تاثیر سطوح مختلف سیاه‌دانه جیره غذایی بر فاکتورهای بیوشیمیایی همولنف میگوی پاسفید غربی (*Penaeus vannamei*)

- **محمد نیرومند:** گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
- **آرش اکبرزاده*:** گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
- **عیسی ابراهیمی‌درچه:** گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
- **سیدعلیرضا سبحانی:** گروه پاتولوژی، دانشگده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران
- **اردشیر شیخ‌احمدی:** گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۷

چکیده

در این آزمایش تاثیر سطوح مختلف سیاه‌دانه جیره بر برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی میگوی پاسفید غربی (*Penaeus vannamei*) مورد بررسی قرار گرفت. پنج جیره با سطوح مختلف سیاه‌دانه شامل صفر (شاهد)، ۰/۵، ۱/۵، ۳ و ۵ درصد در قالب پنج تیمار و هر تیمار شامل سه تکرار و هر تکرار نیز محتوی ٤٠ عدد میگو (گرم ۲/۰±۷/۵) طراحی شدند. بعد از ۱۲ هفته غذادهی، سطوح گلوکز، آلکالین فسفاتاز (ALP) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) پلاسمای میگو، در تیمارهایی که سیاه‌دانه مصرف کرده بودند به‌طور معنی‌داری از تیمار شاهد کم‌تر بود (P<۰/۰۵). هم‌چنین میزان کراتینین (CREA)، پروتئین کل، ازت اوره همولنف (Hemolymph Urea Nitrogen)، اسیداوریک (Uric acid) و اوره (Urea/HUN liquid) نیز در تیمارهای سیاه‌دانه از تیمار شاهد کم‌تر بود اما این تفاوت‌ها معنی‌دار نبودند (P>۰/۰۵). از لحاظ میزان کلسیم و منیزیم، هیچ تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، هم‌چنین افزایش معنی‌داری در میزان فسفات در تیمارهای سیاه‌دانه ۱/۵ و ۵ درصد نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید (P<۰/۰۵). در مجموع آزمایش حاضر نشان داد که افزودن سیاه‌دانه در سطوح ۱/۵ و ۳ درصد، به جیره می‌تواند تاثیر مطلوبی بر فاکتورهای بیوشیمیایی همولنف میگوی پاسفید غربی، داشته باشد و به تولید پایدار میگو کمک کند.

کلمات کلیدی: همولنف، سیاه‌دانه، میگوی پاسفید غربی، هموسیت، پلاسما

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: akbarzadeh@ut.ac.ir

مقدمه

در بین سخت‌پوستان، پرورش میگو، یکی از سریع‌ترین راه‌های تولیدغذا و کسب درآمد می‌باشد (Kumar و همکاران، ۲۰۱۶). میگوی پا سفیدغربی (*Penaeus vannamei*)، در سال ۲۰۱۰ بین همه ماهی‌ها و میگوهای پرورشی، رتبه نخست تولید را کسب کرده (FAO، ۲۰۱۲) و میزان تولید آن از ۸/۸ میلیون تن در سال ۲۰۰۷ به ۱۸/۸ میلیون تن در سال ۲۰۱۵ افزایش یافته است (FAO، ۲۰۱۵). در سال‌های اخیر افزایش ذخیره‌سازی میگو، کاهش کیفیت آب و بالا رفتن میزان ابتلای میگوها به بیماری‌های ویروسی و باکتریایی باعث ضرر و زیان‌های زیادی در صنعت پرورش میگو شده است (Hsu و Chen، ۲۰۰۷؛ Hsieh و همکاران، ۲۰۰۸). میگوی پاسفیدغربی نیز از بیماری‌های ویروسی مثل Taura Syndrome Vius (TSV)، ویروس لکه‌سفید (WSSV) (Lo و همکاران، ۲۰۱۳؛ Yu و Song، ۲۰۰۰) و از باکتری‌های ویبریو مثل Vibrio harveyi رنج می‌برد (Liu و همکاران، ۲۰۰۴)، بنابراین استفاده از روش‌های مختلف، برای بالا بردن مقاومت میگو در برابر شرایط نا مساعد محیطی و بیماری‌ها، می‌تواند کمک شایانی به توسعه پایدار صنعت پرورش میگو بنماید. میگو مثل سایر سخت‌پوستان و حشرات از لحاظ سیستم ایمنی تطبیقی ضعیف است و برای مقابله با پاتوژن‌ها وابسته به سیستم ایمنی ذاتی خود می‌باشد. سلول‌های مرتبط به سیستم ایمنی میگو در همو لنف شناور بوده و هورمون‌های سیستم ایمنی هم توسط همین سلول‌ها تولید و در همولنف آزاد می‌شوند (Haffmann و همکاران، ۱۹۹۹). بنابراین بهبود سطح فاکتورهای بیوشیمیایی همولنف می‌تواند یکی از روش‌های تاثیرگذار برارتقای سطح ایمنی و مقاومت میگو در برابر شرایط نامساعد محیطی و بیماری‌ها باشد. در مطالعات گذشته یک‌سری شاخص‌هایی برای ارزیابی فاکتورهای بیوشیمیایی همولنف میگو، مانند میزان SOD، پروتئین کل ، ALP، CREA، میزان اوره، اسیداوریک، میزان مواد معدنی، فنول اکسیداز، فعالیت فاگوسیتوزی و انفجار تنفسی (Le و Haffner، ۲۰۰۰؛ Rodriguez و Le، ۲۰۰۰) مورد استفاده قرار گرفته‌اند. هم‌چنین در سال‌های اخیر جهت بالا بردن مقاومت میگوها در برابر بیماری‌ها و شرایط نامساعد محیطی تلاش‌های زیادی برای به‌کارگیری موادی که سطح فاکتورهای بیوشیمیایی همولنف را بهبود ببخشند، انجام شده است (Tan و همکاران، ۲۰۱۴). انواع مختلفی از این مواد، شامل پلی‌ساکاریدها، ویتامین‌ها، فلزات و آنتی‌اکسیدان‌ها برای این منظور امتحان شده‌اند (Wang و همکاران، ۲۰۱۳). ترکیبات گیاهی هم با توجه به این‌که طبیعی بوده و خطر کمی برای سلامت غذایی انسان دارند به‌عنوان یک جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها، در سخت‌پوستان، مورد توجه قرار گرفته‌اند (Khan و همکاران، ۲۰۱۳). در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های مصنوعی و مواد شیمیایی غیرارگانیک، گیاهان و مشتقات آن‌ها طبیعی بوده و سمیت کم‌تری دارند، عاری از پسماند هستند و به‌نظر می‌رسد که افزودنی‌های غذایی ایده‌آلی برای تولید دام، طیور و آبزیان باشند (Wang و همکاران، ۲۰۱۳). به‌عنوان مثال استفاده از گیاه گزنه (*Urtica dioica*) در غذای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث افزایش فعالیت سیستم ایمنی گردید (Dugenci و همکاران، ۲۰۰۳). اخیراً نیز مشخص شده که بعضی از گیاهان به‌عنوان محرک سیستم ایمنی، جهت مقابله ماهی با پاتوژن‌ها بسیار مهم هستند که از آن جمله می‌توان به پودر و عصاره گیاه tetra (*Cotinus coggygria*) (Bilen و همکاران، ۲۰۱۱؛ Bilen و همکاران، ۲۰۱۴)، عصاره کاهوی هندی (*Lactuca indica*) (Harikrishnan و همکاران، ۲۰۱۱)، عصاره قارچ oyster (*Pleurotus ostreatus*) (Bilen و همکاران، a۲۰۱۶) و عصاره گیاه caper (*Capparis spinose*) (Bilen و همکاران، b۲۰۱۶) اشاره کرد. هم‌چنین افزودن زنجبیل به غذای میگو، باعث ارتقاء سطح ایمنی و مقاومت در برابر بیماری‌ها شده و آرتمیای غنی شده با زنجبیل، باعث افزایش رشد لاروهای میگو مونودون گردید (Venkutramalingam و همکاران، ۲۰۰۷) و نشان داده شده است که افزودن آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) به غذای میگوی پاسفید غربی، باعث از بین رفتن آلودگی قارچی شده است (Sharif Rohani و همکاران، ۲۰۱۳). ازجمله گیاهان دارویی که به‌صورت سنتی و موفقیت‌آمیزی در انسان، طیور، دام، خرگوش و موش، مورد استفاده قرار گرفته و باعث بهبود فاکتورهای بیوشیمیایی خون شده است، سیاه‌دانه می باشد. سیاه‌دانه با نام علمی *Nigella sativa*، یک گیاه یک‌ساله و متعلق به خانواده *Ranunculaceae* می‌باشد (Atta، ۲۰۰۳). این گیاه در خاورمیانه، شرق اروپا و غرب و مرکز آسیا رشد می‌کند، طعم آن تا حدودی تلخ و تند بوده و بافتی اسفنجی دارد (Shrififar و همکاران، ۲۰۱۶). دانه آن مثلثی شکل و حدود یک تا ۵ میلی‌گرم وزن دارد (Zaoui و همکاران، ۲۰۰۲). ثابت شده است که سیاه‌دانه دارای اثر ضدباکتریایی، ضدالتهاب، محرک ایمنی، آنتی‌اکسیدانی، ضدقارچ، ضدویروس، ضدسرطان، محرک سیستم ایمنی، ضدچاقی، ضدفشارخون و در نهایت اثر ضدچربی و به‌ویژه ضدکلسترول می‌باشد (Heshmati و همکاران، ۲۰۱۵). سیاه‌دانه به اشکال مختلفی همانند پودر سیاه‌دانه، عصاره سیاه‌دانه، روغن سیاه‌دانه و مواد فرار سیاه‌دانه در تحقیقات مورد استفاده قرار می‌گیرد (Mohtashami و همکاران، ۲۰۱۱). سیاه‌دانه حاوی ۰/۵٪ تا ۱/۶٪ روغن فرار، ۳۵/۶٪ تا ۴۱/۶٪ روغن ثابت و ۲۲/۷٪ پروتئین و آمینواسید است (Al-Gaby، ۱۹۹۸). دانه‌ها حاوی چربی، فیبر، مواد معدنی مثل آهن، سدیم، کلسیم، فسفر، مس، روی و ویتامین‌ها مثل اسیداوسکوربیک، تیامین، نیاسین، پیریدوکسین و فولیک‌اسید است (Takruri و همکاران، ۱۹۹۸). مهم‌ترین مواد موجود در روغن فرار سیاه‌دانه عباتند از thymoquinone (۳۰٪ تا ۴۸٪)، thymohydro quinone، dithymoquinone (یا nigellone)، p-cymene (۷٪ تا ۱۵٪)، carvacrol (۶٪ تا ۱۲٪)، ۴-terpineol (۲٪ تا ۷٪)، t- anethole (۱٪ تا ۴٪)، sesquiterpene longifolene (۱٪ تا ۸٪)، α -pinene و thymol (Ali و Blunden، ۲۰۰۳). بعضی از مواد موجود در سیاه‌دانه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی هستند مثل thymoquinone، carvacrol،

