

# مطالعه اثر اسانس اوکالیپتوس (*Eucalyptus globules*) بر برخی فاکتورهای ایمنی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

نجمه شیخ زاده<sup>۱</sup> مهدی سلطانی<sup>۱\*</sup> حسینعلی ابراهیم زاده موسوی<sup>۱</sup> علیرضا خسروی<sup>۲</sup> هادی باقری<sup>۱</sup> عزت اله فتحی<sup>۳</sup> اشکان زرگر<sup>۴</sup>

۱) گروه بهداشت و بیماری آبیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۲) گروه میکرو بیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۳) بخش کلینیکال پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۴) دانش آموخته دکتری رشته بهداشت و بیماری آبیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۲ تیر ماه ۱۳۸۶، پذیرش نهایی: ۲۰ مرداد ماه ۱۳۸۷)

## چکیده

اثرات محرک ایمنی اسانس اوکالیپتوس به روش خوراکی و حمام بر روی برخی فاکتورهای ایمنی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با میانگین وزن ۳۵-۳۰ گرمی دردمای ۱۶-۱۸ (شرایط دمایی پایین تر از میزان اپتیمم) مورد بررسی قرار گرفت. ماهیان به روش های حمام و خوراکی و با غلظتهای ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ میکرو لیتر در لیتر یا به ازاء کیلوگرم غذا بمدت ۸ روز متوالی با اسانس مجاورت داده شدند و برخی فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی شامل سنجش میزان فعالیت لیزوزیم، قدرت باکتری کشی سرم، جمعیت لوکوسیتی، پروتئین کل سرم، میزان آلبومین و گلوبولین در زمان های ۱، ۲، ۸، ۱۵ و ۲۳ روز پس از آخرین تجویز اسانس مورد سنجش قرار گرفت. به منظور سنجش تیترا آنتی بادی، ماهی های باقیمانده ۲۳ روز پس از تجویز اسانس با باکتری آنرو موناس هیدروفیلا کشته شده به روش داخل صفاقی تزریق گردیدند و تیترا آنتی بادی در هفته سوم پس از ایمن سازی به روش میکرو آگلوتیناسیون باکتریایی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که اسانس اوکالیپتوس اثرات بسیار کمی بر روی سیستم ایمنی ماهی کپور معمولی داشته است هر چند افزایش معنی داری در فاکتورهای تیترا آنتی بادی، جمعیت لوکوسیتی و قدرت باکتری کشی سرم در برخی تیمارها بدست آمد. این مساله ممکن است ناشی از شرایط دمایی مورد نظر، عدم استفاده از دوز مناسب و دوره مناسب تجویز اسانس ها باشد.

واژه های کلیدی: اسانس اوکالیپتوس، کپور معمولی، فاکتورهای ایمنی.

خانواده میرتاسه (Myrtaceae) بوده و برگ آن به منظور تولید اسانس مورد استفاده قرار می گیرد (۱۶). اسانس این گیاه دارای خاصیت ضد عفونی کنندگی است به طوری که در قدیم شاخ و برگ گیاه را به منظور ضد عفونی هوا در اطاق بیماران قرار می دادند. برای این اسانس اثرات مسکن، خواب آور، ضد یرقان، زکام، تقویت قوا، و التیام دهنده زخم را قائل می باشند (۱۶).

در مورد استفاده و موارد کاربرد اسانس اوکالیپتوس در آبی پروری اطلاعات بسیار اندکی قابل دسترس است. در مطالعه انجام شده توسط Rohani و همکاران در سال ۱۳۸۴ اثرات اسانس اوکالیپتوس در کنترل آلودگی های قارچی در تخم های قزل آلا ی رنگین کمان تا رسیدن بمرحله چشم زدگی مورد بررسی قرار گرفت و در دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرو لیتر در لیتر اختلاف معنی داری با گروه شاهد گزارش گردید (۱۶).

با وجود اثرات مثبت این گیاه در کنترل برخی بیماری های میکروبی و قارچی و حتی اثرات تحریک سیستم ایمنی در جانوران خونگرم (۲۲، ۱۸، ۱۲، ۴) و تاثیرات مناسب در کنترل بیماری های قارچی ماهی، در این مطالعه اثر این گیاه بر برخی از خواص ایمونوفیزیولوژی گونه ماهی مد نظر قرار گرفت تا در صورت امکان بتوان از این گیاه در کنترل بیماری های مختلف و تقویت سیستم ایمنی ماهی استفاده نمود. از طرف دیگر ماهی کپور معمولی در شرایط کشور ایران طی دوره فصول سرد با استرس حرارتی (کاهش دما) مواجه می شود. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثرات اسانس اوکالیپتوس بر ایمنی غیر اختصاصی و همورال ماهی کپور معمولی به عنوان

## مقدمه

با تراکم شدن صنعت پرورش ماهی، بیماری های عفونی و غیر عفونی نیز در حال گسترش یافتن می باشند به طوری که هر ساله مقادیر زیادی آنتی بیوتیک و مواد شیمیایی به منظور کنترل این بیماری ها مورد استفاده قرار می گیرد که ایجاد باکتری های مقاوم به درمان، آلودگی های محیطی و باقیماندگی در ماهی را به همراه داشته است.

ماهی ها مانند دیگر مهره داران رده های پایین تر برای مبارزه با عوامل بیماریزا عمدتاً به سیستم ایمنی غیر اختصاصی متکی هستند. مواد محرک ایمنی نیز در زمان مواجه با انواع استرس زاقادر به تقویت سیستم ایمنی غیر اختصاصی و حتی سیستم ایمنی اختصاصی می باشند. مواد محرک ایمنی که تاکنون در آبیان مورد استفاده قرار گرفته اند شامل مواد سنتتیک مانند لوامیزول، مواد بیولوژیک مانند مشتقات باکتریایی، پلی ساکاریدها و فاکتورهای تغذیه ای همچون ترکیبات حیوانی و گیاهی می باشند (۱۴). در سالهای اخیر به دلیل توجه به حفظ محیط زیست و استفاده از مواد فاقد باقیماندگی در محیط زیست استفاده از مواد محرک ایمنی گیاهی در آبی پروری در حال افزایش می باشد (۲۱، ۱۳، ۹، ۸، ۶، ۱، ۵).

از طرف دیگر برخی از گیاهان در طب سنتی به منظور درمان و کنترل بسیاری از بیماری های هاد انسان و حیوانات مورد استفاده قرار گرفته اند. یکی از این گیاهان اوکالیپتوس (*Eucalyptus globulus labill*) می باشد که از



مجاورت با اسانس نمونه گیری بعمل آمد. برای اینکار ماهیان بدون بیوشی قطع ساقه دمی و خونگیری گردیدند. ۵۰۰ میکرولیتر خون در لوله‌های اپندورف حاوی EDTA ۱درصد اضافه و برای مطالعه جمعیت لوکوسیتی خون استفاده شد. مقدار ۱ میلی لیتر خون نیز در لوله‌های اپندورف بدون EDTA اضافه و پس از جداسازی سرم‌ها تا زمان آزمایش‌های میزان فعالیت لیزوزیم، پروتئین کل سرم، آلبومین، گلوبولین و قدرت باکتری کشی سرم در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند.

