

Effect of *Berberis vulgaris* extract nanoemulsion on the growth performance, hematological Indices, and antioxidant status of common carp (*Cyprinus carpio*)

Narooei H.¹; Mirdar Harijani J.^{1*}; Gharaei A.¹; Khosravanizadeh A.²

*Javadmirdar@uoz.ac.ir

1-Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran

2-Department of Aquatic Science, Hamoun International Wetland Institute, Research Institute of Zabol, Zabol, Iran

Received: May 2025

Accepted: July 2025

Published: November 2025



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

Introduction

Aquaculture has become one of the fastest-growing sectors of global food production, playing a pivotal role in meeting the rising demand for high-quality animal protein. Nevertheless, the intensification of aquaculture systems, characterized by high stocking densities and exposure to various environmental stressors, has increased the vulnerability of cultured fish to infectious diseases, oxidative stress, and impaired growth performance. Traditionally, antibiotics have been widely used to control disease outbreaks and improve productivity. Nevertheless, their indiscriminate and prolonged use has resulted in serious concerns, including the development of antimicrobial resistance, accumulation of drug residues in fish tissues, and adverse environmental impacts. These challenges have prompted a paradigm shift toward the exploration of natural, eco-friendly alternatives to antibiotics in aquaculture systems. In this context, phytogetic feed additives derived from medicinal plants have gained considerable attention due to their diverse biological properties, such as antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and immunostimulatory effects. Among various medicinal plants, *Berberis vulgaris* (barberry) is particularly notable for its rich composition of bioactive compounds, including alkaloids (notably berberine), phenolic acids, flavonoids, and other secondary metabolites (Harikrishnan *et al.*, 2011a). Berberine, the principal active compound in barberry, has been extensively reported to exhibit antimicrobial, hepatoprotective, hypoglycemic, and antioxidant properties (Imanshahidi and Hosseinzadeh, 2008). Previous studies have demonstrated that plant-derived compounds can enhance fish growth, modulate immune responses, and improve resistance to environmental stressors (Shakeri *et al.*, 2024). Despite these advantages, the application of plant extracts in aquaculture feeds is often limited by their low stability, poor solubility, and reduced bioavailability in aquatic environments and within the gastrointestinal tract of fish. To address

these limitations, nanotechnology-based delivery systems, particularly nanoemulsions, have been introduced as an innovative strategy to improve the efficacy of bioactive compounds. Nanoemulsions are colloidal systems with droplet sizes typically ranging from 20 to 200 nm, which provide enhanced surface area, improved stability, and increased absorption of encapsulated compounds (McClements, 2012). The use of nanoemulsified phytogetic additives has shown promising results in improving growth performance, antioxidant capacity, and immune function in aquatic organisms. Therefore, the present study was designed to investigate the effects of dietary supplementation with barberry (*B. vulgaris*) extract nanoemulsion on growth performance, hematological parameters, and antioxidant status in common carp (*Cyprinus carpio*), a commercially important freshwater species widely cultivated around the world (FAO, 2022).

Methodology

The feeding trial was conducted using a completely randomized design comprising four dietary treatments, each with three replicates. A total of 144 healthy juvenile common carp (*C. carpio*) with an average initial body weight of 50.0 ± 0.5 g were obtained from a local hatchery and acclimated to laboratory conditions before the commencement of the experiment. Following acclimation, the fish were randomly assigned to 12 glass aquaria (40 L capacity), with 12 fish stocked per aquarium (Golshan *et al.*, 2018). The experimental diets consisted of a commercial basal diet containing 32% crude protein, supplemented with barberry nanoemulsion at four inclusion levels: 0 mg/kg (control), 250 mg/kg, 500 mg/kg, and 750 mg/kg of diet. The barberry extract was prepared using a hydroalcoholic extraction method with 96% ethanol, followed by filtration. The nanoemulsion was formulated by mixing the extract with sunflower oil and Tween 80 as a non-ionic surfactant under magnetic stirring, followed by ultrasonication to achieve nanoscale droplet size. The mean particle size of the nanoemulsion was determined to be approximately 105 nm using dynamic light scattering (DLS), indicating a stable nanoemulsion system. The prepared nanoemulsion was uniformly sprayed onto the feed pellets, and a natural binder was used to enhance adhesion. Fish were fed three times daily to apparent satiation over an 8-week period. Water quality parameters, including temperature (24–26°C), pH (7.2–7.8), and dissolved oxygen (6–7 mg/L), were maintained within optimal ranges throughout the experiment, and 30% of the water was renewed daily. At the end of the feeding trial, growth performance indices were calculated, including final body weight (FW), weight gain (WG), specific growth rate (SGR), feed conversion ratio (FCR), and survival rate (Bekcan *et al.*, 2006). For hematological analysis, blood samples were collected from anesthetized fish via caudal vein puncture. Parameters such as red blood cell count (RBC), white blood cell count (WBC), hemoglobin concentration (Hb), hematocrit (HCT), and differential leukocyte counts were determined using standard laboratory techniques (Blaxhall and Daisley, 1973). Serum samples were separated for biochemical analysis of antioxidant and liver enzymes. The activities of antioxidant enzymes, including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPX) were measured. Additionally, liver function enzymes such as alanine aminotransferase (ALT), aspartate

aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), and lactate dehydrogenase (LDH) were assessed using spectrophotometric methods (Gulcin, 2020; Hoseinifar *et al.*, 2020; Hemmat Koohsar *et al.*, 2024). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test, with significance set at $p < 0.05$.

