اثرات سطوح مختلف عصاره یونجه (*Medicago sativa*) بر عملکرد آنزیم‌های کبدی و پارامترهای سرمی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

احمد کولیوند، سید محمد موسوی *، محمد ذاکری، وحید یاوری، نسیم زنگویی

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ایران

*مسئول مکاتبات: seied1356@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۰٦ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۰۵

چکیده

این پژوهش به منظور بررسی اثرات عصاره یونجه (*Medicago sativa*) بر عملکرد آنزیم‌های کبدی و پارامترهای سرم خون بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) انجام شد. در این راستا تعداد ۷۵۰ قطعه بچه‌ماهی با میانگین وزن ۰/۵ ± ۱۰/٤ گرم در استخرهای بتنی پرورشی در ۵ تیمار غذایی به ترتیب شامل، صفر (شاهد)، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ درصد عصاره در جیره با سه تکرار به مدت ٦۰ روز تغذیه شدند. بررسی فراسنجه‌های سرمی نشان داد، بین ماهیان تغذیه شده با عصاره یونجه و گروه شاهد تفاوت معنی‌داری وجود داشت. بالاترین و کمترین سطح گلوکز سرم به ترتیب در تیمار ٤ و تیمار ۱ (شاهد) مشاهده گردید ($p <$ ۰/۰۵). بالاترین سطح پروتئین تام سرم در تیمار ۲ و کمترین آن در تیمار ۵، مشاهده گردید ($p <$ ۰/۰۵)، هر چندکه بین تیمار شاهد با تیمار ۲ و تیمار ٤، از نظر سطح پروتئین تام سرم، اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($p >$ ۰/۰۵). بالاترین سطح آلبومین سرم در تیمار شاهد، ثبت گردید. بر اساس نتایج حاصله، سطوح مختلف عصاره یونجه باعث یک روند کاهشی در میزان تری‌گلیسرید و کلسترول سرم گردید. بیشترین سطح فسفر سرم در تیمار ٤ و کمترین میزان فسفر سرم در تیمار شاهد، مشاهده گردید ($p <$ ۰/۰۵). سطوح منیزیم سرم نیز تحت تاثیر عصاره یونجه قرار گرفت ($p <$ ۰/۰۵). بر اساس نتایج حاصله، در سطوح سرم گلوتامیک اگزالواستیک ترانس‌آمیناز SGOT و سرم گلوتامیک پیرووبک ترانس آمیناز SGPT سرم، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی، در طول دوره ٦۰ روزه تغذیه‌ای مشاهده نگردید ($p >$ ۰/۰۵). بالاترین سطح آلکالین فسفاتاز (ALP) سرم در تیمار ۵ و کمترین آن در تیمار شاهد، مشاهده گردید ($p <$ ۰/۰۵). بالاترین سطح لاکتات دهیدروژناز (LDH) سرم در تیمار شاهد و کمترین آن در تیمار ۳ و تیمار ٤ مشاهده گردید ($p <$ ۰/۰۵). بر اساس نتایج حاصله، سطح ۲ درصد عصاره یونجه در جیره غذایی بهترین تاثیر را بر پارامترهای بیوشیمیایی سرم و آنزیم‌های کبدی داشت.

کلمات کلیدی: قزل‌آلای رنگین کمان، عصاره یونجه، آنزیم کبدی، پارامترهای بیوشیمیایی سرم.

مقدمه

مدیریت و امنیت غذایی یکی از نگرانی‌های انسان‌ها در سرتاسر جهان می‌باشد و یکی از نیازهای اولیه به شمار می‌رود. افزایش تقاضا و همچنین کاهش صید ماهی از دریا، باعث رشد چشمگیری در صنعت آبزی‌پروری شده است و همچنین با توجه به گزارش فائو به دلیل افزایش جمعیت، کاهش ماهی‌گیری سنتی و تغییر الگوی مصرف در کشورهای توسعه یافته، تولیدات آبزی‌پروری رو به افزایش است (۱۲).

توسعه صنعتی شیلات در جهان همواره با مخاطرات و مشکلات متعددی همراه بوده است. توسعه آبزی-پروری در کشور ما نیز بدون مشکل نبوده و با گسترش این صنعت مخاطرات و مشکلاتی برای آن به وجود آمده است. در چند سال اخیر یکی از مهمترین ضرباتی که به صنعت پرورش ماهیان سردابی کشور وارد آمده ناشی از بروز بیماری‌ها می‌باشد (۲، ٤۳).

در سال‌های اخیر موارد متعددی از بروز بیماری در بین گونه‌های پرورشی شیلاتی مشاهده شده است که یکی از مهمترین آنها بیماری سپتی‌سمی خونریزی-دهنده ویروسی (VHS) در ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی کشور بوده که در سال ۱۳۹۲ به تایید سازمان دامپزشکی کشور رسید (۱۳).

با توجه به مشکلات و محدودیت‌های موجود در استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و واکسیناسیون خصوصاً در آبزیان، استفاده از مکمل‌های تغذیه‌ای به منظور افزایش رشد و ایمنی در آبزیان، در سال‌های اخیر مورد توجه زیادی واقع شده است. به‌طورکلی مکمل-های تغذیه‌ای شامل پروبیوتیک، سین‌بیوتیک‌ها و مکمل‌های گیاهی شامل آنتی‌اکسیدان‌ها، محرک‌های ایمنی رشد با منشاء گیاهی که این مکمل‌های گیاهی دارای طیف وسیعی از مواد غذایی است که می‌توان آنها را به صورت کامل و یا قسمتی از آن شامل (ساقه، برگ، ریشه و دانه) به صورت پودر یا عصاره، در آبزی‌پروری استفاده کرد (۵۳)، که اثرات ضدباکتریایی برخی از این مکمل‌ها بر سیستم ایمنی ماهی به اثبات رسیده است (۲۰). از گیاه یونجه به خاطر داشتن طیف گسترده‌ای از مواد غذایی، به عنوان سلطان گیاهان نام برده می‌شود (۳٦).

یونجه دارای مقادیر قابل توجهی از اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها، کارتنوئیدها و پروفایل اسیدهای چرب ضروری است. گیاه یونجه به خاطر داشتن طیف وسیعی از آنزیم‌های ضروری می‌تواند باعث هضم بهتر غذا شود. ترکیبات اصلی گیاه یونجه شامل کولین (۱٤/٤ میلی‌گرم)، ویتامین A (۰/۰۲ میلی‌گرم)، ویتامین E (۳۰/۵ میلی‌گرم)، اسیدچرب اشباع (۰/۰٦۹ میلی‌گرم) می‌باشد (٤٤).