**بررسی فعالیت لیزوزیم:** برای تعیین میزان لیزوزیم از روش ارائه شده توسط Kumari (۲۰۰۶) استفاده شد. به این منظور پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای شکل الیزا، مقدار ۱۵ میکرولیتر سرم افزوده شد. سپس ۱۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری میکروکوکوس لیزودیکتیکوس (سیگما) تهیه شده در بافر سیترات سدیم ۰/۰۲ مولار و pH برابر ۵/۵ به میزان ۰/۲ میلی گرم در لیتر اضافه گردید و جذب نوری اولیه در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری شد و پس از ۱ ساعت نگهداری در دمای اتاق، مجدداً جذب نوری اندازه گیری گردید. لیزوزیم سفیده تخم مرغ لیوفیلیزه شده (سیگما) نیز به منظور ترسیم منحنی استاندارد استفاده گردید.

**بررسی قدرت باکتری کشی سرم:** این روش براساس روش ارائه شده توسط Barnes و همکاران در سال ۲۰۰۳ با تغییراتی انجام شد. بدین منظور باکتری آئروموناس هیدروفیلا به مدت ۲۴ ساعت در محیط ژلوز خون کشت داده شد و سپس سلول‌های باکتریایی با افزودن مقداری بافر فسفات سدیم استریل به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و سلول‌های حاصله جمع‌آوری گردید (جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر برابر ۱) سپس سوسپانسیون مذکور به میزان ۵۰ برابر در بافر فسفات سدیم استریل رقیق سازی و از رقت حاصله میزان ۲۵ میکرولیتر با ۲۵ میکرولیتر نمونه سرم ماهی مجاور شده با اسانس (نگهداری شده در ۴۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه برای غیرفعال شدن کمپلمان) مخلوط و یک ساعت در دمای اتاق نگهداری گردید. در مرحله بعد به این مجموعه میزان ۲۰۰ میکرولیتر سرم نرمال تازه اخذ شده از ماهی‌های نگهداری شده در تانک ذخیره (برای تامین کمپلمان بطور یکسان برای همه نمونه‌ها) اضافه گردید. سوسپانسیون حاصله ۱/۵ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری و پس از هموژن کردن میزان ۱۰ میکرولیتر در سه تکرار بر روی محیط ژلوز خون پخش و پلیت‌ها در ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری و سپس نسبت به شمارش پرگنه‌های باکتریایی رشد یافته اقدام گردید و پلیت‌های دارای تراکم باکتری ۳۰۰-۳۰ باکتری در شمارش مینا قرار گرفت.

**بررسی جمعیت لوکوسیتی:** برای تعیین جمعیت لوکوسیتی از محلول Prochazka - skroobak استفاده شد (۱۹). در این روش از هر تیمار مقدار ۴۰۰ میکرولیتر نمونه خون مورد بررسی قرار گرفت و شمارش با استفاده از لام نئوبار انجام شد.

**اندازه گیری غلظت پروتئین کل سرم:** از نمونه سرم باقیمانده به منظور تعیین میزان پروتئین کل به روش بیوره باکیت و استفاده از دستگاه اتوانالا یزر

یکی از گونه‌های مهم پرورشی ایران در شرایط درجه حرارت پائین تراز میزان اپتیمم می‌باشد تا مشخص شود که آیا این اسانس قادر به محافظت ماهی در شرایط استرس حرارتی می‌باشد یا خیر.

## مواد و روش کار

**ماهی:** تعداد ۵۴۰ عدد ماهی کپور معمولی با متوسط وزن ۲۵-۳۰ گرم از یک مزرعه پرورش ماهی واقع در استان گیلان تهیه و به حوضچه‌های پرورش ماهی واقع در دانشکده دامپزشکی تهران منتقل گردیدند و عمل سازگاری آنها به شرایط جدید ذکر شده در زیر در تانک‌های فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری با تراکم ۲۰ عدد در هر تانک برای یک دوره یک ماهه صورت گرفت و تغذیه با خوراک ماهی تهیه شده از شرکت چینه انجام شد.

**شرایط کیفی آب:** آب چاه با جریان دائم برای کلیه تیمارها در طول مدت انجام تحقیق تامین گردید. دمای متوسط آب ۱۷-۱۶ درجه سانتیگراد، سختی آب بر اساس کربنات کلسیم ۱۸۰ میلی گرم در لیتر، pH برابر ۷/۸ و اکسیژن محلول حداقل ۶ میلی گرم در لیتر بوده است. سایر فاکتورها مانند آمونیاک و نیتريت و دی اکسید کربن نیز در حد قابل قبول بوده است.

**اسانس:** اسانس خالص اوکالیپتوس با وزن مخصوص ۰/۹۱ از شرکت دارویی باریج اسانس (کاشان، ایران) تهیه گردید و به دوروش ذیل استفاده شد.

**روش خوراکی:** در این روش اسانس در غلظت‌های ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا به خوراک ماهی تهیه شده از شرکت چینه به صورت دستی مخلوط با روغن گیاهی مایع افزوده و در هر دوز ۳ تکرار ماهی و هر تکرار شامل ۲۰ ماهی لحاظ شد. پلت حاوی اسانس به مدت ۸ روز متوالی به مصرف ماهی‌ها رسید. میزان غذادهی روزانه نیز ادرصد وزن بدن منظور و در گروه کنترل نیز غذای بدون اسانس استفاده گردید.

**روش حمام:** در این روش از غلظت‌های ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ میکرولیتر در لیتر استفاده شد و برای هر غلظت تعداد سه تکرار و در هر تکرار ۲۰ ماهی لحاظ شد و هر تیمار بصورت حمام کوتاه مدت به مدت ۳۰ دقیقه مجاورت داده شدند. چهار ساعت پس از مجاورت با اسانس ماهی‌ها با خوراک فاقد اسانس تغذیه گردیدند. در هر دوره نیز ۳ تکرار ماهی با ۲۰ عدد ماهی در هر تکرار به عنوان گروه تیمار تنها با پلت تغذیه گردیدند.

**تهیه آنتی ژن و تجویز آن:** یک روز پس از آخرین خونگیری یعنی در روز بیست و سوم پس از تجویز اسانس از ماهیان باقی مانده جهت ایمن‌سازی علیه آئروموناس هیدروفیلا استفاده شد. برای اینکار از آنتی ژن غیر فعال شده با فرمالین و با غلظت  $10^6 \times 6$  سلول به ازاء هر میلی لیتر (مک فارلند شماره ۲) استفاده شد (۱۰). آنتی ژن باکتری به میزان ۰/۲ میلی لیتر در بافر فسفات سدیم استریل به روش داخل صفاقی به هر یک از ماهیان تجویز گردید و عمل خون‌گیری ۳ هفته پس از تجویز آنتی ژن انجام شد.