Results

The results indicated that dietary supplementation with barberry nanoemulsion had a significant impact on growth performance and physiological parameters of common carp. Fish fed the diet containing 500 mg/kg nanoemulsion exhibited the highest final weight, weight gain, and specific growth rate, along with a significantly improved feed conversion ratio compared to the control group ($p < 0.05$). In contrast, fish receiving the highest level (750 mg/kg) showed reduced growth performance, suggesting a dose-dependent response and the existence of an optimal supplementation level. Hematological analysis revealed that fish in the 500 mg/kg treatment group had significantly higher RBC, WBC, and hemoglobin levels compared to the control and other treatments ($p < 0.05$). These findings indicate enhanced oxygen transport capacity and improved immune status. Although hematocrit and certain leukocyte differentials did not show statistically significant differences, the overall trend suggested improved physiological condition in fish receiving moderate levels of nanoemulsion. The antioxidant analysis demonstrated that SOD activity was significantly elevated in the 500 mg/kg group, accompanied by increased GPx activity and reduced MDA levels, indicating enhanced antioxidant defense and reduced oxidative stress. While CAT activity did not differ significantly among treatments, the observed increase in key antioxidant enzymes highlights the beneficial effects of barberry nanoemulsion in mitigating oxidative damage. Furthermore, liver enzyme activities (ALT, AST, and ALP) were significantly higher in the 500 mg/kg group compared to the control ($p < 0.05$), but remained within normal physiological ranges. This suggests increased metabolic activity rather than pathological liver damage. No significant changes were observed in LDH activity across treatments.

Discussion and conclusion

The findings of this study demonstrate that dietary supplementation with barberry extract nanoemulsion can significantly enhance growth performance, hematological parameters, and antioxidant capacity in common carp, particularly at the optimal level of 500 mg/kg. The improved growth performance may be attributed to enhanced nutrient digestibility and absorption, potentially mediated by the bioactive compounds present in barberry, such as berberine and polyphenols. The nanoemulsion system likely played a crucial role in improving the bioavailability and stability of these compounds, thereby maximizing their physiological effects (Shekari *et al.*, 2024). The observed improvements in hematological parameters reflect enhanced immune competence and physiological resilience, which are critical for maintaining fish health under intensive aquaculture conditions. Additionally, the enhancement of antioxidant enzyme activities and reduction of lipid peroxidation indicate that barberry nanoemulsion effectively mitigates oxidative stress, thereby protecting cellular

integrity and promoting overall health. However, the reduced performance observed at higher supplementation levels suggests that excessive intake of bioactive compounds may have negative effects, possibly due to reduced palatability or the presence of anti-nutritional factors. Therefore, careful optimization of dosage is essential to achieve maximum benefits. In conclusion, barberry nanoemulsion at an inclusion level of 500 mg/kg can be considered a promising natural feed additive for improving growth performance, health status, and antioxidant defense in common carp. The use of such phytogenic nanoformulations represents a sustainable and effective strategy for reducing reliance on antibiotics and enhancing the productivity of aquaculture systems.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgment

This work was financially supported by a grant (UOZ-8746) from the Vice Chancellor for Research Affairs of University of Zabol.

Keyword

Berberis vulgaris, Nanoemulsion, Common carp, Hematological indices, Antioxidant activity.

مقاله علمی - پژوهشی:

تأثیر نانوامولسیون عصاره زرشک (*Berberis vulgaris*) بر عملکرد رشد، شاخص‌های خون‌شناسی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

هانیه نارویی^۱، جواد میردار هریجانی^{۱*}، احمد قرایی^۱، علی خسروانی‌زاده^۲

*Javadmirdar@uoz.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲- گروه علوم آبزیان، پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون، پژوهشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ چاپ: آبان ۱۴۰۵

تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۵

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۵

چکیده

در سال‌های اخیر استفاده از ترکیبات گیاهی به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری مورد توجه قرار گرفته است. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر نانوامولسیون عصاره زرشک (*Berberis vulgaris*) بر عملکرد رشد، برخی شاخص‌های خونی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) انجام شد. بدین منظور، ۱۴۴ قطعه بچه‌ماهی با میانگین وزن اولیه حدود 50 ± 5 گرم به مدت ۸ هفته در قالب ۴ تیمار و ۳ تکرار تغذیه شدند. تیمارها شامل گروه شاهد و سطوح ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوامولسیون زرشک بودند. نتایج نشان داد، بیشترین افزایش وزن و نرخ رشد ویژه (SGR) در تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم مشاهده شد ($p < 0.05$). همچنین افزایش معنی‌دار در فراسنجه‌های هموگلوبین، گلبول سفید و گلبول قرمز در این تیمار مشاهده گردید. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، ALT و AST نیز در این تیمار بهبود معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد یافت ($p < 0.05$). مطالعه حاضر، نتایج امیدوارکننده‌ای از تأثیر نانوامولسیون زرشک را در سطح ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم به عنوان یک افزودنی مؤثر در بهبود رشد و تنظیم سیستم‌های ایمنی و آنتی‌اکسیدانی ماهی کپور نشان داد.

لغات کلیدی: زرشک، نانوامولسیون، کپور معمولی، شاخص‌های خونی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی

نویسنده مسئول



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

مقدمه

یکی از مهم‌ترین چالش‌های صنعت آبی‌پروری در دهه‌های اخیر، استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای کنترل بیماری‌ها و بهبود رشد بوده است. اگرچه این ترکیبات در کوتاه‌مدت موجب افزایش بهره‌وری تولید می‌شوند، اما استفاده مداوم از آنها منجر به بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیک، تجمع باقی‌مانده‌های دارویی در بافت ماهی و اثرات مخرب زیست‌محیطی شده است. این موضوع به عنوان یک نگرانی جهانی در حوزه سلامت عمومی و اکولوژی مطرح شده است (Cabello, 2006).

در همین زمینه، توجه پژوهشگران به استفاده از ترکیبات طبیعی و گیاهی به عنوان جایگزین‌های ایمن و پایدار افزایش یافته است. همچنین استفاده از ترکیبات گیاهی به عنوان جایگزین‌های ایمن مورد توجه قرار گرفته است (Dawood et al., 2018). گیاهان دارویی به دلیل دارا بودن ترکیبات فعال زیستی (پلی‌فنول‌ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و ترپنوئیدها)، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضد میکروبی قابل توجهی هستند و می‌توانند به عنوان محرک‌های رشد و تقویت‌کننده سیستم ایمنی در آبزیان مورد استفاده قرار گیرند (Harikrishnan et al., 2011a).

