مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۸، دوره ۶۴، شماره ۱، ۵۴-۴۷

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

نجمه شیخ زاده[۱] مهدی سلطانی[۱]* حسینعلی ابراهیم زاده موسوی[۱] علیرضا خسروی[۲] هادی باقری[۱] عزت اله فتحی[۳] اشکان زرگر[۴]

۱) گروه بهداشت و بیماری آبزیان 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 آبزیان 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 وزن۳۵- ۳۰گرمی دردمای ۱۶-۱۸ (شرایط دمایی پایین تر از میزان اپتیمم) مورد بررسی قرارگرفت. ماهیان به روش‌های حمام و خوراکی و با غلظتهای ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ میکرولیتر در لیتر یا به ازاء کیلوگرم غذا بمدت ۸ روز متوالی با اسانس مجاورت داده‌شدند و برخی فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی شامل سنجش میزان فعالیت لیزوزیم، قدرت باکتری کشی سرم، جمعیت لوکوسیتی، پروتئین کل سرم، میزان آلبومین وگلوبولین در زمان‌های ۱، ۲، ۸، ۱۵ و ۲۳ روز پس از آخرین تجویز اسانس موردسنجش قرارگرفت. به منظورسنجش تیترآنتی بادی، ماهی‌های باقیمانده ۲۳ روز پس از تجویز اسانس با باکتری آئرو موناس هیدروفیلا کشته‌شده به روش داخل صفاقی تزریق‌گردیدند و تیترآنتی بادی در هفته‌سوم پس از ایمن‌سازی به روش میکروآگلوتیناسیون باکتریایی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بدست‌آمده نشان داد که اسانس اوکالیپتوس اثرات بسیار کمی بر روی‌سیستم ایمنی ماهی کپور معمولی داشته است هر چند افزایش معنی‌داری در فاکتورهای تیترآنتی بادی، جمعیت لوکوسیتی و قدرت باکتری کشی‌سرم در برخی تیمارها بدست‌آمد. این مساله ممکن است ناشی ازشرایط دمایی مورد نظر، عدم استفاده از دوز مناسب و دوره مناسب تجویز اسانس‌ها باشد.

واژه‌های کلیدی: اسانس اوکالیپتوس، کپور معمولی، فاکتورهای ایمنی.

مقدمه

با متراکم شدن صنعت پرورش ماهی، بیماری‌های عفونی و غیرعفونی نیز در حال گسترش یافتن می‌باشند به‌طوری‌که هر ساله مقادیر زیادی آنتی بیوتیک و مواد شیمیایی به منظور کنترل این بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد که ایجاد باکتری‌های مقاوم به درمان، آلودگی‌های محیطی و باقیماندگی در ماهی را به همراه داشته است.

ماهی‌ها مانند دیگر مهره‌داران رده‌های پایین تر برای مبارزه با عوامل بیماریزا عمدتا به سیستم ایمنی غیر اختصاصی متکی هستند. مواد محرک ایمنی نیز در زمان مواجه با انواع استرس زا قادر به تقویت سیستم ایمنی غیر اختصاصی و حتی سیستم ایمنی اختصاصی می‌باشند. مواد محرک ایمنی که تاکنون در آبزیان مورد استفاده قرار گرفته‌اند شامل مواد سنتتیک مانند لوامیزول، مواد بیولوژیک مانند مشتقات باکتریایی، پلی ساکاریدها و فاکتورهای تغذیه‌ای همچنین ترکیبات حیوانی و گیاهی می‌باشند(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 آبزی پروری در حال افزایش می‌باشد(۱،۵،۶،۸،۹،۱۳،۲۱).

