

اثرات عصاره هیدرو الکلی بابونه (*Matricaria recutita*) و رازیانه (*Foeniculum vulgare*) بر شاخص‌های خونی و ایمنی بچه ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

علیرضا نجات صنعتی^۱، عباسعلی زمینی^{*}

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

تاریخ دریافت: ۱۵ بهمن ۱۳۹۵

تاریخ پذیرش: ۱۹ تیر ۱۳۹۶

چکیده

محرك‌های ایمنی به ویژه با منشاء طبیعی جایگاه مهمی در بهبود کارایی سیستم ایمنی ماهیان دارند. در این تحقیق که با هدف ارزیابی تأثیر عصاره‌های گیاهان بابونه و رازیانه بر شاخص‌های خونی و ایمنی ماهی کپور، در تابستان ۱۳۹۳، در مرکز تحقیقات علوم شیلاتی و فنون دریایی دکتر کیوان وابسته به دانشگاه آزاد اسلامی لاهیجان انجام شد، ۱۸۰ قطعه بچه ماهی با وزن $(9/25 \pm 1/92)$ گرم در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۵ تیمار با خوراک حاوی مقادیر ۰/۵ و ۱٪ و مکمل تلفیقی ۰/۵٪ عصاره‌ها و گروه شاهد، به مدت دو ماه مورد تغذیه قرار گرفتند. در پایان دوره از ماهیان خون‌گیری شد و شاخص‌های خون‌شناسی شامل WBC و RBC (شمارش با لام نئوبار)، Hct (با روش میکروهماتوکریت)، Hb (با روش Cyanomet Hemoglobine)، تشخیص افتراقی (با تهیه گسترش خونی و رنگ آمیزی گیمسا) و شاخص‌های ایمنی شامل IgM و لیزوزیم (با روش کدورت سنجی، Elliss/Thomas methods) و آنزیم‌های کبدی ALT و AST (با روش فتومتریک)، تعیین گردیدند. حداکثر تعداد RBC $(36855/6 \pm 1448333/3)$ عدد در mm^3 ، حداکثر هموگلوبین $(8 \pm 0/27)$ gr/dl و حداکثر Hct $(38/67 \pm 2/08)$ ٪ متعلق به تیمار بابونه ۱٪ بود. بیش‌ترین WBC در تیمار تلفیقی $(1307/7 \pm 9700)$ عدد در mm^3 مشاهده شد. در تشخیص افتراقی، بیش‌ترین مقدار نوتروفیل‌ها در تیمار تلفیقی $(32/33 \pm 1/53)$ درصد و بیش‌ترین مقدار لمفوسیت‌ها در شاهد $(72/67 \pm 1/53)$ درصد مشاهده شد. تیمار رازیانه ۱٪، بیش‌ترین IgM $(16/10 \pm 0/66)$ mg/dl را دارا بود. بیش‌ترین ایموگلوبولین کل $(23/17 \pm 2/15)$ mg/ml و بیش‌ترین لیزوزیم $(34/67 \pm 8/96)$ u/ml/min نیز مربوط به تیمار بابونه ۱٪ بود. ALT و AST کم‌ترین مقدار را (به ترتیب $17/67 \pm 4/51$ و $167/67 \pm 26/84$ u/l) در تیمار رازیانه ۱٪ داشتند. در مقایسه، تمام تیمارها نسبت به شاهد دارای افزایش معنی‌دار در تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت بودند ($P < 0/05$). WBC در سطح ۱٪ عصاره‌ها نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری یافت ($P < 0/05$). درصد نوتروفیل‌های همه تیمارها نسبت به شاهد و رازیانه ۰/۵٪ بطور معنی‌داری بیش‌تر بود ($P < 0/05$). سطوح ۱٪ عصاره‌ها، افزایش معنی‌دار در ایموگلوبولین کل، نسبت به شاهد داشتند ($P < 0/05$). IgM در سطوح ۱٪ و تلفیقی عصاره‌ها، افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت ($P < 0/05$). لیزوزیم در تیمارهای بابونه ۱٪ و تلفیقی، نسبت به سایر تیمارها، افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0/05$). ALT در تیمار ۱٪ رازیانه، نسبت به همه تیمارها به‌طور معنی‌داری کم‌تر بود ($P < 0/05$). به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت، تجویز خوراکی مقدار ۱٪ جیره حاوی عصاره بابونه و پس از آن رازیانه، باعث بهبود فاکتورهای خونی و ایمنی ذاتی ماهی کپور می‌گردد.

کلمات کلیدی: کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، بابونه (*Matricaria recutita*)، رازیانه (*Foeniculum vulgare*)، خون‌شناسی، ایمنی.

مقدمه

تقویت و ارتقاء سیستم ایمنی و دفاعی بدن ماهیان به ویژه در گونه‌های با ارزش و اقتصادی از اصلی‌ترین نیازهای پرورش دهندگان و مهم‌ترین رویکردهای محققان می‌باشد (Shalaby et al., 2006). از آنجاکه ماهیان از نظر تکاملی نسبت به حیوانات خونگرم ابتدایی‌تر هستند، سیستم ایمنی طبیعی یا ذاتی (Innate immunity) نسبت به سیستم ایمنی اختصاصی (Specific immunity)، نقش بیشتری در محافظت آن‌ها دارد. مواد محرک ایمنی، مقاومت در برابر بیماری‌ها را با تقویت سیستم ایمنی غیر اختصاصی ماهی افزایش می‌دهند. اگرچه حافظه ایمنی در چنین مواردی بسیار کوتاه است، استفاده از این محرک‌ها در افزایش کارایی سیستم ایمنی موثر است (سلطانی، ۱۳۸۷). انواع طبیعی محرک‌های ایمنی به ویژه با منشاء گیاهی که از آن‌ها به عنوان ترکیبات دوست محیط زیست و طبیعت یاد می‌گردد (Fereidouni et al., 2013)، مزیت‌های متعددی دارند و جایگاه مناسبی یافته‌اند. از این مزیت‌ها می‌توان به در دسترس بودن، آسیب کمتر برای محیط زیست و جاندار و کم بودن عوارض جانبی در مقایسه با داروهای شیمیایی، عدم ایجاد مقاومت نسبی عوامل بیماری‌زا به آن‌ها و امکان تولید در سطح وسیع با قیمت مناسب اشاره نمود (Gabor et al., 2010).

بابونه (*Matricaria recutita*) از خانواده Asteracea، از جمله گیاهان بومی ایران و از قدیمی‌ترین و پرمصرف‌ترین گیاهان دارویی شناخته شده در جهان است. از مهم‌ترین ترکیبات موجود در گل‌های آن اسانس فلاونوئید، کومارین‌ها و بیزابول هستند که از لحاظ دارویی مورد توجه می‌باشند. عصاره آن دارای خواص ضد عفونی‌کنندگی، ضد باکتریایی،

آرام‌بخش، ضد اسپاسم و تعدیل‌کنندگی ایمنی می‌باشد (مدرس ثانوی و همکاران، ۱۳۹۲). اثر افزایش‌دهندگی بابونه بر میانگین WBC و میانگین تعداد مطلق نوتروفیل‌ها در افراد سالم و نیز مبتلایان به نوتروپنی گزارش شده است (آزادبخت، ۱۳۷۸؛ روح پرور، ۱۳۷۷). نتایج بررسی اثر مکمل خوراکی بابونه بر پارامترهای خونی و ایمنی بچه‌ماهیان انگشت‌قد (fingerling) گربه‌ماهی آفریقایی (*gariepinus*) (Claris) که توسط Abdelhadi و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد، نشان‌دهنده افزایش مقادیر هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد لکوسیت‌ها نسبت به گروه شاهد بود. بررسی دیگری در خصوص اثرات تغذیه از خوراک حاوی مکمل گیاه بابونه بر پارامترهای فیزیولوژیکی بچه‌ماهیان fry تیلای پای نیل (*Oreochromis niloticus*) توسط Zaki و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد و افزایش مقادیر هموگلوبین خون و کاهش مقادیر آنزیم‌های کبدی ALT و AST، نسبت به گروه شاهد، مشاهده گردید.

گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare*) از خانواده Apiaceae در مناطق مختلف ایران به صورت خودرو می‌روید. دارای خواص ضد التهاب (قاسمی پیر بلوطی، ۱۳۸۸) و آرام‌بخشی (زرگری، ۱۳۷۵) می‌باشد.

رازیانه حاوی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی است که اثرات متعادل‌کنندگی سیستم ایمنی داشته و نقش موثری در ارتقاء سلامتی و کاهش خطر بیماری‌ها در انسان دارند (Cherng et al., 2008). Soltan و El-Laithy (۲۰۰۸) که اثر افزودنی خوراکی رازیانه را بر fry تیلای پای نیل (*Oreochromis niloticus*) بررسی کردند، افزایش هموگلوبین و کاهش آنزیم‌های کبدی ALT و AST در تیمار تغذیه شده با مکمل را در

مقایسه با شاهد ملاحظه نمودند. همچنین تاثیر مکمل اسانس رازیانه بر شاخص های خونی بچه ماهیان سفید دریای خزر توسط یگانه و همکاران (۱۳۹۳) بررسی شد و افزایش مشاهده شده گلبول های سفید و قرمز ماهی در تیمار تغذیه شده با مکمل، به عنوان اثر مثبت این مکمل در ارتقاء سیستم ایمنی عنوان شد.

