Archive of SID

ارزیابی تغییرات برخی از شاخص‌های دفاعی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با عصاره سیر (*Allium satvium*) و سرخارگل (*Echinacea purpurea*)

- **سعید مشکینی**: گروه بهداشت و مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، صندوق پستی: ۱۶۵-۵۷۱۵۳
- **یعقوب قیاسی***: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، صندوق پستی: ۱۶۵- ۵۷۱۵۳

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۳

چکیده

هدف از انجام این مطالعه، بررسی تاثیر عصاره سیر و عصاره سرخارگل بر برخی از پاسخ‌های دفاعی غیراختصاصی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود. برای این منظور، تعداد ۱۰۵۰ قطعه ماهی با وزن متوسط ۵±۴۷ گرم، به‌صورت کاملاً تصادفی در قالب هفت تیمار به‌ترتیب زیر تقسیم شدند: تیمار یک (گروه شاهد)، تیمار دو (عصاره سیر ۰/۵٪)، تیمارسه (عصاره سیر ۱٪)، تیمار چهار (عصاره سرخارگل ۰/۵٪)، تیمار پنج (عصاره سرخارگل ۱٪)، تیمار شش (عصاره سیر ۰/۵ ٪+ عصاره سرخارگل ۰/۵٪) و تیمار هفت (عصاره سیر ۱ ٪+ عصاره سرخارگل۱ ٪). ماهیان به‌مدت ۳۰ روز به‌ترتیب با جیره‌های فوق تغذیه شدند و سپس به‌مدت ۱۵ روز دیگر فقط غذای تجاری دریافت کردند. نتایج نشان داد که میزان فعالیت لیزوزیم در روزهای ۱۵ و ۳۰ تیمارهای ۳ و ۷ به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) بالاتر از تیمار شاهد بود، اما در روز ۴۵ این اختلاف معنی‌دار نبود. از لحاظ میزان فعالیت کمپلمان در روزهای ۱۵ و ۳۰ در تیمارهای ۳ و ۷ به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر تیمارهای مورد آزمایش بودند و در روز ۴۵ تیمار ۳ با سایر تیمارها به‌جز با تیمار ۶ اختلاف معنی‌داری ($P<0/05$) داشت. از لحاظ میزان ایمنوگلوبولین تام سرم در روز ۱۵ مطالعه تیمار ۳ با سایر تیمارها به‌جز با تیمار ۷ اختلاف معنی‌داری داشت و در روز ۳۰ تیمارهای ۳ و ۷ با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار ($P<0/05$) داشتند. هم‌چنین در روز ۴۵ تیمار ۳ با دیگر تیمارهای آزمایشی به‌جز با تیمار ۶ اختلاف معنی‌داری داشت ($P<0/05$). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از عصاره سیر و سرخارگل باعث بهبود پاسخ‌های دفاعی در ماهیان قزل‌آلای‌رنگین‌کمان می‌گردد.

کلمات کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، عصاره سیر، عصاره سرخارگل، پاسخ‌های دفاعی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Ghiasi_63@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان یکی از گونه‌های مهم اقتصادی است که در اکثر نقاط دنیا پرورش داده می‌شود. پرورش متراکم این ماهی با استرس‌های مختلف همراه می‌باشد که ماهی را در برابر بیماری‌های مختلف مستعد می‌نماید (Bahram و همکاران، ۲۰۰۵). یکی از روش‌های مقابله با بروز انواع بیماری‌ها و تأثیر استرس‌ها بر ماهی استفاده از داروهای گیاهی به‌عنوان محرک‌های سیستم ایمنی می‌باشد که نسبت به‌مواد شیمیایی ایمن‌تر و مطمئن‌تر می‌باشند و تأثیر آن‌ها در مقایسه با واکسیناسیون از دامنه وسیع‌تری برخوردار است (فقانی و همکاران، ۱۳۸۸). عوامل متعددی هم‌چون ارزش اقتصادی و کم هزینه بودن تولید داروهای گیاهی، نداشتن اثرات تخریبی بر محیط زیست (داروهای ارگانیک) کم بودن عوارض جانبی داروهای گیاهی در مقایسه با داروهای شیمیایی، عدم ایجاد مقاومت نسبی عوامل بیماری‌زا به داروهای گیاهی، انحصاری بودن درمان برخی بیماری‌ها با گیاهان دارویی و وجود تجربیات مختلف بالینی در رابطه با گیاهان دارویی، منجر شده تا این منابع ارزشمند دارویی از ارزش و جایگاه خاصی در درمان بیماری ها برخوردار باشند (قاسمی‌پیربلوطی، ۱۳۸۸).

در بین گیاهان خوراکی، سیر (*Allium sativa*) از جمله گیاهان مورد استفاده در طب سنتی است که از قدیم در چین، روم باستان و مصر مورد استفاده قرار می‌گرفت. سیر حاوی مواد مختلفی از قبیل مواد معدنی (سدیم، پتاسیم، فسفر، آهن، کلسیم) و مواد آلی (هیدرات کربن، چربی، ترپنوئیدها، آنزیم‌ها، پروستاگلاندین‌ها، آلیساتین، آلوئن و آلیسین) است (Harris و همکاران، ۲۰۰۱). در واقع ترکیبات موجود در سیر به دو گروه عمده ترکیبات سولفوره و غیرسولفوره تقسیم می‌گردند. اثرات درمانی و ضدمیکروبی سیر به‌دلیل ترکیبات ارگانوسولفوره از جمله آلیسین است (Heinrich و Larry، ۱۹۹۶)، این ترکیبات حدود یک‌ونیم درصد وزن گیاه را تشکیل می‌دهند (Hansel و Tayler، ۱۹۹۸). یک میلی‌گرم آلیسین برابر ۱۵ واحد استاندارد پنی‌سیلین تأثیر دارد (Harris و همکاران، ۲۰۰۱). خواص آنتی بیوتیکی و تحریک سیستم دفاعی آن ثابت شده است (Ghazanfari و همکاران، ۲۰۱۲). سیر خرد یا له شده به‌همراه سایر عصاره‌های گیاهی یا جانوری می‌تواند آثار پیشگیری کننده مناسبی بر علیه عوامل بیماری‌زای ماهی به‌ویژه باکتری‌ها و قارچ‌ها داشته باشد (Corzo- Martinez و همکاران، ۲۰۰۷). عصاره سیر باعث افزایش تولید سایتوکین‌ها، افزایش فعالیت ماکروفاژها، لنفوسیت‌ها و سایر سلول‌های سیستم دفاعی می‌شود (Agarwal، ۱۹۹۶). کاهش تعداد ائوزینوفیل‌ها و مونوسیت‌ها در اثر استفاده اسانس سیر، نشان‌دهنده عدم ابتلای بدن به پارازیت‌ها و عوامل مهاجم خارجی بوده و سلامت ماهیان تغذیه شده با اسانس سیر می‌باشد (Guyton و Hall، ۱۹۸۹).