از طرف دیگر برخی از گیاهان در طب سنتی به منظور درمان و کنترل بسیاری از بیماری‌ها در انسان و حیوانات مورد استفاده قرار گرفته‌اند. یکی از این گیاهان اوکالیپتوس (*Eucalyptus globulus labill*) می‌باشد که از خانواده میرتاسه (Myrtaceae) بوده و برگ آن به منظور تولید اسانس مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱۶). اسانس این گیاه دارای خاصیت ضدعفونی کنندگی است به‌طوری‌که در قدیم شاخ و برگ گیاه را به منظور ضدعفونی هوا در اطاق بیماران قرار می‌دادند. برای این اسانس اثرات مسکن، خواب آور، ضد یرقان، زکام، تقویت قوا، و التیام دهنده زخم را قائل می‌باشند(۱۶).

در مورد استفاده و موارد کاربرد اسانس اوکالیپتوس در آبزی پروری اطلاعات بسیار اندکی قابل دسترس است. در مطالعه انجام شده توسط Rohani و همکاران درسال۱۳۸۴ اثرات اسانس اوکالیپتوس در کنترل آلودگی‌های قارچی در تخم‌های قزل آلای رنگین کمان تا رسیدن بمرحله چشم زدگی مورد بررسی قرار گرفت و در دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر در لیتر اختلاف معنی داری با گروه شاهد گزارش گردید (۱۶).

با وجود اثرات مثبت این گیاه در کنترل برخی بیماری‌های میکروبی و قارچی و حتی اثرات تحریک سیستم ایمنی در جانوران خونگرم (۴،۱۲،۱۸،۲۲) و تاثیرات مناسب در کنترل بیماری‌های قارچی ماهی، در این مطالعه اثر این گیاه بربرخی از خواص ایمونوفیزیولوژی گونه ماهی مد نظر قرار گرفت تادر صورت امکان بتوان از این گیاه در کنترل بیماریهای 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 می‌شود. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثرات اسانس اوکالیپتوس بر ایمنی غیر اختصاصی و هومورال ماهی کپور معمولی به عنوان

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۱۹۵-۰۲۱، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: msoltani@ut.ac.ir

یکی از گونه‌های مهم پرورشی ایران در شرایط درجه حرارت پائین تر از میزان اپتیمم می باشد 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 ۳۵-۳۰ گرم از یک مزرعه پرورش ماهی واقع در استان گیلان تهیه و به حوضچه های 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 نیتریت 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 دو روش ذیل استفاده شد.

روش خوراکی: در این روش اسانس در غلظت های ۳۰، ۶۰ و 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 ماهی ها رسید. میزان غذادهی روزانه نیز ۱درصد وزن بدن منظور و در گروه کنترل نیز غذای بدون اسانس استفاده گردید.

روش حمام: در این روش از غلظت های 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 ماهی ها 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 ایمن سازی علیه آئرومونواس هیدروفیلا استفاده شد. برای اینکار از آنتی ژن غیر فعال شده با فرمالین و با غلظت 6×10^{8} سلول به ازاء هر میلی لیتر (مک فارلند شماره۲) 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 خون گیری ۳ هفته پس از تجویز آنتی ژن انجام شد.

نمونه گیری 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 مجاورت با اسانس نمونه گیری بعمل آمد. برای اینکار ماهیان بدون بیهوشی 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، مجددا 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 آئرومونواس هیدروفیلا به مدت ۲۴ ساعت در محیط ژلوز خون کشت داده شد و سپس سلول های باکتریایی با افزودن مقداری بافر فسفات سدیم استریل به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریوفوژ شده و سلول های حاصله جمع آوری 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 غیر فعال 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 ماهی های 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 پلیت ها 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 مبنا 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 ار 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 اتوآنالایزر

جدول۱- میانگین قدرت باکتری کشی سرم در ماهی کپور معمولی پس از دریافت اسانس اوکالیپتوس به روش‌های خوراکی و حمام در زمان‌های مختلف و دوزهای مختلف (میانگین± خطای معیار).

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

(اپندورف) استفاده گردید.

