تأثیر استفاده از عصاره سیر (*Allium sativa*) و سرخارگل (*Echinacea purpurea*) بر روی فاکتورهای خونی و مقاومت در برابر آلودگی باکتریایی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

- **سعید مشکینی**: گروه بهداشت و مواد غذایی دانشکده دامپزشکی و پژوهشکده آرتمیا و آبزیان، دانشگاه ارومیه، صندق پستی: ٤٤٥١٤-٥٧١٥٩
- **مهین ایمانی***: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، صندق پستی: ٤٤٥١٤-٥٧١٥٩
- **علی احسانی**: گروه بهداشت و مواد غذایی دانشکده دامپزشکی و گروه بیوتکنولوژی و کنترل کیفی پژوهشکده آرتمیا و آبزیان، دانشگاه ارومیه، صندوق پستی: ٤٤٥١٤-٥٧١٥٩
- **امیر توکمه‌چی**: گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی پژوهشکده آرتمیا و آبزیان، دانشگاه ارومیه، صندوق پستی: ٤٤٥١٤-٥٧١٥٩
- **فرهاد فرهنگ‌پژوه**: بیمارستان تخصصی گروه دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، صندق پستی: ٤٤٥١٤-٥٧١٥٩
- **یعقوب قیاسی**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، صندق پستی: ٤٤٥١٤-٥٧١٥٩

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۲

چکیده

بافت خون، شاخص مهمی در بررسی وضعیت فیزیولوژیک اندام‌های بدن برای تشخیص بیماری‌ها و کنترل زیستی موجودات زنده از جمله آبزیان است. این پژوهش در آبان ماه ۱۳۹۱ به‌منظور تعیین فاکتورها و شاخص‌های خونی شامل گلبول‌های‌سفید، هموگلوبین، هماتوکریت و درصد افتراقی گلبول‌های سفید از قبیل نوتروفیل‌ها، لنفوسیت‌ها و ائوزینوفیل‌ها تحت تأثیر عصاره سیر و سرخارگل بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد. ۱۰۵۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی ٦/٥ ±٥٠ گرم در قالب هفت تیمار (شاهد، ۰/۵٪ سیر، ۱٪ سیر، ۰/۵٪ سرخارگل، ۱٪ سرخارگل، ۰/۵٪ سیر+ ۰/۵٪ سرخارگل، ۱٪ سیر+ ۱٪ سرخارگل) با سه تکرار تقسیم شد. ماهیان قزل‌آلا در مرحله اول پرورش به‌مدت ۳۰ روز، با جیره حاوی عصاره‌های گیاهی تغذیه شدند و در مرحله دوم پروش به‌مدت ۱۵ روز فقط با جیره شاهد (بدون عصاره) تغذیه شدند تا زمان حذف اثر مواد افزودنی از بدن ماهی تعیین گردد. به‌منظور مقایسه و تعیین فاکتورهای هماتولوژیک در روزهای صفر، ۳۰ و ٤٥ دوره پرورش از هر تکرار سه عدد ماهی به‌طور تصادفی انتخاب شدند. خون‌گیری از ورید ساقه دمی ماهیان با استفاده از ماده ضدانعقاد صورت گرفت، سپس نمونه‌های خونی به‌روش‌های استاندارد خون‌شناسی مورد آزمایش قرار گرفتند. هم‌چنین جهت تعیین تأثیر عصاره‌ها در مقاومت ماهیان در رویارویی با عامل بیماری‌زا، باکتری یرسینیا روکری به‌صورت درون صفاقی در روز ۳۰ تزریق گردید و در طول دو هفته تلفات به‌صورت روزانه ثبت شد. در مرحله اول پرورش، بیش‌ترین میزان گلبول‌های سفید (دارای تفاوت معنی‌دار با تیمار شاهد) و بیش‌ترین میزان لنفوسیت‌ها، هموگلوبین و هماتوکریت (بدون تفاوت معنی‌دار با تیمار شاهد) در گروه‌های ۱٪ عصاره سیر و ۰/۵٪ عصاره سرخارگل مشاهده گردید (P>۰/۰۵). در مرحله دوم پرورش هیچ‌یک از فاکتورهای خونی تیمارهای آزمایشی با تیمار شاهد تفاوت معنی‌دار نداشتند (P>۰/۰۵)، اما بیش‌ترین میزان لنفوسیت بدون تفاوت معنی‌دار در تیمار ۱٪ عصاره سیر ملاحظه شد (P>۰/۰۵). در آزمایش چالش باکتریایی با باکتری یرسینیا روکری، تلفات تیمار ۱٪ عصاره سیر یک روز دیرتر از بقیه تیمارها شروع شد و کم‌ترین درصد تلفات را به‌خود اختصاص داد که با تیمار شاهد تفاوت معنی‌دار نداشت (P>۰/۰۵). با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت، استفاده از ۱٪عصاره سیر و ۰/۵٪ عصاره سرخارگل سبب تحریک سیستم دفاعی و افزایش مقامت قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود.

کلمات کلیدی: فاکتورهای خونی، عصاره سیر، عصاره سرخارگل، آلودگی باکتریایی، قزل‌آلای رنگین‌کمان(*Oncorhynchus mykiss*)

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Mahin_i22@yahoo.com

مقدمه

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان یکی از گونه‌های مهم اقتصادی است که در اکثر نقاط دنیا پرورش داده می‌شود. لیکن پرورش متراکم این ماهی با استرس‌های مختلف همراه می‌باشد که ماهی را در برابر بیماری‌های مختلف (ویروسی، باکتریایی، انگلی و قارچی) مستعد می‌نماید (Bahram و همکاران، ۲۰۰۵). یکی از روش‌های مقابله با بروز انواع بیماری‌ها و تأثیر استرس‌ها بر ماهی استفاده از محرک‌های سیستم ایمنی می‌باشد که نسبت به مواد شیمیایی ایمن‌تر و مطمئن‌تر می‌باشند و تأثیر آن‌ها در مقایسه با واکسیناسیون از دامنه وسیع‌تری برخوردار است (فقانی و همکاران، ۱۳۸۸). مصرف گیاهان دارویی برای درمان و مقابله با عفونت‌های ویروسی (طاهرزاده و همکاران، ۱۳۸۷؛ رضوی و همکاران، ۱۳۸۵)، باکتریایی (Elgayyar و همکاران، ۲۰۰۱) و پیشگیری از شیوع انگل‌های تک یاخته‌ای (مناف فر و همکاران، ۱۳۸۵)، یکی از رویکردهای جدید برای استفاده از این ترکیبات در فارماکولوژی است. استفاده از عصاره گیاهان دارویی به‌عنوان ترکیبات محرک سیستم ایمنی، در افزایش توان سیستم ایمنی ماهیان از دیرباز مرسوم بوده است (اخلاقی و انبارکی مطلق، ۱۳۸۳). David و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که افزودن مخلوطی از دانه آفتابگردان و مکمل ویتامینی به جیره غذایی ماهی سرماری (*Channa striata*) موجب افزایش آنتی‌بادی و افزایش مقاومت این ماهی نسبت به قارچ بیماری‌زای *Aphanomyces invadans* می‌شود. افزودن مکمل غذایی حاوی عصاره گیاهی *Catharanthus roseus* در جیره غذایی ماهی کپورهندی (*Labeo rohita*) موجب افزایش پاسخ ایمنی این ماهی گردید (Nguyen و همکاران، ۲۰۰۲).

در بین گیاهان خوراکی، سیر (*Allium sativa*) از جمله گیاهان مورد استفاده در طب سنتی است که از قدیم درچین، روم باستان و مصر مورد استفاده قرار می‌گرفت. سیر حاوی مواد مختلفی از قبیل مواد معدنی (سدیم، پتاسیم، فسفر، آهن، کلسیم) و مواد آلی (هیدرات کربن، چربی، ترپنوئیدها، آنزیم‌ها، پروستاگلاندین‌ها، آلیساتین، آلوئن و آلیسین) است (Harris و همکاران، ۲۰۰۱). اثرات درمانی و ضد میکروبی سیر به‌دلیل ترکیبات ارگانوسولفوره از جمله آلیسین است (Heinrich و Larry، ۱۹۹۶)، به‌طوری‌که ۱ میلی‌گرم آلیسین برابر ۱۵ واحد استاندارد پنی‌سیلین تأثیر دارد (Harris و همکاران، ۲۰۰۱). خواص آنتی‌بیوتیکی و تحریک سیستم ایمنی آن ثابت شده است (Ghazanfari و همکاران، ۲۰۰۲).