**نمونه‌گیری و انجام آزمایش‌ها:** بعد از ۸ روز مجاورت با اسانس، از هر تیمار تعداد ۳ ماهی به صورت تصادفی در روزهای ۱، ۲، ۸، ۱۵ و ۲۳ پس از اتمام



جدول ۱- میانگین قدرت باکتری کشی سرم در ماهی کپور معمولی پس از دریافت اسانس اوکالیپتوس به روش های خوراکی و حمام در زمان های مختلف و دوزهای مختلف (میانگین  $\pm$  خطای معیار).

| روزهای خون گیری    |                    |                   |                   |                    | غلظت اسانس اوکالیپتوس<br>(میکرولیتر در لیتر یا به ازاء<br>کیلوگرم غذا) |
|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--|
| ۲۲                 | ۱۵                 | ۸                 | ۲                 | ۱                  |  |
| ۶۷/۳۳ $\pm$ ۱۳/۲۲  | ۸۶/۶۷ $\pm$ ۸/۸۲   | ۸۶/۰۰ $\pm$ ۷/۲۱  | ۷۹/۶۷ $\pm$ ۱۱/۵۵ | ۱۰۶/۳۳ $\pm$ ۱۸/۴۶ | حمام ۳۰  |
| ۵۴/۵۰ $\pm$ ۳۳/۵۰  | ۱۱۲/۰۰ $\pm$ ۲۲/۷۵ | ۹۴/۶۷ $\pm$ ۶/۸۹  | ۵۱/۰۰ $\pm$ ۶/۶۶  | ۷۰/۰۰ $\pm$ ۹/۸۲   | حمام ۶۰  |
| ۱۰۴/۳۳ $\pm$ ۱۱/۱۰ | ۸۸/۶۷ $\pm$ ۵/۵۴   | ۵۳/۰۰ $\pm$ ۸/۸۹  | ۴۱/۳۳ $\pm$ ۶/۷۴  | ۸۴/۳۳ $\pm$ ۸/۰۹   | حمام ۱۲۰   |
| ۶۶/۰۰ $\pm$ ۱۲/۲۲  | ۷۹/۰۰ $\pm$ ۱۴/۵۰  | ۷۹/۶۷ $\pm$ ۱۰/۲۷ | ۵۷/۶۷ $\pm$ ۹/۳۹  | ۹۹/۳۳ $\pm$ ۱۵/۱۷  | خوراکی ۳۰  |
| ۲۲/۰۰ $\pm$ ۴/۹۳   | ۶۱/۶۷ $\pm$ ۱۳/۶۴  | ۴۵/۳۳ $\pm$ ۶/۱۷  | ۳۳/۳۳ $\pm$ ۸.۸۱  | ۴۷/۶۷ $\pm$ ۶/۴۹   | خوراکی ۶۰  |
| ۹۱/۶۷ $\pm$ ۱۴/۲۴  | ۹۹/۰۰ $\pm$ ۱۱/۸۴  | ۵۰/۶۷ $\pm$ ۱۷/۵۸ | ۵۰/۰۰ $\pm$ ۱۰/۴۰ | ۶۵/۳۳ $\pm$ ۷/۶۹   | خوراکی ۱۲۰   |
| ۱۰۴/۲۰ $\pm$ ۸/۲۵  | ۱۰۲/۶۰ $\pm$ ۲/۱۸  | ۷۵/۵۰ $\pm$ ۹/۰۵  | ۶۳/۶۰ $\pm$ ۷/۹۳  | ۱۰۰/۸۳ $\pm$ ۶/۳۹  | کنترل  |

(اپندورف) استفاده گردید.

خوراکی ۶۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا افزایش معنی داری در مقایسه با نمونه های کنترل نشان داد ( $p < 0.05$ ).

۳) در روز هشتم خونگیری، میانگین قدرت باکتری کشی سرم در تیمار خوراکی ۶۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا افزایش معنی داری را در مقایسه با نمونه های کنترل نشان داد ( $p < 0.05$ ).

۴) در روز پانزدهم خونگیری، میانگین قدرت باکتری کشی سرم در تیمار خوراکی ۶۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا در مقایسه با نمونه کنترل بطور معنی داری افزایش داشته است ( $p < 0.05$ ).

۵) در روز بیست و دوم خونگیری، میانگین قدرت باکتری کشی سرم در تیمارهای حمام ۳۰ و ۶۰ میکرولیتر در لیتر و خوراکی ۳۰ و ۶۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا در مقایسه با نمونه کنترل بطور معنی داری افزایش داشته است ( $p < 0.05$ ).

**بررسی جمعیت لوکوسیتی:** نتایج مربوط به شمارش لوکوسیتی در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. به طوری که نکات ذیل از این نتایج قابل استناد می باشد:

۱) در روز اول خونگیری، حداکثر میانگین جمعیت لوکوسیتی در تیمارهای حمام ۳۰ میکرولیتر در لیتر برابر  $۴۵۰۰ \pm ۷۶۳/۷۶$  و ۶۰ میکرولیتر در لیتر برابر  $۵۳۳۳ \pm ۸۲۰/۷۴$  بدست آمد و تفاوت معنی داری را در مقایسه با نمونه های کنترل ( $۲۱۶۶/۶۷ \pm ۴۳۶/۲۱$ ) نشان داد ( $p < 0.05$ ).

۲) در روز دوم خونگیری، حداکثر جمعیت لوکوسیتی در تیمار خوراکی ۶۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا بدست آمد که افزایش معنی داری را در مقایسه با نمونه های کنترل نشان داد ( $p < 0.05$ ).

۳) در روز هشتم خونگیری، میانگین جمعیت لوکوسیتی در تیمار حمام ۶۰ میکرولیتر در لیتر افزایش معنی داری را در مقایسه با نمونه های کنترل نشان داد ( $p < 0.05$ ).

۴) در روز پانزدهم خونگیری، میانگین جمعیت لوکوسیتی در تیمارهای حمام ۶۰ میکرولیتر در لیتر برابر  $۴۵۸۳/۳۳ \pm ۱۳۸۶/۹۴$  و خوراکی ۶۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا برابر  $۲۶۶۶/۶۷ \pm ۴۶۳/۹۸$  در مقایسه با نمونه کنترل ( $۱۵۱۶/۶۷ \pm ۱۴۹/۸۱$ ) به طور معنی داری افزایش داشته است ( $p < 0.05$ ).

۵) در روز بیست و دوم خونگیری، حداکثر جمعیت لوکوسیتی در تیمار

اندازه گیری غلظت آلبومین و گلوبولین سرم: بدین منظور از روش بروموزول گرین با کیت و استفاده از دستگاه اتوآنالایزر (اپندورف) انجام گردید و برای محاسبه میزان گلوبولین از رابطه زیر استفاده شد:

$$\text{گلوبولین سرم} = \text{پروتئین کل سرم} - \text{آلبومین سرم}$$

اندازه گیری تیتراکتی بادی: از روش توصیه شده توسط Robertson در سال ۱۹۹۰ با مختصر تغییرات استفاده گردید. به طوری که میزان ۲۵ میکرولیتر از بافر فسفات سدیم به گوده های پلیت الایزا (بجز گوده اول) افزوده شد و سپس مقدار ۲۵ میکرولیتر از نمونه سرم به اولین و دومین گوده اضافه گردید و تهیه رقت های بر مبنای دو در گوده های ۲ الی ۱۲ و حذف ۲۵ میکرولیتر از گوده آخر و در نهایت افزودن ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی آئروموناس هیدروفیلا تهیه شده در بافر فسفات سدیم با رقت مک فارلین شماره ۳ برابر  $۱۰^8 \times ۹$  سلول به ازاء میلی لیتر انجام شد و پس از یک شب در دمای اتاق قرائت نتایج انجام شد بطوری که آخرین گوده ای که در آن آگلوتیناسیون باکتریایی صورت گرفته به عنوان تیتراکتی بادی نمونه سرم در نظر گرفته شد.

**آنالیز آماری:** داده ها با روشهای آنالیز واریانس یکطرفه، مورد بررسی آماری قرار گرفت و میزان معنی داری نیز  $0.05$  به عنوان مبنای قرار گرفت.

