایط نور و تاریکی طبیعی (۱٤ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی) تغذیه شدند. ماهی‌ها چهار بار در روز (در ساعات ۸:۰۰، ۱۰:۰۰، ۱٤:۰۰ و ۱۸:۰۰) بر اساس اشتها غذادهی شدند. در طول آزمایش تغذیه، دمای آب ۱/٦ ± ۱۵ درجه سانتی‌گراد، ۰/۲ ± pH=۷/٦، اکسیژن محلول ۰/۱ ± ۷/۳، آمونیاک ۰/۰۰۱ ± ۰/۰۵۰، نیتریت ۰/۰۰۲ ± ۰/۰٤ و نیترات ۰/۰۱ ± ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر بودند.

جدول ۱- اقلام غذایی (درصد ماده خشک) و ترکیب تقریبی جیره‌های آزمایشی برای قزل‌آلای رنگین‌کمان.

ترکیبات	جیره‌های آزمایشی (٪)			
	۰	۱	۲/۵	۵
پودر ماهی[۱]	٤۳/۵	٤۳/۵	٤۳/۵	٤۳/۵
کنجاله سویا	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸
کنجاله ذرت	۱۰	۹/۳	۷	۳/٤
کنجاله گندم	۸	۷/۵	٦	٤/٦
روغن سویا	۳/۷	۳/۷	۳/۷	۳/۷
روغن ماهی	٤	٤	٤	٤
مخلوط ویتامین [۲]	۳	۳	۳	۳
مخلوط مواد معدنی[۳]	۳	۳	۳	۳
آنتی اکسیدان[٤]	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲
بایندر	۰/۱۸	۰/۱۸	۰/۱۸	۰/۱۸
ویتامین ث	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱
پر کننده[۵] (سلولز)	٦/۵	۵/۵	۵	۱/۵
پودر برگ مورینگا[٦]	۰	۱	۲/۵	۵
بنتوئیت (پر کننده)	۰	۱/۲	٤	۱۰
جمع کل	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
پروتئین خام	۳۹/۵۲	۳۹/۵۵	۳۹/۵۹	۳۹/۵۱
چربی خام	۱۱/۷۱	۱۱/۷۰	۱۱/٦۸	۱۱/۷٤
فیبر	۱/۹۱	۱/۸۹	۱/۹۲	۲/۰۰
خاکستر	۱۱/۷۸	۱۱/۸۷	۱۱/۸۸	۱۱/۸۸
رطوبت	۹/۰۱	۹/۰۰	۸/۹۲	۸/۹۸
عصاره ی عاری از نیتروژن[۷]	۳۵/۰۸	۳٤/۹۹	۳٤/۹۳	۳٤/۸۸
انرژی (کیلوژول/ گرم)	۱۹/۹	۱۹/۹	۱۹/۹	۱۹/۹

[۱] پودر ماهی تولید شده از (*Clupeonella Clupeidae* sp.) (شرکت ممتازدانه، ایران) و شامل ۷۰۱ گرم در کیلوگرم پروتئین، ۹٦ گرم در کیلوگرم چربی و ۹۳ گرم در کیلوگرم خاکستر بود. [۲] مخلوط ویتامین حاوی موارد زیر است (کیلوگرم وزن خشک): ویتامین آ: ۵۰۰۰۰MIU، ویتامین D3: ۱۰MIU؛ ویتامین E: ۱۳۰ گرم؛ ویتامین K_3: ۱۰گرم؛ ویتامین B_1: ۱۰ گرم؛ ویتامین B2: ۲۵ گرم؛ ویتامین B6: ۱٦ گرم؛ ویتامین B12: ۱۰۰ میلی‌گرم؛ نیاسین: ۲۰۰ گرم؛ اسید پانتوتنیک: ۵٦ گرم؛ اسید فولیک: ۸ گرم؛ بیوتین: ۵۰۰ میلی‌گرم. [۳] پیش مخلوط معدنی حاوی موارد زیر است (وزن خشک ۱ کیلوگرم): فسفات کلسیم: ۳۹۷ گرم. لاکتات کلسیم: ۳۲۷ گرم؛ سولفات آهن: ۲۵ گرم؛ سولفات منیزیم: ۱۳۷ گرم؛ کلرید پتاسیم: ۵۰ گرم؛ کلرید سدیم: ٦۰ گرم؛ یدید پتاسیم: ۱۵۰ میلی‌گرم؛ سولفات مس: ۷۸۰ میلی‌گرم؛ اکسید منگنز: ۸۰۰ میلی‌گرم؛ کربنات کبالت: ۱۰۰ میلی‌گرم؛ اکسید روی: ۱/۵ گرم؛ سلنیت سدیم ۲۰ میلی‌گرم. [٤] هیدروکسی تولوئن بوتیله (BHT؛ ®VULKANOX، Lanxess Co.، آلمان). شرکت تک ژن، تهران، ایران. [۵] کربوکسی متیل سلولز(نمک سدیم). [٦] برگ خشک مورینگا اولیفرا تهیه شده از شرکت سبز رویان. دزفول، ایران. [۷] NFE از طریق فرمول (پروتئین خام + چربی خام + خاکستر + فیبر) − ۱۰۰ محاسبه می‌شود. انرژی ناخالص بر اساس (kJ/g) ۲۳/٦ kJ/g برای پروتئین، ۳۹/۵ kJ/g برای لیپید و ۱۷ kJ/g برای NFE محاسبه می‌شود.

تهیه جیره‌های آزمایشی: برگ خشک شده مورینگا از شرکت سبز رویان واقع در شهرستان دزفول خوزستان تهیه شد. برگ‌ها توسط آسیاب الکتریکی (مدل اولسن مارک، OMSB۲۳۸٤۸۵۰W، ساخت کشور چین) پودر شدند. چهار جیره همگن و هم کالری حاوی صفر(شاهد)، ۱، ۲/۵ و ۵ درصد پودر برگ مورینگا با استفاده از نرم‌افزار جیره نویسی تهیه شدند (جدول ۱). تمام مواد ابتدا پودر و سپس با روغن و آب ولرم (~۳۰۰ میلی لیتر/کیلوگرم) مخلوط شدند تا خمیر سفتی به دست آید. خمیر به دست آمده توسط چرخ گوشت (قطر ۳ میلی‌متر؛ SMG-۱۵۷۵، سانی، شرکت سرایش، ایران) به صورت رشته در آمده و پس از خشک شدن رشته‌ها در سایه در دمای محیط، به‌صورت دستی به دانه‌هایی مناسب اندازه ماهی تبدیل شدند. جیره‌های تهیه شده تا زمان استفاده روزانه در کیسه‌های پلاستیکی برچسب دار در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تست چالش

تهیه سویه باکتریایی *آئروموناس هیدروفیلا*: سویه بیماریزای *A. hydrophila* به صورت آمپول لیوفیلیزه (PTCC۱۸۹۰) از گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه شد. باکتری‌ها در محیط کشت نوترینت براث به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد کردند و سپس در دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مواد رویی دور ریخته شد و مواد ته‌نشین شده توسط فسفات بافر سالین (PBS) استریل رقیق شدند تا OD نمونه‌ها به ۰/۵ در طول موج ٥٤۰ نانومتررسانده شد که تقریباً معادل $۱۰^{۸}$ سلول در میلی‌لیتر بود (۲٦).