گیاه سرخارگل *Echinacea purpurea* گیاهی چندساله و بومی شمال آمریکا می‌باشد. ریشه و ساقه زیرزمینی آن از زمان‌های گذشته در درمان زخم و کاهش علائم عفونت و التهاب مورد استفاده بوده‌اند (Matthias، ۲۰۰۸). اجزای شیمیایی سرخارگل شامل پلی‌ساکاریدهای محلول در آب، مشتقات اسیدکافئیک و فلاونوئیدها است (Bone، ۱۹۹۷). خواص فارماکولوژیکی هر یک از این مواد به‌طور کامل مشخص نشده است (Thygesen و همکاران، ۲۰۰۷) با این حال خاصیت تعدیل‌کنندگی سیستم دفاعی توسط مشتقات اسیدکافئیک و آلکامیدها و خاصیت ضدالتهابی آن به اثبات رسیده است (Matthias و همکاران، ۲۰۰۸). اجزای اکیناسه، تعداد گلبول‌های سفید در گردش را زیاد، لنفوسیت‌های T را فعال و فاگوسیتوز را افزایش می‌دهد (O Hara و همکاران، ۱۹۹۸). در مطالعاتی که تاکنون انجام شده، نشان داده شده است که پلی‌ساکاریدهای تخلیص شده از گیاه سرخارگل دارای خاصیت تحریک کنندگی سلول‌های دفاعی است. به‌طوری که باعث افزایش قدرت فاگوسیتوز، کموتاکسی و انفجار تنفسی در ماکروفاژ (Stimpel و همکاران، ۱۹۸۴) و هم‌چنین نوتروفیل می‌شوند (Wagner و Jurcic، ۱۹۹۱). خاصیت تعدیل کنندگی سیستم دفاعی نیز توسط مشتقات اسیدکافئیک و آلکامیدها ثابت شده است (Matthias و همکاران، ۲۰۰۸).

با توجه به‌اهمیت صنعت پرورش ماهی قزل‌آلای‌رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در جهان، تحقیق در رابطه با جنبه‌های مختلف مدیریتی، از جمله مدیریت بهداشتی و تغذیه‌ای لازم و ضروری است. در این راستا با توجه به‌اهمیت محرک‌های ایمنی در بهبود شاخص‌های دفاعی و پیشگیری از بیماری‌ها و آسان و عملی بودن کاربرد آن‌ها در مزارع پرورش آبزیان، خصوصاً از طریق آمیختن آن‌ها با غذای آبزیان، این پژوهش به بررسی تاثیر عصاره سیر و سرخارگل به‌صورت جداگانه و ترکیبی به‌عنوان محرک‌های ایمنی، بر شاخص‌های دفاعی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرداخته است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در آبان‌ماه سال ۱۳۹۱ در سالن تکثیر و پرورش آبزیان پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه دانشگاه ارومیه به‌شرح زیر انجام پذیرفت:

تیمارهای تغذیه‌ای: تعداد ۱۰۵۰ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۵±۴۷ گرم از یکی از مراکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی شهرستان ارومیه تهیه و بعد از گذراندن یک دوره سازگاری ۱۰ روزه، به‌صورت کاملاً تصادفی

www.SID.ir

Archive of SID

در قالب هفت تیمار و با سه تکرار (هر تکرار ۵۰ قطعه ماهی) در ۲۱ مخزن ۳۰۰ لیتری حاوی ۱۸۰ لیتر آب با میانگین دما، pH و اکسیژن محلول به‌ترتیب ۱۳/۷ درجه سانتی‌گراد، ۷/۹ و ۱۰/۳ میلی‌گرم در لیتر، به‌شرح زیر ذخیره سازی شدند. گروه اول: ماهیان شاهد که فقط با غذای تجاری تغذیه شدند. گروه دوم: ماهیان با غذای تجاری حاوی ۰/۵ درصد (۵ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم غذا) عصاره سیر تغذیه شدند. گروه سوم: ماهیان با غذای تجاری حاوی ۱ درصد (۱۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم غذا) عصاره سیر تغذیه شدند. گروه چهارم: ماهیان با غذای تجاری حاوی ۰/۵ درصد (۵ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم غذا) عصاره سرخارگل تغذیه شدند. گروه پنجم: ماهیان با غذای تجاری حاوی ۱ درصد (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم غذا) عصاره سرخارگل تغذیه شدند. گروه ششم: ماهیان با غذای تجاری حاوی ترکیب ۰/۵ درصد (۵ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم غذا) عصاره سیر و ۰/۵ درصد (۵ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم غذا) عصاره سرخارگل تغذیه شدند. گروه هفتم: ماهیان با غذای تجاری حاوی ترکیب ۱ درصد (۱۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم غذا) عصاره سیر و ۱ درصد (۱۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم غذا) عصاره سرخارگل تغذیه شدند.