در میان گیاهان دارویی، زرشک (*Berberis vulgaris*) به دلیل دارا بودن آلکالوئید بربرین، ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدان‌های قوی، توجه ویژه‌ای را در تحقیقات زیست‌پزشکی و دامپزشکی به خود جلب کرده است. بربرین به عنوان ترکیب اصلی فعال این گیاه، دارای اثرات ضد میکروبی، ضدالتهابی، تنظیم‌کننده متابولیسم گلوکز و محافظت‌کننده کبدی گزارش شده است (Imanshahidi and Hosseinzadeh, 2008). مطالعات نشان داده‌اند که عصاره زرشک می‌تواند موجب بهبود عملکرد سیستم ایمنی ذاتی، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش تنش اکسیداتیو در موجودات زنده شود. این ویژگی‌ها آن را به یک گزینه مناسب برای استفاده در تغذیه آبزیان تبدیل کرده است (Shakeri et al., 2024). با وجود مزایای گیاهان دارویی، یکی از محدودیت‌های مهم در استفاده از آنها در جیره غذایی، زیست‌فراهمی

پایین ترکیبات فعال و پایداری کم در محیط‌های آبی و دستگاه گوارش ماهی است. در این عرصه، فناوری نانوامولسیون به عنوان یک راهکار نوین برای بهبود جذب، پایداری و اثربخشی ترکیبات گیاهی معرفی شده است (McClements, 2021). نانوامولسیون‌ها سیستم‌های کلوئیدی پایدار با اندازه ذرات در مقیاس ۲۰-۳۰۰ نانومتر هستند که موجب افزایش زیست‌دسترسی پذیری ترکیبات فعال می‌شوند (McClements, 2012). استفاده از نانوامولسیون‌های گیاهی در تغذیه آبزیان می‌تواند اثربخشی ترکیبات گیاهی را افزایش دهد. این سیستم‌ها با افزایش سطح تماس و تسهیل عبور از غشاهای زیستی، موجب افزایش کارایی ترکیبات دارویی و گیاهی می‌شوند. در مطالعات اخیر، استفاده از نانوامولسیون‌های گیاهی در تغذیه آبزیان موجب بهبود رشد، افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها و ارتقاء شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی شده است. این اثرات عمدتاً ناشی از افزایش زیست‌دسترسی ترکیبات فعال و کاهش تخریب آنها در محیط گوارشی ماهیان گزارش شده است (Fermino et al., 2021; Li et al., 2021). بنابراین، استفاده از مکمل‌های طبیعی مانند نانوامولسیون عصاره زرشک می‌تواند به عنوان یک راهکار پایدار برای بهبود عملکرد رشد، افزایش کارایی سیستم ایمنی و کاهش وابستگی به آنتی‌بیوتیک‌ها مورد توجه قرار گیرد.

ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) یکی از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی در جهان محسوب می‌شود که به دلیل رشد مناسب، مقاومت نسبی و سازگاری با شرایط مختلف محیطی، نقش مهمی در صنعت آبی‌پروری دارد (FAO, 2022). با این حال، در سیستم‌های متراکم پرورش، این گونه مستعد استرس، بیماری و کاهش عملکرد رشد نیز هست.

با توجه به اهمیت روزافزون استفاده از ترکیبات طبیعی و فناوری‌های نوین در تغذیه آبزیان، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر نانوامولسیون عصاره میوه زرشک بر شاخص‌های رشد، فراسنجه‌های خونی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی ماهی کپور معمولی انجام شد.

مواد و روش کار

طراحی آزمایش و شرایط پرورش

تعداد ۱۴۴ قطعه بچه‌ماهی کپور معمولی با میانگین وزن اولیه $50 \pm 5/5$ گرم از مرکز تکثیر و پرورش آبزیان شهرستان زابل تهیه و به آزمایشگاه شیلات دانشگاه زابل منتقل شدند. ماهی‌ها پس از انتقال، به مدت ۴۸ ساعت برای سازگاری در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شدند. سپس در آکواریوم‌های شیشه‌ای ۴۰ لیتری با تراکم ۱۲ عدد در هر آکواریوم توزیع و به مدت هشت هفته در این شرایط تغذیه شدند (Golshan et al., 2018). شرایط فیزیکی و شیمیایی آب شامل دمای $24-26$ درجه سانتی‌گراد، pH در دامنه $7/2-7/8$ و اکسیژن محلول: $6-7$ میلی‌گرم بر لیتر بود و به صورت تعویض ۳۰ درصد آب روزانه انجام گردید.

تیمارهای آزمایشی

تیمارها شامل: تیمار اول شاهد (جیره پایه بدون افزودنی عصاره زرشک) (T1)، تیمار دوم جیره پایه + ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوامولسیون زرشک (T2)، تیمار سوم (جیره پایه + ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوامولسیون زرشک) (T3)، تیمار چهارم (جیره پایه + ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوامولسیون زرشک) (T4) بود که جیره غذایی بر پایه خوراک اکستروژن تجاری (پروتئین ۳۲٪) تنظیم شد. این تحقیق به صورت طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

تهیه عصاره هیدروالکلی و نانوامولسیون عصاره زرشک

میوه زرشک ابتدا شستشو و در دمای 45 درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت خشک شد. سپس آسیاب شده و پودر حاصل در اتانول ۹۶ درصد به مدت ۱۰ روز در دمای محیط استخراج گردید. محلول نهایی از طریق کاغذ Whatman No.1 فیلتر شد. مطابق مطالعات پیشین، استخراج الکلی یکی از مؤثرترین روش‌ها برای بازیابی آلکالوئید بربرین و ترکیبات فنولی است (Imanshahidi and Hosseinzadeh, 2008). برای تهیه نانوامولسیون، ابتدا روغن آفتابگردان به همراه Tween 80 (به عنوان