t- anethole و 4-terpineol (Srinivasan، ۲۰۱۷). برخی دیگر از مواد موجود در روغن فرار سیاه‌دانه، جلوی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت را می‌گیرند که عبارتند از p-cymene، thymoquinone، thujene، α longifolene، sesquiterpene، carvacrol و α -pinene و β -pinene (Morsi، ۲۰۰۰). ازجمله دیگر مواد موجود در سیاه‌دانه می‌توان به dithymoquinone، thymol، nigellicine - N-oxide، nigellidine و α –hedrin اشاره کرد (Nasir و همکاران، ۲۰۰۵؛ Al-Homidan و همکاران، ۲۰۰۲). مواد فعال موجود در سیاه‌دانه به غشای سلولی باکتری‌ها نفوذ کرده و خود را به داخل باکتری می‌رسانند. این کار به‌واسطه خاصیت lipophilicity و آروماتیک سیاه‌دانه انجام می‌شود (Bowles و Miller، ۱۹۹۳). نفوذ به‌فضای داخل‌باکتری باعث افزایش نفوذپذیری غشاء و تراوش ترکیبات حیاتی درون سلولی به بیرون و سرانجام اختلال در سیستم آنزیمی باکتری می‌شود (Farag و همکاران، ۱۹۸۹). تحقیقات گذشته نشان داده است که سیاه‌دانه اثرات متعددی بر فاکتورهای بیوشیمیایی خون موجودات زنده داشته است، به‌عنوان مثال، سیاه‌دانه گلوکز خون را پایین می‌آورد (Al-Awad، ۱۹۹۱)، ALP را پایین می‌آورد (Rathee و همکاران، ۱۹۸۲)، میزان CREA و اوره خون را کاهش می‌دهد (Nwanjo و همکاران، ۲۰۵) و تاثیر معنی‌داری بر پروتئین پلاسما ندارد (Toghyani و همکاران، ۲۰۱۰). پودر سیاه‌دانه باعث بهبود فاکتورهای بیوشیمیایی خون در مرغ تخم‌گذار (Al-Ankari، ۲۰۰)، red tilapia (Abd Elmonem و همکاران، ۲۰۰۲)، Nile tilapia (John و همکاران، ۲۰۰۷)، خرگوش‌ها (Meral و همکاران، ۲۰۰۱) و موش‌ها (Kaleem و همکاران، ۲۰۰۶) شده است. با توجه به مطالعات گسترده‌ای که در مورد اثر سیاه‌دانه بر بهبود فاکتورهای بیوشیمیایی خون در موجودات مختلف صورت گرفته، تاکنون هیچ مطالعه‌ای درخصوص اثر سیاه‌دانه بر میگوها انجام نشده است. در این مطالعه، برای اولین‌بار، اثر سطوح مختلف سیاه‌دانه جیره بر فاکتورهای بیوشیمیایی هموLنف میگوی وانامی مورد مطالعه قرار گرفت تا با این فرض که سیاهدانه قادر است سطح فاکتورهای بیوشیمیایی هموLنف میگو را بهبودببخشدو به این وسیله باعث افزایش مقاومت میگو دربرابر شرایط نامساعد محیطی و بیماری‌ها گردد، گامی درجهت کاهش مشکلات صنعت میگو و تولید پایدار آن برداشته شود.

مواد و روش‌ها

تهیه جیره: سیاهدانه مورد نیاز برای انجام تحقیق از مزارع شهر اصفهان تهیه گردید و ترکیب تقریبی سیاه‌دانه در دانشگاه صنعتی اصفهان مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). پنج جیره غذایی در سطوح سیاه‌دانه صفر (شاهد)، ۰/۵، ۱/۵، ۳ و ۵ درصد تنظیم گردید به این صورت که برای بالانس چربی جیره، سیاه‌دانه جایگزین روغن ماهی و سویا گردید، هم‌چنین با جایگزینی سیاه‌دانه به جای مقادیر مشخص برنج و گندم، پروتئین جیره تنظیم گردید. برای تنظیم جیره نرم‌افزار Lindo ۶/۱ (USA)، مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲). برای ساخت جیره‌ها، مواد اولیه توزین شده و به‌مدت ۲۰ دقیقه در میکسر به‌خوبی هم‌زده شدند و سپس آب‌مقطر برای تهیه یک‌خمیر یکنواخت، به مخلوط اضافه گردید. این مواد از چرخ گوشت با چشمه ۳ میلی‌متر عبور داده شدند سپس جیره‌های غذایی به‌صورت جداگانه، روی پلاستیک‌های تمیز، به‌مدت ۴۸ ساعت در معرض باد فن قرار گرفتند. در نهایت پلت‌های غذایی در کیسه‌های زیپ‌دار نایلونی بسته‌بندی و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند (جدول ۳).

