



مطالعه برخی پارامترهای رشد و خون شناسی گربه ماهی پنگوسی *hypophthalmus* با افزودن عصاره گیاه مریم گلی *Salvia macrosiphon* به جیره *Pangasianodon*

محمد هادی رضایی^۱، ایمان سوری نژاد^{۲*}، سیاوش سلطانیان^۳، مرتضی یوسف زادی^۴

^۱ گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان

^۲ گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی و جوی، دانشگاه هرمزگان

^۳ گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز

^۴ گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم پایه، دانشگاه هرمزگان

چکیده

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۲/۰۱/۰۱

اصلاح: ۹۲/۰۶/۲۰

پذیرش: ۹۲/۰۶/۲۳

کلمات کلیدی:

عصاره

مریم گلی

پارامترهای رشد

خون شناسی

ارتقای سیستم ایمنی و افزایش رشد و بازماندگی ماهیان در مراحل اولیه زندگی از اصلی ترین نیازهای پرورش دهندگان می باشد. با توجه به اثرات محرکهای ایمنی گیاهی در تقویت سیستم ایمنی و رشد ماهیان، تاثیر عصاره گیاه مریم گلی *Salvia macrosiphon* بر برخی پارامترهای رشد و ایمنی بچه ماهی پنگوسی *Pangasianodon hypophthalmus* بررسی شد. ماهیان با میانگین وزنی $1/27 \pm 0/24$ با چهار جیره غذایی حاوی ۰، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلیگرم در کیلوگرم غذا از عصاره مریم گلی به مدت ۴۵ روز تغذیه شدند. در پایان دوره برخی پارامترهای رشد و خون شناسی ماهیان با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد آنالیز شد. اختلاف معنی داری بین تیمارهای مختلف از نظر فاکتورهای رشد در روز پانزدهم، سی ام و چهل و پنجم دوره مشاهده نشد. تیمارهای حاوی عصاره میزان بازماندگی ۱۰۰ درصد نشان دادند. کمترین درصد هماتوکریت در تیمار شاهد ($4/16 \pm 4/33$) و بیشترین درصد در تیمار حاوی ۳۰۰ میلیگرم در کیلوگرم عصاره ($44/56 \pm 2/00$) بود. میانگین تعداد گلبولهای سفید قرمز خون تفاوت معنی داری را بین تیمارهای مختلف نشان نداد. در شمارش تفریقی گلبولهای سفید خون، بالاترین درصد نوتروفیل در تیمار دوم، بالاترین درصد لنفوسیت در تیمار اول و کمترین درصد منوسیت در تیمار سوم مشاهده گردید. اندازه گیری مقادیر میانگین حجم گلبولی، میانگین هموگلوبین گلبولی و میانگین غلظت هموگلوبین گلبولی، هموگلوبین کل، آلبومین و پروتئین کل تفاوت معنی داری را بین تیمارها نشان نداد. بیشترین میزان لیزوزیم خون در تیمار دوم و کمترین میزان در تیمار سوم محاسبه شد ($P < 0/05$).

مقدمه

از عمده‌ترین مخاطراتی که پرورش دهندگان ماهی با آن مواجه هستند، کاهش میزان زنده‌مانی آبزی با بروز برخی بیماری‌ها و آلودگی‌ها خصوصاً در مراحل اولیه زندگی است. لذا تقویت و ارتقای سیستم ایمنی و دفاعی بدن ماهیان به ویژه در گونه‌های با ارزش و اقتصادی از اصلی‌ترین نیازهای پرورش دهندگان و مهمترین رویکرد های محققان در این راستا می‌باشد (Shalaby *et al.*, 2006). تجویزهای دارویی متعددی برای درمان آلودگی‌های مختلف ماهیان خصوصاً آلودگی‌های باکتریایی وجود دارد که از جمله مهمترین آنها می‌توان به استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها اشاره نمود. با این حال، مواجهه با موضوع مقاومت باکتری‌ها در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها و توسعه گونه‌های باکتری مقاوم درآینده، تجمع و باقی ماندن مواد آنتی‌بیوتیکی در بدن ماهیان پرورشی و همچنین اثرات آلاینده‌ی این داروها بر محیط زیست و عدم تاثیر آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های ویروسی از مهمترین مشکلات استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها قلمداد می‌شود (Aoki, 1992). در خصوص واکسیناسیون نیز اگرچه واکسینه کردن ماهیان یکی از موثرترین روش‌های کنترل بیماری‌های عفونی ماهی است، اما هنوز واکسن‌های تجاری با کارایی مناسب علیه برخی از بیماری‌های مهم ویروسی، باکتریایی و یا انگلی تولید نشده‌اند (Ardo *et al.*, 2008). امروزه یکی از روشهای موثر در پیشگیری و کنترل این گونه بیماری‌ها و آلودگی‌ها استفاده از انواع محرک‌های ایمنی می‌باشد. اغلب محرک‌های ایمنی مورد استفاده در آبزیان فاقد هر گونه اثرات منفی موجود در داروهای ضد باکتریایی و واکسن‌ها بر محیط زیست هستند و چون اکثراً جزو ترکیبات طبیعی محسوب می‌شوند، باقیمانده‌های دارویی نامطلوب ایجاد نمی‌کنند (Dugenci *et al.*, 2003).

محرک‌های ایمنی قادر به افزایش قدرت دفاعی و خنثی کردن فعالیت پاتوژن‌های فرصت طلب بوده و از این رو باعث بهبود رشد و کاهش مرگ و میر در سرتاسر دوره تولید در آبزیان می‌شوند و بنابراین به صورت گسترده در مزارع به منظور مدیریت سلامت مورد استفاده قرار می‌گیرند (Sakai, 1999; Wijendra and Pathiratne, 2007). اخیراً در آبزی پروری استفاده از ترکیبات گیاهی به عنوان محرک‌های ایمنی جهت تقویت سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهیان پرورشی رایج شده است (Rao *et al.*, 2006; Ardo *et al.*, 2008; Pratheepa *et al.*, 2010). برخی گیاهان منبعی غنی از تانن‌ها، پلی‌ساکاریدها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها و پلی‌پتیدها هستند که نقش‌های مختلفی از جمله داشتن اثرات ضد میکروبی و تقویت سیستم ایمنی ماهیان برای آنها مشخص شده است (Rao *et al.*, 2006; Ardo *et al.*, 2008). با مروری

بر مطالعات انجام شده در این زمینه به نظر می رسد استفاده از گیاهان دارویی به عنوان محرکهای ایمنی جایگزین مناسبی برای آنتی بیوتیک ها، واکسن ها و ترکیبات سنتزی باشند.