سورفکتانت غیر یونی) با نسبت مشخص در شرایط هم‌زدن مغناطیسی (500 دور در دقیقه) مخلوط شد. سپس عصاره زرشک به صورت قطره‌ای به فاز روغنی اضافه گردید. پس از پیش‌امولسیون، مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه تحت هم‌وژنایزر فراصوت^۱ قرار گرفت تا اندازه قطرات در مقیاس نانومتری کاهش یابد. میانگین اندازه قطرات نانوامولسیون با استفاده از دستگاه^۲ DLS برابر با 105 nm تعیین شد (Jafari et al., 2007). مطابق گزارش‌های علمی، نانوامولسیون‌ها با قطر کمتر از 200 نانومتر دارای پایداری بالا و جذب زیستی بهتر هستند (McClements, 2012). نانوامولسیون تهیه شده به صورت اسپری بر جیره خشک تجاری اعمال شد. برای افزایش چسبندگی، از ژل خوراکی طبیعی استفاده گردید. نانوامولسیون با استفاده از یک اسپری دستی آزمایشگاهی به صورت یکنواخت بر خوراک تجاری پاشیده شد. سپس مقدار مشخصی از ژل خوراکی طبیعی به عنوان عامل چسبنده افزوده شد تا نانوامولسیون به طور یکنواخت به سطح پلت‌ها متصل شود. پس از اختلاط، خوراک در دمای اتاق خشک و تا زمان مصرف در ظروف دربسته و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ماهیان روزانه ۳ بار تا حد سیری نسبی تغذیه شدند.

شاخص‌های رشد و فراسنجه‌های خونی

در پایان دوره آزمایش، پس از انجام زیست‌سنجی، برخی از شاخص‌های رشد مانند وزن نهایی، افزایش وزن، ضریب تبدیل غذایی، نرخ رشد ویژه، درصد افزایش وزن بدن، ضریب چاقی و میزان بقاء با استفاده از فرمول‌های موردنظر مورد سنجش قرار گرفت (Bekcan et al., 2006). همچنین در پایان دوره آزمایش، ۹ ماهی از هر تیمار انتخاب و پس از بیهوشی با عصاره گل میخک (130 mg/L)، خون‌گیری از ساقه دمی انجام شد. نمونه‌ها در شرایط سرد (4 درجه سانتی‌گراد) سانتریفیوژ شدند (10500 دور در دقیقه، 20 دقیقه). سپس شمارش گلبول‌های سفید (WBC) و قرمز خون (RBC) با استفاده از محلول‌های Hayem و Turk صورت گرفت.

¹ Ultrasonication

² Dynamic Light Scattering (DLS)

بررسی شد. سپس از ANOVA یک طرفه و آزمون Duncan در سطح معنی داری ۰/۰۵ استفاده گردید.

نتایج

شاخص‌های رشد

نتایج حاصل از شاخص‌های رشد ماهی کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف نانوامولسیون عصاره زرشک در جدول ۱ ارائه شده است. بررسی داده‌ها نشان داد که افزودن نانوامولسیون زرشک تأثیر قابل توجهی بر عملکرد رشد ماهیان داشته است ($p < 0/05$).

بیشترین میانگین وزن نهایی (FW) و نرخ رشد ویژه (SGR) در تیمار حاوی ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم (T3) نانوامولسیون عصاره زرشک مشاهده شد. همچنین میانگین درصد افزایش وزن بدن (WG%) در این تیمار نیز اختلاف معنی داری با تیمار شاهد (بالاترین میزان) نداشت ($p < 0/05$). در مقابل، بیشترین ضریب تبدیل غذا (FCR) در تیمار حاوی ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم (T2) عصاره زرشک مشاهده گردید که اختلاف معنی داری با شاهد و سایر تیمارها داشت ($p < 0/05$). میزان بقاء ماهیان تحت آزمایش در تمامی تیمارها یکسان و صد درصد بود.

فراسنجه‌های خون‌شناسی

نتایج فراسنجه‌های خونی در جدول ۲ ارائه شده است که نانوامولسیون زرشک اثر معنی داری بر برخی از شاخص‌های خونی ماهی کپور دارد. تیمارهای حاوی نانوامولسیون زرشک در فراسنجه‌های گلبول قرمز، گلبول سفید، هموگلوبین و نوتروفیل دارای اختلاف معنی داری با شاهد هستند ($p < 0/05$). این در حالیست که فراسنجه‌های همتوکریت، لمفوسیت و مونوسیت در تیمارهای مختلف نانوامولسیون زرشک تفاوت معنی داری با شاهد نشان ندادند ($p < 0/05$). همچنین نتایج این جدول نشان می‌دهد که مقادیر گلبول قرمز، گلبول سفید، هموگلوبین، نوتروفیل، لمفوسیت و مونوسیت در تیمار حاوی ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم (T2)، دارای بیشترین مقدار بوده است.

غلظت هموگلوبین (Hb) با استفاده از روش سیانومت هموگلوبین تعیین شد. درصد همتوکریت (Ht) به وسیله لوله‌های مویرگی میکروهماتوکریت اندازه‌گیری شد. همچنین میانگین غلظت هموگلوبین در یک گلبول قرمز (MCHC) و شاخص حجم متوسط گلبول قرمز (MCV) نیز محاسبه گردید (Blaxhall and Daisley, 1973). همچنین با استفاده از روش رنگ آمیزی -Giemsa Wright شمارش افتراقی لوکوسیت‌ها انجام شد.

بخش دیگری از خون ماهی‌ها برای اندازه‌گیری برخی از فراسنجه‌های خون به میکروتیوب‌ها منتقل شدند. پس از سانتیفریفیوژ و جداسازی سرم خون، میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکاتیون پر اکسیداز (GPX) به روش‌های بیوشیمیایی رنگ‌سنجی و مطابق دستورالعمل کیت‌های تجاری اندازه‌گیری شد. فعالیت SOD بر اساس مهار احیای نیتروبولوتترازولیوم (NBT) به وسیله رادیکال‌های سوپراکسید، فعالیت CAT بر اساس کاهش جذب پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و فعالیت GPX بر اساس اکسیداسیون گلوکاتیون احیاء شده در حضور پراکسید هیدروژن تعیین گردید. میزان MDA نیز بر اساس واکنش تیوباربیتوریک اسید (TBARS) و تشکیل کمپلکس رنگی MDA-TBA اندازه‌گیری شد. جذب نمونه‌ها با استفاده از میکروپلیت‌ریدر BioTek مدل ۸۰۰ ELX ثبت گردید. فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز (ALP)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) با استفاده از روش‌های استاندارد آنزیماتیک و بر اساس تغییرات جذب نوری ناشی از واکنش‌های اختصاصی سوبسترا-آنزیم با دستگاه اسپکتروفتومتر UNICO مدل UV ۲۱۰۰ در آزمایشگاه ویروم استان گیلان انجام شد (Gulcin, 2020; Hoseinifar et al., 2020; Hemmat Koohsar et al., 2024).