سیر خرد یا له شده به‌همراه سایر عصاره‌های گیاهی یا جانوری می‌تواند آثار پیشگیری‌کننده مناسبی برعلیه عوامل بیماری‌زای ماهی به‌ویژه باکتری‌ها و قارچ‌ها داشته باشد (Corzo- martinez و همکاران، ۲۰۰۷؛ Ress و همکاران، ۱۹۹۳؛ Adetumbi و همکاران، ۱۹۸۶). برخی مطالعات نشان داده‌اند، اثر سیر در جیره غذایی تیلاپیای نیل می‌تواند میزان گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت خون را افزایش داده و در مقابل سبب کاهش میزان چربی و قندخون گردد (Shalaby و همکاران، ۲۰۰۶). عصاره سیر باعث افزایش تولید سایتوکین‌ها، افزایش فعالیت ماکروفاژها، لنفوسیت‌ها و سایر سلول‌های سیستم ایمنی می‌شود (Agarval، ۱۹۹۶). کاهش تعداد ائوزینوفیل‌ها و مونوسیت‌ها در اثر استفاده اسانس سیر، نشان‌دهنده عدم ابتلای بدن به پارازیت‌ها و عوامل مهاجم خارجی بوده و سلامت ماهیان تغذیه شده با سانس سیر می‌باشد (Guyton و Hall، ۱۹۸۹).

گیاه سرخارگل *Echinacea purpurea* گیاهی چند ساله، بومی شمال آمریکا می‌باشد. ریشه و ساقه زیرزمینی آن از زمان‌های گذشته در درمان زخم و کاهش علائم عفونت و التهاب مورد استفاده بوده‌اند (Matthias و همکاران، ۲۰۰۸). اجزای شیمیایی سرخارگل شامل بخش‌های لیپوفیلیک (مثل آلکامیدها، پلی‌استیلن‌ها)، پلی‌ساکاریدهای محلول در آب، مشتقات اسیدکافئیک (مثل اکیناکوزید، اسیدشیکوریک و اسیدکافئیک) و فلاونوئیدها است (Bone، ۱۹۹۷). خواص فارماکولوژیکی هر یک از این مواد به‌طور کامل مشخص نشده است (Thygesen و همکاران، ۲۰۰۷) با این حال خاصیت تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی توسط مشتقات اسیدکافئیک و آلکامیدها (Matthias و همکاران، ۲۰۰۸) و خاصیت ضدالتهابی آن به‌اثبات رسیده است. پلی‌ساکاریدهای اکیناسه خاصیت محرک سیستم ایمنی و پلی‌استیلن‌های آن دارای اثر ضدالتهابی می‌باشند (American society of Health-system pharmacists، ۲۰۰۱). اجزای اکیناسه تعداد گلبول‌های سفید در گردش را زیاد، لنفوسیت‌های T را فعال و فاگوسیتوز را افزایش می‌دهد (American society of Health-system pharmacists، ۲۰۰۱؛ O Hara و همکاران، ۱۹۹۸).

علم هماتولوژی در تشخیص بیماری‌ها و کنترل زیستی موجودات، تشخیص کم‌خونی‌ها، کمبودهای مواد غذایی و بیماری‌های عفونی کاربرد فراوان دارد (وثوقی و همکاران، ۱۳۷۶؛ سعیدی و همکاران، ۱۳۸۲). این فاکتورها به‌میزان زیادی به‌عنوان نشانگرهای فیزیولوژیکی واکنش به

استرس در ماهی استفاده می‌شوند (Cataldi و همکاران، ۱۹۹۸).

قزل‌آلای رنگین‌کمان در صنعت آبزی‌پروری ایران اهمیت ویژه‌ای دارد که تحت تأثیر تنش‌های مختلف محیطی مثل شیوع بیماری‌های عفونی و عدم تأثیر مناسب داروهای سنتزی تلفات افزاینده‌ای داشته است. با توجه به اهمیت علم هماتولوژی در تشخیص بیماری‌ها و کنترل زیستی موجودات، پژوهش حاضر به بررسی تأثیر استفاده عصاره سیر و سرخارگل به‌صورت جدا و ترکیبی در جیره غذایی بر شاخص‌های خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و مقاومت آن‌ها در برابر آلودگی باکتریایی پرداخته است.

مواد و روش‌ها

تهیه و ذخیره‌سازی ماهیان: در آبان ماه ۱۳۹۱ تعداد ۱۰۵۰ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۶/۵ ±۵۰ گرم از یکی از مراکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی شهرستان ارومیه خریداری شد. ماهیان با تانکر مخصوص حمل بچه‌ماهی که مجهز به مخزن اکسیژن بود به سالن تکثیر و پرورش آبزیان پژوهشکده آرتمیا و آبزیان دانشگاه ارومیه منتقل و به‌مدت یک هفته قرنطینه شدند. پس از سازگاری با شرایط جدید بچه‌ماهیان با محلول نمک ۳ درصد ضدعفونی شده و به‌صورت طرح کاملاً تصادفی در قالب هفت تیمار (هر تیمار دارای سه تکرار) در ۲۱ تانک ۹۰ لیتری (حاوی ۶۰ لیتر آب) با تراکم ۵۰ قطعه در هر تانک ذخیره‌سازی شدند.

تیمارهای تغذیه‌ای: گروه اول، ماهیان شاهد که فقط با غذای تجاری (GFT[1]-2) تغذیه شدند. گروه‌های دوم و سوم، ماهیانی که با غذای تجاری به‌ترتیب حاوی ۰/۵ درصد (۵ گرم در هر کیلوگرم غذا) و ۱ درصد (۱۰ گرم در هر کیلوگرم غذا) عصاره سیر تغذیه شدند. گروه‌های چهارم و پنجم، ماهیانی که با غذای تجاری به‌ترتیب حاوی ۰/۵ درصد (۵ گرم در هر کیلوگرم غذا) و ۱ درصد (۱۰ گرم در هر کیلوگرم غذا) عصاره سرخارگل تغذیه شدند. گروه ششم، ماهیانی که با غذای تجاری حاوی ترکیب ۰/۵ درصد عصاره سیر + ۰/۵ درصد عصاره سرخارگل تغذیه شدند. گروه هفتم، ماهیانی که با غذای تجاری حاوی ترکیب ۱ درصد عصاره سیر + ۱ درصد عصاره سرخارگل تغذیه شدند.

غذادهی: در مرحله اول، همه تیمارها براساس جداول استاندارد غذادهی براساس توده زنده ماهیان و دمای آب به‌مدت ۳۰ روز با ترکیب ذکر شده تغذیه شدند و در مرحله دوم، همه تیمارها به‌مدت ۱۵ روز تنها با جیره شاهد تغذیه شدند، تا زمان حذف اثر مواد افزودنی از بدن ماهی هم تعیین گردد.

ارزیابی فاکتورهای خون‌شناسی: به‌منظور ارزیابی فاکتورهای خون‌شناسی، نمونه‌برداری در روزهای صفر، ۳۰ و ۴۵ صورت گرفت. بدین منظور ۲۴ ساعت قبل از نمونه‌برداری، غذادهی ماهیان متوقف شده و ۹ ماهی از هر تیمار (از هر تکرار ۳ قطعه) به‌طور تصادفی انتخاب شدند و پس از بی‌هوشی کامل ماهیان در محلول پودر گل میخک (۲۰۰ppm)، خون‌گیری از ورید ساقه دمی به کمک سرنگ ۲cc در شرایط کاملاً استریل صورت گرفت. سپس خون گرفته شده سریعاً به لوله‌های حاوی EDTA منتقل گردید. جهت شمارش افتراقی گلبول‌های سفید سریعاً از هر یک از نمونه‌های خون، گسترش تهیه شد و در نهایت نمونه‌ها به‌منظور تعیین فاکتورهای خونی در آزمایشگاه بررسی شدند (گل افشان، ۱۳۸۲؛ فراهانی، ۱۳۸۸).