گربه ماهی آسیایی گونه ای از خانواده گربه ماهیان با نام علمی *Pangasianodon hypophthalmus*، از راسته Siluriformes و خانواده Pangasiidae (www.fishbase.org) می باشد (شکل ۱). این گونه در کشور ما به عنوان ماهی زینتی و در بسیاری از کشورها از جمله کشورهای جنوب شرقی آسیا به عنوان غذا مطرح بوده و دارای ارزش خوراکی با بازار پسندی بسیار بالا می باشد. گربه ماهی پنگوسی نقش مهمی را در آبرزی پروری آسیا و صید تجاری ایفا می کند و در کشورهای جنوب شرقی آسیا بخش زیادی از تولیدات آبرزی پروری را به خود اختصاص می دهد. گونه گربه ماهی پنگوسی گونه آب شیرین بوده و به طور معمول جزو ماهیان سایز بزرگ حاره ای (بیشینه طول ۱۳۰ سانتی متر، www.fishbase.org) است که به بالادست رودخانه برای یافتن مکان تخم ریزی مهاجرت سالیانه انجام می دهد و در دشتهای سیلابی نیز تغذیه می نماید (So et al., 2006). بر اساس بررسی هایی که از کارگاه های پرورش ماهیان زینتی در مراکز عمده تکثیر مصنوعی این گونه در جنوب شرقی آسیا به عمل آمده است، یکی از مشکلاتی که پرورش دهندگان این ماهی زینتی با آن مواجه هستند تلفات زیاد آن خصوصاً در مراحل لاروری و بچه ماهی می باشد که به نظر می رسد به دلیل ضعف در سیستم ایمنی این گونه در سیستم تکثیر و پرورش مصنوعی باشد (Subagja et al., 1999; Elsayed et al., 2006).



شکل ۱. گربه ماهی پنگوسی *Pangasianodon hypophthalmus*

گیاه دارویی و بسیار معطر مریم گلی *Salvia macrosiphon* از خانواده نعنائیان Lamiaceae دارای ۵۸ گونه در ایران است. این گیاه بومی ایران بوده و به طور گسترده ای در مناطق غربی و مرکزی ایران رویش دارد. نتایج تحقیقات اخیر تأیید می نمایند که فلاوونوئیدها و ترکیبات استروئیدی گیاه مریم گلی خاصیت ضد میکروبی دارند (ایزدی و همکاران، ۱۳۸۸؛ کرمانشاه و همکاران، ۱۳۸۸؛ بتولی و همکاران، ۱۳۹۱). کرمانشاه و همکاران در سال ۱۳۸۸، اثر ضد باکتریایی عصاره هیدرو الکلی گیاه مریم گلی (*Salvia officinalis*) را بر روی میکروارگانسیم های پوسیدگی زای استرپتوکوک موتان، لاکتوباسیل

رامنوز و اکتینومیسس ویسکوز مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که این عصاره بر هر سه نوع باکتری اثر بازدارندگی رشد دارد. ایزدی و همکاران در سال ۱۳۸۸، در یک مطالعه تجربی فعالیت بیوشیمیایی و ضد میکروبی روغن اسانس مریم گلی (*Salvia officinalis*) را بر میکروارگانسیم های اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا انترتیدیس و لیستریا مونوسیژنز مورد بررسی قرار دادند. در اسانس مریم گلی ۲۸ ترکیب شناسایی شد و میکروارگانسیم های لیستریا مونوسیژنز، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا انترتیدیس به ترتیب نسبت به اسانس ها حساسیت نشان دادند. در مورد مریم گلی تاکنون گزارشی مبنی بر استفاده از آن به عنوان محرک سیستم ایمنی در آبزیان ارائه نشده است. با توجه به خاصیت ضد میکروبی فلاوونوئیدها و ترکیبات استروئیدی این گیاه، استفاده از عصاره این گیاه در جیره غذایی برای تقویت سیستم ایمنی و افزایش رشد و بازماندگی در ماهی *Pangasianodon hypophthalmus* در تحقیق حاضر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

آماده سازی سالن تکثیر

تحقیق حاضر در یکی از سالنهای تکثیر و پرورش ماهیان زیتنی شهرستان شیراز و با خرید ۸۰۰ قطعه بچه ماهی پنگوسی از کشور تایلند آغاز شد. بچه ماهی های پنگوسی دوره سازش پذیری را به مدت ۱۴ روز در دمای $30/21 \pm 0/25$ درجه سانتیگراد و اکسیژن محلول برابر با $6/94 \pm 0/77$ ppm و pH برابر با $8/05 \pm 0/11$ گذراندند. طی دوره سازش پذیری بچه ماهیان روزی یک وعده با غذای تجاری cp که خاص گربه ماهیان است تغذیه شدند. پس از پایان دوره سازش پذیری، بچه ماهی های پنگوسی با میانگین وزنی $1/27 \pm 0/24$ گرم و میانگین طولی $5/5 \pm 0/45$ سانتی متر شمارش شده و با تراکم ۳۷ قطعه به ازای هر تانک، به آکواریومهای پرورش منتقل شدند. تیمارهای مورد استفاده در تحقیق حاضر شامل چهار جیره غذایی با سطوح مختلف از عصاره گیاه مورد آزمایش بودند که با سه تکرار برای هر تیمار در طی یک دوره ۴۵ روزه در ۱۲ عدد آکواریوم ۱۵۰ لیتری به شرح جدول ۱ مورد استفاده قرار گرفتند.