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS v.19 تحلیل شدند. نرمال بودن داده‌ها با آزمون Kolmogorov-Smirnov

جدول ۱: شاخص‌های رشد (میانگین $\pm$ انحراف معیار) ماهی کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف نانوامولسیون عصاره زرشک

Table 1: Results of growth indices (mean $\pm$ SD) of *Cyprinus carpio* fed with different levels of nanoemulsion of *Berberis vulgaris*

Treatment	IW (g)	FW (g)	WG (%)	SGR (%)	FCR	Survival (%)
T1	50.08 $\pm$ 1.1	72.51 $\pm$ 0.5 ^{bc}	44.79 $\pm$ 2.4 ^b	0.66 $\pm$ 0.03 ^b	1.24 $\pm$ 0.23 ^b	100
T2	49.74 $\pm$ 0.7	71.09 $\pm$ 0.5 ^c	42.93 $\pm$ 2.2 ^{bc}	0.62 $\pm$ 0.03 ^c	1.27 $\pm$ 0.78 ^a	100
T3	51.06 $\pm$ 0.6	78.21 $\pm$ 1.2 ^a	53.17 $\pm$ 3.6 ^a	0.76 $\pm$ 0.02 ^a	1.22 $\pm$ 0.22 ^b	100
T4	50.31 $\pm$ 0.6	74.01 $\pm$ 0.3 ^b	47.11 $\pm$ 2.7 ^b	0.68 $\pm$ 0.03 ^b	1.24 $\pm$ 0.50 ^b	100

جیره پایه: T1؛ جیره پایه + ۲۵۰ میلی گرم در کیلوگرم نانوامولسیون زرشک: T2؛ جیره پایه + ۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم نانوامولسیون زرشک: T3؛ جیره پایه + ۷۵۰ میلی گرم در کیلوگرم نانوامولسیون زرشک: T4. وزن اولیه: IW؛ وزن نهایی: FW؛ میانگین افزایش وزن: WG؛ نرخ رشد ویژه: SGR؛ ضریب تبدیل غذایی: FCR. حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی دار است ($p < 0.05$).

T1(Basal diet), T2(Basal diet + 250 mg.kg⁻¹ Barberry nanoemulsion), T3(Basal diet + 500 mg.kg⁻¹ Barberry nanoemulsion), T4(Basal diet + 750 mg.kg⁻¹ Barberry nanoemulsion). IW: Initial weight; FW: Final weight; WG: Weight gainer; SGR: Specific growth rate; FCR: Food conversion ratio. Different letters in each row indicate a statistically significant difference ($p < 0.05$).

جدول ۲: فراسنجه‌های خونی (میانگین $\pm$ انحراف معیار) ماهی کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف نانوامولسیون عصاره زرشک

Table 2: Hematological parameters (mean $\pm$ SD) of common carp (*Cyprinus carpio*) fed diets containing different levels of barberry (*Berberis vulgaris*) extract nanoemulsion

Treatment	RBC ($\times 10^6$) (cells.mm ³)	WBC ($\times 10^3$) (cells.mm ³)	Hb (g/dL)	HCT (%)	Lymphocyte (%)	Neutrophil (%)	Monocyte (%)
T1	16.65 $\pm$ 1.15 ^b	29.67 $\pm$ 10.4 ^c	5.16 $\pm$ 0.18 ^{ab}	3.0 $\pm$ 0.0 ^a	70.67 $\pm$ 2.41 ^a	21.67 $\pm$ 1.08 ^{ab}	1.64 $\pm$ 0.37 ^a
T2	17.00 $\pm$ 3.50 ^b	39.65 $\pm$ 2.08 ^b	3.90 $\pm$ 1.38 ^b	2.0 $\pm$ 1.0 ^a	71.31 $\pm$ 2.510 ^a	20.00 $\pm$ 2.00 ^{ab}	2.29 $\pm$ 0.54 ^a
T3	25.30 $\pm$ 1.52 ^a	48.67 $\pm$ 1.42 ^a	7.60 $\pm$ 1.68 ^a	2.0 $\pm$ 0.0 ^a	72.67 $\pm$ 1.55 ^a	25.60 $\pm$ 2.41 ^a	2.35 $\pm$ 0.67 ^a
T4	15.23 $\pm$ 0.57 ^b	29.33 $\pm$ 1.52 ^c	6.53 $\pm$ 0.30 ^a	3.0 $\pm$ 1.0 ^a	71.00 $\pm$ 2.64 ^a	19.00 $\pm$ 2.00 ^b	1.64 $\pm$ 1.13 ^a

جیره پایه: T1؛ جیره پایه + ۲۵۰ میلی گرم در کیلوگرم نانوامولسیون زرشک: T2؛ جیره پایه + ۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم نانوامولسیون زرشک: T3؛ جیره پایه + ۷۵۰ میلی گرم در کیلوگرم نانوامولسیون زرشک: T4. گلبول قرمز: RBC؛ گلبول سفید: WBC؛ هموگلوبین: Hb؛ هماتوکریت: HCT؛ حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی دار است ($p < 0.05$).

T1(Basal diet), T2(Basal diet + 250 mg.kg⁻¹ Barberry nanoemulsion), T3(Basal diet + 500 mg.kg⁻¹ Barberry nanoemulsion), T4(Basal diet + 750 mg.kg⁻¹ Barberry nanoemulsion). Red Blood Cell: RBC; White Blood Cell: WBC; Hemoglobin: HB; Hematocrit: HCT; Different letters in each row indicate a statistically significant difference ($p < 0.05$).