ماهی کپور معمولی، از گونه های مهم پرورشی در جهان (FAO, 2015) و از مهم ترین ماهیان پرورشی در ایران است و تقریباً در تمام استان های دارای صنعت آبی پروری کشور، پرورش می یابد (علیشاهی و همکاران، الف ۱۳۹۱). این ماهی گرچه از مقاومت نسبتاً زیادی نسبت به عوامل نامساعد محیطی از جمله کمبود اکسیژن برخوردار است، اما در طی دوران رشد خود با بیماری های زیادی روبرو گشته که برخی از آنها تهدید جدی برای آن به حساب می آیند (جلالی و نصری چاری، ۱۳۷۲). در مناطقی مانند ایران، پرورش کپور، مواجه با طی دوره استرس زا در شرایط سرد زمستان است (Soltani et al., 2010). بیماری های حاصل از عوامل باکتریایی فرصت طلب که معمولاً پس از استرس های ناشی از انتقال بچه ماهیان از استخرهای زمستانه به استخرهای پرواری در اوایل فصل بهار شیوع می یابد و عفونت های قارچی که متعاقب عفونت های میکروبی و انگلی و یا استرس های محیطی، تراکم زیاد ماهیان و ... پدید می آید، می تواند حتی سبب مرگ ماهیان بیمار گردد. با توجه به این که این ماهی به وسیله تغذیه دستی در استخرهای پرورشی رشد می یابد، بهترین روش پیش گیری از بروز بیماری ها و نیز افزایش مقاومت آن ها، مدیریت صحیح پرورش و تغذیه مناسب در طی دوران تغذیه و رشد بچه ماهیان است، تا به حدی که مقاومت طبیعی مناسب و مطلوب را در جریان

زمستان گذرانی به دست آورند (جلالی و نصری چاری، ۱۳۷۲). به علت ویژگی های خاص سیستم ایمنی، ماهی تاثیر استفاده از مکمل های غذایی را بیش تر نشان می دهد (Swain et al., 2006). استفاده از محرک های ایمنی در قالب مکمل های غذایی در طی دوره پرورش می تواند وضعیت سلامتی ماهی در مقابله با میکروارگانیزم های بیماری زا را در مراحل استرس زا بهبود بخشد (Soltani et al., 2010).

بررسی شاخص های هماتولوژیکی، اطلاعات ارزشمندی درباره وضعیت فیزیولوژیکی و سلامتی ماهی ارائه می کنند (Luskova, 1997; Ahmadi et al., 2012). با توجه به گزارش اثرات بابونه و رازیانه در ایمنی انسان و نیز تاثیر بر شاخص های خونی و سیستم ایمنی ذاتی تعدادی از گونه های ماهی، از جمله گربه- ماهی آفریقایی، تیلاپای نیل و ماهی سفید دریای خزر، در این تحقیق، اثرات آن ها بر عوامل خونی و ایمنی ماهی کپور، به عنوان گونه مهم ماهی پرورشی ایران، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

این تحقیق در تابستان ۱۳۹۳ در مرکز تحقیقات علوم و فنون شیلاتی دکتر کیوان دانشگاه آزاد اسلامی لاهیجان، انجام شد.

وضعیت مخازن و محیط تحقیق

تعداد ۱۸ مخزن فایر گلاس بعد از شستشو، ضد عفونی و آب گیری شدند. شرایط فیزیکوشیمیایی آب مورد استفاده در طول دوره تحقیق به این قرار بود: دمای آب (۲۴/۹-۲۳/۵) درجه سانتی گراد، اکسیژن محلول (۴-۶/۷) میلی گرم در لیتر، pH (۸-۸/۵۶)، سختی کل

حداکثر ۲۷۵ میلی گرم در لیتر (CaCO_3)، شوری حداکثر $1/3 \text{ ppt}$ ، آهن کل حداکثر $0/14 \text{ ppm}$ ، ازت آمونیوم حداکثر $0/27 \text{ ppm}$ و ازت نیتريت حداکثر $0/1 \text{ ppm}$. اکسیژن، pH و دمای آب با دستگاه پرتابل WTW و پارامترهای فیزیکوشیمیایی (آمونیم، نیتريت، آهن) با دستگاه اسپکتروفوتومتر HACH-LONGE اندازه‌گیری شدند. منبع تامین آب اصلی، چاه موجود در مرکز و تعویض آب مخازن، روزانه ۱۰٪ حجم آن بود. مخازن با پمپ هوادهی آکواریوم، هوادهی شدند.

تهیه و آماده‌سازی ماهیان

تعداد ۱۸۰ قطعه بچه ماهی کپور معمولی، با وزن متوسط ($1/92 \pm 9/25$) گرم از یکی از مزارع پرورش بچه‌ماهی شهرستان رشت که دارای مجوز اداره کل شیلات استان بود، تهیه و پس از انجام ضدعفونی با نمک و هم‌دمایی، در مخازن قراردادده و به مدت ده روز، سازش‌دهی با شرایط و غذای دستی انجام شد.

آماده‌سازی عصاره‌ها و خوراک ماهیان

عصاره هیدروالکلی بابونه و رازیانه از شرکت کشت و صنعت فراوری گیاهان دارویی SOHA – JISSA تهیه گردید. در بالن تقطیر، الکل آن خارج و برای غلیظ‌تر شدن، در بن‌ماری ۴۰ درجه سانتی‌گراد قراردادده شد تا الکل آن، بیش‌تر تبخیر گردد و غلظت عصاره به میزان موردنظر برسد. به منظور مخلوط نمودن یکنواخت مکمل گیاهی با خوراک ماهی، مقدار مشخص خوراک اکستروود مخصوص ماهی کپور که از شرکت فرادانه تهیه شد، روی سینی گسترانیده و میزان مورد نظر از عصاره (به نسبت ۰/۵ و ۱٪ ماده خشک در خوراک مصرفی و درمورد تیمار تلفیقی با نسبت

مساوی ۰/۵٪ ماده خشک)، بعد از حل شدن در الکل اتیلیک به‌روی غذا اسپری گردید. این عمل همراه با بهم‌زدن خوراک چندین بار تکرار شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در هوای آزاد قرار داده شد تا کاملاً خشک و الکل آن تبخیر گردد (علیشاهی و همکاران، ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱). کلیه تیمارها با خوراک‌های مخصوص هر گروه به مدت دو ماه و به میزان روزانه ۵٪ وزن زنده (بیوماس) در سه مرتبه تغذیه گردیدند (پاپهن و حقوقی راد، ۱۳۸۲).

تیمارهای تحقیق

تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. بررسی، شامل دو تیمار تغذیه‌ای با عصاره‌های افزوده به نسبت ۰/۵٪ (علیشاهی و همکاران، ۱۳۹۰ و الف و ب ۱۳۹۱؛ عیشاهی و مصباح، ۱۳۹۱؛ Alishahi et al., 2010) و ۱٪ (Banaee et al., 2012; Banaee et al., 2014؛ عیشاهی، ۱۳۸۹؛ قاسمی پیر بلوطی و همکاران، ۱۳۹۰؛ Dugenci et al., 2003) به غذا و یک تیمار تغذیه‌ای تلفیقی (به نسبت مساوی ۰/۵٪ دو عصاره) و گروه شاهد (تغذیه شده با خوراک بدون عصاره)، که هر یک از گروه‌ها شامل سه تکرار بود، انجام شد. در هر یک از تکرارها (مخازن)، ۱۰ قطعه ماهی قرار داده شد.

خون‌گیری و انجام آزمایش‌های خون و

ایمنی‌شناسی

در انتهای دوره (پس از ۶۰ روز) از هر تیمار، ۶ ماهی به‌طور تصادفی (از هر تکرار ۲ ماهی) خون‌گیری شد. خون‌گیری از سرخرگ یا سیاهرگ دمی (Caudal Vein or Artery) صورت‌پذیرفت و برای اندازه‌گیری

پارامترهای خون‌شناسی، نمونه‌ها با ظرف حاوی یخ خشک به آزمایشگاه منتقل شدند. انتقال نمونه‌ها در دو دسته ویال‌های دارای ماده ضدانعقادی (هپارین) برای آزمایش CBC و فاقد آن برای آزمایش ALT و AST و IgM انجام شد. گلبول‌های سفید و قرمز پس از رقیق‌سازی خون توسط محلول Lewis، توسط لام هموسیتر متر نتوبار، شمارش شدند. تعیین هماتوکریت با روش میکروهماتوکریت و سانتریفوژ لوله‌های مویینه پر شده از خون در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه (RPM) طی مدت ۵ دقیقه انجام گردید. تشخیص افتراقی لکوسیت‌ها با تهیه گسترش‌های خونی فیکس شده و رنگ‌آمیزی آن‌ها با محلول Giemsa و سپس شناسایی و شمارش با میکروسکوپ نوری انجام شد. سنجش هموگلوبین با استفاده از روش سیانومت هموگلوبین انجام شد. در این روش هموگلوبین در محلول درابکین تحت تاثیر واکنش‌های شیمیایی تبدیل به ترکیب سیان مت هموگلوبین شده و دچار تغییر رنگ می‌گردد. شدت تغییر رنگ، که با غلظت هموگلوبین نمونه خون نسبت مستقیم دارد در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (حقیقی، ۱۳۸۸؛ کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹).

