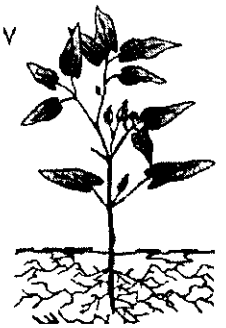

حوليـــات العلـــوم الزراعية
جامعة عين شمس ، القاهرة
مجلد(٥٦)، عدد (١)، ٢٧ - ٣٨، ٢٠١١

التغيرات الطارئة على العوامل البيوكيميائية لدم أسماك البلطي النيلي *Oroechromis niloticus* تحت تأثير مستويات مختلفة من مادة الصابونين Saponin

[٣]

محمد بن عبد الله العويفير[١،*]

١- جامعة الملك فيصل، كلية العلوم الزراعية والأغذية، قسم الإنتاج الحيـــواني و الـــسمكي - ص ب 55135، الهفـــوف، الرمـــز البريدي 31982 - المملكة العربية السعودية - malowafeir@kfu.edu.sa

(*) شكر وتقدير: يتقدم الباحث بالشكر والتقدير لعمادة البحث العلمى بجامعة الملك فيصل على دعمها المالى لهذه الدراسة

الكلمات الدالة: العوامل البيوكيميائية للـــدم ، الـــسمك البلطي النيلي، الصابونيين

الموجـــز

اجريت هذه الدراسة لتقييم أثر مـــادة الـــصابونين على العوامل البيوكيميائية لدم أسماك البلطي النيلـــي .وتم تجهيز أربع علائق علفية متساوية المحتوى مـــن الطاقة والبروتين تحتوى على نسب مختلفة من مـــادة الصابونيين 0.2) ، 0.8 ، 4.2 ، 8.7 جم/كجم، (وذلك من خلال إستخدام مـــصادر علفيـــة نقيـــة (casein, gelatin, dextrin). وتم تقسيم الاعلاف إلـــى أربـــع مجاميع من أسماك البلطي النيلـــي (50) جـــم/ســـمكة وبمقدار 3% من الوزن الكلـــي للأســـماك، وقـــسمت الكمية على وجبتين متساويتين وقدمت فـــي الأوقـــات التالية١٠ صباحا ، ٦ مساءً على مدى سبعة أيـــام و لمدة خمسة أسابيع.

وخلصت الدراسة إلى أن العوامل البيوكيميائية لدم أسماك البلطي النيلي تأثرت إمـــا معنويـــا أو عـــدديا بإضافة مادة الصابونين إلى أعلاف الأسماك . حيـــث إنخفضت قيم الهيموجلوبين عدديا بزيادة تركيز مـــادة الصابونيين في الأعلاف و تراوحت تلك القيم مـــابين ٧,٧ و٦,٦٣ للعليقة القياسية والعليقة المحتوية علـــى أعلى تركيز من مادة الصابونين على التـــوالي. إلا أن نسبة الخلايا في الدم قد تأثرت معنويا بوجـــود مـــادة الصابونيين في أعلاف الأسماك حيث كانت القـــيم 28 و ٢٦,٦٧ للأسماك التي تغذت على التركيز ٤,٢ و ٨,٧ من مادة الصابونين على التوالي، بينما تراوحت القيم مابين 33 و ٣٠,٦٧ للأسماك التي تغذت علـــى العلقية القياسية و العليقـــة ذات التركيـــز ٠,٨ علـــى التوالي .كما تأثر تركيز الدهون الثلاثية و البـــروتين في بلازما الدم معنويا في الأسماك التي تغذت علـــى أعلا تركيزين 4.2)، (8.7 مقارنـــة بالأســـماك التـــي تغذت على العليقة القياسية. لم تختلـــف قـــيم أعـــداد كريات الدم الحمراء معنويا في الأسماك التي تغـــذت على الأعلاف بجميع التركيزات . وكذلك هو الحـــال بالنسبة إلى متوسط حجم الهيموجلوبين في كرية الـــدم الحمراء (MCH) ومتوسط تركيز الهيموجلوبين فـــي كرية الدم الحمراء .(MCHC) إلا أنه تـــم ملاحظـــة

(سلم البحث فى ١٣ فبراير ٢٠١١)
(ووفق على البحث فى ١٢ مارس ٢٠١١)

وجود تغير معنوي في قيم متوسط حجم كريـــة الـــدم الحمراء (MCV) بين المعاملات نتيجة لتغذية الأسماك على أعلاف تحتوي على مادة الصابونين .وتبين مـــن خلال نتائج الدراســـة أن لـــيس لمـــادة الـــصابونين بالتركيزات التي درست أي أثر سلبي على العوامـــل البيوكيميائية للدم، وأن التغيرات التي حدثت للعوامـــل البيوكيميائية للدم كانت نتيجـــة لإنخفـــاض مـــستوى التغذية في الأسماك والذي كان بدوره عامـــل إجهـــاد على الأسماك .

