



University of Guilan

University of Guilan with collaboration of Iranian
Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 7, No. 1, 2021, pages: 27-41



Dietary effects of lemon *Citrus limon* peel essential oil encapsulated in chitosan nanoparticles on hematological indices and antioxidant defense system of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*

Abbas Gheytsi, Seyed Pezhman Hosseini Shekarabi*, Houman Rajabi Islami, Mehdi Shamsaie Mehrgan

Department of Fisheries Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received 16 October 2020

Accepted 14 March 2021

KEYWORDS

Lemon essential oil
Chitosan nanoparticles
Hematology
Antioxidant enzymes

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the effect of dietary levels of lemon essential oil encapsulated in chitosan nanoparticles on hematological indices and antioxidant status of rainbow trout fry. Accordingly, the fish (4.74 ± 0.14 g in weight) were distributed in 12 fiberglass tanks with 20 fish per tank and were fed with different levels of lemon essential oil loaded in chitosan nanoparticles including control group with no additive ($C_0\%$), 0.5% ($T_{0.5\%}$), 0.75% ($T_{0.75\%}$) and 1% ($T_{1\%}$) for 8 weeks in triplicates. The results showed that the highest number of RBC was in $T_{0.75\%}$ compared to $T_{0.5\%}$ and $C_0\%$ ($p < 0.05$). The maximum hemoglobin value was observed in $T_{1\%}$ and $T_{0.75\%}$ compared to the other experimental groups ($p < 0.05$). In addition, in terms of the blood indices, MCH index showed a significant increase in $T_{1\%}$ and $T_{0.75\%}$ compared to the other treatments. The maximum WBC and lymphocytes were observed in $T_{1\%}$ compared to the other experimental groups ($p < 0.05$). Serum antioxidant enzymes showed the highest catalase activity and glutathione peroxidase in $T_{1\%}$ compared to the other groups ($p < 0.05$). Furthermore, superoxide dismutase activity elevated significantly only in $T_{1\%}$ compared to $C_0\%$ ($p < 0.05$). However, the oral administration of 0.75% and 1% of lemon peel essential oil encapsulated with nanochitosan resulted in a significant elevation in the serum malondialdehyde compared to $T_{0.5\%}$ and $C_0\%$ ($p < 0.05$). Overall, the results of this study showed that the addition of lemon essential oil encapsulated in chitosan nanoparticles, especially at 1%, can enhance the hematological indices and antioxidant defense system of rainbow trout.

*Corresponding author: hosseini@srbiau.ac.ir



"مقاله پژوهشی"

تأثیر خوراکی عصاره پوست لیموترش (*Citrus limon*) ریزپوشانی شده با نانوذرات کیتوزان بر فراسنجه‌های خونی و دستگاه دفاع ضد اکسایشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

عباس قیطاسی، سید پژمان حسینی شکرابی*، هومن رجبی اسلامی، مهدی شمسایی مهرجان
گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۲۴

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۷/۲۵

کلمات کلیدی

چکیده

این تحقیق برای ارزیابی اثرات سطوح خوراکی عصاره پوست لیمو ریزپوشانی شده با ذرات نانوکیتوزان بر فراسنجه‌های خونی و وضعیت ضد اکسایشی بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد. به این منظور، ماهیان (۴/۷۴ ± ۰/۱۴ گرم) در ۱۲ مخزن فایبرگلاسی با تراکم ۲۰ قطعه ماهی توزیع و طی مدت ۸ هفته با تیمارهای مختلف نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره پوست لیموترش (صفر (شاهد)، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱٪ در خوراک) در سه تکرار تغذیه شدند. بالاترین تعداد گلبول قرمز در تیمار ۱٪ در مقایسه با تیمار ۰/۵٪ و گروه شاهد مشاهده شد ($p < 0/05$). بیشینه غلظت هموگلوبین در تیمارهای ۱ و ۰/۷۵٪ در مقایسه با دیگر گروه‌های آزمایشی یافت شد ($p < 0/05$). همچنین، در بررسی شاخص‌های خونی، شاخص هموگلوبین متوسط سلولی افزایش معناداری در تیمارهای ۱ و ۰/۷۵٪ نسبت به دیگر تیمارها مشاهده شد. بیشینه تعداد گلبول‌های سفید و لنفوسیت‌ها در تیمار ۱٪ نسبت به دیگر گروه‌ها مشاهده شد ($p < 0/05$). از آنزیم‌های ضد اکسایشی سرم، بیشینه فعالیت کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در تیمار ۱٪ نسبت به دیگر گروه‌ها دیده شد ($p < 0/05$). همچنین، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در تیمار ۱٪ به‌طور معنی‌دار نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ($p < 0/05$), در حالی که تیمارهای ۰/۷۵ و ۱٪ منجر به بهبود معنی‌دار در غلظت مالون‌دی‌آلدهید سرم در مقایسه با تیمارهای ۰/۵٪ و شاهد شد ($p < 0/05$). در مجموع، نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن سطوح خوراکی عصاره پوست لیمو پوشش داده شده با ذرات نانوکیتوزان به خصوص در سطح ۱٪ موجب بهبود فراسنجه‌های خونی و دفاع ضد اکسایشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود.

مقدمه

آبزی‌پروری یکی از سریع‌ترین روش‌های تولید پروتئین حیوانی برای مصارف انسانی است. امروزه استفاده از روش‌های متراکم و فوق متراکم تولید آبزیان سبب شده تا به استفاده از مکمل‌های غذایی برای تقویت جنبه‌های مختلف تولید مانند عملکرد رشد و همچنین، بهبود شاخص‌های خونی، وضعیت ضد اکسایشی و افزایش مقاومت و ایمنی ماهیان بیش از پیش توجه شود. به‌طور کلی، بیشینه سوددهی در صنعت آبزی-پروری از طریق بهبود برآیندی از شرایط کیفی آب، خوراک و کنترل بیماری‌ها مقدور است (Dawood et al. 2018). در این زمینه، گیاهان دارویی با داشتن مزیت‌هایی از جمله عوارض جانبی کم، سهولت دسترسی، امکان تولید در سطح وسیع، قیمت مناسب، عدم ایجاد مقاومت نسبی عوامل بیماری‌زا به داروهای گیاهی و دوست‌دار محیط زیست، جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی محسوب می‌شوند (Gholipourkanani et al. 2019; Doan et al. 2020). این ترکیبات طبیعی برای جایگزینی با ترکیبات صناعی شیمیایی مثل آنتی‌بیوتیک‌ها توان بالقوه بالایی داشته و تحقیقات متعددی نیز بر روی اثرات مثبت مکمل‌سازی خوراک آبزیان با گیاهان دارویی و مشتقات آنها به خصوص عصاره‌های گیاهی را بر عملکرد رشد و کارایی خوراک، ظرفیت ضد اکسایشی، پاسخ‌های ایمنی و فراسنجه‌های خونی در ماهیان انجام شده است (Citarasu, 2010).

فعالیت زیست‌شناختی عصاره‌های گیاهی غالباً وابسته به ترکیبات زیست‌فعال آنهاست که مسئول خواص ضد باکتریایی و ضد اکسایشی روغن عصاره بوده و مصرف آنها فرآیندهای بیوشیمیایی مختلفی را در بدن میزبان تحت تأثیر قرار می‌دهند (Gibbs et al. 1999). به‌رغم وجود خواص مفید عصاره‌های گیاهی، این ترکیبات در محیط ناپایدار هستند و در مقابل شرایط محیطی نامساعد مانند اکسیده‌شدن در برابر اکسیژن، آب (فرآیند تجزیه اترها و استرها) و نور (که باعث انتقال دادن منوترپن‌ها، هیدروکربن‌ها و سنوکوئوترپن‌های غیراشباع می‌شود) تبخیر و تجزیه شده و در نتیجه، استفاده از این ترکیبات را در صنعت با محدودیت‌هایی مواجه ساخته است (Aanyu et al. 2018).