فعالیت لیزوزیم براساس کدورت‌سنجی به روش (Ellis, 1990) و بر مبنای لیز باکتری گرم‌مثبت (*Micrococcus lysodeikticus*) حساس به آنزیم لیزوزیم اندازه‌گیری شد. در این روش با فعالیت لیزوزیم، دیواره سلولی میکروارگانیسم مذکور تجزیه شده و کدورت نمونه کاهش می‌یابد. بنابراین کدورت کمتر نشان‌دهنده فعالیت بیشتر لیزوزیم است. میزان کدورت، در طول موج ۶۷۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت. اندازه‌گیری ایمنوگلوبین کل با استفاده از روش

کالریمتریکی انجام شد. ابتدا پروتئین کل براساس تشکیل کمپلکس آبی متمایل به بنفش بین یون‌های مس با اتم‌های کربونیل اکسیژن و آمیدنیترژن، در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس مخلوط مساوی سرم و محلول پلی‌اتیلن گلیکول (که سبب رسوب همه پروتئین‌های پلاسما به جز ایمنوگلوبین‌ها می‌گردد)، به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوباسیون شد. پس از سانتریفوژ در ۴۰۰۰ دور در دقیقه (RPM) محلول سطحی به دست آمده نیز مورد سنجش پروتئین قرار گرفت. با تفاضل پروتئین اندازه‌گیری شده مرحله دوم از پروتئین کل اولیه، مقدار ایمنوگلوبین کل به دست آمد (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹). میزان IgM براساس کدورت‌سنجی به روش (Thomas, 1998) و بر مبنای اندازه‌گیری شدت کدورت حاصل از تشکیل کمپلکس IgM نمونه و آنتی‌بادی ضد آن، در طول موج ۳۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. آنزیم‌های ALT و AST با کیت زیست‌شیمی و به روش فتومتریک و بر مبنای مصرف NADPH و تبدیل آن به NAD^+ در طول موج ۵۰۵ نانومتر، براساس پروتکل کیت اندازه‌گیری شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها، در ابتدا نرمال بودن آن‌ها با آزمون Shapiro-Wilk تست گردید. در صورت نرمال بودن توزیع داده‌ها، برای مقایسه بین تیمارهای تغذیه‌ای از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه One-way ANOVA و برای جداسازی گروه‌های همگن از آزمون Duncan در سطح احتمال ۵٪ استفاده شد. برای داده‌های غیرنرمال از آزمون ناپارامتریکی Kruskal-Wallis استفاده گردید. معنی‌دار بودن اختلاف گروه‌های مورد

بررسی با استفاده از آزمون Man-Whitney مشخص شد. نرم افزار آماری SPSS Version 17 برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و نرم افزار Excel 2007 برای رسم نمودارها به کار برده شد.

نتایج

کم‌ترین تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت متعلق به گروه شاهد بود. تمام تیمارها

نسبت به این گروه دارای افزایش معنی‌دار بودند ($P < 0/05$) (جدول ۱). هر دو تیمار رازیانه و بابونه بین سطوح خود، از نظر تعداد یاخته‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت، فاقد اختلاف معنی‌دار بودند ($P < 0/05$). تیمارهای بابونه ۵٪ و ۱٪، افزایش معنی‌داری را در تعداد گلبول قرمز و هماتوکریت، نسبت به تیمارهای هم‌سطح رازیانه دارا بودند ($P < 0/05$).

جدول ۱: نتایج مقادیر شاخص‌های هماتولوژیک در گروه‌های تحقیق

گروه آزمایشی	RBC (تعداد در میلی متر مکعب) (انحراف معیار $\pm$ میانگین)	Hb (گرم بر دسی لیتر) (انحراف معیار $\pm$ میانگین)	Hct (درصد) (انحراف معیار $\pm$ میانگین)	WBC (تعداد در میلی متر مکعب) (انحراف معیار $\pm$ میانگین)
شاهد	$1116666/7 \pm 28867/5^a$	$6/20 \pm 0/2^a$	$29/67 \pm 1/53^a$	$6733/3 \pm 450/9^a$
۵٪ رازیانه	$1256666/7 \pm 60277/1^b$	$6/97 \pm 0/31^b$	$33/67 \pm 1/53^b$	$7400 \pm 458/3^{ab}$
۱٪ رازیانه	$1336666/7 \pm 58594/6^{bc}$	$7/40 \pm 0/36^{bcd}$	$35/33 \pm 1/53^{bc}$	8100 ± 400^{bc}
۵٪ بابونه	1400000 ± 50000^{cd}	$7/77 \pm 0/25^{cd}$	37 ± 1^{cd}	$7833/3 \pm 208/2^{ab}$
۱٪ بابونه	$1448333/3 \pm 36855/6^d$	$8 \pm 0/27^d$	$38/67 \pm 2/08^d$	$9066/7 \pm 208/2^{cd}$
تلفیقی ۵٪ عصاره‌ها	$1333000 \pm 82819/1^{bc}$	$7/33 \pm 0/51^{bc}$	$34/67 \pm 2/08^{bc}$	$9700 \pm 1307/7^d$

حروف لاتین غیرمستترک، نشان‌دهنده اختلاف بین تیمارها است ($P < 0/05$)

تیمار تلفیقی دو عصاره از نظر تعداد یاخته‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت، فاقد اختلاف معنی‌دار با سطح ۱٪ رازیانه بودند. درحالی‌که تیمار بابونه ۱٪، نسبت به تیمار تلفیقی، افزایش معنی‌داری را در همه موارد مذکور نشان داد ($P < 0/05$).

تعداد گلبول‌های سفید خون در تیمارهای ۵٪ عصاره‌ها، نسبت به شاهد، افزایش معنی‌داری نشان‌داد ($P < 0/05$)، اما در سطح ۱٪ هر دو عصاره، افزایش نسبت به شاهد معنی‌دار بود ($P < 0/05$). تعداد گلبول‌های سفید در تیمار مکمل تلفیقی دو عصاره، نسبت به تمام تیمارها به‌جز بابونه ۱٪، افزایش معنی‌دار را نشان داد ($P < 0/05$).

در تشخیص افتراقی گلبول‌های سفید خون (جدول ۲)، کم‌ترین مقدار نوتروفیل‌ها در گروه شاهد و بیش‌ترین مقدار، در تیمار تلفیقی مشاهده‌شد، که البته این افزایش نسبت به تیمارهای بابونه از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P < 0/05$). بیش‌ترین درصد لنفوسیت‌ها متعلق به گروه شاهد بود که اختلاف آن با بقیه تیمارها به‌جز تیمار رازیانه ۵٪، معنی‌دار بود ($P < 0/05$). کم‌ترین مقدار در تیمار تلفیقی مشاهده‌گردید. بین تیمارهای مورد بررسی از نظر میزان Monocytes و Eosinophils خون، اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد ($P < 0/05$).

جدول ۲: ترکیب افتراقی گلبول‌های سفید گروه‌های تحقیق

گروه آزمایشی	Neutrophils (درصد) (انحراف معیار $\pm$ میانگین)	Lymphocytes (درصد) (انحراف معیار $\pm$ میانگین)	Monocytes (درصد) (انحراف معیار $\pm$ میانگین)	Eosinophils (درصد) (انحراف معیار $\pm$ میانگین)
شاهد	$24 \pm 1/73^a$	$72/67 \pm 1/53^c$	3 ± 1	$0/33 \pm 0/58$
۰/۵٪ رازیانه	26 ± 1^a	$69/67 \pm 2/52^{bc}$	3 ± 1	$1/33 \pm 0/58$
۱٪ رازیانه	$29/33 \pm 1/16^b$	$66/33 \pm 1/53^{ab}$	$3/33 \pm 0/58$	1 ± 1
۰/۵٪ بابونه	30 ± 1^{bc}	$65 \pm 2/65^a$	4 ± 1	1 ± 1
۱٪ بابونه	32 ± 1^c	$63/33 \pm 3/06^a$	$3/67 \pm 1/16$	1 ± 1
تلفیقی ۰/۵٪ عصاره‌ها	$32/33 \pm 1/53^c$	$63/33 \pm 1/16^a$	$3/67 \pm 0/58$	$0/67 \pm 0/58$

حروف لاتین غیر مشترک، نشان‌دهنده اختلاف بین تیمارها است ($P < 0/05$)

ایمونوگلوبولین کل در تیمارهای بابونه و رازیانه ۱٪ بدون تفاوت معنی‌دار نسبت به هم، افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد و رازیانه ۰/۵٪ دارا بود ($P < 0/05$) (جدول ۳).

این افزایش در تیمارهای ۱٪ و تلفیقی دو عصاره، نسبت به شاهد معنی‌دار بود ($P < 0/05$). کم‌ترین مقدار لیزوزیم، متعلق به گروه شاهد بود. تیمارهای بابونه ۱٪ و تلفیقی، افزایش معنی‌داری را نسبت به سایر تیمارها نشان دادند ($P < 0/05$) (جدول ۳).