تهیه عصاره‌ها و جیره غذایی: عصاره هیدروالکلی سیر و سرخارگل از شرکت گیاه اسانس (گرگان- ایران) تهیه گردید. این عصاره‌ها فرآوری شده و محلول در آب بودند. جهت تغذیه ماهیان از غذای تجاری به‌صورت پلت (GFT-۲) محصول شرکت فرآدانه (شهرکرد-ایران) استفاده شد. برای تهیه جیره غذایی تیمارها، با توجه به‌میانگین وزنی بچه‌ماهیان و دمای آب، مقدار غذای روزانه هر تیمار از روی جدول استاندارد غذادهی (Hardy، ۲۰۰۲) محاسبه شد. سپس، جیره روزانه هر تیمار روی سینی مخصوص آن پخش شد و عصاره‌ها با مقدار محاسبه شده برای هر تیمار با اسپری کننده‌های جداگانه بر روی پلت اسپری شد. در حین اسپری کردن محلول حاوی عصاره بر روی غذا، پلت‌های غذایی هم‌زده شد تا تمام سطوح پلت‌ها کاملاً با محلول حاوی عصاره آغشته گردد. سپس غذای تهیه شده در دمای اتاق خشک شده و در داخل یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) نگه‌داری و در طول روز استفاده گردید. غذادهی به‌طور دستی، ۴ بار در روز انجام شد. طول دوره پرورش ۴۵ روز بود که ۳۰ روز اول ماهیان با غذای حاوی عصاره‌ها و ۱۵ روز دیگر جهت بررسی زمان حذف اثر مواد افزودنی از بدن ماهی، فقط با غذای تجاری تغذیه شدند.

ارزیابی فاکتورهای دفاعی: به‌منظور بررسی فاکتورهای دفاعی شامل میزان فعالیت لیزوزیم، مسیر فرعی کمپلمان و میزان ایمنوگلوبولین تام سرم، نمونه‌های خون ماهیان در شرایط استریل در روز صفر و پایان روزهای ۱۵، ۳۰ و ۴۵ و با استفاده از سرنگ ۲ میلی‌لیتری اخذ شد. خون‌گیری ۲۴ ساعت بعد از قطع غذا از طریق ورید ساقه دمی صورت گرفت. در هر بار نمونه‌گیری تعداد ۹ قطعه ماهی از هر تیمار (هر تکرار ۳ قطعه) به‌صورت تصادفی جهت خون‌گیری انتخاب شدند. قبل از خون‌گیری ماهیان به کمک محلول پودر گل میخک (۲۰۰ قسمت در میلیون) بی‌هوش شدند. برای تهیه سرم، نمونه‌های خون به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق و سپس ۵ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا سرم در بالای رسوب سلولی شناور شود. در مرحله بعد نمونه‌ها با دور ۳۰۰۰ به‌مدت ۳ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و سرم هر نمونه با پیپت پاستور جدا شده و درون میکروتیوب‌های تازه ریخته شد و تا زمان انجام آنالیزها درون فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. فعالیت لیزوزیم براساس روش Clerton و همکاران (۲۰۰۱)؛ Kim و Austin (۲۰۰۶) و بر مبنای لیز باکتری گرم مثبت حساس به آنزیم لیزوزیم یعنی *Micrococcus lysodeikticus* با مشخصات Sigma, M ۳۷۷۰ St.Louis,USA اندازه‌گیری شد. ایمنوگلوبولین تام سرم با روش Siwicki و همکاران (۱۹۹۴) اندازه‌گیری شد. فعالیت مسیر فرعی کمپلمان نیز براساس همولیز گلبول‌های قرمز خرگوش (RaRBC) و به‌کمک روش Waley و North (۱۹۹۷)، Boesen و همکاران (۱۹۹۹) و Amar و همکاران (۲۰۰۰) اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری: قبل از مقایسه میانگین‌ها، ابتدا نرمال بودن داده‌ها به‌کمک آزمون کولموگراف-اسمیرنوف بررسی و یکسان‌سازی شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA)، نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۹) و آزمون توکی (آزمون اختلاف حقیقی که به‌طور مخفف HSD نامیده می‌شود) استفاده شد. در تمام بررسی‌ها، سطح معنی‌دار بودن آزمون‌ها $P<0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز آماری شاخص‌های دفاعی ماهیان قزل‌آلای‌رنگین‌کمان در روزهای صفر، ۳۰ و ۴۵ دوره پرورش در جداول ۱، ۲ و ۳ آورده شده است. در روز صفر هیچ اختلاف آماری معنی‌داری از لحاظ فعالیت آنزیم لیزوزیم، مسیر فرعی کمپلمان و فعالیت ایمنوگلوبولین تام سرم در میان تیمارهای مورد مطالعه وجود نداشت. از لحاظ میزان فعالیت لیزوزیم بین تیمارهای آزمایشی، در روز ۱۵ دوره مطالعه تیمار سه (عصاره سیر ۱درصد) و تیمار هفت (عصاره سیر و سرخارگل ۱ درصد) به‌ترتیب (۱۰/۴±۰/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) و (۱۰/۰۸±۰/۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) دارای بیش‌ترین میانگین فعالیت لیزوزیم سرم بودند. در روز ۳۰ از دوره مطالعه، تیمار سه (عصاره سیر ۱درصد) هم‌چنان دارای بیش‌ترین میانگین فعالیت لیزوزیم سرم

www.SID.ir

Archive of SID

بود (۰/۷۷±۱۳/۳۴ میکروگرم در میلی‌لیتر) که به‌همراه تیمار هفت (عصاره سیر و سرخارگل ۱ درصد) (۰/۷۸±۱۳/۰۹ میکروگرم در میلی‌لیتر) اختلاف آماری معنی‌داری با سایر تیمارهای آزمایشی داشتند ($p<0/05$). در پایان دوره مطالعه (روز ۴۶) با قطع عصاره سیر و سرخارگل، تیمار سه (عصاره سیر ۱درصد) بیش‌ترین میانگین فعالیت لیزوزیم سرم داشت (۰/۹±۱۱/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) اما در مقایسه با سایر تیمارهای آزمایشی اختلاف آماری معنی‌دار نبود. این در حالی است که کم‌ترین میزان فعالیت لیزوزیم سرم در تیمار یک (شاهد) (۱±۱۰/۴۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) مشاهده شد.