پوشش‌دار کردن یا کپسول‌دار کردن فرآیندی است که طی آن ترکیبات فعال ماده اولیه، درون پوششی از ماده ثانویه (دیواره) نگهداری می‌شوند. با توجه به فرار بودن عصاره‌های گیاهی، روش کپسول‌دار کردن، از طریق احاطه ترکیب گیاهی برای جلوگیری از به هدر رفتن آن و همچنین، رسیدن ماده مؤثره به آبزی طی فرآیند تغذیه استفاده می‌شود (Cros et al. 2011). انتخاب ماده مناسب برای ساخت دیواره مواد ریزپوشانی شده که توانایی و پایداری مناسب در مقابل عوامل محیطی را در طی زمان داشته باشد، از جمله اقدامات کلیدی در فرآیند ریزپوشانی محسوب می‌شود. در این میان، زیست‌پلی‌مر کیتوزان (ماده حاصل از کیتین) قابلیت تشکیل پیوندهای الکترواستاتیکی نسبتاً قوی با بیشتر ترکیبات گیاهی (عصاره و عصاره‌ها) دارد که در نتیجه، کپسول‌هایی پایدار را به‌وجود می‌آورند (Kabanov and Novinyuk, 2020). در مطالعه انجام شده توسط Alishahi و همکاران (۲۰۱۱)، استفاده از نانوذرات کیتوزان حاوی ویتامین C در جیره غذایی موجب بهبود شاخص‌های ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان شده است.

در تحقیقات گذشته بیان شده که گیاهان دارویی و مشتقات آنها می‌توانند وضعیت سلامت ماهی و توانایی ایمنی و ضد اکسایشی بدن را بهبود بخشیده و باعث تحریک اریتروپویزیس (افزایش گلبول‌های قرمز، سطح هموگلوبین و هماتوکریت) و لنفوسیتوز (افزایش لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها) شوند (Bulfony et al. 2015). این گیاهان با توجه به دارا بودن ترکیبات زیست‌فعال مختلف، بسیاری از فعالیت‌های زیستی بدن، مانند عوامل دخیل در دستگاه ایمنی و ضد اکسایشی آبزیان را بهبود می‌بخشند (Van Hai, 2015).

در این میان، لیموترش (*Citrus limon*) متعلق به سر رده مرکبات است که خاستگاه اصلی آن در کشور هند بوده و از آنجا به سراسر جهان راه یافته است. به‌طور کلی، عصاره پوست لیموترش مخلوطی با بیش از ۴۰۰ ترکیب شناخته شده دارد که به دو بخش فرار (۸۵ تا ۹۰٪ کل عصاره) و غیر فرار (۱۰ تا ۱۵٪) تقسیم می‌شود (Zuzarte and Salgueiro, 2015; Caputo et al. 2020). یکی از مهمترین ترکیبات زیست‌فعال این عصاره، ماده لیمونن است که خواص ضد باکتریایی، ضد التهابی، ضد اکسایشی و ضد ویروسی آن اثبات

در غلظت‌های مختلف (شامل: صفر (شاهد)، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱٪) با نانوذرات تری‌پلی‌فسفات مخلوط و در ادامه با کمک همزن مغناطیسی برای ۱ ساعت با سرعت ملایم هم زده شد تا ارتباط بین نانوذرات تری‌پلی‌فسفات با سطوح مختلف عصاره پوست لیمو فراهم آید. سپس، نانوذرات با کمک دستگاه اولتراسانتریفوژ در دور ۱۶۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه به دو فاز مجزا تفکیک شدند. در ادامه مایع فوقانی جدا و رسوب تحتانی جمع‌آوری گردید. رسوبات توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی (Christ Alpha 1-4, Christ Co., Germany) در دمای ۵۴- درجه سانتی‌گراد و فشار ۰/۰۴ میلی‌بار به مدت ۲۴ ساعت خشک شده و در یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد (Alishahi et al. 2011).

اندازه‌گیری اندازه ذرات، پتانسیل زتا و ذرات باردار شده نانو کیتوزان-عصاره پوست لیموترش با استفاده از روش پراکندگی نوری توسط دستگاه پراکندگی نور دینامیکی (Malvern Zetasizer Nano S, Malvern Instruments, England) در دمای محیط در دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه پردیس تهران انجام شد. همچنین، ریخت‌شناسی ذرات توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (Vega3, Tescan Co. Ltd., Brno, Czech Republic) در ولتاژ ۲۰ کیلووات مشخص شد (Khanmohammadi et al. 2015).

شرایط پرورش و نگهداری ماهیان

این تحقیق در یک دوره ۸ هفته‌ای در تابستان سال ۱۳۹۹ در یک مرکز خصوصی پرورش ماهیان سردابی در الیگودرز (لرستان، ایران) انجام شد. ابتدا برای سازگار کردن ماهیان با محیط جدید پرورشی، تعداد ۲۴۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی 0.14 ± 0.04 گرم در ۱۲ مخزن فایبرگلاس با حجم ۱۵۰ لیتر آب (هر مخزن شامل ۲۰ قطعه ماهی) با شرایط محیطی مشابه به صورت تصادفی توزیع شدند. آب مورد استفاده برای تغذیه، آب چاه بود (دبی ۱۴ لیتر بر ثانیه) که برای حذف آهن قبل از ورود به مخازن پرورشی هوادهی شد. در طی دوره آزمایش دمای آب توسط دماسنج جیوه‌ای به صورت روزانه و دیگر فراسنجه‌های فیزیوشیمیایی

شده است (Alfonzo et al. 2017). تاکنون در تحقیقات متعدد، اثرات تجویز خوراکی عصاره لیموترش را در ماهیان بررسی شده که می‌توان به ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)؛ امیری رسکتی و همکاران، (Amiri Resketi et al. 2021) و ماهی تیلاپپای نیل (*Oreochromis niloticus*)؛ Mohamed et al. (2020) اشاره کرد.

فواید متعدد پوست لیموترش به عنوان یک مکمل خوراکی غنی از ترکیبات زیست‌فعال از یک طرف و از طرف دیگر مشکلات مربوط به استفاده از عصاره‌های گیاهی به صورت مستقیم در جیره غذایی، محققان را بر آن داشت تا با استفاده از روش ریزپوشانی کردن، اثر سطوح مختلف عصاره پوست لیموترش را بر تغییرات خونی و دستگاه دفاع ضد اکسایشی را برای اولین بار روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مطالعه کنند.

مواد و روش‌ها

کپسول‌دار کردن عصاره پوست لیمو با ذرات نانوکیتوزان

فرآیند کپسول‌دار کردن عصاره پوست لیمو با ذرات نانوکیتوزان در مجتمع آزمایشگاهی رازی (دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران) انجام شد. در این تحقیق، کیتوزان با وزن مولکولی پایین (شرکت سیگما، ۱۵۰ کیلودالتون) به نسبت ۱٪ (وزنی/حجمی) در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید استیک (۰/۱٪) و عصاره پوست لیموترش (شرکت باریج اسانس) تا زمانی که رنگ محلول شفاف شود، حل شد (Alishahi et al. 2011). همچنین، تری‌پلی‌فسفات سدیم (۲٪) نیز به طور همزمان به غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در آب دیونیزه حل شد. سپس، محلول کیتوزان با محلول تری‌پلی‌فسفات سدیم مخلوط شد تا نانو ذرات تری‌پلی‌فسفات-کیتوزان از طریق تشکیل ژل یونیزه به صورت خود به خود تشکیل شده و محلول نانوذرات برای ۶۰ دقیقه در دمای اتاق روی مگنت برقی به خوبی مخلوط شد. نانوذرات تری‌پلی‌فسفات-کیتوزان-عصاره لیمو از طریق تشکیل ژل یونیزه بین ذرات دارای بار مثبت آمینی کیتوزان با عصاره لیمو آماده شد. عصاره پوست لیمو برای این منظور