المقدمة

تتواجد مادة الصابونيين في كثير من المساحيق النباتية التي تستخدم كبدائل لمسحوق السمك في مثل مسحـــوق فـــول الصويا (Gestetner *et al* 1966; Birk, 1969) ومسحـــوق السمسم (Fenwick and Oakenfull, 1983) ومسحوق الفـــول السوداني (Price *et al* 1987) ومسحوق زهرة الشمس (Fenwick *et al* 1991). ويفسر وجود هذه المادة في النباتات إلى كونها مادة دفاعية تعمل على حماية النباتات من الأعداء سواء كانت حشرات أو قوارض أو غيرها من الكائنات الضارة التي تهاجم النباتات (Price *et al* 1987). وتصنف مادة الصابونين كيميائيا على أنها من الجلوكوسيدات glycosides وهي المركبات التي تتركب من جزئين إحداهما كربوهيدرات والأخر عبارة عن جزء هيدروكربونى (Farnsworth, 1966). وتتصف هذه المادة بأن لها طعما مر المذاق وتعتبر مادة سامة للأسماك عند ذوبانها في الماء، وذلك بسبب قدرتهـــا على تقليـــل التوتر السطحي للخلايا .(Birk and Peri, 1980) واجريت ابحاث عديدة على أثر مادة الصابونيين على الكثير من الحيوانات، حيث ثبت أنها تؤثرا سلبا على نمو كل من الفئران (Petit *et al* 1995) والدواجن (Jenkins and Atwal, 1994) والأرانب (Leamaster and Cheeke, 1979) والقـــــرود (Malinow *et al* 1982) والأسمـــاك (Al-Owafeir, 1999) عند تقديم أعلاف لهذه الحيوانات تحتوي على نسب من هذه المادة .كما ثبتت سمية الصابونيين للثدييات حيث تسبب الموت لها خاصة عند حقنها فى الأوردة الدموية بجرعات كبيرة حيث تعمل مادة الصابونين على تقليل السعة التحملية لكريات الدم الحمـــراء على حمل الأكسجين (Price *et al* 1987) وفي دراسة أخرى ثبت أن سمية مادة الصابونين تكون أقل عند تناولها عن طريق الجهاز الهضمي للحيـــوان حيث أن اختـــراق الأمعـــاء ووصولها إلى مجـــرى الـــدم ضعيفـــة .(Gestetner *et al* 1968) وتهدف هذه الدراسة إلى معرفة أثر مادة الصابونين على العوامل البيوكيميائية لدم أسماك البلطي النيلي خصوصا وأن هناك إتجاها عريضا في دراسات تغذية الأسماك إلى إستخدام الكثير من المصادر النباتية في علائق الأسماك لتعويض مسحوق السمك، حيث ستساهـــم هـــذه المعرفـــة في تحديـــد الحـــدود الدنيا والقصوى من تلك المصـــادر التي يمكن إضافتها إلى العليقة السمكية. كما تهدف هذه الدراسة من جانب أخر إلى المساهمة في وضع أساس مرجعي للعوامل البيوكيميائية للدم في أسماك البلطي النيلي نظرا لقلة المعلومات في هذا المجال وعدم وجود دراسات كافية لتحديد قيـــم المعايير البيوكيميائية للـــدم لكثيـــر من الأسماك، خصوصا وأن هذه العوامل تستخدم لدراسة أو تشخيص الحالة الصحية العامة للأسماك والحالة الفسيولوجية بشكل دورى متكرر.

المواد والطرائق

وصف نظام الرعاية

تم إجراء الدراسة في معمل مغلق محكم الظروف البيئية من حيث درجة الحرارة وفترة الإضاءة (12 ساعة نهار، 12 ساعة ليلا) (طوال فترة الدراسة .تم إستخدام المـــاء في المعمل بنظـــام التدويـــر المستمر Continuous recycling، حيث تألف هذا النظام من مجموعة من الأحواض الدائرية ذاتية التنظيف عددها 12 حـــوض سعـــة كل حـــوض 30 لتر خصصت لإحتضان أسمـــاك الدراســـة ووزعت إلـــى أربـــع مجموعات، ربطت هـــذه الأحـــواض بمجموعة من

أحواض الترسيب والمعالجة البيولوجية وهذه بدورها ربطت بمضخة ماء قوة نصف حصان لرفع الماء إلى الخزان الرئيسي سعة 110 لتر والذي يعمل على تزويد أحواض الدراسة بالماء من خلال مواسير بلاستيكية قطر 2 بوصة يتفرع منها مواسير قطر نصف بوصة لكل حوض .تمت المحافظة على تركيز اللوغاريتم السالب لتركيزات ايونات الهدروجين (pH) عند مستوى 7.3 وتركيز الأمونيا عند مستوى 0.11 ملليجرام/لتر طوال فترة الدراسة من خلال تجديد ثلث كمية المياه في النظام كل أسبوعين من أجل التخلص من المخلفات البرازية للأسماك وبقايا الأكل .كما تمت المحافظة على تركيز الأكسجين الذائب عند مستوى 7.5 ملليجرام/لتر من خلال ربط الخزان الرئيسي بمضخة هواء.

أسماك الدراسة

تم إستخدام أسماك البلطي النيلي *Oreochromis niloticus* بوزن 50 جرام/سمكة، حيث تم توزيعها عشوائيا على 12 حوض كل حوض يحتوى على 10 سمكات .تم وزن الأسماك انفراديا قبل توزيعها على الأحواض في بداية الدراسة من أجل تحديد أوزان متقاربة لكل مجموعة(اجمالى العينة ١٢٠ سمكه) . تم إستخدام ميزان من نوع حساس لتحديد الأوزان الانفرادية للأسماك.

العلائق التجريبية

استخدمت أربعة أعلاف متساوية المحتوى من الطاقة والبروتين (**جدول ١**) تحتوى على نسب مختلفة من مادة الصابونيين (**جدول ٢**)، وذلك من خلال استخدام مصادر علفية نقية **(Casein, Gelatin, Dextrin)** تم خلطها جيدا مع بقية المكونات الأخرى لضمان تجانسها بواسطة خلاط كهربائي **(Hobart)** حتى تكونت عجينة العلف والتي تم ضغطها من خلال إمرارها في مفرمة لحم لتتكون خيوط العلف المضغوطة، ثم تم وضعها بعد ذلك في فرن تجفيف تحت درجة حرارة 60 درجة مئوية لمدة 12 ساعة لطرد أكبر قدر ممكن من المحتوى المائي. وبعد أن تم تجفيف الأعلاف تم تكسيرها إلى حبيبات بواسطة مجرشة يدوية ومن ثم تم نخلها بواسطة مناخل معدنية لفصل جميع الحبيبات ذات القطر ٤,٥ – ٣,٥– ملليمتر لاستخدامها في تغذية الأسماك.

تمت تغذية كل مجموعة من المجاميع الأربعة من الأسماك على إحدى الأعلاف الأربعة بمقدار ٣% من الوزن الكلي للأسماك، قسمت على وجبتين متساويتين وقدمت في الأوقات التالية (الساعة العاشرة صباحا ، والثامنة عشر مساء وعلى مدى سبعة أيام ولمدة خمسة أسابيع.