جدول ۱: فعالیت لیزوزیم (میکروگرم در میلی‌لیتر) سرم ماهیان تیمارهای مختلف در دوره پرورشی

شماره تیمار	نام تیمار	روز			
		صفر	۱۵	۳۰	۴۵
۱	شاهد	۵/۰۹±۰/۶۷^{a}	۷/۱۵±۰/۷۸^{b}	۹/۴۵±۰/۸۹^{b}	۱۰/۴۵±۱^{a}
۲	سیر۰/۵ ٪	۴/۹۸±۰/۵۴^{a}	۸/۸۹±۰/۹^{b}	۱۱/۰۱±۰/۸۸^{b}	۱۰/۸۹±۰/۸۹^{a}
۳	سیر ۱ ٪	۵/۶۶±۰/۷۶^{a}	۱۰/۴±۰/۸^{a}	۱۳/۳۴±۰/۷۷^{a}	۱۱/۸±۰/۹^{a}
۴	سرخارگل۰/۵ ٪	۵/۵۶±۰/۸۷^{a}	۸/۷۸±۰/۷۷^{b}	۱۰/۸۸±۰/۹۸^{b}	۱۱/۰۹±۱/۱۱^{a}
۵	سرخارگل ۱ ٪	۴/۹۹±۰/۵۴^{a}	۸/۹۶±۰/۹۵^{b}	۱۱/۶±۰/۸۸^{b}	۱۱/۵۶±۱/۰۹^{a}
۶	سیر۰/۵٪+سرخارگل۰/۵٪	۵/۷±۰/۶۶^{a}	۸/۹۳±۰/۶۸^{b}	۱۰/۸۹±۱^{b}	۱۱/۴۵±۱/۱^{a}
۷	سیر۱٪+ سرخارگل ۱ ٪	۵/۲۳±۰/۶۴^{a}	۱۰/۰۸±۰/۷۵^{a}	۱۳/۰۹±۰/۷۸^{a}	۱۱/۶۲±۱/۲^{a}

* داده‌ها به‌صورت Mean±SD بیان شده‌اند. حروف یکسان در هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ($P<0/05$) می‌باشد.

از لحاظ میزان فعالیت کمپلمان بین تیمارهای مورد آزمایش، در روز ۱۵ دوره مطالعه، تیمار سه (عصاره سیر۱درصد) و تیمار هفت (عصاره سیر و سرخارگل ۱ درصد) به‌ترتیب (۲/۲۳±۳۴/۱۲ واحد در میلی‌لیتر)(۲/۱۱±۳۲/۲۳ واحد در میلی‌لیتر) بیش‌ترین میانگین فعالیت کمپلمان را داشتند که با سایر تیمارهای مورد مطالعه، اختلاف آماری معنی‌دار است ($p<0/05$). اختلاف سایر تیمارهای آزمایشی در این دوره با تیمار شاهد نیز قابل توجه بود. در روز ۳۰ از دوره مطالعه، تیمار سه (عصاره سیر ۱درصد) هم‌چنان دارای بیش‌ترین میانگین فعالیت کمپلمان بود (۲/۵۴±۴۸/۱۸ واحد در میلی‌لیتر) که جز با تیمار هفت (عصاره سیر و سرخارگل ۱ درصد) (۲/۲۴±۴۶/۳ واحد در میلی‌لیتر) با سایر تیمارها اختلاف آماری معنی‌دار داشت ($p<0/05$). تیمار یک (شاهد) نیز کم‌ترین میزان میانگین فعالیت کمپلمان را داشت (۲/۴۲±۳۴/۱۲ واحد در میلی‌لیتر) که در مقایسه با سایر تیمارهای آزمایشی اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده شد ($p<0/05$). در روز ۴۵ دوره مطالعه، میانگین فعالیت کمپلمان در تیمار سه (عصاره سیر ۱ در صد) و تیمار هفت (عصاره سیر و سرخارگل ۱ درصد) به‌ترتیب (۲/۸۹±۴۳/۲۳ واحد در میلی‌لیتر) و (۲/۷۷±۴۱/۱۲ واحد در میلی‌لیتر) افت نمود. البته بیش‌ترین میانگین فعالیت کمپلمان سرم در تیمار سه وجود داشت که اختلاف آماری معنی‌دار با سایر تیمارهای مورد آزمایش داشت ($p<0/05$).

جدول ۲: فعالیت کمپلمان (واحد در میلی‌لیتر) سرم ماهیان تیمارهای مختلف در دوره پرورشی

شماره تیمار	نام تیمار	روز			
		صفر	۱۵	۳۰	۴۵
۱	شاهد	۲۱/۰۱±۲/۱۲^{a}	۲۶/۱۲±۲/۳۴^{c}	۳۴/۱۲±۲/۴۲^{d}	۳۹/۱۱±۲/۶۷^{c}
۲	سیر ۰/۵ ٪	۲۱/۱۱±۲/۰۱^{a}	۳۱/۱۲±۲/۱۹^{b}	۴۲/۱۲±۲/۳^{b}	۴۰/۶۷±۲/۷۶^{b}
۳	سیر ۱ ٪	۲۱/۳۴±۱/۸۹^{a}	۳۴/۱۲±۲/۲۳^{a}	۴۸/۱۸±۲/۵۴^{a}	۴۳/۲۳±۲/۸۹^{a}
۴	سرخار گل ۰/۵ ٪	۲۱/۶۵±۲/۰۹^{a}	۲۹/۱۸±۱/۹۹^{b}	۳۸/۹۹±۲/۱۲^{c}	۳۹±۲/۵۴^{c}
۵	سرخارگل ۱ ٪	۲۱/۳۹±۱/۹^{a}	۳۰/۱±۲/۱۷^{b}	۳۹/۹±۲/۴۳^{c}	۴۱/۰۱±۲/۹۸^{bc}
۶	سیر۰/۵٪+سرخارگل۰/۵٪	۲۱/۸۷±۲^{a}	۳۰/۱۲±۲/۲۱^{b}	۴۰/۲۳ ±۲/۳^{b}	۴۲±۲/۵۶^{ab}
۷	سیر۱٪+ سرخارگل ۱٪	۲۱/۲۳±۱/۷۸^{a}	۳۲/۲۳±۲/۱۱^{a}	۴۶/۳±۲/۲۴^{a}	۴۱/۱۲±۲/۷۷^{bc}

* داده‌ها به‌صورت Mean±SD بیان شده‌اند. حروف یکسان در هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ($P< 0/05$) می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