خون‌گیری

در انتهای روز ۵۶ آزمایش، تغذیه ماهیان به مدت ۲۴ ساعت قطع شد و نمونه‌گیری از سه قطعه ماهی از هر مخزن یا تکرار (۹ ماهی از هر تیمار) به صورت کاملاً تصادفی انجام شد. سپس، بعد از بیهوش کردن ماهیان با پودر گل میخک (ppm ۱۵۰)، عملیات خون‌گیری از سیاهرگ ساقه دمی به میزان تقریبی ۲ میلی‌لیتر خون انجام شد. تقریباً نصف این مقدار به لوله‌های حاوی ماده هپارین (ضد انعقاد) و باقیمانده به لوله‌های فاقد هپارین (برای تهیه سرم) انتقال داده شد. نمونه‌های سرم از لوله‌های خون فاقد ماده ضد انعقاد با کمک دستگاه سانتریفیوژ با دور ۴۵۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جدا، و تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

اندازه‌گیری فراسنجه‌های خونی

شاخص‌های خونی شامل شمارش گلبول‌های سفید و قرمز، غلظت هموگلوبین و درصد هماتوکریت اندازه‌گیری شدند. شمارش گلبول‌های قرمز و سفید توسط لام ثوبار با شمارش مجموع گلبول‌های موجود در ۵ خانه از قسمت‌های مجزای لام و ضرب میانگین اعداد در ۱۰۰۰۰ به دست آمد تا تعداد گلبول‌ها بر حسب عدد در میلی‌متر مکعب مشخص شود (Sandnes et al. 1987). تعیین میزان هماتوکریت نیز از طریق سانتریفیوژ لوله‌های موئین حاوی خون به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد. اندازه‌گیری غلظت هموگلوبین از محلول درابکین به روش سیانو مت هموگلوبین انجام شد (Sandnes et al. 1987). شاخص‌های خونی شامل حجم متوسط گلبولی (MCV)، وزن هموگلوبین داخل گلبولی (MCH) و غلظت هموگلوبین داخل گلبولی (MCHC) طبق روابط زیر اندازه‌گیری شد:

$$\frac{\text{هماتوکریت} \times 10}{\text{گلبول قرمز به میلیون}} = \text{MCV (Mean corpuscular volume)}$$

$$\frac{\text{هموگلوبین} \times 10}{\text{گلبول قرمز به میلیون}} = \text{MCH (Mean corpuscular hemoglobin)}$$

$$\frac{\text{هموگلوبین} \times 100}{\text{هماتوکریت}} = \text{MCHC (Mean corpuscular hemoglobin concentration)}$$

آب از قبیل pH (توسط pH متر AL15-AQUA)، اکسیژن (توسط اکسیژن‌متر AL15-AQUA LYTIC) و آمونیاک به‌طور متناوب اندازه‌گیری شدند. میانگین شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی آب در طی دوره پرورش شامل دما $1 \pm 12/4$ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول $0/3 \pm 7/8$ میلی‌گرم در لیتر، آمونیاک کمتر از $0/00 \pm 0/01$ میلی‌گرم در لیتر و pH برابر $0/3 \pm 7/6$ بود.

آماده‌سازی جیره‌های آزمایشی

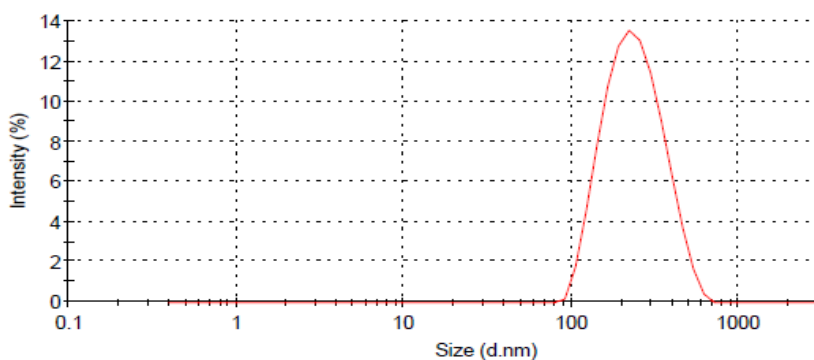
ماهیان با شرایط جدید پرورشی به مدت ۱۴ روز با غذای پایه (خوراک تجاری ماهی قزل‌آلا، شرکت کیمیاگران تغذیه، شهرکرد، ایران) تغذیه شدند. جیره پایه حاوی $0/1 \pm 50/5\%$ پروتئین خام، $0/5 \pm 13/1\%$ چربی خام، $0/8 \pm 11/7\%$ خاکستر و $0/8 \pm 2/4\%$ فیبر بود. لازم به ذکر است که جیره تجاری برای اطمینان، عاری از هرگونه مکمل‌های گیاهان دارویی و مشتقات آنها، پروبیوتیک و پری بیوتیک سفارش داده شد. مطالعه اخیر به صورت یک طرح تصادفی در قالب ۴ تیمار با ۳ تکرار انجام شد، به طوری که در این مطالعه، سطوح مختلف نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره پوست لیموترش شامل صفر (شاهد)، $0/5$ ، $0/75$ و 1% به صورت یک‌نواخت و همگن به جیره پایه اضافه، و سپس با محلول ژلاتین (۲٪) پوشش داده شد. جیره‌های آزمایشی به صورت هفتگی تهیه، و در فریزر -20 درجه سانتی‌گراد تا زمان غذادهی نگهداری شدند. در این بررسی در گروه شاهد تنها از هم بند (ژلاتین) بدون هرگونه افزودنی استفاده شد. غذادهی بچه‌ماهیان بر حسب رسیدن به سیری ظاهری به مدت ۵۶ روز و ۴ بار در روز انجام شد. در طی دوره تغذیه، هر روز مدفوع و دیگر مواد باقی مانده از کف مخازن سیفون و جمع‌آوری می‌شد. هر روز حدوداً 30% آب هر تراف تعویض می‌شد.

تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ انجام شد. ابتدا آزمون‌های کولموگروف-اسمیرنوف و آزمون لون (Levene's test) به ترتیب برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها و برابری واریانس آنها انجام شد. در ادامه، داده‌ها با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه داده‌ها (ANOVA) سنجش، و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ ($p < 0.05$) انجام شد.

نتایج

نتایج اندازه ذرات نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره پوست لیمو توسط دستگاه DSL در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که تمامی ذرات قطر ۲۵۹/۷ نانومتر داشتند. توزیع باریک بودن و تک-اندازه بودن ذرات تولید شده بیانگر این مطلب بوده است.



شکل ۱ طیف مربوط به بررسی اندازه تأثیر نانو ذرات کیتوزان حاوی عصاره پوست لیموترش با دستگاه زتاسایزر.

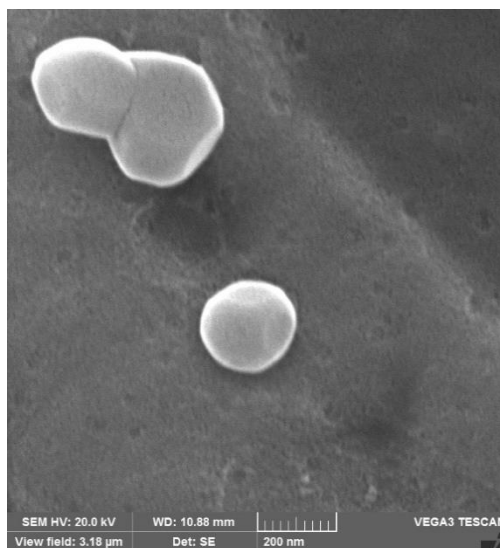
هستند که بیانگر کارایی بالا و روش صحیح نانوکپسوله کردن ذرات بوده است.