وتم إستخدام طرق **AOAC (1990)** في تحليل كل من الرطوبة والبروتين الخام والدهن الخام والرماد والطاقة والألياف والكربوهيدرات ، كما تم إستخدام طريقة **Baccou *et al* (1977)** لتحديد نسبة الصابونيين في الأعلاف ولتحديد نسبة الصابونين فى الاعلاف استخدمت طريقة **Baccau *et al* (1977)** .

سحب وتحاليل الدم

في نهاية الدراسة، تم إختيار ثلاث سمكات عشوائيا من كل حوض لسحب عينات الدم. تم إستخدام حقنة سعة 1 ملل مزودة بإبرة مقاس 21 لسحب عينة الدم من الوريد الذيلي للسمكة . كما تم تخدير الأسماك بإستخدام المخدر Ethyl m-aminobenzoate methane (Sigma) قبل سحب عينات الدم . تم تحديد نسبة الخلايا في الدم أو حجم الخلايا المتجمعة Hematocrit من خلال إستخدام أنابيب شعرية تم ملئها بعينة الدم و وضعها في جهاز طرد مركزي تحت سرعة 10^4 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق وذلك لفصل البلازما عن كريات الدم. كما تم تحديد قيم كل من الهيموجلوبين والدهون الثلاثية والبروتين والجلوكوز وذلك حسب الطرق التحليلية (kit method) المعدة من شركة Sigma في النشرات رقم 525 و339 و541 و315 على التوالي. كذلك تم حساب متوسط حجم كرية الدم الحمراء (MCV) ومتوسط حجم الهيموجلوبين في

جدول ١. نسب خلط العلائق التجريبية على أساس المادة الجافة وتحليلها الكيماني

المكونات	0% صفر صابونيين	0.1% صابونيين	0.5% صابونيين	1% صابونيين
Casein (bovine milk)	260	260	260	260
Gelatin (porcine skin)	40	40	40	40
Dextrin	315	315	315	315
زيت سمك (capelin & herring)	110	110	110	110
صابونيين (Quillaja saponaria, Sigma)	0	1	5	10
سليلوز	195	194	190	185
CMC[1]	20	20	20	20
خليط معادن	40	40	40	40
خليط فيتامينات	20	20	20	20
جدول (١) التحليل الكيميائي				
الرطوبة	35.8	31.2	32.3	38.4
البروتين الخام	275.9	275.9	277.3	287.3
الدهن الخام	102.0	103.5	100.7	102.1
الرماد	49.8	49.8	50.6	52.5
الألياف الخام	141.8	136.2	134.7	132.9
الصابونيين	0.2	0.8	4.2	8.7
الكربوهيدرات المهضومة[2]	394.5	402.6	400.2	378.1
الطاقة ($kJ\ g^{-1}$)	20.23	20.05	20.35	19.79

١ رابط عالي اللزوجة Carboxymethylcellulose-sodium salt

٢ بالطرح.

كريـة الـدم الحمـراء (MCH) ومتوسط تركيـز الهيموجلوبين في كرية الدم الحمراء (MCHC) بناء على المعـادلات الحسابية التي إستخدمها سوينسن (Swenson, 1977) .

التحليل الإحصائي

تم تحليل جميـع البيانـات المتحصل عليها مـن الدراسة إحصائيا بطريقة (ANOVA) وذلك باستخدام البرنامج الإحصائـي **Mini Tab** إصـدار **11.13 (1996)** حيث تم تطبيق اختبار Tukey بدرجة معنوية قدرها 0.05 كما تم استخدام الانحراف المعيـاري لتحديد الفروق بين متوسطات المجموعات.

النتائج والمناقشة

يلخص (**الجدول ٢**) نتائج أثر مادة الصابونين على العوامل البيوكيميائية لدم أسماك البلطي النيلي. حيث يبين الجدول أنه لا توجد هناك فروقـات معنويـة بين جميـع المعامـلات لكل من مستـوى الهيموجلوبين وتركيـز الجلوكـوز في الدم ومتوسط عدد كريات الدم الحمراء ومتوسط حجم الهيموجلوبين

جدول ٢. أثر مادة الصابونين على الخواص البيوكيميائية لدم أسماك البلطي النيلي

العوامل	صفر % صابونيين	0.1% صابونيين	0.5% صابونيين	1% صابونيين
الهيموجلوبين (دسل/جم)	ص 0.33 ± 7.70	ص 0.66 ± 7.47	ص 1.30 ± 6.76	ص 0.59 ± 6.63
نسبة الخلايا في الدم (%)	ص 2.65 ± 33.00	ص ع 0.58 ± 30.67	ع س 1.00 ± 28.00	س 1.16 ± 26.67
الدهون الثلاثية (دسل/ملجم)	ص ع 134.5 ± 323.1	ص 147.8 ± 480.5	ع 70.1 ± 96.6	ع 4.7 ± 94.7
البروتين (دسل/جم)	ص ع 0.34 ± 4.76	ص 0.56 ± 5.43	ع س 0.22 ± 3.99	س 0.62 ± 3.02
الجلوكوز (دسل/جم)	ص 39.04 ± 62.10	ص 28.91 ± 66.70	ص 9.57 ± 40.56	ص 10.78 ± 38.87
عدد كريات الدم الحمراء (10^6×)	ص0.06±2.48	ص0.11±2.46	ص0.06±2.36	ص0.21±2.65
MCV (fl)	ص 13.45 ± 133.09	ص 7.77 ± 124.90	ص ع 4.73 ± 118.85	ع 6.26 ± 101.04
MCH (pg)	ص 1.65 ± 31.02	ص 3.30 ± 30.42	ص 6.31 ± 28.79	ص 1.48 ± 25.06
MCHC (%)	ص1.65±23.41	ص2.27±24.37	ص4.87±24.19	ص2.50±24.89
العلف المستهلك سمكة/جرام	ص0.00 ± 52.5	ع0.62±39.0	س0.36±19.1	ح0.21±11.5

القيم عبارة عن متوسط معدلات العوامل البيوكيميائية للدم ±الإنحراف المعياري لهذه القيم، القيم التي تحمل حروفا مختلفة على نفس السطر تعتبر مختلفة معنويا ($P<0.05$). $fl = 10^{-15}$. $pg = 10^{-12}$.

