وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – دانشگاه علوم دریایی چابهار

عنوان:

تاثیر عصاره متانولی گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea*) بر سطح ایمنی ماهی کفال خاکستری *(Mugil cephalus)*

مجریان:
شاپور کاکولکی
پریا اکبری

شماره ثبت
۵۱۳۲۶

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- دانشگاه علوم دریایی چابهار

عنوان پروژه : تاثیر عصاره متانولی گیاه دارویی سرخارگل(*Echinacea purpurea*) بر سطح ایمنی ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*)
شماره مصوب پروژه : ۹۳۰۰۳-۹۳۵۳-۱۲۵۱-۱۲-۱۳
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : شاپور کاکولکی، پریان اکبری
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : شاپور کاکولکی(مجری موسسه)- پریا اکبری(مجری دانشگاه چابهار)
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : سلیم جدگال - حسن صالحی- ابوالفضل سپهداری- همایون حسین زاده- سید محمد ابراهیم جلیل ذریه زهرا – محمد رضا مهرابی – سیاوش سلطانیان- مصطفی اخلاقی- حسنا قلی پور کنعانی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -
محل اجرا : استان تهران
تاریخ شروع : ۹۳/۱۱/۱
مدت اجرا : ۱ سال و ٦ ماه
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹٦
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه : تاثیر عصاره متانولی گیاه دارویی سرخارگل(*Echinacea purpurea*) بر سطح ایمنی ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*)

کد مصوب : ۹۳۰۰۳-۹۳۵۳-۱۲۵۱-۱۲-۱۳

شماره ثبت (فروست) : ۵۱۳۲۶ تاریخ : ۱۳۹۵/۱۲/۱۲

با مسئولیت اجرایی جناب آقای شاپور کاکولکی دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته بهداشت و بیماریهای آبزیان می‌باشد.

با مسئولیت اجرایی سرکار خانم پریا اکبری دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته آبزیان می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجریان در :

ستاد ■ پژوهشکده □ مرکز □ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی در موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور مشغول بوده است.

با سمت عضو هیئت علمی در دانشگاه علوم دریایی چابهار مشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱-مقدمه ۲
۲- مواد و روش ها ۶
۲-۱- ماهی و شرایط پرورش ۶
۲-۲- تهیه گیاه سرخارگل و آماده سازی عصاره ٦
۲-۳- آماده‌سازی جیره و غذادهی به ماهیان ۶
۲-۴- زیست سنجی و پارامترهای رشد و تغذیه ۷
۲-۵- خونگیری از ماهی ۸
۲-۶- اندازه گیری پارامترهای خون‌شناسی ۸
۲-۷- اندازه گیری فاکتورهای بیوشیمیائی سرم ۹
۲-۸- فاکتورهای ایمنی شناسی ۹
۲-۸-۱- میزان لیزوزیم ۹
۲-۸-۲- اندازه گیری میزان آنتی بادی به روش ELISA ۱۰
۲-۹- تعیین فعالیت فاگوسیتوزی ۱۱
۲-۱۰- انفجار تنفسی ۱۱
۲-۱۱- درصد تلفات بعد از چالش با باکتری زنده فتوباکتریوم دمسلا (*Photobacterium damsela*) ۱۲
۲-۱۲- آنالیز آماری ۱۲
۳- نتایج ۱۳
۳-۱- شاخص های رشد ۱۳
۳-۲- شاخص های هماتولوژی ۱۳
۳-۳- شاخص های بیوشیمیایی سرم خون ۱۴
۳-۴- شاخص های ایمنی ۱۵
۳-۵- درصد تلفات تجمعی بعد از چالش با باکتری فتوباکتریوم دمسلا ۱۶
۴- بحث ۱۸
۵- نتیجه‌گیری کلی ۲۳
منابع ۲۵
چکیده انگلیسی ۲۹

چکیده

گیاهان دارویی در طب شرقی برای قرن‌ها استفاده شده است. سرخارگل به‌عنوان یکی از گیاهان دارویی با اثرات مثبت بر پارامترهای ایمنی شناخته شده است که معمولا برای درمان سرماخوردگی، برونشیت، عفونت‌های تنفسی و التهابی استفاده می‌شود. هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر عصاره سرخارگل بر روی سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهی کفال‌خاکستری بود. ۳۶۰ قطعه لارو ماهیان کفال خاکستری با میانگین وزنی g ۰/۰۲±۰/۷۵ و میانگین طولی cm ۰/۸۱±۴/۴۰ از اسکله رمین واقع در ۵ کیلومتری بندر چابهار صید و به محل آزمایش، انتقال داده شد. این تحقیق بر اساس ۴ تیمار (۰،۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در هر کیلوگرم غذا)، هر تیمار دارای سه تکرار طراحی گردید. عمده فاکتورهای مورد بررسی، فاکتورهای رشد عمدتا مشتمل بر میانگین وزن اخذ شده، رشد روزانه، راندمان پروتئینی، نرخ تولیدی پروتئین، فاکتورهای خونی و بیوشیمیائی مشتمل بر گلوبین، آلبومین، پروتئین کل، و فاکتورهای ایمونولوژیک لیزوزیم، انفجار تنفسی و درصد فاگوسیتوزیس بوده است. در کل نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اضافه نمودن ۱۰۰ و۲۰۰ میلی گرم عصاره سرخارگل به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی منجر به افزایش معنی‌دار وزن نهایی، میزان غذای دریافتی، نرخ رشد روزانه و کارایی پروتئین، پروتئین تام، آلبومین، گلوبین، تعداد گلبول سفید، گلبول قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین کفال ماهی خاکستری در مقایسه با تیمارشاهد گردید. بالاترین میزان فعالیت لیزوزیم، انفجار تنفسی، آنتی بادی کل و درصد فاگوسیتوزیس در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی گرم عصاره سر خارگل بر کیلوگرم غذا مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را با بقیه تیمارها نشان داد. تیمار حاوی ۲۰۰ میلی گرم عصاره بر کیلوگرم غذا کمترین تلفات را بعد از چالش با باکتری فتوباکتریوم دمسلا در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد. در مجموع بر اساس نتایج این تحقیق، افزودن ۲۰۰ میلی گرم عصاره سرخارگل بر کیلوگرم جیره غذایی ماهی کفال خاکستری به‌منظور بهبود شاخص های رشد، هماتولوژی، ایمنی و مقاومت در برابر بیماری فتوباکتریوزیس در این ماهی پیشنهاد می‌شود

کلمات کلیدی:عصاره سرخارگل، کفال ماهی خاکستری، فتوباکتریوزیس، رشد، هماتولوژی، ایمنی

۱-مقدمه

آبزی‌پروری بخش اساسی و در حال رشد را در سراسر دنیا تشکیل می‌دهد. افزایش تقاضای ماهی در ابتدا به دلیل رشد سریع جمعیت، درآمد ناشی از این فعالیت و همچنین ارجحیت ماهی بر سایر پروتئین های حیوانی و سپس دلایل فرهنگی و بهداشتی رشد این صنعت را تسریع کرده و برای آینده نیاز به توسعه فعالیت‌های آبزی پروری و افزایش تولید قابل پیش بینی خواهند بود. صنعت آبزی‌پروری باید موثر و سودآور و دارای حداقل اثرات زیست محیطی باشد. غذاها، عملیات غذادهی و تامین عناصر اساسی در پایداری، سودآوری و مناسب بودن آبزی‌پروری مدرن تعیین کننده هستند، زیرا هزینه‌های غذا، حدود ۳۰ تا ۷۰ درصد از کل هزینه‌های عملیاتی را شامل می‌شوند (ابراهیمی،۱۳۸۵). علاوه بر آن، مشخص شده است که تغذیه نقش مهمی را در عملکرد سیستم ایمنی و مقاومت در برابر بیماری‌ها ایفا می‌کند. در نتیجه، کیفیت غذا و مدیریت تغذیه در آبزی-پروری بسیار حساس و حائز اهمیت می‌گردد (ابراهیمی،۱۳۸۵).

در صنعت آبزی‌پروری عوامل بیماری‌زا از عوامل کاهش‌دهنده تولید بوده لذا برای حل این مشکل امروزه از محرک‌های سیستم ایمنی استفاده می‌کنند و از آن‌جایی که برخی گیاهان دارویی دارای طیف وسیعی از خواص مفید از جمله تحریک و تقویت سیستم ایمنی هستند به همین علت استفاده از آن‌ها در مزارع پرورش ماهی سبب بهبود تولید می‌گردد (رضایی و همکاران، ۱۳۹۲).

سیاست داروسازی نوین در طی دو دهه اخیر به شکل قابل توجهی به سوی گیاهان دارویی و درمان با داروهای گیاهی و طبیعی پیش رفته است. طبیعت این منبع غنی از دارو افق‌های جدیدی را برای جامعه پزشکی، دامپزشکی، داروسازی و دامپروری گشوده است. آمار جهانی نشان می‌دهد که مصرف سالانه گیاهان دارویی به دلیل افزایش مقاومت عوامل بیماریزا به داروهای مصنوعی در کشورهای اروپایی و نیز کشورهای در حال توسعه در سال‌های اخیر پیشرفت چشمگیری داشته است (Galina *et al*.,2009; Dügenci *et al*. , 2003).

در حال حاضر برخی از جوامع بومی و سنتی کشورهای در حال توسعه با توجه به تجربیات و دانش بومی انتقال یافته از نسل‌های قبلی به آن‌ها از گیاهان دارویی و برخی منابع جانوری یا معدنی برای درمان و سلامت دام‌ها و آبزیان استفاده می‌کنند. به‌طور نمونه در این روش درمان، کشاورزان و دامداران از اندام تازه، دم کرده، جوشانده، روغن، شیره، صمغ مرهم برخی از گونه‌های دارویی در جنگل، مراتع یا مزارع بدون پرداخت هزینه بهره‌برداری می‌کنند. اگرچه درمان با گیاهان دارویی به صورت سنتی سریع نمی‌باشد و ممکن است برای بیماری‌های اپیدمیک چندان مناسب نباشد، اما با این حال داروهای گیاهی و طبیعی به دلیل عواملی نظیر ارزش اقتصادی و کم هزینه بودن تولید آن‌ها، 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 توسط 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 برخوردار باشند (Galina *et al*.,2009; Chen *et al*.,2003; Jian and Wu,2004).

سرخارگل با نام علمی *Echinacea purpurea* گیاهی علفی و چند ساله با ارتفاع ۱۵۰-۶۰ سانتی متراست و متعلق به خانواده گل ستاره Asteracea که به عنوان گیاه دارویی ارزشمند است. همچنین این گیاه به نام گل مخروطی بنفش نیز نامیده می‌شود و به‌عنوان یکی از گیاهان دارویی مهم در سراسر جهان که به‌علت خواص ضدالتهابی، محرک ایمنی، ضد باکتریایی، درمان بیماری‌های عفونی و تنفسی و التیام دهنده زخم مورد مصرف قرار می-گیرد. این گیاه بومی شمال آمریکا است و به‌طور گسترده در شمال اروپا نیز کشت داده شده است و در ایالات متحده آمریکا از قسمت های هوایی و ریشه این گیاه ترکیبات قطبی و غیر قطبی آن (آلکائیدها، مشتقات کافئیک اسید، پلی فنولیک، پلی‌ساکارید و اسانس) استخراج شده و به‌صورت داروی گیاهی یا مکمل غذایی مورد استفاده قرار گرفته است (Hudaiba *et al*.,2002). این گیاه فعالیت سیستم ایمنی غیر اختصاصی را در برابر بیماری‌های باکتریایی و ویروسی تقویت می‌کند (Galina *et al*.,2009; Dahui *et al*.,2011) ترکیبات گلیکوپروتئین-ها، پلی ساکاریدها، مشتقات اسید کافئیک و آلکیل آمیدی موجود در اکیناسه فعالیت سیستم ایمنی را افزایش می‌دهند. همچنین باعث تحریک فعالیت فاگوسیتوز ماکروفاژها می‌شوند و مهاجرت گرانولوسیت‌ها را به خون که موجب مقاومت در مقابل عوامل پاتوژن می‌شود را افزایش می‌دهند (Bauer and Wagner,1991). همچنین سرخارگل با افزایش تولید آنتی بادی، ایمنی هومورال را تقویت و با تحریک ماکروفاژها و افزایش تولید سیتوکین‌ها و نیز افزایش تکثیر لنفوسیت های T ایمنی سلولی را تقویت می‌کند (پور غلام و همکاران، ۱۳۹۲ و Stimpel *et al*.,1982) برخی از ترکیبات موثره عصاره سرخارگل عبارتند از آلکالوئیدهای لیپوفیلیک، β-caryophllene، Pentadecadiene 1,8 Germacrene-D و Peopylparaben (Dahui *et al*.,2011;Xu *et al*.,2008). گیاه سرخارگل یکی از گیاهان دارای اثر تحریک ایمنی ثابت شده در حیوانات خون‌گرم بوده و افزایش کارایی سیستم ایمنی به‌دنبال تجویز فرآورده‌های مختلف سرخارگل در موش گزارش شده است (Burger *et al*.,1997; Roesler *et al*.,1991) و اثرات این گیاه در تحریک ایمنی ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) (علیشاهی و همکاران،۱۳۸۸)، ماهی اسکار (*Astronotus ocellatus*.) (علیشاهی و همکاران،۱۳۹۱) و ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (عبدی و علیشاهی، ۱۳۹۲) نیز تایید شده است. Thude. و همکاران (۲۰۰۶) گزارش نمودند که پروتئین abinogalacton (AGP) موجود در گیاه سرخارگل که گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی بالا ($۱/۲\times۱۰^{۶}$) دالتون است منجر به تحریک فعالیت فاگوسیتوزیز و آزادسازی عوامل نکروز دهنده توموری (Tumor necrosis factors) به‌وسیله ماکروفاژها می‌گردد. همچنین افزایش تکثیر تولید آنتی‌بادی لنفوسیت و تولید اینترلوکین ۶ ماکروفاژهای موش می‌گردد. Seeو همکاران در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که استفاده از عصاره گیاه سرخارگل منجر به تحریک عملکرد نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها در موش بر علیه عفونت-های سیستماتیک *Listeria monocytogenes*و *Candida albicans* می‌گردد. همچنین تنها cichoric acid از دسته