عصاره گیری، تهیه جیره و غذادهی به ماهیان

به منظور عصاره گیری از گیاه مریم گلی، ابتدا جمع آوری این گیاه از منطقه خیرآباد بندرعباس انجام شده و سپس این گیاهان در شرایط کنترل شده خشک شدند. در مرحله بعد قسمت های مورد نیاز شامل ساقه و برگ گیاهان توسط آسیاب

جدول ۱. تعداد تیمارها و سطوح مختلف عصاره گیاه مریم گلی در جیره گربه ماهی پنگوسی در تحقیق حاضر

شماره تیمار	تیمار
۱ (شاهد)	غذای کنسانتره cp به عنوان تیمار شاهد
۲ (S1)	غذای کنسانتره cp + ۱۵۰ میلی گرم عصاره گیاهی مریم گلی به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی
۳ (S2)	غذای کنسانتره cp + ۳۰۰ میلی گرم عصاره گیاهی مریم گلی به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی
۴ (S3)	غذای کنسانتره cp + ۶۰۰ میلی گرم عصاره گیاهی مریم گلی به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی

پودر شده و به مدت ۴۸ ساعت در متانول ۷۰٪ قرار گرفتند (Citarasu et al., 2006). سپس محلول حاصل از کاغذ صافی گذرانده شده و الکل آن توسط دستگاه روتاری در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد جدا سازی شد. عصاره حاصل توسط دستگاه فریزدرایر به صورت پودر، آماده شده و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید (Arabshahi-Delouee and Urooj, 2007). ابتدا یک کیلوگرم غذای کنسانتره cp، ویژه گربه ماهیان (ساخت کشور تایلند) توزین گردید. پس از محاسبه میزان عصاره گیاهی مورد نیاز برای هر تیمار، مقدار عصاره محاسبه شده در آب حل شده و با غذا مخلوط گردید. سپس مخلوط به هم زده شده تا به صورت همگن در آید و سپس در مجاورت جریان هوای ملایم که توسط فن ایجاد گردیده بود خشک شد. جیره تهیه شده تا زمان استفاده در فریزر در دمای ۳۰- نگهداری گردید. آنالیز تقریبی غذای ساخته شده در جدول ۲ آمده است. آنالیز جیره غذایی در آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز صورت گرفت.

جدول ۲. آنالیز تقریبی غذای ساخته شده برای بچه ماهی پنگوسی در تیمارهای تحقیق و گروه شاهد

پروتئین (%)	چربی (%)	خاکستر (%)	ماده خشک (%)
۳۰/۴۷	۴	۱۰/۶۶	۹۱/۴

مقدار غذای روزانه با توجه به درصد وزن بدن (توده زنده) محاسبه شده و در دو نوبت صبح و عصر، به میزان ۷٪ وزن بدن (در حد سیری) در اختیار بچه ماهیان قرار گرفت. دوره نوری جهت پرورش بچه ماهیان، به صورت ۶ ساعت تاریکی و ۱۸ ساعت روشنایی اجرا شد. عمل سیفون کردن به صورت یک روز در میان انجام شده و باقیمانده غذایی و مدفوع ماهی ها از مخازن خارج می گردید. همچنین تلفات بچه ماهیان در آکواریوم ها به صورت روزانه ثبت می شد. پارامترهای کیفی آب

شامل اکسیژن، دما، مواد جامد محلول و pH در طول دوره ۴۵ روزه آزمایش و به صورت هر ۳ روز یک بار سنجیده شد. میانگین پارامترهای کیفی آب در جدول ۳ ارائه شده است.

جدول ۳. میانگین پارامترهای کیفی آب در طول دوره ۴۵ روزه تحقیق

اکسیژن محلول (ppm)	دما (°C)	pH	مواد جامد محلول (mg/l)
۶/۹۴±۰/۷۷	۳۰/۲۱±۰/۲۵	۸/۰۵±۰/۱۱	۳۸۵/۷۴±۲۶/۰۳

زیست سنجی و بررسی پارامترهای رشد و درصد بازماندگی بچه ماهی ها

جهت بررسی اثر عصاره مصرفی در غذای بچه ماهیان پنگوسی بر رشد آن ها، اندازه گیری وزن با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم و اندازه گیری طول با کولیس با دقت ۰/۰۲ میلی متر انجام شد. پارامترهای رشد ماهیان شامل کارایی غذا (FER^۱)، شاخص رشد روزانه (DGI^۲) و ضریب رشد ویژه (SGR^۳) در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۴۵ دوره تحقیق و همچنین درصد بازماندگی (SP^۴) در پایان دوره از طریق فرمول زیر مورد محاسبه قرار گرفتند (Whittington et al., 2005).

$$^{-1} \text{ (وزن خشک غذای مصرفی) } \times \text{ وزن اولیه} - \text{ وزن ثانویه} = \text{ کارایی غذا}$$

$$^{-1} \text{ (تعداد روزها) } \times \text{ وزن اولیه} - \text{ وزن نهایی} = \text{ شاخص رشد روزانه}$$

$$100 \times \text{ (تعداد روزها) } \times [\text{Ln (وزن اولیه (میلی گرم))} - \text{Ln (وزن نهایی (میلی گرم))}] = \text{ ضریب رشد ویژه}$$

$$100 \times \text{ (تعداد لاروهای اولیه) } \times \text{ (تعداد لاروهای ثانویه) } = \text{ درصد بازماندگی}$$

بررسی پارامترهای خونی بچه ماهیان

جهت بررسی پارامترهای خونی بچه ماهیان، در پایان دوره پرورش از طریق قطع ساقه دمی از ماهیان خونگیری گردید. بدین منظور تعداد ۵ قطعه ماهی از هر تکرار به صورت تصادفی صید شده و پس از بیهوشی با استفاده از عصاره گل میخک با غلظت ۲۵۰ ppm نسبت به خونگیری از ماهیان اقدام شد. برای اندازه گیری شاخص های MCV (nm³)، MCH

