View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

عنوان:

بررسی تاثیر عصاره متانولی گیاهان دارویی سر خار گل (*Echinacea purpurea*)، چای سبز(*Camellia sinensis*)، سیر (*Allium sativum*) بر سطح ایمنی ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*)

مجری مسئول :
شاپور کاکولکی

شماره ثبت
۵۲۷۹۹

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

عنوان طرح/ پروژه : بررسی تاثیر عصاره متانولی گیاهان دارویی سر خار گل (*Echinacea purpurea*)، چای سبز(*Camellia sinensis*)، سیر (*Allium sativum*) بر سطح ایمنی ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*)
کد مصوب: ۹۳۵۳-۱۲-۱۲-۰
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : شاپور کاکولکی
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : شاپور کاکولکی
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : پریا اکبری، سیدمحمدابراهیم‌لیل ذریه‌زهرا
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -
محل اجرا : استان سیستان و بلوچستان
تاریخ شروع : ۹۳/۱۱/۱
مدت اجرا : ۱ سال و ۶ ماه
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۶
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»

طرح/پروژه: بررسی تاثیر عصاره متانولی گیاهان دارویی سر خار گل (*Echinacea purpurea*)، چای سبز (*Camellia sinensis*)، سیر (*Allium sativum*) بر سطح ایمنی ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*)

کد مصوب : ۹۳۵۳-۱۲-۱۲-۰

شماره ثبت (فروست) : ۵۲۷۹۹ تاریخ : ۹۶/۱۰/۳

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

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

در زمان اجرای طرح مجری در :

ستاد ■ پژوهشکده □ مرکز □ ایستگاه □

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

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه ۲
۲- مواد و روشها ..... ۹.
۲-۱- ماهی و شرایط پرورش ۹
۲-۲- تهیه گیاه و آماده‌سازی عصاره ۹
۲-۳- آماده‌سازی جیره و غذادهی به ماهیان ۹
۲-۴- زیست‌سنجی و بررسی پارامترهای رشد و تغذیه ۱۰
۲-۵- تهیه سرم از ماهی ۱۱
۲-۶- اندازه‌گیری میزان لیزوزیم ۱۲
۲-۷- اندازه‌گیری میزان آنتی بادی به روش ELISA ۱۲
۲-۸- تعیین فعالیت فاگوسیتوزی ۱۳
۲-۹- انفجار تنفسی ۱۴
۲-۱۰- اندازه‌گیری پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین ۱۴
۲-۱۱- آنالیز آماری ۱۵
۳- نتایج ۱۶
۳-۱- شاخص‌های رشد ۱۶
۳-۲- شاخص‌های هماتولوژی ۱۸
۳-۳- شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون ۲۰
۳-۴- شاخص‌های ایمنی ۲۲
۴- بحث ۲۵
۵- نتیجه گیری کلی ۲۶
منابع ۳۹
چکیده انگلیسی ۴۹

چکیده

گیاهان دارویی که باعث تحریک پاسخ ایمنی غیراختصاصی هستند، به‌عنوان مواد سودمند برای ماهی و سایر آبزیان شناخته شده‌اند. ۱۰۸۰قطعه 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. برای هر گیاه ۳ تیمار به‌همراه یک کنترل و هر تیمار دارای ۳ تکرار طراحی شد. هر ۳ تیمار و یک کنترل به‌همراه تکرارهایشان به گیاهان سیر، سرخارگل و چای سبز اختصاص یافت. هدف از انجام این طرح، تاثیر عصاره برخی گیاهان داروئی بر ارتقاء سیستم ایمنی ماهی کفال بود. بالاترین میزان فعالیت لیزوزیم ۱/۸۵ ±۳۸/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر، میزان فاگوسیتوز (۱/۵۵±۵۶ درصد) و انفجار تنفسی (۰/۱۸±۱/۶۱ جذب نوری در ۶۲۰ نانومتر) در تیمار حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره سیر در هر کیلوگرم غذا مشاهده گردید. بالاترین میزان فعالیت لیزوزیمی متاثر از عصاره گیاه سرخارگل در تیمار ۲۰۰ در میلیون به میزان ۱/۱۳±۱۵/۷۳ میکروگرم در میلی‌لیتر و متاثر از گیاه چای سبز ۰/۳±۱۱/۶ در غلظت مشابه ثبت گردید. بالاترین میزان فعالیت لیزوزیم، انفجار تنفسی، آنتی‌بادی کل و درصد فاگوسیتوزیس در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره سرخارگل بر کیلوگرم غذا مشاهده شد. بالاترین میزان فعالیت لیزوزیم (۰/۷±۱۱/۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، میزان فاگوسیتوز (۱/۴۹±۳۳/۳۰ درصد) و انفجار تنفسی (۰/۰۸±۰/۵۷ جذب نوری در ۶۲۰ نانومتر) در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره چای سبز در هر کیلوگرم غذا مشاهده شد. با توجه به نتایج به‌نظر می‌رسد فعالیت لیزوزیمی و فاگوسیتوزی که یکی از شاخص-های مهم ایمنی غیراختصاصی در آبزیان تلقی می‌شود متاثرتر از سیر می‌باشد

واژگان کلیدی: سیر، سرخارگل، چای سبز، ایمنی غیراختصاصی

۱-مقدمه

امروزه با توجه به افزایش روز افزون جمعیت جهان، تقاضا برای محصولات غذایی آبزی بیشتر شده است و به‌نظر می‌رسد که در آینده سهم زیادی از این تقاضا از طریق آبزی‌پروری تامین شود. تکثیر و پرورش آبزیان از فعالیت‌های اقتصادی با ارزش محسوب می‌شود. به‌طوری که از سال ۱۹۷۰ نرخ رشدی معادل ۸/۹ درصد داشته و انتظار می‌رود که این روند در دهه حاضر میلادی نیز افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته باشد (ابراهیمی،۱۳۸۵ : قاسمی پیر بلوطی و همکاران،۱۳۹۰). ماهیان از قدیمی‌ترین گروه مهره‌داران محسوب می‌شوند که سیستم ایمنی آن‌ها شباهت زیادی به پستانداران و پرندگان دارد (عسکریان و کوشا، ۱۳۸۵). در سال‌های اخیر به‌دلیل توجه به پرورش متراکم ماهیان که منجر به افزایش احتمال ابتلای آن‌ها به بیماری‌ها می‌شود مطالعه تاثیر ترکیبات مختلف در ارتقاء سیستم ایمنی ماهیان به‌صورت قابل توجهی افزایش یافته است که می‌توانند به حفظ سلامت ماهیان در طول دوره پرورش کمک می‌کند. مطالعه سیستم ایمنی ماهیان استخوانی به‌دلیل اهمیت اقتصادی و نقش آن‌ها به‌عنوان منبع مهم غذایی از اهمیت بالایی برخوردار است (John et al.,2011). کفال ماهیان از دیرباز مورد توجه انسان بوده‌اند، به‌طوری که رومی‌ها و مصریان باستان ده‌ها قرن پیش کفال را به‌عنوان غذای مصرفی خود پرورش می‌دادند. این ماهیان دارای گوشت سفت، چرب و کم تیغ بوده و در غالب کشورها از اهمیت خاصی برخوردار هستند. در ایران نیز این ماهیان به‌صورت‌های مختلف مصرف می‌شوند و ایرانیان علاقه زیادی به آن‌ها دارند کفال ماهیان از گونه‌های با ارزش اقتصادی در عرصه‌های آبزی‌پروری بوده و به‌دلیل کیفیت مناسب آن از اولویت‌های شیلاتی اغلب کشورها می‌باشد. بروز بیماری‌ها در عرصه‌های شیلاتی بر رشد و میزان محصول اثرات سوء بسیاری دارد. پیش‌گیری از بیماری‌ها با استفاده از واکسیناسیون از جمله روش‌های درمانی شیمیایی می‌باشد. واکسیناسیون ماهی‌ها در مقیاس‌های تجاری جهت کنترل بیماری‌های باکتریایی مانند ویبریوز، بیماری آب‌های سرد، فرونکلوزیس و غیره در آزاد ماهیان به‌خوبی توسعه یافته است. اما استفاده از آن‌ها در سطح وسیع به‌ویژه در عرصه‌های ماهیان دریائی بسیار هزینه‌بر بوده و در صورت بروز بیماری‌های جدید یا با سویه‌های متفاوت مؤثر نخواهد بود همچنین واکسن‌ها در مقابل یک یا تعداد اندکی از بیماری‌ها موجب افزایش مقاومت در موجودات می‌شوند (عسکریان و کوشا، ۱۳۸۵). بررسی‌های متعددی بر روی مواد محرک ایمنی انجام شده و استفاده از آن‌ها در صنعت آبزی‌پروری به‌طور گسترده‌ای در حال توسعه است. ماده محرک ایمنی، یک ماده طبیعی یا مصنوعی است که با تقویت پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی موجب افزایش مقاومت موجودات در مقابل عوامل بیماری‌زا می‌گردد(عسکریان و کوشا، ۱۳۸۵ ؛ Galina et al.,2009). ماهی‌ها برای مقابله با هجوم عوامل بیماری‌زا به سیستم ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی خود وابسته هستند. به‌عنوان مثال، آنزیم لیزوزیم که در گرانول‌های لکوسیت‌های نوتروفیل وجود دارد، با اثر بر دیواره سلولی با کتری‌ها و هیدرولیز زنجیرهای بتای ۱ تا ۴ ان استیل مورامیک اسید (β- (1-4)N-acetyl muramic and 2-acetyllamino-2- deoxy- D-glucose) و ان استیل گولوکوزامین موجود در لایه پپتیدوگلیکان باکتری های گرم مثبت می‌شود (Hanief et al 2004). همچنین

فاگوسیتوزیس یکی از سازوکارهای دفاع سلولی غیراختصاصی ماهی بر علیه عوامل بیماری‌زا از جمله باکتری‌ها، ویروس‌ها و انگل‌ها می‌باشد. در طی روند فاگوسیتوز هم مصرف اکسیژن و هم تولید میانجی‌های مواد واسطه‌ای اکسیداتیو مانند یون سوپر اکسید (O_2^-)، هیدروژن پراکسیداز (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH) را افزایش می‌دهند. این پاسخ موجب افزایش شدیدی در مصرف اکسیژن شده و در نتیجه این واکنش، انفجار تنفسی نام گرفته است. که برای فعالیت باکتری‌کشی اهمیت دارد.(Secombes and Fletcher . 1992).

در حالی‌که در پرورش ماهیان مواد محرک ایمنی مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است که از این جمله می‌توان به لوامیزول (Jeney and Anderson, 1993; Siwicki et al.,1990; Siwicki, 1987,1989) ، گلوکان (Chen and Ainsworth,1992; Jorgensen and Robertsen, 1995; Engstad et al., 1992; Verlhac et al.,1996)، گلوکان همراه با ویتامین C (Verlhac et al.,1996)، لیپو پلی ساکارید (Solem et al.,1995; Dalmo and Seljelid, 1995) و کیتوزان (Siwicki et al.,1994) اشاره نمود. اما بسیاری از مواد محرک ایمنی به‌دلیل قیمت بالا و اثرات نامطلوبی که در کنار اثرات مناسب خود می‌توانند داشته باشند مورد استفاده قرار نمی‌گیرند به‌همین منظور گیاهان متعددی شناسایی و بر روی آبزیان مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Dugenci et al.,2003). استفاده از مواد گیاهی به‌عنوان دارو از سال‌های پیش مورد توجه قرار گرفته است و در آبزیان نیز به‌دلیل در دسترس بودن، قیمت مناسب، قابل تجزیه بودن در محیط، نداشتن اثرات زیست محیطی نامناسب و مؤثر بودن بر علیه طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا مورد مصرف قرار می‌گیرد. تعداد زیادی از این گیاهان خاصیت تحریک کنندگی ایمنی دارند که در سال‌های اخیر توجه زیادی به آن‌ها شده است (Galina et al.,2009).

اهراب فرشبافی در سال ۱۳۹۰ با بررسی اثر چای سبز فاقد کافئین بر برخی از اجزای سیستم ایمنی در مخاط پوست ماهی قزل آلای‌رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نشان داد که در گروه تیمار با چای سبز فاقد کافئین در مقایسه باگروه کنترل افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های مختلف مثل لیزوزیم، پروتئاز،آلکالین فسفاتاز و استراز مشاهده شد. موکوس پوست در ماهی های تغذیه شده با چای سبز فاقد کافئین باعث آگلوتیناسیون اریتروسیت‌ها شد، در حالی‌که در گروه کنترل هیچ آگلوتیناسیونی مشاهده نشد. به‌علاوه موکوس پوست در گروه تغذیه شده با چای سبز فاقدکافئین خاصیت آنتی باکتریایی قوی‌تری در مقابل یرسینیا روکری را نشان داد. درنتیجه، اجزاء مهم ایمنی در موکوس پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان، که در سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهی نقش دارند، با تجویز ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای کیلو گرم از چای سبز فاقد کافئین تقویت گردیدند (اهراب فرشبافی،۱۳۹۰). چای سبز را به‌دلیل داشتن موادی مانند کاتچین ضدسرطان و آنتی‌اکسیدان دارای خواص دارویی مفید می‌دانند، که نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های معروفی چون ویتامین‌های C و E بسیار قوی‌تر عمل می‌کند. به‌تازگی علاوه بر مردم چین، چای سبز در بسیاری از کشورهای جهان طرفداران فراوانی یافته است. دلیل اصلی این استقبال، آشنایی مردم دیگر کشورها با خواص درمانی این نوع نوشیدنی است. ترکیبات اصلی چای سبز، پلی فنل‌ها، ویتامین‌ها، ترکیبات نیتروژنی، کافئین، لیپیدها و کربوهیدرات‌ها می‌باشد (Chu and Juneja,1997).

مطالعات متعدد بر روی انسان و حیوانات آزمایشگاهی نشان دادند که چای سبز نقش مهمی در جلوگیری از پوکی استخوان، پوسیدگی دندان و سنگ کلیه دارد (Crespy and Williamson,2004; Cabrera et al.,2006). مطالعات متعدد نشان دادند که استفاده از چای سبز در جیره غذایی ماهی منجر به بهبود مقاومت در مقابل بیماری‌ها، میزان بقاء، میزان رشد، عملکرد سیستم ایمنی و آنتی‌اکسیدان‌ها می‌شود. برای مثال، استفاده از پلی فنل‌های چای سبز منجر به جلوگیری از بد رنگ شدن گوشت، پر اکسید شدن چربی و رشد میکروبی در ماهی دم زرد ژاپنی (*Seriola quinqueradiata*) گردید (Ishihara et al,2002). همچنین استفاده از عصاره چای سبز در جیره غذایی ماهی کفشک ماهی زیتونی (*Paralichthys olivaceus*) منجر به بهبود رشد، عملکرد تغذیه و کاهش کلسترول (LDL) سرم گردید Cho و همکاران (۲۰۰۷) و Abdel- Tawwab و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که چای سبز می‌تواند منجر به پیش‌گیری بیماری آیرمونازیس و حفظ سلامت ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromisniloticus*) گردد. Epigallocatechin-3 –gallate یکی از آنتی‌اکسیدان‌های موجود در چای سبز است که با غلظت ۳۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم جیره غذایی، نقش آنتی‌اکسیدانی و محرک ایمنی را در قزل‌آلای رنگین کمان ایفا می‌نماید (Thawonsuwan et al.,2010) همچنین استفاده از مکمل چای سبز در جیره غذایی، منجر به افزایش پاسخ ایمنی سلولار، هومورال و مقاومت در برابر بیماری ویبریوزیزدر ماهی هامور (*Epinephelus bruneus*) گردید (Harikishnan et al.,2011). Kano و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که استفاده از عصاره چای سبز در جیره غذایی منجر به کاهش رشد و لیپید بدن ماهی دم زرد ژاپنی(*Seriola quinqueradiata*) گردید Asadpour و همکاران (۲۰۱۲)نشان دادند که استفاده از ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره فاقد کافئین چای سبز بر کیلوگرم غذا منجر به افزایش فعالیت سوپر اکسیداز، افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی، کاهش پراکسید لیپید و میزان تری‌گلیسرید تخم-های حاصل از مولدین تغذیه شده با عصاره چای سبز گردید.

Sheikhzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که استفاده ۱۰۰ میلی‌گرم چای سبز فاقد کافئین به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت لیزوزیم و آگلوتیناسیون اریتروسیت‌ها در ماهی شد در حالی‌که فعالیت آنتی‌تریپسین به‌دلیل آلفا – آنتی پروتئاز در گروه تغذیه شده با ۲۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم چای سبز فاقد کافئین به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی گردید.