از لحاظ میزان فعالیت ایمنوگلوبولین تام سرم بین تیمارهای مورد آزمایش، در روز ۱۵ دوره مطالعه تیمار سه (عصاره سیر ۱ درصد) دارای بیش‌ترین میانگین فعالیت ایمنوگلوبولین تام سرم بود (۰/۵۸±۱۱/۲۱میلی‌گرم در میلی‌لیتر) که جز با تیمار هفت (عصاره سیر و سرخارگل ۱ درصد) (۰/۴۶±۹/۳۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با سایر تیمارهای آزمایشی، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌دار داشتند ($p<0/05$). در روز ۳۰ از دوره مطالعه میزان میانگین فعالیت ایمنوگلوبولین تام سرم در همه تیمارها افزایش داشت و هم‌چنان بیش‌ترین میزان فعالیت آن در تیمار سه (عصاره سیر ۱درصد) و تیمار هفت (عصاره سیر و سرخارگل ۱ درصد) به‌ترتیب (۰/۵۶±۱۹/۶۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، (۰/۲۶±۱۷/۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) مشاهده شد که از لحاظ آماری با سایر تیمارهای مورد آزمایش اختلاف معنی‌دار داشتند ($p<0/05$). کم‌ترین میزان ایمنوگلوبولین تام سرم نیز در تیمار یک (شاهد) (۰/۴۴±۵/۵۷میلی‌گرم در میلی‌لیتر) مشاهده شد که در مقایسه با سایر تیمارها، اختلاف معنی‌دار بود ($p<0/05$). در آخر دوره (روز ۴۵) مطالعه، بیش‌ترین میانگین ایمنوگلوبولین تام سرم در تیمار سه (عصاره سیر ۱درصد) وجود داشت (۰/۸۹±۱۱/۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) که جز با تیمار شش (عصاره سیر و سر خارگل ۰/۵ درصد)(۰/۵۶±۱۰/۵۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با سایر تیمارها، اختلاف معنی‌دار بود ($p<0/05$).

جدول۳: فعالیت ایمنوگلوبولین تام (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) سرم ماهیان تیمارهای مختلف در دوره پرورشی

نام تیمار		روز			
شماره تیمار		صفر	۱۵	۳۰	۴۵
۱	شاهد	$۲/۵۱±۰/۸۹^{a}$	$۳/۲۱±۰/۶۹^{c}$	$۵/۵۷±۰/۴۴^{c}$	$۷/۶۸±۰/۶۷^{c}$
۲	سیر ۰/۵٪	$۲/۶۱±۰/۷۸^{a}$	$۸/۲۱±۰/۵۴^{b}$	$۱۳/۵۷±۰/۳۲^{b}$	$۹/۲۴±۰/۷۶^{b}$
۳	سیر ۱٪	$۲/۸۴±۰/۶۶^{a}$	$۱۱/۲۱±۰/۵۸^{a}$	$۱۹/۶۳±۰/۵۶^{a}$	$۱۱/۸±۰/۸۹^{a}$
۴	سرخار گل ۰/۵٪	$۳/۱۵±۰/۸۶^{a}$	$۶/۲۷±۰/۳۴^{b}$	$۱۰/۴۴±۰/۱۴^{b}$	$۷/۵۷±۰/۵۴^{c}$
۵	سرخارگل ۱٪	$۲/۸۳±۰/۶۷^{a}$	$۷/۱۹±۰/۵۲^{b}$	$۱۱/۳۵±۰/۴۵^{b}$	$۹/۵۸±۰/۹۸^{b}$
۶	سیر۰/۵٪+سرخارگل۰/۵٪	$۳/۳۷±۰/۷۷^{a}$	$۷/۲۱±۰/۵۶^{b}$	$۱۱/۶۸±۰/۳۲^{b}$	$۱۰/۵۷±۰/۵۶^{ab}$
۷	سیر۱٪+ سرخارگل ۱٪	$۲/۷۳ ±۰/۵۵^{a}$	$۹/۳۲±۰/۴۶^{ab}$	$۱۷/۷۵±۰/۲۶^{a}$	$۹/۶۹±۰/۷۷^{b}$

* داده‌ها به‌صورت Mean±SD بیان شده‌اند. حروف یکسان در هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ($p< ۰/۰۵$) می‌باشد.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری شاخص‌های دفاعی در ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان نشان داد که تیمار سه (عصاره سیر۱ درصد) و تیمار هفت (عصاره سیر و سرخارگل ۱ درصد) دارای بیش‌ترین میانگین فعالیت لیزوزیم سرم، مسیر فرعی کمپلمان و میزان ایمنوگلوبولین تام سرم هستند.

بحث

بسیاری از محققین علوم شیلاتی در طی دهه‌های اخیر، تحقیقات بسیاری را بر روی افزایش توان سیستم دفاعی ماهی‌ها در مقابل عوامل بیماری‌زا انجام داده‌اند. یکی از روش‌های معمول جهت افزایش فعالیت سیستم دفاعی ماهی، استفاده از ترکیبات محرک سیستم ایمنی یا اصطلاحاً محرک‌های ایمنی به‌ویژه مکمل‌های غذایی است که در افزایش رشد و بالا بردن توان سیستم دفاعی نقش دارند. این ترکیبات شامل انواع مواد سنتتیک شیمیایی، انواع پروبیوتیک‌ها و نیز ترکیبات طبیعی با منشا گیاهی می‌باشند که در افزایش سلامت، مقاومت نسبت به استرس و عوامل بیماری‌زا می‌توانند مفید واقع شوند (kumara و همکاران، ۲۰۰۳) استفاده از محرک‌های ایمنی در آبزی‌پروری، باعث تقویت سیستم دفاعی آبزیان خصوصاً مکانیسم‌های دفاعی غیراختصاصی در جهت پیشگیری و کنترل بیماری‌ها می‌شود. محرک‌ها باعث تسهیل عمل سلول‌های بیگانه‌خوار شده و فعالیت‌های ضد باکتریایی آن‌ها را افزایش می‌دهند (Kakota وKurokura، ۱۹۹۵). نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهند، استفاده از درصدهای مختلف عصاره سیر و سرخارگل باعث افزایش میزان فعالیت لیزوزیم، کمپلمان و فعالیت ایمنوگلوبولین تام سرم در ماهیان تغذیه شده با عصاره‌ها در روز ۱۵ و ۳۰ مطالعه شده است. به‌خصوص در ماهیان تغذیه شده با عصاره سیر یک درصد (تیمار ۳) و ماهیان تغذیه شده با ترکیب عصاره سیر یک درصد و سرخارگل یک درصد (تیمار ۷) که این افزایش در مقایسه با سایر تیمارها

