تاثیر عصاره گیاه درمنه دشتی بر ایمنی هومورال ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجه با عفونت باکتری استرپتوکوکوس اینیایی

مینا ربیعی

دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: minarabie@pnu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۱۴

چکیده

عفونت‌های باکتریایی از مهم‌ترین عوامل تهدید کننده صنعت آبزی‌پروری می‌باشد. یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی شایع در اکثر مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین کمان در سال‌های اخیر در بسیاری از کشورهای دنیا استرپتوکوکوزیس (Streptococosis) می‌باشد. در سال‌های اخیر، گیاهان آروماتیک و عصاره آن‌ها توجه بسیاری را به خود جلب کرده‌اند. از این‌رو هدف از این مطالعه بررسی تاثیر عفونت باکتریایی ناشی از سویه استرپتوکوکوس اینیایی بر سیستم ایمنی ماهی‌ها و استفاده از عصاره گیاه درمنه دشتی در کاهش اثر سوء این عفونت باکتریایی بر سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است. کاهش سطح پراکسیداز پلاسما، IgM، کمپلمان تام، لیزوزیم در ماهی‌هایی که در معرض باکتری قرار داشته‌اند به خوبی نشان دهنده تاثیر سم آن بر سیستم ایمنی ماهی‌ها است. حال آن‌که در ماهی‌هایی که با عصاره‌ی گیاه درمنه دشتی تغذیه شده و در مواجه با عفونت باکتریایی قرار گرفته‌اند، تغییر معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) در مقایسه با ماهی‌های گروه کنترل مشاهده نگردید، که این امر نشان دهنده تاثیر تقویتی و حفاظتی عصاره‌ی گیاه درمنه دشتی بر سیستم ایمنی ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان است.

واژگان کلیدی: درمنه دشتی، استرپتوکوکوس اینیایی ، قزل‌آلای رنگین‌کمان، ایمنی هومورال.

مقدمه

لزوم تغذیه جمعیت رو به افزایش و کیفیت برتر پروتئین آبزیان در مقایسه با سایر گوشت‌ها، موجب افزایش توجه به آبزیان و صید از دریاها و منابع آبی شده که در نتیجه کاهش ذخایر آبزیان را به دنبال داشته است. برای دستیابی به برابری تولید آبزیان با تقاضای مصرف آن‌ها، پرورش آبزیان در محیط‌های قابل کنترل و همچنین تکثیر انواع ماهیان به‌منظور رهاسازی و بازسازی ذخایر گزینه مناسبی می‌باشد. در این خصوص پرورش ماهیان سردابی و به‌ویژه قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) از جایگاه خاصی برخوردار بوده و در سال‌های اخیر در کشور ما توجه فراوانی به آن شده و بخش اصلی آبزی پروری را به خود اختصاص داده است. به‌طوری‌که در سال ۱۳۸۸ میزان تولید آن بالغ بر ۷۲ هزار تن بوده و ایران رتبه اول تولید قزل‌آلای رنگین کمان در آب‌های شیرین را در جهان داشته است (FAO, 2008). گسترش روز افزون صنعت آبزی‌پروری و توسعه سیستم‌های پرورشی متراکم در ایران و توجه به آبزیان به‌عنوان یک منبع غنی از پروتئین از یک سو و شیوع و ظهور بیماری‌های اپیدمیک در عرصه آبزی‌پروری جهانی از سوی دیگر، شناسایی عوامل بیماری‌زا به‌ویژه باکتری‌ها و روش‌های پیشگیری و مبارزه با آن‌ها را امری ضروری و اجتناب ناپذیر ساخته است.