سرخارگل با نام علمی *Echinacea purpurea* گیاهی علفی و چند ساله با ارتفاع ۱۵۰–۶۰ سانتی‌متراست و متعلق به خانواده گل ستاره Asteracea که به عنوان گیاه دارویی ارزشمند است. 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 گلیکوپروتئین‌ها، 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 گرانوسیت‌ها را به خون که موجب مقاومت در مقابل عوامل بیماری‌زا می‌شود را افزایش می‌دهند (Bauer and Wagner,1991). همچنین سرخارگل با افزایش تولید آنتی بادی، ایمنی هومورال را تقویت و با تحریک ماکروفاژ-

ها و افزایش تولید سیتوکین‌ها و نیز افزایش تکثیر لنفوسیت‌های T ایمنی سلولی را تقویت می‌کند (پور غلام و همکاران، ۱۳۹۲ و Stimpel et al.,1982) برخی از ترکیبات موثره عصاره سرخارگل عبارتند از آلکالومیدهای لیپوفیلیک، β-caryophllene، Germacrene-D 1,8 Pentadecadiene 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 قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (عبدی و علیشاهی، ۱۳۹۲) نیز تایید شده است.

تاثیرگذاری گیاه سرخارگل عمدتا مربوط به واکنش سیستم ایمنی غیراختصاصی سلولی است تحت تاثیر ترکیبات پلی ساکاریدها ،گلیکوپروتئین‌ها، مشتقات اسید کافئیک وآلکامیدهای موجود در گیاه می‌باشد Aly et al.,2008). تحقیقات ثابت کرده است در انسان فقط دوز پایین سرخارگل می‌تواند 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 ۲،۱و۶ می‌گردد این افزایش توسط مونوسیت‌های 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.,2009).

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، هموگلوبولین 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 استرس‌های محیطی به‌دنبال 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 شده‌ای مثل آرگوسان و لوامیزول داشته و می‌توان از آن‌ها به‌عنوان 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 گلبول‌های سفید به‌طور معنی‌داری 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 جیره غذایی) بر پاسخ ایمنی غیراختصاصی ماهی جوان استرلیاد (*Acipencer ruthenus*) مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که فعالیت لیزوزیم، میزان پروتئین تام، میزان آنتی‌بادی سرم و آلبومین تحت تاثیر تجویز عصاره سرخارگل قرار گرفتند و به‌طور معنی داری بیشتر از شاهد بودند (نجف پور مقدم و همکاران، ۱۳۹۲).

پور غلام و همکاران (۱۳۹۲) سه غلظت از عصاره سرخارگل (۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم بر گیلوگرم غذا) را به‌منظور ارزیابی برخی از شاخص‌های ایمنی‌شناسی 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 کیلوگرم غذا نتایج بهتری داشت و آلوده کردن ماهیان مورد آزمایش با باکتری استرپتوکوکوس اینیایی نشان داد که ماهیان دریافت کننده عصاره سرخارگل (۱/۵ گرم بر کیلوگرم غذا) دارای ماندگاری ۹۱/۱۱ درصد بود در صورتی که در گروه کنترل این میزان ۴۴/۴۴ درصد بود (پورغلام و همکاران، ۱۳۹۲).

گیاه سیر با نام علمی *Allium sativum* بزرگ‌ترین و مهم‌ترین جنس خانواده Alliacea با حدود ۴۵۰ گونه است (Lanzotti,2006). سیر از جمله گیاهانی است که از قرن‌های گذشته به‌علت دارا بودن خواص دارویی در درمان بیماری‌های مختلف مورد توجه بوده است. از جمله اثرات مفید سیر می‌توان به‌مواردی از قبیل خاصیت ضد میکروبی، فعالیت ضدسرطانی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، توانایی در کاهش بیماری‌های قلبی- عروقی، بهبود عملکرد سیستم ایمنی بدن، فعالیت آنتی ترومبوتیک و فعالیت آنتی دیابتیک اشاره کرد. تنوع گسترده در خواص دارویی و غذایی سیر به ترکیبات گوگردی موجود درآن نسبت داده می‌شود. بیش از ۲۰ نوع از ترکیبات گوگردی با عملکرد متفاوت در سیر موجود است (Kumolu-Johnson et al.,2013). از مهم‌ترین ترکیبات موجود در سیر ترکیبات ارگانوسولفور نظیر آلیسین (allicin)،آجون (ajoene) دی آلیل دی سولفید (diallyl cysteine) و اس آلیل سیستئین (S-allyl cysteine) می‌باشد (Sahu et al.,2007). مهم‌ترین جزء موثره سیر، ترکیب آلی سولفور-داری به نام آلیسین که باعث کاهش ، کلسترول و تری‌گلیسرید می‌گردد. آلیسین ماده آروماتیک است این ترکیب در سیر باعث کاهش فعالیت آنزیم بتا هیدروکسی بتا متیل گلوتاریل کوآنزیم آ (HMG-CO A) کبدی و کلسترول ۷ آلفا هیدروکسیلاز و اسید چرب سنتتاز می‌شود (Shi and Kim,2004; Nwabueze,2012) همچنین آلیسین موجود در سیر منجر به بهبود فلور روده، هضم و بهبود رشد می‌گردد (Khalil et al.,2001). ترکیب اس

الیل سیستئین سولفوکساید در سیر منجر به فعالیت هیپوگلسیمیک می‌گردد (Ademiluyi et al.,2013) سیر به‌عنوان یک ماده محرک رشد و بهبوددهنده تغذیه و کارایی غذا در تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) مورد استفاده قرار گرفته است (Diab et al., 2002; Shalaby et al., 2006). در تحقیقی که در ارتباط با اثر غلظت‌های مختلف اسانس سیر (۵۰،۱۰۰،۱۵۰mg/kg و ۲۰۰) بر روی شاخص‌های رشد، تغذیه و ترکیب شیمیایی لاشه فیل ماهی (*Huso huso*) انجام شد، بیشترین میزان افزایش وزن، بهترین درصد راندمان پروتئین، بالاترین نرخ تولید پروتئین، کمترین ضریب مصرف غذا و بیشترین میزان پروتئین لاشه در ماده خشک در تیمار حاوی ۱۵۰ mg/kg اسانس سیر مشاهده شد و با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار داشت (ابراهیمی و همکاران،۱۳۹۱). در تحقیقی دیگر، اثر عصاره سیر بر رشد پست لارو یک روزه میگوی وانامی(*Litopenaeus vannamei*) با غلظت های مختلف (mg/l ۲۰۰، ۴۰۰،۶۰۰،۸۰۰ و ۱۰۰۰)، پست لاروهای تغذیه شده با ناپلئوس آرتمیای غنی شده با mg/l ۲۰۰ عصاره سیر از وزن و طول بیشتری در مقایسه با سایر تیمارها برخوردارابوده و نرخ رشد ویژه کلیه تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد (جواد زاده و همکاران،۱۳۹۰). در پژوهشی دیگر بر روی ماهی خاویار استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) مشخص شد که جیره حاوی٪ ۰/۵ عصاره سیر منجر به بهبود عملکرد رشد، تغذیه و پروتئین لاشه شد (Lee et al.,2012).

در ارتباط با سیستم ایمنی محققین نشان دادند که ترکیب S-allylcystein موجود در سیر خرد شده از متابولیسم سلول‌های سرطانی جلوگیری کرده و باعث بهبود پاسخ‌های ایمنی می‌شود (Sumiyoshi, 1997). برخی مطالعات نشان داده اند که استفاده از سیر در جیره غذایی تیلاپیای نیل می‌تواند میزان گلبول‌های قرمز، هموگلوبولین، هماتوکریت و پروتئین خون را افزایش داده و در مقابل سبب کاهش میزان چربی و قند خون گردد (Shalaby et al.,2006). عصاره سیر، باعث افزایش تولید سایتوکین‌ها، افزایش فعالیت ماکروفاژها، لنفوسیت‌هاو سایر سلول-های سیستم ایمنی می‌شود (Agarwal,1996).گونه‌های جنس *Allium* با افزایش پاسخ‌های ایمنی از قبیل افزایش سنتز لنفوسیت‌ها، افزایش رها سازی سیتوکین، افزایش فاگوسیتوزیس نقش مهمی را در بهبود سیستم ایمنی ایفا می‌کنند. Sahu و همکاران (۲۰۰۶) گزارش نمودند که استفاده از عصاره سیر با دوزهای ۱، ۵ و ۱۰ گرم به ازای هر کیلوگرم غذا منجر به افزایش معنی‌داری سوپر اکسید آنیون، فعالیت لیزوزیم، پروتئین تام، آلبومین و فعالیت باکتریسیدال سرم ماهی کپور هندی روهو (*Labeo rohita*) در مقایسه با شاهد شد (Sahu et al.,2006). تنگستانی و همکاران (۱۳۹۰) به بررسی اثر اسانس سیر به‌عنوان یک ماده محرک سیستم ایمنی، بر شاخص‌های هماتولوژی و ایمنی سلولی در فیل ماهیان جوان پرورشی پرداختند آن‌ها نشان دادند که شاخص‌های زمان انعقاد خون و میانگین هموگلوبین در هر گلبول قرمز (MCH) روندی افزایشی در تیمارهای حاوی اسانس سیر نشان داد. تعداد لنفوسیت‌ها در جیره‌های حاوی.۰/۰۵ g/kg، ۰/۱۰g/kg و ۰/۱۵ g/kg اسانس سیر، به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار-های شاهد و حاوی آنتی بیوتیک و تعداد نوتروفیل خون در تیمارهای حاوی ۰/۱۵ g/kgو ۰/۲۰ g/kg اسانس سیر به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها بود. در مجموع نتایج نشان داد که افزودن اسانس سیر با افزایش زمان

انعقاد خون، میزان هموگلوبین گلبول‌های قرمز، افزایش تعداد لنفوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها و کاهش تعداد ائوزینوفیل‌ها، تاثیر معنی‌داری بر ارتقاء سیستم ایمنی و وضعیت فیزیولوژیک بدن فیل ماهیان در مقایسه با جیره شاهد و جیره حاوی آنتی بیوتیک داشته و می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین در جیره غذایی فیل ماهیان جوان پرورشی باشد.

با توجه به مطالعات متعددی که در زمینه استفاده از گیاهان دارویی در تغذیه آبزیان شده است ولی تاکنون در ارتباط با کاربرد عصاره سیر، گیاه سرخارگل و چای سبز در پرورش ماهی کفال خاکستری منبع علمی در دسترس نیست. از این رو با توجه به وفور سیر و ارزانی قیمت آن در ایران و نظر به‌اینکه ماهی کفال خاکستری دارای ارزش اقتصادی قابل توجهی است، لذا در این مطالعه به بررسی اثر عصاره سیر، گیاه سرخارگل و چای سبز در بر روی عملکرد شاخص‌های رشد، تغذیه، ایمنی غیراختصاصی(آنزیم لیزوزیم ، فعالیت فاگوسیتوزی و انفجار تنفسی)، ایمنی اختصاصی (آنتی‌بادی کل)، فاکتورهای هماتولوژیک (شمارش گلبول‌های سفید، شمارش گلبول‌های قرمز، میزان هماتوکریت و میزان هموگلوبولین) و بیوشیمیایی خون (میزان پروتئین تام، آلبومین، گلوبولین و نسبت آلبومین به گلوبولین) ماهی کفال ماهی خاکستری پرداخته شده است.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱- ماهی و شرایط پرورش

این پژوهش در شهریور ماه ۱۳۹۴ در کارگاه تکثیر و پرورش ماهی موسسه تحقیقات شیلات چابهار آغاز شد. ۱۰۸۰ 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 ۰/۰۲±۰/۷۵ g و میانگین طولی ۰/۸۱±۴/۴۰ cm شمارش شده و با تراکم ۳۰ قطعه به ۳۶ مخزن ۶۰L منتقل شدند. در طول دوره، پارامترهای آب اندازه‌گیری شد. به‌طور میانگین در کل دوره درجه حرارت آب ۰/۵±۲۸/۲ °C، اکسیژن محلول ۰/۸۷ mg/L ±۷/۰۱ و pH آب ۰/۴±۷/۸ بود. در طی دوره آزمایش دوره نوری صورت ۱۲D:۱۲Lبود. به‌منظور هوادهی و نیاز اکسیژن لاروها به‌هر یک ازمخزن‌ها یک سنگ هوا که به منبع هواده متصل بود نصب گردید. تیمارهای مورد استفاده در تحقیق حاضر گروه‌ها شامل ۴ گروه برای هر گیاه داروئی بود به‌طوری‌که یک تیمار کنترل 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 کیلوکالری بر کیلوگرم انرژی)، ۳ تیمار با سطوح ۵۰، ۱۰۰و ۲۰۰ mg/kg برای عصاره‌های سرخارگل، سیر و چای سبز به‌طور جداگانه بودند که با سه تکرار برای هر تیمار، در طی یک دوره ۸ هفته مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۲- تهیه گیاه و آماده‌سازی عصاره

جمع آوری گیاهان سرخارگل، سیر از اطراف شهرستان شیراز و چای سبز از اطراف شهرستان لاهیجان صورت گرفت و با کلید شناسایی مورد تایید و سپس در فضای آزاد و به دور از نور مستقیم خورشید خشک و توسط دستگاه همزن برقی کاملا به‌حالت پودر تبدیل شدند. ۵۰ گرم از پودر حاصل هر یک را درون فیلتر استوانه‌ای 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، به‌طور 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 سانتی‌گراد نگهداری شد (Harikrishnan et al., 2003).

۲-۳-آماده‌سازی جیره و غذادهی به ماهیان

به‌منظور اضافه نمودن سطوح مختلف عصاره‌های سرخارگل، سیر و چای سبز به غذای کنسانتره ابتدا مقدار غذا را برای کل دوره (۸ هفته) برای هر تیمار محاسبه سپس با درصد مشخصی آب مقطر(۴۰ mL) عصاره‌ها را به جیره اضافه نموده تا به‌حالت خمیری درآمد. با استفاده از چرخ گوشت با اندازه چشمه تور ۰/۵ میلی‌متری خمیر

عبور داده شد و به‌شکل 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 به‌میزان ٪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 ماهی‌ها از مخازن خارج گردید. آنالیز ترکیب شیمیایی رژیم‌های غذایی مورد آزمایش در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. ترکیب شیمیایی رژیم‌های غذایی مورد آزمایش

رژیم غذایی (mg/kg عصاره سرخارگل، سیر و چای سبز)				
ترکیب شیمیایی (درصد)	**۰**	**۵۰**	**۱۰۰**	**۲۰۰**
سرخارگل				
پروتئین خام	۵۱/۶	۴۸/۸۶	۴۹/۱۳	۴۹/۸۹
چربی خام	۱۱/۹	۱۰/۷۵	۱۰/۳۰	۱۰/۰۱
خاکستر خام	۱۲/۱	۱۰/۲۹	/۱۹ ۱۰	۱۰/۰۱
رطوبت	۶/۳	۶/۷۳	۵/۹۶	۶/۴۳
سیر				
پروتئین خام	۵۱/۶	۵۰/۲	۵۱/۶	۵۱/۴
چربی خام	۱۱/۹	۱۱/۸	۱۱/۶	۱۱/۳
خاکستر خام	۱۲/۱	۱۱/۸	۱۲/۴	۱۲/۶
رطوبت	۶/۳	۵/۸	۶/۲	۶/۵
چای سبز				
پروتئین خام	۵۱/۶	۵۱	۵۰/۶	۵۱/۶
چربی خام	۱۱/۹	۱۱	۱۱/۴	۱۱/۲
خاکستر خام	۱۲/۱	۱۲	۱۱/۸	۱۲/۶
رطوبت	۶/۳	۵/۶	۵/۷	۶/۴

۴-۲- زیست‌سنجی 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 داده‌های حاصل از زیست‌سنجی‌ها، میزان پروتئین موجود در غذا و اندازه‌گیری پروتئین لاشه، شاخص‌های 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)

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

Wf= وزن نهایی (g) Wi= وزن اولیه (g)

WG=افزایش وزن به‌دست آمده (g)

ضریب تبدیل غذایی (FCR)

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

F= مقدار غذای مصرف شده (گرم)

Wf= وزن نهایی (g) Wi= وزن اولیه (g)

میزان غذای دریافتی (VFI)

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

Wf= وزن نهایی (g) Wi= وزن اولیه (g)

راندمان مصرف پروتئین (PER)

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

BWf=وزن نهایی (g) BWi= وزن اولیه (g)

AP= مقدار پروتئین داده شده به هر ماهی

راندمان مصرف چربی (PER)

$$PER = \frac{BWf - BWi}{AL}$$

BWf=وزن نهایی (g) BWi= وزن اولیه (g)

AP= مقدار چربی داده شده به هر ماهی

۵-۲-تهیه سرم از ماهی

ماهی‌ها در پایان دوره (۵ قطعه از هرتکرار) جمع آوری و دو بار با سرم فیزیولوژی(pH= ۷/۵) شسته شدند و سپس با یک حجم سرم فیزیولوژی با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هموژنیزه گردیدند و مجدد مایع رویی آن جمع آوری و با دور ۳۰۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و مایع رویی مجددا جداسازی و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. همچنین در اواخر دوره نیز بافت کلیه ماهی‌ها نیز جدا شد و جهت اندازه‌گیری فاکتورهای مد نظر در دمای ۸۰ - درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۶-۲- اندازه‌گیری میزان لیزوزیم

سنجش میزان لیزوزیم در نمونه‌ها، بر اساس روش توصیه شده توسط Ellis (۱۹۹۰) صورت گرفت ابتدا ۱۷۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروکوکوس لیزودیکتیکوس (*Micrococcus lysodeikticus*) (محصول سیگما) (معادل مقدار ۰/۳۷۵ گرم به ازای هر میلی‌لیتر 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 سانتی‌گراد انکوباسیون شد. میزان جذب نوری پس از ۱۵ و ۱۸۰ ثانیه به‌روش 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 میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر در نظر گرفته می‌شود). همچنین از بافر فسفات سدیم به‌عنوان بلانک استفاده شد.