في كرية الدم الحمراء (MCH) ومتوسط تركيز الهيموجلوبين في كرية الدم الحمراء (MCHC) . حيث تراوحت القيم ما بين 7.7 و6.63 ، 62.10 و38.87، 2.65 و2.36، 31.02 و25.06، 24.89 و23.41 للعوامل المذكورة على التوالى. بينما تباينت باقي العوامل البيوكيميائية للدم معنويا ($P<0.05$) بزيادة تركيز مادة الصابونيين في جميع المعاملات. حيث إنخفضت نسبة الخلايا في الدم معنويا ($P<0.05$) بزيادة تركيز مادة الصابونيين في الأعلاف. كما إنخفضت نسبة الدهون الثلاثية ونسبة البروتين في الدم معنويا ($P<0.05$) بزيادة تركيز مادة الصابونيين في الأعلاف، إلا أن نسبتيهما في الأسماك التي تغذت على العلف المحتوي على 1% من مادة الصابونيين كانت أعلا من الأسماك التي تغذت على العليقة القياسية 0%) صابونيين. (كما إنخفض متوسط حجم كرية الدم الحمراء (MCV)معنويا ($P<0.05$) في الأسماك بزيادة تركيز مادة الصابونيين في الأعلاف.

وتعتبر العوامل البيوكيميائية للدم مؤشرات جيدة لقياس التغيرات الفسيولوجية التي تحدث للأسماك سواء كانت هذه التغيرات داخلية أو خارجية **(Santos and Pacheco, 1996; Cataldi *et al* 1998).** كما تستخدم هذه العوامل لتقدير أو تقييم الحالة الصحية أو التغذوية للأسماك والتعرف على أثر المجهدات في البيئة وتشخيصها **(Rakovac *et al* 2009)**. لذلك فإن هذه العوامل إستخدمت في هذه الدراسة لتوضيح الأثار السامة أو السلبية التي تظهر على الأسماك نتيجة للتغذي على أعلاف تحتوي على مادة الصابونيين .

يعرف عن مادة الصابونيين أنها تستخدم بشكل واسع في تطهير وتنظيف أحواض الأسماك

والقشريات لقدرتهـــا العاليـــة على قتل المفترســـات والكائنات الغير مرغوب فيها (**Terazaki *et al* 1980; Homechaudhuri and Shyam *et al* 1993; Chen, *et al* 1996**). كما يعتبر الصابونيين ساما بشكل كبير عندما يحقن من خلال الأوردة حيث يتسبب بإلتهابات موضعية كما يتسبب فـــي مـــوت الكائن عندما تكون الجرعـــة كبيرة كنتيجـــة لتكســـر كريـــات الدم الحمراء وانخفاض قدرتها على حمل الأكسجين في مجرى الدم (**Price *et al* 1987**). وذكر **Gestetner وأخرون (1968)** أن سميـــة الصابونيين عندمـــا يعطى عن طريق الفم تكون أقل بشكل كبير، وذلك بسبب عدم قـــدرة الصابونيين علـــى إختراق جدار الجهاز الهضمي و الدخول إلى مجرى الدم.

توضح نتائج الدراســـة الحالية كما فى **جدول (٢)** أن لمادة الصابونين أثر سلبـــي علـــى جميع العوامل البيوكيميائية المدروسة لدم أسماك البلطي النيلي سواء كان هذا الأثر السلبي معنويا ($P<0.05$) أو عدديا، حيث إنخفضت قيم هـــذه العوامل بزيـــادة تركيز مادة الصابونيين في عليقة الأسماك .إن هيموجلوبين الدم، وهو أحد العوامل المختبرة، قد إنخفضت قيمه عدديا بزيادة تركيز مادة الصابونيين في العليقة مما يعطي مؤشرا أن لمادة الصابونيين أثر سلبي على محتوى الهيموجلوبين في الدم .لقد ثبت في دراسات سابقـــة أن انخفـــاض محتوى الهيموجلوبين في دم الأسماك راجع إلى مجموعة من العوامل .فقد يكون انخفاض الهيموجلوبين نتيجة للتغيرات في درجات الحرارة أو قد يكون نتيجة لوجود أنيميا حادة يتعرض لها السمك بسبب إصابته بمرض بكتيري أو فيروسي أو بسبب أمراض سوء التغذية (**Rehulka, 2002**) .

١- التأثير على هميوجلوبين الدم

يرجع إنخفـــاض الهيموجلوبين إلـــى التغيـــرات الموسمية أو طول الفترة الضوئية والتي تعرف بأنها تؤثر على قيم الهيموجلوبين وذلك راجع إلى التذبذب في نشـــــاط تكـــون كريـــات الـــدم الحمـــراء (**Erythropoeitic (Hoglund, 1984**) أو قد يكون الإنخفاض فـــي محتوى الهيموجلوبين في الـــدم نتيجـــة لتغير صـــورة الهيم والمرتبطة ببروتين الجلـــوبين **Methemoglobinemia** والتـــي تحـــدث بسبب التغير في جودة ونوعية مياه الإستزراع أو الإجهاد والتعب الشديد أثناء تكوين كريـــات الـــدم تحت ظـــروف نقص الأكسجيـــن (**Sawhney and Johal, 2000**) وفي واقع الحال فأن جميع ما ذكر من عوامل مؤثرة على محتوى الهيموجلوبين في دم الأسمـــاك لا يمكن إرجاعها على أنها عوامل تسببت في إنخفاض محتوى الهيموجلوبين في دم أسمـــاك الدراســـة الحالية، وذلك كـــون أن مسببات تلك العوامـــل لم تكن متواجـــدة في بيئـــة وظروف الدراســـة الحاليـــة .فلم تظهر على الأسماك أعراض أو إصابات مرضية بأنواعها المختلفة، كما أنه لم تسجل أية تغيرات كبيرة في العوامـــل الفيزيائية أو الكيميائية للمياه مثل التغيرات في درجات الحرارة أو طول الفترة الضوئية أو تغيرات في جودة ونوعية مياه الاستزراع كون أن الأسماك تعيش في بيئة مغلقة محكمة الظروف الفيزيائية والكيميائية.