## نتایج

**میزان فعالیت لیزوزیم سرم:** نتایج مربوط به میزان فعالیت لیزوزیم سرم اندازه گیری شده در تیمارهای مختلف حمام و خوراکی نشان داد که تفاوت معنی داری با نمونه های کنترل در روزهای مختلف وجود نداشت ( $p > 0.05$ ).

**بررسی قدرت باکتری کشی سرم:** نتایج مربوط به قدرت باکتری کشی سرم ماهی ها در تیمارهای مختلف در جدول ۱ آمده است. به طوری که نکات ذیل از این نتایج قابل استناد می باشد:

۱) در روز اول خونگیری تیمارهای حمام ۶۰ میکرولیتر در لیتر و خوراکی ۶۰ و ۱۲۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا در مقایسه با نمونه کنترل بطور معنی داری افزایش داشته است ( $p < 0.05$ ).

۲) در روز دوم خونگیری، میانگین قدرت باکتری کشی سرم در تیمار



جدول ۲- میانگین جمعیت لوکوسیتی (در میکرولیتر) در ماهی کپور معمولی پس از دریافت اسانس اوکالیپتوس به روش های خوراکی و حمام در زمان های مختلف و دوزهای مختلف (میانگین  $\pm$  خطای معیار).

| روزهای خون گیری      |                       |                       |                       |                       | غلظت اسانس اوکالیپتوس (میکرولیتر در لیتر یا به ازاء کیلوگرم غذا) |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| ۲۲                   | ۱۵                    | ۸                     | ۲                     | ۱                     |  |
| ۱۸۱۶/۶۷ $\pm$ ۴۴۷/۵۲ | ۱۹۶۶/۶۷ $\pm$ ۲۷۴/۲۷  | ۳۲۰۰/۰۰ $\pm$ ۴۲۵/۸۹  | ۳۴۵۰/۰۰ $\pm$ ۱۲۸۸/۷۳ | ۴۵۰۰/۰۰ $\pm$ ۷۶۳/۷۶  | حمام ۳۰  |
| ۱۸۳۳/۳۳ $\pm$ ۳۶۳/۲۴ | ۴۵۸۳/۳۳ $\pm$ ۱۳۸۶/۹۴ | ۳۸۳۳/۳۳ $\pm$ ۸۸۱/۹۲  | ۳۵۸۳/۳۳ $\pm$ ۸۲۰/۷۴  | ۵۳۳۳/۳۳ $\pm$ ۸۲۰/۷۴  | حمام ۶۰  |
| ۱۷۵۰/۰۰ $\pm$ ۲۵۰/۰۰ | ۱۹۸۳/۳۳ $\pm$ ۱۳۰/۱۷  | ۲۰۰۰/۰۰ $\pm$ ۲۸۸/۶۸  | ۳۷۵۰/۰۰ $\pm$ ۱۱۸۱/۴۵ | ۳۳۳۳/۳۳ $\pm$ ۱۳۷۱/۸۴ | حمام ۱۲۰   |
| ۱۷۵۰/۰۰ $\pm$ ۲۶۴/۵۸ | ۲۲۸۳/۳۳ $\pm$ ۲۸۴/۴۲  | ۲۳۰۰/۰۰ $\pm$ ۱۱۵۰/۳۶ | ۲۶۷۵/۰۰ $\pm$ ۸۳۵/۰۰  | ۳۲۳۳/۳۳ $\pm$ ۱۶۴/۱۵  | خوراکی ۳۰  |
| ۱۶۶۶/۶۷ $\pm$ ۸۳/۳۳  | ۲۶۶۶/۶۷ $\pm$ ۴۶۳/۹۸  | ۲۵۸۳/۳۳ $\pm$ ۵۰۶/۹۰  | ۴۵۸۳/۳۳ $\pm$ ۹۶۱/۰۵  | ۲۹۱۶/۶۷ $\pm$ ۱۰۴۴/۱۶ | خوراکی ۶۰  |
| ۱۴۱۶/۶۷ $\pm$ ۱۶۶/۶۷ | ۱۳۰۰/۰۰ $\pm$ ۵۰/۰۰   | ۳۸۷۵/۰۰ $\pm$ ۲۱۲۵/۰۰ | ۲۲۵۰/۰۰ $\pm$ ۳۸۱/۸۸  | ۳۵۶۶/۶۷ $\pm$ ۱۰۲۶/۸۶ | خوراکی ۱۲۰   |
| ۱۲۹۱/۶۷ $\pm$ ۱۵۶/۲۱ | ۱۵۱۶/۶۷ $\pm$ ۱۴۹/۸۱  | ۱۷۰۰/۰۰ $\pm$ ۳۳۰/۶۶  | ۱۹۹۱/۶۷ $\pm$ ۶۳۲/۵۱  | ۲۱۶۶/۶۷ $\pm$ ۴۳۶/۲۱  | کنترل  |

جدول ۳- میانگین پروتئین کل سرم (گرم در دسی لیتر) در ماهی کپور معمولی پس از دریافت اسانس اوکالیپتوس به روش های خوراکی و حمام در زمان های مختلف و دوزهای مختلف (میانگین  $\pm$  خطای معیار).

| روزهای خون گیری |                 |                 |                 |                 | غلظت اسانس اوکالیپتوس (میکرولیتر در لیتر یا به ازاء کیلوگرم غذا) |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--|
| ۲۲              | ۱۵              | ۸               | ۲               | ۱               |  |
| ۳/۱۳ $\pm$ ۰/۲۷ | ۳/۴۰ $\pm$ ۰/۳۱ | ۳/۲۷ $\pm$ ۰/۲۶ | ۳/۴۳ $\pm$ ۰/۳۵ | ۳/۹۷ $\pm$ ۰/۵۰ | حمام ۳۰  |
| ۳/۴۷ $\pm$ ۰/۰۷ | ۳/۱۷ $\pm$ ۰/۱۲ | ۳/۹۷ $\pm$ ۰/۱۲ | ۳/۵۳ $\pm$ ۰/۰۷ | ۳/۶۰ $\pm$ ۰/۲۶ | حمام ۶۰  |
| ۳/۵۰ $\pm$ ۰/۲۱ | ۳/۲۳ $\pm$ ۰/۱۲ | ۳/۰۰ $\pm$ ۰/۱۰ | ۳/۲۳ $\pm$ ۰/۲۳ | ۳/۱۰ $\pm$ ۰/۱۵ | حمام ۱۲۰   |
| ۳/۴۰ $\pm$ ۰/۰۶ | ۳/۵۰ $\pm$ ۰/۲۰ | ۳/۲۳ $\pm$ ۰/۱۴ | ۲/۹۰ $\pm$ ۰/۲۱ | ۴/۰۷ $\pm$ ۰/۸۲ | خوراکی ۳۰  |
| ۳/۴۷ $\pm$ ۰/۰۹ | ۳/۴۰ $\pm$ ۰/۱۲ | ۳/۸۳ $\pm$ ۰/۱۵ | ۳/۶۰ $\pm$ ۰/۰۶ | ۳/۴۰ $\pm$ ۰/۰۶ | خوراکی ۶۰  |
| ۳/۶۰ $\pm$ ۰/۲۳ | ۳/۷۷ $\pm$ ۰/۰۹ | ۳/۳۳ $\pm$ ۰/۱۸ | ۳/۶۰ $\pm$ ۰/۱۷ | ۳/۴۳ $\pm$ ۰/۱۴ | خوراکی ۱۲۰   |
| ۳/۳۷ $\pm$ ۰/۰۹ | ۳/۳۸ $\pm$ ۰/۰۹ | ۳/۷۰ $\pm$ ۰/۱۵ | ۳/۶۳ $\pm$ ۰/۱۴ | ۳/۴۸ $\pm$ ۰/۲۲ | کنترل  |

۵) در روز ۲۲ خونگیری، حداکثر میانگین پروتئین کل سرم در تیمار خوراکی ۱۲۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا مشاهده شد که تفاوت معنی داری با نمونه های کنترل نداشته است ( $p > 0.05$ ).