همچنین، شناسایی افتراقی گلبول‌های سفید و تعیین درصد هر گروه از آن‌ها نیز با تهیه گسترش خونی و رنگ‌آمیزی به روش گیمسا انجام شد، به طوری که تعداد ۱۰۰ عدد گلبول سفید برای فراوانی انواع گلبول‌های سفید (لنفوسیت، مونوسیت، نوتروفیل، ائوزینوفیل و بازوفیل) از هر نمونه پس از خشک شدن و تثبیت در دمای اتاق، در زیر میکروسکوپ نوری شناسایی و نسبت هریک از انواع آن‌ها تعیین شد (Brown, 1988).

فعالیت آنزیم‌های ضد اکسایشی سرم

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و کاتالاز (CAT) و همچنین سطح مالون دی‌آلدهید (MDA) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-Vis Carry 50 Scan, Varian Inc., USA) و کیت‌های تجاری شرکت ZellBio ساخت کشور آلمان طبق دستورالعمل شرکت سازنده به ترتیب در طول موج‌های ۵۵۰، ۴۱۲، ۴۰۵ و ۵۳۵ نانومتر انجام شد.

ریخت‌شناسی نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره پوست لیمو در زیر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) بررسی (شکل ۲) و مشاهده شد که ساختار ذرات کروی با سطحی صاف



شکل ۲ بررسی شکل نانو ذرات کیتوزان حاوی عصاره پوست لیموترش توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM).

MCHC هم به‌رغم اینکه بیشترین میزان این شاخص در تیمار ۱٪ مشاهده شد ولی این اختلاف با دیگر تیمارها معنی‌دار نبود ($p > 0/05$).

تغییرات شاخص‌های افتراقی گلبول‌های سفید خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره پوست لیموترش در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که درصد لنفوسیت در تیمار ۱٪ نسبت به دیگر تیمارها به‌طور معنی‌دار افزایش یافت ($p < 0/05$). همچنین، درصد مونوسیت به‌طور معنی‌دار در تیمار ۱٪ نسبت به تیمار ۰/۵٪ و گروه شاهد بالاتر بود ($p < 0/05$). در نقطه مقابل کمترین درصد نوتروفیل در تیمار ۱٪ (14 ± 1) و بیشترین درصد ($16/67 \pm 0/58$) در گروه شاهد مشاهده شد ($p < 0/05$). اختلاف معنی‌داری در درصد ائوزینوفیل بین تیمارهای مختلف آزمایشی مشاهده نشد ($p > 0/05$).

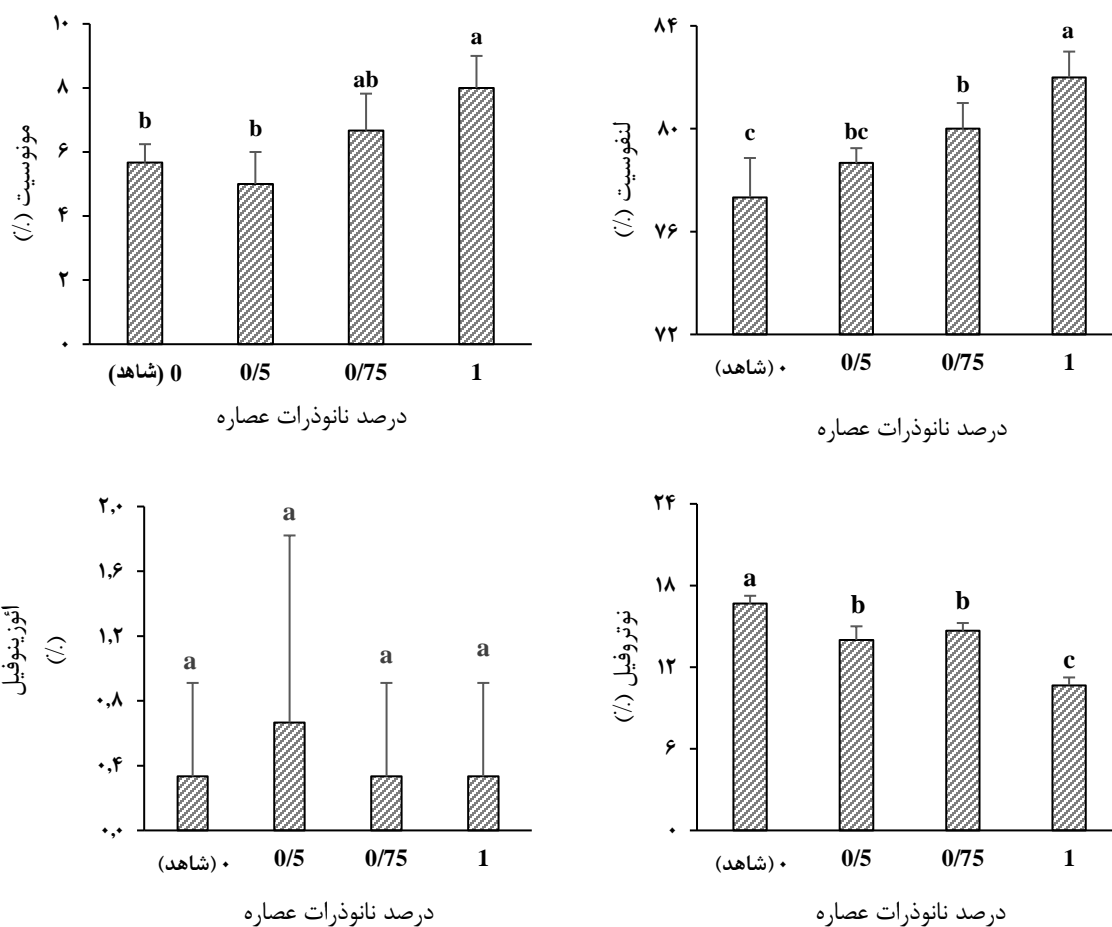
نتایج به دست آمده از بررسی فراسنجه‌های خونی در جدول ۱ خلاصه شده است. نتایج نشان دهنده روند افزایشی تعداد گلبول‌های سفید و قرمز خون، میزان هموگلوبین و درصد هماتوکریت تیمارها با افزایش میزان نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره پوست لیموترش در جیره است، به طوری که بالاترین تعداد گلبول قرمز در تیمار ۱٪ در مقایسه با تیمار ۰/۵٪ و گروه شاهد دیده شد ($p < 0/05$). غلظت هموگلوبین در تیمارهای ۱٪ و ۰/۷۵٪ در مقایسه با دیگر گروه‌های آزمایشی بیشتر بود ($p < 0/05$). همچنین، میزان هماتوکریت در تیمارهای تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره پوست لیموترش ریزپوشانی با نانوذرات کیتوزان افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه دریافت کننده جیره پایه (گروه شاهد) نشان داد ($p < 0/05$).

در بررسی شاخص MCV بین گروه شاهد و ماهیان دریافت کننده عصاره پوست لیموترش اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0/05$), در حالی که شاخص MCH در تیمارهای ۰/۷۵٪ و ۱٪ نسبت به گروه شاهد و تیمار ۰/۵٪ افزایش معنی‌داری نشان داد ($p < 0/05$). در مورد شاخص

جدول ۱ تغییرات فراسنجه‌های خونی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با خوراک‌های غنی شده با سطوح مختلف نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره پوست لیموترش.