جدول ۱: ترکیب شیمیایی سیاه‌دانه بر حسب درصد

ترکیب تقریبی سیاه‌دانه (درصد)	ماده مرطوب	ماده خشک
پروتئین	۲۲/۳۱.	۲۳/۷۸
چربی	۳۸/۲۷	۴۰/۸۰
کربوهیدرات	۲۴/۵۵	۳۲/۲۳
رطوبت	۶/۲	۰
خاکستر	۸/۶۷	۹/۴۴
فیبر	۵/۶۸	۶/۰۶

شرایط آزمایش: این آزمایش در خرداد ماه سال ۱۳۹۵ با انتقال ۸۰۰ عدد میگوی وانامی از مزرعه پرورش میگوی اربیان طلایی، واقع در سایت تیاب شهرستان میناب به پارک زیست فناوری خلیج فارس، آغاز گردید، سپس میگوها به‌مدت سه هفته با شرایط آزمایشگاهی، سازگار شده و در این مدت با غذای تجاری تغذیه شدند. بعد از سازگاری، ۶۰۰ عدد میگوی سالم با وزن ۰/۲±۷/۵ گرم، به‌طور تصادفی در ۱۵ مخزن گرد پلی‌اتیلن با ظرفیت ۲۸۰ لیتر، به تعداد ۴۰ عدد میگو برای هر مخزن توزیع شدند. این آزمایش شامل ۵ تیمار آزمایشی، هر تیمار شامل سه تکرار و جمعاً ۱۲۰ عدد میگو برای هر تیمار بود. میگوها روزانه به‌میزان ۴ درصد وزن بدن در چهار وعده (۰۷:۰۰، ۱۱:۰۰، ۱۵:۰۰ و ۱۹:۰۰) به‌مدت ۱۲ هفته غذادهی شدند. تعویض آب به‌طور مستقیم از دریا و به‌میزان ۹۰ درصد، هر روز صبح، قبل از غذادهی انجام می شد و میزان غذا هر دو هفته یک‌بار براساس میانگین وزنی میگوها در هر مخزن محاسبه می‌گردید. برای هوادهی در هر مخزن از دو سنگ هوا استفاده شد و فاکتورهای بیوشیمیایی شامل اکسیژن، pH، شوری و دما روزانه اندازه‌گیری می‌شد و میانگین مقدار آن‌ها به‌ترتیب، لیتر/میلی‌گرم ۰/۴±۵/۸، ۰/۱±۸/۱، ppt۵/۵±۳۶/۰، ^{o}C۲±۳۲ بود. دوره نوری نیز به‌صورت طبیعی بوده و تقریباً شامل ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی بود. برای سنجش سطح فاکتورهای بیوشیمیایی هموLنف، از هر مخزن، سه عدد میگو انتخاب شده و از ناحیه بین پاهای اول و دوم حرکتی، نزدیک طناب عصبی، از آن‌ها هموLنف گرفته شد (Yang و همکاران، ۲۰۱۴).

نمونه‌برداری و آنالیز هموLنف: برای گرفتن هموLنف از سرنگ انسولین یک میلی‌لیتری با سوزن شماره ۲۵ و حاوی ۰/۳ میلی‌لیتر، ماده‌ضدانعقاد (شامل ۱۰ میلی‌مول Tris-HCl، ۲۵۰ میلی‌مول Sucrose

جدول ۲: آنالیز تقریبی اجزای جیره بر حسب درصد

ماده خوراکی	رطوبت	ماده خشک	پروتئین	چربی	خاکستر
پودر ماهی[۱]	۷/۵۸	۹۲/۴۲	۶۸/۷	۶/۷	۲۳/۰۲
آرد برنج[۲]	۶/۵۱	۹۳/۴۹	۵/۲	۲/۰۶	۲۴/۵۲
آرد سویا[۳]	۶/۷۳	۹۳/۲۷	۴۵/۳	۵/۴۸	۷/۲۳
آرد گندم	۹	۹۱	۱۲	۱/۲	۰/۴
پودر میگو[۲]	۸	۹۲	۳۰	۳/۲	۲۷/۲
گلوتن گندم[۴]	۹	۹۱	۵۷	۱/۸	۲/۱
بنتونیت[۵]	۶/۰۲	۹۳/۹۸	–	۰/۴۷	۹۶/۱۶
بایندر[۵]	۵/۲۴	۹۴/۷۹	–	۵/۹۹	۰/۰۹
روغن ماهی[۶]	–	–	–	–	–
روغن سویا[۷]	–	–	–	–	–
مکمل معدنی[۸]	–	–	–	–	–
مکمل ویتامینه[۹]	–	–	–	–	–

– تهیه شده از کارخانه پودر ماهی قشم، ۲- تهیه شده از کارخانه هرمز دام بندر عباس، ۳- تهیه شده از شرکت یسنا مهر تهران، ۴- تهیه شده از شرکت فرایندهای گیاهی ورامین، ۵ – تهیه شده از شرکت کیمیا رشد، ۶ – تهیه شده از شرکت پارس کیلکا، ۷ – تهیه شده از کارخانه خوراک دام آبزیان ساری، ۸ – شرکت لابراتوارهای سیانس قزوین. هر ۵ کیلوگرم مکمل معدنی حاوی: ۴۰۰۰ میلی‌گرم آهن، ۱۲۰۰۰ میلی‌گرم روی، ۶۰ میلی گرم سلنیوم، ۲۰۰۰ میلی‌گرم کبالت، ۵۱۰۰۰ میلی‌گرم مس، ۴۰۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۸۰ میلی‌گرم ید و۸۰۰۰۰ میلی‌گرم کولین کلراید، ۹ – تهیه شده از شرکت لابراتوارهای سیانس قزوین. هر ۵ کیلوگرم مکمل ویتامینه حاوی: ۸۰۰۰۰۰۰ واحد بین المللی ویتامینA، ۲۰۰۰۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D_3، ۱۵۰۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین E، ۵۰۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین K_3، ۵۰۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین B_1، ۴۰۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین B_2، ۱۵۰۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین B_3، ۲۰۰۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین B_5، ۸۰۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین B_6، ۱۵۰۰۰ میلی‌گرم ویتامی B_9، ۵۰ میلی‌گرم ویتامین B_{12}، ۱۵۰۰ میلی‌گرم H_2، ۵۰۰۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین C، ۵۰۰۰۰۰ میلی‌گرم اینوزیتول و ۱۰۰۰ میلی‌گرم BHT

جدول ۳: ساختار ۵ جیره غذایی و ترکیب شیمیایی آن‌ها

مواد غذایی	شاهد	سیاه‌دانه ۰/۵درصد	سیاه‌دانه۱/۵درصد	سیاه‌دانه ۳درصد	سیاه‌دانه ۵درصد
پودر ماهی	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰
آرد سویا	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹
گلوتین گندم	۹/۶	۹/۶	۹/۶	۹/۶	۹/۶
آرد میگو	۶/۴	۶/۴	۶/۴	۶/۴	۶/۴
پودر گندم	۱۷/۴	۱۷/۴	۱۷/۴	۱۷/۴	۱۷/۴
آرد برنج	۲/۶	۲/۶	۲/۶	۲/۶	۲/۶
بنتونیت	۱	۱	۱	۱	۱
همبند آکواکیوب	۱	۱	۱	۱	۱
مکمل معدنی	۱	۱	۱	۱	۱
مکمل ویتامینه	۱	۱	۱	۱	۱
روغن ماهی و سویا[۱]	۶	۵/۸	۵/۴	۴/۸	۴
سیاهدانه	۰	۰/۵	۱/۵	۳	۵
آرد گندم و سویا[۲]	۵	۴/۷	۴/۱	۳/۲	۲
ترکیب شیمیایی جیره غذایی (درصد)					
پروتئین	۴۰/۹۸	۳۸/۳۸	۳۹/۲۶	۳۸/۴۳	۳۸/۵۸
چربی	۱۸/۵۱	۱۹/۳۰	۱۹/۸۶	۲۱/۴۲	۲۲/۸۵
کربوهیدرات	۲۳/۲۱	۲۵/۳۴	۲۳/۲۰	۲۴/۱۰	۲۲/۲۹
فیبر	۲/۹۸	۳/۰۱	۳/۱۶	۳/۲۷	۳/۲۹
خاکستر	۱۱/۶۹	۱۱/۶۶	۱۱/۷۰	۱۰/۶۹	۱۰/۲۷
رطوبت	۵/۶۱	۵/۳۲	۵/۹۸	۵/۳۶	۶/۰۱

۱- روغن ماهی و سویا به نسبت ۲ به ۱ مورد استفاده قرار گرفتند. ۲ – مخلوط آرد گندم به سویا به نسبت ۷۰ به ۳۰ بود و میزان پروتئین آن معادل پروتئین سیاهدانه یعنی تقریبا ۲۲/۵ بود که برای تعادل جیره مورد استفاده قرار گرفت.