از ۱۵۰۰ سال پیش تاکنون یونجه به عنوان یک گیاه دارویی در جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱٦). برخی از خواص دارویی یونجه به شرح زیر است: کاهش کلسترول خون، تنظیم قند خون، منعقد کننده خون، درمان آرتریت، حذف سموم خون و کلیه‌ها، درمان کم‌خونی، تقویت قلب، درمان زخم معده، محرک اشتها، کاهنده تب، درمان التهاب‌های مثانه، بهبود کارایی کبد، مدر (ادرارآور).

فلامرزی، اثرات پودر و عصاره گیاه یونجه (*Medicago sativa*) را روی شاخص‌های رشد، ترکیبات لاشه و ترکیبات بیوشیمیایی سرم خون در ماهی کپور معمولی مورد بررسی قرار داد (۱۰، ۱۱).

کیان‌طاهری (۲۰۱۵)، اثرات سطوح مختلف عصاره و پودر یونجه را به عنوان مکمل ایمنی در ماهی کپور معمولی مورد بررسی قرار داد. به طور کلی با بررسی نتایج این تحقیقات در اکثر شاخص‌های مورد بررسی، در ماهیان تحت تیمار با پودر و عصاره گیاه یونجه، روند افزایشی و تاثیرگذاری مثبت این گیاه، مشاهده گردید.

نکوبین و سوداگر (۲۰۱۳)، به بررسی اثرات گیاه یونجه و عدسک آبی روی رشد و بازماندگی کپور علفخوار پرداختند و چنین نتیجه گرفتند که استفاده از گیاه یونجه نتایج بهتری نسبت به عدسک روی پارامترهای بیوشیمیایی خون، وزن نهایی و ضریب رشد داشته است (۳۰).

همچنین نجفی و همکاران (۲۰۱۸)، تأثیر عصاره الکلی یونجه بر عملکرد رشد، مصرف غذا، ترکیب

بدن و برخی از پارامترهای سرمی بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را مورد بررسی قرار دادند (٤٦).

هدف از این مطالعه بررسی اثرات افزودن سطوح مختلف عصاره الکلی گیاه یونجه به جیره غذایی بر برخی پارامترهای سرمی و آنزیم‌های کبدی سرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مراحل تغذیه‌ای و دوره پرورش تحقیق حاضر در منطقه رباط از بخش مرکزی شهرستان خرم‌آباد و در یکی از مزارع پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، به مدت ٦٠ روز انجام گرفت و آزمایش‌های مربوطه در دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر صورت پذیرفت. به این منظور تعداد ۷۵۰ قطعه بچه ماهی با وزن اولیه ۱/۵ ± ۱۰/۰٤ گرم، به ازای هر تیمار و تکرار به تعداد ۱۵۰ قطعه در استخرهای بتنی، رهاسازی گردید.

در این پژوهش به منظور بررسی اثر عصاره یونجه بر شاخص‌های بیوشیمیایی سرم و آنزیم‌های کبدی سرم بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان، ۵ تیمار در ۳ تکرار (۱۵ گروه)، با درصدهای مختلف عصاره یونجه، به‌صورت جیره‌های حاوی صفر درصد (تیمار ۱ به‌عنوان تیمار شاهد)، ۰/۵ درصد (تیمار ۲)، ۱ درصد (تیمار ۳)، ۲ درصد (تیمار ٤) و ۳ درصد (تیمار ۵) عصاره یونجه به مدت ٦٠ روز در نظر گرفته شد.

قبل از انجام تحقیق، دوره سازگاری به مدت ۲ هفته تحت شرایط محیط پرورشی و با غذادهی به میزان سیری و ۳ بار در روز در ساعت ۹، ۱۳ و ۱۸ انجام پذیرفت. غذای مورد استفاده از شرکت فرادانه تولید کننده تخصصی خوراک آبزیان (جدول ۱) تهیه گردید. عصاره یونجه مورد استفاده در انجام پروژه از استان خراسان جنوبی شهرستان سبزوار و از شرکت تعاونی مزرعه مروارید دشت جوین با شناسه ملی ۱٤۰۰۰۲۲۸٦۱۰ و شماره ثبت ۳٤۵، تهیه گردید. جدول ۲، تجزیه بیوشیمیایی گیاه یونجه مورد استفاده جهت عصاره‌گیری را نشان می‌دهد. شاخص‌های فیزیکی–شیمیایی آب، روزانه توسط دماسنج، pH متر و دستگاه مولتی‌متر، اندازه‌گیری و ثبت می‌گردید. میانگین دمای آب، ۱/٤±۱۵/۵ درجه سانتی‌گراد، میزان اکسیژن، ۰/٤±۷/۷ میلی‌گرم در لیتر و میزان pH، ۰/۲±۷/۵ در طول دوره ثبت گردید. در انتهای دوره و یک روز قبل از نمونه‌برداری، غذادهی قطع گردید. ابتدا بچه ماهی‌ها توسط ساچوک صید و با کمک سطل مخصوص به محل نمونه‌برداری منتقل گردیدند و به کمک محلول پودر گل میخک با غلظت ppm ۲۰۰ بیهوش شدند.

خون‌گیری از ماهیان به وسیله سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتری آغشته به ماده ضدانعقاد هپارین از طریق ورید ساقه‌دمی انجام گردید و نمونه‌های خون در میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری (بدون ماده ضد انعقاد) منتقل و پس از انعقاد خون، در سانتریفیوژ با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، سرم جداسازی گردید. نمونه‌های سرم در دمای ۸۰– درجه سانتی‌گراد تا زمان آنالیزهای سرمی نگهداری شدند. مقادیر سرمی پروتئین تام، گلوکز، آلبومین، کلسترول، تری‌گلیسرید، LDL، HDL، کلسیم، فسفر و منیزیم سرم و اوره و کراتینین سرم، با استفاده از کیت تشخیصی شرکت پارس آزمون به روش فتومتریک با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر (Mindray BS-200, China) سنجش شدند (۱۷، ٤۷). میزان AST (آسپارتات آمینوترانسفراز)، ALT (آلانین آمینوترانسفراز)، ALP (آلکالین فسفاتاز) و LDH (لاکتات دهیدروژناز) سرم با استفاده از کیت تشخیص کمی شرکت پارس آزمون با روش فتومتریک اندازه‌گیری شدند (۳۵).

تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ و رسم نمودارها در نرم افزار Excell 2013

انجام شد و نرمال بودن داده‌ها به وسیله آزمون Shapiro Wilk مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد بیان شده است.

جدول ۱- آنالیز بیوشیمیایی تقریبی جیره غذایی مورد استفاده

نوع خوراک	SFT
پروتئین (درصد)	٤٠-٤٤
چربی خام (درصد)	١٣-١٥
فیبر (درصد)	٢/٥-٣
فسفر (درصد)	١/٥-٣
رطوبت (درصد)	١١
خاکستر (درصد)	١٣

* تمامی مقادیر بر حسب درصد و سایز غذا ۱/۸ میلی‌متر

جدول۲- نتایج تجزیه بیوشیمیایی گیاه یونجه مورد استفاده جهت عصاره‌گیری

ترکیبات	پروتئین (٪)	کربوهیدرات (٪)	چربی (٪)	خاکستر (٪)	رطوبت (٪)
درصد	٢٣/٩٧	٨/١٨	٤/٢٢	٨/٤٧	٥٥/١٦

نتایج

سطوح پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره حاوی سطوح مختلف عصاره یونجه در جدول ۳، نشان داده شده است. بر این اساس، بالاترین سطح گلوکز سرم در تیمار ٤ و کمترین میزان گلوکز سرم در تیمار ۱ (شاهد) مشاهده گردید ($p < ۰/۰۵$). بالاترین سطح پروتئین تام سرم در تیمار ۲ و کمترین میزان پروتئین تام سرم در تیمار ۵ مشاهده گردید ($p < ۰/۰۵$)، هر چندکه بین تیمار شاهد با تیمار ۲ و تیمار ٤، از نظر سطح پروتئین تام سرم، اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($p > ۰/۰۵$). بالاترین سطح آلبومین سرم در تیمار ۱ (شاهد) و کمترین سطح آلبومین سرم در تیمار ۵، ثبت گردید ($p < ۰/۰۵$). بیشترین میزان گلوبولین تام سرم به ترتیب در تیمار ۲ و تیمار ۵ و کمترین آن در تیمار شاهد ثبت گردید ($p < ۰/۰۵$). بر اساس نتایج حاصله، سطوح مختلف عصاره یونجه باعث یک روند کاهشی در میزان تری‌گلیسرید سرم گشته است به‌طوری‌که بالاترین میزان سطوح تری‌گلیسرید سرم (۲۷/۲۲ ± ۲٤٤/۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) در تیمار ۱ (شاهد) و کمترین سطح تری‌گلیسرید سرم (١٤/٨٨ ± ١٥٤/٦٧ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) در تیمار ٤ مشاهده گردید ($p < ۰/۰۵$). روند کاهشی مشابهی در میزان کلسترول سرم همانند تری‌گلیسرید در تیمارهای مختلف مشاهده گردید، به‌طوری‌که بالاترین سطح کلسترول سرم (١٦/٠٤ ± ٢٩٢/٠٠ میلی‌گرم در دسی-لیتر) در تیمار ۱ (شاهد) و کمترین سطح کلسترول سرم (۱/۵۲±۲۱۰/۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) در تیمار ٤، مشاهده گردید ($p < ۰/۰۵$). در میزان LDL و HDL سرم اختلاف معنی‌داری در بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نگردید ($p > ۰/۰۵$). هر چندکه بیشترین میزان LDL سرم در تیمار شاهد و کمترین میزان LDL سرم در تیمار ٤ مشاهده گردید. همچنین

بیشترین سطح HDL سرم در تیمار ٤ و کمترین سطح HDL سرم در تیمار ۲ مشاهده گردید. در میزان اوره و کراتینین سرم اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نگردید ($p > ۰/۰۵$). سطوح مختلف عصاره یونجه در جیره غذایی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان، تاثیر معنی‌داری را روی سطوح کلسیم سرم نشان ندادند ($p > ۰/۰۵$). اما بیشترین سطح فسفر سرم (۱/۱۲ ± ۲۱/۰٦ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) در تیمار ٤ و کمترین میزان فسفر سرم (۱/٥٤ ± ۱۷/٤٦ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) در تیمار شاهد (تیمار ۱)، مشاهده گردید که دارای اختلاف معنی‌داری بودند ($p < ۰/۰۵$). سطوح منیزیم سرم نیز تحت تاثیر عصاره یونجه قرار گرفت ($p < ۰/۰۵$)، به‌طوری‌که بیشترین سطح منیزیم سرم (۰/۰۳ ± ۲/۷٦ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) مربوط به تیمار ٤ و کمترین آن (۰/۰۰ ± ۲/٤۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) در تیمار ۱ (شاهد)، ثبت گردید. طوح آنزیم‌های کبدی سرم بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره حاوی سطوح مختلف عصاره یونجه، در جدول ٤، نشان داده شده است. بر اساس نتایج حاصله، در سطوح AST و ALT سرم، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی، در طول دوره ٦۰ روزه تغذیه‌ای مشاهده نگردید ($p > ۰/۰۵$). بالاترین سطح آلکالین‌فسفاتاز (ALP) سرم (۱٤/۱۱ ± ٥٥٤/٦۷ واحد در لیتر) در تیمار ٥ و کمترین آن (۸/۰۸ ± ۲۷۲/۰۰ واحد در لیتر) در تیمار ۱ (شاهد)، مشاهده گردید ($p < ۰/۰۵$). بالاترین سطح لاکتات دهیدروژناز (LDH) سرم (۲۱۳/۰۹ ± ۲٥۸۳/۳۳ واحد در لیتر) در تیمار ۱ (شاهد) و کمترین آن در تیمار ۳ (۱٦۰/٥۳ ± ۱۳۹۷/۰۰ واحد در لیتر) و تیمار ٤ (۷٥/۱۲ ± ۱٤٥۲/۳۳ واحد در لیتر)، مشاهده گردید ($p < ۰/۰۵$).