میزان آلبومین کل اندازه گیری شده در نمونه های سرم: نتایج مربوط به میزان پروتئین آلبومین سرم در جدول ۴ نشان داده شده است. به طوری که نکات ذیل از این نتایج قابل استناد می باشد:

۱) در روز اول خونگیری، حداکثر میانگین آلبومین سرم در تیمار خوراکی ۳۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا بدست آمد اما در مقایسه با نمونه های کنترل تفاوت معنی داری نشان نداد ( $p > 0.05$ ).

۲) در روز دوم خونگیری، حداکثر میانگین آلبومین سرم در تیمار حمام ۶۰ میکرولیتر در لیتر بدست آمد اما تفاوت معنی داری با نمونه های کنترل نداشته است ( $p < 0.05$ ). به علاوه میانگین آلبومین سرم در تیمار خوراکی ۳۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا در مقایسه با نمونه کنترل به طور معنی داری کاهش داشته است ( $p < 0.05$ ).

۳) در روز هشتم خونگیری، میانگین آلبومین سرم در تیمار خوراکی ۳۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا کاهش معنی داری را در مقایسه با نمونه های کنترل نشان داد ( $p < 0.05$ ).

۴) در روز پانزدهم خونگیری، حداکثر میانگین آلبومین سرم در تیمار خوراکی ۱۲۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا مشاهده شد که تفاوت معنی داری

حمام ۶۰ میکرولیتر در لیتر مشاهده شد اما در مقایسه با نمونه های کنترل تفاوت معنی داری نشان نداد ( $p < 0.05$ ).

میزان پروتئین کل اندازه گیری شده در نمونه های سرم: نتایج مربوط به میزان پروتئین کل سرم در جدول ۳ نشان داده شده است. به طوری که نکات ذیل از این نتایج قابل استناد می باشد:

۱) در روز اول خونگیری، حداکثر میانگین پروتئین کل سرم در تیمار خوراکی ۳۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا بدست آمد اما تفاوت معنی داری با نمونه های کنترل نداشته است ( $p < 0.05$ ).

۲) در روز دوم خونگیری، میانگین پروتئین کل سرم در تیمار خوراکی ۳۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا در مقایسه با نمونه کنترل به طور معنی داری کاهش داشته است ( $p < 0.05$ ).

۳) در روز هشتم خونگیری، حداکثر میانگین پروتئین کل سرم در تیمار خوراکی ۳۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا مشاهده شد که در مقایسه با نمونه های کنترل تفاوت معنی داری نشان نداد ( $p > 0.05$ ). در حالی که میانگین پروتئین کل سرم در تیمار حمام ۱۲۰ میکرولیتر در لیتر کاهش معنی داری در مقایسه با نمونه های کنترل نشان داد ( $p < 0.05$ ).

۴) در روز پانزدهم خونگیری، حداکثر میانگین پروتئین کل سرم در تیمار خوراکی ۱۲۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا بدست آمد اما تفاوت معنی داری با نمونه های کنترل نداشته است ( $p > 0.05$ ).



جدول ۴- میانگین آلومین کل سرم (گرم در دسی لیتر) در ماهی کپور معمولی پس از دریافت اسانس اوکالیپتوس به روش‌های خوراکی و حمام در زمان‌های مختلف و دوزهای مختلف (میانگین  $\pm$  خطای معیار).

| روزهای خون‌گیری |           |           |            |           | غلظت اسانس اوکالیپتوس (میکرولیتر در لیتر یا به ازاء کیلوگرم غذا) |
|-----------------|-----------|-----------|------------|-----------|--|
| ۲۲              | ۱۵        | ۸         | ۲          | ۱         |  |
| ۰/۸۰±۰/۱۵       | ۰/۹۳±۰/۲۸ | ۰/۸۰±۰/۱۲ | ۰/۹۷±۰/۱۵  | ۱/۰۳±۰/۱۸ | حمام ۳۰  |
| ۰/۹۵±۰/۰۰       | ۰/۸۸±۰/۰۳ | ۱/۰۸±۰/۰۳ | ۱/۰۲±۰/۰۳  | ۱/۰۲±۰/۰۷ | حمام ۶۰  |
| ۰/۹۰±۰/۰۶       | ۰/۸۰±۰/۰۶ | ۰/۸۷±۰/۰۳ | ۰/۹۰±۰/۰۶  | ۰/۸۷±۰/۰۷ | حمام ۱۲۰   |
| ۰/۹۳±۰/۰۳       | ۰/۷۷±۰/۰۷ | ۰/۷۰±۰/۰۶ | ۰/۶۷±۰/۰۸۹ | ۱/۴۰±۰/۵۶ | خوراکی ۳۰  |
| ۱/۰۲±۰/۰۳       | ۰/۹۵±۰/۰۶ | ۱/۰۲±۰/۰۳ | ۰/۹۹±۰/۰۳  | ۰/۹۵±۰/۰۶ | خوراکی ۶۰  |
| ۰/۹۳±۰/۰۷       | ۱/۰۰±۰/۰۰ | ۰/۸۷±۰/۰۹ | ۱/۰۰±۰/۰۶  | ۰/۸۳±۰/۰۳ | خوراکی ۱۲۰   |
| ۰/۸۸±۰/۰۵       | ۰/۸۷±۰/۰۷ | ۱/۱۸±۰/۲۱ | ۰/۹۲±۰/۰۵  | ۱/۰۷±۰/۱۴ | کنترل  |

جدول ۵- میانگین گلوبولین کل سرم (گرم در دسی لیتر) در ماهی کپور معمولی پس از دریافت اسانس اوکالیپتوس به روش‌های خوراکی و حمام در زمان‌های مختلف و دوزهای مختلف (میانگین  $\pm$  خطای معیار).

| روزهای خون‌گیری |           |           |           |           | غلظت اسانس اوکالیپتوس (میکرولیتر در لیتر یا به ازاء کیلوگرم غذا) |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|--|
| ۲۲              | ۱۵        | ۸         | ۲         | ۱         |  |
| ۲/۳۳±۱/۱۵       | ۲/۴۷±۰/۰۳ | ۲/۴۷±۲/۱۹ | ۲/۴۷±۲/۲۲ | ۲/۹۳±۲/۳۳ | حمام ۳۰  |
| ۲/۵۲±۰/۰۷       | ۲/۲۸±۰/۰۹ | ۲/۸۹±۱/۱۵ | ۲/۵۲±۰/۰۳ | ۲/۵۸±۲/۰  | حمام ۶۰  |
| ۲/۶۰±۱/۱۵       | ۲/۶۳±۱/۱۳ | ۲/۳۰±۱/۱۵ | ۲/۳۳±۱/۱۸ | ۲/۲۳±۰/۰۹ | حمام ۱۲۰   |
| ۲/۵۳±۰/۰۷       | ۲/۷۳±۱/۱۸ | ۲/۵۳±۱/۱۹ | ۲/۲۳±۱/۱۲ | ۲/۶۷±۲/۲۷ | خوراکی ۳۰  |
| ۲/۴۵±۱/۰        | ۲/۴۵±۱/۰  | ۲/۴۸±۳/۳۵ | ۲/۶۲±۰/۰۳ | ۲/۴۵±۰/۰  | خوراکی ۶۰  |
| ۲/۶۷±۱/۱۸       | ۲/۷۷±۰/۰۹ | ۲/۴۷±۰/۰۹ | ۲/۶۰±۱/۱۲ | ۲/۶۰±۱/۱۲ | خوراکی ۱۲۰   |
| ۲/۴۶±۰/۰۶       | ۲/۶۲±۰/۰۷ | ۲/۶۲±۱/۰  | ۲/۶۱±۱/۱۱ | ۲/۴۴±۱/۱۱ | کنترل  |

جدول ۶- تیتر آنتی بادی اندازه‌گیری شده به روش میکروآگلوتیناسیون باکتریایی در ماهی کپور معمولی پس از دریافت اسانس اوکالیپتوس به روش‌های خوراکی و حمام در زمان‌های مختلف و دوزهای مختلف (میانگین  $\pm$  خطای معیار).