و ۱۰۰ میلی‌مول Sodium Citrate با pH= ۷/۶) با دمای ۴ C^o استفاده شد. سپس به‌میزان ۰/۳ میلی‌لیتر همولنف از میگو گرفته شد. با توجه به نسبت ۱:۱ همولنف با محلول ضدانعقاد، ضریب ۲ در سنجش تمام شاخص‌های همولنف لحاظ گردید. رنگ ترکیب همولنف با ماده ضد انعقاد در مجاورت هوا، از حالت بی‌رنگ به رنگ آبی‌آسمانی تغییر کرد (Yang و همکاران، ۲۰۱۴). محتویات سرنگ، بلافاصله به‌داخل یک ویال ۱/۵ میلی‌لیتری استریل منتقل و در فریزر ۲۰C^o- قرار داده شدند و در همان‌روز به‌وسیله یخ خشک به آزمایشگاه تشخیص طبی دکتر سبحانی بندرعباس منتقل شدند. سپس ویال‌های حاوی نمونه، در دمای اتاق یخ‌زدایی شده و پس از همگن شدن با دستگاه ورتکس، به‌مدت ۱۲ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار با ۱۳۴۰۰ دور در دقیقه قرارداده‌شدند تاپلاسماازهموسیت‌هاجداگردید (Palacios و همکاران، ۲۰۰۰).درمرحله بعد،بخش فوقانی ویال‌ها برای سنجش میزان گلوکز، اوره، کراتینین، اسیداوریک، آلکالین فسفاتاز، پروتئین کل، آلبومین، کلسیم، فسفر و منیزیم به دستگاه اتوآنالیزور (COBAS INTEGRA ۴۰۰PLUS, Germany) منتقل شدند. جهت سنجش

کورتیزول نیز از دستگاه اتوآنالیزور (COBAS e 411, Germany) استفاده شد. برای اندازه‌گیری کلیه فاکتورهای مذکور از کیت ROCHE, Germany استفاده شد. برای اندازه‌گیری SOD، مخلوط همولنف و ماده ضدانعقاد در دمای ۴C° به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. پلاسما از پلت کف (سلول‌های هموسیت) جدا شده و پلت با ۳ سی‌سی نمک‌طعام ۹ درصد شستشو و دوباره سانتریفیوژ شد. پلت از مایع جدا شده و دوباره با ۲ سی‌سی آب مقطر سانتریفیوژ شده و ۵۰ میکرولیتر از این هموسیت برای سنجش SOD به‌کار رفت. رفرنس استاندارد اندازه‌گیری SOD، کیت Ransod است (Randox, Crumlin, UK). اساس این روش به‌این صورت است که ۵۰ میکرولیتر گزانتین اکسیداز (تولید کننده سوپراکسید) و ۲۰۰ میکرولیتر INT و ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هموسیت در حفره‌های ۴×۱۰ میلی‌متری اسپکتروفوتومتر با طول موج ۵۰۵ نانومتر قرار داده شدند. در اثر واکنش رادیکال‌های سوپراکسید و INT، رنگ قرمز فرمازان تولید می‌شود. یک واحد SOD، آن مقداری است که قادر باشد میزان گزانتین را تا ۵۰ درصد کاهش دهد (Jueliang و همکاران، ۲۰۱۳).

آنالیز آماری داده‌ها: جهت بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولوموگروف اسمیرنوف استفاده گردید و پس از آن جهت بررسی همگنی واریانس‌ها از آزمون لون استفاده شد. پس از برقراری شرایط همگنی داده‌ها به کمک نمودارهای QQ PLOT، از آزمون آماری One Way ANOVA و سپس آزمون دانکن در سطح اعتماد ۵ درصد، جهت مقایسه میانگین‌ها و از نرم‌افزار SPSS (۲۰) برای آنالیز آماری استفاده شد و نتایج به‌صورت میانگین± انحراف معیار (SD) بیان شدند.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی پارامترهای بیوشیمیایی همولنف میگوی وانامی که با جیره‌های حاوی سطوح مختلف سیاهدانه، طی ۱۲ هفته غذادهی شده بودند در جدول ۴ بیان شده‌اند. طبق نتایج، تمام سطوح سیاه‌دانه جیره، باعث کاهش میزان گلوکز، نسبت به گروه شاهد گردیدند اما فقط تیمار حاوی ۳ درصد سیاه‌دانه، به‌طور معنی‌داری از تیمار شاهد کم‌تر بود ($P<0/05$). نتایج حاصل از این آزمایش نشان‌داد که سیاه‌دانه جیره باعث کاهش میزان اوره (urea BUN)، اسید اوریک (uric acid)، ازت اوره همولنف (urea nitrogen)، پروتئین کل، کراتینین و لیزوزیم، نسبت به گروه شاهد گردید اما این اختلاف‌ها معنی‌دار نبود ($P>0/05$). براساس نتایج، جیره‌های حاوی ۱/۵، ۳ و ۵ درصد سیاه‌دانه، به‌طور معنی‌داری باعث کاهش آلکالین فسفاتاز نسبت به گروه شاهد گردیدند ($P<0/05$). سیاه‌دانه جیره هم‌چنین باعث کاهش میزان SOD نسبت به گروه شاهد گردید اما میزان SOD فقط در تیمار حاوی ۱/۵ درصد سیاه‌دانه به‌طور معنی‌داری از تیمار شاهد کم‌تر بود. از لحاظ میزان کلسیم و منیزیم هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد ($P>0/05$). میزان فسفات در گروه‌های سیاه‌دانه ۱/۵ و ۵ درصد به‌طور معنی‌داری از گروه شاهد بیش‌تر بود.

جدول ۴: میزان فاکتورهای بیوشیمیایی پلاسمای میگوی وانامی تغذیه شده با سطوح مختلف سیاه‌دانه، طی دوره ۱۲ هفته آزمایش (n=۹؛ میانگین± انحراف معیار)

موارد	شاهد	۰/۵ درصد	۱/۵ درصد	۳ درصد	۵ درصد
گلوکز	۴۵/۱۰±۶۷/۷۹^{a}	۷±۳۸/۲۳^{ab}	۸±۳۵/۲۵^{ab}	۳۲/۸±۶۷/۱۴^{b}	۴۱/۱۴±۵/۱۱^{ab}
ازت اوره همولنف	۳/۱±۵۶/۳۹	۳/۰±۳۳/۹۹	۳/۰±۱۳/۷۶	۳/۰±۰۶/۹۲	۳/۱±۲۶/۳۵
کراتینین	۰/۰±۹۶/۳۴	۰/۰±۶۷/۰۳	۰/۰±۸۹/۳۴	۰/۰±۹۰/۲۹	۰/۰±۸۲/۲۰
اسید اوریک	۰/۰±۸/۴۵	۰/۰±۶۳/۱۸	۰/۰±۶۰/۳۶	۰/۰±۷۰/۱۵	۰/۰±۸۴/۳۱
کلسیم	۲۶/۱±۲۵/۹۱	۲۷/۱±۶/۲۴	۱۹/۸±۸۸/۱۱	۲۲/۳±۵۰/۶۹	۲۲/۴±۹۹/۵۸
فسفات	۱/۰±۳۶/۴۹^{bc}	۱/۰±۲۲/۳۶^{c}	۱/۰±۸۹/۱۳^{a}	۱/۰±۳۱/۳۱^{bc}	۱/۰±۶۹/۴۶^{a}
منیزیم	۵/۰±۶۵/۹۷	۶/۱±۲۹/۵۱	۵/۱±۰۱/۷۲	۵/۱±۰۵/۰۸	۵/۲±۷۲/۰۷
اوره	۸/۳±۳۲/۳۸	۷/۲±۲۱/۱۴	۶/۲±۲۵/۱۳	۶/۱±۵۳/۹۷	۶/۲±۹۹/۸۹
آلکالین فسفاتاز	۱۸±۵۳/۵۴^{a}	۶۶/۱۹±۶۳/۴۰^{a}	۱۳±۳۶/۹۸^{b}	۴۳/۲۲±۶۶/۴۷^{b}	۷±۴۳/۰۹^{b}
پروتئین کل	۷/۱±۱۶/۲۰	۶/۱±۳۳/۴۸	۶/۱±۶۶/۷۱	۵/۱±۶/۵۴	۶/۱±۵۶/۰۵
سوپراکسید دیسموتاز	۳۹/۶±۴۸/۰۳^{a}	۳۴/۴±۲۰/۶۳^{ab}	۳۱/۲±۰۳/۷۴^{b}	۳۸/۷±۷۲/۰۲^{ab}	۳۱/۶±۹۷/۰۶^{ab}

حروف لاتین غیرمشابه بالای اعداد هر ردیف، نشانه معنی‌دار بودن تفاوت بین تیمارها می‌باشد ($P<0/05$). واحد اندازه‌گیری گلوکز، ازت اوره همولنف، کراتینین، اسید اوریک، کلسیم، فسفات، منیزیم و اوره بر حسب دسی‌لیتر/میلی‌گرم؛ پروتئین کل بر حسب دسی‌لیتر/گرم؛ آلکالین فسفاتاز بر حسب لیتر/واحدبین‌المللی و سوپراکسید دیسموتاز بر حسب میلی‌لیتر/واحد بین‌المللی می‌باشد.