سیستم ایمنی جانوران آبزی، نظیر ماهی‌ها به‌طور پیوسته تحت تاثیر تغییرات دوره‌ای و ناخواسته محیطی قرار دارد و هرگونه تغییر ناخواسته محیطی می‌تواند به‌صورت استرس حاد یا مزمن سلامت جانور را به‌مخاطره اندازد (Nafisi, 2006). عفونت‌های باکتریایی می‌تواند بر روی سیستم ایمنی ماهیان اثرگذار باشد. یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی شایع در اکثر مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین کمان در سال‌های اخیر در بسیاری از کشورهای دنیا استرپتوکوکوزیس می‌باشد (Tiihonen, 2010). مطالعات متعددی در خصوص بیماری‌زایی، شناسایی و جداسازی بیماری از مزارع تکثیر و پرورش قزل‌آلای کشور انجام گرفته است (Akhlaghi and Keshavarz, 2002; Toghyani *et al*., 2010; Tiihonen, 2010). حاصل این مطالعات بیانگر گسترش بیماری در مزارع قزل‌آلای کشور بوده و

تاکنون موجب خسارات زیادی بر این صنعت گردیده است. به‌علاوه در این مطالعات گونه عمده درگیر در بروز استرپتوکوکوزیس در مزارع قزل‌آلای ایران استرپتوکوکوس اینیایی (*Streptococcus iniaie*) و لاکتوکوکوس گارویه (*Lactococcus garvieae*) معرفی شده است (Akhlaghi and Keshavarz, 2002). آنتی‌بیوتیک‌های مختلفی برای درمان بیماری‌های باکتریایی استفاده می‌شود که از آن جمله می‌توان به اکسی‌تتراسایکلین (Oxytetracycline) و اریترومایسین (Erythromycine) اشاره کرد، که به‌دلیل مصرف بی‌رویه زمینه ساز ایجاد مقاومت‌های باکتریایی، تزلزل امنیت غذایی و بهداشت عمومی و ناپایداری صادرات محصولات پرورشی می‌باشد. هم چنین کاربرد داروها و مواد شیمیایی خارج از سیستم صحیح تشخیص و تجویز رسمی بدون در نظر گرفتن باقی مانده‌های دارویی و اثرات آلایندگی آن‌ها در طبیعت موجب عوارض سوء روی انسان و سایر اجزای اکوسیستم آب و خاک می‌گردد.

تقویت سیستم ایمنی ماهی‌ها از طریق افزودن مکمل‌های غذایی می‌تواند راه حل مناسبی برای پیشگیری از بروز ضعف در سیستم ایمنی آن‌ها گردد. ترکیب بسیاری از عصاره‌های گیاهی قادر به از بین بردن انواع ترکیبات فعال اکسیژن‌دار (ROS) می‌باشند و به‌موجب آن می‌توانند به‌طور مستقیم از اثرات استرس اکسایشی بکاهند (Bakkali *et al*., 2008). این ترکیبات همچنین می‌توانند به‌طور غیرمستقیم و از طریق فعال نمودن سیستم دفاع آنتی اکسیدانی نقش حفاظتی خود را اعمال نمایند (Caspary, 1992; Gee *et al*., 1996). استفاده از گیاهان دارویی به‌عنوان ترکیبات ضد قارچ (Bauer, 1996) و ضد باکتری (Lis et al., 1998; Nie and Zhang, 1999) و همچنین به‌عنوان ترکیبات محرک سیستم ایمنی (Gee *et al*., 1996; Hashemi *et al*., 2012; Lji *et al*., 2001)، در افزایش توان سیستم ایمنی ماهیان از دیرباز مرسوم بوده است.

درمنه دشتی *Artemisia sieberi* Besser از خانواده‌ی Compositae تیره Radiae می‌باشد. درمنه گیاهی بوته‌ای به رنگ سبز متمایل به خاکستری و دارای ریشه عمودی ضخیم و ساقه‌های گلدار به ارتفاع ۴۰-۳۰ سانتی‌متر می‌باشد. جنس درمنه دارای بیش از ۴۰۰ گونه در سطح جهان و ۳۴ گونه در ایران می‌باشد. موطن اصلی آن آسیا بوده و از این قاره به اروپا و آمریکا برده شده است. درمنه یکی از گیاهان با ارزش مناطق بیابانی ایران است که پراکندگی جغرافیایی آن در برگیرنده سراسر ایران به جز نواحی غربی است (Goudarzi *et al*., 2005). Lopes-Lutz و همکاران (۲۰۰۸) مهم‌ترین ترکیبات موجود در گیاه درمنه را سابینن، بتاتیوجن، میرسن و کامفور بیان کردند و اسانس این گیاه را به سه گروه شیمیایی اصلی تقسیم کردند؛ اسانس غنی از تیوجن، اسانس غنی از سابینن و اسانس غنی از اپوکسی سیمن (Lee *et al*., 2003). Yousefi و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند فعالیت ضدمیکروبی اسانس *A. hausskenechti* از آنتی بیوتیک‌های مانند نالیدیکسیک اسید، جنتامایسین، سفالونین، آموکسی-سیلین بیشتر است. ترکیبان اصلی اسانس این گیاه سینئول، کامفور، آرتمیزین و بورنئول می‌باشد. Royo و همکاران (۱۹۹۹)، با انجام تحقیقات روی اسانس گیاه *A. sieberi* خواص ضدمیکروبی آن را به‌وجود ترکیباتی مانند کامفور، آلفاتیوجن، سینئول، میرسین بورنئول، سیمن نسبت دادند (Nikaido and Vaara, 1985).