٢- التأثير على نسبة الخلايا فى الدم

تعطي نسبة الخلايا في الدم قياسا لنسبة خلايا الدم الحمراء إلى حجم الدم بأكمله .وتعتبر نسبة الخلايا في الدم (**Haematocrit**) أحد العوامل البيوكيميائية للدم التي من خلالها يمكن قياس الحالة المرضية أو الفسيولوجية في الأسماك .وعادة ما تكون نسبة الخلايا في الدم في الأسماك المصابة بالأمراض منخفضة وذلك نتيجة لتحلل عدد من كريـــات الدم الحمراء .فقد تم ملاحظة إنخفاض نسبة الخلايا في الدم في أسماك مصابة بأمراض بكتيرية(**Benli and Yildiz, 2004**). كما أن إنخفاض نسبة الخلايا في الدم قد يكون نتيجة مباشرة لانخفاض كمية الدم في الأسماك ناتجة عن نـــزيف في أحـــد أعضـــاء السمكـــة الداخليـــة أو الخارجية أو ناتجة عن إصابة الأسماك بفقر في الدم (**Wedemeyer and Yasutake, 1977**)، أو تعرض

الأسماك للتلوث بأحد المصادر المسببة لذلك (Dawson, 1979). وبالرغم من توافق نتائج هذه الدراسة مع ما سبق من دراسات في الانخفاض المعنوي ($P<0.05$) في نسبة خلايا الدم في الأسماك التي تغذت على العليقتين المحتويتين على ٠,٤٢% و٠,٨٧% من مادة الصابونين (**جدو ٢**)، إلا أنه لا يمكن إرجاع هذا الإنخفاض المعنوي ($P<0.05$) إلى أي من المسببات التي ذكرت في هذا الخصوص وذلك لعدم حدوث تلك المسببات في هذه الدراسة.

٣- التاثير على الدهون الثلاثية فى الدم

تعتبر التغيرات في الدهون الثلاثية في بلازما الدم إحدى العوامل التي من خلالها يمكن تشخيص ومعرفة الحالة الفسيولوجية أو المرضية في الأسماك. فمن خلال هذه التغيرات يمكن تحديد ما إذا كانت الأسماك قد تعرضت لحالة تلوث أو أنها تعرضت لظروف بيئية صعبة أدت لنقص في الغذاء (Adams and McLean, 1985)، أو أن هناك تغير في عمليات أيض الدهون أو أن الأسماك مصابة بخلل في وظائف الكبد (Kaplan *et al* 1988). من ومن خلال نتائج هذه الدراسة (**جدول ٢**) فإنه يلاحظ وجود إنخفاض معنوي ($P<0.05$) في نسبة الدهون الثلاثية في بلازما الدم في الأسماك التي تغذت على أعلاف تحتوي على ٠,٤٢% و٠,٨٧% من مادة الصابونيين. وتتوافق نتائج هذه الدراسة مع ما ذكره Adams and McLean (1985) من أن الأسماك قد مرت بظروف صعبة أدت إلى نقص في الغذاء، ويمكن تفسير الظروف الصعبة هنا بإنخفاض مستوى التغذية في الأسماك التي تغذت على أعلاف إحتوت على تركيزات عالية ٤,٢% و٨,٧% من مادة الصابونين (**جدول ٢**) تم ملاحظته في هذه الدراسة .بالتالي، فإن إنخفاض نسبة الدهون الثلاثية في الأسماك التي تغذت على الأعلاف المحتوية على 0.42% و87% من مادة الصابونيين قد يكون سببه إستخدام هذه الدهون كطاقة لمواجهة أثر الإجهاد الناتج من انخفاض مستوى التغذية.

٤- التأثير على البروتين الكلى فى الدم

ينظر إلى قيمة البروتين الكلي في بلازما دم الأسماك على أنه مؤشرا يعول عليه لتشخيص الحالة الفسيولوجية (Pesch, 1970) والحالة التغذوية (Heath, 1995). وبالتالي فإن انخفاض قيمة البروتين في الدم يعتبر عرضا لوجود حالة مرضية أو عرضا لإختلال تغذوي (Wedemeyer and McLeay, 1981). توضح نتائج الدراسة الحالية (**جدول ٢**) أن مستوى البروتين في بلازما الدم قد إنخفض معنويا ($P<0.05$) بإضافة مادة الصابونيين إلى أعلاف الأسماك وأن هذا الإنخفاض يزداد بزيادة نسبة الصابونيين المضافة إلى الأعلاف. ويمكن إيعاز ذلك إلى سببين، إحداهما أن تكون الأسماك مصابة بأمراض تتسبب إحداث تلف في أنسجتها الداخلية أو الخارجية وبالتالي تقوم الأسماك بمحاولات لإنتاج أنسجة جديدة لتعوض به الأنسجة المصابة أو التالفة وهذا يفسر عملية إنخفاض قيمة البروتين في بلازما الدم والذي يؤكده Ziskowski (2008) **وآخرون** كما أن التغيرات في محتوى العليقة من البروتين سواء بالزيادة أو النقصان قد يكون سببا في تغير مستوى البروتين في بلازم الدم في الأسماك، كنتيجة للتغيرات الأيضية المترتبة على ذلك من هدم وبناء والتي تحدث داخل خلايا الأسماك .وبالنظر إلى نتائج الدراسة الحالية فإنه لا يمكن إيعاز هاذين السببين إلى انخفاض مستوى البروتين في بلازما الدم، حيث لم يظهر على الأسماك من خلال المشاهدة أية عوارض مرضية تسببت في تلف أنسجة الأسماك، كما أنه لا توجد هناك فروق في تركيبة الأعلاف المقدمة للأسماك كونها متساوية المحتوى من البروتين والطاقة (**جدول ١**). لكن بالنظر إلى كمية الأعلاف المستهلكة **جدول (٢)** في جميع المعاملات يتضح أن هناك نقصا معنويا ($P<0.05$)فيها يتسارع مع زيادة نسبة الصابونيين في العليقة و بالتالي فإن النقص في كمية الأعلاف المستهلكة سيؤدي بالتالي إلى نقص في كمية البروتين المستهلك. وحتى تحصل الأسماك التي تغذت على أعلاف تحتوي على نسب عالية ٠,٤٢% و٠,٨٧% من الصابونيين

على إحتياجاتها من الطاقة في ظل نقص كمية الغـــذاء المستهلك، فإنها ستقوم بإستهلاك ما هو موجـــود في أنسجتها الحيوية من بروتين، مما يفسر عملية انخفاض قيمة البروتين في بلازما الدم.