۷-۲- اندازه‌گیری میزان آنتی بادی به روش ELISA

ابتدا به‌منظور استخراج ایمنوگلوبولین، ۲۰ میلی‌لیتر از نمونه‌ها به محلول سولفات آمونیوم ۴۰ درصد اشباع اضافه شد و سپس با دور ۱۰۰۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و رسوب در حجم اولیه نمونه‌ها در بافر فسفات سدیم حل گردید و در مقابل ۲۰ میلی‌مولار بافر تریس- اسید کلریدریک با pH برابر ۸ دیالیز 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 آنتی‌بادی خرگوش ضد ایمنوگلوبولین ماهی (۷/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و آنتی سرم بز ضد خرگوش متصل به ماده رنگ‌زا (HRP)[1](شرکت CSB-E120445FH) مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا ۵۰ میکرولیتر محلول آنتی ژن‌ها (آنتی بادی استخراج شده نمونه‌ها با رقت‌های ۰ تا ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در بافرفسفات سدیم بافر رقیق کننده با مولاریته ۰/۰۵ و pH برابر ۶/۲ (PBS)[2] و ۰/۰۵ توئین[3] و ۳ درصد آلبومین سرم گاوی (BSA)[4] داخل حفره‌های میکروپلیت که از قبل با ۵۰ میکرولیتر آنتی بادی خرگوش ضد ماهی (۷/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بلوکه شده و با ژلاتین پوشش داده شده ریخته شد و پس از ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد بعد از شستشو ۵۰ میکروگرم آنتی سرم کونژوگه بز ضد خرگوش متصل به HRP به حفرات اضافه گردید و به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد و هر چاهک را به‌خوبی با بافر شستشو (۲۵۰ میکرولیتر) پر کرده و به‌مدت ۱۰ ثانیه آنرا چرخانده و سه بار عمل شستشو را تکرار کرده سپس ۵۰ میکرولیتر محلول سوبسترای حاوی o- phenylenediamine dihydrochloride (یک میلی‌گرم

---

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

بر میلی‌لیتر) 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 به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در تاریکی انکوباسیون شد، در نهایت واکنش سوبسترا- آنزیم به‌وسیله اضافه نمودن ۲۵ میکرولیترمحلول اسید سولفوریک (۰/۵ مولار) به هر چاهک خاتمه داده شد و تغییر رنگ به‌طریق اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۵۰ نانومتر (۲±۴۵۰ نانومنر) در طول ۱۰ دقیقه اندازه‌گیری گردید. غلظت آنتی بادی در نمونه‌ها به‌وسیله مقایسه تراکم اپتیکال از نمونه‌ها با منحنی استاندارد تعیین گردید. همه نمونه‌ها در سه تکرار در پلت‌ها قرار داده شد و میانگین و خطای استاندارد برای هر نمونه از آنتی بادی محاسبه گردید و داده‌ها بر مبنای میکروگرم بر میلی‌لیتر بیان شد.

۸-۲- 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 (۱۰۶ cell/ml) از هر ماهی روی یک لام شیشه‌ای تمیز قرار داده شد و سپس به‌مدت h ۱ در دمای $^{\circ}C$ ۱۸ در یک اطاقک مرطوب به‌منظور چسبیدن سلول‌ها به لام شیشه‌ای قرار گرفت. سپس لام دو بار توسط محیط L ۱۵- شسته شد تا سلول هایی که به لام شیشه‌ای چسبیده نشده جدا شدند. سپس به‌منظور تهیه سوسپانسیون سلولی مخمر رنگ‌آمیزی شده با رنگ قرمز کانگو،کلونی‌های مخمر بر روی آگار خونی به‌طریق استریل جمع‌آوری و وارد محلول نرمال سالین شد سپس به‌میزان ٪۱ محلول باکتریایی پودر رنگ قرمز کنگو به سوسپانسیون مخمر اضافه و خوب به‌هم زده شد. سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای $^{\circ}C$ ۱۲۰ در اتوکلاو استریل گردید. سپس ml ۱از سوسپانسیون سلولی مخمر (۱۰۸ cell/ml) رنگ‌آمیزی شده با رنگ قرمز کونگو را به لام شیشه‌ای اضافه شد و مجددا به‌مدت ۱ ساعت در اتوکلاو در دمای $^{\circ}C$ 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 به‌مدت ۳ در متانول خالص (٪۹۶) فیکس و به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول رنگی گیمسا (Sigma) قرار گرفت تا رنگ‌آمیزی 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:

$$\text{PA(فعالیت فاگوسیتوزی)} = \frac{\text{تعداد سلول های فاگوسیت کننده}}{\text{تعداد کل سلول ها}} \times ۱۰۰$$

$$\text{شاخص فاگوسیتوزی} = \frac{\text{تعداد مخمر های فاگوسیت شده}}{\text{تعداد ماکروفاژهای فاگوسیت کننده}}$$

۹-۲- انفجار تنفسی

تعیین فعالیت انفجار تنفسی به روش Secombes و Chung (۱۹۸۸) با کمی تغییر صورت گرفت. ۱۰۰µL از سوسپانسیون سلولی حاوی ماکروفاژ به هر خانه میکروپلیت (۹۶ خانه ته صاف) اضافه شد. سپس پلیت را به مدت ۲h در گرمخانه ۲۰°C در تاریکی قرار گرفت تا ماکروفاژها به کف خانه‌های پلیت چسبیدند. آن‌گاه محلول رویی دور ریخته شد و دوبار با محلول محیط ۱۵ـL شستشو داده شد سپس ۶۰ml از محلول نیتروبلوتترازولیوم (Nitro blue tetrazolium) (Merck, Germany)٪۰/۱را همراه با ۲۰µL از آنزیم سوپراکسایددیسموتازو (Superoxide dismutase) (Sigma, Aldrich,USA) ۲۰µL از محلول سوسپانسیون سلولی حاوی ماکروفاژ را به‌هر کدام از خانه پلیت‌های U شکل اضافه شد و آن‌گاه پلیت را به‌مدتmin 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 به‌طور کامل متوقف گردید. سپس ماکروفاژها فیکس شد و پس از گذشتmin۳۰ متانول را خالی و در هوای آزاد خشک شده، آن‌گاه به هر کدام از خانه‌هاµL 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.

۱۰-۲- اندازه‌گیری پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین

در داخل یک لوله آزمایش، میزان ۱/۹ میلی‌لیتر از محلول ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم و ۰/۱ میلی‌لیتر سرم ماهی را و در داخل لوله آزمایش دیگر ۱/۹ میلی‌لیتر از محلول ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم و ۰/۱ میلی‌لیتر استاندارد ریخته شد. همچنین به‌منظور تهیه بلانک، ۲ میلی‌لیتراز محلول ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم را در یک لوله آزمایش دیگر ریخته و ۵ میلی‌لیتر معرف بیوره را به‌هر یک از لوله‌ها اضافه و مخلوط گردید و سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در حرارت آزمایشگاه قرار گرفت و جذب نوری لوله‌های نمونه و استاندارد را در مقابل بلانک در طول موج ۵۵۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (WPAS2000-UV/VIS, Cambridge, UK) قرائت شد. و میزان پروتئین تام بر حسب گرم بر دسی‌لیتر محاسبه گردید (Burtis and Ashwood,1994).

به‌منظور اندازه‌گیری آلبومین به ۵ میلی‌لیتر محلول کاررنگ (۱۲۵ میلی‌لیتر محلول استوک رنگ (حاوی ۲۱۰ میلی‌گرم بروموکرزول سبز، ۵ میلی‌لیتر محلول هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال، ۰/۵ میلی‌لیتر آزاید سدیم و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) ۲۵ میلی‌لیتر سرم اضافه شد و به‌خوبی مخلوط گردید و به‌مدت ۱۰ دقیقه در حرارت آزمایشگاه قرار گرفت. جذب نوری این محلول را در طول موج ۶۳۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (WPAS2000-UV/VIS, Cambridge, UK) در مقابل بلانک قرائت و میزان آلبومین برحسب گرم بر دسی‌لیتر محاسبه گردید. و از کسر پروتئین تام از آلبومین میزان گلوبولین محاسبه شد (Burtis and Ashwood,1994)

۱۱-۲- آنالیز آماری

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

۳. نتایج

۱-۳- شاخص‌های رشد

نتایج حاصل از تغییرات میانگین شاخص‌های رشد و تغذیه متاثر از مقادیر مختلف سیر در جدول ۲ نشان داد که افزودن ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره سیر به جیره غذایی منجر به افزایش یا کارایی معنی‌دار (P<۰/۰۵) میزان ضریب تبدیل غذائی ۱/۰۳±۰/۳۱، نرخ رشد روزانه بر حسب درصد ۱/۰۷±۰/۰۴ و میزان کارایی پروتئین ۲/۰۱±۰/۳۳ در مقایسه با گروه شاهد گردید (P<۰/۰۵) در حالی‌که نرخ رشد روزانه و میزان غذای دریافتی تیمارهای حاوی ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره سیر بر کیلوگرم غذا تفاوت معنی‌داری را با گروه شاهد نشان ندادند (P>۰/۰۵).

جدول ۲. مقایسه میانگین (میانگین± خطای معیار) شاخص های رشد و تغذیه در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش(n=۶۰)

	تیمار			
	۱	۲	۳	۴
وزن اولیه (گرم)	۰/۷۵±۰/۰۶	۰/۷۵±۰/۰۳	۰/۷۴±۰/۰۳	۰/۶۸±۰/۰۲
وزن نهایی (گرم)	۴/۵۹±۰/۱۷^{a}	۴/۶۸±۰/۲۸^{ab}	۴/۸۱±۰/۱۶^{ab}	۵/۲۰±۰/۲۹^{c}
میزان غذای دریافتی (درصد)	۰/۷۵±۰/۰۲^{a}	۰/۷۸±۰/۰۱^{a}	۰/۸۲±۰/۰۳^{ab}	۰/۸۷±۰/۰۲^{b}
نرخ رشد روزانه (درصد)	۰/۸۸±۰/۰۲^{a}	۰/۸۹±۰/۰۱^{a}	۰/۹۷±۰/۰۱^{ab}	۱/۰۷±۰/۰۴^{b}
ضریب تبدیل غذایی	۱/۰۵±۰/۱۲	۱/۰۵±۰/۱۰	۱/۰۵±۰/۲۰	۱/۰۳±۰/۳۱
میزان کارایی پروتئین	۱/۵۰±۰/۱۰^{a}	۱/۸۵±۰/۱۳^{b}	۱/۸۸±۰/۲۱^{b}	۲/۰۱±۰/۳۳^{c}

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

نتایج حاصل از تغییرات میانگین شاخص‌های رشد و تغذیه متاثر از چای سبز در جدول ۳ نشان داد که افزودن ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره چای سبز به جیره غذایی منجر به افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۵) ضریب تبدیل غذائی ۱/۲۰±۰/۱۱ (با کارایی کمتر از غلظت‌های مختلف سیر)، نرخ رشد روزانه بر حسب درصد ۲/۱۹±۰/۱۳ (با کارایی تقریبی ۱/۱۲ بهتر از کاراترین غلظت یا همان ۲۰۰ در میلیون سیر)، میزان کارایی پروتئین ۳/۵۷±۰/۵۲ (با مقدار ۱/۵۶ گرم بهتر از کاراترین غلظت یا همان غلظت میلی‌گرم عصاره چای سبز بر کیلوگرم غذا) در حالی‌که میزان کارایی پروتئین در تیمارهای حاوی ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره چای سبز بر کیلوگرم غذا تفاوت معنی-داری را با گروه شاهد نشان ندادند (P >۰/۰۵).

جدول ۳. مقایسه میانگین (میانگین± خطای معیار) شاخص های رشد و تغذیه در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش

	تیمار			
	۱	۲	۳	۴
وزن اولیه (گرم)	۰/۷۵±۰/۰۶	۰/۷۵±۰/۰۳	۰/۷۴±۰/۰۳	۰/۶۸±۰/۰۲
وزن نهایی (گرم)	۲/۶۴±۰/۰۵^{a}	۲/۸۱±۰/۲۰^{ab}	۳/۱۳±۰/۱۱^{b}	۴/۳۲±۰/۱۶^{c}
میزان غذای دریافتی (درصد)	۱/۶۷±۰/۱۹^{a}	۱/۷۵±۰/۰۷^{a}	۱/۸۲±۰/۱۷^{ab}	۲/۰۲±۰/۰۹^{b}
نرخ رشد روزانه (درصد)	۱/۹۰±۰/۱۶^{a}	۱/۹۸±۰/۱۷^{a}	۲/۰۷±۰/۱۲^{ab}	۲/۱۹±۰/۱۳^{b}
ضریب تبدیل غذایی	۱/۵۰±۰/۰۹^{b}	۱/۳۸±۰/۰۶^{ab}	۱/۳۲±۰/۱۰^{ab}	۱/۲۰±۰/۱۱^{a}
میزان کارایی پروتئین	۲/۰۴±۰/۰۸^{a}	۲/۴۹±۰/۱۲^{b}	۲/۸۸±۰/۰۶^{c}	۳/۵۷±۰/۵۲^{d}

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 چای سبز می باشد.

همچنین نتایج حاصل از تغییرات میانگین شاخص‌های رشد و تغذیه متاثر از گیاه سرخارگل در جدول ۴ نشان داد که افزودن ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره سرخارگل به جیره غذایی منجر به افزایش یا کارایی معنی‌دار (P<۰/۰۵) میزان ضریب تبدیل غذائی ۰/۰۵± ۰/۹۵ (به‌طور قابل ملاحظه‌ای کمتر از کلیه غلظت‌های مورد مطالعه سیر و چای سبز)، نرخ رشد روزانه بر حسب درصد ۰/۵۰± ۱/۷۲ (تقریبا ۶۷٪ بیشتر از بهترین نرخ رشد روزانه متاثر از سیر و میزان ۴۷٪ کمتر از غلظت مشابه چای سبز)، میزان کارایی پروتئین ۰/۸۸± ۲/۹۴ (تقریبا ۰/۹۳ ضریب بالاتر و کاراتر از بالاترین ضریب غلظت‌های مورد مطالعه سیر و۰/۶۲ ضریب کمتر از بهترین غلظت موثر سرخارگل) می‌شود در حالی‌که وزن نهایی، نرخ رشد روزانه و میزان غذای دریافتی تیمارهای حاوی ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره سرخارگل بر کیلوگرم غذا تفاوت معنی‌داری را با گروه شاهد نشان ندادند (P>۰/۰۵).

جدول ۴. مقایسه میانگین (میانگین± خطای معیار) شاخص های رشد و تغذیه در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش

	تیمار			
	۱	۲	۳	۴
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

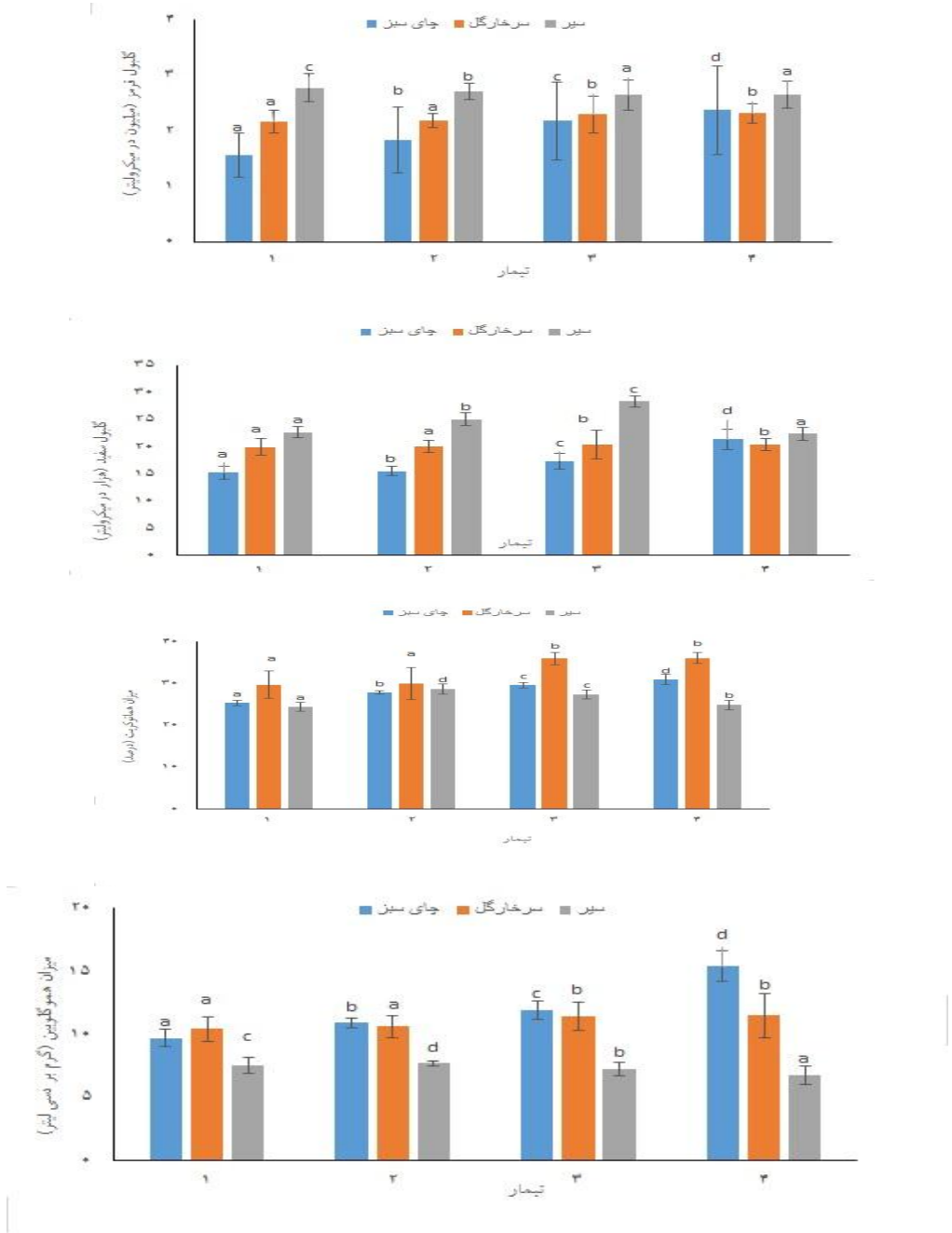
وجود حروف غیرهمسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵). تیمار ۱ تا ۴ بترتیب حاوی ۰، ۵۰، ۱۰۰و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره سرخارگل می باشد.