بتا کاریوفیلن یکی از سسکوئی ترپن‌ها است که توسط آنزیم بتاکاریوفیلن سنتاز از پیش ماده فارنسیل دی‌فسفات به‌وجود می‌آید. این ترکیب و مشتقات آن دارای خاصیت ضدالتهاب، ضدسرطان، بی‌حس کننده موضعی، بازدارنده زخم‌های مخاط معده، ضد باکتری و آنتی‌آکسیدان می‌باشد، همچنین می‌تواند در سیستم دفاعی گیاه نقش داشته باشد (Lavinia, 2009). لینالول و پنین جزء منوترپن‌ها می‌باشند که توسط آنزیم لینالول‌سنتاز و پنین‌سنتاز از پیش ماده گرانیل دی‌فسفات به‌وجود می‌آیند این دو ترکیب دارای خاصیت آرام‌بخش، ضد میکروب، آنتی اکسیدان، ضدویروس برونشیت و القاکننده آپوپتوز می‌باشد (Lopes, 2008).

با توجه به‌موارد فوق‌الذکر، هدف از این مطالعه بررسی تاثیر عفونت باکتریایی ناشی از سویه استرپتوکوکوس اینیایی بر سیستم ایمنی قزل‌آلای رنگین کمان و استفاده از عصاره گیاه درمنه دشتی در کاهش اثر سوء این عفونت باکتریایی بر سیستم

ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۴۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان کاملاً سالم از نظر ظاهری (۱۵±۱۰۰ گرمی) از یک مزرعه خصوصی خریداری و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. ماهی‌های به‌طور تصادفی در ۱۲ مخزن ۱۰۰۰ لیتری مجهز به هواده با طراحی سیستم نیمه مدار بسته با ۱۰ درصد تعویض آب در روز توزیع و به‌مدت ۱۵ روز نگهداری شدند تا کاملاً به شرایط آزمایشگاهی سازگار شوند. ماهی‌ها در طی این مدت با جیره غذایی تجاری فرادانه تغذیه گردیدند. تیمارها شامل تیمار شاهد، تیمار با با عفونت باکتریایی، تیمار با عصاره عصاره‌ی درمنه دشتی و تیمار با عصاره‌ی درمنه دشتی به علاوه با عفونت باکتریایی هر کدام با سه تکرا بود.