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

عصاره نانوامولسیون زرشک بوده است، اما تن‌ها میزان

فعالیت آنزیم‌های SOD، ALT، ALP و AST در این تیمار با تیمار شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود ($p < 0.05$)، زیرا در میزان فعالیت سایر آنزیم‌ها (LDH، GPX، CAT)، تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد مشاهده نشد ($p < 0.05$).

نتایج میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج این جدول نشان می‌دهد که به رغم این‌که بیشترین میزان فعالیت تمامی آنزیم‌های اندازه‌گیری شده در این مطالعه مربوط به تیمار حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم (T3)

جدول ۳: میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی و آنتی‌اکسیدانی (میانگین $\pm$ انحراف معیار) ماهی کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف نانوامولسیون عصاره زرشک

Table 3: Amount of liver and antioxidant enzyme activity (mean $\pm$ SD) of *Cyprinus carpio* fed with different levels of nanoemulsion of *Berberis vulgaris*

Treatment	CAT (U/ML)	SOD (U/ML)	GPX (U/ML)	LDH (U/L)	ALP (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)
T1	0.25 $\pm$ 0.03 ^a	27.0 $\pm$ 1.0 ^b	11.0 $\pm$ 0.0 ^{ab}	26.31 $\pm$ 3.41 ^{ab}	31.67 $\pm$ 2.31 ^b	3.65 $\pm$ 0.37 ^d	5.0 $\pm$ 7.53 ^c
T2	0.25 $\pm$ 0.03 ^a	26.64 $\pm$ 1.52 ^b	11.0 $\pm$ 1.0 ^{ab}	27.67 $\pm$ 1.0 ^{ab}	76.0 $\pm$ 3.0 ^a	19.0 $\pm$ 2.0 ^b	25.0 $\pm$ 1.0 ^b
T3	0.28 $\pm$ 0.03 ^a	36.6 $\pm$ 1.52 ^a	13.0 $\pm$ 1.0 ^a	29.67 $\pm$ 1.0 ^a	79.0 $\pm$ 5.0 ^a	29.0 $\pm$ 2.0 ^a	27.0 $\pm$ 1.0 ^a
T4	0.25 $\pm$ 0.01 ^a	20.0 $\pm$ 1.0 ^c	10.0 $\pm$ 1.0 ^b	25.0 $\pm$ 1.42 ^b	31.0 $\pm$ 1.0 ^b	14.0 $\pm$ 3.0 ^c	9.0 $\pm$ 1.0 ^c

جیره پایه: T1؛ جیره پایه + ۲۵۰ میلی گرم در کیلوگرم نانوامولسیون زرشک: T2؛ جیره پایه + ۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم نانوامولسیون زرشک: T3؛ جیره پایه + ۷۵۰ میلی گرم در کیلوگرم نانوامولسیون زرشک: T4. کاتالاز: CAT؛ سوپر اکسید دیسموتاز: SOD؛ گلوکاتایون پراکسیداز: GPX؛ آلکالین فسفاتاز: ALP؛ آلانین آمینوترانسفراز: ALT؛ اسپارتات آمینوترانسفراز: AST؛ لاکتات دهیدروژناز: LDH. حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی دار است ($p < 0.05$).

T1(Basal diet), T2(Basal diet + 250 mg.kg⁻¹ Barberry nanoemulsion), T3(Basal diet + 500 mg.kg⁻¹ Barberry nanoemulsion), T4(Basal diet + 750 mg.kg⁻¹ Barberry nanoemulsion). Catalase: CAT; Superoxide dismutase: SOD; Glutathione peroxidase: GPX; Alkaline Phosphatase: ALP; Alanine Aminotransferase: ALT; Aspartate Aminotransferase: AST; Lactate Dehydrogenase: LDH. Different letters in each row indicate a statistically significant difference ($p < 0.05$).

بحث

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از نانوامولسیون عصاره زرشک در جیره غذایی ماهی کپور معمولی می‌تواند اثرات معنی‌داری بر شاخص‌های رشد، فراسنجه‌های هماتولوژیک، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و شاخص‌های عملکرد کبدی داشته باشد. به طور کلی، بهترین پاسخ زیستی در سطح ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد که نشان‌دهنده وجود یک دوز بهینه در اثرگذاری ترکیبات زیست‌فعال زرشک است. این یافته‌ها بیانگر نقش مؤثر ترکیبات گیاهی به‌ویژه در قالب نانوساختارها، در بهبود کارایی فیزیولوژیک آبزیان است.

بهبود نسبی در افزایش وزن بدن و ضریب تبدیل غذایی در تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد، اگرچه برخی اختلافات از نظر آماری در سطح معنی‌داری کامل نبودند. این الگو نشان می‌دهد که ترکیبات فعال زرشک به‌ویژه آلکالوئید بربرین، پلی‌فنول‌ها و فلاونوئیدها می‌توانند از طریق بهبود هضم و جذب مواد مغذی و نیز افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی، کارایی رشد را ارتقاء دهند (Shakeri et al., 2024). بهبود شاخص‌های رشد از جمله افزایش وزن نهایی و نرخ رشد ویژه و کاهش ضریب تبدیل غذایی در تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم، می‌تواند ناشی از افزایش زیست‌فراهمی ترکیبات فعال زرشک در فرم نانوامولسیون باشد. نانوامولسیون‌ها با کاهش اندازه ذرات و افزایش سطح تماس، موجب بهبود جذب ترکیبات زیستی در دستگاه گوارش می‌شوند (McClements, 2012). مطالعات مشابه نشان دادند که افزودن ترکیبات گیاهی غنی از پلی‌فنول‌ها می‌تواند باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آمیلاز، لیپاز و پروتئاز در ماهیان پرورشی شود که در نهایت موجب بهبود استفاده از انرژی غذایی می‌گردد (Reverter et al., 2014; Dawood et al., 2018). به‌علاوه، کاهش عملکرد رشد در دوزهای بالاتر (۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، احتمالاً به اثرات ضد تغذیه‌ای یا طعم تلخ آلکالوئیدهای زرشک مربوط است که می‌تواند باعث کاهش اشتها و مصرف خوراک شود (جدول ۱). این یافته با گزارش‌های مشابه در مورد سایر گیاهان دارویی مانند سیر و آویشن نیز همخوانی دارد (Abdel-