(μg/cell) و MCHC (g/dL) از روابط ذیل استفاده شد:

$$\text{MCV} = \text{Hct} \times 10 / \text{RBC (million)},$$

$$\text{MCH} = \text{Hb} \times 10 / \text{RBC (million)},$$

$$\text{MCHC} = \text{Hb} \times 10 / \text{Hct}$$

1= Feed Efficiency Ratio

2= Daily Growth Index

3= Specific Growth Rate

4= Survival Percentage

میزان درصد هماتوکریت خون بچه ماهیان در آخر دوره اندازه گیری شد. برای این منظور پس از قطع ساقه دم، از ماهی ها خونگیری شده و تعیین میزان هماتوکریت خون توسط سانتریفیوژ در دور ۳۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. برای اندازه گیری هموگلوبین (g/dL) از روش سیان مت هموگلوبین استفاده شد که بدین منظور با استفاده از دستگاه نیمه اتوماتیک اسپکتروفتومتر، OD محلول اندازه گیری و با مقایسه با منحنی استاندارد، مقدار هموگلوبین در طول موج ۵۴۰ نانومتر تعیین گردید. به منظور شمارش تعداد گلبول های قرمز و سفید خون بچه ماهی پنگوسی، مقداری هپارین را جهت جلوگیری از انعقاد خون درون میکروتیوپ ریخته و به همان میزان خون ماهی به آن اضافه شد. سپس نمونه ها در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شده و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در محلول رنگ اتوزین قرار گرفته و توسط لام نتوبار شمارش گلبول ها انجام شد. شمارش افتراقی گلبول های سفید نیز از روی لام رنگ شده با گیمسا انجام گرفت. تولید اکسیژن در فرایند فاکوسیتوزی خون به وسیله تست NBT (Nitroblue Tetrazolium) اندازه گیری شد (Wijendra and Pathiratne, 2007). فعالیت لیزوزیم نیز با استفاده از روش استاندارد اندازه گیری گردید (Yan et al., 2001).

تجزیه و تحلیل داده ها

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه (One – Way ANOVA) انجام شد. ابتدا نرمال بودن داده ها با آزمون کولموگوروف اسمیرنوف و همگنی واریانس ها بوسیله آزمون Leven تست گردید. برای مقایسه میانگین ها از آزمون آماری دانکن (Duncan) در سطح ۵ درصد استفاده شد. از نرم افزار SPSS (Version 16) برای آنالیز آماری و از Excel برای رسم نمودارها استفاده گردید.

نتایج

فاکتورهای رشد ماهیان

نتایج سنجش فاکتورهای رشد ماهیان شامل ضریب رشد ویژه SGR، کارایی غذا FER و شاخص رشد روزانه DGI در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۴۵ دوره تحقیق در جدول ۴ ارائه شده است. بر اساس آنالیز آماری انجام شده اختلاف آماری معنی داری بین تیمارهای مختلف از نظر فاکتورهای رشد سنجیده شده در روز پانزدهم، سی ام و چهل و پنجم دوره تحقیق مشاهده نمی شود ($P > 0/05$).

جدول ۴. میانگین پارامترهای رشد بچه ماهی پنگوسی در تیمارهای مختلف در طول دوره تحقیق

فاکتورهای رشد					روز	تیمار
کارایی غذا	شاخص رشد روزانه	ضریب رشد ویژه	طول کل (cm)	وزن تر (g)		
0.02 ± 0.007^a	0.11 ± 0.03^a	4.66 ± 0.22^a	6.56 ± 0.21^a	2.07 ± 0.15^a	S1	روز پانزدهم
0.03 ± 0.00^a	0.12 ± 0.05^a	4.40 ± 0.24^a	6.39 ± 0.12^a	1.94 ± 0.07^a	S2	
0.02 ± 0.002^a	0.13 ± 0.01^a	4.49 ± 0.61^a	6.50 ± 0.17^a	1.97 ± 0.18^a	S3	
0.03 ± 0.004^a	0.14 ± 0.01^a	4.82 ± 0.56^a	6.42 ± 0.15^a	2.07 ± 0.18^a	شاهد	
0.04 ± 0.0004^a	0.19 ± 0.005^a	6.03 ± 0.15^a	9.18 ± 0.15^a	6.28 ± 0.53^a	S1	روز سی ام
0.04 ± 0.00^a	0.18 ± 0.02^a	5.66 ± 0.40^a	8.79 ± 0.36^a	5.50 ± 0.68^a	S2	
0.04 ± 0.002^a	0.20 ± 0.02^a	5.95 ± 0.38^a	9.17 ± 0.29^a	5.99 ± 0.70^a	S3	
0.04 ± 0.01^a	0.22 ± 0.02^a	6.27 ± 0.27^a	9.40 ± 0.15^a	6.57 ± 0.54^a	شاهد	
0.08 ± 0.01^a	0.21 ± 0.02^a	4.99 ± 0.22^a	10.52 ± 0.44^a	9.74 ± 1.07^a	S1	روز چهل و پنجم
0.09 ± 0.01^a	0.19 ± 0.03^a	4.73 ± 0.35^a	10.21 ± 0.37^a	8.47 ± 1.33^a	S2	
0.10 ± 0.02^a	0.23 ± 0.05^a	5.13 ± 0.47^a	10.88 ± 0.51^a	10.20 ± 2.08^a	S3	
0.09 ± 0.02^a	0.21 ± 0.03^a	4.97 ± 0.33^a	10.57 ± 0.47^a	9.41 ± 1.45^a	شاهد	

حروف مشابه در جدول نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار آماری می باشد ($P > 0.05$). S1: غذای کنسانتره + ۱۵۰ میلی گرم، S2: غذای کنسانتره + ۳۰۰ میلی گرم و S3: غذای کنسانتره CP + ۶۰۰ میلی گرم عصاره گیاهی مریم گلی به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی.

درصد بازماندگی

بر اساس نتایج به دست آمده، بچه ماهیانی که از عصاره گیاه مریم گلی در جیره غذایی آنها استفاده شده بود بازماندگی نزدیک ۱۰۰ درصد را نشان دادند هرچند تفاوت معنی داری در میزان درصد بازماندگی بچه ماهی ها در پایان دوره بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد ($P > 0.05$) (شکل ۱).

پارامترهای خون شناسی ماهیان

میزان هماتوکریت، میانگین تعداد گلبول قرمز و سفید، میزان کل پروتئین، میزان آلبومین، میزان لیپوزیم، تعداد نوتروفیل،



شکل ۱. میانگین درصد بازماندگی بچه ماهی پنگوسی در تیمارهای مختلف در پایان دوره تحقیق، حروف مشابه در جدول نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار آماری می باشد ($P > 0.05$).