جدول ۳- میزان پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره حاوی سطوح مختلف عصاره یونجه

پارامترهای بیوشیمیایی سرم	تیمارهای آزمایشی				
	تیمار ۱ (شاهد) (۰ درصد عصاره)	تیمار ۲ (۰/٥ درصد عصاره)	تیمار ۳ (۱ درصد عصاره)	تیمار ٤ (۲ درصد عصاره)	تیمار ٥ (۳ درصد عصاره)
گلوکز (mg/dl)	۸۹/۰۰± ۳/۰٥^{c}	۱۰۱/٦۷ ± ۷/٦۸^{bc}	۱۰٤/۰۰ ± ۳/٦۰^{b}	۱۲۲/٦۷ ± ۱/۲۰^{a}	۹۸/۰۰ ±۱/٥۲ ^{bc}
پروتئین کل (g/dl)	۳/۷۸ ±۰/۲۰ ^{a}	٤/۱۰ ±۰/۲۹ ^{a}	۳/۱۹ ±۰/۰٥^{b}	۳/٦۳ ± ۰/۰۹^{ab}	۳/۱۳ ±۰/۰۸ ^{b}
آلبومین (g/dl)	۳/٥۰± ۰/۹ ^{a}	۳/۰۲ ±۰/۲۳^{ab}	۲/٥۳ ± ۰/۰٦^{bc}	۲/۸٥ ±۰/۲۲^{abc}	۲/۲٥ ±۰/۲۲ ^{c}
گلوبولین (g/dl)	۰/۲۸ ±۰/۰۱^{b}	۱/۰۷ ±۰/۱۸^{a}	۰/٦٦ ± ۰/۰٤^{ab}	۰/۷۸ ± ۰/۱٥^{ab}	۰/۸۸ ±۰/۳۱^{a}
تری‌گلیسرید (mg/dl)	۲٤٤/۰۰± ۲۷/۲۲ ^{a}	۲۲٤/۰ ± ٤۲/٥۷^{ab}	۲۰۸/۰۰± ۹/۰۷ ^{ab}	۱٥٤/٦۷ ± ۱٤/۸۸^{b}	۱۷۱/۳۳ ±٥/۷۸ ^{ab}
کلسترول (mg/dl)	۲۹۲/۰۰± ۱٦/۰٤^{a}	۲۷۱/۰۰ ± ۳۷/۰۷^{a}	۲۷۹/۰۰ ± ٦/٦٥ ^{a}	۲۱۰/۰۰ ± ۱/٥۲ ^{b}	۲٤۷/٦۷ ±۰/۸۸ ^{ab}
LDL (mg/dl)	۱۱٥/۳۳ ± ٤/۸٤	۱۰٦/٦۷ ± ۱٦/۳۳	۱۰۷/۳۳ ± ٤/٦٦	٦۹/٦۷ ± ۸/۸۳	۹۹/۳۳ ±۱/۸٥
HDL (mg/dl)	۱٤۱/۳۳ ± ۱/۸٥	۱۳۸/٦۷ ± ٤/۷۰	۱٤۳/۰۰ ± ۳/٤٦	۱٤٥/٦۷ ± ٦/۱۱	۱٤۱/٦۷ ± ۳/۹۳
اوره (mg/dl)	۷/٤٦± ۰/۰۳	۷/٥۰ ± ۰/۲۰	۷/۹۳ ± ۰/٤۰	۸/۰٦ ± ۱/۱۱	٦/۷۳ ± ۰/۰۲
کراتینین (mg/dl)	۰/۳۱ ±۰/۰٤	۰/۲۷ ± ۰/۰۱	۰/۲۷ ± ۰/۰۲	۰/۲٤ ± ۰/۰۱	۰/۲٥ ±۰/۰۰
کلسیم (mg/dl)	۱۲/٦۰ ±۰/۳٤	۱۲/٦۳ ± ۰/۳۳	۱۲/٦٦ ±۰/۲٦	۱۲/۷۰ ±۰/۳۷	۱۱/۹٦ ±۰/۲۳
فسفر (mg/dl)	۱۷/٤٦ ±۱/٥٤^{ab}	۱۹/٦٦ ±۱/۸۳^{ab}	۱۷/٦۳ ± ۱/۱۷^{ab}	۲۱/۰٦ ± ۱/۱۲ ^{a}	۱٦/۰۰ ± ۰/۱۰ ^{b}
منیزیم (mg/dl)	۲/٤۰ ±۰/۰۰^{b}	۲/٦٦ ±۰/۰۸^{ab}	۲/٥۳ ± ۰/۰٦^{ab}	۲/۷٦ ± ۰/۰۳ ^{a}	۲/۷۳ ±۰/۱٤ ^{a}

وجود حروف غیرهمنام نشانه اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی، کلیه داده‌ها به‌صورت میانگین ± خطای معیار و $p<۰/۰۵$ می‌باشد.

جدول ٤- سطوح آنزیم‌های کبدی سرم بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره حاوی سطوح مختلف عصاره یونجه

تیمارهای آزمایشی	مقادیر آنزیم‌های کبدی سرم خون بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان			
	(U/L) ALP	(U/L) AST	(U/L) ALT	(U/L) LDH
تیمار ۱ (شاهد) (۰٪ عصاره)	۲۷۲/۰۰±۸/۰۸^{d}	۱۱۳/۳۳±٦/۲۲	۱/۳۳±۰/۳۳	۲٥۸۳/۳۳±۲۱۳/۰۹^{a}
تیمار ۲ (۰/٥٪ عصاره)	۳٦۷/۰۰±۳٤/۸۲^{bc}	۱٤۳/۳۳±۱۲/۱۹	۱/٦۷±۰/٦٦	۲۳۰۹/۰۰±۱۳۲/۰۱^{a}
تیمار ۳ (۱٪ عصاره)	٤۳۳/٦۷±۲٦/۸٦^{b}	۱۳۷/۰۰±۹/۱٦	۱/۳۳±۰/۳۳	۱۳۹۷/۰۰±۱٦۰/٥۳^{b}
تیمار ٤ (۲٪ عصاره)	۳٥٥/۰۰±۱٦/٦۲^{c}	۱۳۸/۰۰±۹/۰۱	۱/٦۷±۰/۳۳	۱٤٥۲/۳۳±۷٥/۱۲ ^{b}
تیمار ٥ (۳٪ عصاره)	٥٥٤/٦۷±۱٤/۱۱^{a}	۱۳٤/۰۰±۱٤/۷۹	۲/۰۰±۰/۰۰	۲۳۹۸/۳۳±۱۷٦/۳۱^{a}

وجود حروف غیرهمنام نشانه اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی، کلیه داده‌ها به‌صورت میانگین ± خطای معیار و $p<۰/۰٥$ می‌باشد.