۱-۱-۳-نتیجه شاخص‌های وزنی: علی‌رغم این‌که ضریب تبدیل غذایی در تیمار ۲۰۰ در میلیون سرخارگل به میزان تقریبی ۰/۲۵ نسبت به هم غلظت خود در چای سبز کمتر بوده ولی نرخ رشد روزانه و ضریب کارائی پروتئین نشان داد که چای سبز با مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره چای سبز بر کیلوگرم غذا نسبت به سیر و سرخارگل تاثیر بیشتری در رشد شاخص‌های وزنی کفال خواهد داشت.

۲-۳- شاخص‌های هماتولوژی

دامنه تغییرات گلبول‌های قرمز (RBC_S)، تغییرات گلبول‌های سفید (WBC_S)، میزان هموگلوبولین (Hb) و درصد هماتوکریت (HCT) برای تیمارهای مختلف متاثر از مصرف گیاه سیر در نمودار ۱ نشان داد که روند تغییرات گلبول‌های قرمز به‌صورت معکوس است به‌طوری‌که کمترین مقدار آن در تیمار آزمایشی ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره سیر بر کیلوگرم غذا ۰/۲۵±۲/۶۵ میلیون بر میکرولیتر بدون تفاوت معنی‌دار با مقدار فوق در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره چای سیر بر کیلوگرم غذا ۰/۲۷±۲/۶۴ مشاهده گردید. بیشترین مقدار نیز در گروه شاهد با میزان ۰/۲۵±۲/۷۷ میلیون بر میکرولیتر مشاهده گردید. دامنه تغییرات گلبول‌های سفید (WBC_S) در این آزمایش بین ۲۸۳/۱-۲۲۳/۶ هزار بر میکرولیتر خون به‌دست آمد. بیشترین مقدار گلبول سفید متاثر از تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره چای سیر بر کیلوگرم غذا مشاهده گردید. میزان هموگلوبولین در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P<0/05$). محدوده مقدار هموگلوبولین در خون ماهیان مورد بررسی در این تحقیق ۷/۶۸-۶/۷۴ گرم بر دسی‌لیتر بود. دامنه تغییرات گلبول‌های قرمز (RBC_S)، تغییرات گلبول‌های سفید (WBC_S)، میزان هموگلوبولین (Hb) و درصد هماتوکریت (HCT) برای تیمارهای مختلف عصاره سرخارگل در نمودار ۱ نشان داد که در انتهای دوره آزمایش، تعداد گلبول‌های قرمز وابسته به دوز افزایش پیدا می‌کند به‌طوری‌که کمترین مقدار آن ۰/۲±۲/۱۶ میلیون در میکرولیتر در گروه شاهد و بیشترین مقدار گلبول‌های قرمز در تیمار آزمایش ۲۰۰ میلی-گرم عصاره سرخارگل بر کیلوگرم غذا به میزان ۰/۱۸±۲/۳۱ میلیون در میکرولیتر مشاهده می‌شود. بیشترین مقدار گلبول سفید در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره سرخارگل بر کیلوگرم غذا به‌میزان ۱±۲۰۳/۷هزار در میکرولیتر و کمترین آن مربوط به گروه شاهد با میزان ۱/۵۷±۱۹۹ هزار در میکرولیتر بود که روند افزایشی مشابه شاخص هماتوکریت بود به‌طوری‌که بیشترین درصد هماتوکریت در گروه آزمایشی ۲۰۰ در میلیون ۱/۳۲±۳۶/۰۵ و کمترین آن در گروه شاهد ۳/۳±۲۹/۶۸ مشاهده گردید. بیشرین مقدار هموگلوبولین ۱/۷۳±۱۱/۴۸ گرم بر دسی‌لیتر در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره سرخارگل بر کیلوگرم غذا و کمترین آن ۰/۹۵±۱۰/۴۰ گرم بر دسی‌لیتر در گروه شاهد مشاهده گریدند.دامنه تغییرات گلبول‌های قرمز (RBC_S)، تغییرات گلبول‌های سفید (WBC_S)، میزان هموگلوبولین (Hb) و درصد هماتوکریت (HCT) برای تیمارهای مختلف چای سبز در نمودار ۱ نشان داد که اضافه نمودن عصاره چای سبز منجر به افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید، درصد هماتوکریت و مقدار هموگلوبولین در مقایسه با گروه شاهد شد ($P<0/05$).

دامنه تغییرات گلبول قرمز به‌شکلی بود که بیشترین مقدار آن در تیمار میلی‌گرم عصاره چای سبز بر کیلوگرم غذا به‌میزان ۰/۱±۲۳/۷ و کمترین آن در گروه شاهد با میزان ۰/۸±۹/۷ میلیون در میکرولیتر اندازه‌گیری شد. بیشترین مقدار گلبول سفید در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره چای سبز بر کیلوگرم غذا به‌میزان ۰/۵±۲۱۳/۲ و کمترین آن در گروه شاهد به‌میزان ۰/۳±۱۵۲/۳هزار در میکرولیتر محاسبه شد.



نمودار ۱. مقایسه میانگین گلبول قرمز، گلبول سفید، هماتوکریت و هموگلوبین در تیمارهای مختلف آزمایشی(n=۳). داده‌های نمودار بر اساس میانگین داده ها± خطای استاندارد می‌باشد. ستون‌های دارای حروف غیر مشابه با هم اختلاف معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۵ درصد دارند. تیمار ۱ تا ۴ بترتیب حاوی ۰،۵۰،۰ ۱۰۰و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره چای سبز، سرخارگل و سیر می‌باشد.

۱-۳-۲- نتایج هماتولوژی

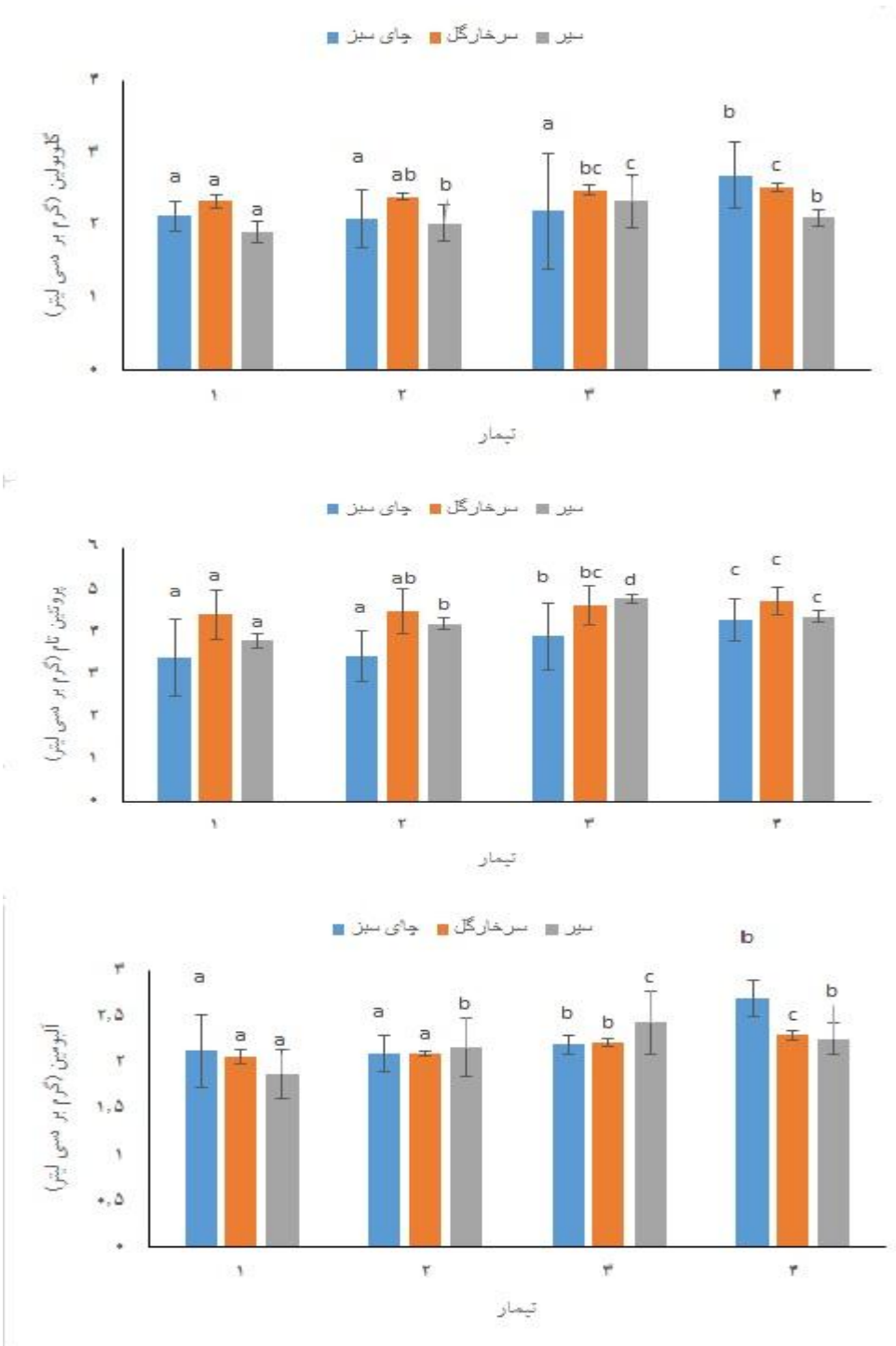
بر اساس نتایج کمترین مقدار گلبول‌های قرمز متاثر از جیره غذایی ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره سیر بر کیلوگرم غذا به میزان قابل توجهی (۰/۳۱ میلیون در میکرولیتر) از بیشترین مقدار آن متاثر از عصاره گیاه سرخارگل بیشتر است. ولی با توجه به نتایج چای سبز و افزایش ۱۰ برابری به نسبت دو عصاره دیگر، این نکته موید آن است که در شرایط یکسان اثر عصاره چای سبز در مقایسه با گیاه سرخارگل و سیر در اریتروپوئزیس ماهی کفال بیشتر است. به‌تبع میزان هموگلوبولین کفال ماهیان متاثر از چای سبز به‌خصوص در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره چای سبز بر کیلوگرم غذا به‌میزان ۷-۵ گرم در دسی‌لیتر از تیمارهای سیر و سرخارگل بیشتر است. از طرفی میزان تولید گلبول سفید در کفال ماهی متاثر از عصاره گیاه سیر قریب به ۷۰ هزار در میکرولیتر بیشتر از عصاره‌های گیاهان سرخارگل و چای سبز می‌باشد.

۳-۳- شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون

میزان پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین سرم خون در تیمارهای تغذیه شده با عصاره سیر افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد ($P<۰/۰۵$) و بین میزان پروتئین تام تیمارهای تغذیه شده با عصاره سیر نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (نمودار ۲) در حالی‌که میزان آلبومین و گلوبولین در تیمارهای حاوی ۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره سیر بر کیلوگرم غذا اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($P>۰/۰۵$). همچنین بالاترین میزان پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین در تیمار حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره سیر بر کیلوگرم غذا مشاهده شد ($P<۰/۰۵$).

میزان پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین سرم خون در تیمارهای تغذیه شده با ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره سرخارگل افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد ($P<۰/۰۵$) و بین میزان پروتئین تام تیمارهای تغذیه شده با ۵۰ . ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره سرخارگل نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. همچنین بالاترین میزان پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره سیر بر کیلوگرم غذا مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). تفاوت معنی‌داری در میزان گلوبولین تیمارهای تغذیه شده با عصاره سرخارگل با گروه شاهد مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$).

اثرعصاره چای سبز بر پروتئین تام، آلبومین وگلوبولین سرم خون ماهی کفال خاکستری در نمودار ۲ نشان داده شده است. میزان پروتئین تام و آلبومین سرم خون در تیمارتغذیه شده با۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره چای سبز افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد($P<۰/۰۵$) و میزان گلوبولین تیمارهای تغذیه شده با ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره چای سبز اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد نشان نداد ($P>۰/۰۵$). بالاترین میزان پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره چای سبز بر کیلوگرم غذا مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). تفاوت معنی‌داری در میزان آلبومین تیمارهای تغذیه شده با ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره چای سبز مشاهده نشد.



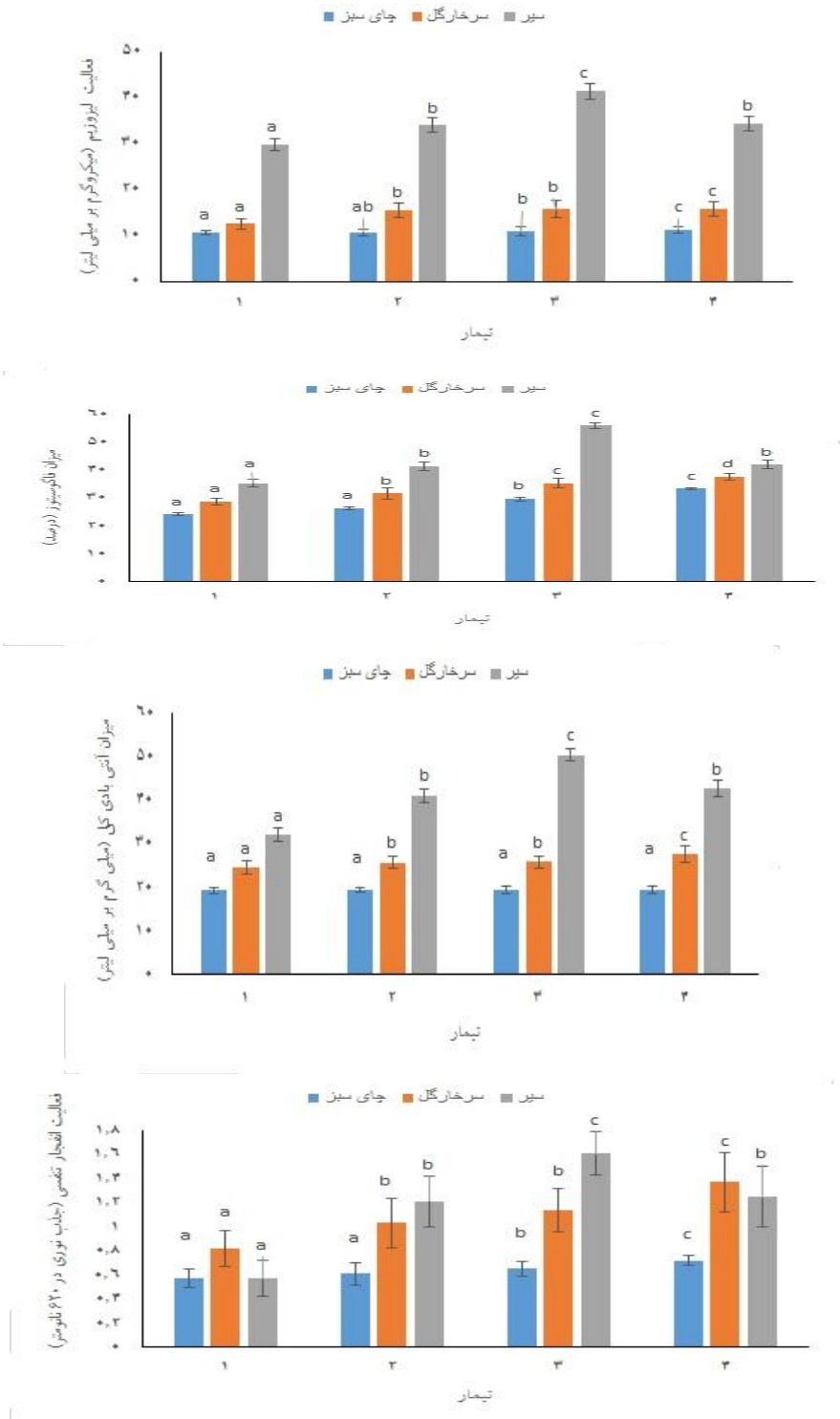
نمودار۲. مقایسه میانگین گلوبین، پروتئین تام و آلبومین در تیمارهای مختلف آزمایشی(n=۳). داده های نمودار بر اساس میانگین داده ها± خطای استاندارد می باشد. ستون‌های دارای حروف غیر مشابه با هم اختلاف معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۵ درصد دارند. تیمار ۱ تا ۴ بترتیب حاوی ۰،۵۰،۰ ۱۰۰و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره چای سبز، سرخارگل و سیر می باشد.