لنفوسیت و منوسیت و فعالیت NBT در پایان دوره در جدول ۵ ارائه شده است. در جدول ۶ نیز نتایج سنجش میزان MCV، MCH، MCHC و هموگلوبین (Hb) در پایان دوره ۴۵ روزه نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، میزان لیزوزیم در تیمارهای مختلف متفاوت بود به طوریکه بیشترین مقدار لیزوزیم مربوط به تیمار دوم (۰/۰۶۰) و کمترین مقدار لیزوزیم مربوط به تیمار سوم (۰/۰۱۰) می باشد ($P < 0.05$). بیشترین میزان هماتوکریت در تیمار دوم، بیشترین تعداد گلبول قرمز و سفید در تیمار کنترل، بیشترین مقدار پروتئین کل و آلبومین در تیمار سوم و بیشترین فعالیت NBT در تیمار دوم بدست آمد. در شمارش افتراقی گلبول های سفید نیز بالاترین درصد نوتروفیل در تیمار دوم، بالاترین درصد لنفوسیت در تیمار اول و کمترین درصد منوسیت در تیمار سوم مشاهده گردید هرچند این تفاوتها معنی دار نبود ($P > 0.05$) (جدول ۵). بر اساس نتایج به دست آمده از جدول ۶ میزان MCV در تیمار دوم، MCH در تیمار اول و میزان MCHC در تیمار کنترل بیشتر بود اگرچه تفاوت معنی داری از این لحاظ بین سطوح مختلف عصاره در جیره مشاهده نمی شود ($P > 0.05$) (جدول ۶).

بحث

بر اساس نتایج به دست آمده، تفاوت معنی داری در بین تیمارهای دریافت کننده عصاره مریم گلی از نظر شاخصهای رشد در نوبت های مختلف سنجش مشاهده نشد. موافق نتایج این تحقیق مطالعه انجام شده توسط Ndong و Fall در سال ۲۰۱۱ می باشد که بیان نمودند مقادیر مختلف سیر در جیره غذایی تاثیری بر افزایش رشد بچه ماهیان هیبرید تیلپیا با میانگین وزن حدود ۲۵ گرم ندارد و حتی در سطح ۰/۵ گرم در کیلوگرم غذا باعث کاهش ۲۰ درصدی رشد بعد از گذشت ۲ تا ۴

جدول ۵. میانگین پارامترهای خونی بچه ماهی پنگوسی در تیمار مریم گلی در پایان دوره ۴۵ روزه

پارامتر	تیمار	Control	S1	S2	S3
هماتوکریت (درصد)	41.33 ± 4.16^a	43.33 ± 1.03^a	44.56 ± 2.00^a	42.67 ± 4.01^a	
تعداد گلبول قرمز (cell/ml)	3.10 ± 0.05^a	2.41 ± 0.07^a	2.67 ± 0.06^a	2.43 ± 0.07^a	
تعداد گلبول سفید (cell/ml)	7.40 ± 0.35^a	7.20 ± 0.30^a	7.30 ± 0.28^a	6.77 ± 0.40^a	
پروتئین کل (µg/ml)	2.91 ± 0.42^a	2.75 ± 0.22^a	2.88 ± 0.15^a	2.97 ± 0.17^a	
میزان آلبومین (µg/ml)	0.95 ± 0.04^a	0.87 ± 0.08^a	0.93 ± 0.06^a	0.97 ± 0.02^a	
میزان لیزوزیم (µg/ml)	0.42 ± 0.005^b	0.13 ± 0.001^c	0.60 ± 0.007^a	0.10 ± 0.001^d	
تعداد نوتروفیل (درصد)	25.67 ± 3.51^a	24.33 ± 4.04^a	26.67 ± 4.93^a	25.33 ± 7.37^a	
تعداد لنفوسیت (درصد)	74.33 ± 2.52^a	74.67 ± 4.93^a	72.67 ± 5.51^a	74.33 ± 7.57^a	
تعداد منوسیت (درصد)	1.00 ± 0.01^a	1.00 ± 0.01^a	1.00 ± 0.01^a	0.68 ± 0.33^a	
فعالیت NBT	0.96 ± 0.22^a	0.84 ± 0.17^a	0.98 ± 0.41^a	0.81 ± 0.22^a	

حروف مشابه در جدول نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار می باشد ($P > 0.05$). S1: غذای کنسانتره ۱۵۰۰ میلی گرم، S2: غذای کنسانتره ۳۰۰۰ میلی گرم و S3: غذای کنسانتره cp ۶۰۰۰ میلی گرم عصاره گیاهی مریم گلی به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی.

جدول ۶. مقادیر پارامترهای MCV، MCHC، MCH و هموگلوبین (Hb) در تیمار مریم گلی در پایان دوره ۴۵ روزه

پارامتر خونی	Control	S1	S2	S3
MCV (nm ³)	147.55 ± 12.66^a	150 ± 7.36^a	153 ± 4.59^a	147.9 ± 0.57^a
MCHC (g/dl)	30.75 ± 2.76^a	30 ± 2.7^a	28.95 ± 0.64^a	30.1 ± 0.28^a
MCH (µg/cell)	44.8 ± 0.42^a	45.27 ± 1.85^a	44.45 ± 2.48^a	44.45 ± 0.28^a
Hb (g/dl)	10.75 ± 0.07^a	10.93 ± 0.68^a	10.25 ± 0.77^a	10 ± 0.28^a

حروف مشابه در جدول نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار می باشد ($P > 0.05$). S1: غذای کنسانتره ۱۵۰۰ میلی گرم، S2: غذای کنسانتره ۳۰۰۰ میلی گرم و S3: غذای کنسانتره cp ۶۰۰۰ میلی گرم عصاره گیاهی مریم گلی به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی.