شرایط آزمون چالش: در پایان ۸ هفته تغذیه با پودر برگ مورینگا، ۲۰ عدد ماهی از ماهیان باقیمانده در هر مخزن آزمایشی به‌طور تصادفی صید و پس از بیهوشی با اسانس میخک (شرکت دارویی باریج اسانس، کاشان) با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر (۱٦)، با ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی ($۱۰^{۸}$ سلول در میلی‌لیتر بر اساس آزمایش $LD_{۵۰}$) به صورت داخل صفاقی تزریق شدند، در طول آزمایش چالش (۱۰ روز)، تغذیه ماهی‌ها با رژیم‌های تغذیه مربوطه ادامه یافت. هم‌چنین مرگ و میر و ناهنجاری در تمام گروه‌های آزمایشی پایش شد. آزمایش میکروبی روی کلیه ماهیان مرده انجام شد تا علت مرگ توسط *آئروموناس هیدروفیلا* تایید شود (۲۷). در پایان آزمون چالش، از ماهیان باقی‌مانده به‌طور تصادفی برای تجزیه و تحلیل پارامترهای خونی و بیوشیمیایی نمونه‌برداری انجام شد.

جمع‌آوری نمونه: این آزمایش شامل دو مرحله نمونه‌برداری بود. مرحله اول بعد از ۸ هفته تغذیه و قبل از چالش با باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* (قبل از چالش) و مرحله دوم ۱۰ روز بعد از آلودگی با آئروموناس هیدروفیلا (بعد از چالش) بود. در پایان آزمایشات، ۳ ماهی از هر تکرار (۹ عدد از هر گروه آزمایشی) به‌طور تصادفی صید و پس از بیهوشی با ۲۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس میخک، خون‌گیری از رگ ساقه دمی ماهی‌ها انجام شده و خون جمع‌آوری شده به دو قسمت تقسیم شد. یک قسمت به تیوب‌های حاوی عامل ضد انعقاد (۱۰ میکرولیتر هپارین در میلی‌لیتر) (۲۸) برای اندازه‌گیری شاخص‌های خون‌شناسی منتقل و قسمت دیگر جهت تهیه سرم، به تیوب‌های فاقد ماده ضد انعقاد منتقل و با سرعت ۳۰۰۰g به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با دستگاه میکروسانتریفیوژ (مدل نیوجرسی ۰۸۸۵٤، شرکت توموس، ساخت آمریکا) سانتریفیوژ شدند. سرم تا زمان اندازه‌گیری شاخص‌های موردنظر در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

فراسنجه‌های خونی: پس از رقیق کردن خون هپارینه شده با محلول رقیق‌کننده هایم (۲۰۰: ۱)، تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) با استفاده از لام هموسایتومتر نئوبار شمارش شد (۲۹). غلظت هموگلوبین (Hb) براساس روش سیانومت هموگلوبین توسط کیت تجاری (شرکت پارس آزمون، تهران، ایران) با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر ارزیابی شد. مقادیر هماتوکریت (HCT) با روش استاندارد سانتریفیوژ میکرو هماتوکریت با استفاده از لوله‌های مویرگی میکرو هماتوکریت و سانتریفیوژ (مبین طب، ایران) در دور ۷۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه تعیین شد (۳۰). علاوه بر این، شاخص‌های گلبولی مانند حجم متوسط گلبولی (MCV)، میزان متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) و غلظت هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) با استفاده از فرمول‌های استاندارد به‌شرح زیر محاسبه شدند (۱۷):

[(۱۰^۶ میلی‌متر مکعب) تعداد گلبول‌های قرمز] / [۱۰ × (٪) هماتوکریت] = (فمتولیتر) حجم متوسط گلبولی

[هماتوکریت (٪)]] / [۱۰۰ × (گرم در دسی‌لیتر) هموگلوبین] = (درصد) غلظت هموگلوبین گلبول‌های قرمز

تعداد گلبول‌های قرمز] / ۱۰ × [(گرم در دسی‌لیتر) هموگلوبین)] = (پیکوگرم در سلول) میزان متوسط هموگلوبین گلبولی
[(۱۰^۶ میلی‌متر مکعب)

پارامترهای بیوشیمیایی سرم: سطح گلوکز سرم براساس روش آنزیم گلوکز اکسیداز در طول موج ۵۰۰ نانومتر توسط کیت تجاری (شرکت پارس آزمون، تهران، ایران) اندازه‌گیری شد. فعالیت سه آنزیم کبدی شامل: سنجش آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) با استفاده از کیت‌های تجاری پارس آزمون (تهران، ایران) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده مورد سنجش قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری: برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف استفاده شد. سپس داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون توکی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند تا تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیمار در سطح معنی‌داری ۵ درصد مشخص شود. تمامی تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از بسته نرم‌افزاری آماری SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. هم‌چنین سطوح بهینه جیره پودر برگ مورینگا برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از مدل‌های رگرسیون چندجمله‌ای برآورد شد. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد (SE) ارائه شده است.

نتایج

پارامترهای خونی: نتایج پارامترهای خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سطوح مختلف پودر برگ مورینگا در پایان دوره تغذیه ۸ هفته‌ای (قبل از چالش) و ۱۰ روز بعد از عفونت با باکتری *آئرومونا‌س هیدروفیلا* (بعد از چالش) در جدول ۲ نمایش داده شده است. تیمارهای آزمایشی مختلف تفاوت معنی‌داری را در تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین، حجم متوسط گلبولی، میزان متوسط هموگلوبین گلبولی و غلظت هموگلوبین گلبول‌های قرمز در هر دو دوره قبل و بعد از عفونت با باکتری *آئرومونا‌س هیدروفیلا* در مقایسه با تیمار

شاهد نشان ندادند (P>۰/۰۵). اگرچه تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در همه تیمارهای آزمایشی به ویژه در تیمار ۲/۵ درصد در مقایسه با تیمار شاهد در هر دو دوره قبل و بعد از آلودگی با باکتری *آئرومونا‌س هیدروفیلا* مقادیر بالاتری را نشان دادند، اما تفاوت‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

جدول ۲- پارامترهای خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از ۸ هفته تغذیه با سطوح مختلف پودر برگ *مورینگا اولیفرا* (دوره قبل از چالش) و ۱۰ روز پس از عفونت با *آئرومونا‌س هیدروفیلا* (بعد از چالش) (خطای استاندارد ± میانگین).