بحث

همولنف به‌عنوان یک ماده بیولوژیک مهم قابل‌دسترس در تعداد زیادی از گونه‌های آبزیان، ازجمله میگوها، همانند خون نقش مهمی در تبادلات یونی و حمل و نقل هموسیت‌ها و مواد مربوط به سیستم ایمنی ذاتی میگو و انجام بسیاری از فعالیت‌های شیمیایی مورد نیاز بدن، بر عهده دارد، لذا مطالعه و سنجش ترکیبات بیوشیمیایی آن می‌تواند حائز اهمیت باشد. از این‌رو، در این مطالعه برای اولین‌بار در سخت‌پوستان، اثر سیاه‌دانه بر فاکتورهای بیوشیمیایی همولنف میگو وانامی مورد ارزیابی قرار گرفت. در تحقیق حاضر، سیاه‌دانه جیره باعث کاهش میزان گلوکز گردید. در نتایج مشابه، سیاه‌دانه باعث کاهش گلوکز پلاسما در خرگوش‌ها (Al-Hader، ۱۹۹۳)، انسان (Al-Okbi و همکاران، ۲۰۱۳) و موش‌ها (El-Dakhakhny و همکاران، ۲۰۰۲؛ Zaoui و همکاران، ۲۰۰۲) شده است. مکانیسم پایین آمدن گلوکز به‌وسیله سیاه‌دانه هنوز مشخص نیست اما ممکن است به‌طور مستقیم به‌وسیله تاثیر مواد فعال سیاه‌دانه بر کبد صورت بگیرد. یا این‌که سیاه‌دانه

به‌صورت غیرمستقیم، با افزایش سطح مقاومت میگو، به استرس‌های محیطی باعث کاهش گلوکز شود به این دلیل که استرس‌های محیطی در میگوهای پنائیده باعث‌افزایش ترشح دوپامین می‌شوند. دوپامین باعث فعال‌شدن آنزیم hyperglycaemic در سخت پوستان می‌شود که نتیجه آن بالا رفتن میزان گلوکز پلاسما است (Kuo و همکاران، ۱۹۹۵). در نتیجه پایین بودن گلوکز پلاسما ممکن است به‌دلیل بالا رفتن‌مقاومت میگو دربرابراسترس‌های محیطی، دراثرمصرف سیاه‌دانه باشد. پایین بودن سطح گلوکز در واقع یک نوع دفاع آنتی‌اکسیدانی است (Kennedy، ۱۹۸۴)، به این دلیل که افزایش میزان گلوکز و ورود آسان آن به‌داخل سلول‌های خون و کبد، باعث glycosylation غیرآنزیمی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود. پس سیاه‌دانه با کاهش میزان گلوکز پلاسما، مانع از تقلیل آنزیم‌های آنتی اکسیدانی شده و به این صورت به ارتقاء سطح ایمنی کمک می کند (Kennedy، ۱۹۸۴). در مطالعات انجام شده بر روی انسان (Valizadeh و همکاران، ۲۰۰۹) و موش‌ها (Alsaif، ۲۰۰۷؛ Attia و Nasr، ۲۰۰۹)، مشخص شده‌که سیاه‌دانه قادراست میزان ALP سرم خون را به‌طور معنی‌داری کاهش دهد. بالا بودن ALP در سرم، نشان دهنده‌بروزآسیب‌های کبدی است (Toghyani، ۲۰۱۰؛ Zerin، ۲۰۰۴).سیاه‌دانه‌به‌وسیله‌مواد آنتی‌اکسیدان خود، پراکسیداسیون چربی‌ها را در سلول‌های B-cell کبدی کاهش می‌دهد و به این ترتیب مانع بروز آسیب‌های کبدی و پایین‌ماندن سطح آلکالین فسفاتاز در سرم می‌شود(Kanter، ۲۰۰۹). در مطالعه حاضر نیز سیاه‌دانه به‌واسطه موادفعال آنتی‌اکسیدان‌خود، باعث پایین‌بودن‌میزان ALP در همولنف میگو گردید که می‌تواند نشان‌دهنده تقویت سطح سلامت باشد. SOD یک آنزیم داخل سلولی است و در مکانیسم دفاعی بر علیه استرس‌های اکسیداتیو نقش مهمی ایفا می‌کند (Neves و همکاران، ۲۰۰۰). در زمان‌حمله پاتوژن‌ها، سلول‌های هیالینه، آن‌ها را دربرمی‌گیرندو میزان مصرف اکسیژن در میکروزوم‌های میتوکندری سلول‌های هیالینه، بالا رفته و باعث بروز انفجار تنفسی می‌شود، در نتیجه آنیون‌های سوپر اکسید (O_2^-) تولید می‌شوند که باکتری‌کش هستند، اما اگر مقدار این آنیون‌ها زیاد شود سلول‌های هموسیت را می‌کشند. حضور جزئی آنیون‌های سوپر اکسید باعث می‌شود که ترکیب چربی دیواره سلول هموسیت تغییر کرده و آنتی‌اکسیدان‌هایی‌مثل SOD فعال شوند.SOD باعث‌تبدیل آنیون‌های سوپراکسید به H_2O_2 (پراکسید هیدروژن) شده و از تولید رادیکال‌های بسیار سمی هیدروکسیل (OH*) جلوگیری می‌کند. آنیون‌های پراکسید هیدروژن، به‌وسیله آنزیمgluthathion prexidase آزادانه از دیواره سلول هموسیت‌ها به بیرون‌هدایت‌می‌شوند (Warner، ۱۹۹۴؛ Itami و همکاران، ۱۹۹۸؛ Winston، ۱۹۹۱). بنابراین افزایش‌سطح اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها، بعد از آن‌که سلول با پاتوژن یا یک محرک برخورد می‌کند، یک پاسخ ایمنی قوی در میگوها است (Downs و همکاران، ۲۰۰۷). اما Salem (۲۰۰۵) گزارش داد که سیاه‌دانه به‌واسطه وجود موادفعال آنتی‌اکسیدان، باعث می‌شود که میزان SOD در موش‌ها در سطح نرمال بماند. در آزمایش حاضر نیز سیاه‌دانه جیره باعث کم شدن میزان SOD نسبت به تیمار شاهد شده بود. این کاهش SOD می‌تواند به این دلیل باشد که سیاه‌دانه به‌وسیله مواد آنتی‌باکتریال خود پاتوژن‌ها را نابود می‌کندو اصلاً کار به افزایش تولید هیالینه‌ها و انجام فاگوسیتوز نمی‌انجامد. یا این‌که اگر هم فاگوسیتوز و انفجار تنفسی رخ دهد مولکول‌های سبک وزن آنتی اکسیدان سیاه‌دانه، رادیکال‌های پراکسید را از بین می‌برند و دیگر نیاز به تولید SOD نیست. تحقیقات نشان داده که تیموکوئینون (TQ) سیاه‌دانه، میزان اسیداوریک‌خون‌موش‌ها‌را به‌مقدار جزئی‌کاهش‌داده است (Kanter، ۲۰۰۴). اسیداوریک یک آنتی‌اکسیدان مهم‌خون‌است (Ames و همکاران، ۱۹۸۱)و محصول نهایی‌کاتابولیسم purine‌می‌باشد. باوجود این‌که اسیداوریک،رادیکال‌های آزاداکسیژن را کاهش می‌دهد، اما مقدار زیاد آن در خون ایجاد سمیت می‌کند (Mahjoubi و همکاران، ۲۰۰۸). در این آزمایش سیاه‌دانه به‌میزان خیلی جزئی باعث کاهش اسیداوریک همولنف گردید و این به‌دلیل وجود TQ است. در آزمایش‌حاضر،سیاه‌دانه باعث‌کاهش میزان اوره و کراتینین همولنف گردید، اما این تفاوت معنی‌دار نیست. اوره و کراتینین پسماندهای تولید پروتئین‌ها هستند که نیاز است به‌وسیله کلیه‌ها دفع شوند، بنابراین اگر مقدار آن‌ها در بدن زیاد شود باعث آسیب به سیستم کلیه می‌شوندو به‌عنوان شاخص آسیب‌های کلیوی‌شناخته‌می‌شوند (Garba و همکاران، ۲۰۰۷). TQ موجود در سیاه‌دانه مانع از آسیب‌های کبدی می‌شود و این کار را با تنظیم کراتینین و اوره انجام می‌دهد(Badary، ۱۹۹۹). بنابراین سیاه‌دانه با کاهش اوره و کراتینین به ارتقاء سطح سلامت‌میگوکمک‌می‌کند.در مورد اثرسیاه‌دانه جیره بر میزان‌پروتئین پلاسما، عنوان شده که سیاه‌دانه جیره در طیور (Yalcin، ۲۰۰۹)، خرگوش‌ها (Meral و همکاران، ۲۰۰۱) و موش‌ها (Alsaif، ۲۰۰۷؛ Moneim و همکاران، ۱۹۹۷)، بر پروتئین پلاسما تاثیری ندارد. در مطالعه حاضر نیز در شرایط عادی آزمایش، میزان پروتئین، در تیمارها هیچ تفاوتی ندارد. در سخت‌پوستان، یکی از وظایف همولنف، حمل هموسیانین است، هموسیانین همان پروتئین تنفسی است که ۶۰ تا ۹۵درصدپروتئین‌کل پلاسما را درمی‌گیرد.ممکن است به‌دلیل خواص آنتی‌اکسیدان قوی سیاه‌دانه، نیاز اکسیژنی میگو در سطح نرمال و طبیعی باشد در نتیجه میزان هموسیانین نیز عادی و به تبع آن سطح پروتئین پلاسما هم ثابت خواهد ماند (Djangmah، ۱۹۷۰).سیاه‌دانه حاوی مواد معدنی مثل فسفر (۰/۵۷ گرم/میلی‌گرم)، کلسیم (۱/۸۶۴ گرم/میلی‌گرم)، پتاسیم (گرم/میلی‌گرم ۱۱/۸۰)، آهن (گرم/میلی‌گرم ۰/۵۷)، سدیم (گرم/میلی‌گرم ۰/۸۵) و منیزیم (۰/۳ گرم/میلی‌گرم) است(Toghyani و همکاران، ۲۰۱۰). در تحقیق‌حاضرمیزان‌کلسیم، فسفرو منیزیم پلاسمای میگو بررسی گردید که در میزان کلسیم و منیزیم هیچ تفاوتی بین تیمارها مشاهده نشد. در مطالعات مشابه روی انسان نیز، سیاه‌دانه روی میزان کلسیم و منیزیم تاثیری‌نداشته‌است (Valizadeh و همکاران، ۲۰۰۹). اما میزان فسفات در بعضی از