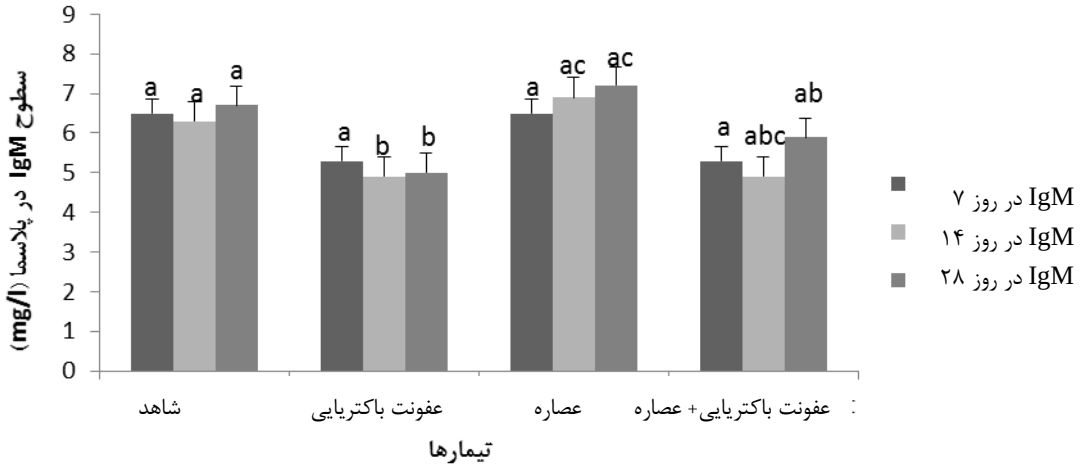
درمنه‌های دشتی از منطقه اردستان و ارتفاعات ۱۶۰۰ تا ۱۷۰۰ متری در دوران اواخر گلدهی جمع-آوری با کد هرباریوم ۸۵۸۲۲ جمع‌آوری شد. جهت تهیه عصاره از برگ‌های گیاه استفاده شد که به‌روش هیدروالکلی توسط دستگاه سوکسله و حلال از طریق تقطیر در خلاء بخار، عصاره تهیه گردید.

استوک خالص باکتری استرپتوکوکوس اینیایی از گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردید که از تلفات ماهیان قزل‌آلای مزارع کشور جداسازی و شناسایی شده بود (Soltani *et al*., 2005). تجدید کشت باکتری برای نگهداری از نمونه‌های خالص‌سازی شده نیز هفته‌ای یک بار انجام گردید. برای تهیه سوسپانسیون باکتری استرپتوکوکوس اینیایی به میزان لازم از پرگنه‌های باکتری روی محیط TSA حاوی ژلوز خون‌دار برداشته و به داخل یک لوله آزمایش محتوی بافر نمکی فسفات (PBS) (۷/۲ گرم Nacl، ۱/۴۸ گرم Na_2HPo_4، ۰/۴۳ گرم KH_2Po_4 در ۱ لیتر آب مقطر) منتقل و توسط شیکر یکنواخت گردید. سپس غلظت باکتری‌ها با محلول مک‌فارلند (Mac Farland Nephelometery Standards) ۱ (۰/۱ میلی‌لیتر $BaCl_2$ یک درصد و ۹/۹ میلی-لیتر H_2So_4 یک درصد) تنظیم گردید تا تعداد ۳×۱۰^۸ سلول در میلی‌لیتر باکتری در سوسپانسیون مورد نظر موجود باشد. محیط کشت اختصاصی باکتری استرپتوکوکوس اینیایی ژلوز خون‌دار (Blood agar) می‌باشد (Soltani *et al*., 2005)؛ که برای تهیه آن مراحل زیر طی شد. ابتدا محیط کشت تریپتیک سویا آگار (TSA) به‌میزان ۴۰ گرم در ۱ لیتر آب مقطر استریل حل شده و در دمای ۱۲۱/۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. پس از اتوکلاو در دمای اتاق قرار گرفته تا سرد شده و دمای آن به ۴۵^oC رسید.