پارامترهای خونی	مرحله مورد بررسی	جیره‌های آزمایشی (درصد)					*P*-value	
		۰	۱	۲/۵	۵	خطی	پلی نومینال	
گلبول قرمز ($\times10^{6}$)	قبل از چالش	۱/۱۶ ± ۰/۱۵^{a}	۱/۱۹ ± ۰/۰۴^{a}	۱/۲۷ ± ۰/۰۷^{a}	۱/۱۷ ± ۰/۰۷^{a}	۰/۷۸۴	۰/۷۴۷
	بعد از چالش	۰/۹۸ ± ۰/۰۶^{a}	۱/۰۵ ± ۰/۱۳^{a}	۱/۰۶ ±۰ /۰۷^{a}	۱/۰۵ ± ۰/۰۹^{a}	۰/۵۶۶	۰/۷۷۹
هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر)	قبل از چالش	۸/۷۳ ± ۰/۵۰^{a}	۹/۰۰ ± ۲/۰۹^{a}	۱۱/۷۱ ± ۰/۶۲^{a}	۹/۴۵ ±۰/۰۹^{a}	۰/۳۸۶	۰/۴۱۴
	بعد از چالش	۷/۲۹ ± ۰/۴۷^{a}	۷/۳۹ ± ۰/۲۰^{a}	۷/۴۹ ± ۰/۰۶^{a}	۷/۳۹ ±۰/۷۶^{a}	۰/۸۲۸	۰/۹۵۴
هماتوکریت (درصد)	قبل از چالش	۴۱/۵۰ ± ۰/۸۷^{a}	۴۲/۳۳ ± ۲/۶۰	۴۵/۳۳ ± ۰/۸۸	۴۲/۳۳ ± ۳/۱۷	۰/۵۷۰	۰/۵۷۹
	بعد از چالش	۳۶/۶۷ ± ۲/۷۳^{a}	۴۰/۶۶ ± ۰/۸۸	۴۱/۰۰ ± ۱/۱۵	۳۹/۳۳ ± ۳/۴۸	۰/۴۳۱	۰/۳۴۸
MCV (فمتولیتر)	قبل از چالش	۳۶۸/۳۴ ± ۴۱/۲۲^{a}	۳۵۵/۷۸ ± ۱۸/۲۳^{a}	۳۵۸/۸۸ ± ۱۷/۰۸^{a}	۳۶۴/۸۸ ± ۳۸/۴۹	۰/۹۵۴	۰/۹۴۹
	بعد از چالش	۳۸۰/۸۸ ± ۵۳/۳۰^{a}	۳۹۵/۳۰ ± ۳۷/۴۸^{a}	۳۹۱/۵۲ ± ۲۷/۰۶^{a}	۳۷۶/۸۸ ±۳۷/۶۵^{a}	۰/۹۲۴	۰/۹۲۵
MCH (پیکوگرم)	قبل از چالش	۷۸/۴۱ ± ۱۲/۲۵^{a}	۷۴/۸۸ ± ۱۵/۲۳^{a}	۹۲/۴۸ ± ۴/۰۲^{a}	۸۱/۴۶ ± ۵/۶۷^{a}	۰/۵۶۳	۰/۸۰۱
	بعد از چالش	۷۵/۲۲ ± ۷/۵۷^{a}	۷۲/۲۴ ± ۸/۹۹	۷۱/۵۹ ± ۴/۹۲^{a}	۶۹/۹۶ ± ۱/۳۵^{a}	۰/۵۳۶	۰/۸۲۹
MCHC (درصد)	قبل از چالش	۲۱/۰۹ ± ۱/۴۷^{a}	۲۰/۸۳ ± ۳/۵۶^{a}	۲۵/۸۰ ± ۰/۸۷^{a}	۲۲/۶۰ ± ۱/۸۲^{a}	۰/۳۶۰	۰/۵۴۹
	بعد از چالش	۲۰/۰۷ ±۱ /۸۱	۱۸/۲۰ ± ۰/۸۵	۱۸/۳۰ ± ۰/۶۳	۱۸/۹۸ ± ۲/۰۹	۰/۶۲۲	۰/۵۹۹

حجم متوسط گلبولی (MCV)، میزان متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) و غلظت هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC)، حروف همنام در هر ردیف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار (P <۰/۰۵) بین گروه‌ها می‌باشد

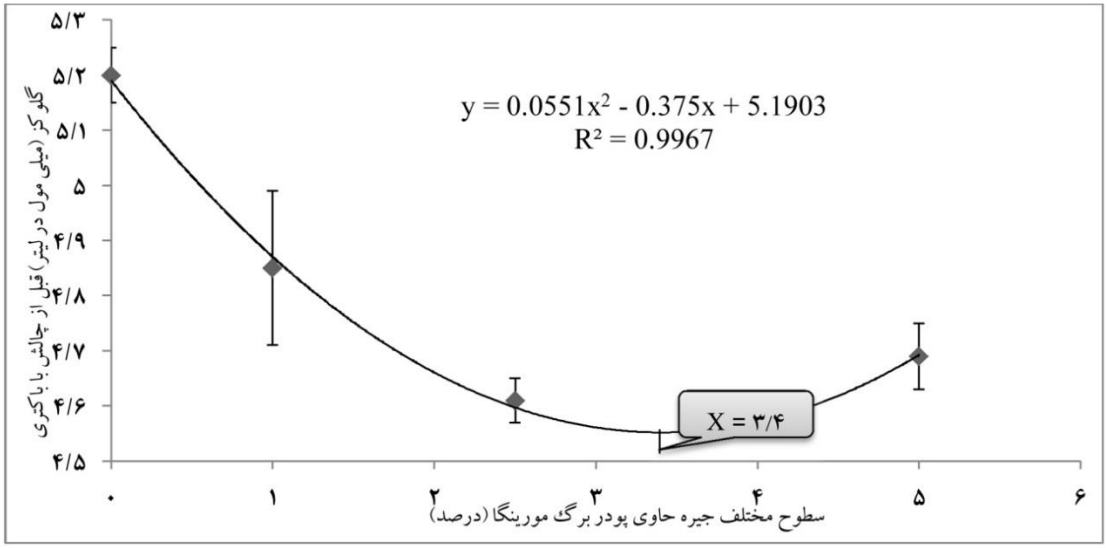
پارامترهای بیوشیمیایی سرم: اثرات غذایی مکمل پودر برگ مورینگا بر پارامترهای بیوشیمیایی سرم در قزل‌آلای رنگین‌کمان در دوره‌های قبل و بعد از چالش با باکتری *آئرومونا‌س هیدروفیلا* در جدول ۳ آورده شده است. سطح گلوکز در تمام گروه‌های اضافه شده با پودر برگ مورینگا به ویژه در ماهی‌های تغذیه شده با جیره ۲/۵ درصد در مقایسه با ماهی‌های تیمار شاهد در هر دو دوره قبل و بعد از آزمایش چالش به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵). معادله رگرسیون گلوکز قبل از چالش با باکتری *آئرومونا‌س هیدروفیلا* $Y= ۰/۰۵۵۱\ x^{۲} - ۰/۳۷۵x + ۵/۱۹۳$ بود که y مقادیر گلوکز و *x* مقادیر پودر برگ مورینگا بود. پایین‌ترین مقدار گلوکز در غلظت ۳/۴۰ درصد در دوره قبل از چالش با باکتری مشاهده شد (شکل ۱). هم‌چنین

مقدار بهینه پودر برگ مورینگا برای بعد از چالش باکتری برای این فاکتور ۲/۷۷ درصد بود (شکل ۲). تفاوت معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز در بین تمام تیمارهای آزمایشی در دوره قبل از چالش با باکتری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). پس از چالش با باکتری، فعالیت آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز کاهش معنی‌داری را در تیمار ۲/۵ درصد در مقایسه با تیمار شاهد نشان دادند (P<۰/۰۵). رگرسیون چند جمله‌ای درجه دوم نشان داد که مقدار بهینه گنجاندن پودر برگ مورینگا در جیره قزل‌آلای رنگین‌کمان برای پایین‌ترین فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز به ترتیب مقادیر ۱/۹۷ و ۳/۳۳ درصد برای مراحل قبل و بعد از چالش با باکتری (شکل‌های ۳ و ٤). علی‌رغم کاهش مشاهده شده در فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز با افزایش غلظت پودر برگ مورینگا در جیره در مقایسه با تیمار شاهد اما هیچ تفاوت معنی‌داری بین تمامی تیمارهای آزمایشی در دوره قبل و بعد از چالش با باکتری آئروموناس هیدروفیلا مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