تیمارهای سیاه‌دانه به‌طور معنی‌داری از تیمار شاهد بالاتر بود. فسفات در انسان‌ها، وظیفه حمل، ذخیره و آزادکردن انرژی را بر عهده دارد و با بسیاری از آنزیم‌ها و ویتامین‌ها برای رهاسازی انرژی از مواد مغذی همکاری می‌کند (Devi، ۲۰۰۸). فسفر ماده حیاتی برای ساخت ALP نیز می‌باشد، بنابراین سیاه‌دانه ممکن است به‌واسطه فسفر به تقویت سیستم ایمنی میگو کمک کند. با توجه به نتایج تحقیق حاضر می‌توان بیان نمود که سیاه‌دانه جیره در سطوح ۱/۵ و ۳ درصد، قادر است به‌عنوان یک آنتی اکسیدان و آنتی‌باکتریال قوی، میزان گلوکز، اوره و اسیداوریک را کاهش دهد و محتوی فسفات سرم را افزایش دهد و در نهایت، میزان CREA، ALP، SOD را در سطح پایینی نگه دارد. بنابراین سیاه‌دانه جیره غذایی، می‌تواند با تاثیر بر فاکتورهای بیوشیمیایی هملنف، باعث افزایش مقاومت میگو در برابر شرایط نامساعد محیطی و بیماری‌ها گردیده و به‌عنوان یک جایگزین مناسب، به‌جای واکسن‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها، مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدر دانی

نویسندگان مقاله، مراتب تشکر و قدردانی خود را از آقای دکتر سیدمحمودرضا آقامیری، رئیس محترم پارک زیست فناوری خلیج فارس، به‌دلیل حمایت همه جانبه از انجام مراحل عملی این طرح و آقای دکتر علی ارشدی، عضو هیات علمی دانشگاه زابل به‌خاطر راهنمایی‌های علمی و کمک‌های بی‌دریغ برای پیشبرد اهداف تحقیق و هم‌چنین آقای مهندس متقی، کارشناس محترم آزمایشگاه تغذیه و جیره‌نویسی آبزیان دانشگاه صنعتی اصفهان، جهت همکاری در آنالیز و تنظیم جیره غذایی، ابراز می‌نمایند.

منابع

۱. **Abd Elmonem, A.; Shalaby, S. M.M. and El-Dakar, A.Y., 2002.** Response of red tilapia to different levels of some medicinal plants by-products: black seed and roquette seed meals. in: Proceeding of the 1st Conference on Aquaculture El Arish, Egypt. pp: 247-260.

۲. **Ahmed, M.; Attia, A.M. and Nasr, H.M., 2009.** Dimethoate-induced changes in biochemical parameters of experimental rat serum and its neutralization by black seed (*Nigella sativa L.*) oil. International Journal of Agliculture Science. Vol. 42, No. 2, pp: 87-94.

۳. **Al-Ankari, A.S., 2005.** Immunomodulating effects of black cumin and oxytetracycline in pigeons. Journal of Immunopharmacology and Immunotoxicology. Vol. 27, pp: 515-520.

۴. **Al-Awadi, F.M.; Fatania, H. and Shamte, U., 1991.** The effect of a plants mixture extract on liver gluconeogenesis in streptozotocin induced diabetic rats. Diabetes Research (Edinburgh, Scotland). Vol. 18, No. 4, pp:163-168.

۵. **Al-Gaby, A.M., 1988.** Amino acid composition and biological effects of supplementing broad bean and corn proteins with*Nigella sativa* (Black cumin) cake protein. Nahrung. Vol. 42, pp: 290-294.

۶. **Al-Hader, A.; Aqel, M. and Hasan, Z., (1993).** Hypoglycemic effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds. Journal of Pharmaceutical Biology. Vol. 31, No. 2, pp: 96-100.

۷. **Al-Homidan, A.; Al-qarawi, A.A.; Al-waily, S.A. and Adam, S.E.I., 2002.** Response of broiler chicks to dietary *Rhazya stricta* and *Nigella sativa*. British Poultry Science. Vol. 43, pp: 291-296.

۸. **Ali, B.H. and Blunden, G., 2003.** Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. Phytotherapy Research: PTR. Vol. 17, pp: 299-305.

۹. **Al-Okbi1, S.Y.; Mohamed, D.A.; Hamed, T.E. and Edris, A.E., 2013.** Potential protective effect of *Nigella sativa* crude oils towards fatty liver in rats. Euroup Journal Lipid Science Technology. No. 115, pp: 774-782.

۱۰. **Alsaif, M.A., 2007.** Effect of Thymoquinone on Ethanol-induced Hepatotoxicity in Wistar Rats. Journal of Medicine Science. Vol. 7, No. 7, pp: 1164-1170.