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

گلوبولین سرم= پروتئین کل سرم - آلبومین سرم

اندازه گیری تیتر آنتی بادی: از روش توصیه شده توسط Robertson در سال ۱۹۹۰ با مختصر تغییرات استفاده گردید. به طوری که میزان ۲۵ میکرولیتراز بافر فسفات سدیم به گودههای پلیت الایزا (بجز گوده اول) افزوده شد و سپس مقدار ۲۵ میکرولیتر از نمونه سرم به اولین و دومین گوده اضافه گردید و تهیه رقت‌های بر مبنای دو در گودههای ۲ الی ۱۲ و حذف ۲۵ میکرولیتر از گوده آخر و در نهایت افزودن ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی آئرومونواس هیدروفیلا تهیه شده در بافر فسفات سدیم با رقت مک فارلین شماره ۳ برابر ۹×۱۰^{۸} سلول به ازاء میلی لیتر انجام شد و پس از یک شب در دمای اتاق قرائت نتایج انجام شد بطوری که آخرین گودهای که در آن آگلوتیناسیون باکتریایی صورت گرفته به عنوان تیتر آنتی بادی نمونه سرم در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری: دادهها با روشهای آنالیز واریانس یکطرفه، مورد بررسی آماری قرار گرفت و میزان معنی‌داری نیز ۰/۰۵ به عنوان مبنا 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 معنی‌داری با نمونه‌های کنترل در روزهای مختلف وجود نداشت ($p>۰/۰۵$).

بررسی قدرت باکتری کشی سرم: نتایج مربوط به قدرت باکتری کشی سرم ماهی‌ها در تیمارهای مختلف در جدول ۱ آمده است. به‌طوری‌که نکات ذیل از این نتایج قابل استناد می‌باشد:

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 ($p<۰/۰۵$).

۲) در روز دوم خونگیری، میانگین قدرت باکتری کشی سرم در تیمار خوراکی ۶۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا افزایش معنی‌داری در مقایسه با نمونه‌های کنترل نشان داد ($p<۰/۰۵$).

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 نمونه‌های کنترل نشان داد ($p<۰/۰۵$).

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 معنی‌داری افزایش داشته است ($p<۰/۰۵$).

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 معنی‌داری افزایش داشته است ($p<۰/۰۵$).

بررسی جمعیت لوکوسیتی: نتایج مربوط به شمارش لوکوسیتی در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. به‌طوری‌که نکات ذیل از این نتایج قابل استناد می‌باشد:

۱) در روز اول خونگیری، حداکثر میانگین جمعیت لوکوسیتی در تیمارهای حمام ۳۰ میکرولیتر در لیتر برابر ۷۶۳/۷۶±۴۵۰۰ و ۶۰ میکرولیتر در لیتر برابر ۸۲۰/۷۴±۵۳۳۳ بدست آمد و تفاوت معنی‌داری را در مقایسه با نمونه‌های کنترل (۴۳۶/۲۱±۲۱۶۶/۶۷) نشان داد ($p<۰/۰۵$).

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 نمونه‌های کنترل نشان داد ($p<۰/۰۵$).

۳) در روز هشتم خونگیری، میانگین جمعیت لوکوسیتی در تیمار حمام ۶۰ میکرولیتر در لیتر افزایش معنی داری را در مقایسه با نمونه‌های کنترل نشان داد ($p<۰/۰۵$).

۴) در روز پانزدهم خونگیری، میانگین جمعیت لوکوسیتی در تیمارهای حمام ۶۰ میکرولیتر در لیتر برابر ۱۳۸۶/۹۴±۴۵۸۳/۳۳ و خوراکی ۶۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا برابر ۴۶۳/۹۸±۲۶۶۶/۶۷ در مقایسه با نمونه کنترل (۱۴۹/۸۱±۱۵۱۶/۶۷) به طور معنی داری افزایش داشته است ($p<۰/۰۵$).