هفته می شود. نتایج تحقیق دیگری که در سال ۲۰۱۱ توسط Prasad و Priyanka بر روی عصاره میوه *Garcinia gummi*-

gutta با سطوح ۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم جیره در گربه ماهی پنگوسی *Pangasianodon*

hypophthalmus منتشر شد، کاهش وزن و کاهش نرخ رشد ویژه را نشان داد. دلیل این کاهش وزن و نرخ رشد ویژه به

ترکیبات موجود در عصاره این میوه از جمله هیدروکسی سیتریک اسید (hydroxy citric acid) نسبت داده شد. از جمله

اثرات این اسید کاهش سنتز اسیدهای چرب، کاهش لیپوژنز، کاهش دریافت غذا و بنابراین افزایش گلیکوژن و کاهش وزن می باشد.

در تحقیق دیگری که توسط Dada و Ikuerowo در سال ۲۰۰۹ انجام شد، تاثیر عصاره الکلی گیاه *Garcinia kola* بر رشد مولدین گربه ماهی آفریقایی *Clarias gariepinus* با دامنه وزنی ۲۵۰-۲۴۵/۲ گرم مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور عصاره این گیاه با غلظت های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ گرم عصاره در هر کیلو گرم جیره به ماهیان به مدت ۵۶ روز خوراندن شد و در پایان مشخص شد که تیماری که از جیره حاوی ۱ گرم عصاره در هر کیلو گرم جیره تغذیه شده بودند تفاوت معنی داری را نسبت به دیگر تیمارها نشان داده است. با توجه به عدم تاثیر معنی دار عصاره گیاه مریم گلی بر شاخص های رشد گربه ماهی پنگوسی در تحقیق حاضر دلایل این مساله می تواند بهینه نبودن دوز عصاره مورد استفاده در جیره و یا ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره باشد. بررسی دقیق ترکیبات موجود در عصاره این گیاه و تعیین دوز بهینه برای مطالعات آینده در این زمینه پیشنهاد می گردد.

در خصوص بازماندگی نیز علیرغم اختلاف های مشاهده شده بین تیمارهای مختلف از نظر میزان بازماندگی، تفاوت آماری معنی داری بین تیمارها مشاهده نگردید ($P > 0/05$). موافق نتایج این تحقیق، در مطالعه انجام شده توسط Prasad و Priyanka در سال ۲۰۱۱ بر روی تاثیر عصاره میوه *Garcinia gummi-gutta* بر بازماندگی گربه ماهی *Pangasianodon hypophthalmus* با وزن ۱۷/۵ تا ۳۰/۵ گرم نیز تفاوت آماری معنی داری بین تیمارهای اصلی و کنترل مشاهده نگردید. نتایج تحقیق موید آن بود که علیرغم اثرات مثبت عصاره این میوه در افزایش برخی پارامترهای ایمنی شناختی خون ماهیان، این عصاره فاقد اثرات سمی و مضر بر سلامت ماهیان می باشد که این اثرات مضر ممکن است باعث تلفات در بچه ماهیان به هنگام استفاده در جیره غذایی شود. در تناقض با نتایج تحقیق حاضر، Pratheepa و همکاران در سال ۲۰۱۰ تاثیر عصاره برگ گیاه *Aegle marmelos* را در دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵ و ۵۰ گرم بر کیلوگرم غذا در جیره ماهیان بر روی ماهی کپور مورد بررسی قرار دادند که در پایان دوره مشخص شد درصد بازماندگی در تیمارهایی که با غلظت های ۵ و ۱۰ گرم بر کیلوگرم غذا از عصاره تغذیه شده بودند، بیشتر از سایر تیمارها بوده است. در تحقیق حاضر به دلیل اینکه شرایط نگهداری ماهیان پنگوسی در آکواریوم کاملاً کنترل شده و در حالت بهینه قرار داشت تلفات زیادی در تیمار کنترل و سایر تیمارها مشاهده نگردید. انجام آزمایش های مشابه در شرایط کارگاهی نگهداری بچه ماهیان پنگوسی که برای پرورش دهندگان تلفات زیادی

را به همراه دارد و مقایسه رشد و بازماندگی در شرایط کارگاهی با شرایط استفاده از تیمارهای بهینه گیاهی برای مطالعات آینده در این خصوص پیشنهاد می شود.

در تحقیق حاضر که اثرات عصاره های گیاهی بر هماتوکریت خون گربه ماهی پنگوسی مورد بررسی قرار گرفت، تفاوت های معنی داری در میزان هماتوکریت خون در بین تیمارهای مختلف مشاهده نگردید ($P > 0.05$). فضل الله زاده و همکاران در سال ۲۰۱۱ تاثیر افزودن پودر سیردر جیره را بر روی پارامترهای خونی و فعالیت های پلازما در ماهی قزل آلاي رنگین کمان ۵۰ گرمی مورد بررسی قرار دادند. همانند نتایج تحقیق حاضر تفاوت معنی داری در میزان هماتوکریت بین گروه های مختلف مورد آزمایش و تیمار شاهد مشاهده نگردید. البته در تحقیق دیگری که در سال ۲۰۰۹، Dorucu و همکاران اثر دانه های زیره سیاه *Nigella sativa* را بر روی پاسخ ایمنی ماهی قزل آلاي رنگین کمان با میانگین وزن ۳۴ گرم بررسی نمودند میزان هماتوکریت و تعداد سلول های لکوسیت خون در ماهیانی که با جیره حاوی ۲/۵ درصد زیره سیاه تغذیه شده بودند به طور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود.

در خصوص سایر پارامترهای خون شناسی نتایج موافق و مخالف تحقیق حاضر به وفور یافت می شود. در مورد تاثیر عصاره های گیاهی بر تعداد گلبول های سفید خون می توان به مطالعات علیشاهی و همکاران (۱۳۹۰) و Harikrishnan و همکاران (۲۰۰۹) به عنوان نتایج مخالف و Watanuki و همکاران (۲۰۰۶) و Tatina و همکاران (۲۰۱۰) به عنوان نتایج موافق با تحقیق حاضر اشاره نمود.

در مورد اندیس های گلبولی (MCV، MCH و MCHC) نیز تحقیقات مشابه، نتایج موافق و متناقضی داشته اند به طوریکه Ekanem و Yusuf (۲۰۰۸) تغییر این فاکتورها و Harikrishnan و همکاران (۲۰۰۹) عدم تغییر این فاکتورها را گزارش نموده اند.