شاخص خونی	صفر (شاهد)	۰/۵	۰/۷۵	۱
گلبول قرمز (تعداد در میلی‌متر مکعب $\times 10^6$)	$1/13 \pm 0/07^c$	$1/22 \pm 0/09^b$	$1/25 \pm 0/04^{ab}$	$1/29 \pm 0/04^a$
گلبول سفید (تعداد در میلی‌متر مکعب $\times 10^2$)	$4/72 \pm 0/23^d$	$5/42 \pm 0/31^c$	$6/1 \pm 0/16^b$	$6/73 \pm 0/27^a$
هموگلوبین (گرم/دسی لیتر)	$7/00 \pm 0/37^c$	$7/51 \pm 0/42^b$	$8/44 \pm 0/55^a$	$8/50 \pm 0/61^a$
هماتوکریت (%)	$37/61 \pm 1/55^b$	$39/84 \pm 1/67^a$	$41/27 \pm 1/81^a$	$42/66 \pm 1/40^a$
MCV (فمتولیتر)	$332/83 \pm 10/61^a$	$326/55 \pm 8/72^a$	$330/16 \pm 16/78^a$	$330/69 \pm 14/95^a$
MCH (پیکوگرم/سلول)	$61/94 \pm 1/96^b$	$61/55 \pm 3/26^b$	$67/52 \pm 3/84^a$	$65/89 \pm 2/80^a$
MCHC (گرم در دسی لیتر)	$18/61 \pm 1/59^a$	$18/85 \pm 2/11^a$	$20/45 \pm 1/90^a$	$20/43 \pm 1/75^a$

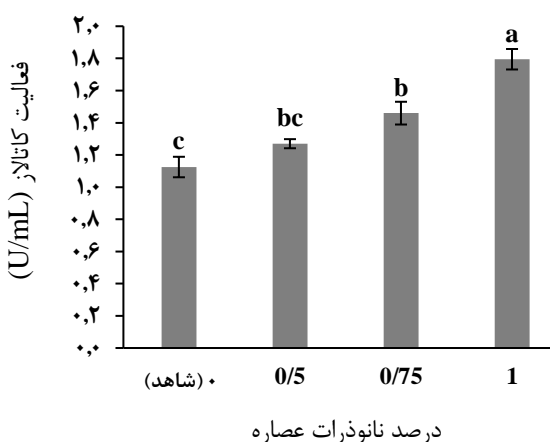
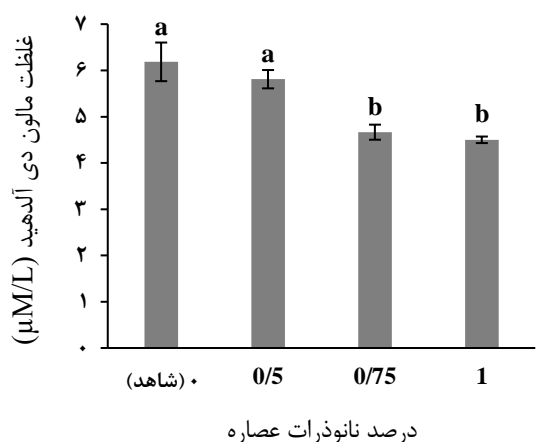
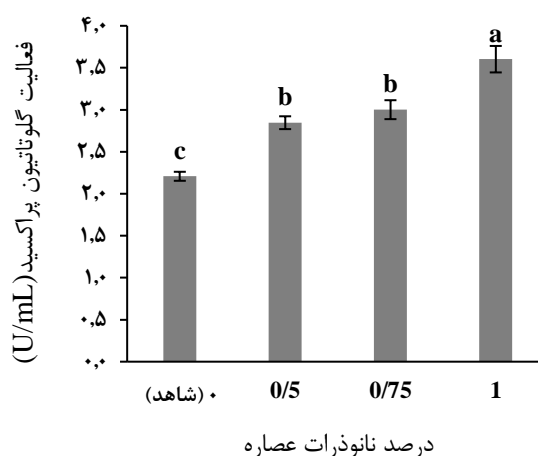
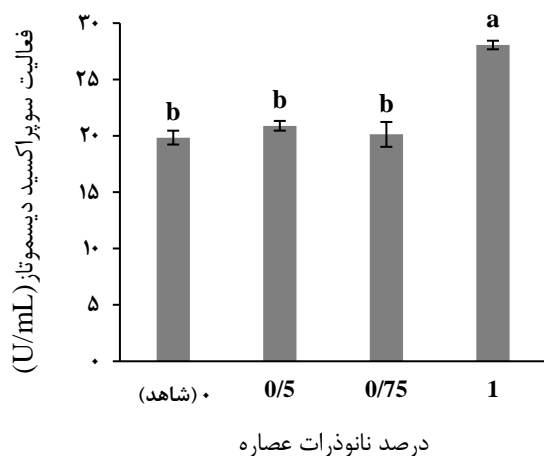
حروف غیر همسان در هر ردیف بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است ($p < 0/05$). حجم متوسط گلبولی (MCV)، غلظت هموگلوبین داخل گلبولی (MCHC) و وزن هموگلوبین داخل گلبولی (MCH).



شکل ۳ تغییرات شاخص‌های افتراقی گلبول‌های سفید خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره پوست لیموترش. حروف غیر همسان بیانگر اختلاف معنی‌دار است ($p < 0/05$).

۱٪ ($3/6 \pm 0/16$ U/mL) و شاهد ($2/21 \pm 0/05$ U/mL) مشاهده شد ($p < 0/05$). برای فعالیت آنزیم CAT، تیمار ۰/۵٪ تفاوت معنی‌داری با تیمارهای ۰/۷۵٪ و شاهد نداشت، درحالی‌که بالاترین مقدار فعالیت این آنزیم در ماهی تغذیه شده با ۱٪ عصاره ($1/8 \pm 0/06$ U/mL) ثبت شد ($p < 0/05$). سطح MDA سرم با افزایش غلظت عصاره یک روند نزولی داشته و حداقل مقدار آن در تیمارهای ۰/۷۵ و ۱٪ نسبت به بقیه گروه‌های آزمایشی دیده شد ($p < 0/05$).

با توجه به شکل ۴، فعالیت SOD در ماهیانی که جیره‌های غذایی پایه (بدون افزودنی)، ۰/۵ و ۰/۷۵٪ عصاره پوست لیمو ریزپوشانی شده با نانوکیتوزان را دریافت کرده بود، تغییر معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0/05$)، در حالی که این آنزیم در سرم ماهیان تغذیه شده با ۱٪ عصاره بیش از دیگران بود ($p < 0/05$). در خصوص فعالیت آنزیم GPx، تمام ماهیان تیمار شده نسبت به گروه شاهد فعالیت بالاتری داشته و همچنین بیشینه و کمینه فعالیت این آنزیم به ترتیب در تیمار



شکل ۴ تغییرات آنزیم‌های ضدکسایشی شامل سوپر اکسید دیسموتاز، گلووتاتیون پراکسیداز و کاتالاز و همچنین غلظت مالون دی آلدئید در نمونه‌های سرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره پوست لیموترش. حروف غیر همسان بیانگر اختلاف معنی‌دار است ($p < 0/05$).