۱-۳-۳- نتایج سرمی

نتایج پروتئین سرمی نشان داد که میزان پروتین تام سرمی ماهیان کفال متاثر از غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا عصاره های گیاه سیر و سرخارگل بدون تفاوت معنی دار حدود ۴/۷ گرم در دسی‌لیتر اندازه-گیری شد در حالی‌که این میزان در چای سبز ۰/۳ گرم در دسی‌لیتر حدودا کمتر است. در خصوص مقدار گلوبولین می‌توان اذعان داشت که با توجه به مقدار ۰/۱±۲/۷ گرم در دسی‌لیتر تیمار در۲۰۰ میلی‌گرم عصاره چای سبز بر کیلوگرم غذا به ترتیب مقادیر آن در ماهی کفال متاثر از عصاره‌های سرخارگل و سیر ۰/۲ کاهش نشان می‌دهد. میزان آلبومین در ماهی کفال متاثر از تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره سیر بر کیلوگرم غذا بدون تفاوت معنی‌داری از سرخارگل به نسبت از عصاره چای سبز بیشتر بوده است. این نتایج نشان می‌دهد نقش و تاثیر سیر و سرخارگل در تحریک ایمنی غیراختصاصی بیشتر از چای سبز است ولی با توجه به نتایج مقدارگلبول‌های سفید چنین به‌نظر می‌رسد نقش سیر در القا سیستم ایمنی غیراختصاصی به‌مراتب بیشتر از عصاره سرخارگل است.

۴-۳- شاخص‌های ایمنی

تغییرات میانگین فعالیت لیزوزیم، آنتی‌بادی کل، میزان فاگوسیتوز و انفجار تنفسی ماکروفاژها در نمودار ۳ نشان داده است که تیمارهای حاوی عصاره سیر افزایش معنی‌داری را در شاخص‌های فوق الذکر در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند ($P<۰/۰۵$). بالاترین میزان فعالیت لیزوزیم ۱/۸۵ ±۷/۳۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر، میزان فاگوسیتوز (۱/۵۵±۵۶ درصد) و انفجار تنفسی (۰/۱۸±۱/۶۱ جذب نوری در ۶۲۰ نانومتر) در تیمار حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره سیر در هر کیلوگرم غذا مشاهده گردید. بالاترین میزان فعالیت لیزوزیمی متاثر از عصاره گیاه سرخارگل در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا به میزان ۱/۱۳ ±۱۵/۷۳ میکروگرم در میلی‌لیتر و متاثر از گیاه چای سبز ۰/۳ ±۱۱/۶ در غلظت مشابه ثبت گردید. فعالیت فاگوسیتوزیس و انفجار تنفسی در گیاه سیر در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا به‌مراتب بیشتر از گیاه سرخارگل و چای سبز می‌باشد.



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 می‌باشد. ستون‌های دارای حروف غیر مشابه با هم اختلاف معنی داری در سطح اطمینان ۹۵ درصد دارند. تیمار ۱ تا ۴ به‌ترتیب حاوی ۰،۵۰،۰ ۱۰۰و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره چای سبز، سرخارگل و سیر می‌باشد.

۱-۴-۳- نتایج ایمنی

با توجه به نتایج به‌نظر می‌رسد فعالیت لیزوزیمی و فاگوسیتوزیسی که یکی از شاخص‌های مهم ایمنی غیر اختصاصی در آبزیان تلقی می‌شود متاثرتر از سیر می‌باشد.

۴- بحث

تغییرات شاخص‌های رشد در بین تیمارهای مختلف در این تحقیق، نشان داد که اضافه نمودن ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره چای سبز در هر کیلوگرم جیره غذایی، منجر به افزایش معنی‌داری در مقادیر وزن نهایی (FW)، میزان غذای دریافتی (VFI)، میزان کارایی پروتئین و نرخ رشد روزانه (DGR) در مقایسه با تیمار شاهد شد ($p<۰/۰۵$). به‌نظر می‌رسد وجود عصاره چای سبز در جیره‌های غذایی باعث شده تا در فرآیند متابولیسم، پروتئین مسیر اصلی خود یعنی مسیر سنتز بافت را طی نموده و به شکل پروتئین ذخیره گردد (Ebrahimi Dorche Shalaby et al., 2006 ; et al., 2013). در نتیجه از نظر عددی بهترین راندمان پروتئین (PER) در تیمار های حاوی عصاره چای سبز در این تحقیق مشاهده شد و تیمار حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره چای سبز بر کیلوگرم غذا منجر به ایجاد بهترین عملکرد رشد در کفال ماهیان خاکستری به مدت ۶۰ روز در این تحقیق شده است. Abdel-Tawwab و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که استفاده از غلظت ۰/۲۵ تا ۲ گرم عصاره چای سبز در کیلوگرم غذا منجر به بهبود شاخص‌های رشد در ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) گردید می‌توان گفت که epigallocatechin-3 gallate موجود در چای سبز منجر به افزایش رشد و بهبود عملکرد رشد گردید (Thawonsuwan et al.,2010) . که با نتایج به‌دست آمده از این تحقیق همخوانی داشت. Nootash و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که استفاده از ۱۰۰ میلی گرم عصاره چای سبز در هر کیلوگرم غذا ماهی قزل آلای رنگین کمان منجر به بهبود وضعیت ایمنی و بیوشیمیایی شد ولی بر روی رشد تاثیر گذار نبود. همچنین Hwang و همکاران (۲۰۰۴)با بررسی اثر عصاره اتانولی چای سبز در جیره غذایی سنگ ماهی *Sebastes schlegel* و Cho و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی اثر چای سبز بر روی کفشک ماهی زیتونی (*Paralichthys olivaceus*) دریافتند که تیمارهای تغذیه شده با چای سبز میزان رشد کمتری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان دادند که با نتایج به‌دست آمده از این تحقیق همخوانی ندارند می توان گفت دلیل این اختلاف وابسته به گونه، غلظت، نوع عصاره چای سبز(آبی یا متانولی)، طول دوره تغذیه داشته لذا لازم است که تحقیقات متعددی در زمینه دستیابی به غلظت بهینه و مدت زمان استفاده از عصاره برای هر گونه ماهی صورت گیرد (Hwang et al.,2004).

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. 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 خوک، 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

اضافه نمودن ۲۰۰ میلی گرم عصاره سیر به هر کیلوگرم جیره غذایی، منجر به افزایش معنی داری در مقادیر وزن نهایی(FW)، میزان غذای دریافتی (VFI) و نرخ رشد روزانه (DGR) در مقایسه با تیمار شاهد شد($p<۰/۰۵$) .همچنین بررسی شاخص های تغذیه نشان داد که راندمان پروتئین در تیمارهای حاوی عصاره سیر افزایش معنی داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد و این روندافزایش منظم و تدریجی بود ($P<۰/۰۵$). از نظر عددی بهترین راندمان پروتئین (PER) در تیمار های حاوی عصاره سیر در این تحقیق مشاهده شد بدین ترتیب با توجه به عدم اختلاف معنی دار شاخص های تغذیه و رشد در بین تیمارهای حاوی ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم عصاره سیر بر کیلوگرم غذا با تیمار شاهد می توان گفت که تیمار حاوی ۲۰۰ میلی گرم عصاره سیر بر کیلوگرم غذا منجر به ایجاد بهترین عملکرد رشد در کفال ماهیان خاکستری به مدت ۶۰ روز در این تحقیق شده است. در حالی که سطوح پایین تر عصاره سیر تاثیر چندانی بر عملکرد رشد ماهی نداشته است. در تحقیقی که در ارتباط با اثر غلظتهای مختلف اسانس سیر (۵۰mg/kg، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰) بر روی شاخص های رشد ، تغذیه و ترکیب شیمیایی لاشه فیل ماهی (Huso huso) انجام شد، بیشترین میزان افزایش وزن، بهترین درصد راندمان پروتئین، بالاترین نرخ تولید پروتئین، کمترین ضریب مصرف غذا و بیشترین میزان پروتئین لاشه در ماده خشک در تیمار حاوی mg/kg ۱۵۰ اسانس سیر مشاهده شد و با سایر تیمارها تفاوت معنی دار داشت (Ebrahim Ebrahimi et al., 2013). در تحقیقی دیگر، اثر عصاره سیر بر رشد پست لارو یک روزه میگوی وانامی(Litopenaeus vannamei) با غلظت های مختلف (۲۰۰ mg/l، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰)، پست لاروهای تغذیه شده با ناپلئوس آرتمیای غنی شده با ۲۰۰ mg/L عصاره سیر از وزن و طول بیشتری در مقایسه با سایر تیمارها برخوردارربوده و نرخ رشد ویژه کلیه تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی داری را نشان داد (Javadzadeh et al., 2012). که با نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی داشت. در پژوهشی دیگر نیز بر روی ماهی خاویار استرلیاد (Acipenser ruthenus) مشخص شد که جیره حاوی٪ ۰/۵ عصاره سیر منجر به بهبود عملکرد رشد ، تغذیه شد (Lee et al., 2012). همچنین عصاره سیر (۳۰ g/kg) در تیلاپیای نیل (Oreochromis niloticus) منجر به افزایش وزن، کارایی پروتئین بهبود ضریب تبدیل غذا گردید (Shalaby et al., 2006). برخلاف این نتایج، Nwabueze در سال ۲۰۱۲ با بررسی

اثر سیر بر رشد گربه ماهی آفریقایی (Clarias gariepinus) نشان داد که هیچگونه اثر تحریک کنندگی بر رشد در این گونه گزارش نشد(Nwabueze, 2012) که یافته های ایشان با برخی از نتایج پژوهش حاضر و تحقیق های مشابه همخوانی ندارد. که علت آن می تواند ناشی از اختلاف در گونه های مورد آزمایش، سن یا اندازه ماهیان مورد آزمایش، شرایط آزمایش و یا نحوه استفاده از سیر (پودر شده یا بصورت عصاره) باشد (Akrami et al.,2015).

وظیفه اصلی سلولهای قرمز خون یا اریتروسیت ها حمل و انتقال گاز اکسیژن در سزاسز بدن است. تعیین تعداد سلولهای قرمز خون اهمیت زیادی در فیزیولوژی و کلینیک داشته 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 چای سبز باعث افزایش تدریجی و منظم تعداد گلبول های قرمز، تعداد گلبول های سفید، درصد هماتوکریت و میزان هموگلوبین در تیمارهای مختلف آزمایش شد با نتایج بدست آمده از این تحقیق، می توان بیان نمود که استفاده از عصاره چای سبز می تواند بر روی کارایی فعالیت هماتوپوئیتیک (خون سازی) بچه ماهی کفال خاکستری موثر باشد و بعنوان محرک ایمنی عمل نموده و منجر به افزایش تعداد گلبول سفید خون ماهی می گردد(Jian and Wu.2003) می توان گفت که وجود ترکیبات فنلی در این گیاه موجب افزایش گلبول سفید و در نتیجه بهبود ایمنی غیر اختصاصی ماهی شده است (Sheikhzadeh et al.,2011). Sheikhzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که استفاده ۱۰۰ میلی گرم چای سبز فاقد کافئین به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی ماهی قزل آلای رنگین کمان منجر به افزایش معنی دار فعالیت لیزوزیم و آگلوتیناسیون اریتروسیت ها در ماهی شد همچنین Abdel Tawab و همکاران (۲۰۱۰) گزارش نمودند که استفاده از غلظت ۰/۲۵ تا ۲ گرم عصاره چای سبز در کیلوگرم غذا منجر به بهبود شاخصهای هماتولوژی در ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) گردید که با نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی دارند. از آنجاییکه تاکنون مطالعه اندکی در زمینه اثر عصاره چای سبز بر هماتولوژی ماهی صورت گرفته است. لذا نتایج با عصاره گیاهان دارویی دیگر مقایسه گردید. 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. می توان گفت که گیاهان دارویی با تاثیر بر سلولهای خونی منجر به افزایش عملکرد سیستم ایمنی ماهی می گردند. (Oskoii et al.,2012).

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 موث 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).

میزان گلبول های قرمز در تیمارهای مختلف آزمایشی تغییر معنی داری را نشان دادند (P<۰/۰۵) و افزودن عصاره سیر باعث کاهش تعداد گلبول های قرمز در تیمارهای مختلف آزمایش شد . تحقیقات صورت گرفته بر روی ماهی تیلاپیا و فیل ماهی به بررسی اثر سیر به عنوان یک ماده محرک رشد و سیستم ایمنی پرداختند و گزارش کردند که افزایش میزان سیر در جیره غذایی، سبب افزایش سطح گلبول های قرمز در این ماهیان گردید (Shalaby et al.,2006;Nobahar et al.,2014) می توان گفت که افزایش شاخص های خونی مربوط به واکنش دفاعی بدن در برابر سیر است که با تحریک خونسازی توام می باشد (Fazlolahzadeh et al.,2011) . همچنین تنگستانی و همکاران در سال ۱۳۹۰ گزارش کردند که افرودن اسانس سیر با غلظت های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵ و ۰/۲۰ گرم بر کیلوگرم غذا منجر به کاهش در تعداد گلبولهای قرمز فیل ماهی (Huso huso) گردید اما این کاهش معنی دار نبود (تنگستانی و همکاران، ۱۳۹۰)..دلیل این اختلاف ها می تواند ناشی از عوامل مختلف از جمله شرایط آزمایش، گونه ماهی، سطوح مختلف سیر باشد. Nakagawa و همکاران در سال ۱۹۸۰ نیز در بررسی اثر سیر خام در جیره غذایی موش ها نشان دادند که سیر منجر به کاهش معنی دار تعداد گلبول های قرمز شد (P<۰/۰۵) که با نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی دارد. همچنینIrkin و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که اضافه نمودن ۴ الی ۶ درصد پودر سیر در جیره غذایی ماهی باس دریایی (Dicentrachus labrax) منجر به

کاهش میزان گلبولهای گردید بنابر این می توان نتیجه گرفت مواد محرک سیستم ایمنی، لزوما نمی توانند اثر معنی داری بر شاخص های هماتولوژیک از جمله تعداد گلبول های قرمز، میزان هماتوکریت و هموگلوبین داشته باشند (Shalaby et al.,2006). گلبول های سفید (لوکوسیت ها) بعنوان سد اولیه دفاعی بدن می باشد که با افزایش عفونت باکتریایی تعداد گلبول های سفید خون 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). دامنه تغییرات گلبول های سفید (WBC_S) در این تحقیق، بین ۲۸/۳۱ – ۲۲/۳۶ هزار بر میکرولیتر خون بدست آمد. تعداد گلبول های سفید از تیمار شاهد تا تیمار حاوی ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره سیر بطور منظم و تدریجی افزایش یافته و پس از آن در سطوح بالاتر عصاره سیر(۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم غذا) کاهش یافته است. و تعداد کل گلبول های سفید، بین تیمار شاهد و تیمار ۴ اختلاف معنی داری را نشان نداد ($P>۰/۰۵$). میزان هموگلوبین در تیمارهای مختلف تفاوت معنی داری نشان داد ($P<۰/۰۵$). محدوده مقدار هموگلوبین در خون ماهیان مورد بررسی در این تحقیق ۶/۷۴-۷/۶۸ گرم بر دسی لیتر بود. کمترین میزان هموگلوبین در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره سیر و بالاترین میزان آن در تیمار حاوی ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره سیر اندازه گیری شد. تغییرات میزان هموگلوبین در تیمارهای مختلف نیز روند خاصی را نشان نداد. کمترین میزان هماتوکریت در تیمار شاهد (۱/۴۹±۲۴/۴۲ درصد) و بالاترین میزان آن در تیمار حاوی ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره سیر (۱/۱۲±۲۸/۶۸ درصد) اندازه گیری شد. می توان گفت که میزان هموگلوبین و هماتوکریت تابعی از تغییرات گلبول قرمز و در رابطه مستقیم با آن می باشد (تنگستانی و همکاران،۱۳۹۰). تنگستانی و همکاران در سال ۱۳۹۰ نشان دادند که کمترین میزان هماتوکریت در تیمار حاوی ۰/۲ گرم بر کیلوگرم اسانس سیر و بالاترین میزان آن در تیمار حاوی ۰/۰۵ گرم بر کیلوگرم اسانس سیر مشاهده شد در حالیکه تغییرات میزان هموگلوبین، گلبول سفید و هماتوکریت در تیمارهای مختلف تفاوت معنی داری را نشان نداد می توان استنباط نمود که شاید دوز و میزان دوره استفاده از عصاره در این تحقیق، به اندازه ای نبوده که منجر به افزایش وتعداد گلبولهای سفید خون گردد که با یافته های این تحقیق همخوانی نداشت. درحالیکه Nobahar و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارش کردند که میزان گلبول سفید فیل ماهی تغذیه شده با سیر بالاتر از گروه شاهد بود و اختلاف معنی داری را نشان داد همچنین Shalaby و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که میزان هموگلوبین و هماتوکریت در تیلاپیای نیل تغذیه شده با سیر افزایش معنی داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد که با یافته های حاصل از این تحقیق همخوانی داشتند.