٥- التأثير على الجلوكوز فى بلازما الدم

يعتبر جلوكوز بلازما الدم أحد العوامل المستخدمة لقياس الإجهاد في الأسماك **(Hatting, 1979)** كما يعتبر العامل الأكثر حساسية لقيـــاس الإجهـــاد تحت القاتل .وتختلف الأسماك في إستجابتهـــا للتغيرات في جلوكوز بلازمـــا الدم نتيجة للإجهـــاد، فهناك من الأسماك من تكون إستجابتها بالزيادة **(Arends *et al* 1999; Mzimela *et al* 2002)** في نسبة الجلوكوز بينمـــا تكون إستجابة البعض الأخر منها بالنقصـــان **(Krumschnable and Lackner, 1993; Flodmark *et al* 2002)** . وحيث أن نتائج الدراسة الحالية **(جدول ٢)** أوضحت أن هنـــاك تناقص في تركيز الجلوكوز في بلازما الـــدم مـــع تزايد نسبة الصابونيين في العليقة، فإن هذه النتيجة توضح أن الأسماك تعرضت لحالة إجهاد نتيجة لتغذيتها أعلافا تحتوي على مادة الصابونين. .وحيث يوضح **(جدول ٢)** تناقص كمية الأعلاف المستهلكة بزيادة نسبة الصابونيين في العليقة، فإنه يمكن تفسير ذلك على أن إنخفاض مستوى التغذية هو السبب الرئيسى لتناقص نسبة الجلوكوز في بلازما الدم .من جانب أخر، يعتقد أن إستهلاك الجلوكوز في الأسماك أسرع من تكوينه بسبب التخزين المنخفض للجليكوجين في الكبد **(White and Fletcher, 1989)**. ومن هذا يمكن إيعاز إنخفاض نسبة الجلوكوز في أسماك الدراسة الحالية على أنه عدم قدرة الأسماك على تعويض الفاقد منها من خلال عمليات الأيض نتيجة لإنخفاض مستوى التغذية.

٦- التأثير على كرات الدم الحمراء

تشير نتائج الدراسة الحالية **(جدول ٢)** إلى أنه لا توجـــد هنـــاك فـــروق معنوية ($P<0.05$) بين جميع المعاملات فيما يتعلق بعدد كريات الدم الحمراء .وهذا دليل على أن الأسماك لم تتعرض لإصابة مرضية بسبب تغذيتها علـــى أعـــلاف تحتـــوي علـــى مادة الصابونيين، كون أن الزيادة أو النقصان في أعداد كريات الدم الحمراء يعتبر مؤشرا لتعرض الأسماك إما لإصابة مرضية تعرف بـــ Polycythemia أو لإصابة بحالة من فقر الدم Anemia علـــى التوالـــي **(Ahmed *et al* 2007)**. كما تشير النتائج أيضا **(جدول ٢)** إلى عـــدم وجـــود فـــروق معنويـــة ($P<0.05$) بين جميـــع المعامـــلات فيما يتعلـــق بمتـــوسط حجـــم الهيموجلوبين في كريـــة الدم الحمـــراء (MCH) ومتوسط تركيز الهيموجلوبين في كرية الدم الحمراء (MCHC) إلا أنه تم ملاحظة وجود فروق معنوية ($P<0.05$) بين المعاملات فيما يتعلق بمتوسط حجم كرية الدم الحمراء (MCV) وجميع هذه العوامل تعتبر مؤشرات لحالات مختلفة من أمراض فقـــر الـــدم أو أمـــراض سوء التغذية **(Ahmed *et al* 2007)**. وكون أن حساب حجم كرية الدم الحمراء يدخل فيه قيمة نسبة الخلايا في الدم، مما إنعكس على قيمة حجم كرية الدم الحمراء.

يتضح مما سبق أن العوامـــل البيوكيميائيـــة لـــدم أسماك البلطي النيلي قد طرأ عليها تغيـــرات ســـواء بالزيادة أو النقصان نتيجة لتغذيـــة الأســـماك علـــى أعلاف تحتوي على نسب مختلفة من مادة الصابونين . وحيث أن هناك أسباب و مسببات لهذه التغيرات فـــي العوامل البيوكيميائية للدم حسب ما تم توضيحه، فإنه يعتقد أن السبب الرئيس في تغير العوامل البيوكيميائية لدم أسماك الدراسة الحالية يعود إلى إنخفاض مستوى التغذية في الأسماك التي تحتوي أعلافها على نـــسب عالية من مادة الصابونيين تصل إلى 4.2 جم/كجـــم (كالتركيزات المستخدمة فـــي الدراســـة بـــدءا مـــن ٤,٢جم/كجم وحتى ٨,٧حم/كجم أو أكثر و ذلك بسبب عدم إستساغة الأسماك لطعم الأعلاف المحتوية علـــى مادة الصابونيين والتي يعرف عنها بأنها مرة المذاق . فبالنظر إلى كمية العلف المستهلك **(جدول ٢)** يلاحـــظ أن أسماك المجموعة الأولى (القياسية) قد إستهلكت ما مقداره 134,6% و 274,9% و 56,5% مما إستهلكته

أسماك المجموعة الثانية 0.8) جم/كجم صابونيين (وأسماك المجموعة الثالثة 4.2) جم/كجم صابونيين (وأسماك المجموعة الرابعة 8.7) جم/كجم صابونيين على التوالى. وحيث أن هذه النسب تتزايد بالتزامن مع تزايد نسب تركيز مادة الصابونيين في الأعلاف. وحيث أن المتغير الوحيد في تركيبة هذه الأعلاف هو تركيز مادة الصابونين. فإنه مما لاشك فيه يعتبر العامل الوحيد المتسبب في إنخفاض مستوى التغذية في الأسماك. فإنخفاض مستوى التغذية يعتبر من العوامل المسببة للإجهاد في الأسماك والذي بدوره يؤثر على العوامل البيوكيميائية للدم كما تم توضيحه سابقا. وبالتالي يتضح من خلال نتائج هذه الدراسة ومناقشتها وكذلك من خلال الدراسات التي تمت الإشارة إليها في مقدمة هذه الدراسة، أن سمية مادة الصابونيين تكون أكثر وضوحا عندما تقدم مادة الصابونيين من خلال الأوردة و ليس من خلال المعدة.