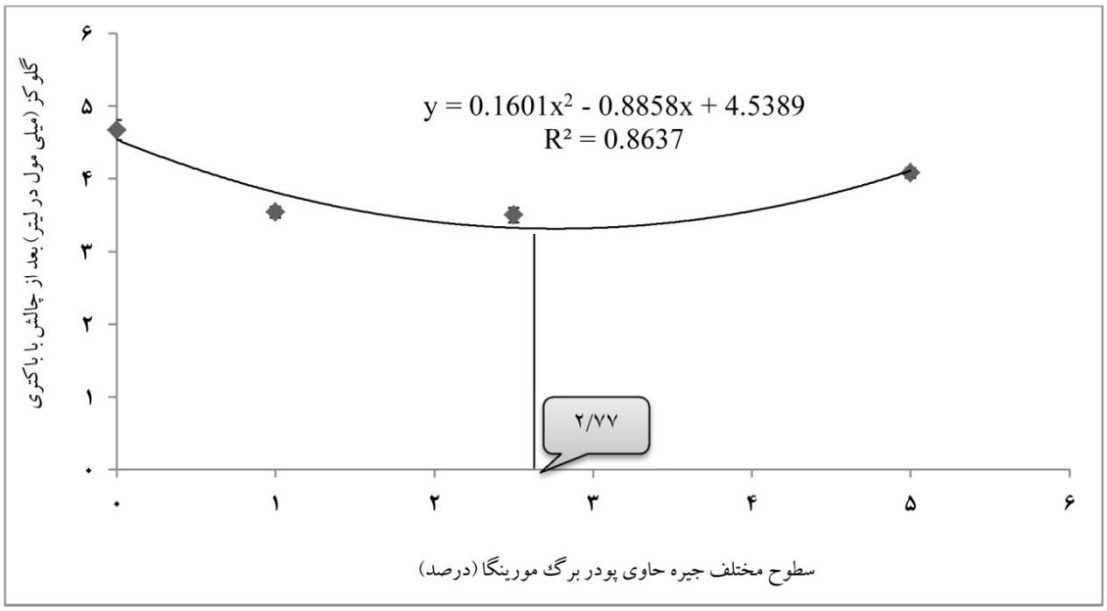
جدول ۳- پارامترهای شیمیایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از ۸ هفته تغذیه با سطوح مختلف پودر برگ *مورینگا اولیفرا* (دوره قبل از چالش) و ۱۰ روز پس از عفونت با *آئروموناس هیدروفیلا* (پس از چالش) (خطای استاندارد ± میانگین).

پارامترهای بیوشیمیایی سرم	مرحله مورد بررسی	جیره‌های آزمایشی (درصد)				*P*-value	
		۰	۱	۲/۵	۵	خطی	پلی نومینال
گلوکز (میلی‌مول در لیتر)	قبل از چالش	۵/۲۱ ± ۰/۰۵^{a}	٤/۸۵ ± ۰/۱٤^{b}	٤/٦۱ ±۰/۰٤^{b}	٤/٦۹ ±۰ /۰٦^{b}	۰/۰۰۳	۰/۰۰۱
	بعد از چالش	٤/٦۷ ±۰/۱٤^{a}	۳/۵٤ ± ۰/۰۸^{c}	۳/۵۰ ± ۰/۱۰^{c}	٤/۰۸ ± ۰/۰۷^{b}	۰/۱۹٤	۰/۰۰۰
AST (واحد در لیتر)	قبل از چالش	۲۹/۷۷ ± ۱/۹۸^{ab}	۲۵/۸۰ ± ۳/٤٤^{b}	۲٤/۸۱ ± ۲/۸٦^{b}	۳۷/۰۵ ± ۲/٦٤^{a}	۰/۲۳۰	۰/۰۲٤
	بعد از چالش	۷۲/٤٤ ± ۱۵/٤۷^{a}	٤۹/٦۲ ± ۵/۷۳^{ab}	۳۵/۷۳ ± ۲/۲۹^{b}	٤۱/٦۸ ± ۵/۷۳^{b}	۰/۰۱۱	۰/۰٤٦
ALT (واحد در لیتر)	قبل از چالش	۱٤/۰۰ ± ۰/۷۰^{a}	۱٤/۸۳ ± ۰/۷۷^{a}	۱۳/۳۰ ± ۰/٦۱^{a}	۱۳/۸٦ ± ۰/۱۷^{a}	۰/۵۱۰	۰/۷۹۸
	بعد از چالش	۱۹/۷۷ ± ۰/۲٤^{a}	۱۹/۷۰ ± ۰/۵۸^{a}	۱٦/۲۰ ± ۰/٤۰^{b}	۲۱/۳۳ ± ۰/۸۸^{a}	۰/۸٤۲	۰/۰۹٤
ALP (واحد در لیتر)	قبل از چالش	٤۱۳/۵۵ ± ۱۵/۹۱^{a}	۳۸۵/۹۸ ± ٤۷/۷۵^{a}	۳۸۵/۹۸ ± ۳۱/۸۳^{a}	٤۰۰/۰۰ ± ۵۹/۳۰^{a}	۰/۸۱۷	۰/۸۵۱
	بعد از چالش	۳۸۳/۷۲ ± ۱۹/۹۳^{a}	۳۸۵/۹۸ ± ٦۳/٦۷^{a}	۳۵۸/٤۱ ± ۳۱/۸۳^{a}	۳۳۰/۸٤ ± ۱۵/۹۱^{a}	۰/۲۵۱	۰/٤۹۳

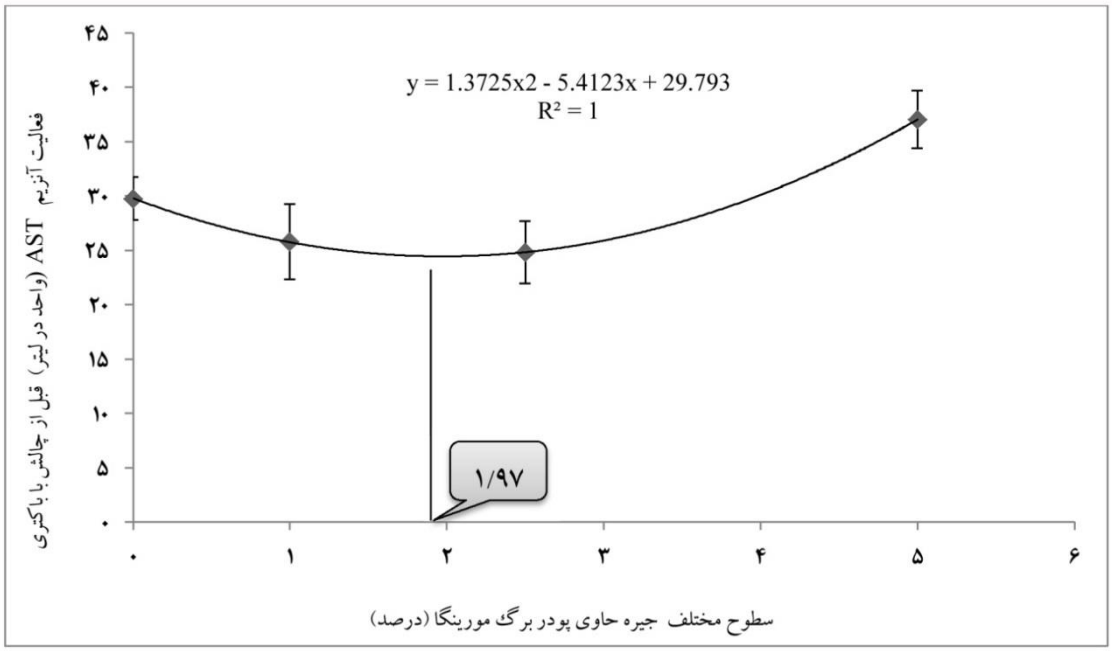
حروف غیرهمنام در هر ردیف مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد (P<۰/۰۵). آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلکالین فسفاتاز (ALP)