بحث

بین شاخص‌های خونی، غلظت هموگلوبین خون ماهیان تحت آزمایش، بیشترین مقدار در تیمارهای ۱ و ۰/۷۵٪ مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با تیمار ۰/۵٪ و گروه شاهد داشت. علاوه بر این، سطح هماتوکریت خون ماهیان تیمار نسبت به گروه شاهد بهبود یافت. در مطالعه‌ای مشابه، امیری رستکی و همکاران (۱۳۹۸) گزارش کردند که استفاده از سطوح مختلف عصاره پوست سیر به‌خصوص در غلظت‌های ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم موجب افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های قرمز و سفید، غلظت هموگلوبین و درصد هماتوکریت خون بچه ماهی جوان قزل‌آلای رنگین کمان شده است. همسو با نتایج این مطالعه، اریتروگرام (شامل تعداد گلبول قرمز، غلظت هموگلوبین و درصد هماتوکریت) ماهی تیلاپپای نیل که از جیره‌های غذایی حاوی عصاره پوست مرکبات تغذیه کرده بود، افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان داد (Mohamed et al. 2021). افزایش تعداد گلبول قرمز و غلظت هموگلوبین با افزایش مکمل غذایی عصاره پوست لیموترش از ۱ به ۵٪ در جیره غذایی ماهی کپور هندی *Labeo victorinus* گزارش شده است (Ngugi et al. 2017). در یک تحقیق مشابه دیگر، Samavat و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که تجویز خوراکی عصاره پوست گریپ‌فروت (*C. paradisi*) به مقدار ۲۵ گرم در کیلوگرم خوراک سبب بهبود فراسنجه‌های خونی بچه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) شد. محققان دلیل این افزایش را به وجود آهن در این عصاره گیاهی نسبت داده‌اند. در همین راستا امیری رستکی و همکاران (۱۳۹۸) گزارش کردند که استفاده از سطوح خوراکی عصاره پوست لیموترش به خصوص به میزان ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان جوان سبب بهبود عملکرد رشد و فراسنجه‌های خونی شامل تعداد گلبول‌های قرمز، غلظت هموگلوبین و هماتوکریت نسبت به گروه شاهد می‌شود. هرچند که این محققان نشان دادند که افزودن عصاره در جیره سبب تغییرات معنی‌دار در شاخص‌های خونی MCV، MCH و MCHC نمی‌شود. در حقیقت بهبود فراسنجه‌های خونی در ماهیانی که با رژیم غذایی حاوی عصاره لیموترش تغذیه می‌شوند، احتمالاً ناشی از تأثیرات ترکیبات ضداکسایشی، فنولیک و ترپنوئیدی و همچنین ویتامین C

با توجه به روند رو به رشد روش‌های پرورش متراکم و فوق متراکم آبی‌پروری و به تبع آن بروز استرس در محیط پرورش، توان دفاعی ماهی در برابر عوامل بیماری‌زا و همچنین استرس‌های محیطی کاهش پیدا کرده است که از جمله راهکارها برای ارتقای دستگاه ایمنی و افزایش مقاومت ماهی‌ها می‌توان به استفاده از گیاهان دارویی و مشتقات آنها (عصاره‌ها) به‌عنوان مواد محرک رشد و همچنین، بهبود دهنده دستگاه ایمنی و ضداکسایشی اشاره کرد (Citarasu, 2010)، در حالی که ترکیبات عصاره گیاهان فرار بوده و از دسترس موجود به راحتی خارج می‌شود. در همین راستا، علم نانوفناوری توانسته با انتقال پایدار ریزمغذی‌ها، مواد و اجزای غذایی با پایداری کم نقش مهمی را در صنعت خوراک دام، طیور و آبزیان ایفا کند (Bouwmeester et al. 2009). در تحقیق حاضر نیز عصاره فرار پوست لیمو توسط ذرات نانو کیتوزان پوشش‌دهی شده و با مصرف آن توسط ماهی قزل‌آلای رنگین کمان، فراسنجه‌های خون‌شناختی و ظرفیت ضداکسایشی آن بهبود یافت.

آزمایش‌های خون‌شناسی و سنجش اجزای آن، روشی مناسب برای تشخیص مشکلات سوخت و سازی، وضعیت تغذیه و همچنین، ارزیابی وضعیت سلامت کلی ماهیان در شرایط مختلف است (Adel et al. 2015). در این میان، شاخص‌های خون‌شناختی مانند تعداد گلبول‌های قرمز، غلظت هموگلوبین و درصد هماتوکریت، شاخص‌هایی کاربردی در تعیین ظرفیت انتقال اکسیژن و نشان‌دهنده مقدار اکسیژن در دسترس برای ماهیان هستند و شاخص مناسبی برای تعیین وضعیت سلامتی آبزیان تلقی می‌شوند (Rashmei et al. 2021). در همین راستا، نتایج به‌دست‌آمده از محاسبه تعداد گلبول‌های قرمز نشان داد این شاخص در تیمار آزمایشی ۱٪ در مقایسه با تیمار ۰/۵٪ و گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشته و کمترین مقدار در گروه دریافت‌کننده جیره پایه (گروه شاهد) به‌دست‌آمد. لذا، نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره پوست لیموترش در سطح ۱ و ۰/۷۵٪ تأثیر مثبتی بر عملکرد بافت‌های خونساز ماهی و بهبود شاخص‌های خونی داشته و با افزایش جذب آهن از روده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان موجب بهبود این شاخص‌ها شده است (Wang et al. 2020). در

ذرات کیتوزان حاوی عصاره پوست لیموترش نسبت به تیمار شاهد نشان دهنده قدرت مقابله بالاتر ماهیان در برابر عوامل عفونی و استرس‌زا است (Velmurugan et al. 2017). نتایج نشان داد که بیشترین تعداد گلبول‌های سفید خون در تیمار ۱٪ مشاهده شد که بیان‌گر تقویت دستگاه ایمنی ماهیان تغذیه‌شده با این مکمل طبیعی-گیاهی است. به طور مشابه، بالاترین تعداد گلبول سفید و همچنین دیگر شاخص‌های ایمنی خون در قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه‌شده با عصاره‌های مرزه خوزستانی، گیاه زرین گیاه و پونه کوهی مشاهده شد (قاسمی پیربلوطی و همکاران، ۱۳۹۰). شناسایی افتراقی گلبول‌های سفید در تیمارهای آزمایشی نانو ذرات کیتوزان حاوی عصاره پوست لیموترش نشان داد که تیمار ۱٪ واجد کمترین درصد نوتروفیل بوده و تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد داشته است. در نقطه مقابل، بیشترین درصد لنفوسیت و مونوسیت در این تیمار مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با دیگر تیمارها داشته است. افزایش معنی‌دار لنفوسیت‌ها در تیمار ۱٪ ممکن است نشان دهنده تأثیر این گیاه در افزایش تولید لنفوسیت‌ها در بافت لنفوئیدی، مانند بخش قدامی کلیه و طحال باشد (Wang et al. 2020). افزایش درصد لنفوسیت و مونوسیت در ماهیان موجب افزایش خاصیت بیگانه‌خواری سلول‌ها و افزایش پاسخ‌های ایمنی ماهی می‌شود (Adel et al. 2019). این امر ممکن است در افزایش ایمنی سلولی و حتی افزایش کارایی ایمنی اکتسابی نیز مؤثر باشد. گزارش شده است که ترکیبات زیست‌فعال موجود در عصاره لیموترش به‌خصوص ترکیب لیمون اثر محرک ایمنی در میزبان دارد (Vieira et al. 2018). در این راستا Abdel-Latif و همکاران (۲۰۲۰) اظهار داشت که مکمل غذایی عصاره پونه کوهی در ۱۵ گرم در کیلوگرم سبب افزایش معنی‌دار سطح فعالیت لایزوزیم سرم، فعالیت بیگانه‌خواری و تعداد گلبول‌های سفید می‌شود. علاوه بر این، Acar و همکاران (۲۰۱۵) و Baba و همکاران (۲۰۱۶) به این نتیجه رسیدند که جیره‌های غذایی به‌ترتیب ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و تیلاپیای موزامبیک (*O. mossambicus*) غنی‌شده با عصاره پوست لیمو و پرتقال، پاسخ‌های ایمنی را بهبود می‌بخشند.