Tawwab et al., 2020). از نظر رشد، بهبود معنی‌دار FCR و SGR در تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با گزارش‌های پیشین درباره زرشک و سایر فیتوژنیک‌ها همسو است. برای مثال، در تاس‌ماهی سبیری، افزودن عصاره زرشک موجب افزایش رشد شده و با بهبود FCR همراه بوده است که این امر با افزایش بیان ژن‌های مرتبط با رشد مانند هورمون رشد (GH) و شاخص شبه‌انسولینی-۱ (IGF-1) همراه بود. این نتایج نشان می‌دهد که عصاره زرشک علاوه بر تأمین مواد مغذی، می‌تواند از طریق تنظیم مسیرهای هورمونی نیز بر رشد تأثیرگذار باشد. افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی یکی دیگر از مکانیسم‌های مهم در بهبود رشد محسوب می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از عصاره زرشک موجب افزایش فعالیت آنزیم‌هایی مانند آمیلاز، پروتئاز و لیپاز می‌گردد که این امر به بهبود هضم و جذب مواد مغذی منجر می‌شود (Ramezani et al., 2021). بهبود کارایی گوارشی نه‌تنها باعث افزایش رشد می‌شود بلکه می‌تواند منجر به کاهش اتلاف خوراک و بهبود بهره‌وری اقتصادی در سیستم‌های پرورش آبزیان گردد. علاوه‌براین، وجود بربرین به عنوان ترکیب اصلی زرشک می‌تواند از طریق تنظیم مسیرهای سوخت‌وساز و افزایش کارایی مصرف انرژی، رشد را تحریک نماید (Imanshahidi and Hosseinzadeh, 2008).

نتایج فراسنجه‌های هماتولوژیک نشان داد که در تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم، افزایش معنی‌داری در تعداد گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید و هموگلوبین مشاهده شد که بیانگر بهبود وضعیت فیزیولوژیک و افزایش ظرفیت انتقال اکسیژن و تقویت ایمنی ذاتی در ماهیان است. گلبول‌های سفید اثرات بالایی در ایمنی ذاتی و ایمنی غیر اختصاصی دارند و تعداد آنها به عنوان شاخص سلامت در ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد. افزایش تعداد گلبول‌های سفید بخشی از دفاع ایمنی ماهی است و ایمنی سلولی و همورال تا حدی به تعداد گلبول‌های سفید خون نیز بستگی دارد (Azizi et al., 2016). افزایش RBC و Hb معمولاً با بهبود عملکرد تنفسی و افزایش متابولیسم همراه است و می‌تواند به افزایش رشد کمک کند. همچنین افزایش

باشد، نه آسیب بافتی (جدول ۳). در مقابل، عدم تغییر معنی‌دار برخی آنزیم‌ها مانند CAT و LDH نشان می‌دهد که نانوامولسیون زرشک در سطوح مورد استفاده اثر سمی نداشت و از ایمنی زیستی مناسبی برخوردار بود. این تفسیر زمانی تقویت می‌شود که همزمان، شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی بهبود یافته و MDA کاهش یافته است، زیرا در صورت آسیب واقعی، انتظار افزایش همزمان شاخص‌های پراکسیداسیون وجود دارد.

برای تعیین دقیق سهم نانوامولسیون در مقایسه با اثر ذاتی عصاره زرشک، انجام آزمایش‌های تکمیلی شامل مقایسه مستقیم بین عصاره زرشک معمولی، نانوامولسیون عصاره زرشک و تیمارهای با دوز معادل از ترکیبات فعال ضروری خواهد بود. بنابراین، بر ضرورت بررسی مقایسه‌ای اثر فرم معمولی و نانوامولسیونی عصاره زرشک تأکید می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه زابل برای تأمین منابع مالی تحقیق حاضر از محل پژوهانه ۷۸۴۶-GR-UOZ صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- Abdel-Tawwab, M., Monier, M.N., Hoseinifar, S.H. and Faggio, C., 2020. Fish response to stress: Role of feed additives in mitigation of stress effects. *Aquaculture*, 520:734967. DOI:10.1016/j.aquaculture.2020.734967
- Azizi, E., Yeganeh, S., Firouzbakhsh, F. and Janikhalili, K., 2016. Effects of dietary Supplemental thyme essence (*Thymus vulgaris* L.) on growth, hematological and serum biochemical parameters of Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Journal of Applied Ichthyological Research*, 4(2):45-61 (in Persian)

WBC نشان‌دهنده تقویت سیستم ایمنی غیراختصاصی است (Blaxhall and Daisley, 1973). از نظر آماری، اختلاف معنی‌دار این شاخص‌ها نسبت به شاهد، همراه با افزایش همزمان RBC و Hb، نتایج مثبت حاصل را تایید می‌کند (جدول ۲). مطالعات قبلی نیز نشان داده‌اند که ترکیبات گیاهی غنی از فنول‌ها و آلکالوئیدها می‌توانند پاسخ‌های ایمنی و شاخص‌های خونی را در ماهیان بهبود بخشند (Harikrishnan *et al.*, 2011b; Dawood *et al.*, 2018).

افزایش درصد نوتروفیل‌ها در تیمار بهینه نیز نشان‌دهنده تحریک سیستم ایمنی ذاتی است، زیرا نوتروفیل‌ها نقش مهمی در پاسخ‌های اولیه ایمنی دارند. این نتایج با یافته‌های Shekarabi و همکاران (۲۰۲۲) مطابقت دارد که افزایش نوتروفیل‌ها را در تیمار بهینه نشان داد و مؤید فعال‌سازی بازوی فاگوسیتیک ایمنی ذاتی است و افزایش شاخص‌های ایمنی در ماهیان تغذیه‌شده با عصاره زرشک را گزارش می‌نماید.