سطوح ۰/۵٪ عصاره‌ها، افزایش معنی‌داری در مقدار IgM نسبت به شاهد نشان‌دادند ($P > 0/05$)، اما

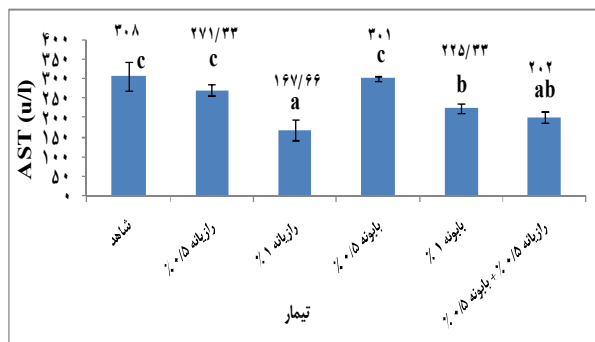
جدول ۳: شاخص‌های ایمنی در گروه‌های تحقیق

گروه آزمایشی	Immunoglobulin Total (mg/ml) (انحراف معیار $\pm$ میانگین)	Igm (Mg/dl) (انحراف معیار $\pm$ میانگین)	Lysozyme (u/ml/min) (انحراف معیار $\pm$ میانگین)
شاهد	$17/73 \pm 0/05^a$	$11/57 \pm 1/1^a$	$13/33 \pm 2/08^a$
۰/۵٪ رازیانه	$18/7 \pm 2/11^a$	$13/13 \pm 0/42^{ab}$	$15/33 \pm 2/52^a$
۱٪ رازیانه	$22/83 \pm 1/63^b$	$16/10 \pm 0/66^c$	23 ± 5^a
۰/۵٪ بابونه	$22 \pm 1/61^b$	$12/43 \pm 0/6^a$	22 ± 5^a
۱٪ بابونه	$23/17 \pm 2/15^b$	$14/43 \pm 0/74^{bc}$	$34/67 \pm 8/96^b$
تلفیقی ۰/۵٪ عصاره‌ها	$20/13 \pm 0/81^{ab}$	$15/33 \pm 2/02^c$	$34 \pm 6/08^b$

حروف لاتین غیر مشترک، نشان‌دهنده اختلاف بین تیمارها است ($P < 0/05$)

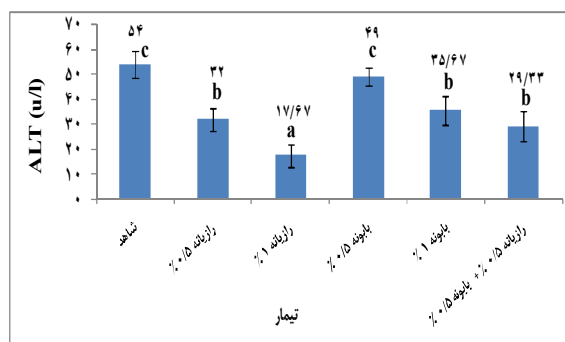
نتایج مقادیر ALT خون بچه‌ماهیان، نشان‌داد که مقادیر در گروه شاهد، نسبت به سایر تیمارها (بجز تیمار بابونه ۰/۵٪) با اختلاف معنی‌داری، بیش‌تر بود (شکل ۱). کم‌ترین مقدار ALT، مربوط به رازیانه ۱٪ بود که کاهش معنی‌داری را نسبت به سایر تیمارها از خود نشان‌داد ($P < 0/05$). هم‌چنین بیش‌ترین AST، در گروه شاهد اندازه‌گیری شد (شکل ۲)، که با مقادیر در تیمارهای عصاره‌ها در سطح ۰/۵٪، اختلاف

($P < 0.05$)، ولی نسبت به تیمار تلفیقی عصاره‌ها، کاهش معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$).



شکل ۲: میانگین تغییرات AST خون در تیمارهای مختلف

معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$). کم‌ترین مقادیر AST نیز در تیمار رازیانہ ۱٪ مشاهده شد، که مقدار آن نسبت به تیمار بابونه ۱٪، به‌طور معنی‌داری کم‌تر بود.



شکل ۱: میانگین تغییرات ALT خون در تیمارهای مختلف

بحث

تغییر شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی در فصول مختلف، تغذیه با جیره‌های غذایی مختلف و بیماری‌ها ثابت شده‌است (Aldrin *et al.*, 1982). شاخص‌های خونی از قبیل تعداد گلبول‌های قرمز و سفید، غلظت هموگلوبین و درصد همتوکریت اطلاعات ارزشمندی برای ارزیابی سلامت ماهیان فراهم می‌کنند (Banace *et al.*, 2008). با توجه به اینکه در کپور سالم، تحت شرایط دمایی مناسب، تعداد اریتروسیت‌ها بین ۱۱۰۰۰۰۰ - ۱۸۰۰۰۰۰ عدد می‌باشد (Svoboda *et al.*, 1996)، تعداد گلبول‌های قرمز تیمارهای این تحقیق، بین حداقل ۲۸۸۶۷/۵ ± ۱۱۱۶۶۶۶/۷ عدد در گروه شاهد و حداکثر ۳۶۸۵۵/۶ ± ۱۴۴۸۳۳۳/۳ عدد در گروه بابونه ۱٪ بود. یگانه و همکاران (۱۳۹۳)، در بررسی تاثیر مکمل اسانس رازیانہ بر فراسنجه‌های خونی بچه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) با وزن (۰/۶ ± ۰/۰۲) گرم در سطوح (صفر) شاهد، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ میلی گرم در کیلو گرم جیره، طی مدت ۶۰ روز (مشابه تحقیق حاضر)، افزایش معنی‌دار در

تعداد گلبول‌های قرمز در سطوح ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم اسانس در کیلو گرم جیره را نسبت به شاهد مشاهده کردند که با اثر افزایشی مکمل رازیانہ در این تحقیق مطابقت دارد. علیشاهی و همکاران (الف ۱۳۹۱)، اثرات تحریک ایمنی سه عصاره گیاهی سرخارگل، کندر و آویشن را در سطحی مشابه با سطح حداقل تحقیق حاضر (۰/۵٪ جیره غذایی)، بر بچه‌ماهی کپور ۱/۲۲ ± ۱۱/۱۲ گرمی در طی مدت ۴۲ روز بررسی کردند، ولی تفاوت معنی‌داری را از نظر افزایش تعداد گلبول‌های قرمز نسبت به گروه شاهد ملاحظه نکردند. Alishahi و همکاران (۲۰۱۰) اثر عصاره ۰/۵٪ آلوئه‌ورا بر ایمنی کپور معمولی ۱۱/۴ ± ۱۰۸ گرمی را در طی ۸ هفته بررسی نمودند که تفاوت معنی‌داری بین تیمارها از نظر تعداد گلبول‌های قرمز ملاحظه نشد. با توجه به تطابق نتیجه یگانه و همکاران با نتیجه این تحقیق در تاثیر مکمل رازیانہ بر افزایش معنی‌دار اریتروسیت‌ها، دلایل تفاوت در نتایج سایر محققین را شاید بتوان در تفاوت در گونه گیاهان و ویژگی‌ها و ترکیبات موجود در عصاره‌های آن‌ها، تفاوت در مدت دوره تیمار و ...

دانست (مدرس ثانوی و همکاران، ۱۳۹۲؛ علیشاهی و مصباح، ۱۳۹۱؛ Ibtisam, 2011). در این بررسی، افزایش معنی دار در میزان هموگلوبین خون ماهیان در تمام تیمارها نسبت به شاهد، مشاهده شد. با توجه به این که هموگلوبین جزء اصلی گلبول قرمز است (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹)، از این رو شباهت غالب نتایج به دست آمده از اندازه گیری مقادیر هموگلوبین با نتایج حاصل از شمارش تعداد گلبول قرمز در تیمارها دارای رابطه ای منطقی می باشد.

Abdelhadi (۲۰۱۰)، تاثیر تغذیه از گیاهان دارویی (بصورت خشک)، از جمله بابونه آلمانی را، بر پاسخ های ایمنی گربه ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) ۲۲ گرمی در طی ۱ ماه، بررسی نمودند. مقدار هموگلوبین در تیمار بابونه ۱٪ از گروه شاهد بیش تر بود. Zaki و همکاران (۲۰۱۲)، اثر جیره های غذایی حاوی مکمل های خشک گیاهان دارویی از جمله بابونه آلمانی را در سطوح ۰، ۱ و ۲٪ جیره، بر بچه ماهی تیلاپای نیل (۳/۰ ± ۸۲/۰ گرمی) در طی ۱۱۲ روز بررسی نمودند. مقدار هموگلوبین در سطح ۲٪ نسبت به هر دو سطح دیگر افزایش داشت. یگانه و همکاران که تاثیر مکمل اسانس رازیانه را بر بچه ماهیان سفید بررسی کردند، افزایش معنی دار هموگلوبین را در تیمارهای ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره نسبت به گروه شاهد مشاهده نمودند. Hagibeglou و Sudagar (۲۰۱۰)، اثرات مخلوط ۴ عصاره گیاهی را در سطوح ۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ و ۱۲۵۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره، بر پاسخ های ایمنی ماهی کپور معمولی در طی ۴۵ روز بررسی نمودند، که مقادیر هموگلوبین در تیمارهای ۱۰۰۰ و ۱۲۵۰ میلی گرم عصاره، افزایش معنی داری را نسبت به تیمارهای سطوح پایین تر، داشتند ($P < 0.05$).