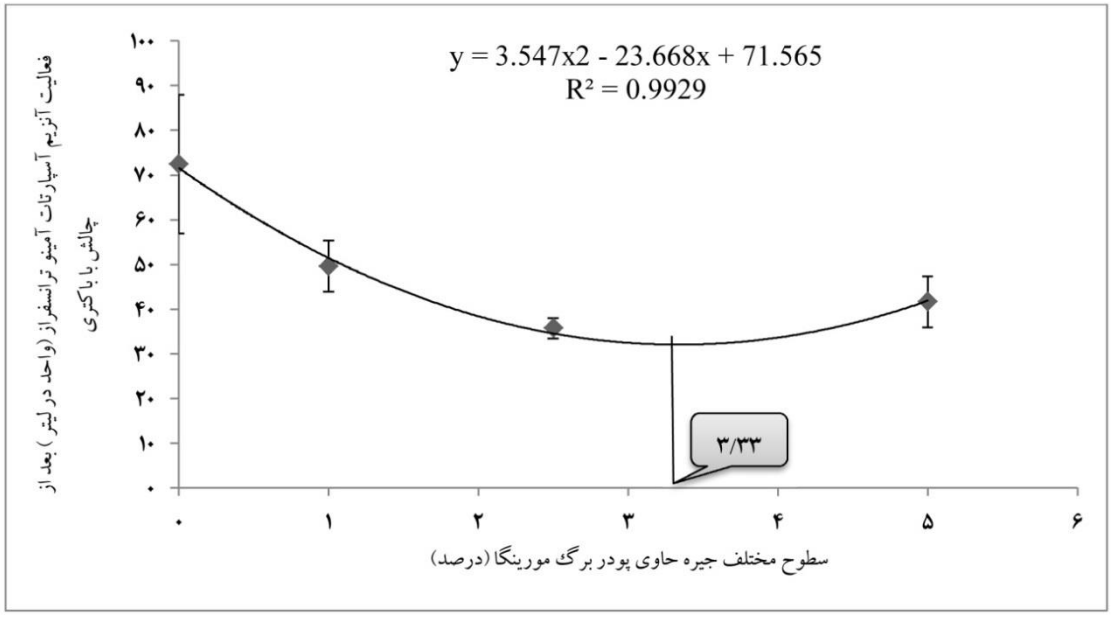
شکل ۱- معادله درجه دوم و تجزیه و تحلیل رگرسیون چندجمله‌ای ($P < ۰/۰۵$) گلوکز ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سطوح جیره‌ای پودر برگ مورینگا در دوره قبل از چالش با باکتری *آئرومونـاس هیدروفیلا*.



شکل ۲- معادله درجه دوم و تجزیه و تحلیل رگرسیون چندجمله‌ای ($P < ۰/۰۵$) گلوکز ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سطوح جیره‌ای پودر برگ مورینگا در دوره بعد از چالش با باکتری *آئرومونـاس هیدروفیلا*.



شکل ۳- معادله درجه دوم و تجزیه و تحلیل رگرسیون چندجمله‌ای (P < ۰/۰۵) فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سطوح جیره‌ای پودر برگ مورینگا در دوره قبل از چالش با باکتری *آئرومونا‌س هیدروفیلا*.



شکل ٤- معادله درجه دوم و تجزیه و تحلیل رگرسیون چندجمله‌ای (P < ۰/۰۵) فعالیت آنزیم آسپارتات آمینو ترانسفراز ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سطوح جیره‌ای پودر برگ مورینگا در دوره بعد از چالش با باکتری *آئرومونا‌س هیدروفیلا*.

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که جیره غذایی دارای ۲/۵ درصد پودر برگ مورینگا می‌تواند برای بهبود عملکرد کبد و کاهش استرس در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از آلودگی با باکتری آئروموناس هیدروفیلا مؤثر باشد. هم‌چنان که برای تقویت پاسخ‌های ایمنی مربوط به پارامترهای ایمنی غیراختصاصی (ایمنی سلولی و هومورال)، سیتوکین‌ها و مقاومت در برابر عفونت با باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در قزل‌آلای رنگین‌کمان مؤثر بوده است (۲۵).

پارامترهای خونی معمولاً به عنوان یک شاخص زیستی برای ارزیابی وضعیت سلامت عمومی ماهی استفاده می‌شود (۳۱). نتایج مطالعه ما نشان داد که مکمل رژیم غذایی مورینگا باعث افزایش تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین ماهی‌های تیمارهای آزمایشی به ویژه ۲/۵ درصد در مقایسه با تیمار شاهد در هر دو مرحله قبل و بعد از چالش با باکتری آئروموناس هیدروفیلا شد اگرچه اختلاف معنی‌داری بین تیمارها با تیمار شاهد مشاهده نشد. به‌طور مشابه، در مطالعه عبد ال گواد و همکاران (۲۰۲۰) (۳۲) و مبوکانه ومویو و (۲۰۱۸) (۱۰) علی‌رغم افزایش در پارامترهای خونی مثل هموگلوبین، هماتوکریت و گلبول قرمز در مقایسه با تیمار شاهد به ترتیب با جیره‌های حاوی ۱/۵ و ۵ درصد کنجاله پودر برگ مورینگا بعد از ٦۰ روز تغذیه در ماهی تیلاپیای نیل و جیره‌های حاوی ۳، ٦، ۹ و ۱۲ درصد پودر برگ مورینگا در جیره تیلاپیای موزامبیک (*Oreochromis mossambicus*) بعد از ٤٥ روز تغذیه تفاوت‌ها به صورت غیرمعنی‌دار گزارش شده است. به‌طور مشابه، در تیلاپیای نیل تغذیه شده با مقادیر ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد کنجاله برگ مورینگا (۳۳) و هم‌چنین در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با عصاره گشنیز (۱۵) تفاوت معنی‌داری گزارش نشده است. در مقابل شریف و همکاران (۲۰۱٤) (۳٤) افزایش معنی‌دار شاخص‌های خون را در ماهی تیلاپیای نیل تحت تیمار با ۱۰ و ۱۵ درصد کنجاله پودر برگ مورینگا به مدت ٦ هفته را گزارش کردند. افزایش شاخص‌های خونی در این مطالعه می‌تواند به‌دلیل وجود ویتامین ث موجود در برگ گیاه مورینگا باشد که در جذب آهن غذا و سایر مواد معدنی از روده و ساخت گلبول‌های قرمز و افزایش آن‌ها نقش داشته باشد (۱۲ و ۳۵) نتایج مطالعه ما در تضاد با مطالعه اوزوه (۲۰۱۳) (۳٦) در بررسی اثر کنجاله برگ مورینگا در رژیم غذایی گربه ماهی آفریقایی *C. gariepinus* که کاهش تعداد گلبول قرمز را ثبت کردند است، آن‌ها این کاهش را به غلظت بالاتر تانن در برگ مورینگا نسبت دادند. این تفاوت در اثرات مشاهده شده می‌تواند به دلیل دخالت عوامل بسیاری از جمله اندازه، گونه ماهی، دوز، وضعیت فیزیولوژیکی ماهی و زمان تجویز مکمل‌ها باشد (۳۲). در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری در میزان پارامترهای خونی بعد از چالش با باکتری مشاهده نشد که مبوکانه و مویو (۲۰۱۸) نتایج مشابهی را بعد از چالش ماهی تیلاپیای موزامبیک تغذیه شده با سطوح ۹ و ۱۲ درصد پودر برگ مورینگا مشاهده کردند. هم‌چنین تعداد گلبول قرمز در ماهی‌های *Solea senegalensis* Kaup چالش داده شده با *Tenacibaculum maritimum* و بدون چالش بدون تغییر باقی ماند (۳۷).