www.SID.ir

Archive of SID

معنی‌دار بود ($p<0/05$). کم‌ترین میزان فعالیت شاخص‌های دفاعی فوق، در تیمار یک (شاهد) مشاهده شد. نتایج مشابه درباره تأثیر عصاره‌های گیاهی به‌عنوان محرک بر شاخص‌های دفاعی گزارش شده است. به‌طوری که Guanghoug و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که عصاره ترکیبی چند گیاه دارویی سنتی چینی (Qompye) فعالیت فاگوسیتوز ماکروفاژها، محتوای پروتئین پلاسمای خون، گلوبولین و لیزوزیم سرم را افزایش داد که منجر به افزایش سطح ایمنی ماهی کپور شد. عصاره سیر، باعث افزایش تولید سایتوکین‌ها، افزایش فعالیت ماکروفاژها، لنفوسیت‌ها و سایر سلول‌های سیستم دفاعی می‌شود (Agarval، ۱۹۹۶). هم‌چنین افزایش فعالیت لیزوزیم سرم و مقاومت پاسخ‌های دفاعی ذاتی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در استفاده از پودر گیاه سیر به‌میزان ۵ گرم در کیلوگرم و ۱۰ گرم در کیلوگرم دیده شد (Nay و Austin، ۲۰۰۹). خواص ضدباکتریایی سیر به خاطر وجود آلیسین است. به‌طوری‌که یک میلی‌گرم آلیسین برابر ۱۵ واحد استاندارد پنی‌سیلین تأثیر دارد (Harris و همکاران، ۲۰۱۱). علاوه بر آن عصاره سیر تازه مقادیر بالاتری از آنزیم‌های سلولی اکسیداتیو، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز دارند (Borek، ۲۰۰۱). از دیگر ترکیبات گیاه سیر آلئین است، ترکیبات دیگری مانند آلیسین، پلی‌سولفیدها، آژوین‌ها، مرکاپتان‌ها، تیوگلیکوزیدها، تیوسولفینات‌ها و آدلوزین‌ها نیز در جوانه سیر وجود دارد اما نسبت به آلئین خاصیت کم‌تری دارند و مقادیر آن‌ها بسیار ناچیز است (Bloch، ۱۹۸۵).

ترکیبات اصلی گیاه سرخارگل کافئیک‌اسید و آلکامیدها است (Bauer و Wagner، ۱۹۹۱). شواهد قابل توجهی در استفاده از این گیاه در فعال نمودن ماکروفاژها، شکستن پلی‌ساکاریدها و دیگر عوامل موثر در سیستم دفاعی وجود دارد (Bauer، ۱۹۹۸). هم‌چنین خاصیت تعدیل‌کنندگی سیستم دفاعی توسط مشتقات اسیدکافئیک و آلکامیدها ثابت شده است (Matthias و همکاران، ۲۰۰۸). در مطالعه حاضر استفاده از عصاره سرخارگل ۰/۵ درصد (تیمار ۴) و عصاره سرخارگل ۱ درصد (تیمار ۵) باعث افزایش قابل توجه فعالیت مسیر فرعی کمپلمان و میزان ایمنوگلوبولین تام سرم در مقایسه با تیمار شاهد شد. هم‌چنین میزان فعالیت لیزوزیم سرم در تیمارهای فوق افزایش یافت. این نتایج با مطالعات صورت گرفته مشابهت دارد، به‌طوری‌که در استفاده از سرخارگل به‌میزان ppt ۰/۲۵ در رژیم غذایی ماهی تیلاپیای نیل افزایش نرخ رشد ویژه، میزان بقا، مقاومت در برابر عفونت، تعداد سلول‌های سفید خون، فعالیت لیزوزیم و هماتوکریت گزارش شده است (Aly و همکاران، ۲۰۰۷، ۲۰۰۸). هم‌چنین بهبود ضریب تبدیل غذایی و تعدیل سیستم دفاعی غیراختصاصی توسط سرخارگل اثبات شده است (Maas و همکاران، ۲۰۰۵). استفاده از سرخارگل در ماهی گوپی باعث افزایش وزن و پاسخ‌های دفاعی شد (Guz و همکاران، ۲۰۱۱). در شرایط آزمایشگاهی سلول‌های مختلف سیستم دفاعی (ماکروفاژها، مونوسیت‌ها و سلول‌های کشنده طبیعی) توسط عصاره سرخارگل تحریک شده‌اند (Bauer، ۱۹۹۸). اثرات مشابه عصاره سرخارگل (تحریک ایمنی و مقاومت در برابر عفونت‌های باکتریایی) در ماهی کپورعلفخوار نیز گزارش گردیده است (Alishahi و همکاران، ۲۰۱۱). سرخارگل باعث تحریک فعالیت لنفوسیت (Wagner و همکاران، ۱۹۸۶)، افزایش فاگوسیت‌ها، انتقال گرانولوسیت در خون و محافظت در برابر آلودگی میکروبی می‌شود (Roesler و همکاران، ۱۹۹۱). مطالعات Bohlouli و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که استفاده از سرخارگل با دوز ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد اثرات مثبتی در رشد، شاخص‌های بیوشیمیایی و هماتولوژی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان داشت. در روز ۴۵ مطالعه حاضر با قطع عصاره‌ها از رژیم غذایی ماهی، میزان شاخص‌های دفاعی افت داشت، البته اختلاف قابل توجه در برخی گروهای آزمایشی مشاهده شد. به‌طوری‌که میزان فعالیت کمپلمان و ایمنوگلوبولین تام سرم در تیمار تغذیه شده با عصاره سیر ۱ درصد (تیمار ۳) جز با تیمار تغذیه شده با عصاره سیر و سرخارگل ۰/۵ درصد (تیمار۶) با سایر تیمارهای آزمایشی اختلاف آماری معنی‌دار داشتند. هم‌چنین میزان فعالیت لیزوزیم در تیمار تغذیه شده با عصاره سیر ۱ درصد (تیمار۳) بیش‌تر از سایر تیمارهای آزمایشی بود. اما از لحاظ آماری اختلاف قابل توجه نبود. نتایج فوق اثرات عصاره بعد از قطع آن را نشان می‌دهد که با مطالعات محققین بر ماهی تیلاپیا در استفاده از ترکیب گیاه سیر و سرخارگل و مشاهده اثرات آن بعد از قطع دارو مشابهت دارد (Aly و Mohamed، ۲۰۱۰). استفاده از ترکیب سیر و سرخارگل به نسبت یک درصد سرخارگل و سه درصد سیر به‌مدت شش ماه در خوراک ماهی تیلاپیای نیل افزایش وزن، درصد بقا و مقاومت در برابر عفونت مشاهده شد. این ترکیب اثرات طولانی بعد از قطع دارو نشان داد و مقاومت به استرس دمایی در طی فصل زمستان افزایش یافت (Aly و Mohamed، ۲۰۱۰). باید به این نکته توجه داشت که تأثیر محرک‌های ایمنی در میزان بقای ماهی معمولاً در دوره‌های طولانی (۶ ماه) باعث ایجاد تغییرات معنی‌دار می‌شود (Heidarie و همکاران، ۲۰۱۰؛ Gopalakannan و Arul، ۲۰۰۶؛ Bagni و همکاران، ۲۰۰۵).