Soltan و El-Laithy (۲۰۰۸)، اثر افزودنی های خوراکی از جمله رازیانه را در سطح ۱٪ بر بچه ماهیان Fry تیلاپای نیل در مدت ۹۰ روز بررسی کردند، تاثیر افزایشی رازیانه در جیره غذایی را بر مقادیر هموگلوبین نسبت به گروه شاهد، ملاحظه نمودند. علیشاهی و همکاران (۱۳۹۰)، تاثیر عصاره خوراکی خارمریم را در سطح ۵/۰٪ (مشابه سطح حداقل مکمل این تحقیق) در جیره ماهی کپور ($8/22 \pm 65/12$ گرم)، در مدت ۴۰ روز بررسی نمودند و افزایش مقادیر هموگلوبین را نسبت به گروه شاهد، ملاحظه کردند. با توجه به این که تعداد گلبول های قرمز، غلظت هموگلوبین و درصد هماتوکریت خون با یکدیگر ارتباط دارند (ستاری، ۱۳۸۵)، نتایج میزان هماتوکریت در خون بچه ماهیان کپور در این تحقیق، در انطباق با نتایج تعداد گلبول های قرمز خون بود. در بررسی Abdelhadi و همکاران (۲۰۱۰)، نیز مقادیر هماتوکریت در خون بچه ماهیان گربه ماهی آفریقایی مورد تغذیه با مکمل خشک ۱٪، نسبت به گروه شاهد، افزایش نشان داد (البته اختلاف آن معنی دار نبود ($P > 0.05$)). اثرات افزایش دهنده گی عصاره های گیاهی آویشن و کندر بر میزان هماتوکریت خون بچه ماهیان کپور معمولی نسبت به گروه شاهد، در بررسی علیشاهی و همکاران (الف ۱۳۹۱)، در سطح ۵/۰٪ جیره (مشابه با سطح حداقل مکمل این تحقیق)، نیز ملاحظه گردید، هر چند تفاوت با گروه شاهد معنی دار نبود ($P > 0.05$). در تحقیق حاضر افزایش درصد هماتوکریت، از سطوح ۵/۰٪ مکمل ها به بالا، نسبت به شاهد، معنی دار بود. همچنین نتایج این تحقیق نشان دهنده آن بود که افزایش سطح عصاره از ۵/۰٪ به ۱٪ (در مورد هر دو عصاره)، لزوماً سبب افزایش معنی دار در پارامترهای (تعداد گلبول های قرمز،

هموگلوبین و هماتوکریت) نگردید و به‌طور کلی عصاره بابونه، اثرات افزایشی قابل ملاحظه‌تری نسبت به رازیانه در ارتقاء شاخص‌های مذکور داشت. استفاده از عصاره بابونه در تلفیق با رازیانه توانست، اثرات افزایشی تقریباً در حد استفاده از رازیانه ۱٪، ایجاد نماید. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که افزودن مکمل‌های عصاره گیاهان رازیانه و بابونه در جیره غذایی ماهی کپور معمولی، منجر به افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت، در سطوح مختلف افزوده شده نسبت به گروه شاهد گردید که این امر می‌تواند نشان‌دهنده برتری وضعیت تنفس و قابلیت انتقال گازهای تنفسی (ستاری، ۱۳۸۵) در تیمارها نسبت به شاهد باشد. افزایش گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در نتیجه مصرف رازیانه، ناشی از تاثیر آن، بر محیط روده‌ای و همانند نقش ویتامین C در جذب آهن دانسته شده است (یگانه و همکاران، ۱۳۹۳).

در این بررسی، تعداد گلبول‌های سفید در تیمارهای تغذیه شده با ۰/۵٪ عصاره‌ها، افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نداشت ($P > 0/05$) ولی در سطح ۱٪ هردو عصاره نسبت به شاهد، افزایش معنی‌دار نشان دادند. افزایش در تیمار بابونه ۱٪ به مراتب بیش‌تر از رازیانه ۱٪ بود. تیمار تلفیقی نسبت به رازیانه ۱٪ تعداد گلبول سفید بیش‌تری داشت که با بررسی کلی نتایج، می‌توان این امر را به اثر هم‌پیشی (تشدید کنندگی) بابونه نسبت داد. محرک‌های سیستم ایمنی، موادی هستند که گلبول‌های سفید خون را فعال می‌سازند (Raa, 2000). Abdelhadi و همکاران (۲۰۱۰)، که اثر مکمل خوراکی بابونه را بر گربه‌ماهی آفریقایی بررسی کردند، افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های سفید در خون بچه‌ماهیان فینگرلینگ، را در

سطح ۱٪ نسبت به گروه شاهد اعلام کردند ($P < 0/05$). آن‌ها با بررسی شاخص‌های Hepato & Splano / Somatic افزایش رشد کبد و طحال، ارگان‌های مهم خون‌سازی در ماهی را در نتیجه تغذیه از جیره‌های حاوی مکمل بابونه مشاهده کردند. یگانه و همکاران (۱۳۹۳)، که اثر مکمل اسانس رازیانه را در سطوح مختلف در بچه ماهی سفید بررسی کردند، افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های سفید در سطوح ۱۰۰، ۲۰۰، ۶۰۰ میلی گرم اسانس در کیلوگرم جیره، نسبت به گروه شاهد را اعلام نمودند و آن‌را ناشی از تاثیر ترکیبات فنی موجود در رازیانه دانستند. علیشاهی و همکاران (۱۳۹۰)، همچنین، افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های سفید خون در ماهیان کپور تغذیه شده با خوراک حاوی ۰/۵٪ عصاره خارمریم را نسبت به گروه شاهد مشاهده نمودند. افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های سفید در خون ماهیان کپور، در نتیجه تغذیه مخلوط عصاره الکلی چند گیاه دارویی، با افزایش سطح عصاره‌ها تا بالاترین سطح بررسی (۱۲۵۰ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم جیره)، نسبت به گروه شاهد و تیمارهای تغذیه شده با سطوح پایین‌تر، در بررسی Hagibegloo و sudagar (۲۰۱۰) نیز مشاهده شد ($P < 0/05$). تاثیر پودر زنجبیل (*Zingiber officinalis*) بر برخی از فاکتورهای خونی بچه ماهیان کپور معمولی توسط طوسی و همکاران (۱۳۸۹)، بررسی شد. با افزودن ۰/۵ و ۱٪ پودر زنجبیل به جیره پایه و تغذیه بچه ماهیان به مدت ۵۸ روز، نتایج به‌دست آمده نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار تعداد گلبول‌های سفید بین تیمارها با شاهد بود. همان‌گونه که ملاحظه می‌گردد، اثرات تغذیه از مکمل‌های گیاهی در افزایش‌دهندگی WBC، در غالب تحقیقات ذکر شده، با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. افزایش تعداد

گلبول‌های سفید می‌تواند ناشی از اثر عصاره‌ها بر بافت‌های خون‌ساز ماهی از جمله بافت لمفوئید و تولید و تکثیر این گلبول‌ها باشد که نقش مهمی در ارتقاء و تقویت سیستم ایمنی ذاتی (غیراختصاصی) ماهی دارد (Alishahi *et al.*, 2010; Banaee *et al.*, 2015).
 علیشاهی و همکاران، ۱۳۹۱ (a). Martins و همکاران (۲۰۱۰)، افزایش همزمان RBC و لکوسیت‌ها و هماتوکریت را در ماهی تغذیه شده با سیر مشاهده نمودند. افزایش تعداد لکوسیت‌ها، هموگلوبین و هماتوکریت در تیلایپای نیل تغذیه شده با مکمل خوراکی سیر، توسط Shalaby و همکاران (۲۰۰۶) و در تیلایپای هیبرید توسط Ndong و Fall (۲۰۱۱) نیز گزارش گردید. همچنین افزایش WBC، RBC، هموگلوبین و هماتوکریت در نتیجه تجویز خوراکی عصاره Silymarin در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) توسط Banaee و همکاران (۲۰۱۲) گزارش شد که ناشی از تاثیر آن بر عملکرد اعضا Haematopoietic (خون‌ساز) مانند طحال و فوق کلیوی که نقش مهمی در ساخت سلول‌های خونی ایفا می‌نمایند، عنوان گردید. به‌طور کلی افزایش WBC، RBC، هموگلوبین در تیمارها در مقایسه با گروه شاهد در این بررسی که با نتایج محققین مذکور و نیز (Hajibeglou and Sudagar, 2010) در مورد ماهی کپور مطابقت دارد، می‌تواند نشان‌دهنده فعال‌شدن سیستم دفاعی به‌ویژه ایمنی ذاتی در نتیجه تغذیه از مکمل‌های گیاهی باشد (Barreto-Medeiros *et al.*, 2005).
 درصد و نوع گلبول‌های سفید نیز در تعیین وضعیت عمومی ماهی کاربرد فراوانی دارد (شاهسونی و همکاران، ۱۳۷۸). نسبت انواع گلبول‌های سفید، یکی از شاخص‌های مهم سلامتی و وضعیت سیستم ایمنی در

جانوران می‌باشد (Shalaby *et al.*, 2006). در این بررسی، درصد نوتروفیل‌ها در تیمار رازیانه ۰/۵٪، اختلاف معنی‌دار آماری با گروه شاهد نداشت. اما اثر افزایشی تیمار بابونه ۰/۵٪، از نظر آماری در سطحی مشابه، (بدون اختلاف معنی‌دار) با تیمار رازیانه ۱٪ بود. تیمار بابونه ۱٪ اختلاف معنی‌داری با سطح ۰/۵٪ خود نداشت، اما اثر افزایشی آن بر درصد نوتروفیل‌ها، از رازیانه ۱٪ به‌طور معنی‌داری بیش‌تر بود ($P < 0/05$). مقدار نوتروفیل‌ها در تیمار تلفیقی دو عصاره، حتی از تیمار بابونه ۱٪ نیز بیش‌تر بود. مرور کلی نتایج، نشان‌دهنده اثر تشدیدکنندگی مکمل بابونه در هم‌پیشی با رازیانه می‌باشد Abdelhadi و همکاران (۲۰۱۰) نیز اثر افزایشی مکمل بابونه ۱٪ و سطوح بالاتر از آن (۳ و ۵٪) را بر درصد نوتروفیل‌ها در خون گربه‌ماهی آفریقایی، نسبت به گروه شاهد مشاهده نمودند که با نتیجه این تحقیق در داشتن تأثیر افزایشی مکمل بابونه بر درصد نوتروفیل‌ها مطابقت دارد. در این تحقیق، درصد لنفوسیت‌ها در خون بچه‌ماهیان کپور گروه شاهد، بیش‌ترین مقدار را داشت. تیمار رازیانه ۰/۵٪ نیز از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نداشت. همه تیمارهای حاوی بابونه نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری، درصد لنفوسیت کم‌تری را در خون دارا بودند. در بررسی Abdelhadi و همکاران (۲۰۱۰) کاهش درصد لنفوسیت‌ها در خون گربه‌ماهی آفریقایی در نتیجه تغذیه از سطح ۱٪ مکمل بابونه، نسبت به گروه شاهد، ملاحظه شد که با نتیجه این تحقیق مطابقت داشت. تغییرات معکوس (متقابل) درصد لنفوسیت‌ها (کاهش) و نوتروفیل‌ها (افزایش) مشاهده شده در این بررسی همراه با افزایش کلی WBC نسبت به شاهد، با نتایج تحقیق Abdelhadi و همکاران (۲۰۱۰) در نتیجه تغذیه از