تعیین میزان مقاومت در برابر آلودگی باکتریایی *یرسینیا روکری* (*Yersinia ruckeri*): جهت تعیین تأثیر عصاره‌ها در تقویت سیستم دفاعی ماهیان، پس از ۳۰ روز غذادهی با جیره حاوی عصاره‌های سیر و سرخارگل، آلودگی باکتریایی با سویه حاد *یرسینیا روکری* ایجاد شد. بدین منظور، یک میلی‌لیتر از این باکتری در محیط کشت BHI broth به‌مدت ۴۸- ۲۴ ساعت در شرایط هوازی و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. بعد از رشد باکتری‌ها، مقداری از آن از محیط کشت برداشته و با دور g × ۳۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس به رسوب حاصل از سانتریفیوژ، سرم فیزیولوژیکی اضافه شد. غلظت سوسپانسیون حاصل با استفاده از لوله ۲ مک فارلند با تراکم (۶ × ۱۰^{۸} CFU/ml) تنظیم شد (رحمتی‌اندانی و همکاران، ۱۳۹۰). برای ایجاد آلودگی باکتریایی، ابتدا ماهیان هر تیمار به‌طور تصادفی به دو گروه (در هر گروه ۱۰ قطعه ماهی) تقسیم شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به‌صورت داخل صفاقی به‌همه ماهیان تزریق شد. ماهیان به‌مدت دو هفته در داخل حوضچه‌های ۹۰ لیتری پرورش داده شدند و تلفات به‌صورت روزانه ثبت گردید. به‌منظور تأیید تشخیص عفونت، از کلیه و کبد نمونه‌های بی‌حال و یا تلف شده نمونه‌برداری گردید و کشت باکتریایی به‌منظور تشخیص نوع

[1] Grower Food Trout

باکتری موجود در نمونه‌ها در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری: برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS[1] (نسخه ۱۶) استفاده شد. به‌منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون Kolmogorov-smirnov، جهت مقایسه واریانس تیمارها از آزمون واریانس یک‌طرفه[2] و جهت بررسی وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها از آزمون توکی[3] استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار بودن اختلاف‌ها کم‌تر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد و داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شدند. برای ترسیم جداول و نمودارها به‌ترتیب از نرم‌افزارهای Word و Excel (نسخه ۲۰۱۰) استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز آماری فاکتورهای خون ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در روزهای صفر، ۳۰ و ۴۵ دوره پرورش در جداول ۲ ، ۳ و ۴ آورده شده است. نتایج خون‌شناسی حاصل از مرحله اول دوره پرورش (۳۰روز) نشان داد، درصد لنفوسیت، مونوسیت، نوتروفیل هیچ‌کدام از تیمارها با گروه شاهد تفاوت معنی‌دار ندارند (P>۰/۰۵). ولی میزان هماتوکریت، هموگلوبین و تعداد کل گلبول‌های سفید و ائوزینوفیل در بعضی از تیمارها با تیمار شاهد تفاوت معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵) (جدول ۳). بیش‌ترین میزان گلبول‌های سفید در تیمار ۱٪ عصاره سیر و ۰/۵٪ عصاره سرخارگل و کم‌ترین میزان آن در گروه شاهد مشاهده گردید (P < ۰/۰۵). بیش‌ترین میزان ائوزینوفیل (تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد) در تیمار ۱٪ عصاره سرخارگل و کم‌ترین درصد آن (بدون تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد) در تیمار ۰/۵٪ عصاره سرخارگل دیده شد. بیش‌ترین درصد نوتروفیل در تیمار ۰/۵٪ عصاره سیر + ۰/۵٪ عصاره سرخارگل و کم‌ترین درصد آن در تیمار ۱٪ عصاره سیر دیده شد که هیچ کدام با گروه شاهد تفاوت معنی‌دار نداشتند (P>۰/۰۵). بیش‌ترین میزان لنفوسیت در تیمار ۱٪ عصاره سیر و ۰/۵٪ عصاره سرخارگل و کم‌ترین میزان آن در تیمار ۰/۵٪ عصاره سیر + ۰/۵٪ عصاره سرخارگل مشاهده شد که هیچ‌کدام با گروه شاهد تفاوت معنی‌دار نداشتند (P > ۰/۰۵). بیش‌ترین و کم‌ترین درصد مونوسیت بدون تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد به‌ترتیب در تیمار شش و هفت مشاهده شد. بیش‌ترین میزان هموگلوبین و هماتوکریت (بدون تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد) در تیمار ۱٪ عصاره سیر و کم‌ترین میزان آن‌ها (دارای تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد) در تیمار ۱٪ عصاره سرخارگل دیده شد (جدول ۳).

نتایج حاصل از مرحله دوم پرورش، نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P>۰/۰۵)، اما بیش‌ترین میزان نوتروفیل و کم‌ترین میزان لنفوسیت در تیمار شش و کم‌ترین میزان نوتروفیل و بیش‌ترین میزان لنفوسیت در تیمار سه دیده شد که هیچ کدام با گروه شاهد تفاوت نداشتند (P>۰/۰۵) (جدول ۴).

بعد از تزریق باکتری، به‌مدت دو هفته تلفات ماهیان ثبت شد (جدول ۱). تا روز دوم هیچ‌کدام از تیمارها تلفات نداشتند، به دریج علائمی هم‌چون تیرگی رنگ بدن، نقاط خون‌ریزی در اطراف دهان، قاعده باله‌ها و آبشش‌ها را نشان دادند و در نهایت دچار عدم تعادل و شنای وارونه شدند. تلفات همه تیمارها از روز سوم آغاز شد، به‌غیر از تیمار ۱٪ عصاره سیر که تلفات آن از روز چهارم آغاز شد. بیش‌ترین تلفات تیمارها تا روز هفتم بود و پس از آن کاهش یافت. بیش‌ترین تلفات مربوط به تیمار ۱٪ عصاره سیر + ۱٪ عصاره سرخارگل و کم‌ترین تلفات مربوط به تیمار ۱٪ عصاره سیر بود (جدول ۱).

[1] Statistical Package for Social Science
[2] One-Way ANOVA
[3] Tukey Test

جدول ۱: درصد تلفات تجمعی تیمارها بعد از چالش با باکتری *یرسینیا روکری* در طول دو هفته، (میانگین ± انحراف معیار)

تیمار	شاهد	۰/۵٪ سیر	۱٪ سیر	۰/۵٪ سرخارگل	۱٪ سرخارگل	۰/۵٪ سیر + ۰/۵٪ سرخارگل	۱٪ سیر + ۱٪ سرخارگل
گروه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
تلفات	۶۰ ± ۲۹/۴۷^{b}	۶۰ ± ۳۱/۱۳^{ab}	۴۱/۴۳ ± ۲۱/۴۳^{b}	۷۲/۸۶ ± ۳۴/۰۷^{a}	۴۸/۵۷ ± ۳۲/۰۷^{b}	۴۹/۲۹ ± ۳۴/۳۰^{b}	۷۳/۵۷ ± ۳۸/۱۵^{a}

اعداد با حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار دارند ($p<۰/۰۵$).

جدول ۲: نتایج ارزیابی فاکتورهای خونی در روز صفر، (میانگین ± انحراف معیار)

گلبول‌های سفید (عدد/ میلی‌لیتر مکعب)	نوتروفیل (درصد)	ائوزینوفیل (درصد)	لنفوسیت (درصد)	مونوسیت (درصد)	هموگلوبین (گرم/ دسی‌لیتر)	هماتوکریت (درصد)
۴۰۰۰۰ ± ۵۷۸۷/۹۱	۵/۴ ± ۲/۷۰	۲ ± ۰/۴۵	۹۲/۸ ± ۲/۳۹	۱/۶ ± ۰/۸۹	۹/۹۴ ± ۱/۹۸	۳۱/۸ ± ۶/۳۸

جدول ۳: میزان شاخص‌های خونی در ماهیان قزل‌آلا- تیمارها در روز ۳۰، (میانگین ± انحراف معیار)