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

جدول۲- میانگین جمعیت لوکوسیتی (در میکرولیتر) در ماهی کپور معمولی پس از دریافت اسانس اوکالیپتوس به روش‌های خوراکی و حمام در زمان‌های مختلف و دوزهای مختلف (میانگین± خطای معیار).

غلظت اسانس اوکالیپتوس (میکرولیتر در لیتر یا به ازاء کیلوگرم غذا)	روزهای خون گیری				
	۱	۲	۸	۱۵	۲۲
حمام ۳۰	۴۵۰۰/۰۰±۷۶۳/۷۶	۳۴۵۰/۰۰±۱۲۸۸/۷۳	۳۲۰۰/۰۰±۴۳۵/۸۹	۱۹۶۶/۶۷±۲۷۴/۳۷	۱۸۱۶/۶۷±۴۴۷/۵۲
حمام ۶۰	۵۳۳۳/۳۳±۸۲۰/۷۴	۳۵۸۳/۳۳±۸۲۰/۷۴	۳۸۳۳/۳۳±۸۸۱/۹۲	۴۵۸۳/۳۳±۱۳۸۶/۹۴	۱۸۳۳/۳۳±۳۶۳/۲۴
حمام ۱۲۰	۳۳۳۳/۳۳±۱۳۷۱/۸۴	۳۷۵۰/۰۰±۱۱۸۱/۴۵	۲۰۰۰/۰۰±۲۸۸/۶۸	۱۹۸۳/۳۳±۱۳۰/۱۷	۱۷۵۰/۰۰±۲۵۰/۰۰
خوراکی ۳۰	۳۲۳۳/۳۳±۱۶۴/۱۵	۲۶۷۵/۰۰±۸۲۵/۰۰	۲۳۰۰/۰۰±۱۱۵۰/۳۶	۲۲۸۳/۳۳±۳۸۴/۴۲	۱۷۵۰/۰۰±۲۶۴/۵۸
خوراکی ۶۰	۲۹۱۶/۶۷±۱۰۴۴/۱۶	۴۵۸۳/۳۳±۹۶۱/۰۵	۲۵۸۳/۳۳±۵۰۶/۹۰	۲۶۶۶/۶۷±۴۶۳/۹۸	۱۶۶۶/۶۷±۸۳/۳۳
خوراکی ۱۲۰	۳۵۶۶/۶۷±۱۰۲۶/۸۶	۲۲۵۰/۰۰±۳۸۱/۸۸	۳۸۷۵/۰۰±۲۱۲۵/۰۰	۱۳۰۰/۰۰±۵۰/۰۰	۱۴۱۶/۶۷±۱۶۶/۶۷
کنترل	۲۱۶۶/۶۷±۴۳۶/۲۱	۱۹۹۱/۶۷±۶۳۲/۵۱	۱۷۰۰/۰۰±۳۳۰/۶۶	۱۵۱۶/۶۷±۱۴۹/۸۱	۱۲۹۱/۶۷±۱۵۶/۲۱

جدول۳- میانگین پروتئین 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± خطای معیار).

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

حمام ۶۰ میکرولیتر در لیتر مشاهده شد اما در مقایسه با نمونه‌های کنترل تفاوت معنی داری نشان نداد($p<۰/۰۵$).

میزان پروتئین کل اندازه گیری شده در نمونه‌های سرم: نتایج مربوط به میزان پروتئین کل سرم در جدول ۳ نشان داده شده است. به‌طوری‌که نکات ذیل از این نتایج قابل استناد می‌باشد:

۱) در روزاول خونگیری، حداکثر میانگین پروتئین کل سرم در تیمار خوراکی ۳۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا بدست آمد اما تفاوت معنی داری با نمونه‌های کنترل نداشته است($p<۰/۰۵$).

۲) در روز دوم خونگیری، میانگین پروتئین کل سرم در تیمارخوراکی ۳۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا در مقایسه با نمونه کنترل به طور معنی داری کاهش داشته است($p<۰/۰۵$).