۱۱. **Ames, B.N.; Cathcart, R. and Schwiers, E., 1981.** Uric acid provides an antioxidant defense in human against oxidant and radical caused aging and cancer: a hypothesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol. 78, pp: 6858-6862.

۱۲. **Atta, M.B., 2003.** Some characteristics of Nigella (*Nigella sativa L.*) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. Food Chemistry Journal. No. 83, pp: 63-68.

۱۳. **Badary, O.A., 1999.** Thymoquinone attenuates ifosfamide-induced fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activity in mice. Journal of Ethnopharmacology. Vol. 67, pp: 135-142.

۱۴. **Bilen, S.; Altunoglu Çelik, Y.; Ulu, F. and Biswas, G., 2016b.** Innate immune and growth promoting responses to caper extract in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology. Vol.57, pp: 206-212.

۱۵. **Bilen, S.; Bulut, M. and Bilen, M.A., 2011.** Immunostimulant effects of Cotinus coggyria on rainbow trout, Fish and Shellfish Immunology. Vol. 30, pp: 451-455.

۱۶. **Bilen, S.; Ünal, S. and Güvensoy, H., 2016a.** Effects of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and nettle (*Urtica dioica*) methanolic extracts on immune responses and resistance to Aeromonas hydrophila in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. Vol. 454, pp: 90-94.

۱۷. **Bilen, S.; Yılmaz, S.; Bilen, M.A. and Biswas, G., 2014.** Effects of dietary incorporation of tetra (*Cotinus coggygria*) extract on immune response and resistance to Aeromonas hydrophila in koi carp (*Cyprinus carpio*), 7 pages, Israeli Journal of Aquaculture. E Bamidgeh. Vol. 66, pp: 1-6.

۱۸. **Bowles, B.L. and Miller, A.J., 1993.** Antibotulinal properties of selected aromatic and aliphatic aldehydes. Journal of Food Protection. Vol. 56, pp: 788-794.

۱۹. **Braak, K.V.D., 2002.** Haemocytic defence in black tiger shrimp. PhD thesis. Fisheries Department. Wageningen University. The Netherlands. 168 p.

۲۰. **Devi, K.; Sarma, H. and Kumar, S., 2008.** Estimation of essential and trace elements in some medicinal plants by PIXE and PIGE techniques. Nuclear Instruments and Methods in Physics Res. B. Vol. 266, pp: 1605-1610.

۲۱. **Djangmah, J.S., 1970.** The effects of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopancreas, and on blood proteins of *Crangon* l*ulgaris* Fabricius. Comparative of Biochemistry and Physiology. Vol. 32, pp:709-731.

۲۲. **Downs, C.; Fauth, J.E. and Woodley, C.M., 2001.** Assessing the health of grass shrimp exposed to natural and anthropogenic stressors: a molecular biomarker system. Marine Biotechnology. Vol. 3, pp: 380-397.

۲۳. **Dugenci, S.K.; Arda, N. and Candan, A., 2003.** Some medicinal plants as immunostimulant for fish. Journal of Ethnopharmacology. Vol. 88, No. 1, pp: 99-106.

۲۴. **El-Dakhakhny, M.; Mady, N.; Lembert, N. and Ammon, H.P., 2002.** The hypoglycemic effect of *Nigella sativa* oil is mediated by extrapancreatic actions. Planta Medica. Vol. 68, pp: 465-466.

۲۵. **Ellis, A.E., 1990.** Lysozyme Assays. Techniques in Fish Immunology. pp:101-103.

۲۶. **Farag, R.S.; Badei, A.Z.M.; Hewedi, F.M. and El- Baroty, G.S.A., 1989.** Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. Journal of the American Oil Chemists' Society. Vol. 66, pp: 792-799.

۲۷. **Garba, S.H.; Adelaye, A.B. and Mshelia, L.Y., 2007.** Histopathological and biochemical changes in the rats kidney following exposure to a pyrethroid based mosquito coil. J of Applied Sciences. Research. Vol. 3, pp: 1788-1793.

۲۸. **Harikrishnan, R.; Kim, J.S.; Kim, M.C.; Balasundaram, C. and Heo, M., 2011.** Lactuca indica extract as feed additive enhances immunological parameters and disease resistance in Epinephelus bruneus to Streptococcus iniae, Aquaculture. Vol. 318, pp: 43-47.

۲۹. **Heshmati, N. and Namazi, M., 2015.** Effects of black seed (*Nigella sativa*) on metabolicparameters in diabetes mellitus: a systematic review, Complement. Therapeutic Medicine. Vol. 23, pp: 275-282.

۳۰. **Hoffmann, J.A.; Kafatos, F.C.; Janeway, C.A. and Ezekowitz, R.A., 1999.** Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science. Vol. 284, pp: 131-138.

۳۱. **Hsieh, S.L.; Ruan, Y.H.; Li, Y.C.; Hsieh, P.S.; Hu, C.H. and Kuo, C.M., 2008.** Immune and physiological responses in pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to vibrio alginolyticus. Aquaculture. Vol. 275, pp: 335-341.

۳۲. **Hsu, S.W. and Chen, J.C., 2007.** The immune response of white shrimp Penaeus vannamei and its susceptibility to vibrio alginolyticus under sulfide stress. Aquaculture. Vol. 271, pp: 61-69.

۳۳. **Itami, T.; Asano, M. and Tokushige, K., 1998.** Enhancement of disease resistance of Kuruma shrimp,

(Decapoda, Palemonidae) infected by *Probopyrus ringueleti*. Disease of Aquatic Organisms. Vol. 39, pp: 155-158.

۵۵. **Nwanjo, H.U.; Okafor, M.C. and Oze, G.O., 2005.** Changes in biochemical parameters of kidney function in rats co-administered with chloroquine and aspirin. Journal ofClinical Science. Vol. 23, pp: 10-12.

۵۶. **Palacios, E.; Ibarra, A.M. and Racotta, I.S., 2000.** Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. Aquaculture. Vol. 185, pp: 353-371.

۵۷. **Rathee, P.S.; Mishra, S.H. and Kaughal, R., 1982.** Antimicrobial activity of essential oil, fixed oil and unsaponifiable matter of *Nigella sativa* Linn. Indian. Journal of Pharmacology Science. Vol. 44, pp: 8-10.

۵۸. **Rodriguez, J. and Le Moullac, G., 2000.** State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. Aquaculture. Vol. 191, pp: 109-119.

۵۹. **Salem, M.L., 2005.** Immunomodulatroy and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. International Journal of Immunopharmacology. Vol. 5, pp: 1749-1770.

۶۰. **Shrififar, F.; Assadipour, A.; Moshafi, M.H.; Alishahi, F. and Mahmoudvand, H., 2016.** Bioassay Screening of the Essential Oil and Various Extracts of *Nigella sativa* L. Seeds Using Brine Shrimp Toxicity Assay. Journal of Herbal Medicine. Vol. 2, No. 1, pp: 26-31.

۶۱. **Sharif Rohani, M.; Dashtiannasab, A.; Ghaednia, B.; Mirbakhsh, M.; Yeganeh, V. and Vahabnezhad, A., 2013.** Investigation of the possibility use of *Zataria multiflora* (Avishan-e Shirazi) essence in control of fungal contamination of cultured shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Iranian Journal of Fisheries Sciences. Vol. 12, pp: 454-464.

۶۲. **Söderhäll, K. and Smith, V.J., 1983.** Separation of the haemocyte populations of Carcinus maenas and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. Developmental and Comparative Immunology. Vol. 7, pp: 229-239.

۶۳. **Srinivasan, K., 2017.** Cumin and black cumin seeds: traditional uses, chemical constituents, and nutraceutical effects. Food Quality and Safety. No. 2, pp: 1-16.

۶۴. **Takruri, H.R.H. and Dameh, M.A.F., 1998.** Study of the nutritional value of black cumin seeds. Journal of the Science of Food and Agriculture. Vol. 76, pp: 404-410.

۶۵. **Tan, C.G.; Li, X.Q.; Leng, X.J.; Su, X.G.; Chen, L.; Liu, B.; Ma, F.; Cai, X.Q. and Guo, T., 2014.** Effects of supplemental Azomite in diets on growth, mmune function and disease resistance of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture Nutrition. No. 20, pp: 324-331.