www.SID.ir

Archive of SID

به‌طور کلی براساس یافته‌های حاصل از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از عصاره‌های گیاهی سیر و سرخارگل به‌خصوص عصاره سیر یک درصد در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان سبب افزایش توان سیستم دفاعی و مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از شرکت گیاه اسانس گرگان و پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه دانشگاه ارومیه در همکاری با این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. قاسمی‌پیربلوطی، ع.، ۱۳۸۸. گیاهان دارویی و معطر (شناخت و بررسی اثرات آن‌ها)، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی. ۵۰۰ صفحه.

۲. فقانی، ط.؛ آذری‌تاکامی، ق.؛ قیاسی، م.؛ فقانی، س. و احمدی‌فر، ا.، ۱۳۸۸. ارزیابی اثر ارگوسان و واکسن ضد استرپتوکوکوزیس بر پارامترهای خونی ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران. شماره ۲، صفحات ۱۲۰ تا ۱۱۳.

3. **Agarwal, K.C., 1996.** Therapeutic action of garlic constituents. Medicinal Research Reviews. Vol. 16, pp: 111-124.

4. **Alishahi, M.; Soltani, M.; Mesbah, M. and Esmaili Rad, A., 2011**. Effects of dietary *Silybum marianum* extract on some immune responses of Common carp (*Cyprinus carpio*). J. Vet. Res. Vol. 66, pp: 255-263.

5. **Aly, S.M. and Mohamed, M.F., 2010.** *Echinacea purpurea* and *Allium sativum* as immunostimulants in fish culture using Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. Vol. 94, pp: 31-39.

6. **Aly, S.M.; Mohamed, M.F. and John, G., 2008.** *Echinacea* as immunostimulatory agent in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) via earthen pond experiment. 8th international symposium on Tilapia in aquaculture. 437 p.

7. **Aly, S.M.; John, G.; El-Naggar, G. and Mohamed, F., 2007.** Effect of *Echinacea* on body gain, survival and some hematological and immunological parameters of *Oreochromis niloticus* and their response to challenge infection. Egypt J Aquat Biol Fish. Vol. 113, pp: 435-445.

8. **Amar, E.C.; Kiron, V.; Satoh, S.; Okamoto, N. and Watanabe, T., 2000.** Effects of dietary β-carotene on the immune response of rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)*. Fisheries Science. Vol. 66, pp: 1068-1075.

9. **Bahram, S.; Vahabzadeh Roodsari, H.; Nazari, R.M. and Javadian, R., 2005**. Efect of Levamisole on survival rate of the Persian Sturgeon *(Acipenser persicus)* fry. Journal of marine science and technology. Vol. 4, pp: 1-9.

10. **Bagni, M.; Romano, N.; Finoia, M.G.; Abelli, L. and Scapigliati, G. 2005.** Short- and long-term effects of a dietary yeast â-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (Dicentrarchus labrax). Fish Shellfish Immunol. Vol. 18, pp: 311-325.

11. **Bauer, R., 1998.** Echinacea: biological effects and active principles. In: L. D. Lawson, R. Bauer (eds), Phytomedicines of Europe: Chemistry and Biological Activity. DC7 American Chemical Society, Washington. 140 p.

12. **Bauer, R. and Wagner, H., 1991.** *Echinacea* species as potential immunostimulatory drugs. In: Wagner H, Farnsworth NR (eds) Economic and medicinal plant research, Academic Press Limited, London. Vol. 5, pp: 253-321

13. **Block, E., 1985.** The chemistry of garlic and onion. Scientific American. Vol. 252, pp: 114-119.

14. **Boesen, H.T.; Pedersen, K.; Larsen, J.L.; Koch, C. and Ellis, A.E., 1999.** Vibrio anguillarum resistance Trout *(Oncorhynchus mykiss)* Serum: Role of O-Antigen Structure of Lipopolysaccharide. Infection and Immunity. Vol. 67, No. 1, pp: 294-301.

15. **Bohlouli Oskoii, S.; Tahmasebi Kohyani, A.; Parseh, A.; Salati, A,P. and Sadeghi, S. 2011.** Effects of dietary administration of *Echinacea purpurea* on growth indices and biochemical and hematological indices in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. Springer Science+Business Media B.V. 251 p.

16. **Bone, K.E., 1997.** What makes it work? Alt. Med. Rev. Murray MT, Pizzorno Jr JE. Textbook of Natural Medicine, 2nd ed., Churchill Livingstone Inc. 704 p.