مکمل گیاهی بابونه مطابقت داشت. در تحقیق Mohammadi و همکاران (۲۰۱۳)، که تأثیر قرارگیری در معرض سطوح (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی گرم در لیتر) عصاره‌های اکالیپتوس و شمع‌دانی را بر شاخص‌های خونی بچه‌ماهیان کپور ۲۵ گرمی در طی ۳ هفته بررسی نمودند، کاهش درصد لنفوسیت‌ها و در همان حال، افزایش درصد نوتروفیل‌ها که با افزایش کلی WBC با افزایش سطوح عصاره‌ها در محیط نسبت به شاهد همراه بود (و در سطوح بالاتر عصاره‌ها معنی‌دار نیز شد) ($P < 0.05$)، ملاحظه گردید. El-Feki و همکاران (۲۰۰۰)، تغییر در شاخص‌های هماتولوژیکی ماهی کپور را در نتیجه تزریق روغن سیاه‌دانه (*Nigella sativa*)، بررسی کردند. آن‌ها افزایش تعداد نوتروفیل‌های بالغ در تیمار تزریق‌شده با روغن را مشاهده‌نموده و آن‌را ناشی از تسریع مراحل نمو لکوسیت‌های Polymorphonuclear در نتیجه تأثیر روغن سیاه‌دانه اعلام نمودند. اثر بابونه بر افزایش تعداد گلبول‌های سفید و نوتروفیل‌ها در افراد سالم و مبتلایان به نوتروپنی گزارش شده است (آزاد بخت، ۱۳۷۸؛ روح پرور، ۱۳۷۷). همچنین، در بررسی اثر چند گیاه دارویی بر سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) ۵۰ گرمی که توسط قاسمی پیر بلوطی و همکاران (۱۳۹۰) به مدت ۸ هفته انجام شد، میزان لنفوسیت‌های خون در ماهیان تغذیه‌شده با مرزه بختیاری در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت، در حالی که درصد هتروفیل‌ها افزایش معنی‌دار داشت و نتیجه‌گیری شد که جیره حاوی مرزه با دارا بودن ترکیبات فنلی که از جمله مواد ثانویه موجود در عصاره‌های گیاهان به کاررفته در این تحقیق نیز می‌باشند، توانسته‌است، سبب افزایش درصد هتروفیل‌ها به عنوان اولین سلول‌های خونی فعال در ایمنی گردد. در این تحقیق

درصد مونوسیت‌ها و نوزینوفیل‌ها در تیمارها، تفاوت معنی‌دار آماری با یکدیگر نداشت. در بررسی Abdelhadi و همکاران (۲۰۱۰) نیز درصد مونوسیت‌ها در تمام سطوح تغذیه بابونه، تفاوت معنی‌دار آماری با گروه شاهد نداشت. افزایش سطح گلوبلین سرم، شاخص مناسبی برای بررسی وضعیت دفاع ایمنی ماهی و ارتقاء آن می‌باشد (Banaee et al., 2012; Siwwicki et al., 1994). در این بررسی افزایش معنی‌دار مقادیر Ig نسبت به شاهد در تیمارهای بابونه و رازیانه ۱٪ مشاهده شد. افزایش سطح عصاره از ۰/۵٪ به ۱٪ در تیمارهای بابونه تأثیر معنی‌داری در افزایش مقدار Ig نداشت، اما این افزایش در تیمارهای رازیانه معنی‌دار بود. در زمینه تأثیر جیره‌های حاوی مکمل‌های گیاهی بر ایمنوگلوبین کل در ماهیان، ارجی (۱۳۹۱)، تأثیر عصاره ریحان در سطوح ۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم (۰/۱٪) در کیلوگرم جیره را بر برخی شاخص‌های خونی قزل‌آلای رنگین کمان، بررسی نمود که نتایج تحقیق مذکور، افزایش مقادیر Ig را با بیش‌تر شدن سطح عصاره نشان داد ولی افزایش معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). در بررسی حاضر افزایش معنی‌دار Ig تا سطح ۰/۵٪ عصاره رازیانه و تلفیقی دو عصاره، نسبت به گروه شاهد ملاحظه نشد. مهمترین Ig در ماهی‌ها IgM می‌باشد که توانایی ایمنی اختصاصی در برابر آنتی ژن خاص را دارد (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹). در تحقیق حاضر بیش‌ترین مقدار IgM در تیمار رازیانه ۱٪ و تلفیقی دو عصاره ملاحظه شد که البته اختلاف معنی‌دار آماری با تیمار بابونه ۱٪ نداشتند.

کم‌ترین مقدار IgM نیز مربوط به گروه شاهد بود. تیمارهای سطوح ۰/۵٪ و ۱٪ عصاره نیز نسبت به گروه شاهد، افزایش مقدار IgM را نشان دادند، هر چند

افزایش، معنی دار نبود. بیش تر بودن معنی دار IgM نسبت به گروه شاهد، در نتیجه تغذیه ماهی کپور از مکمل عصاره ۰/۵٪ خارمریم، توسط علیشاهی و همکاران (۱۳۹۰) گزارش شد که با نتایج این تحقیق در تاثیر افزایشی تغذیه از مکمل های گیاهی مطابقت دارد. البته عدم معنی دار بودن افزایش در سطوح ۰/۵٪ در این تحقیق در مقایسه با بررسی مذکور، می تواند ناشی از تفاوت در گونه های گیاهی و تاثیر گذاری متفاوت ترکیبات ثانویه موجود در آن ها باشد. افزایش معنی دار IgM در تیمار تلفیقی دو عصاره، نسبت به هریک از تیمارهای ۰/۵٪، نشان دهنده اثر هم پشی این دو عصاره در ارتقاء این عامل ایمنی است.

میزان فعالیت لیوزوزیم سرم، به عنوان یک معرف با اهمیت ایمنی غیر اختصاصی در ماهی می باشد (Sakai, 1999). افزایش فعالیت لیوزوزیم بعد از تجویز محرک های ایمنی، واکسن ها و برخی پروبیوتیک ها در ماهی گزارش گردیده است (علیشاهی و همکاران، ۱۳۹۰). در این بررسی، تیمارهای بابونه ۱٪ و تیمار تلفیقی دو عصاره، به طور معنی داری نسبت به سایر تیمارها و شاهد، افزایش در لیوزوزیم خون را نشان دادند. با توجه به اینکه هیچ کدام از تیمارهای سطح ۰/۵٪، نتوانستند به تنهایی افزایش معنی دار لیوزوزیم نسبت به گروه شاهد را سبب شوند، افزایش معنی دار در تیمار تلفیقی را می توان نشانه اثر هم پشی این دو عصاره در ارتقاء این عامل ایمنی تلقی نمود. در بررسی Wu و Jian (۲۰۰۴)، افزایش معنی دار سطح لیوزوزیم در Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) ۱۰۱ گرمی در نتیجه تغذیه از مکمل های خشک گیاهی در سطح ۱ و ۱/۵٪ جیره نسبت به گروه شاهد، در طی ۳۰ روز ملاحظه شد ($P < 0.05$). علیشاهی و همکاران

(۱۳۹۰) که تأثیر تجویز خوراکی عصاره خارمریم در سطح ۰/۵٪ خوراک، بر پاسخ های ایمنی ماهی کپور را بررسی کردند، افزایش معنی دار لیوزوزیم را در خون ماهی کپور در نتیجه تغذیه از غذای حاوی مکمل گیاهی مذکور گزارش کردند. نتیجه این تحقیق، عدم تاثیر هر دو عصاره رازیانه و بابونه در سطح ۰/۵٪ را در افزایش معنی دار لیوزوزیم نشان داد که می تواند به دلیل تفاوت در مواد موثره گیاهان مورد بررسی باشد. همچنین با توجه به اینکه نوتروفیل ها از عوامل تولید لیوزوزیم می باشند، شاید بتوان مشاهده بیش ترین درصد نوتروفیل ها را در همان تیمارهایی که در این تحقیق دارای بیش ترین مقادیر لیوزوزیم هستند، در همین راستا ارزیابی نمود.

در این تحقیق همچنین آنزیم های کبدی (آلانین آمینوترانسفراز) و (آسپیرات آمینوترانسفراز) که دو آنزیم کلیدی برای تعیین عملکرد کبد می باشند (Shariffi, et al., 2001) مورد سنجش قرار گرفتند. در مقایسه با شاهد، کم ترین مقدار ALT و AST در تیمار رازیانه ۱٪ ملاحظه شد. افزایش سطح عصاره خوراکی در مورد هر دو گیاه کاهش معنی دار ALT و نیز AST را سبب شد.