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 نمونه‌های کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($p>۰/۰۵$). در حالی‌که میانگین پروتئین کل سرم در تیمار حمام ۱۲۰ میکرولیتر در لیتر کاهش معنی داری در مقایسه با نمونه‌های کنترل نشان داد($p<۰/۰۵$).

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 نمونه‌های کنترل نداشته است($p>۰/۰۵$).

۵) در روز۲۲ خونگیری، حداکثر میانگین پروتئین کل سرم در تیمار خوراکی ۱۲۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا مشاهده شد که تفاوت معنی داری با نمونه‌های کنترل نداشته است($p>۰/۰۵$).

میزان آلبومین کل اندازه گیری شده در نمونه‌های سرم: نتایج مربوط به میزان پروتئین آلبومین سرم در جدول ۴ نشان داده شده است. به‌طوری‌که نکات ذیل از این نتایج قابل استناد می‌باشد:

۱) در روز اول خونگیری، حداکثر میانگین آلبومین سرم در تیمار خوراکی ۳۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا بدست آمد اما در مقایسه با نمونه‌های کنترل تفاوت معنی داری نشان نداد ($p>۰/۰۵$).

۲) در روز دوم خونگیری، حداکثر میانگین آلبومین سرم در تیمار حمام ۶۰ میکرولیتر در لیتر بدست آمد اما تفاوت معنی داری با نمونه‌های کنترل نداشته است($p<۰/۰۵$). 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($p<۰/۰۵$).

۳) در روز هشتم خونگیری، میانگین آلبومین سرم در تیمار خوراکی ۳۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا کاهش معنی داری را در مقایسه با نمونه‌های کنترل نشان داد($p<۰/۰۵$).

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

جدول۴- میانگین آلبومین 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±خطای معیار).

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

جدول۵- 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±خطای معیار).

غلظت اسانس اوکالیپتوس (میکرولیتر در لیتر یا به ازاء کیلوگرم غذا)	روزهای خون گیری				
	۱	۲	۸	۱۵	۲۲
حمام ۳۰	۲/۹۳±/۳۳	۲/۴۷±/۲۲	۲/۴۷±/۲۱۹	۲/۴۷±/۰۳	۲/۳۳±/۱۵
حمام ۶۰	۲/۵۸±/۲۰	۲/۵۲±/۰۳	۲/۸۹±/۱۵	۲/۲۸±/۰۹	۲/۵۲±/۰۷
حمام ۱۲۰	۲/۲۳±/۰۹	۲/۳۳±/۱۸	۲/۳۰±/۱۵	۲/۶۳±/۱۳	۲/۶۰±/۱۵
خوراکی ۳۰	۲/۶۷±/۲۷	۲/۲۳±/۱۲	۲/۵۳±/۱۹	۲/۷۳±/۱۸	۲/۵۳±/۰۷
خوراکی ۶۰	۲/۴۵±/۰۰	۲/۶۲±/۰۳	۲/۴۸±/۳۵	۲/۴۵±/۱۰	۲/۴۵±/۱۰
خوراکی ۱۲۰	۲/۶۰±/۱۲	۲/۶۰±/۱۲	۲/۴۷±/۰۹	۲/۷۷±/۰۹	۲/۶۷±/۱۸
کنترل	۲/۴۴±/۱۱	۲/۶۱±/۱۱	۲/۶۳±/۱۰	۲/۶۳±/۰۷	۲/۴۶±/۰۶

جدول۶- تیتر آنتی بادی اندازه گیری شده به روش میکروآ گلوتیناسیون باکتریایی در ماهی کپور معمولی پس از دریافت اسانس اوکالیپتوس به روش های خوراکی و حمام در زمان‌های مختلف و دوزهای مختلف (میانگین±خطای معیار).

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

با نمونه‌های کنترل نداشته است($p>0/05$).