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 چای سبز 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 چای سبز در هر کیلوگرم غذا مشاهده شد.Nootash و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که استفاده از ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم عصاره چای سبز در کیلوگرم غذا منجر به افزایش معنی دار پروتئین تام در سرم ماهی قزل آلای رنگین کمان در مقایسه با تیمار شاهد شد و ۲۰ استفاده از میلی گرم عصاره در جیره غذایی تفاوت معنی داری را با تیمار شاهد نشان نداد که با نتایج بدست آمده از این تحقیق همخوانی داشت همچنین Abdel-Tawwab و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که استفاده از عصاره چای سبز (۰/۲۵ -۲ گرم عصاره بر کیلوگرم غذا) منجر به بهبود پارامترهای بیوشیمیایی ماهی تیلاپیا نیل گردید. همچنین استفاده از پودر چای سبز توسط موش های نر منجر به افزایش پروتئین پلاسما گردید (Hasegawa et al.,2003) می توان گفت که ترکیبات فلاونوئیدی موجود در چای سبز با نقش مهمی در برخی از عملکردهای بیولوژیکی بدن بعنوان سنتز پروتئین دارند (Carlo et al.,1999) 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 گلوبولین تغییر می کند (Akrami et al.,2015) همچنین میزان آلبومین و گلوبولین 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 ئ 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 گلوبولین سرم خون در تیمارهای تغذیه شده با ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم عصاره چای سبز افزایش معنی داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵) که یا تحقیق صورت گرفته توسط Abdel-Tawwab بر روی تیلاپیا نیل همخوانی داشت.

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 ئ 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 گلوبولین 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 گلوبولین 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 گلوبولین در مقایسه یا گروه شاهد شد. این امر نشان داد که آنتی‌بادی اکثرا در بخش گاما گلوبولین پروتئین سرم واقع شده است. بنابر این افزایش این بخش منجر به عملکرد بیشتر سیستم ایمنی می گردد.

نتایج حاصل از این تحقیق، نشان داد که میزان پروتئین تام سرم در تیمارهای حاوی تغذیه شده با عصاره سیر افزایش معنی داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد و بالاترین میزان پروتئین تام در تیمار حاوی ۱۰۰ میلی گرم عصاره سیر به ازای هر کیلوگرم غذا مشاهده شد . Shalaby و همکاران در سال ۲۰۰۶ نیز نشان دادند که استفاده از ۲۰ و ۳۰ گرم سیر به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی منجر به افزایش معنی دار پروتئین پلاسما ماهی تیلاپیا نیل (Oreochromis niloticus)در مقایسه با تیمار شاهد گردید در حالیکه این تفاوت در تیمار حاوی ۴۰ گرم سیربر کیلوگرم غذا معنی دار نبود که با نتایج حاصل از این یافته همخوانی دارد. همچنین Hussein و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که استفاده از اسانس سیر منجر به افزایش معنی دار پروتئین پلاسما موش در مقایسه با تیمار شاهد گردید. در یافته های حاصل از این تحقیق، میزان آلبومین و گلوبین سرم خون در تیمارهای تغذیه شده با عصاره سیر افزایش معنی داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد(P<۰/۰۵) ولی میزان آلبومین و گلوبین در تیمارهای حاوی ۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم عصاره سیر بر کیلوگرم غذا اختلاف معنی داری را نشان نداد (P>۰/۰۵)که با نتایج حاصل از تحقیق Sahu و همکاران در سال ۲۰۰۷ بر روی بر روی ماهی روهو Labeo rohita همخوانی داشت. Sahu و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که اضافه نمودن ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد سیر به جیره غذایی منجر به افزایش معنی دار پروتئین پلاسما و گلوبین در مقایسه با تیمار شاهد در ماهی کپور روهو گردید. Samadi و همکاران (۲۰۱۲) در ارتباط با مقدار پروتئین کل پلاسما روند افزایشی را در میگوی پا سفید غربی Litopenaeus vannamei با افزایش سطح عصاره سیر در جیره نشان داد همچنین Tallpuur و Ikhwanuddin گزارش

نمودند که میزان پروتئین کل پلاسما در تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی پودر سیر اختلاف معنی داری را نسبت به گروه کنترل در بچه ماهی باس دریایی (Dicentrachus labrax) نشان داد که مطابق با نتایج مطالعه حاضر بوده است. در حالیکه Nya و Austin در سال ۲۰۱۱ پس از افزودن سیر به جیره غذایی قزل آلای رنگین کمان گزارش نمودند که تاصیر معنی داری از لحاظ میزان پروتئین پلاسما در خون در تیمارهای تغذیه شده با پودر سیر نسبت به گروه کنترل دیده نشد اختلاف مطالعه فوق با تحقیق حاضر می تواند مربوط به شرایط کیفیتی در آزمایش باشد.

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 چای سبز نشان داد که در انتهای آزمایش (پس از دو ماه)، میزان فعالیت لیزوزیم در تیمار های حاوی ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم عصاره بر کیلوگرم غذا افزایش معنی داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد و با افزایش غلظت عصاره در جیره غذایی ماهیان، فعالیت لیزوزیم نیز افزایش یافت ولی بین تیمار حاوی ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم عصاره این اختلاف معنی دار نبود. که با نتایج بدست آمده از تحقیقAbdel-Tawwab و همکاران (۲۰۱۰) بر روی ماهی تیلاپیایی نیل همخوانی دارد. آنها گزارش کردند که استفاده از عصاره چای سبز 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). همچنین استفاده از مکمل چای سبز در جیره غذایی، منجر به افزایش پاسخ ایمنی سلولار ، هومورال و مقاومت در برابر بیماری ویبریوزیزدر ماهی هامور (*Epinephelus bruneus*) گردید (Harikishnan et al.,2011) که با نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی دارد وجود ترکیباتی چون آلکلوئیدها ، اسید های ارگانیک موجود در چای سبز می تواند اثر مهمی در افزایش ایمنی سلولار و هومورال گردند(Harikishnan et al.,2011).

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 داد و با افزایش غلظت عصاره در جیره غذایی ماهیان، فعالیت لیزوزیم نیز افزایش یافت 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).

ماهیها برای مقابله با هجوم عوامل بیماریزا به سیستم ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی خود وابسته هستند بعنوان مثال، آنزیم لیزوزیم که در گرانول های لکوسیت های نوتروفیل وجود دارد، با اثر بر دیواره سلولی با کتریها و هیدرولیز زنجیرهای بتای ۱ تا ۴ ان استیل مورامیک اسید (β- (1-4)N-acetyl muramic and 2-acetyllamino-2-deoxy- D-glucose) و ان استیل گولوکوزامین موجود در لایه پپتیدوگلیکان باکتریهای گرم مثبت می شود (Hanief et al 2004) . همچنین فاگوسیتوزیس یکی از سازوکارهای دفاع سلولی غیر اختصاصی ماهی بر علیه عوامل بیماریزا از جمله باکتریها، ویروسها و انگلها می باشد. در طی روند فاگوسیتوز هم مصرف اکسیژن و هم تولید میانجی های مواد واسطه ای اکسیداتیو مانند یون سوپر اکسید (O_2^-)، هیدروژن پراکسیداز (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH) را افزایش می دهند این پاسخ موجب افزایش شدیدی در مصرف اکسیژن شده و در نتیجه این واکنش، انفجار تنفسی نام گرفته است. که برای فعالیت باکتری کشی اهمیت دارد. (Secombes and Fletcher . 1992)نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اضافه نمودن عصاره سیر به جیره غذایی منجر به افزایش معنی دار فعالیت لیزوزیم پلاسما، آنتی بادی کل پلاسما ، انفحار تنفسی و فعالیت فاگوسیتوز ماکروفاژهای کلیه در مقایسه با تیمار شاهد در ماهی کفال خاکستری گردید و بیشترین میزان شاخص های فوق الذکر در تیمار حاوی ۱۰۰ میلی گرم عصاره سیر در هرکیلوگرم جیره غذایی مشاهده شده و بین تیمار حاوی ۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم عصاره سیر در هر کیلوگرم غذا تفاوت معنی داری مشاهده نشد. گونه های جنس Allium با افزایش پاسخ های ایمنی از قبیل افزایش سنتز لنفوسیت ها، افزایش رها سازی سیتوکین، افزایش فاگوسیتوزیس نقش مهمی را در بهبود سیستم ایمنی ایفا می کنند. Sahu و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش نمودند که استفاده از عصاره سیر با دوزهای ۱، ۵ و ۱۰ گرم به ازای هر کیلوگرم غذا منجر به افزایش معنی داری سوپر اکسید آنیون، فعالیت لیزوزیم، پروتئین تام، آلبومین و فعالیت باکتریسیدال سرم ماهی روهو (Labeo rohita) در مقایسه با شاهد شد(Sahu et al.,2006) که با یافته های حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. همچنین Ndong و Fall در سال ۲۰۱۱ با بررسی اثر عصاره سیر روی رشد و پاسخ ایمنی هیبرید تیلاپیا (O.niloticus×O.aureus) نشان دادند که اضافه نمودن ۰/۵ گرم بر کیلوگرم سیر باعث افزایش معنی دار تعداد لکوسیت ها، انفجار تنفسی، فعالیت فاگوسیتوز و فعالیت لیزوزیم گردید می توان گفت که ترکیب S-allylcystein موجود در سیر متابولیسم سلول های سرطانی جلوگیری کرده و باعث بهبود پاسخ های ایمنی می شود(Sumiyoshi ,1997). آنتی بادی کل (IgM) ماهیان استخوانی و آنتی بادی IgM پستانداران از نظر ساختار و ویژگیهای فیزیولوژیکی مشابه هستند و به عنوان یکی از مولکولهای تاثیر گذار بر ایمنی در خون ماهی نقش مهمی را بازی می نماید (Eliis,1999 ;Wison et al.,1995;Sun et al.,2012) تحقیقات متعدد نشان دادند که سطوح IgM سرم ماهیان رابطه زیادی با عواملی نظیر سن، شرایط محیطی، وضعیت سلامت ماهی ، استفاده از مواد مختلف محرک ایمنی و غلظت و زمان اجرا دارد (ottir

(Magnadotiir et al.,1999; Picchitti et al.,2001;Klesius,1990). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اضافه نمودن ۱۰۰ میلی گرم عصاره سیر بر کیلوگرم جیره غذایی بالاترین میزان IgM پلاسما را در مقایسه با تیمارهای مختلف نشان داد. Awad و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند که استفاده از ۱۰ درصد شنبلیله (Trigonella foenum) در جیره غذایی ماهی سیم دریایی (Sparus aurata) منجر به افزایش معنی دار IgM سرم در مقایسه با تیمار شاهد شد همچنین Verma و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که اضافه نمودن ۵ درصد عصاره ریشه انجیر هندی نیز منجر به افزایش معنی دار IgM سرم ماهی سر ماری (Channa punctatus) در مقایسه با تیمار شاهد شد که با این تحقیقات نشان می دهد که افزایش IgM سرم ماهی با اضافه نمودن مکمل گیاهان دارویی در ارتباط می باشد.

گیاهان دارویی 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 چای سبز نشان داد که در انتهای آزمایش (پس از دو ماه)، میزان IgM با افزایش غلظت عصاره در جیره غذایی ماهیان، میزان آن نیز افزایش یافت ولی افزایش معنی داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان نداد. می توان گفت که دلیل این اختلاف می تواند مربوط به گونه ماهی، غلظت عصاره گیاهی و نوع عصاره مورد استفاده متفاوت باشد(Yin et al.,2009).

فرآیند فاگوسیتوز و فعالیت کشندگی توسط سلولهای فاگوسیت کننده ، یکی از مهمترین مکانیسم 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 ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم عصاره چای سبز بر کیلوگرم غذا افزایش معنی داری را در درصد فاگوسیتوزی و میزان انفجار تنفسی در مقایسه با تیمار شاهد نشان دادند ($P<۰/۰۵$). بالاترین میزان فاگوسیتوزو انفجار تنفسی در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی گرم عصاره چای سبز در هر کیلوگرم غذا مشاهده شد. نتایج حاضر با مطالعات Harikishnan همکاران (۲۰۱۱) بر اثر عصاره چای سبز بر روی ماهی هامور(*Epinephelus bruneus*) همخوانی دارد.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که میزان آنتی بادی کل (IgM) در تیمارهای تغذیه شده با جیره غذایی حاوی عصاره سرخارگل نشان داد که در انتهای آزمایش (پس از دو ماه)، میزان IgM افزایش معنی داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد 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 معمی 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 آلکامیدهای موجود در گیاه می باشد (Aly et al.,2009).

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 آلکامیدهای 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.

۵- نتیجه گیری کلی

در کل نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اضافه نمودن 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 ماهی کفال خاکستری در مقایسه با تیمارشاهد گردید. افزایش عصاره سیر به جیره غذایی از ۵۰ تا ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، سبب کاهش معنی‌دار در تعداد اریتروسیت‌ها نسبت به گروه شاهد گردید تعداد گلبول های سفید از گروه شاهد تا تیمار حاوی ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره سیر به‌طور منظم و تدریجی افزایش یافته و پس از آن در سطوح بالاتر عصاره سیر(۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم غذا) کاهش یافته است. کمترین میزان هموگلوبولین در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره سیر و بالاترین میزان آن در تیمار حاوی ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره سیر اندازه گیری شد. تغییرات میزان هموگلوبولین در تیمارهای مختلف نیز روند خاصی را نشان نداد. کمترین میزان هماتوکریت در گروه شاهد (۱/۴۹±۲۴/۴۲ درصد) و بالاترین میزان آن در تیمار حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره سیر (۱/۱۲±۲۸/۶۸ درصد) اندازه گیری شد. میزان پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین سرم خون در تیمارهای تغذیه شده با عصاره سیر افزایش معنی داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد($P<۰/۰۵$). همچنین بالاترین میزان پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین در تیمار حاوی ۱۰۰ میلی گرم عصاره سیر بر کیلوگرم غذا مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). تیمارهای حاوی عصاره سیر افزایش معنی داری را در شاخص های فوق الذکر در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند ($P<۰/۰۵$) . بالاترین میزان فعالیت لیزوزیم (۱/۸۵±۴۱/۳۳ میکروگرم بر میلی لیتر)، آنتی بادی کل (۱/۳۳±۵۰/۳۳ میلی گرم بر میلی‌لیتر)، میزان فاگوسیتوز (۱/۵۵±۵۶ درصد) و انفجار تنفسی (۰/۱۸±۱/۶۱ جذب نوری در ۶۲۰ نانومتر) در تیمار حاوی ۱۰۰ میلی گرم عصاره سیر در هر کیلوگرم غذا مشاهده شد و بین تیمار حاوی ۵۰ میلی‌گرم عصاره سیر بر کیلوگرم غذا با تیمار حاوی ۲۰۰ میلی گرم عصاره سیر بر کیلوگرم غذا اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق می توان گفت که استفاده از ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا عصاره سیر در جیره غذایی ماهی کفال خاکستری به منظور افزایش رشد، عملکرد تغذیه ، ایمنی در صنعت آبزی پروری توصیه می-گردد.