در ارزیابی وضعیت آنتی‌اکسیدانی، افزایش معنی‌دار SOD و بهبود GPx همراه با کاهش MDA در تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، نشان‌دهنده تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، کاهش استرس اکسیداتیو و مهار پراکسیداسیون لیپیدی است. افزایش SOD (مرحله اول خنثی‌سازی ROS) همراه با کاهش MDA (به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی و محصول نهایی آسیب لیپیدی)، نشان‌دهنده کاهش آسیب اکسیداتیو به غشاهای سلولی است. این الگو با مطالعاتی که نقش پلی‌فنول‌ها و فلاونوئیدها را در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد نشان داده‌اند، مطابقت دارد (Imanshahidi and Hosseinzadeh, 2008; Shekarabi *et al.*, 2022). عدم تغییر معنی‌دار برخی آنزیم‌ها (CAT, LDH) همراه با بهبود SOD/GPX می‌تواند نشان دهد که سطح استرس اکسیداتیو پایه به‌حدی نبوده است که همه مسیرها به طور همزمان القاء شوند، ولی مسیرهای حساس‌تر (SOD/GPX) پاسخ داده‌اند. اگرچه در این مطالعه بیشترین مقادیر برخی آنزیم‌های کبدی (ALT, AST) در تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم مشاهده شد، اما این افزایش در محدوده فیزیولوژیک قابل قبول بوده است و می‌تواند نشان‌دهنده افزایش فعالیت سوخت‌وساز کبد

- Bekcan, S., Doğankaya, L. and Çakıroğulları, G.C., 2006.** Growth and body composition of European catfish (*Silurus glanis*) fed diets containing different percentages of protein. *Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, 58(2):137–142. DOI:10.46989/001c.20430
- Blaxhall, P.C. and Daisley, K.W., 1973.** Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, 5(6):771–781. DOI:10.1111/j.1095-8649.1973.tb04510.x
- Cabello, F.C., 2006.** Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8(7):1137–1144. DOI:10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x
- Dawood, M.A.O., Koshio, S. and Esteban, M.Á., 2018.** Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: A review. *Reviews in Aquaculture*, 10(4):950–974. DOI:10.1111/raq.12209
- FAO, 2022.** The state of world fisheries and aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. FAO, Rome, Italy. 266 P.
- Firmino, J.P., Galindo-Villegas, J., Reyes-López, F.E. and Gisbert, E., 2021.** Phytogetic bioactive compounds shape fish mucosal immunity. *Frontiers in Immunology*, 12:695973. DOI:10.3389/fimmu.2021.695973
- Golshan, N., Mirdar Harijani, J., Gharaei, A. and Jamshidian, A., 2018.** The effect of anesthetic Lavender (*Lavendula officinalis*) essential oil on histopathological and blood biochemical enzymes of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Journal of Veterinary Research*, 73(1):9-15. DOI:10.22059/jvr.2018.139459.2408 (In Persian)
- Gulcin, İ., 2020.** Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3):651-715. DOI:10.1007/s00204-020-02689-3
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C. and Heo, M.S., 2011a.** Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish. *Fish and Shellfish Immunology*, 31(6):973–981. DOI:10.1016/j.fsi.2011.03.006
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C. and Heo, M.S., 2011b.** Herbal supplementation in aquaculture: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, 31(6):953–962. DOI:10.1016/j.fsi.2011.08.013
- Hemmat Koohsar, F., Mirdar Harijani, J., Gharaei, A. 2024.** Effect of different levels of Vitamin C on growth indices, some blood parameters, and antioxidant enzymes activity of *Schizothorax zarudnyi*. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 32(6):1-10 (in Persian)
- Hoseinifar, S. H., Yousefi, S., Van Doan, H., Ashouri, G., Gioacchini, G., Maradonna, F. and Carnevali, O., 2020.** Oxidative stress and antioxidant defense in fish: the implications of probiotic, prebiotic, and synbiotics. *Reviews in Fisheries Science &*

- Aquaculture*, 29(2):198-217.
DOI:10.1080/23308249.2020.1795616
- Imanshahidi, M. and Hosseinzadeh, H., 2008.** Pharmacological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine. *Phytotherapy Research*, 22(8):999–1012.
DOI:10.1002/ptr.2399
- Jafari, S.M., He, Y. and Bhandari, B., 2007.** Optimization of nano-emulsions production by microfluidization. *European Food Research and Technology*, 225(5):733-741.
DOI:10.1016/j.foodchem.2007.06.003
- Li, G., Zhang, Z., Liu, H. and Hu, L., 2021.** Nanoemulsion-based delivery approaches for nutraceuticals: Fabrication, application, characterization, biological fate, potential toxicity and future trends. *Food and Function*, 12(5):1933-1953.
DOI: 10.1039/D0FO02686G
- McClements, D.J., 2012.** Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 8(6):1719–1729.
DOI:10.1039/C2SM06903B
- McClements, D.J., 2021.** Advances in edible nanoemulsions: Digestion, bioavailability, and potential toxicity. *Progress in Lipid Research*, 81:101081.
DOI:10.1016/j.plipres.2020.101081
- Ramezani, F., Shekarabi, S.P., Mehrgan, M.S., Foroudi, F. and Islami, H.R., 2021.** Supplementation of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) diet with barberry (*Berberis vulgaris*) fruit extract: Growth performance, hemato-biochemical parameters, digestive enzyme activity, and growth-related gene expression. *Aquaculture*, 540:736750.
DOI:10.1016/j.aquaculture.2021.736750
- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B. and Sasal, P., 2014.** Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy. *Aquaculture*, 433:50–61.
DOI:10.1016/j.aquaculture.2014.05.017
- Shakeri, F., Kiani, S., Rahimi, G. and Boskabady, M.H., 2024.** Anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects of *Berberis vulgaris* and its constituent berberine, experimental and clinical, a review. *Phytotherapy Research*, 38(4):1882-1902. DOI:10.1002/ptr.8077
- Shekarabi, S.P.H., Mehrgan, M.S., Ramezani, F., Dawood, M.A., Van Doan, H., Moonmanee, T., Hamid, T., N.K.A. and Kari, Z.A., 2022.** Effect of dietary barberry extract on immune responses and antioxidant capacity in fish. *Aquaculture Reports*, 23:101041.
DOI:10.1016/j.aqrep.2022.101041