۶۶. **Toghyani, M.; Gheisari, A.; Ghalamkari, G. and Mohammadrezaei, M., 2010.** Growth performance, serum biochemistry and blood hematology of broiler chicks fed different levels of black seed (*Nigella sativa*) and peppermint (Mentha piperita). Livestock Science. No. 129, pp: 173-178.

۶۷. **Valizadeh, N.; Zakeri, H.R.; Amin- asnafi, G.; Shafiee, A.; Sarkhail, P.; Heshmat, R.; Sereshti, H. and Larijani, B., 2009.** Impact of Black seed (*Nigella sativa*) extract on bone turnover markers in postmenopausal women with osteoporosis. Vol. 17, pp: 20-25.

۶۸. **Venkatramalingam, K.; Christopher, J.G. and Citarasu, T., 2007.** *Zingiber officinalis* an herbal appetizer in the tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius) larviculture. Aquaculture Nutrition. Vol. 13, pp: 439-443.

۶۹. **Wang, H.; Dai, A.; Liu, F. and Guan, Y., 2013.** Effects of dietary astaxanthin on the immune response, resistance to white spot syndrome virus and transcription of antioxidant enzyme genes in Pacific white shrimp. Iranian Journal of Fisheries Sciences.Vol. 3, No. 2, pp: 699-718.

۷۰. **Warner, H.R., 1994.** Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. Free Radical Biology and Medicine. Vol. 3, pp: 249-258.

۷۱. **Winston, G.W., 1991.** Oxidants and antioxidants in aquatic animals. Comparative Biochemistry and Physiology. Vol. 100, pp: 173-176.

۷۲. **Yalçın, S.; Erol, H.; Buğdaycı, K.E.; Özsoy, B. and Çakır, S., 2009.** Effects of dietary black cumin seed *(Nigella sativa L.)* on performance, egg traits, egg cholesterol content and egg yolk fatty acid composition in laying hens. Journal of the Science of Food Agriculture. Vol. 89, pp: 1737-1742.

۷۳. **Yang, C.; Chen, N.; Lu, L.; Chen, S. and Lai, C., 2014.** Effect of Mushroom Beta Glucan on Immune and Haemocyte Response in Shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal Aquaculture Research Development. Vol. 5, No. 6, p: 275.

۷۴. **Yu, C.I. and Song, Y.L., 2000.** Outbreaks of Taura syndrome in Pacific white shrimp Penaeus vannamei cultured in Taiwan. Fish Pathology. Vol. 35, pp: 21-24.

۷۵. **Zaoui, A.; Cherrah, Y.; Mahassini, N.; Alaoui, K.; Amarouch, H. and Hassar, M., 2002.** Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil. Phytomedicine. Vol. 9, No. 1, pp: 69-74.

۷۶. **Zerin, M.; Karakilpk, A.Z.; Nazligiil, Y. and Bitiren, M., 2004.** Ratlarda deneysel karaciber hasan uzerine corek otu yagrnm koruyucu rolu. Journal of Medicine. Science. Vol. 24, pp: 598-631.

Penaeus japonicas. after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. Aquaculture. Vol. 164, pp: 277-288.

۳۴. **Jiravanichpaisal, P.; Lee, B.L. and Söderhäll, K., 2006.** Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. Immunobiology. Vol. 211, pp: 213-236.

۳۵. **John, C.; Mesalhy, S.; Rezk, M.; El Naggar, G. and Fathi, M., 2007.** Effect of some immunostimulants as feed additives on the survival and growth performance of Nile tilapia, Oreochromis niloticus and their response to artificial infection, Egypt. Journal of Aquatic Biology and Fisheries. Vol. 11, pp: 1299-1308.

۳۶. **Jueliang, P.; Chuchird, N. and Limsuwan, C., 2013.** The effects of probiotic, b-1,3-glucan and organic acid on pacific withe shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Immune system and survival upon challenge with ibrio harveyi. Kasetsart University fisheries research bulletin. Vol. 37, No. 3.

۳۷. **Kaleem, M.; Kirmani, D.; Asif, M.; Ahmed, Q. and Bano, B., 2006.** Biochemical effects of *Nigella sativa* L. seeds in diabetic rats. Indian Journal of Experimental Biology. Vol. 44, pp: 745-748.

۳۸. **Kanter, M.; Akpolat, M. and Aktas, C., 2009.** Protective effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds on beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats: a light and electron microscopic study. Journal of Molecular Histology. Vol. 40, pp: 379-385.

۳۹. **Kanter, M.; Coskun, O.; Korkmaz, A. and Oter, S., 2004.** Effects of *Nigella sativa* on oxidative stress and beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology. Vol. 279, pp: 685-691.

۴۰. **Kennedy, L. and Baynes, J.W., 1984.** Non-enzymatic glycosylation and the chronic complications of diabetes. An Overview. Diabetologica. Vol. 24, pp: 93-98.

۴۱. **Khan, S.H.; Ashraf-Anjum, M.; Parveen, A.; Khawaja, T. and Ashraf, N.M., 2013.** Effects of black cumin seed (*Nigella sativa L.*) on performance and immune system in newly evolved crossbred laying hens. Veterinary Quarterly. Vol. 33, No. 1, pp: 13-19

۴۲. **Kumar, V.; Sinha, A.K. and Tidwell, J.H., 2016.** Metabolic implicatins of ietary cholesterol in shrimp. Aquaculture, Meeting Abstract.

۴۳. **Kuo, C.M.; Hsu, C.R. and Lin, C.Y., 1995.** Hyperglycaemic effects of dopamine in tiger shrimp, Penaeus monodon. Aquaculture. Vol. 135, No. 1, pp: 61-72.

۴۴. **Liu, C.H.; Cheng, W.; Hsu, J.P. and Chen, J.C., 2004.** Vibrio alginolyticus infection in the white shrimp Litopenaeus vannamei confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. Diseases of Aquatic Organisms. Vol. 61, pp: 169-174.

۴۵. **Lo, C.F.; Chang, Y.S.; Peng. S.E. and Kou, G.H., 2003.** Major viral diseases of Penaeus monodon in Taiwan. Journal of Fisheries Society of Taiwan. Vol. 30, pp: 1-13.

۴۶. **Mahjoubi, S.A.; Fetoui, H. and Zeghal, N., 2008.** Nephrotoxicity induced by dimethoate in adult rats and their suckling pups. Pesticide. Biochemistry and Physiology. Vol. 91, pp: 96-103.

۴۷. **Mathiesen, A.M., 2012.** The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA) FAO Fisheries and Aquaculture Department Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, Italy.

۴۸. **Mathiesen, A.M., 2017.** The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA) FAO Fisheries and Aquaculture Department Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, Italy. 30 p.

۴۹. **Meral, I.; Yener, Z.; Kahraman, T. and Mert, N., 2001.** Effect of *Nigella sativa* on glucose concentration, lipid peroxidation, anti-oxidant defence system and liver damage in experimentally-induced diabetic rabbits. Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine. Vol. 48, pp: 593-599.

۵۰. **Mohtashami, R.; Amini, M.; Fallah Huseini, H.; Ghamarchehre, M.; Sadeqhi, Z.; Hajiagaee, R. and Fallah Huseini, A., 2011.** Blood Glucose Lowering Effects of *Nigella Sativa* L. Seeds Oil in Healthy Volunteers: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. Journal of Medicinal Plants. Vol. 10, No. 39.

۵۱. **Moneim, A.; El-Feki, M. and Salah, E., 1997.** Effect of *Nigella sativa*, fish oil and gliclazide on alloxan diabetic rats \-biochemical and histo-pathological studies. Journal of the Egyptian- German Society of Zoology. Vol. 23, pp:237-265.

۵۲. **Morsi, N.M., 2000.** Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics-resistant bacteria. Acta Microbiologica Polonica. Vol. 49, pp: 63-74.

۵۳. **Nasir, Z.; Abid, A.R.; Hayat, Z. and Shakoor, H.I., 2005.** Effect of kalongi (*Nigella sativa*) seeds on egg production and quality in white Leghorn layers. Journal of Animal and Plant Science. Vol. 15, pp: 22-24.

۵۴. **Neves, C.A.; Santos, E.A. and Bainy, A.C.D., 2000.** Reduce superoxide dismutase activity in *Palaemonetes argentines*