میکرولیتر در لیتر بدست آمد که افزایش معنی‌داری را در مقایسه با نمونه‌های کنترل نشان داد ( $p < 0.05$ ).

۲) در روز دوم خونگیری، حداکثر میانگین گلوبولین سرم در تیمار خوراکی ۶۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا مشاهده شد که در مقایسه با نمونه‌های کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداد ( $p > 0.05$ ) در حالی‌که میانگین گلوبولین سرم در تیمار خوراکی ۳۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا کاهش معنی‌داری در مقایسه با نمونه‌های کنترل نشان داد ( $p < 0.05$ ).

| میانگین ( $\pm$ خطای معیار) تیتر آنتی بادی | غلظت اسانس اوکالیپتوس (میکرولیتر در لیتر یا به ازاء کیلوگرم غذا) |
|--|--|
| ۱۵/۱۱±۲/۳۵                                 | حمام ۳۰  |
| ۱۳/۶۷±۱/۲۰                                 | حمام ۶۰  |
| ۲۳/۱۱±۳/۵۸                                 | حمام ۱۲۰   |
| ۱۴/۲۲±۱/۱۷۶                                | خوراکی ۳۰  |
| ۲۰/۰۷±۵/۵۲                                 | خوراکی ۶۰  |
| ۷/۶۷±۱/۶۷                                  | خوراکی ۱۲۰   |
| ۸/۶۷±۱/۲۶                                  | کنترل  |

۳) در روز هشتم خونگیری، حداکثر میانگین گلوبولین سرم در تیمار حمام ۶۰ میکرولیتر در لیتر بدست آمد که در مقایسه با نمونه‌های کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداد ( $p < 0.05$ ).

۴) در روز پانزدهم خونگیری، حداکثر میانگین گلوبولین سرم در تیمار خوراکی ۱۲۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا بدست آمد اما تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های کنترل نداشته است ( $p > 0.05$ ) به علاوه میانگین گلوبولین سرم در تیمار حمام ۶۰ میکرولیتر در لیتر در مقایسه با نمونه کنترل به طور معنی‌داری کاهش داشته است ( $p < 0.05$ ).

با نمونه‌های کنترل نداشته است ( $p > 0.05$ ).

۵) در روز بیست و دوم خونگیری، حداکثر میانگین گلوبولین سرم در تیمار خوراکی ۶۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا بدست آمد اما در مقایسه با نمونه‌های کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداد ( $p > 0.05$ ).

۵) در روز بیست و دوم خونگیری، حداکثر میانگین آلومین سرم در تیمار خوراکی ۶۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا بدست آمد اما در مقایسه با نمونه‌های کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداد ( $p > 0.05$ ).

میزان گلوبولین کل اندازه‌گیری شده در نمونه‌های سرم: نتایج مربوط به میزان پروتئین گلوبولین سرم در جدول ۵ نشان داده شده است. به طوری‌که نکات ذیل از این نتایج قابل استناد می‌باشد:

۱) در روز اول خونگیری، حداکثر میانگین گلوبولین سرم در تیمار حمام ۳۰

۱) در روز اول خونگیری، حداکثر میانگین گلوبولین سرم در تیمار حمام ۳۰





نسبت به گروه‌های کنترل نشان داد اما برای تیمار خوراکی ۳۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا (روز دوم) و تیمار حمام ۱۲۰ میکرولیتر در لیتر (روز هشتم) این مقدار از کاهش معنی داری برخوردار بود ( $p < 0.05$ ). همین وضعیت تا حدی برای میزان آلبومین و گلوبولین کل سرم اتفاق افتاد به طوری که افزایش مختصری در روزهای دوم، پانزدهم و بیست و دوم در تیمارهای خوراکی و حمام نشان داد و کاهش معنی داری در تیمار خوراکی ۳۰ میکرولیتر در لیتر بدست آمد ( $p < 0.05$ ).

میزان تیترا آنتی بادی نیز تنها در تیمار خوراکی ۱۲۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا از کاهش غیر معنی داری نسبت به گروه کنترل برخوردار بود در حالی که تیترا آنتی بادی در تیمارهای حمام ۳۰ و ۱۲۰ میکرولیتر در لیتر و خوراکی ۳۰ و ۶۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری داشته اند ( $p < 0.05$ ). بنابراین می توان نتیجه گرفت که مصرف این اسانس با مقادیر مذکور و روشهای فوق الذکر مانع تحریک سیستم ایمنی ماهی نمی گردد بلکه ممکن است اثر تحریکی نیز داشته باشد که نیازمند مطالعات بعدی است.

تعداد مطالعات انجام شده در زمینه اثر این اسانس بر سیستم ایمنی جانوران بسیار محدود است. از جمله مطالعه انجام شده توسط Serafino و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثر اسانس اوکالیپتوس موجب افزایش قدرت بیگانه خواری توسط ماکروفاژهای مشتق شده از مونوسیت هادر موش رت BDIX گردید (۱۸).

علل متعددی برای تفسیر این نتایج قابل تصور است که از آن جمله می توان به تاثیر عوامل محیطی مانند درجه حرارت آب زمان آزمایش، غلظت اسانس اوکالیپتوس و دوره زمانی در معرض قرارگیری اسانس اشاره نمود. با توجه به اینکه درجه حرارت آب در زمان آزمایش (۱۸-۱۶ درجه سانتیگراد) پائین تر از درجه حرارت مطلوب فیزیولوژی ماهی کپور معمولی (۲۴-۲۳ درجه سانتیگراد) بوده است بنابراین کاهش درجه حرارت می تواند به عنوان یکی از فاکتورهای ممانعت از تحریک ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی ماهی عمل کند. این مساله با گزارشهای وارده توسط برخی محققان دیگر نیز همخوانی دارد در به طوری که در مطالعه انجام شده توسط Tort و همکاران در سال ۲۰۰۴ بر روی ماهی *sea bream (Sparus aurata)* طی دوره زمانی کاهش درجه حرارت کاهش معنی داری در میزان لیزوزیم رخ داد اما در فعالیت کمپلمان، قدرت فاگوسیتوزی و جمعیت لوکوسیتی تغییرات موقتی رخ داد. در مطالعه حاضر نیز علت کاهش میزان لیزوزیم سرم در تمام تیمارها ممکن است درجه حرارت پائین باشد (۲۰). در مطالعه انجام شده توسط Bagni و همکاران در سال ۲۰۰۵ در ماهی باس دریایی (*labrax Dicentrarchus*) حین استفاده از ارگوسان در دوره سرما میزان فعالیت کمپلمان به صورت معنی داری کاهش یافت و میزان لیزوزیم و جمعیت لنفوسیتها نیز به صورت شدیدی تحت تاثیر قرار می گیرند (۲). اما با این وجود در این مطالعه نیز مشابه مطالعه حاضر افزایش معنی داری در برخی فاکتورهای ایمنولوژیک مشاهده شد اما حین استفاده از این محرک ایمنی

استفاده از روش آگلوتیناسیون باکتریایی در تیمارهای مختلف در جدول شماره ۶ آمده است. نتایج گویای افزایش معنی دار تیترا آنتی بادی در تیمارهای حمام ۳۰ و ۱۲۰ میکرولیتر در لیتر و خوراکی ۳۰ و ۶۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا نسبت به کنترل می باشد و حداکثر تیترا آنتی بادی در تیمار حمام ۱۲۰ میکرولیتر در لیتر مشاهده شد.