بحث

اندازه‌گیری پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین سرم ارزش تشخیصی قابل توجهی در شناخت وضعیت کلی تغذیه، یکپارچگی سیستم عروقی و اعمال کبد دارد (۱، ٤٦) و همچنین نقش مهمی در پاسخ‌های ایمنی ایفا می‌کند (٤). طبق نتایج به دست آمده در این تحقیق، مقادیر پروتئین کل و گلوبولین خون تحت تاثیر سطوح مختلف عصاره الکلی یونجه قرار گرفتند. به‌طوری‌که با افزایش میزان عصاره یونجه نسبت به گروه شاهد، یک روند افزایشی و معنی‌دار را نشان دادند، اما میزان آلبومین سرم تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت. انرژی بالا و شرایط مناسب جیره از نظر مواد غذایی مانند مقادیر پروتئین و اسیدهای چرب موجب افزایش گلوبولین و به تبع آن، پروتئین کل در خون ماهیان می‌شود (۲۲).

فلامرزی (۲۰۱٥) و نکوبین (۲۰۱۲) با مطالعه روی ماهی کپور معمولی و آمور، نتایج مشابهی را ارائه نمود (۱۳، ۲۹). موارد دیگری از بررسی تاثیرات گیاهان دارویی به عنوان محرک ایمنی نظیر سیر (۳۸)، زردچوبه (۳۷)، مَرغ (*Cynodon dactylon*) (۱۹) بر کپور هندی وجود دارد که موجب افزایش معنی‌دار در مقادیر پروتئین کل و گلوبولین تام سرم خون شده‌اند. احتمالا ترکیبات فلاوونوئیدی موجود در یونجه با نقش مهمی که در برخی از عملکردهای بیولوژیکی بدن ایفا می‌کنند (۱۱). عامل اصلی تغییرات در میزان پروتئین و گلوبولین سرم بوده‌اند. همچنین میزان آلبومین و گلوبولین موجود در سرم با میزان پروتئین تام در سرم خون در ارتباط می‌باشد (۲، ۱٥).

از سطح گلوکز خون در ماهی اغلب به عنوان شاخص استرس غیراختصاصی نسبت به سطوح کورتیزول و آدرنالین استفاده می‌شود. همچنین سطح گلوکز خون می‌تواند با افزایش منابع کربوهیدرات جیره غذایی تحت تاثیر قرار گیرد (۲۰، ٤۰، ٤۸).

براساس آنالیز نتایج تحقیق حاضر، میزان گلوکز خون با افزایش سطح عصاره تا تیمار ٤، دارای روند افزایشی و در تیمار ٥، کاهش سطح گلوکز مشاهده شد که دارای اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد بود. فلامرزی (۲۰۱٦) و نکوبین (۲۰۱۲) با مطالعه روی ماهی کپور معمولی و آمور، نتایج مشابهی را ارائه نمود (۱۱، ۲۹). از دلایل احتمالی افزایش گلوکز خون می‌توان به وجود مواد کربوهیدراتی در ترکیبات این گیاه اشاره کرد. البته نجفی و همکاران (۲۰۱۸)، در سطح گلوکز سرم بچه ماهی‌های قزل‌آلای رنگین

کمان تغذیه شده با جیره‌های حاوی عصاره الکلی یونجه، تغییرات معنی‌داری را مشاهده نکردند (۲۸) که تفاوت نتایج این تحقیق با تحقیق حاضر، می‌تواند ناشی از تفاوت در سن و اندازه ماهی مورد استفاده، سطح عصاره مورد استفاده و همچنین نوع گیاه یونجه و نحوه عصاره‌گیری باشد.

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، استفاده از عصاره الکلی یونجه منجر به کاهش سطح کلسترول سرم گردید، به‌نحوی‌که کمترین میزان کلسترول در تیمار ٤ و بیشترین میزان کلسترول در تیمار شاهد مشاهده گردید. نجفی و همکاران (۲۰۱۸)، کاهش سطح کلسترول سرم خون بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان را تحت تاثیر تغذیه با جیره‌های حاوی سطوح مختلف عصاره الکلی یونجه را گزارش نمودند (۲۸). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که مصرف یونجه باعث کاهش جذب کلسترول در حیوانات شده و از تشکیل پلاک‌های آرتروکلسروتیک جلوگیری می‌نماید (۵). گزارش شده است که ساپونین موجود در قسمت‌های فوقانی گیاه یونجه (ساقه و برگ‌ها)، غلظت کلسترول پلاسما را بدون تغییر در غلظت کلسترول لیپوپروتئین‌های با چگالی بالا، کاهش داده و جذب روده‌ای کلسترول را کاهش می‌دهند. مقادیر HDL–کلسترول سرم با افزایش سطح عصاره الکلی یونجه در جیره غذایی، تغییرات معنی‌داری را نشان نداد. میزان LDL–کلسترول سرم با افزایش میزان عصاره یونجه در جیره غذایی، یک روند کاهشی را نسبت به گروه شاهد نشان داد. دلیل این تغییر را می‌توان به وجود اسیدهای چرب غیراشباع n-۳ و n-٦ (اسیدهای چرب ضروری) در ترکیبات گیاه یونجه نسبت داد. چرا که اسیدهای چرب ضروری با تاثیر بر غشاء سلولی و فسفولیپیدها، موجب افزایش HDL و کاهش LDL می‌شوند (١٤). همچنین ساپونین موجود در یونجه موجب افزایش اسیدهای صفراوی، افزایش ترشح استروئیدها (دفع کلسترول از بدن) و کاهش نسبت کلسترول کل به HDL–کلسترول (کاهش LDL) می‌شود (٦، ۳۵). از طرفی طبق گزارشات، وجود ایزوفلانول‌ها نظیر کامسترول در گیاه یونجه نیز می‌تواند موجب افزایش HDL و کاهش LDL در خون شود (۲۷، ٤۲).

سطوح مختلف عصاره الکلی یونجه در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان منجر به کاهش سطح تری‌گلیسرید سرم نسبت به تیمار شاهد در این تحقیق گردیده است که مشابه نتایج بدست آمده توسط نجفی و همکاران (۲۰۱۸) روی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان و فلامرزی و همکاران (۲۰۱٦) روی ماهی کپور معمولی می‌باشد (۱۱، ۲۸). در سرم خون لیپوپروتئین‌ها با چگالی بسیار کم، نقش ناقل تری‌گلیسرید را از کبد به بافت‌ها بر عهده دارند (۹)، که کاهش سطح LDL–کلسترول سرم می‌تواند یکی دیگر از دلایل کاهش سطح تری‌گلیسرید سرم باشد (۷، ۲٦). همچنین افزایش یا کاهش تری‌گلیسرید به نرخ سوخت و ساز بدن وابسته است (٢٤). همچنین نقش نمک‌های صفراوی در محتوای تری‌گلیسرید در چندین گونه ماهی گوشتخوار گزارش شده است (۱۸، ٤۱، ۵۰، ۵۱).