ترکیبات فنولئیک منجر به تحریک فعالیت فاگوسیتوز در موش می‌گردد. هر چند تعدادی از ترکیبات فعال گیاه سرخارگل شناسایی شده است اما ساز و کار عمل هر یک از ترکیبات، فراهمی زیستی، قدرت زیستی و اثرات هم‌افزایی آن‌ها هنوز شناسایی نشده است.

تاثیرگذاری گیاه سرخارگل عمدتا مربوط به واکنش سیستم ایمنی غیراختصاصی سلولی است که تحت تاثیر ترکیبات پلی ساکاریدها، گلیکوپروتئین ها، مشتقات اسیدکافئیک و آلکائیدها موجود در گیاه می‌باشد (Aly *et al*.,2008). همچنین تاثیر ترکیبات آلکائیدها و مشتقات فنولیک اسید گیاه سرخارگل بر روی سیستم ایمنی غیر اختصاصی به مراتب بیشتر از ایمنی اختصاصی است (Percival, 2000). تحقیقات ثابت کرده است در انسان فقط دوز پایین سرخارگل می تواند فاگوسیتوز را بالا ببرد و دوز بالا تعداد گلبول‌های سفید و فعالیت فاگوسیتوز را کاهش می‌دهد (Fleming.1998). عصاره سرخارگل باعث افزایش در میزان اینترلوکین ۱، ۲و۶ می-گردد این افزایش توسط مونوسیت های فعال شده یا ماکروفاژها، فیبروبلاست‌ها و سلول‌های آندوتلیال صورت می‌گیرد. این ترکیب سیتوکینی با فعالیت گسترده برای تیموسیت‌ها خاصیت میتوژنی داشته و به آن عامل فعال کننده لنفوسیت نیز می‌گویند از طرفی اینترلوکین ۱ عامل کمکی برای تمایز و تکثیر لنفوسیت‌های B است (Dahui *et al*.,2011).

علیشاهی و همکاران در سال ۱۳۹۱ نشان دادند که تجویز خوراکی ۵ درصد عصاره سرخارگل منجر به افزایش معنی‌دار رشد، تعداد گلبول‌های سفید، میزان هماتوکریت، هموگلوبین و مقاومت ماهی اسکار در مقابل باکتری آیروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) در مقایسه با گروه شاهد شد. همچنین علیشاهی و همکاران در سال ۱۳۹۱ با بررسی اثر تحریک رشد و افزایش مقاومت در برابر برخی استرس های محیطی به دنبال تجویز برخی محرک‌های ایمنی (لوامیزول، آرگوسان و ویتامین c) و عصاره‌های گیاهی (سرخارگل، آلوئه ورا ، داروش و سیاه دانه) در ماهی برزم (*Barbus barbulus*) نشان دادند که عصاره سرخارگل و داروش اثرات تحریک رشد و ایمنی قابل رقابت با محرک‌های ایمنی پذیرفته شده ای مثل آرگوسان و لوامیزول داشته و می‌توان از آن-ها به عنوان محرک‌های ایمنی در آبزیان استفاده نمود (علیشاهی و همکاران، ۱۳۹۱a)

Salah و همکاران در سال ۲۰۰۸ به بررسی اثر اکیناسه روی میزان رشد و میزان بقاء بعد از تزریق صفاقی باکتری پسودوموناس فلورسانس (*Pseudomonas fluorescens*) در ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) پرداختند. نتایج نشان داد که در گروه تغذیه شده با اکیناسه میزان وزن به‌دست آمده، ضریب رشد ویژه، میزان هماتوکریت، فعالیت لیزوزیم و تعداد لکوسیت‌ها به‌طور معنی داری در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت. همچنین میزان بقاء در گروه تغذیه شده با اکیناسه پیش و بعد از تزریق صفاقی باکتری بالاتر از گروه شاهد بود(Gabor *et al*.,2010).

Kasiri و همکاران در سال ۲۰۱۱ گزارش نمودند که استفاده از عصاره اکیناسه در جیره غذایی فرشته ماهی (*Pterophyllum scalare*) منجر به بهبود رشد گردید.

در تحقیق دیگر تاثیر عملکرد گیاه سرخارگل (در سه سطح ۰/۵، ۱ و ۲ گرم بر کیلوگرم چیره غذایی) بر پاسخ ایمنی غیر اختصاصی ماهی جوان استرلیاد (*Acipencer ruthenus*) مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که فعالیت لیزوزیم، میزان پروتئین تام، میزان آنتی بادی سرم و آلبومین در ماهیانی که تحت تاثیر تجویز عصاره سرخارگل قرار گرفتند به طور معنی‌داری بیشتر از شاهد بودند (نجف پور مقدم و همکاران، ۱۳۹۲).

Sadigh -Eteghad (۲۰۱۱) گزارش کرد که استفاده از ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گیاه سرخارگل در جیره غذایی موش منجر به افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های سفید، درصد هماتوکریت، فعالیت فاگوسیتوز، پروتئین تام، آلبومین و گلوبین در مقایسه با گروه شاهد شد.

پور غلام و همکاران در سال ۱۳۹۲ سه غلظت از عصاره سرخارگل (۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم بر گیلوگرم غذا) را به منظور ارزیابی برخی از شاخص‌های ایمنی شناسی و خون‌شناسی در بچه ماهیان قزل آلا و مقاومت آن‌ها در برابر استرپتوکوکوس اینیایی (*Streptococcus iniae*) مورد استفاده قرار دادند. نتایج مشخص کرد که مقادیر کمپلمان، لیزوزیم، رادیکال آزاد اکسیژن، تعداد گلبول‌های سفید و درصد نوتروفیل پس از ۶۰ روز افزایش معنی‌داری در تیمارهای حاوی سرخارگل نسبت به گروه کنترل داشته و غلظت ۱/۵ گرم بر گیلوگرم غذا نتایج بهتری داشته و آلوده کردن ماهیان مورد آزمایش با باکتری استرپتوکوکوس اینیا نشان داد که ماهیان دریافت کننده عصاره سرخارگل (۱/۵ گرم بر گیلوگرم غذا) دارای ماندگاری ۹۱/۱۱ درصد بود در صورتی که در گروه کنترل این میزان ۴۴/۴۴ درصد بود (پورغلام و همکاران، ۱۳۹۲).

با توجه به مطالعات متعددی که در زمینه استفاده از گیاهان دارویی در تغذیه آبزیان شده است ولی تاکنون در ارتباط با کاربرد عصاره سرخارگل در پرورش ماهی کفال خاکستری منبع علمی در دسترس نیست. لذا در این مطالعه به بررسی اثر عصاره سرخارگل بر روی عملکرد شاخص های رشد، تغذیه، ایمنی غیر اختصاصی(آنزیم لیزوزیم ، فعالیت فاگوسیتوزی و انفجار تنفسی)، ایمنی اختصاصی (آنتی بادی کل)، فاکتورهای هماتولوژیک (شمارش گلبول‌های سفید، شمارش گلبول‌های قرمز، میزان هماتوکریت و میزان هموگلوبین) و بیوشیمیایی خون (میزان پروتئین تام، آلبومین، گلوبین و نسبت آلبومین به گلوبین) ماهی کفال ماهی خاکستری پرداخته شده است.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱- ماهی و شرایط پرورش

این پژوهش در کارگاه تکثیر و پرورش ماهی موسسه تحقیقات شیلات چابهار انجام شد. ۳۶۰ قطعه لارو ماهیان کفال خاکستری از اسکله رمین واقع در ۵ کیلومتری بندر چابهار صید و به محل آزمایش، انتقال داده شد. پس از طی مرحله سازگاری به‌مدت دو هفته و اطمینان از سلامتی آن‌ها، لاروها با میانگین وزنی g ۰/۰۲±۰/۷۵ و میانگین طولی cm ۰/۸۱±۴/۴۰ شمارش شده و با تراکم ۳۰ قطعه به ۱۲ مخزن ۶۰L منتقل شدند. در طول دوره، پارامترهای آب اندازه گیری شد. به‌طور میانگین در کل دوره درجه حرارت آب°C ۰/۵±۲۸/۲، اکسیژن محلول mg/L ۰/۸۷± ۷/۰۱ و pH آب ۰/۴±۷/۸ بود. در طی دوره آزمایش فتوپریود به‌صورت ۱۲D:۱۲Lبود. به‌منظور هوادهی و نیاز اکسیژن لاروها به هر یک ازمخزن‌ها یک سنگ هوا که به منبع هواده متصل بود نصب گردید. تیمارهای مورد استفاده در تحقیق حاضر شامل: تیمار ۱ یا شاهد که تنها با غذای تجاری (شرکت تعاونی تولیدی ۲۱ بیضاء، شیراز با میزان ۵۰ درصد پروتئین ۱۳/۵ درصد چربی خام و ۱/۷ درصد فیبر خام و ۴۳۰۰ کیلوکاری بر کیلوگرم انرژی)، تغذیه گردید ۳ تیمار دیگر با سه تکرار برای هر تیمار با غذای تجاری حاوی سطوح mg/kg ۵۰،۱۰۰و ۲۰۰ عصاره سرخارگل در طی یک دوره ۸ هفته تغذیه گردیدند.

۲.۲- تهیه گیاه سرخارگل و آماده سازی عصاره

گیاه سرخارگل، از اطراف شهرستان شیراز جمع آوری شد و به‌منظور شناسایی آن از کلید شناسایی استفاده گردید. سپس بوته‌ها و سر شاخه‌های آن‌ها در فضای آزاد خشک و توسط دستگاه آسیاب کاملا به حالت پودر تبدیل شدند .۵۰ گرم از پودر حاصل را درون فیلتر استوانه ای دستگاه سوکسله ریخته سپس ۴۰۰ میلی‌لیتر از حلال متانول را درون فلاسک دستگاه ریخته و با نصب کامل دستگاه سوکسله (اتصال فلاسک به مبرد و سوکسله) منبع حرارت دهنده دستگاه روشن گردید. در این حال با تبخیر مرتب حلال از بالن تحتانی، به طور مداوم حلال خالص بر روی ماده گیاهی قرار گرفته و موجب خروج کامل+ مواد موثره از درون سلول‌های گیاه گردید پس از ۱۲ ساعت محتویات فلاسک در دستگاه دسیکاتور در شرایط خلاء کاملا خشک گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد(Harikrishnan et al., 2003).

۲-۳- آماده‌سازی جیره و غذادهی به ماهیان

به‌منظور اضافه نمودن سطوح مختلف عصاره به غذای کنسانتره ابتدا مقدار غذا را برای کل دوره (۸ هفته) برای هر تیمار محاسبه سپس با درصد مشخصی آب مقطر(۴۰ mL) عصاره را به جیره اضافه نموده تا به حالت خمیری درآمد. با استفاده از چرخ گوشت با مش ۰/۵ میلی متری خمیر عبور داده شد و به شکل پلت در مجاورت هوا خشک گردید و سپس برای مصرف در کل دوره آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد(Choi

et al., 2015). مقدار غذای روزانه با توجه به درصد وزن بدن (توده زنده) محاسبه شد و در نوبت صبح و عصر به میزان ٪۷ وزن بدن (در حد سیری) در اختیار لارو ماهیان قرار گرفت. عمل سیفون کردن به‌صورت یک روز در میان انجام و باقیمانده غذایی و مدفوع ماهی ها از مخازن خارج گردید.