گروه	تیمار	گلبول‌های سفید (عدد / میلی‌لیتر مکعب)	نوتروفیل (درصد)	ائوزینوفیل (درصد)	لنفوسیت (درصد)	مونوسیت (درصد)	هموگلوبین (گرم / دسی‌لیتر)	هماتوکریت (درصد)
۱	شاهد	۳۴۳۳۳/۳۳ ± ۱۵۲۷/۵۲^{b}	۱۲/۳۳ ± ۴/۱۶^{ab}	۰/۳۳ ± ۰/۵۸^{b}	۸۲/۳۳ ± ۳/۵۱^{ab}	۵ ± ۲/۵۶^{ab}	۱۲/۳۰ ± ۰/۴۶^{a}	۳۹/۳۳ ± ۱/۵۳^{a}
۲	۰/۵٪ سیر	۴۱۳۳۳/۳۳ ± ۱۵۲۷/۵۲^{a}	۱۴/۳۳ ± ۱/۵۳^{ab}	۳ ± ۲^{ab}	۸۱/۳۳ ± ۲/۸۰^{ab}	۱/۳۳ ± ۱/۵۳^{ab}	۱۱/۴۷ ± ۰/۹۶^{ab}	۳۶/۶۷ ± ۳/۰۶^{ab}
۳	۱٪ سیر	۴۳۳۳۳/۳۳ ± ۱۱۵۴/۷۰^{a}	۹ ± ۱^{b}	۲ ± ۱^{ab}	۸۷ ± ۱/۷۳^{a}	۲ ± ۱^{ab}	۱۳/۳۳ ± ۱/۲۷^{a}	۴۲/۶۷ ± ۴/۰۴^{a}
۴	۰/۵٪سرخارگل	۴۳۳۳۳/۳۳ ± ۱۵۲۷/۵۲^{a}	۱۱/۶۷ ± ۲/۰۸^{ab}	۰ ± ۰^{b}	۸۷/۳۳ ± ۲/۳۱^{a}	۱/۵۰ ± ۲/۱۲^{ab}	۱۳ ± ۰/۱۷^{a}	۴۱/۶۷ ± ۰/۵۸^{a}
۵	۱٪ سرخارگل	۳۹۰۰۰ ± ۱۰۰۰^{ab}	۱۲/۶۷ ± ۱/۱۵^{ab}	۵/۶۷ ± ۲/۵۲^{a}	۷۹/۳۳ ± ۴/۷۳^{ab}	۲/۳۳ ± ۱/۵۳^{ab}	۸/۵۳ ± ۱/۱۱^{b}	۲۷/۳۳ ± ۳/۵۱^{b}
۶	۰/۵٪سیر+۰/۵٪سرخارگل	۴۱۰۰۰ ± ۳۰۰۰^{a}	۱۵/۶۷ ± ۲/۰۸^{a}	۵ ± ۲/۵۶^{a}	۷۴ ± ۳/۶۱^{b}	۵/۳۳ ± ۱/۱۵^{a}	۱۲/۲۷ ± ۱/۱۹^{a}	۳۹/۳۳ ± ۳/۷۹^{a}
۷	۱٪ سیر + ۱٪ سرخارگل	۴۲۰۰۰ ± ۲۰۰۰^{a}	۱۱/۳۳ ± ۱/۵۳^{ab}	۲/۶۷ ± ۰/۵۸^{ab}	۸۵/۳۳ ± ۲/۰۸^{a}	۰/۶۷ ± ۰/۵۸^{b}	۱۲/۴۰ ± ۲/۰۹^{a}	۳۹/۶۷ ± ۶/۶۶^{a}

اعداد در هر ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار هستند ($p<۰/۰۵$).

جدول ۴: میزان شاخص‌های خونی در ماهیان قزل‌آلا- تیمارها در روز ۴۵، (میانگین ± انحراف معیار)

گروه	تیمار	گلبول‌های سفید (عدد / میلی‌لیتر مکعب)	نوتروفیل (درصد)	ائوزینوفیل (درصد)	لنفوسیت (درصد)	مونوسیت (درصد)	هموگلوبین (گرم / دسی‌لیتر)	هماتوکریت (درصد)
۱	شاهد	۴۰۶۶۶/۶۷ ± ۲۵۱۶/۶۱^{a}	۱۲/۳۳ ± ۴/۱۶^{ab}	۷/۳۳ ± ۱/۱۵^{a}	۷۹/۳۳ ± ۳/۷۹^{ab}	۱ ± ۱^{a}	۱۲/۹۳ ± ۱/۱۱^{a}	۴۱/۳۳ ± ۳/۵۱^{a}
۲	۰/۵٪ سیر	۴۱۳۳۳/۳۳ ± ۳۰۵۵/۰۵^{a}	۱۴/۳۳ ± ۱/۵۳^{ab}	۲ ± ۳/۴۶^{a}	۸۳/۳۳ ± ۳/۰۶^{ab}	۰/۳۳ ± ۰/۵۸^{a}	۱۲/۶۰ ± ۰/۴۶^{a}	۴۰/۳۳± ۱/۵۳^{a}
۳	۱٪ سیر	۴۱۳۳۳/۳۳ ± ۲۵۱۶/۶۱^{a}	۹ ± ۱^{b}	۳ ± ۰^{a}	۸۶ ± ۱^{a}	۲ ± ۱^{a}	۱۴/۸۰ ± ۱/۰۵^{a}	۴۷/۳۳ ± ۳/۵۱^{a}
۴	۰/۵٪سرخارگل	۴۲۳۳۳/۳۳ ± ۲۵۱۶/۶۱^{a}	۱۱/۶۷ ± ۲/۰۸^{ab}	۴/۶۷ ± ۱/۵۳^{a}	۸۲/۶۷ ± ۱/۵۳^{ab}	۱ ± ۱/۷۳^{a}	۱۱/۷۷ ± ۱/۴۰^{a}	۳۷/۶۷ ± ۴/۵۱^{a}
۵	۱٪ سرخارگل	۴۲۶۶۶/۶۷ ± ۱۵۲۷/۵۲^{a}	۱۲/۶۷ ± ۱/۱۵^{ab}	۴ ± ۱/۴۱^{a}	۸۵/۳۳ ± ۰/۵۸^{a}	۰ ± ۰^{a}	۱۱/۷۷ ± ۱/۱۷^{a}	۳۷/۶۷ ± ۳/۷۹^{a}
۶	۰/۵٪سیر+۰/۵٪سرخارگل	۴۲۰۰۰ ± ۲۶۴۵/۷۵^{a}	۱۵/۶۷ ± ۲/۰۸^{a}	۷/۳۳ ± ۴/۹۳^{a}	۷۷ ± ۴^{b}	۰ ± ۰^{a}	۱۲/۶۰ ± ۲/۸۸^{a}	۴۰/۳۳ ± ۹/۲۹^{a}
۷	۱٪ سیر + ۱٪ سرخارگل	۴۵۰۰۰ ± ۱۰۰۰^{a}	۱۱/۳۳ ± ۱/۵۳^{ab}	۷/۶۷ ± ۱/۵۳^{a}	۸۰/۶۷ ± ۳/۲۱^{ab}	۰/۳۳ ± ۰/۵۸^{a}	۱۳/۱۳ ± ۰/۹۵^{a}	۴۲ ± ۳^{a}

اعداد در هر ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار هستند ($p<۰/۰۵$).

بحث

بسیاری از محققین علوم شیلاتی در طی دهه‌های اخیر، تحقیقات بسیاری را بر روی افزایش توان سیستم دفاعی ماهی‌ها در مقابل عوامل بیماری‌زا انجام داده‌اند. یکی از روش‌های معمول افزایش سطح توان سیستم دفاعی ماهی، استفاده از محرک‌های سیستم ایمنی است. این ترکیبات شامل انواع مواد سنتتیک شیمیایی، انواع پروبیوتیک‌ها و نیز ترکیبات طبیعی با منشا گیاهی می‌باشند.

در این مطالعه از عصاره سیر و سرخارگل به‌عنوان محرک سیستم ایمنی بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده شد. آزمایش‌های هماتولوژی نشان داد در بین فاکتورهای خونی اندازه‌گیری شده در تیمارهای آزمایشی، به‌غیر از ائوزینوفیل و تعداد کل گلبول‌های سفید، بقیه پارامترهای مورد بررسی در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار ندارند (P<۰/۰۵). بیش‌ترین میزان گلبول‌های سفید در تیمار تغذیه شده با ۱٪ عصاره سیر و تیمار تغذیه شده با ۰/۵ ٪ عصاره سرخارگل مشاهده شد. در تحقیق مشابهی که توسط علیشاهی و همکاران (۱۳۹۱) بر روی کپورمعمولی انجام شد، در بین فاکتورهای خونی مورد بررسی (هموگلوبین، هماتوکریت، گلبول‌های قرمز و سفید) تفاوت معنی‌دار فقط در تعداد گلبول‌های سفید خونی در بین تیمارهای مختلف مشاهده شد که بیش‌ترین تعداد آن مربوط به تیمار آرگوسان و سرخارگل بود و با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). در تحقیقی که توسط تنگستانی و همکاران (۱۳۹۰) بر روی فیل‌ماهی انجام شد، اختلاف معنی‌داری در تعداد کل گلبول‌های سفید در تیمارهای مختلف مشاهده نشد ولی میزان آن از گروه شاهد تا تیمار حاوی ۰/۰۵ و ۰/۱۰ اسانس سیر افزایش یافت که در سطوح بالاتر اسانس سیر (۰/۱۵ و ۰/۲۰) میزان آن‌ها کاهش یافت. در تحقیق اکرمی و همکاران (۱۳۹۰) بر روی فیل ماهی بیش‌ترین تعداد کل گلبول‌های سفید در تیمار حاوی ۱٪ اینولین جیره بود و با افزایش درصد اینولین جیره میزان آن نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. آن‌ها گزارش داده‌اند که احتمالاً اینولین هم مثل سایر محرک‌های ایمنی در سطوح بالاتر باعث تضعیف سیستم ایمنی می‌شود، چون اینولین استخراج شده از ریشه کاسنی زنجیره طولانی دارد و به آهستگی توسط سلول‌های آنتروسیت روده تخمیر می‌شود، در نتیجه این کربوهیدرات در دستگاه گوارش افزایش یافته و باعث آثار زیان‌باری می‌شود. افزایش تعداد گلبول‌های سفید بخشی از دفاع ایمنی ماهی می‌باشد. هرچند ایمنی سلولی و هومورال وابسته به گلبول‌های سفید خونی می‌باشد ولی همیشه میزان محافظت ماهی در برابر عوامل عفونی با تعداد لکوسیت‌های ماهی ارتباط مستقیم ندارد (Alishahi و همکاران، ۲۰۱۱؛ Vinodhini و Narayanan، ۲۰۰۹؛ Harikrishnan و همکاران، ۲۰۰۳) احتمالاً تجویز سرخارگل سبب افزایش تکثیر گلبول‌های خونی در بافت خون‌ساز ماهی شده است (Iwama و Nakanishi، ۱۹۹۶).