افزایش سطح کراتینین در سرم خون نشان‌دهنده آسیب‌های کلیوی و کارکرد غیرطبیعی کلیه است (۲۳). در این تحقیق، مقادیر کراتینین سرم خون در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت که این نشان‌دهنده کارکرد طبیعی کلیه‌ها در ماهیان تحت تیمار با عصاره گیاه یونجه است. فلامرزی و همکاران (۲۰۱٦) نیز نتایج مشابهی را در ماهی کپور معمولی گزارش نمودند (۱۰، ۱۱).

از محصولات نهایی متابولسیم پروتئین در ماهیان استخوانی، اوره و اسیداوریک می‌باشد (۸، ٤۷). بر این اساس، سنجش مواد زائد نیتروژنی به عنوان شاخص

تأثیرات تیمارهای آزمایشی بر متابولیسم پروتئین محسوب می‌شود و دیدی از تعادل نیتروژن مواد دریافتی توسط ماهی را ارائه می‌دهد. در مطالعه حاضر، سطح اوره سرم در تیمارهای حاوی سطوح مختلف عصاره الکلی یونجه نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار نشان ندادند، که نشان‌دهنده عدم وجود اثرات منفی بر متابولیسم نیتروژن در بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بوده است. سطح الکترولیت‌های سرم از جمله کلسیم، منیزیم و فسفر، شاخص‌های پاسخ استرس ثانویه در آبزیان است و همچنین شاخص غیرمستقیم از سطح کورتیزول سرم (۳۲، ۳۶)، شاخص عملکرد مکانیسم هموستاتیک و توانایی تنظیم اسمزی (۳۹) و شرایط رشد و تغذیه (۳۱، ٤٥) در ماهی می‌باشد. آبزیان برخی مواد مغذی از جمله کلسیم و منیزیم را از محیط آبی جذب می‌کنند (۲۲).

در مطالعه حاضر سطح کلسیم و منیزیم سرم تغییرات معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان ندادند که می‌توان اذعان داشت که افزودن عصاره الکلی یونجه به جیره غذایی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان، مواد معدنی مورد نیاز بدن بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین را جهت عملکرد طبیعی بدن تأمین می‌کند. افزایش معنی‌دار فسفر سرم در تیمار ٤، می‌تواند ناشی از محتوای فسفر عصاره الکلی یونجه باشد (۵۲).

فسفاتاز قلیایی نه تنها در سرم بلکه در بافت کبد، آبشش، کلیه‌ها، ماهیچه و سایر ارگان‌ها یافت می‌شود. ولی به‌طور عمده در کبد موجود است (۳، ٤۹). در نتیجه سنجش آن می‌تواند اطلاعاتی در زمینه تأثیر جیره غذایی بر عملکرد بافت کبد ارائه دهد. محتوای فسفاتاز قلیایی سرم بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف عصاره الکلی یونجه، روند افزایشی معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان داد. افزایش سطح این آنزیم در مطالعه کیان‌طاهری (۲۰۱۵) روی ماهی کپور معمولی نیز گزارش گردیده است (۲۱).

این آنزیم نقش انتقال یون‌ها و جذب آب از دیواره سلولی را بر عهده دارد (۲۵). افزایش فرآیند ساخت مواد و جابه‌جایی انرژی توسط عملکرد بافت کبد، منجر به افزایش یون‌ها، افزایش فعالیت این آنزیم در کبد و آسیب غشایی می‌شود، در نتیجه میزان نشت آنزیم به درون خون افزایش می‌یابد (٤٦).

از دیگر دلایل افزایش فعالیت این آنزیم در سرم، دریافت انرژی بیشتر از غذا و رشد بیشتر است (۳۷)، که می‌توان دلیل روند افزایشی فعالیت این آنزیم در سرم را احتمالا کسب انرژی بیشتر جهت رشد بیشتر نسبت به تیمار شاهد دانست. پراتیپا و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی اثرات گیاه بکرایی بر ماهی کپور معمولی افزایش آلکالین فسفاتاز سرم را گزارش کردند (۳۳).

آلانین آمینوترانسفراز (ALT یا SGPT) و آسپارتات آمینوترانسفراز (AST یا SGOT) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) به عنوان شاخص آسیب‌های کبدی (آلودگی شیمیایی، عفونی، فیزیولوژیکی) مورد استفاده قرار می‌گیرند، همچنین اختلال در چرخه کربس هم می‌تواند موجب افزایش میزان این آنزیم‌ها شود (٤۰).

طبق نتایج به دست آمده در این تحقیق، میزان این آنزیم‌ها در سرم خون دارای یک روند یکنواخت در تیمارهای آزمایشی بود و اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد که نشان‌دهنده کارکرد طبیعی کبد و چرخه کربس در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره الکلی گیاه یونجه می‌باشد که با نتایج کیان‌طاهری (۲۰۱۵) در ماهی کپور معمولی، همخوانی دارد (۲۱). استفاده از عصاره گیاه یونجه در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به واسطه داشتن ترکیبات آنتی‌اکسیدانت نظیر سلنیم،

روی، ویتامین‌های C و E، کولین و فیتول و ایزوفلاوونوئیدهای موجود در این عصاره، باعث کاهش رادیکال‌های آزاد در کبد می‌شود. در واقع کاهش تولید و یا تجمع رادیکال‌های آزاد در کبد، منجر به پیشگیری از ایجاد التهاب در کبد می‌شود. در این تحقیق، در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی عصاره الکلی یونجه، افزایش معنی‌داری در میزان فعالیت این آنزیم‌ها و مقادیر سرمی آنها مشاهده نگردید که دلیل آن می‌تواند اثرات آنتی‌اکسیدانی ترکیبات این گیاه و عدم تاثیرات منفی بر سلامت کبد، باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق استفاده از عصاره گیاه یونجه تا سطح ۲ درصد در جیره غذایی ماهیان کپور معمولی موجب بهبود وضعیت شاخص‌های بیوشیمیایی خون (پروتئین کل، گلوبولین، گلوکز، HDL–کلسترول و LDL–کلسترول) شده است و با توجه به بررسی شاخص‌های بیوشیمیایی آسیب‌شناسی (اوره و کراتینین و آنزیم‌های LDH، AST و ALT) موجب اختلال در کارکرد طبیعی کبد و کلیه‌ها نشده است و می‌توان از عصاره این گیاه در سطح ۲ درصد در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به عنوان یک مکمل غذایی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر به منظور حمایت‌های مالی جهت انجام این تحقیق، تقدیر و تشکر نمایند.