بنایی و همکاران (۱۳۹۵)، افزایش معنی دار فعالیت آنزیم ALT تحت تیمار ۰/۵ و ۱ درصد عصاره آبی - الکلی پونه در روز ۴۵ تحقیق و افزایش معنی دار سطح آنزیم AST را تحت تیمار ۱ درصد عصاره، در روزهای ۳۰ و ۴۵ تحقیق، در ماهی کپور ۸۷ گرمی، مشاهده نمودند. در تحقیق دیگری، فلاح پور و همکاران (۱۳۹۶)، افزایش معنی دار سطوح آنزیم ALT و AST را در ماهیان کپور ۳۷ گرمی تحت تیمار ۱ درصد عصاره خوراکی گل ختمی ملاحظه کردند. محققین مذکور این افزایش ها

را نشان‌دهنده ایجاد سمیت سلولی، در نتیجه تجویز عصاره‌های گیاهان مورد تحقیق عنوان نمودند. اما بالعکس، کاهش معنی‌دار این دو آنزیم در نتیجه تغذیه از خوراک حاوی رازیانه در بچه‌ماهیان فینگرلینگ تیلایپای هیبرید (*Oreochromis niloticus* × *O. aurus*) نسبت به گروه شاهد، توسط El-Dakar و همکاران (۲۰۰۴) مشاهده شد. El-Laithy و Soltan (۲۰۰۸) که اثر رازیانه افزوده به خوراک تیلایپای نیل را در سطح ۱٪ خوراک بررسی نمودند، نیز کاهش (غیرمعنی‌دار) ALT و کاهش (معنی‌دار $P < 0.05$) AST را نسبت به گروه شاهد گزارش نمودند که با نتایج تحقیق حاضر، به‌ویژه از نظر آماری در مورد AST، مطابقت داشت. آن‌ها نتایج بدست آمده را ناشی از امحاء عوامل سمی غذا توسط ماده افزوده (رازیانه) که عملکرد کبد را بهبود می‌بخشد، عنوان نمودند. همچنین Zaki و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی تاثیر خوراکی گیاهان دارویی از جمله بابونه بر بچه‌ماهیان تیلایپای نیل، کاهش ALT و AST خون در تیمارهای بابونه را نسبت به گروه شاهد گزارش کردند. در بررسی حاضر، تیمارهای ۱٪ هر دو عصاره، کاهش بیش‌تری را نسبت به تیمارهای ۰.۵٪ خود نشان دادند. در مقایسه دو عصاره اثرات کاهندگی عصاره رازیانه در مورد هر دو شاخص، نسبت به بابونه بیش‌تر بود. عوامل کاهنده سطوح AST و ALT توسط رازیانه، ترکیبات D - limonene و B - myrcene موجود در آن عنوان شده‌اند که نهایتاً سبب اثرات هپاتوپروتکتیو این گیاه می‌گردند (Ozbec et al., 2003).

با ارزیابی مجموع نتایج به‌دست آمده از اثرات افزایشی و ارتقاءدهندگی مکمل‌ها بر شاخص‌های خونی و ایمنی بچه‌ماهی کپور در تحقیق حاضر، بیش‌ترین اثرات مربوط به تیمار بابونه ۱ درصد و پس از آن رازیانه ۱ درصد بوده و تیمارهای تلفیقی دو عصاره، بابونه ۰.۵ درصد و رازیانه ۰.۵ درصد به ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار دارند.

سپاسگزاری

این تحقیق، در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد در مرکز علوم شیلاتی و فنون دریایی دکتر کیوان (دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان) انجام گردید. بدینوسیله از جناب آقای دکتر حبیب وهاب‌زاده، ریاست محترم و کارکنان آن مرکز که در انجام این پژوهش مساعدت نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. آزاد بخت، م.، ۱۳۷۸. رده‌بندی گیاهان دارویی. تهران، نشر طبیب (تیمورزاده)، ۴۰۱ صفحه.
۲. ارجی، پ.، ۱۳۹۱. تاثیر سطوح مختلف عصاره ریحان (*Ocimum basilicum*) بر میزان رشد، بقا و برخی از شاخص‌های خونی و مقاومت بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مقابله با تنش حرارتی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان. دانشکده منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، ۹۳ صفحه.
۳. بنایی، م.، نعمت دوست حق، ب.، شوکت، پ.، ۱۳۹۵. تاثیر عصاره پونه (*Mentha longifolia*) بر فاکتورهای بیوشیمیایی خون و شاخص‌های رشد ماهی کپور (*Cyprinus carpio*). نشریه توسعه آبی‌پروری. دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، ۱۰ (۳)، ۳۹-۵۵.

۴. پاپهن، ف.، حقوقی راد، ن.، ۱۳۸۲. پرورش کپور و ماهیان استخری. تهران، انتشارات نوربخش، ۲۰۵ صفحه.
۵. جلالی، ب.، نصری چاری، ع.، ۱۳۷۲. معرفی آبزیان پرورشی، زیست شناسی و بیماری های شایع ماهی کپور معمولی در ایران. مجله آبزی پرور. معاونت تکثیر و پرورش آبزیان شیلات ایران، ۱ (۳) ۳-۶.
۶. حقیقی، م.، ۱۳۸۸. روش های آزمایشگاهی خون شناسی ماهی. تهران، موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۸۳ صفحه.
۷. روح پرور، م.، ۱۳۷۷. بررسی اثر قطره بابونه بر روی تعداد گرانولوسیت ها در افراد سالم داوطلب و در بیماران مبتلا به نوتروپنی و جدا کردن فراکسیون های مختلف بابونه. پایان نامه دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ۹۴ صفحه.
۸. زرگری، ع.، ۱۳۷۵. گیاهان دارویی ایران. تهران، انتشارات دانشگاه تهران. جلد دوم. ۹۸۰ صفحه.
۹. ستاری، م.، ۱۳۸۵. ماهی شناسی (۱) تشریح و فیزیولوژی. رشت، انتشارات حق شناس، ۶۶۲ صفحه.
۱۰. سلطانی، م.، ۱۳۸۷. ایمنی شناسی ماهیان و سخت پوستان. تهران، انتشارات دانشگاه تهران، ۲۶۴ صفحه.
۱۱. شاهسونی، د.، وثوقی، غ.، خضرائی نیا، پ.، ۱۳۷۸. تعیین برخی از فاکتورهای خونی ماهی ازون برون در سواحل جنوب شرقی دریای خزر. مجله پژوهش و سازندگی. وزارت جهاد کشاورزی، ۱۲ (۳)، ۱۳-۴۴.
۱۲. طوسی، م.، بزرگ نیا، ع.، سوداگر، م.، ۱۳۸۹. تاثیر پودر زنجبیل (*Zingibar officinalis*) بر برخی از فاکتورهای خونی بچه ماهیان کپور معمولی. همایش ملی گیاهان دارویی.
۱۳. علیشاهی، م.، ۱۳۸۹. بررسی اثر سطوح مختلف عصاره خام گیاه آلوئه ورا بر شاخص های رشد و میزان مقاومت در برابر عفونت با باکتری آئروموناس هیدروفیلا در ماهی سیکلید. مجله علمی پژوهشی بیولوژی دریا. دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، ۲ (۸)، ۴۱-۴۶.
۱۴. علیشاهی، م.، سلطانی، م.، مصباح، م.، اسمعیلی راد، ا.، ۱۳۹۰. تاثیر تجویز خوراکی عصاره خار مریم بر پاسخ های ایمنی ماهی کپور معمولی. مجله تحقیقات دامپزشکی. دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۶۶ (۳)، ۲۵۵-۲۶۳.
۱۵. علیشاهی، م.، سلطانی، م.، مصباح، م.، زرگر، ا.، ۱۳۹۱. اثرات تحریک ایمنی و رشد لوامیزول، ارگوسان و سه عصاره گیاهی در ماهی کپور. مجله تحقیقات دامپزشکی. دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۶۷ (۲)، ۱۳۵-۱۴۲.
۱۶. علیشاهی، م.، مصباح، م.، نامجویان، ف.، سبزواری زاده، م.، راضی جلالی، م.، ۱۳۹۱. مقایسه اثر برخی محرک های ایمنی شیمیایی و گیاهی در ماهی اسکار. مجله دامپزشکی ایران. دانشگاه شهید چمران اهواز، ۸ (۲)، ۵۸-۶۸.
۱۷. علیشاهی، م.، مصباح، م.، ۱۳۹۱. اثر عصاره دارویش و سیاه دانه بر بقاء و فاکتورهای رشد و مقاومت در برابر عفونت با آئروموناس هیدروفیلا در ماهی طلایی. مجله تحقیقات دامپزشکی. دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۶۷ (۳)، ۲۸۵-۲۹۰.
۱۸. فلاح پور، ف.، بنایی، م.، جوادزاده، ن.، ۱۳۹۶. اثرات تجویز خوراکی عصاره گل ختمی (*Althea officinalis*) بر سلول های خونی و برخی آنزیم های کبدی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). نشریه توسعه آبزی پروری. دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، ۱۱ (۱)، ۱۰۵-۱۱۷.
۱۹. قاسمی پیربلوطی، ع.، ۱۳۸۸. گیاهان دارویی و معطر (شناخت و بررسی اثرات آنها). شهرکرد، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی، ۵۰۰ صفحه.