٤-۲- زیست سنجی و بررسی پارامترهای رشد و تغذیه

به‌منظور اندازه‌گیری شاخص‌های رشد، در انتهای آزمایش تمام لاروهای هر مخزن خارج شده و وزن (با دقتg ۰/۰۱) و طول (با دقت۱mm) آنها ثبت گردید. با استفاده از داده های حاصل از زیست سنجی ها، میزان پروتئین موجود در غذا و اندازه گیری پروتئین لاشه، شاخص های رشد میزان رشد روزانه (Wahli et al., 2003)، میزان غذای دریافتی(Misra et al., 2006)، ضریب تبدیل غذایی(Lim et al., 2000)، راندمان مصرف پروتئین و راندمان مصرف چربی (Bai, 2001) تعیین شد.

میزان رشد روزانه (DGR)

$$DGR = \frac{[(\mathrm{WG} \times 100)/(\mathrm{Wi} + \mathrm{Wf})/2)]}{t}$$

Wf= وزن نهایی (g) Wi= وزن اولیه (g)

WG=افزایش وزن بدست آمده (g)

ضریب تبدیل غذایی (FCR)

$$\mathrm{FCR} = \frac{F}{\mathrm{Wf} - \mathrm{Wi}}$$

F= مقدار غذای مصرف شده (گرم)

Wf= وزن نهایی (g) Wi= وزن اولیه (g)

میزان غذای دریافتی (VFI)

$$VFI = \frac{100 \times \text{ crude feed intake}/ (\mathrm{Wf} + \mathrm{Wi}/2)}{t}$$

Wf= وزن نهایی (g) Wi= وزن اولیه (g)

راندمان مصرف پروتئین (PER)

$$\mathrm{PER} = \frac{\mathrm{BWf} - \mathrm{BWi}}{\mathrm{AP}}$$

BWf=وزن نهایی (g) BWi= وزن اولیه (g)

AP= مقدار پروتئین داده شده به هر ماهی

راندمان مصرف چربی (PER)

$$LER = \frac{\mathrm{BWf} - \mathrm{BWi}}{AL}$$

BWf=وزن نهایی (g) BWi= وزن اولیه (g)

AP= مقدار چربی داده شده به هر ماهی

۲-۵- خونگیری از ماهی

در پایان دوره آزمایش، از هر تیمار ۱۰ عدد ماهی به صورت تصادفی انتخاب شد و فاکتورهای هماتولوژیک (شمارش گلبول‌های سفید، شمارش گلبول‌های قرمز، میزان هماتوکریت و میزان هموگلوبین) ، بیوشیمیایی خون (میزان پروتئین تام، آلبومین، گلوبین و نسبت آلبومین به گلوبین)، ایمنی غیر اختصاصی (لیزوزیم) و ایمنی اختصاصی (آنتی بادی کل) در آن ها مورد سنجش قرار گرفت. برای این کار، ابتدا ماهیان با استفاده از پودر میخک با غلظت ۳۰ میلی گرم بر لیتر بیهوش گردیده و برای جلوگیری از ورود آب و موکوس به نمونه خون، ماهیان خشک شدند. خون گیری از قلب صورت گرفت. برای این کار بخشی از خون گرفته شده (به منظور شمارش گلبول‌های قرمز و سفید خون) وارد میکروتیوب های حاوی ۵۰ µL هپارین (ماده ضد انعقادخون) گردید و بخشی از آن نیز وارد میکروتیوب های فاقد هپارین (به منظور جداسازی سرم خون) گردید. سرم خون با استفاده از سانتریفوژ Hettich مدل DV200 باسرعت۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه جدا گردید و نمونه های سرم تا قبل از انجام تست های بیوسیمیایی و ایمنی در ماهی ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

۲-۶- اندازه گیری پارامترهای خون شناسی

برای اندازه گیری پارامترهای خونی، از روش های معمول و متداول پارامترهای خونی پستانداران با کمی تغییر (Feldman et al.,2000) استفاده گردید.

شمارش کلی گلبول‌های سفید به روش مستقیم (با استفاده از لام هموسیتوتر) با رقیق کردن خون به نسبت ۱ به ۲۰۰ با محلول رقیق کننده داسیس صورت گرفت. پس از انتقال نمونه رقیق شده به لام هموسیتومتر تعداد گلبول-های سفید در ۴ مربع بزرگ اطرافی شمارش گردید و سپس تعداد کل گلبول‌های سفید در میلی مترمکعب خون محاسبه شد (Alishahi et al.,2011)

برای تعیین میزان هماتوکریت از روش میکروهماتوکریت استفاده گردید (Rehulka,2000).

برای شمارش تعداد گلبول قرمز از پیپت حبابدار (ملانژور) استفاده گردید. تعداد گلبولهای قرمز با استفاده از لام نئوبار بعد از رقیق سازی خون هپارینه با محلول داسیس (رقت ۱/۲۰۰) شمارش شد از مربع میانی (۵ مربع از ۲۵ مربع میانی) لام نئوبار برای شمارش گلبول قرمز استفاده و عدد بدست آمده در عدد ۱۰۰۰۰ ضرب شد تعداد گلبول قرمز در یک میلی مترمکعب خون محاسبه گردید(Basu et al.,2001).

برای تعیین میزان هموگلوبین، طبق روش سیانومت، هموگلوبین ابتدا ۱۰ میلی لیتر محلول درابکین در لوله آزمایش ریخته و ۲۰ میکرولیتر از خون به آن اضافه می شود. لوله ها به مدت ۵ دقیقه روی شیکر قرار گرفته تا محلول و خون کاملا مخلوط شوند. سپس با استفاده از دستگاه طیف سنج در طول موج ۵۴۰ نانومتر تعیین و با استفاده از فرمول زیر میزان هموگلوبین بر اساس گرم در دسی لیتر بدست آمد (Trenzado et al.,2009).

۲-۷- اندازه گیری فاکتورهای بیوشیمیایی سرم

مقدار پروتئین تام سرم با استفاده از کیت تشخیصی شرکت پارس آزمون مورد سنجش قرار گرفت. در داخل یک لوله آزمایش، میزان ۱/۹ میلی لیتر از محلول ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم و ۰/۱ میلی لیتر سرم خون را و در داخل لوله آزمایش دیگر ۱/۹ میلی لیتر از محلول ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم و ۰/۱ میلی لیتر استاندارد ریخته شد. همچنین به‌منظور تهیه بلانک، ۲ میلی لیتراز محلول ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم را در یک لوله آزمایش دیگر ریخته و ۵ میلی لیتر معرف بیوره را به هر یک از لوله ها اضافه و مخلوط گردید و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت آزمایشگاه قرار گرفت و جذب نوری لوله های نمونه و استاندارد را در مقابل بلانک در طول موج ۵۵۰ نانومتر بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (WPAS2000-UV/VIS, Cambridge, UK) قرائت شد. و میزان پروتئین تام بر حسب گرم بر دسی لیتر محاسبه گردید (Burtis and Ashwood,1994).

مقدار آلبومین تام سرم با استفاده از کیت تشخیصی شرکت پارس آزمون مورد سنجش قرار گرفت. به منظور اندازه گیری آلبومین به ۵ میلی لیتر محلول کاررنگ (۱۲۵ میلی لیتر محلول استوک رنگ (حاوی ۲۱۰ میلی گرم بروموکرزول سبز، ۵ میلی لیتر محلول هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال، ۰/۵ میلی لیتر آزاید سدیم و ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر) ۲۵ میلی لیتر سرم اضافه شد وبه خوبی مخلوط گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت آزمایشگاه قرار گرفت. جذب نوری این محلول را در طول موج ۶۳۰ نانومتر بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (WPAS2000-UV/VIS, Cambridge, UK) در مقابل بلانک قرائت گردید و میزان آلبومین برحسب گرم بر دسی لیتر محاسبه گردید(Burtis and Ashwood,1994). و از کسر پروتئین تام از آلبومین میزان گلوبولین محاسبه شد (Kumar et al.,2005) میزان نسبت آلبومین به گلوبولین از تقسیم کردن مقادیر آلبومین تام به گلوبولین تام محاسبه گردید (Sahoo et al.,1999).

۲-۸- فاکتورهای ایمنی شناسی

۲-۸-۱- میزان لیزوزیم

سنجش میزان لیزوزیم سرم نمونه ها، بر اساس روش توصیه شده توسط Ellis در سال ۱۹۹۰ صورت گرفت ابتدا ۱۷۵ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروکوکوس لیزودیکتیکوس (*Micrococcus lysodeikticus*) (محصول سیگما) (معادل مقدار ۰/۳۷۵ گرم به ازای هر میلی لیتر بافر فسفات سدیم با مولاریته ۰/۰۵ و pH برابر ۶/۲) با میزان ۲۵۰

میکرولیتر از هر نمونه مخلوط و در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد انکوباسیون شد. میزان جذب نوری پس از ۱۵ و ۱۸۰ ثانیه به روش اسپکتروفتومتری و در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت گردید. سپس تفاوت جذب نوری بین اولین و دومین مرحله نورسنجی ثبت شد و نتایج حاصله بر حسب میکرو گرم بر میلی لیتر به کمک رسم منحنی استاندارد با استفاده از رقت‌های بر مبنای ۲ لیزوزیم سفیده تخم مرغ (محصول سیگما) تهیه و در بافر فسفات سدیم محاسبه شد (رقت اولیه ۱/۶ میکرو گرم بر میلی لیتر در نظر گرفته شد). همچنین از بافر فسفات سدیم به عنوان بلانک استفاده شد.

۲-۸-۲- اندازه گیری میزان آنتی بادی به روشELISA

ابتدا به منظور استخراج ایمنوگلوبین ، ۲۰ میلی لیتر از نمونه ها به محلول سولفات آمونیوم ۴۰ درصد اشباع اضافه شد و سپس با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد و رسوب در حجم اولیه نمونه ها در بافر فسفات سدیم حل گردید و در مقابل ۲۰ میلی مولار بافر تریس- اسید کلریدریک با pH برابر ۸ استفاده شد .و سپس وارد ستون کروماتوگرافی سفادکس G۲۰۰ شد و پس از خروج در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. میزان آنتی بادی با استفاده از روش الیزای غیر مستقیم (Hanif et al.,2004) و میکروپلیت پوشیده با آنتی بادی خرگوش ضد ایمنوگلوبین ماهی (۷/۶ میکروگرم بر میلی لیتر) و آنتی سرم بز ضد خرگوش متصل به ماده رنگ زا (HRP)۱(شرکت CSB-E120445FH) مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا ۵۰ میکرولیتر محلول آنتی ژن ها (آنتی بادی استخراج شده نمونه ها با رقت‌های ۰ تا ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در بافرفسفات سدیم بافر رقیق کننده با مولاریته ۰/۰۵ و pH برابر ۶/۲ (PBS)۲ و ۰/۰۵ توئین۳ و ۳ درصد آلبومین سرم گاوی (BSA)۴) داخل حفره های میکروپلیت که از قبل با ۵۰ میکرولیترآنتی بادی خرگوش ضد ماهی (۷/۶ میکروگرم بر میلی لیتر) بلوکه شده و با ژلاتین پوشش داده شده ریخته شد و پس از ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوباسیون شد بعد از شستشو ۵۰ میکروگرم آنتی سرم کونژوگه بز ضد خرگوش متصل به HRP به حفرات اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوباسیون شد و هر چاهک را بخوبی با بافر شستشو (۲۵۰ میکرولیتر) پر کرده و به مدت ۱۰ ثانیه آنرا چرخانده و سه بار عمل شستشو را تکرار کرده سپس ۵۰ میکرولیتر محلول سوبسترای حاوی o- phenylenediaminedihydrochloride (یک میلی گرم بر میلی لیتر) و ۰/۰۴ ٪ (H_2O_2) ۰/۱ مولار سیترات در ۰/۲ مولار بافر فسفات با pH برابر ۵/۵ به هر چاهک اضافه شد و سپس به‌خوبی مخلوط گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد در تاریکی انکوباسیون شد، در نهایت واکنش سوبسترا- آنزیم بوسیله اضافه نمودن ۲۵ میکرولیترمحلول اسید سولفوریک (۰/۵ مولار) به هر چاهک خاتمه داده شد و تغییر رنگ بطریق اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۵۰ نانومتر (۲±۴۵۰ نانومنر) در

---

1 - Horse raddish peroxidase
2- Phosphate- buffered saline
3- Tween
4- Bovine serum albumin

طول ۱۰ دقیقه اندازه گیری گردید. غلظت آنتی بادی در نمونه ها بوسیله مقایسه تراکم اپتیکال از نمونه ها با منحنی استاندارد تعیین گردید. همه نمونه ها در سه تکرار در پلت‌ها قرار داده شد و میانگین و خطای استاندارد برای هر نمونه از آنتی بادی محاسبه گردید و داده ها بر مبنای میکرو گرم بر میلی لیتر بیان شد.