منابع

1. Abdel-Tawwab M., Abdel-Rahman A.M., Ismael N.E.M. 2008. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged *in situ* with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 280: 185-189.

2. Afshar-Nasab M. 2008. Health status and aquatic diseases in Iran with emphasis on viral diseases. *15th Iranian Veterinary Congress*, Tehran, pp: 1-4.

2. Akrami R., Gharaei A., Razeghi M., Galeshi A. 2015. Effects of dietary onion (*Allium cepa*) powder on growth, innate immune response and haemato-biochemical parameters of beluga (*Huso huso*) juvenile. *Fish and Shellfish Immunology*, 45(2): 828-834.

3. Asadi F., Halajian A., Pourkabir M., Asadian P., Jadidizadeh F. 2006. Serum biochemical parameters of *Huso huso*. *Comparative Clinical Pathology*, 15: 245-248.

4. Chi C., Jiang B., Yu X., Liu T., Xia L., Wang G. 2014. Effects of three strains of intestinal autochthonous bacteria and their extracellular products on the immune response and disease resistance of common carp, *Cyprinus carpio*. *Fish and Shellfish Immunology*, 36: 9-18.

5. Cohen T., Gertler A., Birk Y. 1981. Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*) I. Purification and physical properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxipeptidase B. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 69B: 639-646.

6. Czech A., Ognik K., Semeniuk W. 2010. Effect of PX concentrate of alfalfa in turkey hens' feeding on blood biochemical parameters. In: Alfalfa in human and animal nutrition, Grela E.R. (ed). Stow Rozwoju Regionalnego I Lokalnego "Progress". *Dzierdziowka-Lublin*, 6: 168-169.

7. Dixit V.P., Joshi S.C. 1985. Antiatherosclerotic effects of alfalfa meal ingestion in chicks: A biochemical

evaluation. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 29: 47-50.

8. Engin K., Carter C.G. 2001. Ammonia and urea excretion rates of juvenile australian short-finned eel *Anguilla australis australis* as influenced by dietary protein level. *Aquaculture*, 194: 123-136.

9. Evans G.O., Watterson C.L. 2009. General enzymology. In: Animal clinical chemistry, a practical guide for toxicologists and biochemical researchers, 2nd ed. G.O. Evans (ed.). CRC Press, New York, pp: 17-36.

10. Falamarzi Z. 2015. Effects of alfalfa (meal and extract) on growth performance, nutrition and biochemical composition of body and blood serum of common carp (*Cyprinus carpio*). Master's degree thesis, in the field of fisheries, department of fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology.

11. Falamarzi Z., Mousavi S.M., Zakeri M., Zanguee N. 2016. Effects of different levels of Alfalfa meal and alcoholic extract on growth, nutrition, biochemical carcass composition and some serum biochemical parameters of Common Carp, *Fisheries Journal (Iranian Journal of Natural Resources)*, 69(2): 235-251.

12. Food and Agriculture Organization (FAO). 2014. FAO statistical yearbook. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. pp: 135.

13. Gharagozlou M.J., Qajari A., Abdi K., Seifouri P., Fallah Mehrabadi M.H., Shahbazian N. 2017. Evaluation of clinical signs and autopsy (apparent pathology) of viral haemorrhagic septicemia (VHS) in rainbow trout. *Iranian Journal of Fisheries Science*, 26(5): 121-130.

14. Holub BJ. 2002. Clinical Nutrition: 4. Omega-3 Fatty Acids in Cardiovascular Care. *Canadian Medical Association Journal*, 166(5): 608-615.

15. Hussein S.Y., El-Nasser M.A., Ahmed S.M. 1996. Comparative studies on the effect of herbicide atrazine on freshwater fish *Oreochromis niloticus* and *Chrysichthye auratus* at Assuit, *Egypt. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 57: 503-510.

16. Jasjeet D., Pankaj K., Tiwari B.N., Rakesh P. 2011. Chemo-pharmacological aspects of alfalfa: A review. *Journal of Advance Scientific Research*, 2: 50-53.

17. Johnson A.M., Rohlfs E.M., Silverman L.M. 1999. Proteins. In: Burtis, C.A., and Ashwood, E.R. (eds). Tietz Textbook of Clinical Chemistry 3rd. Philadelphia: W. B. Saunders company, pp: 477-540.

18. Kader M.A., Bulbul M. Koshio S., Ishikawa M., Yokoyama S., Nguyen B.T., Komilus C.F. 2012. Effect of complete replacement of fishmeal by dehulled soybean meal with crude attractants supplementation in diets for red sea bream, *Pagrus major*, *Aquaculture*, 350-353: 109-116.

19. Kaleeswaran B., Ilavenil S., Ravikumar S. 2010. Changes in biochemical, histological and specific immune parameters in *Catla catla* (Ham.) by *Cynodon dactylon* (L.). *Journal of King Saud University- Science*, 24: 139-152.

20. Khansari A., Yavari V., Alishahi M., Mousavi S.M., Ghorbanpoor M., Darvish Bastami K., Azizi Sh. 2013. Effects of *Oliviera decumbens* and *Satureja khuzestanica* extract on some immunological and haematological parameters of *Cyprinus carpio*, *Comparative Clinical Pathology*, 22(3): 339-342.

21. Kiantaheri M. 2015. Using different levels of Alfalfa (meal and extract) as a immunostimulant in Common Carp (*Cyprinus carpio*). Master's degree thesis, in the field of fisheries, department of fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology.

of fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

30. Nekoubin H., Sudagar M. 2013. Effect of Different Types of Plants (*Lemna Sp*., *Azolla filiculoides* and Alfalfa) and Artificial Diet (With Two Protein Levels) on Growth Performance, Survival Rate, Biochemical Parameters and Body Composition of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Journal of Aquaculture Research and Development*. 5(3): 33-40.

31. Peres H., Santos S., Oliva-Teles A. 2013. Selected plasma biochemistry parameters in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Journal of Applied Ichthyology*, 29: 630–636.

32. Peres H., Santos S., Oliva-Teles A. 2014. Blood chemistry profile as indicator of nutritional status in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 40: 1339-1347.