تعداد گلبول‌های سفید و نسبت انواع آن‌ها یکی از شاخص‌های مهم سلامتی و وضعیت سیستم ایمنی در جانوران است (Shalaby و همکاران، ۲۰۰۶). در ماهیان قسمت اعظم گلبول‌های سفید را لنفوسیت‌ها تشکیل می‌دهند و افزایش آن نشان‌دهنده تقویت سیستم ایمنی ماهیان در برابر عوامل بیماری‌زای مهاجم می‌باشد (تنگستانی و همکاران، ۱۳۹۰). لنفوسیت‌ها معمولاً در مقابله با بیماری‌های ویروسی کاربرد دارند (Campbell و Ellis، ۲۰۰۷). در تحقیق حاضر در مرحله اول پرورش (روز ۳۰) میزان لنفوسیت در تیمارهای آزمایشی با گروه شاهد تفاوت معنی‌دار نداشت، اما بیش‌ترین میزان آن در تیمار حاوی ۱٪ عصاره سیر و ۰/۵٪ عصاره سرخارگل مشاهده شد. کم‌ترین درصد نوتروفیل در تیمار ۱٪ عصاره سیر ملاحظه شد که با گروه شاهد تفاوت معنی‌دار نداشت (P>۰/۰۵). افزایش لنفوسیت و کاهش نوتروفیل نشان‌دهنده تأثیر اسانس سیر بر کاهش اثر استرس‌های مزمن و ارتقای مقاومت بدنی و سازگاری‌های فیزیولوژیک با محیط پرورش می‌باشد (Guyton و Hall، ۱۹۸۹). در تحقیق تنگستانی و همکاران (۱۳۹۰)، تعداد نوتروفیل خون ماهیان در تیمارهای مختلف تغییرات معنی‌داری نشان داد، به‌طوری‌که با افزایش سطوح اسانس سیر در جیره میزان آن کاهش یافت. کم‌ترین میزان نوتروفیل در تیمار دارای ۰/۲۰ گرم در کیلوگرم و ۰/۱۵ گرم در کیلوگرم اسانس سیر مشاهده شد که با بقیه تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد. کم‌ترین میزان لنفوسیت در تیمار کنترل و تیمار حاوی آنتی‌بیوتیک مشاهده شد و میزان لنفوسیت با افزودن اسانس سیر تا سطح ۰/۱۵ درصد افزایش یافت ولی در سطوح بالاتر (۰/۲۰ درصد) میزان آن کاهش یافت.

در پژوهش حاضر بیش‌ترین میزان ائوزینوفیل در تیمار ۱٪ عصاره سرخارگل دارای تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد و کم‌ترین میزان آن در تیمار ۰/۵٪ عصاره سرخارگل بدون تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد دیده شد. بیش‌ترین و کم‌ترین میزان مونوسیت بدون تفاوت با گروه شاهد به‌ترتیب در تیمار ۰/۵٪ عصاره سیر + ۰/۵٪ عصاره سرخارگل و ۱٪ عصاره سیر + ۱٪ عصاره

سرخارگل مشاهده شد. در تحقیق تنگستانی و همکاران (۱۳۹۰) مونوسیت‌ها در تیمارهای مختلف آزمایشی اختلاف معنی‌داری نشان ندادند (P>۰/۰۵) ولی تعداد ائوزینوفیل در تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری از سایر تیمارها بیش‌تر بود. آن‌ها کاهش تعداد ائوزینوفیل و مونوسیت‌ها را عدم ابتلای بدن به پارازیت‌ها و عوامل مهاجم خارجی و سلامت ماهیان تغذیه شده با اسانس سیر گزارش کرده‌اند. تعداد ائوزینوفیل‌ها در هنگام عفونت‌های باکتریایی افزایش می‌یابد (بهمنی و کاظمی، ۱۳۸۲).

بخشی از حجم کل خون که توسط گلبول‌های قرمز اشغال می‌شود، هماتوکریت نام دارد. این مقدار یک کمیت نسبی است و به‌عنوان یک شاخص مهم و رایج در تعیین سلامت و بیماری ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Houston و Rupert، ۱۹۹۷). در پژوهش حاضر بیش‌ترین میزان هموگلوبین و هماتوکریت بدون اختلاف با گروه شاهد در تیمار حاوی ۱٪ عصاره سیر و تیمار ۰/۵٪ عصاره سرخارگل مشاهده شد. افزایش هموگلوبین نشان‌دهنده اثر مثبت سیر بر میزان هموگلوبین و قابلیت انتقال گازهای تنفسی توسط هموگلوبین می‌باشد (تنگستانی و همکاران ۱۳۹۰). علیشاهی و همکاران (۱۳۹۱) در تحقیق اثر محرک‌های شیمیایی و گیاهی بر ماهی اسکار (*Astronotus ocellatus*)، بیش‌ترین میزان هموگلوبین و هماتوکریت را در تیمار ۰/۵٪ عصاره سرخارگل مشاهده نمودند. پلی‌ساکاریدهای گیاهی باعث رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک شده و در تیجه به‌طور غیرمستقیم می‌توانند فاکتورهای خونی را بهبود بخشند (Savage و همکاران، ۱۹۹۶). از پلی‌ساکاریدهای سرخارگل می‌توان به اکیناسئین[۱]، اکیناکوزید[۲] و آکینولون[۳] اشاره کرد که نقش مهمی در بهبود فاکتورهای خونی دارند (تیموری زاده و همکاران، ۱۳۸۸). Shalaby و همکاران (۲۰۰۶) گزارش داده‌اند که استفاده از سیر در جیره غذایی تیلاپیای نیل میزان گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت خون را افزایش می‌دهد. درتحقیق تنگستانی و همکاران (۱۳۹۰)، میزان هموگلوبین و هماتوکریت با افزایش درصد اسانس سیر نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. هم‌چنین در تحقیق اکرمی و همکاران (۱۳۹۰) بیش‌ترین درصد هماتوکریت در سطح ۱٪ اینولین جیره مشاهده شد و با افزایش میزان آن در جیره، میزان هموگلوبین و هماتوکریت کاهش یافت. در تحقیق آن‌ها در بیش‌تر موارد با افزایش سطح اینولین در جیره، عوامل خونی نسبت به گروه شاهد کاهش یافت که نشان‌دهنده تأثیر سوء افزایش سطح این نوع پروبیوتیک بر عوامل خونی فیل‌ماهیان جوان پرورشی است. ممکن است کاهش مقادیر هماتوکریت به این دلیل باشد که ماهیان به خوبی تغذیه نکرده‌اند یا به عفونتی مبتلا هستند (Aly و Mohamed، ۲۰۱۰).

فاکتورهایی مانند عوامل محیطی (درجه حرارت، فصول سال، شوری، دوره نوری، تراکم)، عوامل فیزیولوژیکی (سن، جنس، گونه آبزی، چرخه تولیدمثلی و وضعیت بلوغ، شرایط تغذیه‌ای)، زمان نمونه‌گیری، دقت و روش‌های نمونه‌گیری و نحوه تهیه نمونه می‌تواند در پارامترهای خون تأثیر بگذارد و باعث اختلاف در تفسیر نتایج شود (Verdegem و همکاران، ۱۹۹۷).

نتایج هماتولوژی در مرحله دوم پرورش، نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین همه تیمارها است (P>۰/۰۵). اما بیش‌ترین میزان نوتروفیل و کم‌ترین میزان لنفوسیت در تیمار ۰/۵٪ عصاره سیر + ۰/۵٪ عصاره‌ی سرخارگل و کم‌ترین میزان نوتروفیل و بیش‌ترین میزان لنفوسیت در تیمار ۱٪ عصاره سیر ملاحظه گردید که هیچ‌کدام با گروه شاهد تفاوت نداشتند (P>۰/۰۵) (جدول ۴).