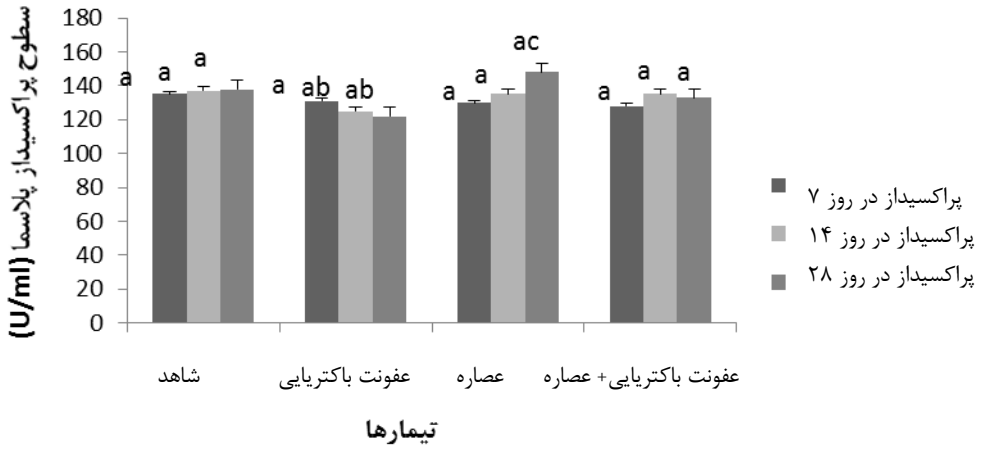
تهیه غذا به‌صورت تازه و به‌طور هفتگی و با افزودن عصاره‌ی درمنه دشتی به نسب ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هرکیلوگرم غذا با پودر غذای تجاری و تهیه مجدد پلت غذایی انجام گردید. پس از شروع آزمایش، به‌طور تصادفی از هر مخزن ۳ ماهی و در مجموع از هر تیمار ۹ ماهی در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۸ صید و پس از بیهوش کردن با عصاره پودر گل میخک (۱:۵۰۰۰) از ساقه دمی آن‌ها با استفاده از سرنگ آغشته به EDTA خون‌گیری گردید. پلاسما پس از سانتریفیوژ نمونه‌های خون در دستگاه سانتریفیوژ با قدرت ۶۰۰۰g دور به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جداسازی و تا زمان انجام آزمایش‌های نهایی در فریز ۷۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

در سنجش سطح فعالیت پراکسیداز پلاسما، ۱۵ میکرولیتر پلاسما با ۳۵ میکرولیتر بافر HBSS عاری از منیزیوم و کلسیم رقیق شد. سپس به آن ۵۰ میکرولیتر محلول (TMB) و ۵ میلی‌مول آب‌اکسیژنه افزوده شد تا محلول به رنگ آبی درآید، سپس پس از گذشته ۲ دقیقه، با افزودن ۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۲ مولار واکنش رنگی متوقف گردید و رنگ محلول به زرد روشن تبدیل شد. در مرحله بعد میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر سنجیده شد و پس از محاسبه با جذب نوری محلول استاندارد نتیجه برحسب واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر بیان گردید.

سنجش کمپلمان تام CH_{50} با استفاده از کیت تهیه شده از شرکت بهار افشان تهران و براساس روش ایمنودیفیوژن شعاعی اندازه‌گیری گردید. سطح فعالیت لیزوزیم نیز با استفاده از روش کدورت سنجی و با استفاده از سوسپانسون *Micrococcus lysodeikticus* و آنزیم مورآمیداز صورت گرفت. میزان کدورت نیز در طول موج ۶۷۰ سنجش می‌شود. سطح ایمنوگلبولین IgM پلاسما نیز با استفاده از کیت سنجش IgM و



شکل ۱ - تغییر سطح ایمنوگلبولین پلاسما در تیمارهای مختلف مورد مطالعه.



شکل ۲ - تغییر سطح پراکسیداز پلاسما در تیمارهای مختلف مورد مطالعه.

اتوآنالیزر هیتاچی سنجش گردید.

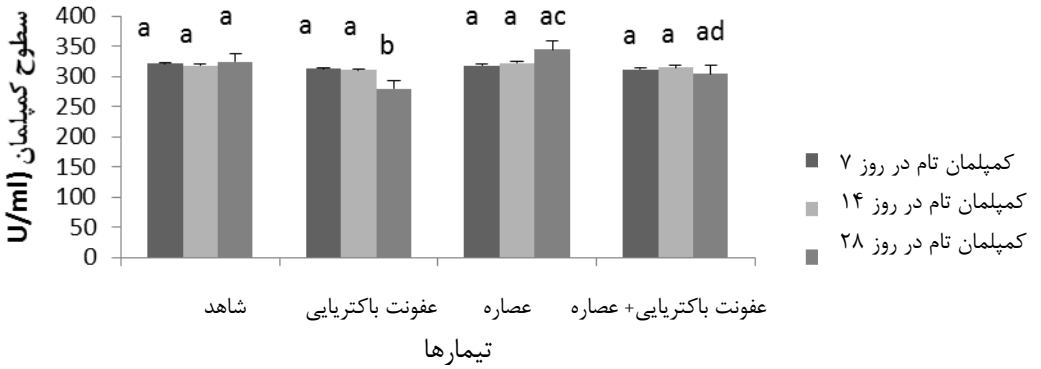
تجزیه و تحلیل آماری: داده‌ها به روش One way- ANOVA تجزیه و تحلیل نموده و با آزمون توکی میانگین نتایج با یکدیگر در سطح اطمینان ($P<۰/۰۵$) مقایسه شدند.