اضافه نمودن ۲۰۰ میلی گرم عصاره سرخارگل و چای سبز 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 گلبول‌های قرمز نسبت به گروه شاهد گردید تعداد گلبول های سفید از گروه شاهد تا تیمار حاوی ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم سرخارگل و چای سبزبطور 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 گروه شاهد و بالاترین میزان آن در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم سرخارگل و چای

سبز اندازه گیری شد. میزان پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین سرم خون در تیمارهای تغذیه شده با عصاره سرخارگل افزایش معنی داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد($P<0/05$). همچنین بالاترین میزان پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی گرم سرخارگل و چای سبزبر کیلوگرم غذا مشاهده شد ($P<0/05$). 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 سرخارگل و چای سبز در هر کیلوگرم غذا مشاهده شد و بین تیمار حاوی ۵۰ میلی گرم عصاره سرخارگل بر کیلوگرم غذا با تیمار حاوی ۱۰۰ میلی گرم سرخارگل و چای سبز بر کیلوگرم غذا (به استثنای درصد فاگوسیتوز) اختلاف معنی داری مشاهده نشد($P>0/05$). با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق می توان گفت که استفاده از ۲۰۰ میلی گرم سرخارگل و چای سبز بر کیلوگرم جیره غذایی ماهی کفال خاکستری منجر به افزایش رشد، عملکرد تغذیه و ایمنی 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

- ابراهیمی،ع . ۱۳۸۵. تغذیه ونیازهای غذایی ماهیان درآبزی پروری، انتشارات جهاددانشگاهی واحدصنعتی اصفهان، ۳۰۴ صفحه.
- ابراهیمی،ع.، تنگستانی، ر.، علیزاده دوغیکلایی، ا. و زارع،پ.۱۳۹۱. اثر سطوح مختلف اسانس سیر بر رشد، تغذیه و ترکیب لاشه فیل ماهی (*Huso huso*). مجله علوم و فنون دریایی. شماره ۴. دوره ۱۱. صفحه ۱۲-۱.
- اهراب فرشبافی،م. ۱۳۹۰. تاثیر عصاره تام کافئین بر سیستم ایمنی غیر اختصاصی موکوس پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان. پایان نامه دکترای حرفه ای. ۱۲۰ صفحه.
- 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.
- تنگستانی،ر.علیزاده دوغیکلایی،ا.ابراهیمی،ع،زارع،پ. ۱۳۹۰اثرات اسانس گیاه سیر بر شاخص‌های هماتولوژیک فیل ماهیان پرورشی. مجله تحقیقات دامپزشکی. دوره ۶ شماره ۳ صفحه ۲۱۶-۲۰۹.
- جوادزاده، م.، سالارزاده،ع.،یحیوی،م.،حافظیه،م .درویش پور،ح.۱۳۹۰ اثر عصاره سیر روی رشد و بقاء پست لارو میگوی وانامی (*Litopenaeus vannami*)مجله تحقیقات شیلات ایران. شماره ۲۱.صفحه ۴۶-۳۹
- رضایی، م ه. سوری نژاد، ا. سلطانیان،س. یوسف زادی،م. ۱۳۹۲ تأثیرعصاره گیاه مورخوش *Zhumeria majdae*درجیره غذایی برشاخصهای رشد،خون شناسی وایمنی شناسی گربه ماهی *Pangasianodon hypophthalmus*. مجله بوم شناسی دوره ۱ شماره ۳. صفحه ۱۹-۸.
- 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.
- عسگریان، ف و کوشا، ۱.۱۳۸۵. مجموعه فیزیولوژی ماهی و آبزیان (جلد اول) استرس. دانشگاه آزاد واحد سوادکوه ۸۰ صفحه.
- 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.
- 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.

- 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.
- قاسمی پیر بلوطی، ع. پیر علی، ۱. پیشکار، غ. ر. جلالی،س.م. ع. رئیسی، م. جعفریان دهکردی، م. و حامدی،ب. ۱۳۹۰اثر اسانس چند گیاه دارویی بر سیستم ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان . مجله داروهای گیاهی. سال دوم، شماره ۲، صفحه ۱۵۵-۱۴۹.
- 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.
- Abdel-Tawwab, M., M. H. Ahmad, M. E. A . Seden & S. F. M. Saker, 2010. Use of green tea, *Camellia sinensis* L., in practical diet for growth and protection of Nile tilapia, *Oreochromisniloticus* (L.), against *Aeromonashydrophila* infection. Journal of the World Aquaculture Society, 41:203-213.
- Adams, C.A. 2005. Nutrition-basedhealth. Feed International, 2, 25-28.
- Ademiluyi, A. O., Oboh, G., Owoloye, T. R. and Agbebi, O. J. 2013. Modulatory effects of dietary inclusion of garlic (*Allium sativum*) on gentamycin-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 3(6): 470-475.
- Ademiluyi, A. O., Oboh, G., Owoloye, T. R. and Agbebi, O. J. 2013. Modulatory effects of dietary inclusion of garlic (*Allium sativum*) on gentamycin-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 3(6): 470-475.
- Agarwal, K.C. (1996). Therapeutic action of garlic constituents. Med. Res. Rev. 16: 111-124.
- Agarwal, K.C. 1996. Therapeutic action of garlic constituents. Med. Res. Rev. 16: 111-124.
- Ainsworth, A.J., 1994: ß-glucan inhibitable zymosan receptor on channel catfish neutrophils. Veterinary Immunology and Immunopathology, 41: 141-152.
- Ainsworth, A.J., 1994: ß-glucan inhibitable zymosan receptor on channel catfish neutrophils. Veterinary Immunology and Immunopathology, 41: 141-152.
- 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: 828-834.
- Akrami, R., Gharaei, A., Razeghi Mansour, M.and Galeshi,A. 2015. Effects of dietary onion (*Alliumcepa*) powder on growth, innate immune response and hematoebiochemical parameters of beluga (*Husohuso* Linnaeus, 1754) juvenile. Fish & Shellfish Immunology 45 2015. 828-834.
- 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 ofCarbohydrate Polymers. 86: 142– 146.
- 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.
- 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 andinduce the non-specific immunity system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal ofCarbohydrate Polymers. 86: 142– 146.
- Amend, D. F., 1981. "Potency testing of fish vaccines. International on fish biologics: serodiagnotics and vaccines.." Developments in Biological Standardization. 49: 447-454.
- Asadpour, R., Koochaki Panchah,F.,Sheikhzadeh,N. and Tayefi-Naserabadi,H.2012. Effects of decaffeinated green tea (*Camelliasinensis*) on reproductive characteristics and egg quality in rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*). Bulgarian Journal of Veterinary Medicine 15(4):246-253.

- Atamanalp, M., Angis, S., Oguzhan, P., Aksakal, E. 2008. Alterations in Hematological Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to DDVP, The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh 60(1), 9-12.
- Atamanalp,M. ,Angis, S. , Oguzhan, P. , Aksakal, E. (2008). Alterations in Hematological Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchusmykiss*) Exposed to DDVP, The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh 60(1), 9-12.
- Austin, B and Austin, D.A., 2007. Bacterial fish pathogens. Diseases of farmed and wild fish . Springer, pp.552
- Austin, B and Austin, D.A., 2007. Bacterial fish pathogens. Diseases of farmed and wild fish .Springer, pp.552.
- Austin, B and Austin, D.A., 2007. Bacterial fishpathogens. Diseases of farmed and wild fish .Springer, pp.552.
- Awad, E., Cerezuela, R. and Esteban, A. 2015. Effects of fenugreek (*Trigonella foenum* graecum) on gilthead seabream (*Sparus aurata*L.) immune status and growth performance Fish & Shellfish Immunology 45 454-464.
- 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
- 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.
- 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.
- 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 (*Oncorhynchusmykiss*). Journal of Fisheries, Iranian Journal of Natural Research ,63 (4): 271-286.
- 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.
- 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 andComparative Endocrinology. 124: 97-105
- 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.
- Basu, N., Nakano, T., Grau, E.G. and Iwama, G.L.2001 .The effect of cortisol on heat stock protein 70levels in two fish species. General and Comparative Endocrinology. 124: 97-105.
- 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.
- Burger R.A., Torres A.R., Warren R.P ,.Caldwell W.D. and Hughes B.G. 1997 .(Echinacea-induced cytokine production by humanmacrophage. International immunopharmacology ,19: 371-379.
- Burtis CA, Ashwood ER (1994) Tietz Textbook of Clinical Chemistry 2rd edn.W.B.Sunders Company. Philadelphia. USA
- Burtis, C.A., Ashwood, E. R. 1994. Tietz Textbook of Clinical Chemistry (2thed.).W.B.Sunders Company. Philadelphia. USA.
- Burtis, C.A., Ashwood, E. R. 1994. Tietz Textbook of Clinical Chemistry (2thed.).W.B.Sunders Company. Philadelphia. USA.
- Cabrera, C., R. Artacho & R. Gime´nez, 2006 . Beneficial effects of green tea – a review . Journal of the American College ofNutrition, 25, 79–99.
- Carlo GD, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sci 1999; 65: 337-353.
- 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.
- Chen X., Wu, Z. and Yin, J. 2003. Effects offour species of herbs on immune function of *Carassius* auratus gibelio. Journal of Fish Sciencesof China 10, 36-40.
- Chen, D., Ainsworth, A. J., 1992: Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, Ictalurus punctatus Rafinesque. Journal of Fish Diseases, 15: 295-299.
- Chen, D., Ainsworth, A. J., 1992: Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictaluruspunctatus* Rafinesque. Journal of Fish Diseases, 15: 295-299

- Cho SH, Lee SM, Park BH, Ji SC, Lee J, Bae J, et al. Effect of dietary inclusion of
- Chu, D. C. & L. R. Juneja, 1997. General chemical composition of green tea and its infusion. In: Chemistry and Application of Green Tea, eds T. Yamamoto, L. R . Juneja, D. C. Chu & M. Kim, CRC PressLLC, pp. 13–22.
- Crespy, V. & G. Williamson, 2004. A review of the health effects of green tea catechins in vivo animal models. American Society For Nutrition, 134, 3431–3440.
- Dahui, L., Wang Zaigui, W. and Yunhua, Z .2011. Antifungal activity of extracts bysupercritical carbon dioxide extraction from roots of *Echinacea angustifolia* and analysis oftheir constituents using gas chromatographymass spectrometry (GC-MS). Journal of Medicinal Plants Research. 5(23), pp. 5605-5610.
- Dalmo, R.A., Seljelid. R., 1995. The immunomodulatory effect of LPS, laminaran and sulphated laminaran (1, 3)-d-glukan] on Atlantic Salmon, S. salar, macrophages in vitro. Journal of Fish Diseases, 18: 175-185.
- Dalmo, R.A., Seljelid., R., 1995. The immunomodulatory effect of LPS, laminaran and sulphated laminaran [_(1,3)-d-glean] on Atlantic Salmon, S. salar, macrophages in vitro. Journal of Fish Diseases, 18: 175-185.
- Diab, A.S., El-Nagar, G.O., Abd-El-Hady, Y.M. 2002. Evaluation of *Nigella sativa*L (black seeds¸ baraka), *Allium sativum* (garlic) and Biogen as feed additives on growth performance and immunostimulants of O. niloticusfingerlings. Suez Canal Vet. Med. J. 13: 745-75.
- Diab, A.S., El-Nagar, G.O., Abd-El-Hady, Y.M. 2002. Evaluation of Nigella sativaL (black seeds¸ baraka), *Allium sativum* (garlic) and Biogen as feed additives on growth performance and immunostimulants of *O. niloticus* fingerlings. Suez Canal Vet. Med. J. 13: 745-75.
- Dügenci SK, Arda N and Candan A. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. J. Ethnopharmacol. (2003) 88:99-106.
- Dügenci SK, Arda N and Candan A.2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. J. Ethnopharmacol. 88:99-106.
- Dügenci, S.K., Arda, N. and Candan A.2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. J. Ethnopharmacol. 88:99-106.
- 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.
- 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.
- Ellis AE:1990. Lysozyme Assays:In Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson BS,Van Muiswinkel WB, editors.Techniques in :Fish Immunology. Fair Haven, NJ: SOS Publications; 101-103.
- Ellis, A.1999. Immunity to bacteria infish, Fish Shellfish Immunol, 9: 291-308.
- Engstad, R.E., Robertson, B., Frivold, E., 1992. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish and Shellfish Immunology, 2: 287-297.
- Engstad, R.E., Robertson, B., Frivold, E., 1992. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish and Shellfish Immunology, 2: 287-297.
- Fazlolahzadeh F., Keramati K., Nazifi S., Shirian S.&Seifi S. (2011) Effect of garlic (*Allium ativum*) on hematological parameters and plasma activities of ALT and AST ofRainbow trout in temperature stress. Australian Journal of Basic & Applied Sciences 5, 84-90.
- 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
- 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.
- 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.
- Fleming T. PDR for Herbal Medicines, 4th Edition,Thomson, Medical Economics Company Inc , 1998. 11: 2-9.
- Gabor, E.F., Sara, A., Barbu A. 2010: The effects of some Phyto-additives on growth, health and meat quality on different species of fish. ScientificPapers: Animal Sciences and Biotechnologies 43(1): 61-65.
- 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.
- 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.
- 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.

- Gül S¸, Belge-Kurutas ¸E,Yıldız, E,S¸ ahan A, Doran F.2004. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology offish (Cyprinidae(living in Seyhan Dam Lake, Turkey. Environ Int 30: 605-609.
- Hanif A., Bakopoulos V. and Dimitriadis GJ: Maternal transfer of humoral specific and non- specific immune parameters to sea bream (*Sparusauratus*) larvae. Journal of Fish and Shellfish Immunology. 2004: 17: 411-435
- 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.
- Hanif A., Bakopoulos V. and Dimitriadis GJ:2004. Maternal transfer of humoral specific and non- specific immune parameters to sea bream (*Sparus auratus*) larvae. Journal of Fish and Shellfish Immunology. 17: 411-435.
- 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
- Harikrishnan R., Balasundaram C. and Heo MS:2010. *Lactobacillus sakei* BK19 enriched diet enhances the immunity status and disease resistance to streptococcosis infection in kelp grouper,*Epinephelus bruneus*. Fish and Shellfish Immonology. 29: 1037-1043.
- Harikrishnan R., Balasundaram C. and Heo MS:2010. *Lactobacillus sakei* BK19 enriched diet enhances the immunity status and disease resistance to streptococcosis infection in kelp grouper,Epinephelus bruneus. Fish and Shellfish Immonology. 29: 1037-1043.
- Harikrishnan, R., C. Balasundaram & M. S .Heo, 2011. Influence of diet enriched withgreen tea on innate humoral and cellular immune response of kelp grouper (*Epinephelusbrune*us) to *Vibrio carchariae* infection. Fish and Shellfish Immunology.30:972-979
- Harikrishnan, R., Nisha, M. R., Balasundaram, C. 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture. 221: 41-50.
- Hasegawa N, Yamada N, Mori M. Powdered green tea has antilipogenic effect on Zucker rats fed a high-fat diet. Phytother Res 2003;17:477-1480
- 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.
- 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.
- Hwang JH, Lee SW, Rha SJ, Yoon HS, Park ES, Han KH, et al. Dietary green tea extract improves growth performance, body composition, and stress recovery in the juvenile black rockfish,*Sebastesschlegeli*. Aquacult Int 2013;21:525-538.
- Ishihara, N., T. Araki, Y. Tamaru, M. Inoue. A. Nishimura, N. Aoi, D. C. Chu, L. R . Juneja & T. Morishhita, 2002. Influence ofgreen tea polyphenols on feed performance, growth performance and fish bodycomponent in yellowtail (*Seriolaquinqueradiata*). Japanese Journal of Food Chemistry, 9, 7–14
- Jeney, G., Anderson, D.P., 1993. An in vitro technique for surveying immunostimulants in fish. Aquaculture, 112: 283-287.
- Jeney, G., Anderson, D.P., 1993. An in vitro technique for surveying immunostimulants in fish. Aquaculture, 112: 283-287.
- Jeney, G., Galeotti, M., Jeney, Z., Anderson, D.P., 1997. Prevention of stress in rainbow trout (*O. mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. Aquaculture, 154: 1-15.
- Jeney, G., Galeotti, M., Jeney, Z., Anderson, D.P., 1997. Prevention of stress in rainbow trout (*O. mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. Aquaculture, 154: 1-15.
- Jian, J. and Wu Z. 2004. Influences oftraditional Chinese medicine on nonspecificimmunity of Jian carp (*Cyprinus carpiovar*. Jian) Fish and Shellfish Immunology. 16, 185–191.
- Jian, J. and Wu, Z. 2003. Effects of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity and disease resistance of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*), Aquaculture 218: 1-9.
- John, G., Rathna Kumari, P. and Balasundaram, A. (2011) Health promoting biochemical effects of three medicinal plants on normal and *Aeromonashydrophila* infected Labeo rohita. Journal of Fisheries Aquatic Sciences, 6: 633-641
- John, G., Rathna Kumari, P. and Balasundaram, A. 2011. Health promoting biochemical effects of three medicinal plants on normal and *Aeromonas hydrophila* infected *Labeo rohita*. Journal of Fisheries Aquatic Sciences, 6: 633-641.