آنزیم‌های ترانس آمیناز در متابولیسم پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها مهم هستند. آن‌ها مسئول کاتالیز تبدیل اسیدهای آمینه غیر ضروری مانند آلانین، آسپارتات و گلوتامات هستند (۳۸). سطوح ترانس آمینازها، به‌عنوان مثال، آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات

آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز برای ارزیابی وضعیت فیزیولوژیکی و سلامت گونه‌های آبزی استفاده می‌شود (۳۹). آسپارتات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز در هنگام آسیب اندام در خون آزاد می‌شوند (٤٠). در مطالعه ما تفاوت معنی‌داری در سطوح آسپارتات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز در بین تمام گروه‌های آزمایشی در دوره قبل از چالش، هم‌چنین در سطح آلکالین فسفاتاز در بین تمام گروه‌های آزمایشی در دوره قبل و بعد از چالش با باکتری مشاهده نشد. پویچا و همکاران (۲۰۱۷) (۱۳) بیان نمودند که مکمل رژیم غذایی گربه‌ماهی (*Pangasius bocourti*) با ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ گرم در کیلوگرم برگ مورینگا تأثیر معنی‌داری بر سطوح آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز نداشت. مبوکانه و مویو (۲۰۱۸) نشان دادند که جیره‌های حاوی ۳، ٦، ۹ و ۱۲ درصد پودر برگ مورینگا تغذیه اثر معنی‌داری در میزان آنزیم‌های کبدی ماهی تیلاپیای موزامبیک بعد از ٤٥ روز تغذیه نداشتند. نتایج ما نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز سرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از چالش با باکتری بود. مطابق با نتایج ما، گنجاندن مورینگا در رژیم غذایی ماهی تیلاپیای نیل کاهش قابل‌توجهی در فعالیت آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز پس از چالش گرسنگی (۲۳) و پس از استرس فیزیولوژیکی ناشی از هیدروژن پراکسید نشان داد (٤١). مطالعات قبلی گزارش داده‌اند که عصاره برگ مورینگا از آسیب کبدی پس از قرار گرفتن در معرض عوامل استرس‌زا مانند استرس در معرض قرارگیری با باکتری آئروموناس هیدروفیلا (با غلظت $۹/۳ \times ۱۰^{۵}$ سلول در میلی‌لیتر) و استرس حمل‌ونقل در گربه‌ماهی آفریقایی انگشت‌قد *C. gariepinus* (۲۲) و هم‌چنین از آسیب کبدی ناشی از استامینوفن با کاهش آنزیم‌های کبدی و پراکسیداسیون لیپیدی کبد محافظت می‌کند (٤٢ و ٤٣). عصاره متانولی برگ مورینگا باعث بهبود سطوح سرمی آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز در طی تجویز استات سرب در موش صحرایی شد (٤٤). بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که مکانیسم مهم اثرات محافظتی کبد ممکن است به ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برای از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن مرتبط باشد (٤٥) که می‌تواند رادیکال‌های آزاد آسیب‌رسان تولید شده از طریق فعالیت طبیعی سلولی و استرس‌های مختلف را غیرفعال کند (٤٦). بنابراین، سطوح پایین آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز پس از عفونت با *آئروموناس هیدروفیلا* در مطالعه حاضر نشان‌دهنده بهبود وضعیت سلامت در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با مورینگا است. این می تواند به دلیل اثرات حفاظت کبدی مورینگا (٤٧) و وجود کوئرستین در برگ مورینگا (٤٨) باشد که اثرات قابل‌توجهی بر سطوح آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز دارند (۲۳).

گلوکز شاخص مهم استرس در ماهی است و برای پاسخگویی به افزایش نیاز سلول‌ها به انرژی از گلیکوژنولیز تولید و در خون آزاد می‌شود (٤٩). یافته‌های ما کاهش معنی‌داری را در محتوای گلوکز سرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با تمام تیمارهای افزوده شده با برگ مورینگا به ویژه تیمار ۲/۵ درصد قبل و بعد از آلودگی با باکتری نشان داد. به موازات نتایج ما، کاهش معنی‌داری در محتوای گلوکز سرم در تیلاپیای نیل تغذیه شده با سطوح جیره‌ای از عصاره آبی به میزان ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ٤۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم رژیم غذایی به مدت ٦۰ روز نسبت به ماهی شاهد مشاهده شد (۵۰). به‌طور مشابه،

رژیم غذایی حاوی عصاره برگ مورینگا به طور قابل‌توجهی سطوح کورتیزول و گلوکز را در تیلاپیای نیل در برابر عفونت با *آئروموناس هیدروفیلا* (با غلظت $۹/۳\times۱۰^{۵}$ سلول در میلی‌لیتر) و در معرض استرس حمل‌ونقل کاهش داد (۲۱). علاوه بر این، نشان داده شده است که مکمل‌های غذایی با مورینگا و عصاره آبی آن به‌طور قابل‌توجهی سطوح کورتیزول را در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، در معرض استرس حاد حبس کاهش داد (۵۱). برگ مورینگا حاوی مهارکننده‌های آلفا گلوکوزیداز و آمیلاز است که از جذب گلوکز به متابولیت‌های قابل‌جذب و افزایش گلوکز خون جلوگیری می‌کند (۵۲). اثر ضد استرس برگ مورینگا ممکن است به وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی قوی که به کاهش اثرات منفی عوامل استرس زا کمک می‌کند نسبت داده شود (۵۳). این ممکن است ناشی از خواص آنتی‌اکسیدانی مورینگا باشد (٥٤) که ممکن است فعالیت انسولین را تشویق کرده و سطح گلوکز را کاهش دهد (۵۵).

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزودن پودر برگ مورینگا در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، به‌ویژه ۲/۵ درصد می‌تواند به کاهش استرس و شاید به بهبود سلامت عمومی این ماهی کمک کند. دوز توصیه شده پودر برگ مورینگا بر اساس مدل‌های رگرسیون چندجمله‌ای برای پارامترهای بیوشیمیایی سرم مانند گلوکز و آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز از ۱/۹۷ تا ۳/٤ درصد به‌دست آمد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از کارشناسان آزمایشگاه پرورش آبزیان پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون و از جناب آقای مهندس حیدری کارشناس آزمایشگاه شیلات دانشگاه زابل و جناب آقای مهندس عباس علیزاده معاون آبزی‌پروری اداره کل شیلات سیستان بابت کمک‌های بی‌شائبه در طول انجام پژوهش تشکر و سپاسگزاری می‌کنند.