۹-۲- تعیین فعالیت فاگوسیتوزی

تعیین فعالیت فاگوسیتوزی ماکروفاژهای بافت کلیه بر اساس روش Kim و Austin(2006) با اندکی تغییر صورت گرفت. mL ۱ از سوسپانسیون سلولی ماکروفاژها(cell/ml ۱۰۶) از هر ماهی روی یک لام شیشه ای تمیز قرار داده شد و سپس به مدت h ۱ در دمای °C ۱۸ در یک اطاقک مرطوب بمنظور چسبیدن سلول ها به لام شیشه ای قرار گرفت. سپس لام دو بار توسط محیط L– ۱۵ شسته شد تا سلول‌هایی که به لام شیشه ای چسبیده نشده جدا شدند. سپس به منظور تهیه سوسپانسیون سلولی مخمر رنگ آمیزی شده با رنگ قرمز کانگو،کلونی‌های مخمر بر روی آگار خونی به طریق استریل جمع‌آوری و وارد محلول نرمال سالین شد سپس به میزان ٪۱ محلول باکتریایی پودر رنگ قرمز کنگو به سوسپانسیون مخمر اضافه و خوب به هم زده شد. سپس به مدت ۲۰دقیقه در دمای °C ۱۲۰ در اتوکلاو استریل گردید. سپس ml ۱از سوسپانسیون سلولی مخمر (cell/ml ۱۰۸) رنگ آمیزی شده با رنگ قرمز کونگو را به لام شیشه ای اضافه شد و مجددا به مدت ۱ ساعت در اتوکلاو در دمای °C ۱۸ به‌منظور عمل فاگوسیتوز شدن مخمر توسط ماکروفاژها قرار گرفت. سپس لام دو بار توسط محیط L– ۱۵ شسته شد و در مجاورت هوا خشک شد و به‌مدتmin ۳ در متانول خالص (٪۹۶) فیکس و به‌مدت min۱۵ در محلول رنگی گیمسا (Sigma) قرار گرفت تا رنگ آمیزی شدند. سپس مجدداً شستشوی آن انجام شد و در ادامه اسلاید به‌دست آمده را در زیر میکروسکوپ (عدسی۱۰۰×) قرار گرفته و تعداد۲۰۰ سلول را شمارش شده تا ماکروفاژهایی که مخمرها را بلعیده‌اند مشخص شدند. سپس فعالیت فاگوسیتوزی طبق فرمول زیر محاسبه شد:

۱۰۰ × تعداد کل سلول ها / تعداد سلول های فاگوسیت کننده = PA(فعالیت فاگوسیتوزی)

تعداد ماکروفاژهای فاگوسیت کننده /تعداد مخمر های فاگوسیت شده = شاخص فاگوسیتوزی

۱۰-۲- انفجار تنفسی

تعیین فعالیت انفجار تنفسی به روشSecombes و Chung (۱۹۸۸) با کمی تغییر صورت گرفت. µL۱۰۰ از سوسپانسیون سلولی حاوی ماکروفاژ به هر خانه میکروپلیت (۹۶ خانه ته صاف) اضافه شد. سپس پلیت را به مدت h۲ در گرمخانه °C۲۰ در تاریکی قرار گرفت تا ماکروفاژها به کف خانه‌های پلیت چسبیدند. آنگاه محلول رویی دور ریخته شد و دوبار با محلول محیط L۱۵ـشستشو داده شد سپس ml۶۰ از محلول نیتروبلوتترازولیوم (Nitro blue tetrazolium) (Merck, Germany)٪۰/۱را همراه با µL۲۰ از آنزیم سوپراکسایددیسموتازو (Superoxide

dismutase) (Sigma, Aldrich,USA) ۲۰µL از محلول سوسپانسیون سلولی حاوی ماکروفاژ را به هر کدام از خانه پلیت‌های U شکل اضافه شد و آنگاه پلیت را به مدت min ۴۵ در گرمخانه ۱۸°C قرار گرفت و سپس محلول رویی ریخته شد و دوبار با نرمال سالین شستشو داده شد و µL ۵۰ متانول٪ ۷۰ به هر خانه اضافه شد تا روند انجام واکنش به طور کامل متوقف گردید. سپس ماکروفاژها فیکس شد و پس از گذشت min ۳۰ متانول را خالی و در هوای آزاد خشک شده، آنگاه به هر کدام از خانه‌ها µL ۱۲۰ از محلول هیدروکسید پتاسیم و µL ۱۴۰ از محلول دی متیل سولفوکساید ٪۵(Merck, Germany) اضافه شد و جذب نوری پلیت را توسط دستگاه قرائت الیزا در طول موج nm ۶۲۰ قرائت شد.

۱۱-۲- درصد تلفات بعد از چالش با باکتری زنده فتوباکتریوم دمسلا(*Photobacterium damsela*)

سویه فتوباکتریوم دمسلا (*Photobacterium damsela*) (Sk_7) از اداره دامپزشکی شهرستان چابهار که از بافت کلیه ماهیان مشکوک به فتوباکتریوزیز جداسازی شده تهیه گردید و باروش کشت میکروبی و تست‌های بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفتند (Austin and Austin,2007)/

به منظور بررسی مقاومت ماهی در برابر عفونت باکتریایی بعد از پایان دوره ماهیهای باقی مانده در هر تیمار با باکتری زنده فتوباکتریوم دمسلا (SK_7) به میزان $۷/۲\times۱۰^{۴}$سلول بر هر میلی لیتر (LD70) به مدت ۲ دقیقه غوطه ور شدند. به این منظور باکتری فتوباکتریوم دمسلا که در محیط آبگوشت مغز و قلب (brain heart infusion broth BHI)) کشت داده شده بود به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه گردید، باکتری در فاز رشد لگاریتمی به وسیله سانتریفوژ از محیط کشت باکتریایی جداسازی و با سرم فیزیولوژی استریل شستشو شده و در سرم فیزیولوژی به صورت سوسپانسیون شد. با استفاده از روش کشت غلظت های متوالی بر مبنای ده باکتری، و با توجه به یافته های قبلی در مورد غلظت ایجاد کننده تلفات بعد از ۹۶ ساعت،غلظت باکتری در سرم فیزیولوژی به میزان $۷/۲\times۱۰^{۴}$ سلول بر هر میلی لیتر تنظیم گردید. تعداد تلفات بعد از تزریق باکتری، به مدت یک هفته بصورت روزانه ثبت شده و تلفات تجمعی در انتهای یک هفته مشخص گردید (Bakopoulos et al.,1997).

۱۲-۲- آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده ها (میانگین± خطای معیار) با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و آزمون مقایسه چند دامنه ای دانکن، در سطح احتمال ٪۵ بین تیمارهای مختلف صورت گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS 16 در محیط ویندوز XP استفاده گردید.

۳- نتایج

۳-۱- شاخص های رشد

نتایج حاصل از تغییرات میانگین شاخص های رشد و تغذیه در جدول ۱ نشان داده شده است. افزودن ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم عصاره سرخارگل به جیره غذایی منجر به افزایش معنی دار وزن نهایی، میزان غذای دریافتی، نرخ رشد روزانه و میزان کارایی پروتئین در مقایسه با تیمار شاهد گردید (P<۰/۰۵) و بالاترین میزان شاخص های فوق الذکر در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره بر کیلوگرم غذا مشاهده شد در حالی‌که وزن نهایی، نرخ رشد روزانه و میزان غذای دریافتی تیمار حاوی ۵۰ میلی گرم عصاره سرخارگل بر کیلوگرم غذا تفاوت معنی داری را با تیمار شاهد نشان ندادند (P>۰/۰۵).

جدول ۱. مقایسه میانگین (میانگین± خطای معیار) شاخص های رشد و تغذیه در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش

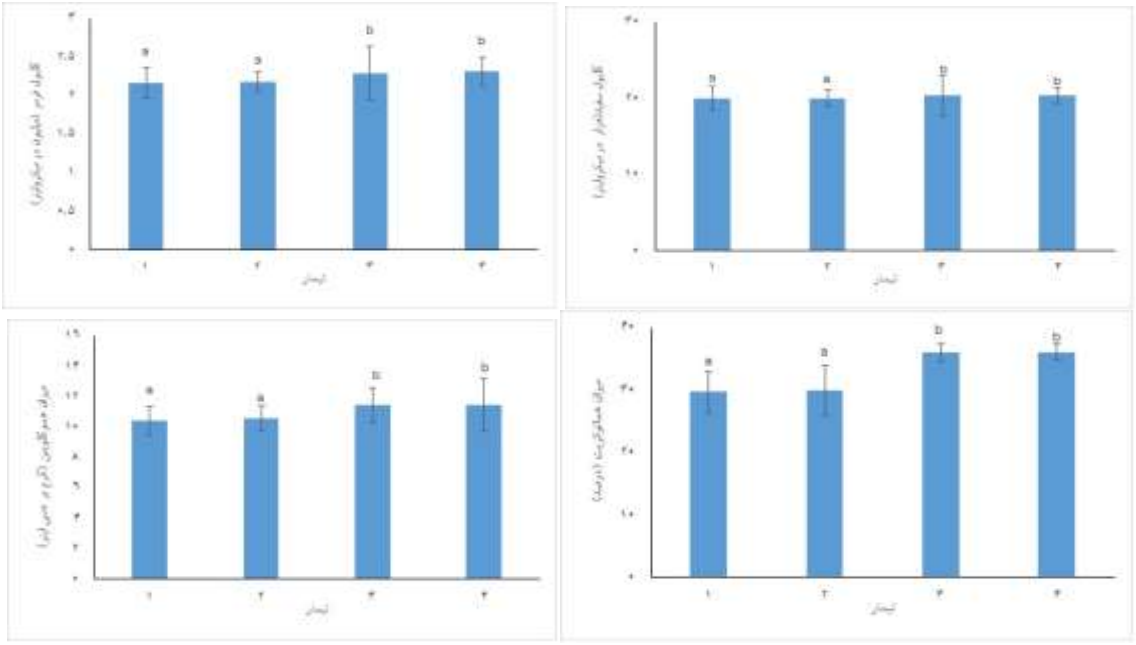
	تیمار			
	۱	۲	۳	٤
وزن اولیه (گرم)	۰/۷۵±۰/۰۶ a	۰/۷۵±۰/۰۳ a	۰/۷۴±۰/۰۳ a	۰/۶۸±۰/۰۲ a
وزن نهایی (گرم)	۱/۶۳ ±۰/۰۸ a	۱/۷۴ ±۰/۱۲ a	۴/۰۸ ±۰/۱۳ b	۴/۲۲ ±۰/۱۱ b
میزان غذای دریافتی (درصد وزن بدن /روز)	۲/۸۱ ±۰/۱۲ b	۲/۶۲ ±۰/۰۸ b	۱/۷۰ ±۰/۰۴ a	۱/۷۷ ±۰/۵۱ a
میزان رشد روزانه	۰/۸۰ ±۰/۰۵ a	۱/۰۷ ±۰/۳۷ a	۱/۵۴ ±۰/۵۱ b	۱/۷۲ ±۰/۵۰ b
ضریب تبدیل غذا	۱/۱۲ ±۰/۰ b	۱/۰۸ ±۰/۰۶ ab	۱/۰۷ ±۰/۰۵ ab	۰/۹۵ ±۰/۰۵ a
میزان کارایی پروتئین	۱/۶۹ ±۰/۰۷ a	۱/۸۴ ±۰/۰۹ b	۲/۹۴ ±۰/۸۸ c	۲/۹۱ ±۰/۷۸ c

وجود حروف غیرهمسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵). تیمار ۱ تا ۴ بترتیب حاوی ۰، ۵۰، ۱۰۰و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره سرخارگل می باشد.