همچنین Nya و Austin (۲۰۰۹) افزایش درصد نوتروفیل و لنفوسیت در قزل آلاي رنگین کمان تغذیه شده با پودر گیاه زنجبیل و فضل الله زاده و همکاران (۲۰۱۱) افزایش درصد لنفوسیت و کاهش درصد نوتروفیل را در ماهی قزل آلاي رنگین کمان تغذیه شده با پودر سیر نشان دادند.

در سال ۲۰۱۰، Hajibeglou و Sudagar در بررسی تاثیر عصاره ۱۱ گیاه دارویی مختلف بر فاکتورهای خون شناسی ماهی کپور معمولی، افزایش میزان هموگلوبین و آلبومین و Pratheepa و همکاران (۲۰۱۰) در بررسی تاثیر عصاره برگ گیاه

Aegle marmelos بر فاکتورهای خونی ماهی کپور معمولی، افزایش میزان هموگلوبین و میزان NBT را در مقایسه با تیمار شاهد گزارش نمودند.

سنجش سطح پروتئین های سرم خون شاخص مناسبی برای بررسی وضعیت ایمنی شناسی ماهی می باشد. در تحقیق حاضر میزان پروتئین کل سرم خون تفاوت معنی داری را بین تیمارهای مختلف دریافت کننده عصاره مریم گلی نشان نداد ($P>0/05$). در تناقض با نتایج تحقیق حاضر می توان به گزارش علیشاهی و همکاران (۱۳۹۰) در مورد تاثیر تجویز خوراکی عصاره گیاه خار مریم (*Silybum marianum*) بر پاسخ های ایمنی ماهی کپور معمولی، Dugenci و همکاران (۲۰۰۳) در مورد تاثیرات ایمنی شناختی عصاره سه گیاه داروаш *Viscum album*، گزنه *Urtica dioica* و زنجبیل *Zingiber officinale* بر ماهیان قزل آلاي رنگین کمان، Dorucu و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی اثر دانه های زیره سیاه *Nigella sativa* بر پاسخ ایمنی ماهی قزل آلاي رنگین کمان و Pratheepa و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه تاثیر عصاره برگ گیاه (*Aegle marmelos*) بر روی ماهی کپور معمولی اشاره نمود. در تطابق با نتایج تحقیق حاضر در تحقیقات مشابه دیگری که توسط Misra و همکاران (۲۰۰۶) بر روی قزل آلاي رنگین کمان و Ispir و Mustafa (۲۰۰۵) بر روی کپور هندی (*labeo rohita*) انجام شد، علیرغم گزارش برخی شاخص های تحریک ایمنی در تعدادی از فرآورده های گیاهی، عدم تاثیر این عصاره ها بر میزان پروتئین کل و گلوبولین سرم در گونه های مورد بررسی گزارش گردید.

بر اساس نتایج به دست آمده، تیمارهایی که با جیره حاوی عصاره گیاه مریم گلی تغذیه شده بودند، تفاوت معنی داری را در میزان لیزوزیم نشان دادند. میزان فعالیت لیزوزیم سرم به عنوان یک شاخص با اهمیت ایمنی غیراختصاصی در ماهی می باشد (Sakai, 1999). در تحقیقی که علیشاهی و همکاران در سال ۱۳۹۰ با عنوان تاثیر تجویز خوراکی عصاره گیاه خار مریم (*Silybum marianum*) بر پاسخ های ایمنی ماهی کپور معمولی انجام دادند، ۲۰ روز بعد از تجویز خوراکی عصاره گیاه خار مریم، افزایش معنی داری در فعالیت لیزوزیم سرم نسبت به تیمار شاهد مشاهده گردید. همچنین افزایش فعالیت لیزوزیم سرم در ماهی کاراس (Chen et al., 2003)، ماهی Large yellow croaker (Jain and Wu, 2003) و ماهی کپور معمولی (Jain and Wu, 2004) بعد از تجویز خوراکی عصاره های گیاهی بومی گزارش شده است.

با توجه به این که نتایج موافق و مخالف با تحقیق حاضر به وفور مشاهده می شود می توان دلیل این پدیده را در ترکیبات موجود در عصاره های مختلف دانست. بنابراین انجام تحقیقات بیشتر و تخصصی تر بر روی عصاره مریم گلی به منظور تعیین ترکیبات موجود در این عصاره پیشنهاد می شود. همچنین با توجه به اینکه دوزهای مختلفی از عصاره های گیاهی در

این گونه تحقیقات استفاده می‌شود که می‌تواند بر نتایج مطالعات اثرگذار باشد، لذا تحقیق بر روی دوزهای قابل استفاده عصاره مریم گلی و مطالعه اثرات ترکیبات مختلف موجود در همین عصاره و همچنین سایر عصاره های گیاهی در جیره و رسیدن به دوز بهینه به منظور بررسی امکان تاثیرات معنی دار آنها بر پارامترهای ایمنی شناختی خون ماهیان قابل پیشنهاد می‌باشد.

منابع

ایزدی، ز.، احمدوند، گ.، اثنی عشری، م.، پیری، خ.، داوودی، پ. ۱۳۸۸. فعالیت بیوشیمیایی و ضد میکروبی روغن های اسانس مریم گلی و نعناع فلفلی. مجله ارمغان دانش. ۱۵ (۱): ۲۰-۲۹.

بتولی، ح.، صفائی قمی، ج.، حقیر ابراهیم‌آبادی، ع.، معصومی، ر. ۱۳۹۱. بررسی ترکیب شیمیایی اسانس اندام های رویشی و زایشی و خاصیت ضد میکروبی اسانس و عصاره دو گونه از جنس مریم گلی (*Salvia L*) منطقه کاشان. مجله علمی پژوهشی فیض دانشگاه علوم پزشکی کاشان. ۱۶ (۶): ۵۳۶-۵۴۵.

علیشاهی، م.، سلطانی، م.، مصباح، م.، اسمعیلی راد، ا. ۱۳۹۰. تاثیر تجویز خوراکی عصاره خار مریم (*Silybum marianum*) بر پاسخ های ایمنی ماهی کپور معمولی. مجله تحقیقات دامپزشکی. ۶۶ (۳): ۲۵۵-۲۶۳.