منابع

1. Saeidi Asl, M. R., Adel, M., Caipang, C. M. A., & 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.
2. Paknejad, H., Shekarabi, S. P. H., Mehrgan, M. S., Hajimoradloo, A., Khorshidi, Z., & Rastegari, S. (2020). Dietary peppermint (*Mentha piperita*) powder affects growth performance, hematological indices, skin mucosal immune parameters, and expression of growth and stress-related genes in Caspian roach (*Rutilus caspicus*). *Fish Physiology Biochemistry*. 46 (5), 1883-1895.
3. Li, P., Lewis, D. H., & Galtin, D. M. (2004). Dietary oligonucleotides from yeast RNA influence immune responses and resistance of hybrid striped bass (Morone chrysops Morone saxatilis) to *Streptococcus iniae* infection. *Fish and Shellfish Immunology*. 16, 561-569.
4. Faggio, C., Morabito, M., Minicante, S. A., Piano, G. L., Pagano, M., & Genovese, G. (2015). Potential use of polysaccharides from the brown alga *Undaria pinnatifida* as anticoagulants. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 58 (5), 798-804.
5. Kumar, J., Priyadharshini, M., Madhavi, M., Begum, S. S., Ali, A. J., Musthafa, M. S., & Faggio, C. (2022). Impact of *Hygrophila auriculata* supplementary diets on the growth, survival, biochemical and haematological parameters in fingerlings of freshwater fish *Cirrhinus mrigala* (Hamilton, 1822). Comparative

Biochemistry and Physiology Part A: *Molecular & Integrative Physiology*. 263, 111097.

6. Van Doan, H., Hoseinifar, S. H., Sringarm, K., Jaturasitha, S., Khamlor, T., Dawood, M. A. O., Esteban, M. Á., Soltani, M., & Musthafa, M. S. (2019). Effects of elephant's foot (*Elephantopus scaber*) extract on growth performance, immune response, and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. Fish and Shellfish Immunology. 93, 328-335.
7. Harikrishnan, R., Balasundaram, C., & Heo, M.S. (2011). Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*. 317 (1-4), 1–15.
8. Lee, J. Y., & Gao, Y. (2012). Review of the application of garlic, *Allium sativum*, in aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*. 43 (4), 447-458.
9. Platel, K., Rao, A., Saraswathi, G., & Srinivasan, K. (2002). Digestive stimulant action of three Indian spice mixes in experimental rats. *Food/Nahrung*. 46 (6), 394-398.
10. Mbokane, E. M., & Moyo, N. A. G. (2018). Alterations of haemato-biochemical parameters pre and post-challenge with *Aeromonas hydrophila* and survival of *Oreochromis mossambicus* fed *Moringa oleifera*-based diets. *Fish and Shellfish Immunology*. **doi: 10.1016/j.fsi.2018. 09.017.**
11. Foidl, N., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2001). The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses. In: L.J. Fuglie, (Ed.). The Miracle Tree. CTA, Wugeningen, Netherlands and CWS, New York, USA, pp: 45-77.
12. Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J., & Bertoli, S. (2015). Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: An overview. *International Journal of Molecular Sciences*. 16 (6), 12791-12835.
13. Puycha, K., Yuangsoi, B., Charoenwattanasak, S., Wongmaneeprateep, S., Niamphithak, P., & Wiriyapattanasub, P. (2017). Effect of moringa (*Moringa oleifera*) leaf supplementation on growth performance and feed utilization of Bocourti's catfish (*Pangasius bocourti*). *Agriculture Natural Resources*. 51 (4), 286-291.
14. Kou, X., Li, B., Olayanju, J., Drake, J., & Chen, N. (2018). Nutraceutical or pharmacological potential of *Moringa oleifera* Lam. *Nutrients*. 10 (3), 343.
15. Naderi Farsani, M., Hoseinifar, S. H., Rashidian, G., Farsani, H. G., Ashouri, G., & 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.
16. Adel, M., Dawood, M. A. O., Shafiei, S. et al. (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, 734738.
17. Mostafavi, Z. S., Hosseini Shekarabi, S. P., Shamsaie Mehrgan, M., & Rajabi Islami, H. (2022). Amelioration of growth performance, physio-metabolic responses, and antioxidant defense system in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using dietary dandelion, *Taraxacum officinale*, flower extract. *Aquaculture International.* 546,737296.
18. Elbesthi, R. T. A., Ozdemir, K. Y., Taştan, Y., Bilen, S., & Sonmez, A. Y. (2020). Effects of ribwort plantain (*Plantago lanceolata*) extract on blood parameters, immune response, antioxidant enzyme activities, and growth performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology Biochemistry*. 46 (4), 1295-1307.
19. Moghanlou, K. S., Nasr Isfahani, E., Dorafshan, S., Tukmechi, A., & Aramli, M.S. (2018). Effects of dietary supplementation with *Stachys lavandulifolia* Vahl extract on growth

performance, hemato-biochemical and innate immunity parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Feed Science and Technology*. **https:// doi.org/ 10.1016/ j.anifeedsci. 2018. 01. 016.**

20. Bilen, S., Abdalsalam, T., Altief, S., Ozdemir, K. Y., Salem, M. O. A., Terzi, E., & Güney, K. (2020). Effect of lemon balm (*Melissa officinalis*) extract on growth performance, digestive and antioxidant enzyme activities, and immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology Biochemistry*. 46 (1), 471-481.
21. Gbadamosi, O. K., Fasakin, E. A., & Adebayo, O. T. (2016). Hepatoprotective and stress - reducing effects of dietary *Moringa oleifera* extract against *Aeromonas hydrophila* infections and transportation-induced stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1757) fingerlings. *International Journal of Environmental and Agriculture Research (IJOEAR)*. 2 (7), 121-128.
22. Gbadamosi, O. K., Fasakin E. A., & Adebayo, O. T. (2017). Effects of Dietary *Moringa oleifera* Extract Against *Aeromonas hydrophila* infection and transportation-induced stress in African Catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) fingerlings. *World Applied Sciences Journal*. 35 (1), 88-95.
23. Elabd, H., Soror, E., El-Asely, A., Abd El-Gawad, E., & Abbass, A. (2019). Dietary supplementation of Moringa leaf meal for Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Effect on growth and stress indices. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. 45 (3), 265-271.
24. Emam, M. A., Shourbela, R. M., El-Hawarry, W. N., Abo-Kora, S. Y., Abdel-Monem Gad, F., Abd El-latif, A. M., & Dawood, M. A. O. (2022). Effects of *Moringa oleifera* aqueous extract on the growth performance, blood characteristics, and histological features of gills and livers in Nile tilapia. *Aquaculture and Fisheries*. **https:// doi. org/10.1016/j.aaf.2021.12.011.**
25. Sanchooli, N., Paknejad, H., Sudagar, M., Hosseini Shekarabi, S. P., & Rahdari, A. (2023). Growth promoting and immunomodulatory effects of dietary *Moringa oleifera* leaf powder in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture Reports. 30, 101555. **https:// doi.org/10.1016/ j.aqrep. 2023. 101555.**
26. Soltanian, S., & Fereidouni, M.S. (2016). Effect of Henna (*Lawsonia inermis*) extract on the immunity and survival of common carp, *Cyprinus carpio* infected with *Aeromonas hydrophila*. *International Aquatic Research*. 8, 247-261.
27. Kiadaliri, M., Firouzbakhsh, F., & Deldar, H. (2020). Effects of feeding with red algae (*Laurencia caspica*) hydroalcoholic extract on antioxidant defense, immune responses, and immune gene expression of kidney in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture International* 526, 735361.
28. Heydari, M., Firouzbakhsh, F., & Paknejad, H. (2020). Effects of *Mentha longifolia* extract on some blood and immune parameters, and disease resistance against yersiniosis in rainbow trout. *Aquaculture International*. 515, 734586.
29. Blaxhall, P. C., & Daisley, K. W. (1973). Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*. 5 (6), 771-781.
30. Rehulka, J. (2000). Influence ofastaxanthin on growthrate, condition, and some blood indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Aquaculture*. 190 (1-2), 27-47.
31. Satheeshkumar, P., Ananthan, G., Kumar, D. S., & Jagadeesan, L. (2012). Haematology and biochemical parameters of different feeding behaviour of teleost fishes from Vellar estuary, India. *Comparative Clinical Pathology*. 21 (6), 1187-1191.
32. Abd El-Gawad, E. A. A., Asely, A. M. E., Soror, E. I., Abbass, A. A., & Austin, B. (2020). Effect of dietary *Moringa oleifera* leaf on the immune response and control of *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia

(*Oreochromis niloticus*) fry. *Aquaculture International*. 28 (1), 389-402.
33. Bbole, I., Mumba, C., Mupenda, N., & Shula Kefi, A. (2016). Analysis of growth performance and haematological parameters of *Oreochromis niloticus* fed on a varying diet of *Moringa oleifera* Lam. leaf meal as an additive protein source. *International Journal of Fisheries and Aquaculture*. 8 (11), 105-111.
34. Sherif, A. H., El-Gamal, A. M., & Tolan, A. E. (2014). Incorporation of *Moringa oleifera* leaf in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* diet and its effect on growth performance and immune status. *Journal of Veterinary Science*. 1, 806-814.
35. Lim, C., Klesius, P. H., Li, M. H., & Robinson, E. H. (2000). Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Journal of Aquaculture*. 185, 313-327.
36. Ozovehe, B. N. (2013). Growth performance, hematological indices and some biochemical enzymes of juveniles *Clarias gariepinus* [Burchell 1822] fed varying levels of *Moringa oleifera* leaf meal diet. *Journal of Aquaculture Research and Development*. 14 (2), 166-172.
37. Guardiola, F. A., Mabrok, M., Machado, M., Azeredo, R., Afonso, A., Esteban, M. A., & Costasa, B. (2019). Mucosal and systemic immune responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup) bath challenged with *Tenacibaculum maritimum*: A timecourse study. *Fish and Shellfish Immunology*. 87, 744–754.
38. Racicot, J. G., Gaudet, M., & Leray, C. (1975). Blood and liver enzymes in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) with emphasis on their diagnostic use: Study of CCl4 toxicity and a case of Aeromonas infection. *Journal of Fish Biology*. 7 (6), 825-835.
39. Vutukuru, S. S., Pauleena, J. S., Rao, J. V., & Anjaneyulu, Y. (2007). Architectural changes in the gillmorphology of the freshwater fish, *Esomus danricus* as potential biomarkers of copper toxicity using automated video tracking system. *Environmental Bioindicators*. 2 (1), 3-14.
40. Tietz, N. W. (1986). Textbook of Clinical Chemistry. W. B. Saunders, Philadelphia, PA, USA.
41. Mansour, A. T., Espinosa, C., Garcia-Beltran, J. M., Miao, L., Ceballos Francisco, D. C., Alsaqufi, A. S., & Esteban, M. A. (2020). Dietary supplementation of drumstick tree, *Moringa oleifera*, improves mucosal immune response in skin and gills of seabream, *Sparus aurata*, and attenuates the effect of hydrogen peroxide exposure. *Fish Physioloiogy Biochemistry*. 46, 981-996.
42. Fakurazi, S., Sharifudin, S. A., & Arulselvan, P. (2012). *Moringa oleifera* hydroethanolic extracts effectively alleviate acetaminophen induced hepatotoxicity in experimental rats through their antioxidant nature. *Molecules*. 17 (7), 8334-8350.
43. Uma, N., Fakurazi, S., & Hairuszah, I. 2010. *Moringa oleifera* enhances liver antioxidant status via elevation of the antioxidant enzyme activity and counteracts paracetamol-induced hepatotoxicity. *Malays Journal Nutrition.* 16 (2), 293-307.
44. Christian, E. O., Samuel, C. M., Chudi, E. D., Anaelechi, J. O., Chinwemma, F. O., Daniel, L. A., John, K. N., & Obi, E. (2016). Amelioratory effect of methanolic leaf extract of *Moringa oleifera* on some liver and kidney function and oxidative stress markers in lead intoxicated rats. *European Journal of Medicinal Plants*. 12 (4), 1-12.
45. Cao, L., Du, J., Ding, W., Rui, J., Liu, Y., Xu, P., Teraoka, H., & Yin, G. (2016). Hepaprotective and antioxidant effects of dietary *Angelica sinensis* extract against carbon tetrachloride-induced hepatic injury in Jian Carp (*Cyprinius carpio* var. Jian). Aquaculture Research. 47 (6), 1852-1863.
46. Rapatsa, M. M., & Moyo, N. A. G. (2014). Effect of *Moringa oleifera* on

the histology, haematology and growth of *Oreochromis mossambicus* in the aquadams fertilised with chicken manure in South Africa. *African Journal of Aquatic Science*. 39, 295-303.

47. Nascimento, J. A., Magnani, M., Sousa, J. M. B., Araújo, K. L. G. V., Epaminondas, P. S., Souza, A. S., Souza, A. L., Silva, M. C. D., & Souza, A. G. (2016). Assessment of the antioxidant effects of *Moringa oleifera* Lam. Extracts in fish oil during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*. 40 (1), 29-36.
48. Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M., & Gilani, A. H. (2007). *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytother Research*. 21 (1), 17-25.
49. Mohammadi, G., Rashidian, G., Hoseinifar, S. H., Naserabad, S. S., Van Doan, H. (2020). Ginger (*Zingiber officinale*) extract affects growth performance, body composition, haematology, serum and mucosal immune parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish and Shellfish Immunology*. 99, 267-273.
50. Shourbela, R. M., El-Hawarry, W. N., Abd El-Latif, A. M., & Abo-Kora, S. Y. (2020). Potentiality of *Moringa oleifera* aqueous extract as a growth modulator and antistress in acute hypoxic Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Iranian Journal of Fisheries Science*. 19 (1), 67-84.
51. Khalil, F., & Korni, F. M. M. (2017). Evaluation of *Moringa oleifera* leaves and their aqueous extract in improving growth, immunity and mitigating effect of stress on common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. *Turkish Journal of Aquatic Science*. 32, 170-177.
52. Abdulkarim, S. M., Long, K., Lai, O. M., Muhammad, S. K. S., & Ghazali, H. M. (2005). Some physico-chemical properties of *Moringa oleifera* seed oil extracted using solvent and aqueous enzymatic methods. Food Chemistry. 93 (2), 253-263.
53. Sreelatha, S., & Padma, P. R. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Foods for Human Nutrition*. 64 (4), 303-311.
54. Chumark, P., Khunawat, P., Sanvarinda, Y., Phornchirasilp, S., Morales, N. P., Phivthong-ngam, L., Ratanachamnong, P., Srisawat, S., & Pongrapeeporn, K. S. (2008). The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 116 (3), 439-46.
55. Hajibeglou, A., & Sudagar M. (2010). Effects of using the *valeriana officinalis* extract during transportation of swordtail, *Xiphophorus helleri*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 9 (18), 2377-2381.