33. Pratheepa V., Ramesh S., Sukumaran N. 2010. Immunomodulatory effect of *Aegle marmelos* leaf extract on freshwater fish *Cyprinus carpio* infected by bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Pharmaceutical Biology*, 48: 1224-1239.

34. Radovic J., Sokolovic D., Markovic J. 2009. Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25: 465-475.

35. Reshef G., Gestetner B., Birk Y., Bondi A. 2006. Effect of alfalfa saponins on the growth and some aspects of lipid metabolism of mice and quails. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 27(1): 63-72.

36. Roque A., Yildiz H.Y., Carazo I., Duncan N. 2010. Physiological stress responses of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) to hydrogen peroxide (H2O2) exposure. *Aquaculture*, 304: 104-107.

22. Lall SP (2000) Nutrition and health of fish. In Cruz-Suarez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Olvera-Novoa MA, Civera-Cerecedo R (eds), Avances en Nutricion Acuicola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutricion Aquicola, 19-22 Noviembre 2000. Merida, Yucatan Mexico, pp: 13-23.

23. Masopust J. 1998 Clinical Biochemistry. Demanding and Evaluation of Biochemical Investigation. Karolinum, Praha, 832 pp.

24. McCue M.D. 2010. Starvation physiology: reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology part A*, pp: 1-18.

25. Moss D.W. 1997. Physiochemical and pathophysiological factors in the release of membrane-bound alkaline phosphatase from cells. *Clinica Chimica Acta*, 257(1): 133-140.

26. Mozanzadeh M.T., Marammazi J.G., Yavari V., Agh N., Mohammadian T., Gisbert E. 2015. Dietary n–3 LC-PUFA requirements in silvery-black porgy juveniles (*Sparidentex hasta*). *Aquaculture*, 448: 151-161.

27. Naftolin F., Stanbury G. 2002. Phytoestrogens: are they really estrogen mimics. *Fertility Sterility*, 77: 15-18.

28. Najafi Z., Ouraji H., Yeganeh S., Keramat A. 2018. Effect of lcoholic extract of alfalfa (*Medicago sativa*) on growth performance, food intake, body composition and some serum parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Journal of Fisheries Science*, 27(5): 1-9.

29. Nekoubin H. 2012. Influence of plant foods (Azolla, Duckweeds and alfalfa) and concentrate on feeding of Amur fish (*Ketoenopharyngodon idella*), and its effect on growth indices, survival, body composition, some blood parameters and carcass fatty acid profile, Master's Degree Thesis, in the field of fisheries, department

37. Sahu S., Das B.K., Mishra B.K., Pradhan, J., Samal, S.K., Sarangi, N. 2008. Effect of dietary *Curcuma longa* on enzymatic and immunological profiles of rohu, *Labeo rohita* (Ham.), infected with *Aeromonas Hydrophila*. *Aquaculture Research*, 39: 1720-1730.

38. Sahu S., Das B.K., Mishra B.K., Pradhan J., Samal S.K., Sarangi N. 2008. Effect of dietary *Curcuma longa* on enzymatic and immunological profiles of rohu, *Labeo rohita* (Ham.), infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, 39: 1720-1730.

39. Sahu S., Das B.K., Mishra B.K., Pradhan J., Sarangi N. 2007. Effect of *Allium sativum* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Applied Ichthyology*, 23: 80-86.

40. Shahsavani D., Kazerani H.R., Kaveh S., Gholipour-Kanani H. 2010. Determination of some normal serum parameters in starry sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas, 1771) during spring season. *Comparative Clinical Pathology*, 19: 57-61.

41. Shalaby A. 2006. The opposing effect of ascorbic acid (vitamin C) on ochratoxin toxicity in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*.6th International Symposium Tilapiain *Aquaculture Philippin*es, pp: 150-157.

42. Silva F.C., Nicoli J.R., Zambonino-Infante J.L., Le Gall M.M., Kaushik S., Gatesoupe F.J. 2012. Influence of partial substitution of dietary fish meal on the activity of digestive enzymes in the intestinal brush border membrane of gilthead seabream, (*Sparus aurata*) and goldfish, (*Carassius auratus*). Aquaculture, 306: 233-237.

43. Skibola C., Smith M.T. 2000. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology and Medicine*, 29: 375-383.

44. Stavros C., Angela G.E., Pascal D. 2006. Fishmeal replacement by alfalfa protein concentrate in sharp snout sea bream *Diplodus puntazzo*. *Fisheries Science*, 72(6): 1313-1315.

45. Thomas L. 1998. Clinical Laboratory Diagnostics. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft; pp: 241-247.

46. Vangen B., Hemre G.I. 2003. Dietary carbohydrate, iron and zinc interactions in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 219: 597-611.

47. Wang Y., Kong L., Li C., Bureau D.P. 2010. The potential of land animal protein ingredients to replace fish meal in diets for cuneate drum, *Nibea miichthioides*, is affected by dietary protein level. *Aquaculture Nutrition*, 16: 37-43.

48. Wood C.M. 1993. Ammonia and urea metabolism and excretion. In: Evans, D.H. (ed.). Physiology of Fishes. CRC Press, Boca Raton, pp: 379-425.

49. Xie J., Liu B., Zhou Q., Su Y., He Y., Pan L., Ge X., Xu P. 2008. Effects of anthraquinone extract from rhubarb *Rheum officinale* bail on the crowding stress response and growth of common carp *Cyprinus carpio* var. Jian. *Aquaculture*, 281(1-4): 5-11.

50. Xu Q.Y., Wang C.A., Zhao Z.G., Luo L. 2012. Effects of replacement of fish meal by soy protein isolate on the growth, digestive enzyme activity and serum biochemical parameters for juvenile Amur Sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Asian*-Australas *Journal of Animal Science*, 25(11): 1588-1594.

51. Yang A.L., Chauying J.J., Chen H.L. 2003. Effects of high-cholesterol diet and parallel exercise training on the vascular function of rabbit aortas: a time course study. *Journal of Applied Physiology*, 95(3): 1194-1200.

52. Ye J., Liu X., Wang Z., Wang K. 2011. Effect of partial fish meal replacement by soybean meal on the growth performance and biochemical indices of juvenile

bone meal in shrimp, tilapia and trout diets. Advance en Nutrition Acicular VII. Memories del VII Symposium international de Nutrition Acuicola. 16-19 November. Hermosillo, Sonora, Mexico.

Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture International*, 19: 143-153.

53. Yu Y. 2004. Replacement of fish meal with poultry by product meal and meat and