۳-۲- شاخص های هماتولوژی

دامنه تغییرات گلبول های قرمز(RBC_S)، تغییرات گلبول های سفید (WBC_S)، میزان هموگلوبین (Hb) و درصد هماتوکریت (HCT) برای تیمارهای مختلف در نمودار ۱ آورده شده است. نتایج نشان داد که در انتهای دوره آزمایش، تعداد گلبول‌های قرمز (۲/۱۸±۰/۱۲ میلیون در میکرولیتر)، گلبول‌های سفید (۱/۱۰±۲۰ هزار در میکرولیتر)، درصد هماتوکریت (۳/۹۰±۲۹/۹۳ درصد) و غلظت هموگلوبین (۰/۸۴±۱۰/۵۹ گرم بر دسی لیتر) در تیمار حاوی ۵۰ میلی گرم عصاره سرخارگل بر کیلوگرم غذا اختلاف معنی داری با تیمار شاهد نداشتند (P>۰/۰۵). روند تغییرات گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید، درصد هماتوکریت و میزان هموگلوبین در تیمارهای آزمایشی منظم و تدریجی بود به گونه ای که بالاترین میزان پارامترهای فوق الذکر در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی گرم عصاره سرخارگل بر کیلوگرم غذا مشاهده شد. هر چند بین تیمار حاوی ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم

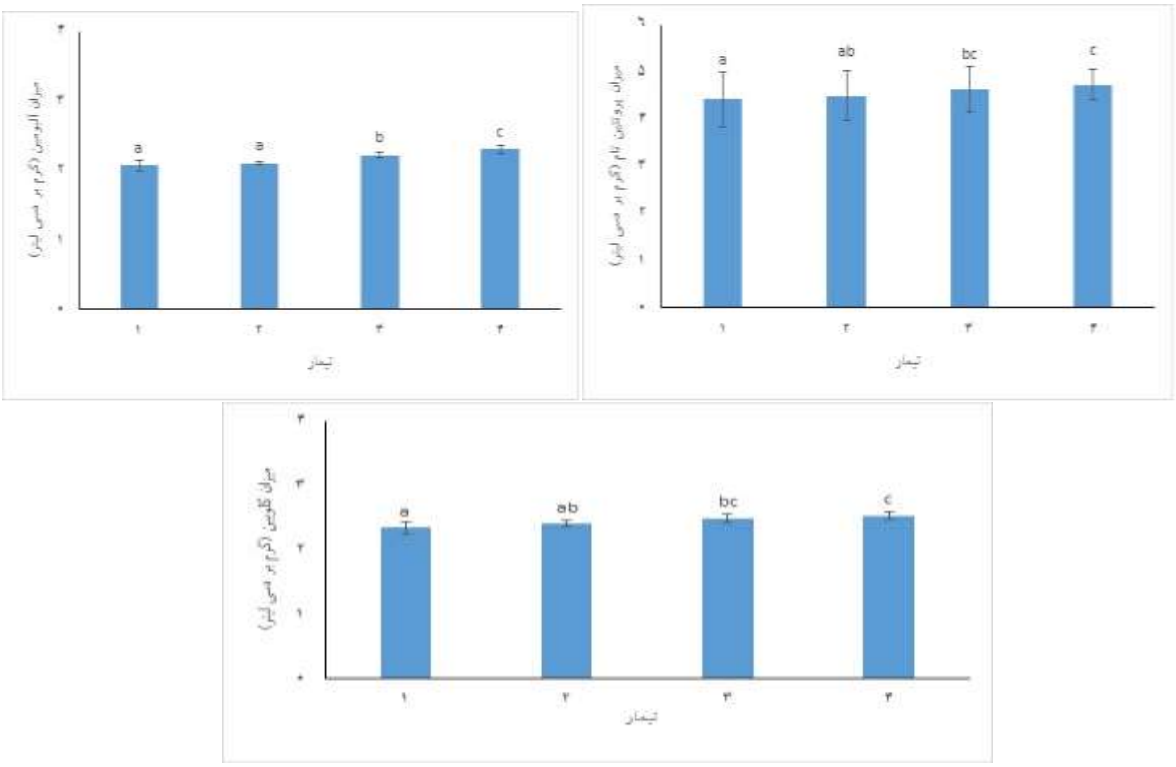
عصاره سرخارگل بر کیلوگرم غذا اختلاف معنی داری از نظر پارامترهای هماتولوژیک اندازه گیری شده وجود نداشت (P>۰/۰۵) اما این دو تیمار (۳ و ۴) تفاوت معنی داری را با تیمار شاهد نشان دادند (P<۰/۰۵).



نمودار۱. مقایسه میانگین گلبول قرمز، گلبول سفید، هماتوکریت و هموگلوبین در تیمارهای مختلف آزمایشی(n=۳). داده های نمودار بر اساس میانگین داده ها± خطای استاندارد می باشد. ستون‌های دارای حروف غیر مشابه با هم اختلاف معنی داری در سطح اطمینان ۹۵ درصد دارند. تیمار ۱ تا ٤ به‌ترتیب حاوی ۰،۵۰،۰ ۱۰۰و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره سرخارگل می باشد.

۳-۳- شاخص های بیوشیمیایی سرم خون

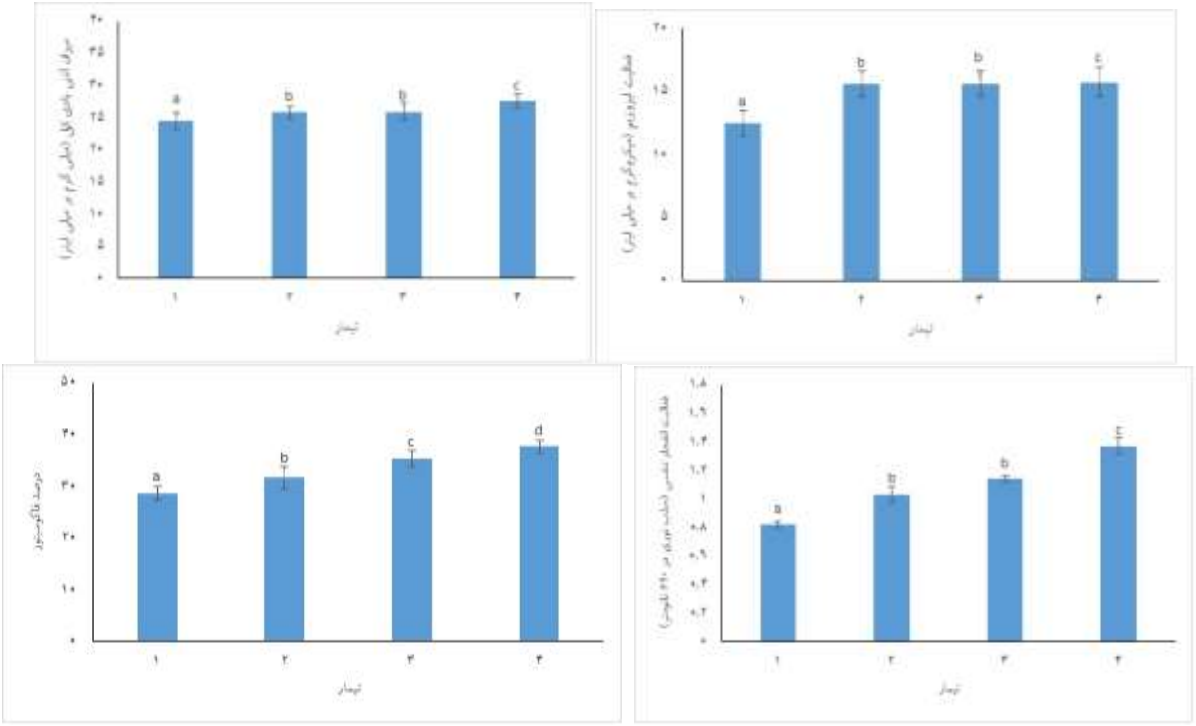
اثرعصاره سرخارگل بر پروتئین تام، آلبومین وگلوبین سرم خون ماهی کفال خاکستری در نمودار ۲ نشان داده شده است. میزان پروتئین تام ، آلبومین و گلوبین سرم خون در تیمارهای تغذیه شده با ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم عصاره سرخارگل افزایش معنی داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد(P<۰/۰۵) و بین میزان پروتئین تام تیمارهای تغذیه شده با ۵۰ . ۲۰۰ میلی گرم عصاره سرخارگل نیز تفاوت معنی داری مشاهده شد همچنین بالاترین میزان پروتئین تام، آلبومین و گلوبین در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی گرم عصاره سیر بر کیلوگرم غذا مشاهده شد (P<۰/۰۵). تفاوت معنی داری در میزان گلوبین تیمارهای تغذیه شده با عصاره سرخارگل با تیمار شاهد مشاهده نشد (P>۰/۰۵).



نمودار۲. مقایسه میانگین پروتئین تام، آلبومین وگلوبین در تیمارهای مختلف آزمایشی(n=۳). داده های نمودار بر اساس میانگین داده ها± خطای استاندارد می باشد. ستون‌های دارای حروف غیر مشابه با هم اختلاف معنی داری در سطح اطمینان ۹۵ درصد دارند. تیمار ۱ تا ٤ به‌ترتیب حاوی ۰،۵۰،۰ ۱۰۰و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره سرخارگل می باشد.

٤-۳- شاخص های ایمنی

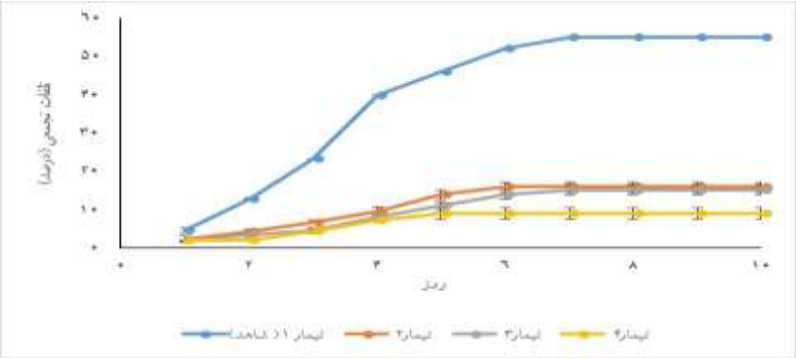
تغییرات میانگین فعالیت لیزوزیم، آنتی بادی کل، میزان فاگوسیتوز و انفجار تنفسی ماکروفاژها در نمودار ۳ نشان داده شده است. تیمارهای حاوی عصاره سرخارگل افزایش معنی داری را در شاخص های فوق الذکر در مقایسه با تیمار شاهد نشان دادند (P<۰/۰۵) . بالاترین میزان فعالیت لیزوزیم (۱/۱۳±۱۵/۷۳ میکروگرم بر میلی لیتر)، آنتی بادی کل (۱/۰۵±۲۷/۵۲ میلی گرم بر میلی لیتر)، میزان فاگوسیتوز (۱/۱۵±۳۷/۶۶ درصد) و انفجار تنفسی (۰/۰۶±۱/۳۷ جذب نوری در ۶۲۰ نانومتر) در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی گرم عصاره سرخارگل در هر کیلوگرم غذا مشاهده شد و میزان فعالیت لیزوزیم، آنتی بادی کل و انفجار تنفسی در بین تیمار حاوی ۵۰ میلی گرم عصاره سرخارگل بر کیلوگرم غذا با تیمار حاوی ۱۰۰ میلی گرم عصاره سرخارگل بر کیلوگرم غذا اختلاف معنی داری مشاهده نشد(P>۰/۰۵).



نمودار۳. مقایسه میانگین فعالیت لیزوزیم، آنتی بادی کل (IgM)، انفجار تنفسی و درصد فاگوسیتوزدر تیمارهای مختلف آزمایشی(n=۳). داده های نمودار بر اساس میانگین داده ها± خطای استاندارد می باشد. ستون‌های دارای حروف غیر مشابه با هم اختلاف معنی داری در سطح اطمینان ۹۵ درصد دارند. تیمار ۱ تا ٤ بترتیب حاوی ۰،۵۰،۰ ۱۰۰و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره سرخارگل می باشد.

۵-۳- درصد تلفات تجمعی بعد از چالش با باکتری فتوباکتریوم دمسلا

درصد تلفات تجمعی بعد از چالش با باکتری فتوباکتریوم دمسلا به مدت ۱۰ روز در تیمارهای مختلف آزمایشی در نمودار ۴ آورده شده است. تیمار حاوی ۲۰۰ میلی گرم عصاره سرخارگل بر کیلوگرم غذا کمترین تلفات را در مقایسه با تیمار های حاوی ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم عصاره بر کیلوگرم غذا و تیمار شاهد نشان داد. بالاترین درصد بقاء (۹۱ درصد) مربوط به بالاترین غلظت مصرفی عصاره سرخارگل بود در حالیکه بین تیمار ۲ و ۳ این تفاوت معنی داری را نبود (P>۰/۰۵). بیشترین تلفات تجمعی (۵۵ درصد) در تیمار شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵).



نمودار٤ :درصد تلفات تجمعی بعد از چالش با باکتری فتوباکتریوم دمسلا (LD_{50}) در مدت ۱۰ روز در تیمارهای مختلف آزمایشی(n=۳). داده های نمودار بر اساس میانگین داده ها± خطای استاندارد می باشد. تیمار ۱ تا ٤ به‌ترتیب حاوی ۰،۵۰،۰ ۱۰۰و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره سرخارگل می باشد.