## بحث

توسعه صنعت آبی پروری مستلزم بهبود کیفیت پرورش از طریق کاهش هر گونه استرس و ممانعت از انتشار بیماریها می باشد. روش های معمول برای حل این معضلات، استفاده از واکسیناسیون و مواد محرک ایمنی می باشد. تا بحال نیز مطالعات زیادی به منظور یافتن محرکین ایمنی مناسب در ماهی در شرایط مختلف و بویژه استرس زا انجام شده است. در دهه های اخیر نیز توجهات زیادی بسمت استفاده از مواد طبیعی و غیر مضر برای محیط زیست معطوف گردیده است. در این مطالعه نیز اثر احتمالی اسانس اوکالیپتوس به عنوان یک محرک ایمنی در ماهی کپور معمولی به عنوان یکی از گونه های مهم پرورشی در کشور مورد مطالعه قرار گرفته است. با توجه به اینکه در پرورش ماهی کپور معمولی دوره ای از پرورش مصادف با کاهش درجه حرارت در فصل زمستان بویژه در مناطق نیم کره شمالی و برخی مناطق ایران اتفاق می افتد به طوری که درجه حرارت آب به کمتر از ۲۰ درجه سانتیگراد کاهش می یابد لذا این مطالعه در شرایط دمایی مشابه دوران سرما انجام گرفته است تا اثر گیاه در ایجاد تحریک ایمنی در شرایط استرس سرمایی مورد بررسی قرار گیرد.

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان می دهد که کپور معمولی پس از قرار گرفتن در معرض غلظت های مختلف اسانس در دو روش حمام و خوراکی واکنش های متفاوت ایمنولوژیکی طی زمانهای مختلف پس از تجویز اسانس از خود نشان داد به طوری که تنها در برخی تیمارها افزایش معنی داری در قدرت باکتری کشی سرم بدست آمد به طوری که در روز اول نمونه گیری در تیمارهای حمام ۶۰ میکرولیتر در لیتر، خوراکی ۶۰ و ۱۲۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا و نیز در روزهای دوم، هشتم و پانزدهم پس از خونگیری در تیمار خوراکی ۶۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا افزایش معنی داری بدست آمد. به علاوه در روز بیست و دوم و در تیمارهای حمام ۳۰ و ۶۰ میکرولیتر در لیتر و خوراکی ۳۰ و ۶۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا نیز افزایش معنی داری بدست آمد ( $p < 0.05$ ). همچنین میزان فعالیت لیزوزیم سرم در تیمارهای مختلف افزایش معنی داری در مقایسه با گروه های کنترل نداشته است ( $p > 0.05$ ) در حالی که تعداد لوکوسیت های خون نیز در غلظت های پایین تر (۳۰ و ۶۰ میکرولیتر در لیتر و به ازاء کیلوگرم غذا) و به روش های حمام و خوراکی در روزهای اول، دوم، هشتم و پانزدهم نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری برخوردار بود ( $p > 0.05$ ).

به علاوه به طور کلی میزان پروتئین کل سرم افزایش مختصری را در روزهای اول، هشتم، پانزدهم و بیست و دوم در تیمارهای حمام و خوراکی



دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و شرکت باریج اسانس جهت تامین اسانس تشکر و قدردانی می‌گردد.

## References

1. 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 hydrophila*. *Aquaculture*. 275: 26-33.
2. Bagni, M., Romano, N., Finioia, M.G., Abelli, L., Scapigliati, G., Tiscar, P. G., Sarti, M., Marino, G. (2005) Short- and long-term effects of a dietary yeast  $\beta$ -glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Shell. Immunol*. 18: 311-325.
3. Barnes, A. C., Young, F. M., Horne, M. T., Ellis, A. E. (2003) *Streptococcus iniae*: serological differences presence of capsule and resistance to immune serum killing. *Dis. aquatic Org.* 53: 241-247.
4. Cermelli, C., Fabio, A., Fabio, G., Quaglio P. (2008) Effect of Eucalyptus Essential Oil on Respiratory Bacteria and Viruses. *Curr. Microbiol*. 56: 89-92.
5. Choi, S., Park, K., Yoon, T., Kim, J., Jang, Y, Choe, C. (2008) Dietary Korean mistletoe enhances cellular non-specific immune responses and survival of Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Fish Shell. Immunol*. 24: 67-73.
6. Dügenci, S. K., Arda, N., Candan, A. (2003) Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *J. Ethnopharmacol*. 88: 99-106.
7. Esteban, M. A., Rodríguez, A., Cuesta, A., Meseguer, J. (2005) Effects of lactoferrin on non-specific immune responses of gilthead seabream (*Sparus auratus L.*). *Fish and Shellfish Immunol*. 18: 109-124.
8. Jian, J., Wu, Z. (2003) Effects of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity and disease resistance of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson). *Aquaculture*. 218: 1-9.
9. Jian, J., Wu, Z. (2004) Influences of traditional

در شرایط اپتیمم دمایی ماهی باس دریایی افزایش معنی‌دار در تمام فاکتورهای ایمونولوژیک گزارش گردید. مساله مهم دیگر در استفاده از مواد محرک ایمنی یافتن دوز مناسب و طول دوره مجاورت با ماده محرک ایمنی می‌باشد به طوری که کاهش یا افزایش دوز و یا طول دوره مجاورت خارج از محدوده اپتیمم سبب کاهش پاسخ‌های ایمنی و یا سرکوب ایمنی می‌شود (۱۷) به طوری که در بررسی انجام شده توسط Peng و همکاران در سال ۲۰۰۶ بر روی ماهی باس هیبرید مخطط (*Morone saxatilis* × *Morone chrysops*) گزارش شد که در استفاده از لوامیزول به میزان‌های ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم به ازاء کیلوگرم غذا بهترین پاسخ ایمنی با دوز ۱۰۰ میلی گرم به ازاء کیلوگرم غذا رخ داد در حالی که با دوز ۱۰۰۰ میلی گرم به ازاء کیلوگرم غذا علائمی از مسمومیت مزمن و کاهش دریافت غذا و کارایی غذا مشاهده گردید (۱۳). در مطالعه انجام شده توسط Esteban و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز لاکتوفیرین با دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم به ازاء کیلوگرم غذا به مدت ۱ و ۲ هفته به جیره ماهی *Sparus aurata* اضافه شد. در این مطالعه نیز بهترین پاسخ ایمنی با دوز ۱۰۰ میلی گرم به ازاء کیلوگرم غذا و با طول دوره استفاده ۱ هفته بدست آمد (۷).