المراجع

Adams, S. and R. McLean (1985). Estimation of largemouth bass *Micropterus salmoides Lacepede*, growth using the liver somatic index and physiological variables. **J. Fish. Biol. pp. 26: 111-126.**

Ahmed, N.; M. Dawson; C. Smith and E. Wood (2007). Biology of Disease. pp. 30-35. Cromwell Press, London.

Al-Owafeir, M. (1999). The Effects of Dietary Saponin and Tannin on Growth Performance and Digestion in *Oreochromis niloticus* and *Clarias gariepinus*, pp. 80-100. PhD. Thesis, Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland. U.K

AOAC (1990). Official Methods of Analysis, 15th Ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC

Arends, R.; J. Mancera; J. Munoz; S. Wendelaar and G. Flik (1999). The Stress Response of the Gilthead Sea Bream *Sparus Aurata* L. to air Exposure and Confinement. **J. Endorinol., pp. 163: 149-157.**

Baccou, J.; F. Lambert and Y. Sauvaire, (1977). Spectrophotometric Method for the Determination of Total Steroidal Sapogenin. **Analyst, pp. 102: 458-465**

Benli, A. and H. Yildiz (2004), Blood Parameters in Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus* L.) Spontaneously Infected with *Edwardsilla tarda*. **Aquaculture Research, pp. 35: 1388-1390.**

Birk, Y. (1969). Saponins. In: **Toxic Constituents of Plant Foodstuffs, pp. 169-210** (Ed. Liner I.E.). Academic Press, New York.

Birk, Y. and I. Peri. (1980). Saponins, In: **Toxic Constituents of Plant Foodstuffs, pp. 161-182** (Ed. Liener I.E.), Academic Press, New York.

Cataldi, E.; P. Marco; A. Mandich and S. Cataudella (1998). Serum Parameters of Adriatic Sturgeon *Acipenser naccarii* (Pisces: Acipenseriformes); Effects of Temperature and Stress. **Comparative Biochemistry and Physiology, pp. 121A: 351-354.**

Chen, J.; K. Chen and J. Chen, (1996). Effects of Saponin on Survival, Growth, Molting and Feeding of *Penaeus japonicus* juveniles. **Aquaculture, pp. 144: 165-175.**

Dawson, M. (1979). Hematological Effects of Long-term Mercury Exposure and Subsequent Periods of Recovery on the Winter Flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. In: Vernberg, W.B.; A. Calabrese; F.P. Thurber and F.J. Vernberg. **(Eds.), Marine Pollution: Functional Responses. pp. 171-182.** Academic Press, New York.

Farnsworth, N. (1966) Biological and Phytochemical Screening of Plants. **J. Pharm. Sci. 55: 225-276.**

Fenwick, D. and D. Oakenfull, (1983). Saponin Content of Food Plants and Some Prepared Foods. **J. Sci. Food Agric 34: 186-191.**

Fenwick, G.; K. Price; C. Tsukamoto and K. Okubo, (1991). Saponins, In: **Toxic Substances in Crop Plants, pp. 285-327.** (Ed. J. D'mello, C. Duffus and J. Duffus), Royal Society of London.

Flodmark, L.; H. Urke; J. Halleraker; J. Arenkleiv; L. Vollestad and A. Poleo (2002), Cortisol and Glucose Responses in Juvenile Brown Trout Subjected to a Fluctuating Flow Regime in an Artificial Stream. **J. Fish Biol. 60: 238-248.**

Gestetner, B.; Y. Birk; A. Bondi and Y. Tencer, (1966). Soya Bean Saponins-VII: Method for the Determination of Sapogenin and Saponin Contents in Soya Bean. **Phytochemistry, 803-806.**

Gestetner, B.; Y. Birk and Y. Tencer, (1968). Soybean Saponins. Fate of Ingested Saponins and the Physiological Aspect of their Hemolytic Activity. **J. Agric. Food Chem. 16: 1031-1037**

Hatting, J. (1979), Blood Sugar as an Indicator of Stress in the Freshwater Fish, *Labeo Copensis* (Smith). **Journal of Fish Biology, 10: 191-195.**

Heath, A. (1995), Water Pollution and Fish Physiology. **p. 359.** CRC Press, Boca Raton, N.Y.

Hill, S. (1982), A Literature Review of the Blood Chemistry of Rainbow Trout *Salmo Gairdneri*. **J. Fish Biol. 20: 535-569**

Homechaudhuri, S. and S. Banerjee, (1991). Scanning Electron Microscopic Observations on the Blood Cells of Common carp *Cyprinus carpio* and Catfish *Heteropneustes fossilis* under Piscicide Toxicity. **Asian Fish. Sci. 4(2): 263-267.**

Jenkins, K.J. and A.S. Atwal. (1994). Effects of Dietary Saponins on Fecal Bile Acids and Neutral Sterols, and Availability of Vitamins A and E in the Chick. **J. Nutr. Biochem., 5: 134-137**

Kaplan, A.; L. Ozabo and K. Ophem (1988). Clinical Chemistry: Interpretation and Techniques. 3rd Ed. pp. 8-10. Lea & Febiger, Philadelphia.