موجود در این عصاره بوده که از کم خونی ناشی از کمبود آهن جلوگیری می‌کند (Amiri Resketi et al. 2021). همچنین، نتایج به دست آمده از مطالعه Bilen و همکاران (۲۰۲۰) روی تأثیر عصاره به لیمو بر روی رشد و شاخص‌های ایمنی قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز نتایج نشان‌دهنده افزایش تعداد گلبول سفید و بهبود ایمنی غیر اختصاصی و بقا بود که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت. در تحقیق مشابه دیگری، اکبری و یونسی (۱۳۹۶) نشان دادند که ماهی کفال خاکستری تغذیه شده با غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ گرم کیتوزان در کیلوگرم خوراک واجد مقادیر بالایی از تعداد گلبول‌های سفید و شاخص‌های غلظت هموگلوبین، MCHC و MCV خون شد که این تفاوت با بقیه تیمارها به‌خصوص تیمار دریافت کننده خوراک پایه (بدون افزودنی) معنی‌دار بود. در تحقیق حاضر، شاخص‌های خونی شامل MCV، بین گروه شاهد و ماهیان دریافت کننده عصاره پوست لیموترش اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد، در حالی که در شاخص MCH اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای ۰/۷۵ و ۱٪ نسبت به گروه شاهد و ۰/۵٪ مشاهده شد. در مورد شاخص MCHC هم به‌رغم اینکه بیشترین میزان این شاخص در تیمار ۱٪ مشاهده شد، ولی این اختلاف با دیگر تیمارها معنی‌دار نبود. استفاده از عصاره مرکبات در جیره ماهی تیلاپیا نیز سبب بهبود تعداد گلبول‌های قرمز و شاخص‌های خونی شد (Acar et al. 2015). در مطالعه مشابه دیگر، Ngugi و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که با افزایش غلظت عصاره پوست لیموترش از غلظت ۱ به ۵٪ افزایش معنی‌داری در شاخص‌های MCH و MCHC، هماتوکریت و تعداد گلبول‌های سفید و قرمز خون ماهی *L. victorianus* ایجاد می‌شود. مطالعات نشان داده است که عصاره لیموترش غنی از ترکیبات زیست‌فعال شامل هیدروکربن‌ها (مثل پین‌ها، ترپین و لیمونن) و مونوترپن‌ها هستند و این مواد اثرات مختلف ضدباکتریایی، ضدویروسی، ضدکسایشی و ضدالتهابی دارند (Acar et al. 2015) که می‌توانند بر فراسنجه‌های خونی و سرمی نیز مؤثر باشند (Ngugi et al. 2017).

گلبول‌های سفید خون یا لوکوسیت‌ها به‌عنوان سلول‌های دستگاه ایمنی، علیه عوامل آسیب‌زا و آلودگی‌ها نقش ایفا می‌کنند. بنابراین، افزایش آنها در تیمارهای تغذیه شده با نانو

به همراه کیتوزان در مقیاس نانو در راستای کاهش و جلوگیری از بروز استرس اکسیداتیو و در نهایت تشکیل MDA در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است. در حقیقت نشان داده شده است که دو ترکیب عمده در عصاره پوست لیمو شامل لیمون و لینالول می‌توانند با خصوصیات ضداکسایشی بالای خود تولید MDA را مهار کنند (Obob et al. 2014).

با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر تأثیر تیمارهای مختلف نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره پوست لیموترش به خصوص در سطح ۱٪ خوراک بر فراسنجه‌های خونی و دستگاه دفاع ضداکسایشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان کاملاً مثبت و معنی‌دار ارزیابی شد. هر چند که انجام مطالعات تکمیلی برای بررسی تأثیر این مکمل خوراکی بر بیان ژن‌های مرتبط با شاخص‌های ایمنی، عملکرد رشد و همچنین توانایی مقاومت ماهی قزل‌آلای علیه بیماری‌های عفونی شایع ویروسی و باکتریایی ضروری به نظر می‌رسد. همچنین، در تحقیقات آینده پیشنهاد می‌شود که اثرات مجزای عصاره پوست لیموترش بدون پوشش‌دهی و نانوکیتوزان در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی شود تا اثرات پوشش‌دهی عصاره پوست لیمو با نانوکیتوزان بهتر مشخص شود.

تشکر و قدردانی

از همکاری صمیمانه مسئولین شرکت آبی اکسیر کوثر و آزمایشگاه شیلات، مجتمع آزمایشگاهی رازی، واحد علوم و تحقیقات تهران دانشگاه آزاد اسلامی سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

اکبری، پ.، یونسی، آ. ۱۳۹۶ تأثیر مکمل غذایی کیتوزان بر رشد، خون‌شناسی، بیوشیمی سرم خون و ایمنی ذاتی ماهی کفال خاکستری. تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک ۱۶: ۲۰۳-۱۹۴.

امیری رستکی، م.، یگانه، س.، جانی خلیلی، خ. ۱۳۹۸. تأثیر استفاده از عصاره پوست لیموترش در جیره بر عملکرد رشد، فراسنجه‌های خونی و بیوشیمیایی سرم و آنزیم‌های کبدی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. علوم و فنون شیلات ۹: ۸-۱.

سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز مهم‌ترین آنزیم‌های ضداکسایشی هستند که نقش‌های متفاوتی در اولین خط دفاع ضداکسایشی در موجودات ایفا، و از بافت‌های بدن در برابر آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو محافظت می‌کنند، به طوری که SOD یون‌های سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌کند و آنزیم‌های CAT و GPx نیز هر دو در تخریب پراکسید هیدروژن و سم‌زدایی نقش دارند (Martínez-Álvarez et al. 2005). در مطالعات متعدد در خصوص استفاده از گیاهان دارویی و مشتقات آنها در رژیم‌های غذایی ماهیان گزارش شده که افزایش فعالیت این آنزیم‌ها با مهار یا کاهش استرس اکسیداتیو مرتبط است. برای مثال، با دانه *Silybum marianum* (Zeilab Sendijani et al. 2020)، عصاره برگ سنبل‌آبی یا *Eichhornia crassipes* (Rufchaei et al. 2020) و چای ترش یا *Hibiscus sabdariffa* (Hoseini et al. 2021) همگی به طور قابل توجهی فعالیت‌های SOD، GPx و CAT را بهبود بخشیده و همچنین استرس اکسیداتیو را سرکوب کرده‌اند. بنابراین، نتایج حاضر در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با عصاره پوست لیموترش کپسول دار شده با ذرات نانو کیتوزان نشان داد که تجویز خوراکی این مکمل در سطح ۱٪ منجر به افزایش قابل توجه دستگاه دفاع ضداکسایشی ماهی قزل‌آلای از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و GPx می‌شود. البته این یافته ممکن است با سطح بالای لیمون به‌عنوان ترکیب زیست‌فعال موجود در پوست لیموترش و نقش آن در تنظیم فعالیت آنزیم‌های ضداکسایشی مرتبط باشد (Aanyu et al. 2018).

هنگامی که دستگاه ضداکسایشی بتواند از موجود زنده در برابر پرواکسیدان‌ها و رادیکال‌های آزاد محافظت کند، از بروز استرس اکسیداتیو جلوگیری کرده و در نتیجه، لیپیدها کمتر در معرض رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن قرار گرفته و فرآیندهای پراکسیده شدن به طور چشمگیری کاهش می‌یابد و همچنین، مقدار MDA کمتری تولید می‌شود (Alagawany et al. 2021). چنین شرایطی در مطالعه حاضر و موارد قبلی تغذیه ماهیان با گیاهان دارویی گزارش شده است که نشان‌دهنده قدرت بالای عصاره پوست لیموترش

- رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). داروهای گیاهی ۲: ۱۵۵-۱۴۹.
- Aanyu, M., Betancor, M.B., Monroig, O. 2018. Effects of dietary limonene and thymol on the growth and nutritional physiology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 488: 217-226.
- Abdel-Latif, H.M., Abdel-Tawwab, M., Khafaga, A.F., Dawood, M.A. 2020. Dietary oregano essential oil improved antioxidative status, immune-related genes, and resistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish & Shellfish Immunology* 104: 1-7.
- Acar, Ü., Kesbiç, O.S., İnanan, B.E., Yılmaz, S. 2019. Effects of dietary Bergamot (*Citrus bergamia*) peel oil on growth, hematology and immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture Research* 50: 3305-3312.
- Acar, Ü., Kesbiç, O.S., Yılmaz, S., Gültepe, N., Türker, A. 2015. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. *Aquaculture* 37: 282-286
- Adel, M., Abedian Amiri, A., Zorriehzahra, J., Nematollahi, A., Esteban, M.Á. 2015. Effects of dietary peppermint (*Mentha piperita*) on growth performance, chemical body composition and hematological and immune parameters of fry Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*). *Fish & Shellfish Immunology* 45: 841-847.
- Alagawany, M., Farag, M.R., Abdelnour, S. A., Elnesr, S.S. 2021. A review on the beneficial effect of thymol on health and production of fish. *Reviews in Aquaculture* 13: 632-641.
- قاسمی پیربلوطی، ع.، پیرعلی، ا.، پیشکار، غ.، جلالی، م.ع.، ریسی، م.، جعفریان دهکردی، م.، حامدی، ب. ۱۳۹۰. اثر عصاره چند گیاه دارویی بر سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای
- Alfonzo, A., Martorana, A., Guarrasi, V., Barbera, M., Gaglio, R., Santulli, A., Settanni, L., Galati, A., Moschetti, G., Francesca, N. 2017. Effect of the lemon essential oils on the safety and sensory quality of salted sardines (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792). *Food Control* 73: 1265-1274.
- Alishahi, A., Mirvaghefi, A., Tehrani, M.R., Farahmand, H., Koshio, S., Dorkoosh, F.A., Elsabee, M.Z., 2011. Chitosan nanoparticle to carry vitamin C through the gastrointestinal tract and induce the non-specific immunity system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Carbohydrate Polymers* 86:142-146.
- Amiri Resketi, M., Yeganeh, S., Khalili, K. J. 2021. Dietary sour lemon (*Citrus limon*) peel essential oil supplementation for reduction of deltamethrin-induced stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of the World Aquaculture Society* 52: 105-123.
- Baba, E., Acar, Ü., Öntaş, C., Kesbiç, O. S., Yılmaz, S. 2016. Evaluation of *Citrus limon* peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture* 465: 13-18.
- Bilen, S., Altief, T.A.S., Özdemir, 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 and Biochemistry* 46: 471-481.
- Bouwmeester, H., Dekkers, S., Noordam, M. Y., Hagens, W.I., Bulder, A.S., de Heer, C., ten Voorde, S.E.C.G., Wijnhoven, S.W.P., Marvin, H.J.P., Sips, A.J.A.M.

2009. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 53: 52-62.
- Brown B.A. 1988. Routine hematology procedures. In: Brown B.A. 1980. *Hematology: Principle and procedures*. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, USA. 358 p.
- Bulfon, C., Volpatti, D., Galeotti, M. 2015. Current research on the use of plant-derived products in farmed fish, *Aquaculture Research* 46: 513-551.
- Caputo, L., Cornara, L., Bazzicalupo, M., De Francesco, C., De Feo, V., Trombetta, D., Smeriglio, A. 2020. Chemical composition and biological activities of essential oils from peels of three citrus species. *Molecules* 25: 1-27.
- Citarasu, T. 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International* 18: 403-414.
- Cros, S., De Bettignies, R., Berson, S., Bailly, S., Maise, P., Lemaitre, N., Guillerez, S. 2011. Definition of encapsulation barrier requirements: A method applied to organic solar cells. *Solar Energy Materials and Solar Cells* 95: 65-69.
- Dawood, M.A., Koshio, S., Esteban, M.Á. 2018. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture* 10: 950-974.
- Doan, H. V., Soltani, E., Ingelbrecht, J., Soltani, M. 2020. Medicinal herbs and plants: Potential treatment of monogenean infections in fish. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 28: 260-282.
- Gholipourkanani, H., Buller, N., Lymbery, A. 2019. *In vitro* antibacterial activity of four nano-encapsulated herbal essential oils against three bacterial fish pathogens. *Aquaculture Research* 50: 871-875.
- Gibbs, F., Selim, K., Intez, A., Catherine, N., Mulligan, B. 1999. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 50: 213-224.
- Hoseini, S. M., Hoseinifar, S. H., Van Doan, H. 2021. Growth performance and hematological and antioxidant characteristics of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed diets supplemented with Roselle, *Hibiscus sabdariffa*. *Aquaculture* 530: 735827.
- Kabanov, V.L., Novinyuk, L.V. 2020. Chitosan application in food technology: A review of recent advances. *Food Systems* 3: 10-15.
- Khanmohammadi, M., Elmizadeh, H., Ghasemi, K. 2015. Investigation of size and morphology of chitosan nanoparticles used in drug delivery system employing chemometric technique. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 14: 665-675.
- Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A. 2005. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15: 75-88.
- Mohamed, R.A., Yousef, Y.M., El-Tras, W.F., Khalafallaa, M.M. 2021. Dietary essential oil extract from sweet orange (*Citrus sinensis*) and bitter lemon (*Citrus limon*) peels improved Nile tilapia performance and health status. *Aquaculture Research* 52: 1463-1479.
- Ngugi, C.C., Oyoo-Okoth, E., Muchiri, M. 2017. Effects of dietary levels of essential oil (EO) extract from bitter lemon (*Citrus limon*) fruit peels on growth, biochemical, haemato-immunological parameters and disease resistance in Juvenile *Labeo victorinus* fingerlings challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research* 48: 2253-2265.
- Oboh, G., Olasehinde, T. A., Ademosun, A. O. 2014. Essential oil from lemon peels inhibits key enzymes linked to neurodegenerative conditions and pro-oxidant induced lipid peroxidation. *Journal of Oleo Science* 63: 373-381.

- Rashmeei, M., Shekarabi, S.P.H., Mehrgan, M.S., Paknejad, H. 2021. Assessment of dietary chaste tree (*Vitex agnus-castus*) fruit extract on growth performance, hemato-biochemical parameters, and mRNA levels of growth and appetite-related genes in goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture and Fisheries* 525: 735315.
- Rufchaei, R., Mirvaghefi, A., Hoseinifar, S.H., Valipour, A., Nedaei, S. 2020. Effects of dietary administration of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) leaves extracts on innate immune parameters, antioxidant defense, and disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 515: 734533.
- Samavat, Z., Shamsaie Mehrgan, M., Jamili, S., Soltani, M., Hosseini Shekarabi, S.P. 2019. Determination of grapefruit (*Citrus paradisi*) peel extract bio-active substances and its application in Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) diet: Growth, haemato-biochemical parameters and intestinal morphology. *Aquaculture Research* 50: 2496-2504.
- Sandnes, K., Lio, O., waagboe, R. 1987. Normal ranges of some blood chemistry parameters in adult formed Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology* 32: 129-135.
- Van Hai, N. 2015. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: a review. *Aquaculture* 446: 88-96.
- Velmurugan, P., Ganeshan, V., Nishter, N.F., Jonnalagadda, R.R. 2017. Encapsulation of orange and lavender essential oils in chitosan nanospherical particles and its application in leather for aroma enrichment. *Surf Interfaces* 9: 124-132
- Vieira, A.J., Beserra, F.P., Souza, M., Totti, B., Rozza, A. 2018. Limonene: Aroma of innovation in health and disease. *Chemico-Biological Interactions* 283: 97-106.
- Wang, Q.I., Shen, J., Yan, Z., Xiang, X., Mu, R., Zhu, P., Yao, Y., Zhu, F., Chen, K., Chi, S., Zhang, L. 2020. Dietary *Glycyrrhiza uralensis* extracts supplementation elevated growth performance, immune responses and disease resistance against *Flavobacterium columnare* in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Fish & Shellfish Immunology* 97: 153-164.
- Zeilab Sendijani, R., Abedian Kenari, A., Smiley, A.H., Esmaeili, M. 2020. The effect of extract from dill *Anethum graveolens* on the growth performance, body composition, immune system, and antioxidant system of rainbow trout. *North American Journal of Aquaculture* 82: 119-131.
- Zuzarte, M., Salgueiro, L. 2015. Essential oils chemistry. In: Sousa, D.P. Bioactive essential oils and cancer. Springer, Germany, 292 p.