٤- بحث

تغییرات شاخص های رشد در بین تیمارهای مختلف در این تحقیق، نشان داد که اضافه نمودن عصاره سرخارگل به جیره غذایی، منجر به افزایش معنی داری در مقادیر وزن نهایی(FW)، میزان غذای دریافتی (VFI)، ضریب تبدیل غذایی، میزان کارایی پروتئین و نرخ رشد روزانه (DGR) در مقایسه با تیمار شاهد شد ($p<۰/۰۵$). این روند افزایش منظم و تدریجی بود. به نظر می رسد وجود عصاره سرخارگل در جیره های غذایی باعث شده تا در فرآیند متابولیسم، پروتئین مسیر اصلی خود یعنی مسیر سنتز بافت زا طی نموده و به شکل پروتئین ذخیره گردد (Ebrahimi Dorche et al., 2013; Shalaby et al., 2006). در نتیجه از نظر عددی بهترین راندمان پروتئین (PER) در تیمار های حاوی عصاره سرخارگل در این تحقیق مشاهده شد تیمار حاوی ۱۰۰و ۲۰۰ میلی گرم عصاره سرخارگل بر کیلوگرم غذا منجر به ایجاد بهترین عملکرد رشد در کفال ماهیان خاکستری به مدت ۶۰ روز در این تحقیق شده است. Salah و همکاران (۲۰۰۸) گزارش نمودند که استفاده از عصاره سرخارگل در جیره غذایی منجر به افزایش وزن نهایی و ضریب رشد ویژه در ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) شد که با نتایج بدست آمده از این تحقیق همخوانی دارد می توان گفت که گیاه سرخارگل با تاثیر بر عملکرد آنزیمهای گوارشی و خوش طعم نمودن غذا منجر به افزایش مصرف غذا و در نهایت بهبود ضریب تبدیل غذایی و رشد ماهی کفال خاکستری می گردد(Adams, 2005)

نتایج حاصل از Maass و همکاران (۲۰۰۵) بر روی استفاده از مکمل گیاه سرخارگل در جیره غذایی فرشته ماهی (*Pterophyllum scalare*) (Kasiri et al.,2011)، کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) (علیشاهی و همکاران،۱۳۸۸) ماهی برزم (*Barbus barbulus*) (علیشاهی و همکاران، ۱۳۹۱a) نتایج بدست آمده از این تحقیق را تایید می نماید. همچنین Medina- Beltran و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که استفاده از ۲ و ۴ گرم بر کیلوگرم پودر سرخارگل در جیره غذایی میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) منجر به افزایش معنی‌دار رشد در مقایسه با گروه شاهد گردید.

وظیفه اصلی سلول‌های قرمز خون یا اریتروسیت ها حمل و انتقال گاز اکسیژن در سراسر بدن است. چون جذب و آزاد شدن اکسیژن یعنی تبادلات آن در این سطح صورت می‌گیرد از این نظر این رقم واجد اهمیت است. زیرا تبادل اکسیژن عمل اصلی فیزیولوژیک گلبولهای قرمز است و تعداد گلبولهای قرمز در یک گونه ماهی به وضع بهداشت و سلامت ماهی بستگی دارد (Harikrishnan et al.,2003). لذا به نظر می رسد که می توان از این فاکتور بعنوان یک شاخص جهت تایید وضعیت بهداشت و سلامت ماهیان در تیمارهای مختلف تا پایان دوره آزمایش استفاده نمود. در این تحقیق، افزودن عصاره سرخارگل باعث افزایش تدریجی و منظم تعداد گلبول های قرمز، تعداد گلبول های سفید، درصد هماتوکریت و میزان هموگلوبین در تیمارهای مختلف آزمایش شد ولی افزایش این پارامترها در تیمار حاوی ۵۰ میلی گرم عصاره سرخارگل بر کیلوگرم غذا در مقایسه با تیمار شاهد اختلاف معنی داری را نشان ندادند ($P>۰/۰۵$). همچنین در زمینه پارامترهای فوق الذکر، بین تیمارهای حاوی ۱۰۰ و

۲۰۰ میلی گرم عصاره سرخارگل بر کیلوگرم غذا این اختلاف معنی دار نبود در حالیکه این دو تیمار تفاوت معنی داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان دادند (P>۰/۰۵). با نتایج بدست آمده از این تحقیق، می توان بیان نمود که استفاده از عصاره سرخارگل در غلظت های بالا (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم غذا) می تواند بر روی کارایی فعالیت هماتوپوئیتیک (خون سازی) بچه ماهی کفال خاکستری موثر باشد. Salah و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که اضافه نمودن گیاه سرخارگل به جیره غذایی منجر به افزایش تعداد لکوسیت ها و درصد هماتوکریت خون ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) گردید این موضوع نشاندهنده تاثیر داشتن گیاه سرخارگل در وضعیت سلامت وایمنی ماهی می باشد (Salah et al.,2008). پورغلام و همکاران در سال ۱۳۹۲ نشان دادند که در انتهای ماه دوم پرورش، بیشترین تعداد گلبول های سفید در ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با غلظت ۱ و ۱/۵ گرم عصاره سرخارگل بر کیلوگرم جیره غذایی مشاهده شد که در مقایسه با گروه کنترل نیز اختلاف معنی دار بود که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. Oskoii و همکاران (۲۰۱۲) نیز اثرات مثبت عصاره سرخارگل بر روی شاخص های خونی از جمله افزایش گلبول های سفید در قزل آلای رنگین کمان را مشاهده کردند. می توان گفت که گلبول های سفید (لوکوسیت ها) بعنوان سد اولیه دفاعی بدن می باشد که با افزایش عفونت باکتریایی تعداد آنها افزایش می یابد. تحقیقات متعدد نیز نشان دادند که گیاهان دارویی بعنوان محرک ایمنی عمل نموده و منجر به افزایش تعداد گلبول سفید خون می گردند (Jian and Wu.2003).

پروتئین سرم خون سیستم بیوشیمیایی نسبتا حساسی است که تابع وضعیت سلامت و تغییرات ناشی از عوامل خارجی و داخلی می باشد. Shalaby و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش نمودند که عواملی نظیر جنس، تخم ریزی، مواد غذایی، فشار اسمزی، درجه حرارت، نور، سن و کاهش اکسیژن می تواند بر میزان پروتئین کل سرم تاثیر گذار باشد (Shalaby et al.,2006). نتایج حاصل از این تحقیق، نشان داد که میزان پروتئین تام سرم در تیمارهای تغذیه شده با ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم عصاره سرخارگل در هر کیلوگرم غذا افزایش معنی داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد و بالاترین میزان پروتئین تام در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی گرم عصاره سرخارگل در هر کیلوگرم غذا مشاهده شد. نجف پور مقدم و همکاران (۱۳۹۲) گزارش نمودند که میزان پروتئین کل و آلبومین سرم ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) تحت تاثیر تجویز خوراکی عصاره سرخارگل (۲ گرم بر کیلوگرم غذا) قرار گرفتند و افزایش معنی داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان دادند که با نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی دارد. می توان گفت که سنجش سطح پروتئین های سرم خون شاخص مناسبی برای وضعیت ایمنی شناسی ماهی می باشد(Siwiki et al.,1994) پروتئین عموما تحت تاثیر حجم پلاسما (Yousefian et al.,2010)، ذخیره پروتئینی بافت ها بویژه بافت کبد (Banaee et al.,2011) و میزان آلبومین و گلوبین تغییر می کند (Akrami et al.,2015) همچنین میزان آلبومین و گلوبین موجود در سرم با میزان پروتئین تام در سرم خون وابسته می باشد (Hussein,1996; Akrami et al.,2015) آلبومین در کبد جانوران سنتز می گردد و اهمیت زیادی در حفظ فشار

اسمزی، حفظ ذخیره نیتروژنی برای رشد و ترمیم بافت ها و نیز به عنوان پروتئین حامل مواد مختلف اعم از لیپیدها، هورمون ها، مواد معدنی و ویتامین ها است و نقش مهمی را در حمل و نقل ترکیباتی مثل داروها در خون دارد و می تواند باعث حمل و نقل ترکیبات دارویی عصاره در خون شود (Jha et al.,2007).در یافته های حاصل از این تحقیق، میزان آلبومین و گلوبین سرم خون در تیمارهای تغذیه شده با ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم عصاره سرخارگل افزایش معنی داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد($P<۰/۰۵$). در مطالعاتی که توسط Okoii و همکاران (۲۰۱۲) بر روی گیاه سرخارگل انجام گردید مشاهده شد که افزودن عصاره گیاه سرخارگل به جیره قزل آلای رنگین کمان سبب افزایش معنی داری در میزان پروتئین تام، آلبومین و گلوبین در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی گیاه سرخارگل در مقایسه با گروه کنترل شده است که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد.. ، در سال ۲۰۱۱ Sadigh -Eteghad گزارش کردند که استفاده از ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گیاه سرخارگل در جیره غذایی موش منجر به افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های سفید، درصد هماتوکریت، فعالیت فاگوسیتوز، پروتئین تام و گلوبین در مقایسه یا گروه شاهد شد. این امر نشان داد که آنتی‌بادی اکثرا در بخش گاما گلوبین پروتئین سرم واقع شده است. بنابر این افزایش این بخش منجر به عملکرد بیشتر سیستم ایمنی می گردد.

.لیزوزیم یکی از اجزای سیستم دفاع غیر اختصاصی بدن است که بر دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت تاثیر گذاشته و پیوند ۴-۱ گلیکوزیدی بین پپتید وگلیکان را از بین می برد(Hanief et al 2004). نتایج تغییرات آنزیم لیزوزیم در تیمارهای تغذیه شده با جیره غذایی حاوی عصاره سرخارگل نشان داد که در انتهای آزمایش (پس از دو ماه)، میزان فعالیت لیزوزیم افزایش معنی داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان می‌دهد و با افزایش غلظت عصاره در جیره غذایی ماهیان، فعالیت لیزوزیم نیز افزایش یافته ولی بین تیمار حاوی ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم عصاره این اختلاف معنی دار نبود که با نتایج بدست آمده از تحقیق پورغلام و همکاران (۱۳۹۲) بر روی ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) همخوانی دارد. آنها گزارش کردند که استفاده از ۱/۵ گرم عصاره بر کیلوگرم غذا منجر به افزایش معنی دار فعالیت لیزوزیم گردید.مطالعات انجام شده توسط محققین نشان داد که بدنبال استفاده عصاره گیاهی در جیره غذایی ماهی میزان فعالیت لیزوزیم افزایش یافته که این افزایش در برخی از مواقع نیز معنی دار نبوده است که بسته به گونه ماهی، غلظت عصاره گیاهی و نوع عصاره مورد استفاده متفاوت بوده است (Yin et al.,2009).

گیاه سرخارگل ایمنی هومورال را تقویت و با تحریک ماکروفاژها ، افزایش تولید سیتوکین ها و نیز افزایش تکثیر لنفوسیت های T ایمنی سلولها را تقویت می کند (Stimpel et al.,1984; پورغلام و همکاران،۱۳۹۲). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که میزان آنتی بادی کل (IgM) در تیمارهای تغذیه شده با جیره غذایی حاوی عصاره سرخارگل IgM افزایش معنی داری را در مقایسه با تیمار شاهد دارد و با افزایش غلظت عصاره در جیره غذایی ماهیان، میزان آن نیز افزایش یافت ولی بین تیمار حاوی ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم عصاره این اختلاف معنی دار نبود نجف پور مقدم و همکاران در سال ۱۳۹۲ نشان دادند که میزان ایمنوگلوبین M ماهیان استرلیاد

(*Acipencer ruthenus*) در مقایسه با کنترل افزایش معنی داری را نشان داد که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. می توان گفت تاثیر گذاری گیاه سرخارگل عمدتا مربوط به واکنش سیستم ایمنی غیر اختصاصی سلولی است و تحت تاثیر ترکیبات پلی ساکاریدها، گلیکوپروتئین ها، مشتقات کافئیک و آلکائیدهای موجود در گیاه می باشد (Aly et al.,2009).