در آزمون چالش تیمارها با باکتری *یرسینیا روکری*، تا روز دوم هیچ‌کدام از تیمارها تلفات نداشتند. به‌تدریج علائمی هم‌چون تیرگی رنگ بدن، نقاط خون‌ریزی در اطراف دهان، قاعده باله‌ها و آبشش‌ها را نشان دادند و در نهایت علائم عدم تعادل و شنای وارونه دیده شد. تلفات همه تیمارها از روز سوم آغاز شد، به‌غیراز تیمار تغذیه شده با ۱٪ عصاره سیر که تلفات آن از روز چهارم آغاز شد. بیش‌ترین تلفات تیمارها تا روز هفتم بود و پس از آن کاهش یافت. کم‌ترین تلفات مربوط به تیمار تغذیه شده با ۱٪ عصاره سیر بود و بیش‌ترین تلفات مربوط به تیمار ۱٪ عصاره سیر + ۱٪ عصاره سرخارگل بود.

فقانی و همکاران (۱۳۸۸) گزارش کرده‌اند، احتمالاً افزایش درصد لنفوسیت در اثر تغذیه با آرگوسان، موجب افزایش مقاومت سیستم دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زا، تحریکات محیطی و استرس‌ها شده که این خود می‌تواند با افزایش فعالیت سوخت و ساز، نهایتاً باعث بهبود رشد، کاهش میزان مرگ و میر و افزایش میزان بازماندگی شود. آرگوسان تکثیر لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها و تولیدسیتوکین‌ها و لیزوزیم را افزایش می‌دهد و هم‌چنین پاسخ به واکسیناسیون را در ماهی افزایش می‌دهد

[۱] Echinacein
[۲] Echinacoside
[۳] Echinolone

Schering-plough Animal Health Aquaculture) Corporation، ۲۰۰۵).

علیشاهی و همکاران (۱۳۹۱) در مطالعه خود بر روی کپورمعمولی گزارش کرده‌اند که تلفات بعد از چالش با باکتری زنده *آئروموناس هیدروفیلا* در تیمار آرگوسان، سرخارگل و لوامیزول کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت اما آویشن و کندر تأثیری بر میزان تلفات بعد از چالش نداشته است. با توجه به اثرات تحریک ایمنی لوامیزول (Ispir و Dorueu، ۲۰۰۵) و آرگوسان (Peddie و همکاران، ۲۰۰۲) می‌توان ادعا نمود که عصاره سرخارگل نیز مثل این دو محرک بر تحریک ایمنی و ایجاد مقاوت در برابر عفونت‌های باکتریایی تأثیر دارد.

علیشاهی و همکاران (۱۳۹۱) در مطالعه بر روی ماهی اسکار گزارش داده‌اند که عصاره سرخارگل نیز هم‌چون آرگوسان و لوامیزول در چالش با باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* سبب کاهش تلفات شده است که نشان‌دهنده تحریک ایمنی در اثر مواد مؤثره موجود در آن می‌باشد.

علیشاهی و همکاران (۱۳۹۱) در مطالعه بر روی ماهی برزم (*Luciobarbus barbulus*) گزارش کرده‌اند، تیمارهای آرگوسان، سرخارگل و داروا‌ش به‌ترتیب کم‌ترین تلفات و تیمارهای سیاه دانه و شاهد بیش‌ترین تلفات را داشته‌اند. با این وجود تلفات در تیمارهای ویتامین C و آلوئه ورا نیز کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت. می‌توان بهبود فاکتورهای رشد متعاقب تجویز این مکمل‌های غذایی را علاوه بر اثر مستقیم ماده موثره این مواد بر رشد، به اثر آن‌ها بر تحریک ایمنی غیراختصاصی ماهی نسبت داد، چر ا که بهبود فاکتورهای ایمنی ماهی به‌صورت غیرمستقیم بهبود رشد ماهی را نیز باعث می‌شود. تلفات بعد از چالش، با میزان مقاومت میزبان نسبت به عفونت باکتریایی ایجاد شده نسبت مستقیمی دارد که این مقاومت در اثر تحریک ایمنی غیراختصاصی ماهی ایجاد می‌شود. لذا در تیمارهای با بقای بیش‌تر نوعی تحریک ایمنی ایجاد گردیده که این تحریک در اثر مواد مؤثره موجود در عصاره مصرفی بوده است. باید به این نکته هم توجه داشت که تاثیر محرک‌های ایمنی در میزان بقای ماهی معمولاً در دوره‌های طولانی‌تر (۶ ماه) باعث ایجاد تغییرات قابل توجهی می‌شود (Heidarieh و همکاران، ۲۰۱۰؛ Gopalakannan و Arul، ۲۰۰۶).

با توجه به نتایج تحقیقات مشابه، هموگلوبین و هماتوکریت به‌عنوان یک شاخص مهم و رایج در تعیین سلامت و بیماری ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد و افزایش آن‌ها نشان‌دهنده افزایش قابلیت انتقال گازهای تنفسی می‌باشد. افزایش لنفوسیت نشان‌دهنده افزایش مقاومت بدنی و سازگاری فیزیولوژیک با محیط پرورش است. کاهش نوتروفیل، ائوزینوفیل و مونوسیت هم نشان‌دهنده عدم ابتلای بدن به پارازیت‌ها و عوامل مهاجم خارجی بوده و سلامت ماهیان تغذیه شده با اسانس سیر را نشان می‌دهد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد، در مرحله اول پرورش (۳۰ روز تغذیه با عصاره‌ها)، بیش‌ترین میزان گلبول‌های سفید در تیمار تغذیه شده با ۱٪ عصاره سیر و تیمار تغذیه شده با ۰/۵ ٪ عصاره سرخارگل مشاهده شد که با گروه شاهد تفاوت معنی‌دار داشت. بیش‌ترین میزان لنفوسیت در تیمار ۱٪ عصاره سیر و تیمار ۰/۵٪ عصاره سرخارگل، کم‌ترین میزان نوتروفیل در تیمار ۱٪ عصاره سیر و کم‌ترین درصد ائوزینوفیل در تیمار ۰/۵٪ عصاره سرخارگل مشاده گردید. در مرحله دوم پرورش (۱۵روز تغذیه بدون عصاره) کم‌ترین میزان نوتروفیل و بیش‌ترین میزان لنفوسیت در تیمار ۱٪ عصاره سیر ملاحظه گردید و در چالش با باکتری *یرسینیا روکری* به‌مدت دو هفته، تلفات تیمار ۱٪ عصاره سیر یک روز دیرتر از بقیه تیمارها شروع شد و در طول این دو هفته کم‌ترین درصد تلفات را به‌خود اختصاص داد.

با توجه به نتایج این تحقیق و سایر محققین، می‌توان نتیجه گرفت استفاده از ۱٪عصاره سیر (۱۰ گرم/کیلوگرم غذا) و ۰/۵٪ عصاره‌ی سرخارگل (۵ گرم/کیلوگرم غذا) سبب تحریک سیستم ایمنی و افزایش مقامت ماهیان قزل‌آلای‌رنگین‌کمان شده است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولین دانشکده منابع طبیعی و پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه که در انجام این پژوهش یاری نمودند، سپاسگزاری به‌عمل می‌آید.

منابع

۱. **اخلاقی، م. و انبارکی‌مطلق، م.، ۱۳۸۳.** تغییرات فاگوسیتوز در ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) به دنبال استفاده از محرک‌های ایمنی کوئیلآ (Quil-A) و لوامیزول (Levamisole). مجله علمی شیلات ایران. شماره ۱۳، جلد ۳، صفحات ۱ تا ۱۲.

۲. **اکرمی، ر.؛ قلیچی، ا. و احمدی، ا.، ۱۳۹۱.** تأثیر پربیوتیک اینولین جیره غذایی بر پارامترهای

هماتولوژی و بیوشیمی سرم خون فیل‌ماهیان (*Huso huso*) پرورشی. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۶، شماره ۲، صفحات ۴۹ تا ۶۲.

۳. **امیری. ش.م.؛ یوسفیان، م.؛ یاوری، و.؛ صفری، ر. و قیاسی، م.، ۱۳۹۰.** بررسی تأثیر پربیوتیک اینولین بر فاکتورهای سیستم ایمنی و مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در برابر باکتری بیماری‌زای استرپتوکوک. مجله زیست شناسی ایران. شماره ۲، جلد ۲۴. صفحات ۶۱ تا ۸۵.