17. **Borek, C., 2001.** Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as a supple-ment: antioxidant health effects of aged garlic extract. Journal of Nutrition. Vol. 13, pp: 1010-1015.

18. **Clerton, P.; Troutaud, D.; Verlha, V.; Gabraudan, J. and Deschaux, P., 2001.** Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and on head kidney leucocytes. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 11, pp: 1-13.

19. **Corzo-Martinez, M.; Corzo, N. and Villamiel, M., 2007.** Biological properties of onions and garlic. Trends in Food Science and Technology. Vol. 18, pp: 609-625.

20. **Guanghong, W.U.; Yuan, C.O.; Shen, M.; Tang, J.; Gong, Y.I.; Dongme, L.I.; Sun, F.F.; Huang, C. and Han, X., 2007.** Immunological and biochemical parameters in carp (*Cyprinus carp*) Qompsell feed ingredients for long term administration. Aquaculture Research. Vol. 38, pp: 246-255.

21. **Guz. L.; Sopinska. A. and Oniszczuk. T., 2011.** Effect of *Echinacea purpurea* on growth and survival of guppy (*Poecilia re-ticulata*) challenged with Aeromonas bestiarum. Aquacult Nut. Vol. 17, pp: 695-700.

22. **Ghazanfari, T. and Ebrahimi, H.Z.M., 2002.** Immmunomodulatory activity of a protein isolated from garlic extract on delayed type hypersensitivity. International Immunopharmacology. Vol. 211, pp: 1541-1549.

23. **Gopalakannan, A. and Arul, V., 2006.** Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. Aquaculture. Vol. 255, pp: 179-187.

www.SID.ir

Archive of SID

24. **Guyton, A.C. and Hall, J.E., 1989.** Medical Physiology. Translated by Farrokh Shadan, Chehr Publication. Tehran, Iran. 324 p.

25. **Hansel, R. and Tayler, VE., 1998.** Rational phytotherapy.A. Physicians guide to herba medicine. 3rd ed. Springer, Berlin. pp: 107-125.

26. **Harris, J.C.; Cottrell, S.L.; Plummer, S. and Lioy, D., 2001.** Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 57, pp: 282-286.

27. **Hardy, R.W., 2002.** Nutrient requairment dnd feeding of fish for aquaculture. CABI Publishing, Walling ford, Oxon, United kingdom. pp: 184-202.

28. **Heidarieh, M.; Afsharnasab, M.; Soltani, M.; Dashtyannasab, A.; Rajabifar, S. and Sheikhzadeh, N., 2010.** Effects of ergosan and vibromax to *prevent vibriosis* and WSSV in Litopeaneus vannamei, J.Fish. Aquat. Sci. vol. 5, pp: 120-125.

29. **Heinrich, P. and Larry, D.L., 1996.** Garlic: The science and therapeutic application of Allium Sativum L. and related species. 2 nd ed. Translated to English by: William W. 313 p.

30. **Matthias, A.; Banbury, L.; Bone, K.M.; Leach, D.N. and Lehmann, R.P., 2008.** *Echinacea alkylamides* modulate induced immune responses in T cells. Fitoterapia. Vol. 79, pp: 53-58.

31. **Maass, N.; Bauer, J.; Paulicks, B.R.; Bo¨hmer, B.M. and Roth-Maier, D.A., 2005.** Efficiency of *Echinacea purpu*-reaon performance and immune status in pigs. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. Vol. 89, pp: 244-252

32. **Nya, E.J. and Austin, B., 2009.** Use of garlic (Allium sativum) to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish. pp: 328-329 Dis (in press).

33. **O Hara, M.; Kiefer, D.; Farrell, K. and Kemper, K., 1998.** A review of 12 commonly used medicinal herbs. Arch. Fam. Med. Vol. 7, pp: 523-35.

34. **Roesler, J.; Emmendorffer, A.; Steinmuller, C; Luttig, B.; Wagner, H. and Lohmann-Matthes, M.L., 1991.** Application of purified polysaccharides from cell cultures of the plant *Echinacea purpurea* to test subjects mediates activation of the phagocyte system. Int. J. Immunopharmacol. Vol. 13, No. 7, pp: 931- 941.

35. **Kakuta, I. and Kurokura, H., 1995.** Defensive effect of orally administered bovine lactoferrin against Cryptocaryon irritans infection of red sea bream. Fish Pathol. Vol. 30, pp: 289-290 (In Japanese).

36. **Kim, D.H. and Austin, B., 2006.** Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout, (*Oncorhyichus mykiss)*, induced by probiotics. Veterinary Immunology and Immunopathology. Vol. 114, pp: 297-3004.

37. **Kumari, J.; Swain, T. and Sahoo, P.K., 2003.** Dietary bovine lactoferrin induces changes in immunity level and disease resistance in Asian catfish (*Clarias batrachus)*. Veterinary Immunology and Immunopathology. Vol. 94, pp: 1-9.

38. **Siwicki, A.K.; Anderson, D.P. and Rumsey, G.L., 1994.** Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Veterinary Immunology and Immunopathology. Vol. 41, pp: 125-139.

39. **Stimpel, H.; Proksch, A.; Wagner, H. and Lohmann Matthes, M.L., 1984.** Macrophage activation and induction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharide fractions from the plant *Echinacea purpurea*. Infect Immun. Vol. 46, pp: 845-849.

40. **Thygesen, L.; Thulin, J.; Mortensen, A.; Skibsted, L.H. and Molgaard, P., 2007.** Antioxidant activity of cichoric acid and alkamides from *Echinacea purpurea*, alone and in combination. Food Chemistry. Vol. 101, pp: 74-81.

41. **Wagner, H. and Jurcic, K., 1991.** Immunologic studies of plant combination preparations. In vitro and in vivo studies on the stimulation of phagocytosis, Arzneimittel Forschung. Vol. 41, pp: 1072-1076.

42. **Waley, K. and North, J., 1997.** Haemolytic assays for whole complement activity and individual components. In: Dodds, A. W. and Sim, R. B. (Eds.), Complement: A Practical Approach, Vol. 1: Oxford University Press, Oxford, Great Britain. pp: 19-47.

www.SID.ir