- Jorgensen, J., Robertsen, B., 1995. Yeast ß-glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages. Developmental and Comparative Immunology, 19: 43- 57.
- Jorgensen, J., Robertsen, B., 1995. Yeast ß-glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (*Salmosalar* L.) macrophages. Developmental and Comparative Immunology, 19: 43- 57.
- Kasiri, M., Farahi, A., Sudagar, M.2011. Effects of supplemented diets bylevamisole and *Echinacea purpurea* extract on growth and reproductiveparameters in angelfish (*Pterophyllum scalare*). AACL Bioflux 4(1): 46-51.
- Khalil, R. H., Nadia, B. M. and Soliman, M. K., 2001. Effects of Biogen and Levamisol Hcl on the immune response of cultured Oreochromis niloticus to *Aeromonashydrophila* vaccine. Beni-Suef Veterinary Medicine Journal Egypt, XI (2), 381-392.
- Kim DH and Austin B. 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*,Walbaum 1792) induced by probiotics. Fish. Shellfish Immunol. 21: 513-24.
- Kim DH and Austin B. 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*,Walbaum 1792) induced by probiotics. Fish. Shellfish Immunol. 21: 513-24.
- Kim DH and Austin B. 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*,Walbaum 1792) induced by probiotics. Fish. Shellfish Immunol. 21: 513-24.
- Klesius, P. 1990. Effect of size and temperature on the quantity of immunoglobulin in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, Veterinary Immunol Immunopathol 24:187-195.
- Kono, M., K. Furukawa, Y. M. Sagesaka, K Nakagawa & K. Fujimoto, 2000. Effect ofgreen tea extracts and green tea grounds asdietary supplements on cultured yellow tailand ayu. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi ,47, 932-937.
- 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 *Labeorohita* juveniles. Journal of Fish and Shellfish Immunology, 19: 331-344.
- 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.
- 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.
- Kumolu- Jonhnson, C.A., Ndimele, P.E. and Olasehinde, F.I. 2013. Preliminary study on the antioxidative and antimicrobial effects of fresh garlic (*Allium sativum*) on the shelf life of hotsmiked Catfish (Clarias gariepinus). Journal of Fisheries and Aquatic Science. 1: 253-256.
- Kumolu- Jonhnson, C.A., Ndimele, P.E. and Olasehinde, F.I. 2013. Preliminary study on the antioxidative and antimicrobial effects of fresh garlic (*Alliumsativum*) on the shelf life of hotsmiked Catfish (*Clarias gariepinus*). Journal of Fisheries and Aquatic science. 1: 253-256.
- Lanzotti, V. (2006). The analysis of onion and garlic.Review Article. J. Chromatogr. 1112: 3-22.
- Lanzotti, V. (2006). The analysis of onion and garlic.Review Article. J. Chromatogr. 1112: 3-22.
- Latife Ceyda Irkin,L. C., Yigit, C., Yilmaz,S, and Maita,M.2014. Toxicological Evaluation of Dietary Garlic (*Allium sativum*) Powder in European Sea bass *Dicentrarchus labrax* Juveniles Food and Nutrition Sciences5: 989-996
- Lee et al., 2012(.Khalil, R. H., Nadia, B. M. and Soliman, M. K., 2001. Effects of Biogen and Levamisol Hcl on the immune response of cultured Oreochromis niloticus to *Aeromonas hydrophila* vaccine. Beni-Suef Veterinary Medicine Journal Egypt, XI (2), 381-392.
- Lee, J Bae & S. Y. Oh, 2007. Effect of dietary inclusion of various sources of green tea on growth, body composition and blood chemistry of the juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. FishPhysiology and Biochemistry, 33, 49–57.
- Lee, D. H.., Ra, C. S.., Song, Y. H.., Sung, K. I. ., Kim, J. D., 2012. Effects of dietary garlic extract on growth, feed utilization and whole body composition of juvenile sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*). Asian - Australasian Journal of Animal Sciences, 25, 577-583.
- Lee, D. H.., Ra, C. S.., Song, Y. H.., Sung, K. I. ., Kim, J. D., 2012. Effects of dietary garlic extract on growth, feed utilization and whole body composition of juvenile sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*). Asian - Australasian Journal of Animal Sciences, 25, 577-583.
- 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*) toEdwardsiella ictaluri challenge. Aquaculture 185 313-327.

- 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*) toEdwardsiella ictaluri challenge. Aquaculture 185 313-327
- 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*) toEdwardsiella ictaluri challenge. Aquaculture 185 313-327.
- 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 inpig, Journal of animal physiology and nutrition, 89: 244-252.
- Magnadottir, B., Jonsdottir, H., Helgason, S., Bjornsson, B., Jørgensen T.Ø. and Pilstrom, L. 1999. Humoral immune parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): I. The effects of environmental temperature, Comp Biochem Physiology Part B: Biochem Mol Biol 122: 173-180.
- 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
- 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
- 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.
- Nakagawa, S., Masamoto, K., Sumiyoshi, H., Kunihiro, K., Fuwa, T. (1980). Effect of raw and exteracted-aged garlic juice on growth of young rats and their organs after peroral administration (Author's transl). J. Toxicol. Sci. 5: 91-112.
- Ndong, D., Fall, J. (2011): The effect of garlic (*Allium sativum*) on growth and immune responses of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x Oreochromis *aureus*). Journal of Clinical Immnunology and Immunopathology Research. 3(1):1-9.
- Nobahar, Z., Gholipour-Kanani, H., Kakoolaki, SH. and Jafaryan, H.2014. Effect of garlic (*Allium sativum*) and nettle performance and hematological parameter. Iranian Journal of Aquatic Animal Health, 1 (1):63-69
- Nootash,Sh., Sheikhzadeh,N., Baradaran,B., Khani Oushani,A., Maleki Moghadame, M.R., Nofouzi,K., Monfaredan, A., Aghebati,L.,Zare.F.,Shabanzadeh, S., Green tea (*Camellia sinensis*) administration induces expression of immune relevant genes and biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) .2013 .Fish & Shellfish Immunology 35 ,1916-1923
- Nwabueze, A. A., 2012. The Effect of Garlic (*Allium sativum*) on Growth and Haematological Parameters of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Sustainable Agriculture Research, 1(2): 222-228.
- Nwabueze, A. A., 2012. The Effect of Garlic (*Allium sativum*) on Growth and Haematological Parameters of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Sustainable Agriculture Research, 1(2): 222-228.
- Nya, E.J. and Austin, B. 2011. Development of immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Aeromonas hydrophila* after the dietary application of garlic. Journal of Fish and Shellfish Immunology. 30(3): 845-850
- 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 indicesin rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss)* fingerlings. Fish Physiology and Biochemistry. 38(4):1029-34.
- Peddie S., Zou J., Secombes Ch. J., 2002. Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of ergosan. Veterinary Immunology and Immunopathology, 86: 101-113
- Peddie S., Zou J., Secombes Ch. J., 2002. Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of ergosan. Veterinary Immunology and Immunopathology, 86: 101-113
- 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.
- Picchitti, S., Scapigliati, G., Fanelli, M., Barbato, F., Canese, S. and Mastrolla, L. 2001. Sex-related variations of serum immunoglobulins during reproduction in gilthead sea bream and evidence for a transfer from the female to the eggs, J Fish Biol 59: 1503-1511.
- Porfaraj, V.., Karami, M.., Nezami, S. A.., Rafiee, G. R.., Khara, H. ., Hamidoghli, A., 2013. Study of some biological features of Mullets in Iranian coasts of the Caspian sea. Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics 2, 97-110.
- Porfaraj, V.., Karami, M.., Nezami, S. A.., Rafiee, G. R.., Khara, H. ., Hamidoghli, A., 2013. Study of some biological features of Mullets in Iranian coasts of the Caspian sea. Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics 2, 97-110.

- Rehulka, J. 2000. Influence of astaxanthin on growthrate, condition, and some blood indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Aquaculture. 190: 27-47
- Rehulka, J. 2000. Influence of astaxanthin on growthrate, condition, and some blood indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Aquaculture. 190: 27-47.
- Rehulka, J. 2000. Influence of astaxanthin on growthrate, condition, and some blood indices of rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal ofAquaculture. 190: 27-47.
- Roesler J., Steinmi.iller C., Kiderlin A ,.Emmendorffer A., Wagner H. and LohmannMatthes M.L. 1991. Application of purifiedpolysaccharides from cell cultures of the plant *Echinaceapurpurea* to mice mediates protection against systemic infections with *Listeriamonocytogenes* and Candida albicans. International journal of immunopharmacology, 13: 27-37
- 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.
- Sahoo, P.K., Mohanty, J. and Mukherjee, S.C. 1999. .he three imuunomodulators on haemotologicalparameters and immunity level in rohu (*Labeorohita*) fingerlings. Journal of Aquaculture in the Tropics, 14: 127–135.
- 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.
- Sahu, S., Das, B.K., Mishra, B.K., Pradhan, J. and Sarangi,N.2006. Effect of *Allium sativum* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with Aeromonas hydrophila. Journal of Applied Ichthyology. 23(1):80-86.
- Sahu, S., Das, B.K., Mishra, B.K.,Pradhan,J.and Sarangi,N.2006. Effect of *Alliumsativum* on the immunity and survival of *Labeorohita* infected with *Aeromonashydrophila*. Journal of Applied Ichthyology, 23(1):80-86.
- Salah, M.A., Mohamed, F.M., George, J. (2008): Echinacea as immunostimulatory agent in Nile tilapia (*Oreochromisniloticus*) via earthen ponds experiment. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture ,Egypt, 12-14 October, pp.1003-1042.
- Samadi, L. 2012. Effects of Allium sativum extract on growth and haemolymph parameters of *Litopenaeus vannamei*. Thesis of M.Sc. University of Science and Technology of Khorramshahr., 79 pp
- Secombes C J., Fletcher TC. 1992. The role of phagocytes in the protective mechamisms of fish. Annual Review in Fish Disease 2, 53-71.
- Secombes CJ, Chung S. Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. Comp Biochem Physiol 1988; 89B:539-544.
- Secombes CJ, Chung S. Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. Comp Biochem Physiol 1988; 89B:539-544.
- Secombes CJ, Chung S. Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. Comp Biochem Physiol 1988; 89B:539-544.
- Secombes CJ, Chung S. Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. Comp Biochem Physiol 1988; 89B:539-544.
- Secombes CJ. Fletcher TC. 1992. The role of phagocytes in the protective mechamisms of fish. Annual Review in Fish Disease 2, 53-71.
- Secombes CJ., Fletcher TC. 1992. The role of phagocytes in the protective mechamisms of fish. Annual Review in Fish Disease 2, 53-71
- Shalaby, A.M., Khattab, Y.A., Abdel Rahman, A.M 2006. Effects of Garlic (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromisniloticus*). J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.12：172-201.
- Shalaby, A.M., Khattab, Y.A., Abdel Rahman, A.M.2006 Effects of Garlic (Allium sativum) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.12：172-201.
- Sheikhzadeh,N., Nofouzi,K, Delazar,A. and Oushani,A.K.2011 Immunomodulatory effects of decaffeinated green tea (*Camelliasinensis*) on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).Fish Shellfish Immunol. 31(6):1268-9.
- Shin, S. H. and Kim, M. K., 2004. Effect of dired powders or ethanol extracts of garlic flesh and peel on lipid metabolism and antithrombogenic capacity in 16-month-old rats. Hanguk Yongyang Hakhoechi,, 37(7): 515-524

- Shin, S. H. and Kim, M. K., 2004. Effect of dired powders or ethanol extracts of garlic flesh and peel on lipid metabolism and antithrombogenic capacity in 16-month-old rats. Hanguk Yongyang Hakhoechi,, 37(7): 515-524.
- Siwicki, A. K., 1989. Immunostimulating influence of levamisole on non-specific immunity in carp (*C. carpio*). Developmental and Comparative Immunology, 13: 87-91.
- Siwicki, A. K., 1989. Immunostimulating influence of levamisole on non-specific immunity in carp (*C. carpio*). Developmental and Comparative Immunology, 13: 87-91.
- Siwicki, A. K., Anderson, D. P., Dixon, O. W., 1990. In vitro immunositumulation of rainbow trout (*O. mykiss*) spleen cells with levamisole. Developmental and Comparative Immunology, 14: 231-237.
- Siwicki, A. K., Anderson, D. P., Dixon, O. W., 1990. In vitro immunositumulation of rainbow trout (*O. mykiss*) spleen cells with levamisole. Developmental and Comparative Immunology, 14: 231-237.
- 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.
- 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.
- 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.
- Siwicki, A., 1987. Immunomodulating activity of levamisole in carp spawners, *Cyprinus carpio* L. Journal of Fish Biology, 31: 245-246.
- Siwicki, A., 1987. Immunomodulating activity of levamisole in carp spawners, *Cyprinuscarpio* L. Journal of Fish Biology, 31: 245-246.
- Stimpel, M., Proksch, A., Wagner, H. andLohman, 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.
- Sumiyoshi, H. 1997. New pharmacological activities of garlic and its constituents. Folia Pharmacol. Japonica. 110: 93-97.
- Sumiyoshi, H. 1997. New pharmacological activities of garlic and its constituents. Folia Pharmacol. Japonica. 110: 93-97.
- Sun, YZhang, , M., Liu, C., Qiu, R. and Sun, L. 2012. A divalent DNA vaccine based on Sia10 and OmpU induces cross protection against *Streptococcus iniae* and *Vibrio anguillarum* in Japanese flounder, Fish Shellfish Immunol 32:1216-1222.
- Talpur, A.D. and Ikhwanuddin, M. 2012. Dietary effects of garlic (*Allium sativum*) on haematoimmunological parameters, survival, growth, and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). Journal of Aquaculture. 6–12.
- 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.
- Trenzado, C.E., Morales, A.E., Palma, J.M. and Higuera, M.D.L. 2009. Blood antioxidant defensesand hematological adjustments in crowded/uncrowded rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed on diets with different levels of antioxidantvitamins and HUFA. Journal of Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. 149: 440─ 447 pp.
- Trenzado, C.E., Morales, A.E., Palma, J.M. andHiguera, M.D.L. 2009. Blood antioxidant defenses and hematological adjustments in crowded un crowded rainbow trout (*Oncorhynchuu mykiss*) fed on diets with different levels of antioxidant vitamins and HUFA. Journal of Comparative Biochemistry and Physiology. Part C. 149: 440─ 447 pp.
- various sources of green tea on growth, body composition and blood chemistry of the juvenile olive flounder,*Paralichthysolivaceus*. Fish Physiol Biochem 2007;49: 33-35.
- Verlhac, V., Gabaudan, J., Obach, A., Schuep, W., Hole, R., 1996. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*O. mykiss*). Aquaculture, 143: 123-133.
- Verlhac, V., Gabaudan, J., Obach, A., Schuep, W., Hole, R., 1996. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*O. mykiss*). Aquaculture, 143: 123-133.
- 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.

- Wahli, T., Verlhac, V., Griling, P., Gabaudan, J., Aebischer, C., 2003. Influence of dietary vitamin C on the wound healing process in rainbow trout (*Oncorhyncusmykiss*) Aquaculture 225, 371- 386.
- Wahli, T., Verlhac, V., Griling, P., Gabaudan, J., Aebischer, C., 2003. Influence of dietary vitamin C on the wound healing process in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Aquaculture 225, 371-386.
- Wilson, M.R., Ravenstein, E., Miller, N.W., Clem, L.W., Middleton, D.L. and Warr, G.W. 1995. c DNA sequences and organization of IgM heavy chain genes in two holostean fish, Dev Comp Immunol 19: 153-164.
- Xu, D.J., Xia, Q., Wang, J.J., Wang, P.P., 2008. Molecular Weight and Monosaccharide Composition of *Astragalus polysaccharides*, Molecules, 13: 2408 – 2415.
- 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 *Aeromonashydrophila*, Fish & Shellfish Immunology, 26(1):140 – 145.
- 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.
- Yousefian, M., Sheikholeslami, M. and Kor, D. 2010 . Serum biochemical parameter of male, immatureand female Persian sturgeon (*Acipencer persicus*. Australian Journal of Basic & Applied Sciences, 5(5).476-480.

Abstract

Medicinal herbs are non-specific stimulants for the immune response, as useful material for fish and other aquatic animals are known. 1080 grey mullet larvae with an average weight of g 0.75 ± 0.02 and an average length cm 4.40 ± 0.81 were purchased from Ramin port is located 5 km far from the fishing port of Chabahar. This research is based on nine treatments and control designed with 3 replications and a control treatment. Each 3 treatments with its replications dedicated to garlic, green tea and Echinacae. 38.7 ±1.85 micrograms per ml was highest lysozyme activity, phagocytosis rate (56 ± 1.55%) and respiratory burst (1.61 ± 0.18 absorbance at 620 nm) in the treatment with 100 mg of garlic extract per kilogram food was observed. The highest lysozyme activity by the extract of Echinacea was observed in treatment of 200 per million as 15.73 ± 1.13 mg green tea by 11.6 ± 0.3 were recorded in the same concentration. The highest activity of lysozyme (11.3 ± 0.7 micrograms per ml), the phagocytosis (33.3 ± 1.49%) and respiratory burst (0.57 ± 0.08 absorbance at 620 nm) in treatment green tea extract 200 mg per kg of food was observed. According to the results seems lysozyme activity and phagocytosis, which is considered an indicator of the safety of non-proprietary are influnced highly by diets containing garlic.

Keywords: Echinacae, Garlic, Green tea, Non specific immunity.

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – Off-Shore Fisheries Research Center-Chabahar
-Chabahar Marinetime university

Project Title : A study on methanol herbal plant extract of garlic, Green tea and Echinacae on immunity level of *Mugil cephalus*
Approved Number: 0-12-12-9353
Author: Shapour Kakoolaki
Project leader Researcher : Shapour Kakoolaki
Collaborator(s) *:* Paria Akbari, Seyed Mohammad Ebrahim Zorriehzahra
Advisor(s): -
Supervisor: -
Location of execution : ChabaharSistan-O-Balouchestan province
Date of Beginning : 2015
Period of execution : 1 Year & 6 Months
Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2018

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 garlic, Green tea and Echinacae on immunity level of *Mugil cephalus*

Project leader Researcher :

Shapour Kakoolaki

Register NO.
52799