فرآیند فاگوسیتوز و فعالیت کشندگی توسط سلولهای فاگوسیت کننده ، یکی از مهمترین سازو کار های دفاعی در برابر باکتریهای بیماریزا می باشد. فاگوسیت های ماهی قادر به تولید سوپراکسید (O_2^-) در طی فرآیندی تحت عنوان انفجار تنفسی می باشند. رادیکال آزاد اکسیژن یکی از فاکتورهای اختصاصی در انفجار تنفسی بوده که توسط برخی از سلول‌های فاگوسیتوزی مثل نوتروفیل ها و ماکروفاژها تولید می شود .(Secombes and Fletcher. 1992) نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تیمارهای حاوی عصاره سرخارگل افزایش معنی داری را در درصد فاگوسیتوزی و میزان انفجار تنفسی در مقایسه با تیمار شاهد نشان دادند (P<۰/۰۵). بالاترین میزان فاگوسیتوز (۱/۱۵±۳۷/۶۶ درصد) و انفجار تنفسی (۰/۰۶±۱/۳۷ جذب نوری در ۶۲۰ نانومتر) در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی گرم عصاره سرخارگل در هر کیلوگرم غذا مشاهده شد و در میزان انفجار تنفسی تیمار حاوی ۵۰ میلی گرم عصاره سرخارگل بر کیلوگرم غذا و تیمار حاوی ۱۰۰ میلی گرم عصاره سرخارگل بر کیلوگرم غذا اختلاف معنی داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). نتایج حاضر با مطالعات Peddie و Secombes (۲۰۰۳) و پورغلام و همکاران (۱۳۹۲) بر اثر عصاره سرخارگل (*Echinacea anguistifola*) و *Echinacea purpurea* بر روی ماهی قزل آلای رنگین کمان همخوانی دارد.می توان گفت که ترکیبات موجود در گیاه سرخارگل بویژه آلکائیدهای لپتوفیلیک باعث افزایش فعالیت ماکروفاژها می شود (Dahui et al.,2011). در سال ۲۰۱۱ Sadigh -Eteghad گزارش کردند که استفاده از ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گیاه سرخارگل در جیره غذایی موش منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت فاگوسیتوز در مقایسه یا گروه شاهد شد. تعدادی مطالعات نشان دادند که استفاده خوراکی گیاه سرخارگل منجر به افزایش فعالیت فاگوسیتوز نشد که به‌نظر می‌رسد این امر مرتبط با بخشهای مختلف گیاه است که از نظر ترکیبات شیمیایی مختلف است (Cundell *et al.*, 2003). در سال ۲۰۰۹ Bohmer و همکاران نیز نشان دادند که تزریق عصاره اتانولی گیاه سرخارگل در موش منجر به افزایش فعالیت فاگوسیتوز و انفجار تنفسی هم در نوتروفیل و هم در ماکروفاژها گردید که با نتایج حاضر همخوانی داشت.

فتوباکتریوزیز ایجاد شده از سویه باکتری فتو باکتریوم دمسلا یکی از مشکلات اصلی صنعت پرورش آبزیان دریایی است که منجر به تلفات بالا می شود. این سویه باکتری غالبا از ماهی باس دریایی (*Morone saxatilis*) و دم زرد ژاپنی (*Seriola quinqueradiata*)جدا می شود. این باکتری به شکل کوکوباسیل های گرم منفی، میله ای، فاقد اسپور، اکسیداز منفی و کاتلاز مثبت است و به عنوان یک عامل بیماریزا برای بسیاری از گونه های ماهیان دریایی از جمله خانواده کفال ماهیان است (Bakopoulos et al., 1997).تاکنون مطالعه ای در زمینه اثر مکمل عصاره سرخارگل بر روی باکتری فتوباکتریوم دمسلا در ماهی صورت نگرفته است. اما اثبات شده است که

استفاده از عصاره های گیاهی منجر به کاهش مرگ و میر ماهی ها در برابر عوامل بیماریزا می گردد (Nya and Autin,2011). نتایج آزمایشات آلوده شدن ماهی در برابر فتوباکتریوم دمسلا نشان داد که میزان درصد تلفات تجمعی ماهیان در تیمارهای دریافت کننده عصاره سرخارگل نسبت به تیمار کنترل به مراتب کمتر بوده و غلظت ۲۰۰ میلی گرم عصاره بر کیلوگرم غذا نتیجه بهتری را به‌همراه داشته است. به نظر می رسد که استفاده از عصاره سرخارگل باعث تقویت سیستم ایمنی ماهی شده و مقاومت آن را در برابر فتوباکتریوزیس افزایش می دهد که با نتایج بدست آمده از تحقیق پورغلام و همکاران در سال ۱۳۹۲ بر روی ماهی قزل آلای رنگین کمان مطابقت دارد. پورغلام و همکاران (۱۳۹۲) گزارش کردند که استفاده از غلظت ۱ و ۱/۵ گرم بر کیلوگرم عصاره سرخارگل منجر به تقویت سیستم ایمنی و مقاومت ماهی در برابر بیماری استرپتوکوکوزیس شد. Chaves و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که گونه های مختلف *E. purpurea, E. pallida, E. angustifelia* گیاه سرخارگل باعث مهار ویروس های آنفلوآنزا و هرپس شده و عمدتا تاثیر آن مربوط به متابولیت هایی نظیر آلکائیدها و مشتقات اسید کافئیک می باشد. همچنین See و همکاران در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که استفاده از عصاره گیاه سرخارگل منجر به تحریک عملکرد نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها در موش بر علیه عفونت‌های سیستماتیک *Listeria monocytogenes* و *Candida albicans* ' گردید.

۵- نتیجه گیری کلی

در کل نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اضافه نمودن ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم عصاره سیر به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی منجر به افزایش معنی دار وزن نهایی، میزان غذای دریافتی، نرخ رشد روزانه و کارایی پروتئین کفال ماهی خاکستری در مقایسه با تیمارشاهد گردید افزایش عصاره سرخارگل به جیره غذایی از ۵۰ تا ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، سبب افزایش معنی دار در تعداد اریتروسیت ها نسبت به تیمار شاهد گردید. تعداد گلبول های سفید از تیمار شاهد تا تیمار حاوی ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره سرخارگل بطور منظم و تدریجی افزایش یافته است. بالاترین میزان هموگلوبین در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره سرخارگل اندازه گیری شد. کمترین میزان هماتوکریت در تیمار شاهد و بالاترین میزان آن در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره سرخارگل اندازه گیری شد. میزان پروتئین تام، آلبومین و گلوبین سرم خون در تیمارهای تغذیه شده با عصاره سرخارگل افزایش معنی داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد($P<۰/۰۵$). همچنین بالاترین میزان پروتئین تام، آلبومین و گلوبین در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی گرم عصاره سرخارگل بر کیلوگرم غذا مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). بالاترین میزان فعالیت لیزوزیم (۱/۱۳±۱۵/۷۳ میکروگرم بر میلی لیتر)، آنتی بادی کل (۱/۰۵±۲۷/۵۲ میلی گرم بر میلی لیتر)، میزان فاگوسیتوز (۱/۱۵±۳۷/۶۶ درصد) و انفجار تنفسی (۰/۰۶±۱/۳۷ جذب نوری در ۶۲۰ نانومتر) در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی گرم عصاره سرخارگل در هر کیلوگرم غذا مشاهده شد و بین تیمار حاوی ۵۰ میلی گرم عصاره سرخارگل بر کیلوگرم غذا با تیمار حاوی ۱۰۰ میلی گرم عصاره سرخارگل بر کیلوگرم غذا (به استثنای درصد فاگوسیتوز) اختلاف معنی داری مشاهده نشد($P>۰/۰۵$). تیمار حاوی ۲۰۰ میلی گرم عصاره بر کیلوگرم غذا کمترین تلفات را بعد از چالش با باکتری فتوباکتریوم دمسلا در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد. با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق می توان گفت که استفاده از ۲۰۰ میلی گرم عصاره سرخارگل بر کیلوگرم جیره غذایی ماهی کفال خاکستری منجر به افزایش رشد، عملکرد تغذیه ، ایمنی و مقاومت در برابر بیماری فتوباکتریوزیس شده و در صنعت آبزی پروری توصیه می گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری مسئولین کارگاه تکثیر و پرورش مرکز تحقیقات شیلات آبهای دور شهرستان چابهار بدلیل در اختیار قرار دادن امکانات و فضای مناسب انجام کار و مسئولین بخش آزمایشگاه ایمنی پژوهشکده غدد متابولیسم و درون ریز دانشگاه شهید بهشتی تهران به منظور انجام آزمایشات ایمنی، مسئول آزمایشگاه تخصصی طبی و بالینی صدف واقع در شهرستان چابهار و مسئول آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی بخش آبزیان به منظور فراهم نمودن امکانات آزمایشات بیوشیمیایی خون و هماتولوژی تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

۱. ابراهیمی،ع .01385 .تغذیه و نیازهای غذایی ماهیان در آبزی پروری، انتشارات جهاد دانشگاهی واحد صنعتی اصفهان، 304 صفحه.

۲. پورغلام، ر.، شریف روحانی،م.، صفری،ر.و سعیدی، غ.۱۳۹۲.۱. اثر عصاره سرخارگل(*Echinacea purpurea*) بر برخی شاخص های ایمنی و بازماندگی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در برابر با استرپتوک اینیایی (*Streptococcus iniae*) مجله علمی شیلات ایران. شماره ۳ صفحه ۱۰-۱.

۳. رضایی، م ه. سوری نژاد، ا. سلطانیان،س. یوسف زادی،م. ۱۳۹۲ تأثیر عصاره گیاه مورخوش *Zhumeria majdae* در جیره غذایی بر شاخص های رشد،خون شناسی و ایمنی شناسی گربه ماهی .*hypophthalmus Pangasianodon* مجله بوم شناسی دوره ۱ شماره ۳. صفحه ۱۹-۸.

۴. عبدی، ا و علیشاهی، م. ۱۳۹۲. بررسی اثر ماده محرک ایمنی ایمونوفن (اسانس گیاه سرخارگل) بر اندیس رشد و ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان انگشت قد . دومین همایش ملی توسعه و پرورش ماهیان سردابی. صفحه ۵۶۸-۵۶۴.

۵. علیشاهی،ع.، مصباح، م.، نامجویان، ف.، سبزواری زاده، م و راضی جلالی، م.۱۳۹۱. مقایسه اثر برخی محرک های شیمیایی و گیاهی در ماهی اسکار(*Astronotus ocellatus*). مجله دامپزشکی ایران دوره هشتم، شماره ۲، صفحه ۶۸-۵۸ .

۶. علیشاهی، م.، مصباح، م.، نجف زاده، ح. و خواجه، غ.ح.۱۳۸۸. اثر اکیناسه پورپورآ(*Echinacea purpurea*) بر پاسخ ایمنی ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*). طرح تحقیقاتی دانشگاه شهید چمران اهواز. شماره طرح ۶۱۹.

۷. علیشاهی، م.، پورمهدی بروجنی، م. و عبدی، ا. ۱۳۹۱a. مقایسه اثر برخی محرک های ایمنی و عصاره های گیاهی بر فاکتورهای رشدو مقاومت ماهی برزم در برابر استرس های محیطی . مجله دامپزشکی ایران. دوره هشتم، شماره ۴. صفحه ۶۷-۵۹.

۸. نجف پور مقدم،.س.م.، سلاطی، ا.پ.، کیوان شکوه، س.، یاوری، و. و پاشا زانوسی، ح. تاثیر عصاره خوراکی گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea*) بر برخی فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی ماهی استرلیاد (*Acipencer ruthenus*). هشتمین گردهمایی دامپزشکان علوم بالینی ایران ۱-۳ آبان ماه ۱۳۹۲. شیراز. صفحه ۱-۱۲.

9. Adams, C.A. 2005. Nutrition-based health. Feed International, 2, 25-28.
10. Akrami, R., Gharaei,A., Razeghi Mansour, M.and Galeshi,A.2015. Effects of dietary onion (*Allium cepa*) powder on growth, innate immune response and hematoebiochemical parameters of beluga (*Huso huso* Linnaeus, 1754) juvenile. Fish & Shellfish Immunology 45 2015. 828-834.
11. Alishahi, A., Mirvaghefi, A., Tehrani, M.R,. Farahmand, H., Koshio, S., Dorkoosh, F.A. and Elsabee, M.Z. 2011. Chitosan nanoparticle to carry vitamin C through the gastrointestinal tract and induce the non-specific immunity system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Carbohydrate Polymers. 86: 142– 146.

12. Aly, S.M., John, G., El-Naggar, G. & 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 Journal of Aquatic Biological Fish*, 113, 435-445.