۵) در روز بیست و دوم خونگیری، حداکثر میانگین آلبومین سرم در تیمار خوراکی ۶۰ میکرولیتر به ازاء کیلوگرم غذا بدست آمد اما در مقایسه با نمونه‌های کنترل تفاوت معنی داری نشان نداد ($p>0/05$).

میزان گلوبولین کل اندازه گیری شده در نمونه‌های سرم: نتایج مربوط به میزان پروتئین گلوبولین سرم در جدول ۵ نشان داده شده است. به‌طوری‌که نکات ذیل از این نتایج قابل استناد می باشد:

۱) در روز اول خونگیری، حداکثر میانگین گلوبولین سرم در تیمار حمام ۳۰ میکرولیتر در لیتر بدست آمد که افزایش معنی داری 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 معنی داری در مقایسه با نمونه‌های کنترل نشان داد($p<0/05$).

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 معنی داری 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 معنی داری 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 معنی داری کاهش داشته 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 معنی داری نشان نداد($p>0/05$).

نتایج آگلوتیناسیون باکتریایی: نتایج اندازه گیری تیتر آنتی بادی با

استفاده از روش آگلوتیناسیون باکتریایی در تیمارهای مختلف در جدول شماره ۶ آمده است. نتایج گویای افزایش معنی دار تیتر 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 تیتر آنتی بادی در تیمار حمام ۱۲۰ میکرولیتر در لیتر مشاهده شد.

بحث

توسعه صنعت آبزی 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 ایمونوفیزیولوژیک 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 لوکوسیتهای 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 ازافزایش معنی داری برخوردار بود($p>0/05$).

به علاوه به طورکلی میزان پروتئین کل سرم افزایش مختصری را در روزهای اول، هشتم، پانزدهم و بیست و دوم در تیمارهای حمام و خوراکی نسبت به گروه های 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 تیتر 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 تیتر 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 ها در 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 دارد 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 درسال 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 شدیدتری تحت تاثیر قرار می گیرند (۲). اما با این وجود در این مطالعه نیز مشابه مطالعه حاضر افزایش معنی داری در برخی فاکتورهای ایمونولوژیک مشاهده شد اما حین استفاده از این محرک ایمنی

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 به‌طوری‌که کاهش یا افزایش دوز و یا طول دوره مجاورت خارج از محدوده اپتیمم سبب کاهش پاسخ‌های ایمنی و یا سرکوب ایمنی می‌شود (۱۷) به‌طوری‌که 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 حالی‌که 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 لاکتوفرین با دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم به ازاء کیلوگرم غذا به مدت ۱ و ۲ هفته به جیره ماهی sea bream (*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. بهرحال 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 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., Finoia, M.G., Abelli, L., Scapigliati, G., Tiscar, P. G., Sarti, M., Marino, G. (2005) Short- and long-term effects of a dietary yeast β-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 Sellfish 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

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 escence application in control of fungal contarnination 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 I Immunol. 9: 17.
19. Soltani, M., Alishahi, M., Khazaryeenia, P., Rabani, M., Sattari, A. (2007) Study on some immunological responses of rainbow trout (*Oreochromis mgkiss*) to some antigens of *Streptococcus iniae*. J. Vet. Res. 62: 1-9.
20. Tort, L., Rotllant, J., Liarte, C., Acerete, L., Hernándeza, 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) Effec 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 macroghages. J. Phar. Pharmacol. 56: 257-263.

J.Vet.Res. 64,1:47-54,2009

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

Sheikhzadeh, N.[1], Soltani, M.[1]*, Ebrahimzadeh Mousavi, H. A.[1], Khosravi, A. R.[2], Bagheri, H.[1], Fathi, E.[3], Zargar, A.[4]

[1]*Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

[2] *Mycology Research Center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

[3]*Department of Clinical Pathology , Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

[4]*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 intraperitonealy injected with killed *Aeromonas hydrophila* (6×10^8 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, Tel: 021-61117195, Fax: 021-66933222**