Krumschnable, G. and R. Lackner (1993), Stress Response in Rainbow Trout *Oncorhynchus Mykiss alevins*. **Comp. Biochem. Physiol. 43B: 611-617.**

Leamaster, B. and P. Cheeke, (1979). Feed Preferences of Swine: Alfalfa Meal, High and low Saponin Alfalfa and Quinine Sulfate. **Can. J. Anim. Sci. 59: 467-469.**

Malinow M.; P. McLaughlin; W. McNulty; D. Houghton; S. Kessler; P. Stenzel; S. Goodnight; E. Bardana and J. Palotay, (1982). Lack of Toxicity of Alfalfa Saponins in Monkeys. **J. Med. Primatol., 11: 106-118**

Mzimela, H.; V. Wepener and D. Cyrus (2002). The Sublethal Effect of Copper and Lead on the Haematology and Acid-Base Balance of the Groovy mullet, *Lizza dumerili*. **Afr. J. Aquat. Sci., 27: 39-46.**

Pesch, G. (1970) Plasma Protein Variation in a Winter Flounder *Pseudopleuronectes americanus* Population. **Journal of Fisheries Research Board Canada, 27: 951-954.**

Petit, P.; Y. Sauvaire; D. Hillaire; O. Leconte; Y. Baissac; G. Ponsin and G. Ribes, (1995). Steroid Saponins From Fenugreek Seeds: Extraction, Purification and Pharmacological Investigation on Feeding Behaviour and Plasma Cholesterol. **Steroids, 60(10): 674-680.**

Price, K.; I. Johnson and G. Fenwick, (1987). The Chemistry and Biological Significance of Saponins in Foods and Feeding Stuffs. **CRC Critical Rev. Food Sci. pp. 7-135.**

Rakovac, R.; N. Popovic; T. Smuc; I. Perovic and M. Jadan (2009). Classification Accuracy of Algorithms for Blood Chemistry Data for three Aquaculture-Affected Marine Fish Species. **Fish Physiol. Biochem. 35: 641-647.**

Rehulka, J. (2002). Aeromonas Causes Severe Skin Lesions in Rainbow Trout. (*Oncorhynchus mykiss*): Clinical Pathology, Haematology and Biochemistry, **Acta Veterinaria Brono, 71: 351-360.**

Santos, M. and M. Pacheco (1996). *Anguilla Anguilla* L. Stress Biomarkers Recovery in Clean Water and Secondary-Treated Pulp Mill Effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety, 35: 96-100.**

Sawhney, A. and M. Johal (2000). Erythrocyte Alterations Induced by Malathion in *Channa punctatus* (Bloch). Bull. Environ. **Contam. Toxicol. 64: 398-405.**

Shyam, R.; N. Tripathy and H. Khan, (1993). Effect of the Piscicides Mahua Oilcake and Bleaching Powder on Benthic Productivity in Carp Nursery Ponds. **J. Aquacult. Trop. 8(1): 25-32.**

Swenson, M.J. (1977). Physiological Properties and Cellular and Chemical Constituents of Blood. In: **DUKES' Physilogoy of Domestic Animals. 9th Ed. pp. 14-35,** Cornell University, Vail-Ballou Press.

Terazaki, M.; P. Tharnbuppa and Y. Nakayama, (1980). Eradication of Predatory Fishes in Shrimp Farms by Utilization of Thai tea seed.**Aquaculture, 19: 235-242.**

Wedemeyer, G. and D. McLeay (1981). Methods for Determining the Tolerance of Fishes to Environmental Stressors. In: Pickering, A.D. (Ed.) In: **Stress and Fish pp. 247-275,** Academic Press, London.

Wedemeyer, G. and W. Yasutake (1977), Clinical Methods for the Assessment of the effects of environmental stress on fish health. **Technical Paper United States Fish and Wildlife Service Report, 89: 18 pp.**

White A. and T. Fletcher (1989), The Effect of Physical Disturbance, Hypoxia and Stress Hormones on Serum Components of the Plaice, *Pleeuronectes platessa* L. **Comparative Biochemistry and Physiology, 93A: 455-461.**

Ziskowski, J.; R. Allen; J. Pereira; C. Kuropat and R. Goldberg (2008). The Effects of Fin rot Disease and Sampling Method on Blood Chemistry and Hematocrit Measurements of Winter Flounder *Pseudopleuronectes americanus* From New Haven Harbor. **Marine Pollution Bulletin, 56: 740-750.**

Annals
Agric. Sci.,
Ain Shams Univ.,
Cairo, 56(1), 27- 38, 2011

VARIATION IN HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF NILE TILAPIA *OROECHROMIS NILOTICUS* FED GRADED LEVELS OF SAPONIN

[3]

Mohamed Alowafeir[1]

1- Dept. of Animal and Fish Production, Faculty of Agriculture and Food Sciences, King Faisal University, Saudi Arabia

Keywords: Hematological parameters of bload, *Oroechromis niloticus,* Saponin

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the effect of saponin levels on hematological parameters of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. A purified basal diets with added 0.2, 0.8, 4.2 and 8.7 gm/kg of saponin from *Quillaja saponaria* fed to Nile tilapia (50 g/fish) in triplicate aquaria. Fish were fed 3% of their total body weight over seven days a week and for a period of five weeks. Feed was divided on two equal meals and provided at the time of 10 and 18 a O' clot day. All Hematological parameters of Nile Tilapia were affected either significantly or numerically by adding saponin to fish feed. Hemoglobin values were decreased numerically with increasing the concentration of saponin in the feed. Values were ranged between 7.7 and 6.63 which was the highest for the control diet. Hematocrit was significantly affected by the presence of saponin in fish feed. Values were 26.67, 28, 30.67 and 33 for fish fed on 8.7, 4.2, 0.8 and 0.2 gm/kg of saponin respectively. Triglycerides and protein in blood plasma were affected significantly by the presence of different saponin concentrations (from 0.2 to 8.7gmLkg) in fish feed. However, red blood cells did not differ for fish fed on all diets. Similar trend was found for mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC); whereas, mean corpuscular volume values (MCV) were significantly affected by the presence of saponin in fish feed. The results showed that there is no negative effect of saponin per se on fish; and the changes of hematological parameters in fish were a result of the low level of feeding in fish, referred as which in turn was a cause of stress on fish.

(Received February 13, 2011)
(Accepted March 12, 2011)

تحكيم: أ.د إبراهيم محمد حسن
أ.د عبد الرحمن عبد اللطيف الجمل