۴. **بهمنی، م. و کاظمی، ر.، ۱۳۸۰.** مطالعه تطبیقی برخی عوامل بیوشیمیایی و خونی در تاس‌ماهیان پرورشی قره‌برون(*Acipenser Persicus*)وفیل‌ماهی(*Huso huso*) مجله علوم شیلاتی ایران. دوره ۱، شماره ۲، صفحات ۶۱ تا ۷۳.

۵. **تنگستانی، ر.؛ علیزاده، د.ا.؛ ابراهیمی، ع. و زارع، پ.، ۱۳۹۰.** اثر اسانس گیاه سیر بر شاخصه‌های هماتولوژیک فیل‌ماهیان جوان پرورشی. مجله تحقیقات دامپزشکی. دوره ۶۶، شماره ۳، صفحات ۲۰۹ تا ۲۱۶.

۶. **تیموری‌زاده، ز.؛ رحیمی، ش.؛ کریمی، م.ا. و امیدبیگی، ر.، ۱۳۸۸.** مقایسه اثر عصاره‌های آویشن، سرخارگل، سیر و آنتی‌بیوتیک ویرجینیامایسین بر لیپیدهای سرم، درصد هماتوکریت و میزان هموگلوبین جوجه‌های گوشتی. فصلنامه گیاهان دارویی. دوره ۸، شماره ۴، صفحات ۳۷ تا ۴۵.

۷. **رحمتی‌اندانی، ح.ر.؛ توکمه‌چی، ا.؛ مشکینی، س. و ابراهیمی، ه.، ۱۳۹۰.** افزایش مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر عفونت با *آئروموناس هیدروفیلا* و *یرسینیا روکری* با استفاده از لاکتوباسیل‌های جدا شده از روده ماهی کپورمعمولی. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۷، شماره ۲، صفحات ۵۸ تا ۷۴.

۸. **رضوی، س.م.؛ عزیزالهی، ب. و رحیمی، ه.، ۱۳۸۵.** بررسی اثر ضدویروسی عصاره سیر بر روی هرپس سیمپلکس ویروس با استفاده از روش کشت سلولی. مجله دانشکده دانداپزشکی. دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی. دوره ۲۴ ، شماره ۱، صفحات ۷۸ تا ۹۹.

۹. **سعیدی، ع.؛ پورغلام، ر.؛ نصرآباد، ع. و کامکار، م.، ۱۳۸۲.** مقایسه برخی پارامترهای هماتولوژیکال و بیوکمیکال (تعداد اریتروسیت‌ها، مقادیر هماتوکریت و هموگلوبین، اندیس‌های خونی شامل M.C.V و C.H.C و گلوکز یا قند خون) در بچه‌ماهی قره‌برون در شرایط دریا. مجله علمی شیلات ایران. دوره ۱، شماره ۱، صفحات ۹۹ تا ۱۰۶.

۱۰. **طاهرزاده، م؛، زندی، ک.؛ یعقوبی، ر.؛ تاجبخش، س. و راستیان، ز.، ۱۳۸۷.** اثر ضدویروسی گیاه حرا (*Avicennia marina*) بر روی ویروس پولیو در کشت سلولی. فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد ۲۴، شماره ۱، صفحات ۳۸ تا ۴۶.

۱۱. **علیشاهی، م.؛ پورمهدی. ب.م. و عبدی، ا.، ۱۳۹۱.** مقایسه اثر برخی محرک‌های ایمنی و عصاره‌های گیاهی بر فاکتورهای رشد و مقاومت ماهی برزم در برابر استرس‌های محیطی. مجله دامپزشکی ایران، دوره ۸، شماره ۴، صفحات ۶۰ تا ۷۲.

۱۲. **علیشاهی، م.؛ مصباح، م.؛ نامجویان، ف.؛ سبزواری زاده، م. و راضی‌جلالی، م.، ۱۳۹۱.** مقایسه اثر برخی محرک‌های ایمنی شیمیایی و گیاهی در ماهی اسکار *Astronotus ocellatus*. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۸، شماره ۲، صفحات ۵۸ تا ۶۸.

۱۳. **علیشاهی، م.؛ سلطانی، م.؛ مصباح، م. و زرگر، ا.، ۱۳۹۱.** اثرات تحریک ایمنی و رشد لوامیزول، آرگوسان و سه عصاره گیاهی در ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*). مجله تحقیقات دامپزشکی. دوره ۶۷، شماره ۲، صفحات ۱۰۵ تا ۱۱۶.

۱۴. **فقانی، ط.؛ آذری‌تاکامی، ق.؛ قیاسی، م.؛ فقانی، س. و احمدی‌فر، ا.، ۱۳۸۸.** ارزیابی اثر ارگوسان و واکسن ضداسترپتوکوکوزیس بر پارامترهای خونی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات. سال ۳، شماره ۲، صفحات ۹۸ تا ۱۱۲.

۱۵. **فراهانی، گ.ش.، ۱۳۸۸.** بررسی برخی فاکتورهای هماتولوژیک‌در بعضی از ماهیان خانواده Acipenseridae. فصلنامه علمی - پژوهشی زیست‌شناسی جانوری. دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان. سال ۲ ، شماره ۱، صفحات ۷۸ تا ۹۳.

۱۶. **گل‌افشان، ح.ا.، ۱۳۸۲.** روش‌های آزمایشگاهی و کنترل کیفی در خون‌شناسی. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی شیراز. چاپ سوم. ۲۰۰ صفحه.

۱۷. **مناف‌فر، ر.؛ ملکی، ر.؛ آتشبار، ب. و آق. ن.، ۱۳۸۵.** استفاده از عصاره دانه گیاه *Azadirachta indica* علیه مژکداران تک‌سلولی مهاجم در محیط پرورش متراکم جلبک تک‌سلولی *Dunaliella tertiolect*. مجله پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان. سال ۱۹، شماره ۱، صفحات ۸۲ تا ۸۸.

۱۸. **وثوقی، غ.م.؛ شاهسونی، د. و پیغان، ر.، ۱۳۷۶.** بررسی فاکتورهای خونی ماهی‌حوض (*Carassius*

auratus) مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. دوره۵۲، شماره ۴، صفحات ۱۴۸ تا ۱۶۱.

19. **Adetumbi, M.; Javor G.T. and Lau, B.H.S., 1986.** Allium sativum (garlic). Inhibits lipid synthesis by Candida albicans. Antimicrob. Agents. Chemother. Vol. 30, pp: 499-501.
20. **Agarwal, K.C., 1996.** Therapeutic action of garlic constituents. Medicinal Research Reviews. Vol. 16, pp: 111-124.
21. **Alishahi, M.; Soltani, M.; Mesbah, M. and Esmaili Rad, A., 2011.** Effects of dietary *Silybum marianum* extract on some immune responses of Common carp (*Cyprinus carpio*). Journal Veterinary Research. Vol. 66, pp: 255-263.
22. **Aly, S.M. and Mohamed, M.F., 2010.** *Echinacea purpurea* and *Allium sativum* as immunostimulants in fish culture using Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. Vol. 94, pp: 31-39.
23. **American Society of Health–system Pharmacists. 2001.** Herbal companion to AHFS DI., Bethesda, Maryland, USA. Vol: 7, pp: 31-32.
24. **Bahram, S.; Vahabzadeh Roodsari, H.; Nazari, R.M. and Javadian, R., 2005.** Efect of Levamisole on survival rate of the Persian Sturgeon *(Acipenser persicus)* fry. Journal of marine science and technology. Vol. 4, pp: 1-9.
25. **Bone, K.E., 1997.** What makes it work? Alt. Med. Rev. Vol. 2, pp: 87-93.
26. **Murray, M.T. and Pizzorno, J.E., 1999.** Textbook of Natural Medicine, 2nd ed. Churchill Livingstone Inc. 704 p.
27. **Campbell, T.W. and Ellis, C.K., 2007.** Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology.3th ed. Blackwell Publishing. Vol. 5, pp: 93 – 113.
28. **Cataldi, E.; Di Marco, P.; Mandich, A. and Cataudella, S., 1998.** Serum parameters of Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* (Pisces: Acipenseriformes); effects of temperature and stress. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 121, pp: 351–354.
29. **Corzo-Martinez, M.; Corzo, N. and Villamiel, M., 2007.** Biological properties of onions and garlic. Trends in Food Science and Technology. Vol. 18, pp: 609-625.
30. **David, J.C.M.; Jaree, P.; James, H.L.; Somkiat, K.; Kim, D.T. and Alexandra, A., 2001.** Immunostimulation of striped snakehead Channa striata against epizootic ulcerative syndrome. Aquaculture. Vol. 195, pp: 1 – 15.
31. **Elgayyar, M.; Draughon, F.A.; Golden, D.A. and Mount, J.R., 2001.** Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms, J. Food Prot. Vol. 64, pp: 1019 -1024.
32. **Ghazanfari, T. and Ebrahimi, H.Z.M., 2002.** Immmunomodulatory activity of a protein isolated from garlic extract on delayed type hypersensitivity. International Immunopharmacology. Vol. 211, pp: 1541-1549.
33. **Gopalakannan, A. and Arul, V., 2006.** Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. Aquaculture. Vol. 255, pp: 179-187.
34. **Guyton, A.C. and Hall, J.E., 1989.** Medical Physiology. Translated by Farrokh Shadan, Chehr Publication. Tehran, Iran. 502 p.
35. **Harikrishnan, R.; Nisha, M.R. and Balasundaram, C., 2003.** Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture. Vol. 221, pp: 41-50.
36. **Harris, J.C.; Cottrell, S.L.; Plummer, S. and Lioy, D., 2001.** Antimicrobial properties of Allium sativum (garlic). Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 57, pp: 282-286.
37. **Heidarieh, M.; Afsharnasab, M.; Soltani, M.; Dashtyannasab, A.; Rajabifar, S. and Sheikhzadeh, N., 2010.** Effects of ergosan and vibromax to prevent vibriosis and WSSV in *Litopeaneus vannamei*, Journal of Fisheries and Aquatic Science. Vol. 5, pp: 120-125.
38. **Heinrich, P. and Larry, D.L., 1996.** Garlic: The science and therapeutic application of Allium Sativum L. and related species. Williams & Wilkins Publication, 2 nd Ed. 329 p.
39. **Hrubec, I.C. and Smith, S.A., 1990.** Hematology of fish. In: Veterinary