بنابراین در مجموع نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که مجاورت ماهی کپور معمولی با اسانس اوکالیپتوس بصورت حمام و خوراکی و در غلظت‌های ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ میکرولیتر در لیتر و یا به ازاء کیلوگرم غذا در شرایط دمایی پایین اثرات اندکی بر سیستم ایمنی داشته است و تنها در مورد فاکتورهای جمعیت لوکوسیتی و تیتر آنتی بادی از افزایش معنی‌داری در اغلب تیمارها برخوردار بود.

مساله دیگر عدم حلالیت کامل اسانس در آب در روش مصرف حمام آن بوده است. در مطالعات انجام شده توسط شریف روحانی در سال ۱۳۸۳ توئین ۲۰ به منظور حل نمودن این اسانس‌ها در آب استفاده گردید اما از آنجائیکه ممکن است این سورفکتانت بر سیستم ایمنی ماهی اثرگذار باشد بهمین منظور این اسانس بتنهایی در آب مورد استفاده قرار گرفت. بنابراین مصرف آن بصورت حمام ممکن است تا حدی سبب کاهش کارایی این اسانس در روش حمام و کاهش برخی فاکتورهای ایمونولوژیک مورد بررسی در تیمارهای حمام گردیده باشد. بدین منظور پیشنهاد می‌شود که در مطالعات بعدی بررسی‌های بیشتری با استفاده از دوزهای مختلف و مدت زمان‌های مختلف در شرایط اپتیمم و استرس‌های مختلف برای ماهی کپور معمولی به منظور انتخاب این اسانس انجام شود تا به اثرات تحریک ایمنی احتمالی آن در ماهی پی برد. بهر حال ترکیب مذکور در غلظت‌های بکار برده شده فاقد اثرات قابل توجهی بر فاکتورهای مذکور بوده است.

## تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب طرح تحقیقاتی مصوب شورای پژوهشی دانشگاه تهران و از محل اعتبارات گرنت مجری انجام گردیده است. از همکاری کارشناسان گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان و آزمایشگاه مرکزی تحقیقات



- chinese medicine on non-specific immunity of Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). Fish Shell. Immunol. 16: 185-191.
10. Khoshbavar-Rostami, H. A., Soltani, M., Hassan, H. M. D. (2007) Immune responses of great sturgeon *Huso huso* to *Aeromonas hydrophila* bacterin. J. Fish Biol. 70: 1931-1938.
  11. Kumari, J. (2006) Seasonal variation in the innate immune parameters of the Asian catfish *Clarias batrachus*. Aquaculture. 252: 121-127.
  12. Liu, X., Chen, Q., Wang, Z., Xie, L., Xu, Z. (2008) Allelopathic effects of essential oil from *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* on pathogenic fungi and pest insects. Frontiers of Forestry in China. 3: 232-236.
  13. Peng, Li, Xiaoxue Wang, Delbert M. Gatlin. (2006) Evaluation of levamisole as a feed additive for growth and health management of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). Aquaculture. 251: 201-209.
  14. Rao, V., Chakrabarti, R. (2005) Stimulation of immunity in Indian major carp (*Catla catla*) with herbal feed ingredients. Fish Shell. Immunol. 18: 327-334.
  15. Robertson, B.S. (1990) Bacterial Agglutination. In: Techniques in Fish Immunology. Stolen, J. S., Fletcher, T.C., Anderson, D. P., Robertson, B.S., Van Muiswinkel, W. B. ed. SOS Publication, pp. 81-87.
  16. Rohani, M.S., Ebrahimzadeh Mousavi, H., Mokhayer, B., Khosravi, A., Bahonar, A., Mirzargar, S., Mehrabi, Y. (2006) Evaluation of Germanium herbarvm essence application in control of fungal contamination of trout eggs. J. Vet. Res. 61: 269-272.
  17. Sakai, M. (1999) Current research status of fish immunostimulant. Aquaculture. 172: 63-92.
  18. Serafino, A., Vallebona, P.S., Andreola, F., Garaci, E. and Pierimarchi, P. (2008) Stimulatory effect of Eucalyptus essential oil on innate cell-mediated immune response. BMC Immunol. 9: 17.
  19. Soltani, M., Alishahi, M., Khazaryeenia, P., Rabani, M., Sattari, A. (2007) Study on some immunological responses of rainbow trout (*Oreochromis mkgiss*) to some antigens of *Streptococcus iniae*. J. Vet. Res. 62: 1-9.
  20. Tort, L., Rotllant, J., Liarte, C., Acerete, L., Hernández, A., Ceulemans, S., Coutteau, P., Padros, F. (2004) Effects of temperature decrease on feeding rates, immune indicators and histopathological changes of gilthead sea bream *Sparus aurata* fed with an experimental diet. Aquaculture. 229: 55-65.
  21. Yin, G., Jeney, G., Racz, T., Xu, P., Jun, X., Jeney, Z., (2006) Effect of two Chinese herbs (*Asrtagalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture. 253: 39-47.
  22. Vigo, A., Cepeda, A., Gualillo, O., Perez-Fernandez, R. (2004) In-vitro anti-inflammatory effect of *Eucalyptus globulus* and *Thymus vulgaris*: nitric oxide inhibition in J774A.1 murine macrophages. J. Phar. Pharmacol. 56: 257-263.





## EFFECTS OF *EUCALYPTUS GLOBULES LABILL* ESSENTIAL OIL ON SOME IMMUNOLOGICAL VARIABLES OF COMMON CARP (*CYPRINUS CARPIO*)

Sheikhzadeh, N.<sup>1</sup>, Soltani, M.<sup>1\*</sup>, Ebrahimzadeh Mousavi, H. A.<sup>1</sup>, Khosravi, A. R.<sup>2</sup>, Bagheri, H.<sup>1</sup>, Fathi, E.<sup>3</sup>, Zargar, A.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

<sup>2</sup>Mycology Research Center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

<sup>3</sup>Department of Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

<sup>4</sup>Graduated of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

(Received 23 June 2007 , Accepted 10 August 2008)

### Abstract:

Influence of both dietary and bath administration of *Eucalyptus globules labill* was evaluated on some immunological variables of common carp (*Cyprinus carpio*) under temperature less than optimum in order to determine stimulatory effect of the essential oils. Fish weighing 30-35 g were bathed or fed with different doses of 30, 60 and 120 µl/L or mg/kg feed for a period of 8 days. Serum lysozyme activity, bactericidal activity, total white blood cells, total protein, globulin and albumin were measured on days 1, 2, 8, 15 and 23 after the essential oils administration. On day 23 post administration the remaining fish from each group were intraperitoneally injected with killed *Aeromonas hydrophila* ( $6 \times 10^8$  cells/ml) and antibody titer was measured 3 weeks later. The obtained results showed that *Eucalyptus globules* had a limited immunostimulatory effect on these immunological variables although antibody titers and total white blood cells in some test groups were significantly ( $p < 0.05$ ) higher than the control one. The reduction of the immunological factors is probably related to the lower water temperature, inappropriate administrating dose and duration of essential oils administration.

**Key words:** *eucalyptus globules labill*, common carp, immunological factors.

\*Corresponding author's email: [msoltani@ut.ac.ir](mailto:msoltani@ut.ac.ir), Tel: 021-61117195, Fax: 021-66933222