کرمانشاه، ح.، هاشمی کمانگر، ص.، آرامی، س.، میرصالحیان، ا.، کمالی نژاد، م.، کریمی، م. ۱۳۸۸. بررسی آزمایشگاهی اثر ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی مریم گلی و بومادران بر میکروارگانیسم‌های پوسیدگی زرا. مجله دندانپزشکی جامعه اسلامی دندانپزشکان. ۲۱ (۳): ۲۱۵-۲۲۰.

- Aoki, T. 1992. Chemotherapy and drug resistance in fish farms in Japan. In: Shariff, M. Subasighe, R.P. Arthur, J.R. (Editors) Diseases in Asian Aquaculture Vol. 1. Fish Health Section, Asian Fisheries Society. Manila. Philippines. pp. 519-529.
- Arabshahi-delouee, S., Urooj, A. 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica L.*) leaves. Food chain. 102: 1233-1240.
- Ardo, L., Yin, G., Xu, P., Varadi, L., Szigeti, G., Jeney, Z., Jeney, G. 2008. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophyla*. Aquaculture. 275: 26-33.
- Chen, X., Wu, Z., Yin, J. 2003. Effects of four species of herbs on immune function of *Carassius auratus gibelio*. Journal of Fisheries Science of China. 10: 36-40.
- Citarasu, T., Sivaram, V., Immanuel, G., Rout, N., Murugan, V. 2006. Influence of selected Indian immunostimulat herbs against white spot syndrome virus (wssv) infection in black tiger shrimp, *penaeus monodon* with reference to haematological, biochemical and immunological changes. Fish and shellfish immunology. 21: 372-384.
- Dada, A.A., Ikuerowo, M. 2009. Effects of ethanolic extracts of *Garcinia kola* seeds on growth and haematology of catfish (*Clarias gariepinus*) broodstock. African Journal of Agricultural Research. 4 (4): 344-347.
- Dorucu, M., Ozesen Colak, S., Ispir, U., Altinterim, B., Celayir, Y. 2009. The effect of Black Cumin Seeds, *Nigella sativa*, on the immune response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Mediterranean Aquaculture Journal. 2(2): 1-7.

- Dugenci, S.K., Arda, N., Candan, A. 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *Journal of Ethnopharmacology*. 88: 99-106.
- Ekanem, J. T., Yusuf, O. K. 2008. Some biochemical and haematological effects of black seed (*Nigella sativa*) oil on *Trypanosoma brucei*-infected rats. *African Journal of Biotechnology*. 4(3): 153-157.
- Elsayed, E.E., Ezz El Dien, N., Mahmoud, M.A. 2006. Ichthyophthiriasis: Various Fish Susceptibility or Presence of More than one Strain of the Parasite? *Nature and Science*. 4(3): 5-13.
- Fazlolahzadeh, F., Keramati, K., Nazifi, S., Shirian, S., Seifi, S. 2011. Effect of Garlic (*Allium sativum*) on Hematological Parameters and Plasma Activities of ALT and AST of *Rainbow trout* in Temperature Stress. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 5(9): 84-90.
- Hajibeglou, A., Sudagar M. 2010. Immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with herbal immunostimulants diets. *Agricultural Journal*. 5 (3): 163-172.
- Harikrishnan, R., Balasundaram. C., Heo. M.S. 2009. Herbal supplementation diets effects on hematology and innate immunity in goldfish. *Fish and Shellfish Immunology*. 28: 211-225.
- Ispir, U., Mustafa, D.M. 2005. A Study on the Effects of Levamisole on the Immune System of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 29: 1169-1176.
- Misra, C.K., Kumar Das, B., Mukherjee, S.C., Pattnaik, P. 2006. Effect of long term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture*. 255: 82-94.
- Ndong, D., Fall, J. 2011. The effect of garlic (*Allium sativum*) on growth and immune responses of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*). Department of Aquaculture, College of Life Sciences National Taiwan Ocean University Keelung. Taiwan. 202, ROC.
- Nya, E.J., Austin, B. 2009. Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe, as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*. 32: 971- 977.
- Prasad, G., Priyanka, G.L. 2011. Effect of fruit rind extract of garcinia gummi-gutta on haematology and plasma biochemistry of catfish pangasianodon hypophthalmus. *Asian Journal of Biochemistry*. 6(3): 240-251.
- Pratheepa, V., Ramesh, S., Sukumaran, N. 2010. Immunomodulatory effect of *Aegle marmelos* leaf extract on freshwater fish *Cyprinus carpio* infected by bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Pharmaceutical Biology*. 48(11): 1224–1239.
- Rao, Y.Y., Das, B.K., Iyotymayee, P., Chakrabarti, R. 2006. Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*. 20: 265-273.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*. 172: 63-92.
- 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 (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. 12: 172-201.
- Subagja, J., Slembrouck, J., Hung, L.T., Legendre, M. 1999. Larval rearing of an Asian catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Siluroidei, Pangasiidae): Analysis pf precocious mortality and proposition of appropriate treatments. *Aquatic Living Resources*. 12 (1): 37-44.
- Tatina, M., Bahmani, M., Soltani, M., Abtahi, B., Gharibkhani, M. 2010. Effects of different levels of dietary Vitamins C and E on some of hematological and biochemical parameters of sterlet (*Acipenser ruthenus*). *Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 5:1-11.
- Watanuki, H., Ota, K., Malina, A.C., Tassakka, A., Sakai, M. 2006. Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*. 258: 157-163.

- Whittington, R., Lim, C., Klesius, P. 2005. Effect of dietary h-glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*. 248: 217-225.
- Wijendra, G.D.N.P., Pathiratne, A. 2007. Evaluation of immune responses in an Indian carp, *Labeo rohita* (hamilton) fed with levamisole incorporated diet. *Journal of Science of the University of Kelaniya* 3: 17-28.
- Yan, Q.P., Su, Y.Q., Wang, J., Zhuo, H.M., Pi, L.B., Zhang, Z.X. 2001. The effect of immune additive on the immunity function of farmed *Pseudosciana crocea* (Richardson). *Journal of Jimei University (Natural Science)* 6(2): 134-137.