Garlic (*Allium sativum*). And chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. Vol. 12, pp: 172-201.

51. **Stoskopf, M.K. 1993.** Clinical phatology. In: fish medicine. Vol. 4, pp: 113-130.
52. **Stoskopf, M.K., 1993.** Clinical phatology. In: fish medicine. Vol. 35, pp: 113-130.
53. **Svobodova, Z. and Vykusova, B., 1991.** Diagnostics prevention and Therapy of fish disease and intoxications. Manual for international train ing course on fresh water fish disease and intoxication. pp: 156-157.
54. **Thygesen, L.; Thulin, J.; Mortensen, A.; Skibsted, L.H. and Molgaard, P., 2007.** Antioxidant activity of cichoric acid and alkamides from *Echinacea purpurea*, alone and in combination. Food Chemistry. Vol. 101, pp: 74-81.
55. **Verdegem, M.C.J.; Hilbrands, A.D. and Boon, J.H., 1997.** Influence of salinity and dietary composition on blood parameter values of hybrid red tilapia (*Oreochromis niloticus & Oreochromis. mossambicus*). Aquaculture Research and Development. Vol. 28, pp: 453-459.
56. **Vinodhini, R. and Narayanan, M., 2009.** The impact of toxic heavy metals on the hematological parameters in common carp (*cyprinus carpio*). Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering. Vol. 8, pp: 23-28.

hematology. Feldman, B.F. pp: 1120-1125.

40. **Houston, A.H. and Rupert, R., 1997.** Immediate response of hemoglobin system of gold fish (*Cyprinus auratus*) to tempera change. Can. Journal of Zoology. Vol. 54, pp: 1731-1741.
41. **Iwama, G. and Nakanishi, T., 1996.** Innate immunity in fish. In: The Fish Immune System. Academic Press, London, UK. Vol. 7, pp: 73-114.
42. **Ispir, U. and Dorueu, M., 2005.** Astudy on the effects of levamisole on the immune system of Rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*, walbaum). Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. Vol. 29, pp: 1169-1176.
43. **Matthias, A.; Banbury, L.; Bone, K.M.; Leach, D.N. and Lehmann, R.P., 2008.** *Echinacea alkylamides* modulate induced immune responses in T cells. Fitoterapia. Vol. 79, pp: 53-58.
44. **Nguyen, T.T.T.; Mukherjee, S.C. and Pani, P.K., 2002.** Studies on the immunostimulatory effect of certain plant extracts on fish. Abstracts: AH-13, the Sixth Indian Fisheries Forum, Mumbai, India. 153 p.
45. **O Hara, M.; Kiefer, D.; Farrell, K. and Kemper, K., 1998.** A review of 12 commonly used medicinal herbs. Arch. Fam. Med. Vol. 7, pp: 523-535.
46. **Peddie, S.; Zou, J. and Secombes, C.J., 2002.** Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of Ergosan. Veterinary Immunology and Immunopathology. Vol. 86, pp: 101-113.
47. **Ress, L.P.; Minney, S.F.; Plummer, N.J.; Slatter, J.H. and Skyrme, D.A., 1993.** Aquantitative assessment of the antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum*). World. Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol. 9, pp: 303- 307.
48. **Savage, T.F., Cotter, P.F. and Zakrzewska EI., 1996.** The effect of feeding mannan oligosaccharid on immunoglobulins, plasma IG, bile IgI, of Wrolstad MW male turkeys. Poultry. Science. Vol. 75, pp: 143 - 4.
49. **Schering-plough Animal Health Aquaculture Corporation. 2005.** Union, newjersey. Brifes about Aquavac Ergosan and Aquavac Garvetil vaccine.
50. **Shalaby, A.M.; Khattab, Y.A. and Abdel Rahman, A.M., 2006.** Effects of

Effect of Garlic extract *(Allium sativa*) and purple Coneflower (*Echinacea purpurea*) on hematological parameters and resistance to bacterial infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

- **Saeid Meshkini:** Department of Food Hygiene Faculty of Veterinary Medicine and Artemia and Aquatic Research Institute, Urmia University. P.O.Box: 57159-44514, Urmia, Iran
- **Mahin Imani*:** Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University. P.O.Box: 57159-44514, Urmia, Iran
- **Ali Ehsani:** Department of Food Hygiene Faculty of Veterinary Medicine / Department of Biotechnology and Quality Control Artemia and Aquatic Research Institute, Urmia University. P.O.Box: 57159-44514, Urmia, Iran
- **Amir Tukmechi:** Department of Pathobiology and Quality Control Artemia and Aquatic Research Institute, Urmia University. P.O.Box: 57159-44514, Urmia, Iran
- **Farhad Farhangpazhouh:** Veterinary Specialist Hospital of Urmia University. P.O.Box: 57159-44514, Urmia, Iran
- **Yaghob Ghiasi:** Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University. P.O.Box: 57159-44514, Urmia, Iran

Received: September 2013 Accepted: October 2013

Keywords: Hematological parameters, Garlic extract, Purple Coneflower extract, Bacterial Resistance, *Oncorhynchus mykiss*

Abstract

Blood tissue is an important indicator of the physiological condition of the body's organs to diagnose disease and organisms biological control, as aquatic animals. This study aimed to determine the factors and parameters hematological including white blood cells, hemoglobin, hematocrit and percentage differential white blood cell such as neutrophils, lymphocytes and eosinophils with garlic extracts and Echinacea extracts on rainbow trout was impressed. 1050 fishes with an average weight of 50 ± 6.5 g in seven treatments (control, 0.5% garlic, 1% garlic, 0.5% Echinacea, 1% Echinacea, 0.5% garlic + 0.5% Echinacea, 1% garlic + 1% Echinacea) and were divided into three replicates. Rainbow trout in all first stages reared for 30 days whit diets containing plant extracts were fed and in the second stage rearing for 15 days only whit control diet (Without extract) were fed, Until time to remove the effect of additives of the fish's body be determined. In order to compare and evaluate the hematological parameters on days zero, 30 and 45 of the breeding period of per replicate three fishes were randomly selected. From fish's caudal vein using the anticoagulant was bloodletting, then, in order to compare and evaluate the hematological parameters, blood samples were tested by standard methods of Hematology. To determine the effect of plant extracts in the bacterial challenge with pathogen, the bacterium *yersinia ruckeri* was injected intraperitoneally on 30th day and mortality daily was recorded in two weeks. In the first stage of culture, most of the white blood cells (which was significantly different from control treatments) and most of the lymphocytes, hemoglobin and hematocrit (without significant difference from the control treatments) was observed in garlic extract 1% and echinacea extract 0.5% treatments. In the second phase of culture none of hematologic parameters in the experimental treatments there were no significant difference with control treatments ($P > 0.05$), but most of the lymphocytes was observed in garlic extract 1% treatments. In experiments bacterial challenge with the bacterium *Yersinia ruckeri*, Mortality in the treatment garlic extract 1% one day later than other treatments began and the lowest mortality accounted. From the results of this study can be conclude that the use of garlic extract 1 %and echinacea extract 0.5% makes stimulates the immune system and increase resistance in rainbow trout.

* Corresponding Author's email: Mahin_i22@yahoo.com