13. Austin, B and Austin, D.A., 2007. Bacterial fish pathogens. Diseases of farmed and wild fish .Springer, pp.552.
14. Bakopoulos V, Peric Z, Rodger H, Adams A, Richards RH.1997. First report of fish Pasteurellosis from Malta. J Aquat Anim Health.9:26-33.
15. .Banaee, M., Mirvagefei, A. R. Rafei, G. R. and Sureda Gomila, A. 2011. Effects of oral administration of silymarin on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Fisheries, Iranian Journal of Natural Research , 63 (4): 271-286.
16. Basu, N., Nakano, T., Grau, E.G. and Iwama, G.L. 2001 .The effect of cortisol on heat stock protein 70 levels in two fish species. General and Comparative Endocrinology. 124: 97-105.
17. Bauer, R. and Wagner, H., 1991. Echinacea species as potential immunostimulatory drugs. In : H. Wagner, N.R. Farnsworth, Eds. Economic and Medicinal Plant Research. Vol 5, London Academic Press Limited, pp. 253–321.
18. Bohmer, B.M., Salisch, H., Paulicks, B.R., Roth, F.X., 2009.*Echinacea purpurea* as a potential immunostimulatory feed additive in laying hens and fattening pigs by intermittent application. Livestock Science 122, 81–85.
19. Burger R.A., Torres A.R., Warren R.P ,.Caldwell W.D. and Hughes B.G. 1997. Echinacea-induced cytokine production by human macrophage. International immunopharmacology,19: 371-379.
20. Burtis, C.A., Ashwood, E. R. 1994. Tietz Textbook of Clinical Chemistry (2thed.).W.B.Sunders Company. Philadelphia. USA.
21. Chaves, F., Chacon, M., Badilla, B. and Arevalo ,C. 2007. Effect of *Echinaceae purpurea* (Astraceae) aqueous extract on antibody response to *Bothrops aspervenom* and immune cell response, Revista de Biologia Tropical, 55(1): 113-119.
22. Chen X., Wu, Z. and Yin, J. 2003. Effects of four species of herbs on immune function of *Carassius* auratus gibelio. Journal of Fish Sciences of China 10, 36-40.
23. Cundell, D.R., Matrone, M.A., Ratajczak, P., Pierce, J.D., 2003. The effect of aerial parts of Echinaceaon the circulating white cell levels and selected immune functions of the aging male Sprague–Dawley rat. Regulatory Toxicology and Pharmacology 46, 163–166.
24. Dahui, L., Wang Zaigui, W. and Yunhua, Z .2011 . Antifungal activity of extracts by supercritical carbon dioxide extraction from roots of *Echinacea angustifolia* and analysis of their constituents using gas chromatographymass spectrometry (GC-MS). Journal of Medicinal Plants Research. 5(23), pp. 5605-5610.
25. Dügenci, S.K., Arda, N. and Candan A.2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. J. Ethnopharmacol. 88:99-106.
26. Ellis AE: Lysozyme Assays:In Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson BS,Van Muiswinkel WB, editors.Techniques in :Fish Immunology. Fair Haven, NJ: SOS Publications; 1990: 101-103.
27. Feldman, B. F., Zinkl, J. G. and Jain, N.C. 2000 . Schalm's Veterinary Hematology. 5 th ed. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 1120-1124
28. Fleming T. PDR for Herbal Medicines, 4th Edition,Thomson, Medical Economics Company Inc , 1998. 11: 2-9.
29. Gabor, E.F., Şara, A., Barbu A. (2010): The effects of some Phyto-additives on growth, health and meat quality on different species of fish. Scientific Papers: Animal Sciences and Biotechnologies 43(1): 61-65.
30. Galina J., Yin G., Ardo L., Jeney Z., 2009. The use of immunostimulating herbs in fish. An overview. Journal of Fish Physiology and Biochemistry. 35(4):669-676.
31. Hanif A., Bakopoulos V. and Dimitriadis GJ: Maternal transfer of humoral specific and non- specific immune parameters to sea bream (*Sparus auratus*) larvae. Journal of Fish and Shellfish Immunology. 2004: 17: 411-435.
32. Harikrishnan R., Balasundaram C. and Heo MS: Lactobacillus sakei BK19 enriched diet enhances the immunity status and disease resistance to streptococcosis infection in kelp grouper,*Epinephelus bruneus*. Fish and Shellfish Immonology. 2010: 29: 1037-1043.
33. Hussein, S. A. 1996. Electrophoretic pattern of serum protein and immunoglobulin level in chickens in relation of age. Benha. Vet. Med. J., 7: 95-107.
34. Hudaiba M., Fiori, J., Grazia Bellardi, M., Rubies-Autonell, C. and Cavrini, V.2002. GC– MS analysis of the lipophilic principles of *Echinacea purpurea* and evaluation of cucumber mosaic cucumovirus (CMV) infection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.29: 1053-1060.

35. Jian, J. and Wu Z. 2004. Influences of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity of Jian carp (*Cyprinus carpiovar*. Jian) Fish and Shellfish Immunology. 16, 185–191.
36. Kasiri, M., Farahi, A., Sudagar, M.2011. Effects of supplemented diets by levamisole and *Echinacea purpurea* extract on growth and reproductive parameters in angelfish (*Pterophyllum scalare*). AACL Bioflux 4(1): 46-51.
37. Kim DH and Austin B. 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*,Walbaum 1792) induced by probiotics. Fish and Shellfish Immunol. 21: 513-24.
38. Kumar, S., Sahu, N. P., Pal, A. K., Choudhury, D., Yengkokpam, S. and Mukherjee, S. C. 2005. Effect of dietary carbohydrate on haematology, respiratory burst activity and histological changes in *Labeo rohita* juveniles. Journal of Fish and Shellfish Immunology. 19: 331-344.
39. Lim, C., Klesius, P.H., Li, M.H., Robinson, E.H., 2000. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, haematoloy, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. Aquaculture 185 313-327.
40. Maass, N., J. Bauer, B. R. Paulicks, B.M. BÖhmer and D. A. Roth-Maier. 2005 . Efficiency of *Echinacea purpurea* on growth performance and immune status in pig, Journal of animal physiology and nutrition, 89: 244-252.
41. Medina-Beltrán, V., Luna-González, A., Fierro-Coronado, J.A., Campa-Córdova , A.I., Peraza-Gómez, V., Carmen Flores-Miranda, M.and Gutiérrez Rivera, J.N. 2012. *Echinacea purpurea* and *Uncaria tomentosa* reduce the prevalence of WSSV in with leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. Aquaculture 358–359 (2012) 164–169
42. Misra, C.K., Kuamr, D.B., Mukherjee, S.C., Pattnaik, P., 2006. Effect of long term administration of dietary â-glucan on immunity, growth and survival of Labeo rohito fingerlings. Aquaculture 255, 82-94
42. Oskoii, S.B., Kohyani, A.T., Parseh, A., Salati ,A.P. and Sadeghi, E., 2012. Effects of dietary administration of *Echinacea purpurea* on growth indices and biochemical and hematological indices in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss)* fingerlings. Fish Physiology and Biochemistry. 38(4):1029-34
43. Peddie, S. and Secombes, C.J. 2003. The Immuno stimulatory effects of Chevimmun in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Bullitin of European Association Fish Pathology, 23: 48 – 51.
44. Percival, S.S., 2000. Commentary, use of Echinacea in medicine. Biochemical Pharmacology 60, 155–158
45. Rehulka, J. 2000. Influence of astaxanthin on growth rate, condition, and some blood indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Aquaculture. 190: 27-47
46. Roesler J., Steinmi.iller C., Kiderlin A , Emmendorffer A., Wagner H. and Lohmann Matthes M.L. 1991. Application of purified polysaccharides from cell cultures of the plant *Echinacea purpurea* to mice mediates protection against systemic infections with *Listeria monocytogenes* and Candida albicans. International journal of immunopharmacology, 13: 27-37.
47. Sadigh-Eteghad, S., khayat-Nuri, H., Abadi,N., Ghavami, S., Golabi, M. and Shanebandi, D. 2011. Synergetic effects of oral administration of levamisole and *Echinacea purpurea* on immune response in Wistar rat . Research in Veterinary Science 91: 82–85.
48. Sahoo, P.K., Mohanty, J. and Mukherjee, S.C. 1999. The three imuunomodulators on haemotological parameters and immunity level in rohu (*Labeo rohita*) fingerlings. Journal of Aquaculture in the Tropics. 14: 127–135.
49. Salah, M.A., Mohamed, F.M., George, J. (2008): Echinacea as immunostimulatory agent in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) via earthen ponds experiment. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture ,Egypt, 12-14 October, pp.1003-1042.
50. Secombes CJ, Chung S. Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. Comp Biochem Physiol 1988; 89B:539-544.
51. See, D.M., Broumand, N., Sahl, L., and Tilles, J.G.1997. In vitro effects of Echinacea and ginseng on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients lmmunopharmacology, 35: 229-235.
52. Siwicki, A. K., Anderson, D.P., Rumsey, G.L., 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Veterinary Immunology and Immunopathology, 14: 139-159.
53. Stimpel, M., Proksch, A., Wagner, H. and Lohman, M.L. 1984. Macrophage activation an induction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharide fraction from the plant *Echinacea purpurea*. Infection and Immunity 46 :845-849.
54. Thude. S., Classen, B., BlascheK, W., Barz, D. and Thude, H. 2006. Binding studies of an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea t*o leucocytes. Phytomedicine.13: 425–427.

55. Trenzado, C.E., Morales, A.E., Palma, J.M. and Higuera, M.D.L. 2009. Blood antioxidant defenses and hematological adjustments in crowded /uncrowded rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed on diets with different levels of antioxidant vitamins and HUFA. Journal of Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. 149: 440─ 447 pp.
56. Wahli, T., Verlhac, V., Griling, P., Gabaudan, J., Aebischer, C., 2003. Influence of dietary vitamin C on the wound healing process in rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*) Aquaculture 225, 371-386.
57. Xu, D.J., Xia, Q., Wang, J.J., Wang, P.P., 2008. Molecular Weight and Monosaccharide Composition of Astragalus polysaccharides, Molecules, 13: 2408 – 2415.
58. Yin, G., Ardo, L., Thopmpson, K.D., Adams, A ,. Jeney, Z. and Jeney, G., 2009. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*)enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila*, Fish & Shellfish Immunology, 26(1):140 – 145.
59. Yousefian, M., Sheikholeslami, M. and Kor, D. 2010 . Serum biochemical parameter of male, immature and female Persian sturgeon (*Acipencer persicus*. Australian Journal of Basic & Applied Sciences, 5(5).476-480.

Abstract
Medicinal plants have been used in oriental medicine for centuries. *Echinacea purpurea* (Asteraceae), also known as the purple coneflower, is an herbal medicine with positive effects on various immune parameters that has been used customarily as a treatment for the common cold**,** coughs, bronchitis, upper respiratory infections, and some inflammatory conditions. The aim of this study was to investigate the effect of *Echinacea purpurea* (EP) extract on a non-specific immunity of *Mugil cephalus*. Three hundred and sixty Gray mullet larvae with average weight of 0.75 ± 0.02 g and an average length of 4.40 ±0.81cm collected from Ramin port where is located at 5 km far from the Chabahar and finally transferred to lab of trial in Offshore Research Center. This research was designed based on 4 treatment, Each with 3 replicates. The major factors examined containing growth factors mainly consists of average weight, average daily gain, protein efficiency rate, protein productive rate, hematological and biochemical factors including globin, albumin, total protein, lysozyme, ultimately, immunological factors, and respiratory burst and phagocytosis percent. In general, the results of this study showed that the addition of 100 and 200 mg of EP extract per kg of diet led to a significant increase in growth parameters (final weight, food intake, daily growth rate and efficiency of protein), hematology (RBC, WBC, Hb, Hct) and biochemical factors (total protein, albumin, globulin) in gray mullet were compared to control. The highest lysozyme activity, immunoglobulin, phagocytosis and respiratory burst was observed in treatment containing 200 mg EP extract per kg food. Treatment containing 200 mg EP extract per kg food showed a minimal mortality after challenge with bacteria *photobacterium damselae* compared to the control treatment. Finally, the present results suggest that diet containing 200 200 mg EP extract per kg food could improve growth, hematology, immunity and resistance against photobacteriosis of grey mullet.

Keywords: *Echinacea purpurea* extract, *Mugil cephalus,* photobacteriosis, growth, gematology, immunity

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute - Chabahar Maritime University

---

Project Title : A study on methanol herbal plant extract of *Echinacea) Echinacea purpurea*) on immunity level of *Mugil cephalus*
Approved Number: 13-12-1251-9353-93003
Author: Shapor Kakolaki(Iranian Fisheries Science Research Institute)-Paria Akbari (Chabahar University)
Project Researcher : Shapor Kakolaki(Iranian Fisheries Science Research Institute)-Paria Akbari(Chabahar University)
Collaborator(s) *:* S. Jedgal, H. Salehi, A. Sepahdari, H. Hoseinzadeh Sahafi, S.J. Zorriehzahra, M.R. Mehrabi, S. Soltanian, H. Gholipour kanani, M. Akhlaghi
Advisor(s): -
Supervisor: -
Location of execution : Tehran province
Date of Beginning : 2015
Period of execution : 1 Year & 6 Months
Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2017

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute

Project Title :

A study on methanol herbal plant extract of *Echinacea) Echinacea purpurea*) on immunity level of *Mugil cephalus*

Project Researcher :

Shapor Kakolaki
Paria Akbari

Register NO.

51326