- (*Cyprinus carpio*). International Journal of Veterinary Research, 4(3), 189-195.
28. Banaee, M., Mirvaghefi, A.R., Rafei, G.R., Amiri, B.M., 2008. Effect of sub-lethal diazinon concentration on blood plasma biochemistry. International Journal of Environmental Research, 2(2), 189-198.
 29. Banaee, M., Nematollahi, M.A., Asadi, M.S., Mirvaghefi, A. R., Ahmadi, K., 2012. Effects of Watercress extract on selected immunological parameters of rainbow trout. Open Veterinary Journal, 2, 32-39.
 30. Banaee, M., Taghiyan, M., Nafisi Bahabadi, M., Nematdoust Haghi, B., 2014. Effects of dietary administration of yarrow extract on growth performance and blood biochemical parameters of rainbow trout. International Journal of Aquatic Biology, 2(5), 275-285.
 31. Banaee, M., Fallahpour, F., Javadzade N., 2015. The effects of hydro-alcoholic extract of follower of marshmallow on some biochemical and hematological parameters in common carp. Journal of Herbal Drugs, 6(2), 73-83.
 32. Barreto – Medeiros, J.M., Feitoza, E.G., Magalhes, K., Da Silva, R.R., Manes De Castro, F.M., Manes De Castro, R., De Castro C. M. M. B., 2005. The expression of an intraspecific aggressive reaction in the face of a stressor agent alters the immune response in rats. Brazilian Journal of Biology, 65, 203-209.
 33. Cherg, J.M., Chiang, W., Chiang, L.C., 2008. Immunomodulatory activities of common vegetables and spices of Umbelliferae and its related coumarins and flavonoids. Food Chemistry, 106(3), 944-950.
 34. Dugenci, S.K., Arda, N., 2003. Some medicinal plants as immune stimulants for fish. Journal OF Ethnopharmacology, 88, 99-106.
 35. El-Dakar, A.Y., Hassanein, G.D., Gad S.S., Sakr, S. E., 2004. Use of medical and aromatic plants in fish diets (Efects of dried basil leaves on performance of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*), Fingerlings. 3rd Inter. Conf. on Amin. Production and Health in semi-Arid Areas, Suez Canal University, 265-277.
 36. EL – Feki, M.A.E., Fahim, H.M., Gad, M., Fatehy, A.A.G., 2000. Changes in the Haematological Parameters of Carp (*Cyprinus carpio*) Induced by Laminarian and Nigella sativa oil during the Motile Aeromonas Septicemia Disease. Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries, 4(2), 43-93
 37. Ellis, A.E., 1990. Lysozyme Assays in: Techniques in Fish Immunology. Stolen, J. S., T. C. Fletcher, D. P. Anderson & W. B. Van
 20. قاسمی پیر بلوطی، ع.، پیرعلی، ا.، پیشکار، غ.ر.، جلالی، س.م.ع.، رئیسی، م.، جعفریان دهکردی، م.، حامد، ب.، ۱۳۹۰. اثر اسانس چند گیاه دارویی بر سیستم ایمنی ماهی قزل آلائی رنگین کمان. فصلنامه داروهای گیاهی. دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، ۲ (۲)، ۱۴۹-۱۵۵.
 21. کاظمی، ر.، پوردهقانی، م.، یوسفی جوردی، ا.، یارمحمدی، م.، نصری تجن، م.، ۱۳۸۹. فیزیولوژی دستگاه گردش خون آبزیان و فنون کاربردی خون شناسی ماهیان. رشت، انتشارات بازرگان، ۱۹۴ صفحه.
 22. مدرس ثانوی، س.ع.م.، ایزدی، ز.، سروش زاده، ع.، اثنی عشری، م.، داودی، پ.، ۱۳۹۲. اثر ضد میکروبی اسانس گیاهان دارویی بابونه آلمانی و بابونه کبیر. مجله علمی پژوهشی ارمغان دانش. دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، ۱۸ (۱)، ۳۱-۴۳.
 23. یگانه، س.، مهدوی، س.، فیروزبخش، ف.، جانی خلیلی، خ.، ۱۳۹۳. تاثیر مکمل اسانس رازیانه بر شاخص های رشد، بازماندگی، ترکیب لاشه و فراستجه های خونی بچه ماهی سفید دریای خزر. فصلنامه علمی- پژوهشی علوم و فنون شیلات. دانشگاه تربیت مدرس، ۳ (۳)، ۷۹-۹۰.
 24. Abdelhadi, Y.M., Saleh, O., Sakr, S.F., 2010. Study on Effect of Wormseed Plants and Chamomile on Growth Parameters and Immune Response of African Catfish. Journal of Fisheries International, 5(1), 1-7.
 25. Ahmadi, K., Banaee, M., Vosoghei A.R., Mirvaghefi, A. R., Ataimehr, B., 2012. Evaluation of the immunomodulatory effects of silymarin extract on some immune parameters of rainbow trout. Acta Ichthyologica – Et Piscatoria, 42(2), 113-120.
 26. Aldrin, J.F., Messenger, J.L., Saleun, S., 1982. Analyses sanguineous de turbots d'eleuages immature (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture, 40, 17-25.
 27. Alishahi, M., Ranjbar, M.M., Ghorbanpour, M., Peyghan, R., Mesbah, M., Razi jalali, M., 2010. Effects of dietary *Aloe vera* on some specific and nonspecific immunity in the common carp

50. Shalaby, A.M., Khattab, Y.A., Abdel Rahman, A.M., 2006. Effects of *Allium sativum* and Chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 12, 172-201.
51. Shariffi, M., Jayawardena, P.A.H.L. Yusoff, F.M., Subasinghe, R., 2001. Immunological parameters of Japanese carp exposed to copper and challenged with *A. hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, 11, 281-291.
52. Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Rumsey, G.L., 1994. Dietary intake of Immunostimulant by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41(1), 125-139.
53. Soltan, A.S., El-Laithy, S.M., 2008. Effect of probiotics and some spices as feed additives on the performance and behaviour of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 12(2), 63- 80.
54. Soltani, M., Sheikhzade, N., Ebrahimzade-Mousavi, H. A., Zargar, A., 2010. Effects of Zataria multiflora Essential oil on Innate Immune Responses of Common Carp. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 5(3), 191-199.
55. Svoboda, Z., Pravda, D., Palackova, J., 1996. Unified methods of haematological examination of fish. *Research institute of fish culture and hydrobiology Vodnany, Czechoslovakia*.
56. Swain, P., SDash, P.K., Sahoo, P., Routray, S.K., Sahoo, S.D., Gupta, P.K., Meher, N., Sarangi, A., 2006. Non Specific immune parameters of Brood Indian Major Carp. And their seasonal variation. *Fish and Shellfish Immunology*, 22, 38-43.
57. Thomas, L., 1998. *Clinical Laboratory Diagnostics: Use and Assessment of Clinical Laboratory Results*. American Association for Clinical Chemistry; 1 edition. 1527 P.
58. Zaki, M.A., Labib, E.M., Nour, A.M., Tonsy, H.D., Mahmoud, S.H., 2012. Effects Some Medcinal Plants Diets on Mono Sex Nile Tilapia, Growth Performance, Feed Utilization and Physiological Parameters. *APCBEE Procedia*, 4, 220-227.
59. WWW. FAO.ORG/Fishery/Statistic.
- Muiswinkel (Eds). Vol 1. SOS Publications. USA, 101-103.
38. Fereidouni, M.S., Akhlaghi, M., Khadem Alhoseini, A., 2013. Antibacterial effects of medicinal plant extracts against *Lactococcus garvieae*, the etiological agent of rainbow trout lactococcosis. *International Journal of Aquatic Biology*, 1(3), 119-124.
39. Gabor, E.F., Sara, A., Barbu, A., 2010. The Effects of Some Phytoadditives on Growth, Health and Meat Quality on Different Species of Fish. *Animal Science and Biotechnologies*, 43(1), 61-65.
40. Hajibeglou, A., Sudagar, M., 2010. Immune Response of common carp fed with herbal immunostimulants diets. *Agricultural Journal*, 5(3), 163-172.
41. Ibtisam, M.A., 2011. Antimicrobia Activity of Ethanolic Extracts from Some Medicinal Plant. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(11), 678-683.
42. Jian, J., Wu, Z., 2004. Influences of traditional Chines medicine on non-specific immunity of Jian Carp. *Fish and Shellfish Immunology*, 16, 185-191.
43. Luskova, V., 1997. Annual cycles and normal valuses of haematological parameters in fishes. *Acta Sci. Nat. bibo*, 31, 70-78.
44. Martins, M.L., Moraes, F.R., Miyazaki, D.M., Brum, C.D., Onak, E.M., Fenerick, J.J., Bozzo, F. R., 2002. Alternative treatment for *Anacanthorus penilabiatu*s infection in cultivated pacu in Brazil and its haematological effects. *Parasite*, 9, 175-180.
45. Mohamadi, M., Zamini, A.A., Vahabzadeh, H., 2013. Evaluation of Antibacterial Properties of *Eucalyptus spp* and *Plelargonium roseum* Extraction Common carp, and Their Effecton Blood Indices. 2013. *Middle- East Journal of Sientific Research*, 15(5), 723-731.
46. Ndog, D., Fall, J., 2011. The effect of garlic on growth and immune responses of hybrid tlapia. *Journal of Clinical Immunology and Immunopathology Research*, 3, 1-9.
47. Ozbek, H., Ugras, S., Dulger, H., Bayram, I., Tuncer, I., Ozturk, G., Ozturk, A., 2003. Hepatoprotective effects of *F. vulgare* essential oil. *Fitoterapia*, 74, 317-319.
48. Raa, J., 2000. The use of stimulant in fish and shelfish Feeds. *University of Troms. Norway*.
49. Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172, 63-92.