نتایج

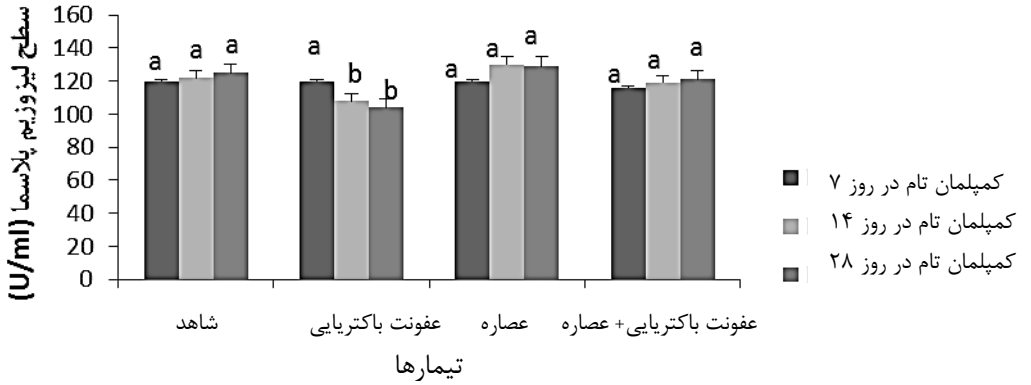
در طی آزمایش تعدادی مرگ و میر در بین ماهی‌های تحت تیمار مشاهده شد و ماهی‌های تحت تیمار عفونت باکتریایی به‌خصوص در پایان دوره علائم عفونت باکتریایی را نشان دادند. حال آن‌که در دیگر تیمارها علائم بیماری مشاهده نگردید.

براساس نتایج سطوح ایمنوگلبولین تیمارها در روزهای ۱۴ و ۲۸ به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<۰/۰۵$). در روز ۷ تغییر معنی‌داری در غلظت IgM ماهی‌های تحت تیمار مشاهده نگردید، اگرچه سطح IgM در پلاسمای ماهی‌های تحت تیمار با عصاره درمنه دشتی در طی دوره آزمایش به‌صورت صعودی بود و افزایش سطح IgM در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۵$). تفاوت سطح IgM در پلاسمای ماهی‌هایی که تحت عفونت باکتریایی بوده و با عصاره درمنه دشتی تغذیه شده‌اند نیز در مقایسه با ماهی‌های گروه شاهد معنی‌دار نبود (شکل ۱).

تفاوت معنی‌داری در سطح پراکسیداز در ماهیان تغذیه شده با عصاره درمنه دشتی و در معرض عفونت باکتریایی در مقایسه با گروه کنترل در طی دوره آزمایشی در تمامی مراحل نمونه‌برداری مشاهده نگردید ($P<۰/۰۵$). بین سطح پراکسیداز ماهی‌های در معرض عفونت باکتریایی و ماهی‌هایی که با عصاره درمنه دشتی تغذیه شده‌اند در سومین مرحله نمونه-برداری تفاوت معنی‌داری یافت ($P<۰/۰۵$) (شکل ۲).



شکل ۳ - تغییر سطح کمپلمان تام پلاسما در تیمارهای مختلف مورد مطالعه.



شکل ۴ - تغییر سطح لیزوزیم پلاسما در تیمارهای مختلف مورد مطالعه.

سطح کمپلمان تام پلاسما در ماهیان در معرض عفونت باکتریایی در روز ۲۸ به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش داشت ($P<۰/۰۵$). در حالی که در دیگر زمان‌های نمونه‌برداری اختلاف معنی‌داری در سطح کمپلمان مشاهده نگردید. افزایش معنی‌دار سطح کمپلمان پلاسما در ماهی-هایی که با عصاره درمنه دشتی تغذیه شده‌اند، در مقایسه با ماهی‌هایی که علاوه بر تغذیه با عصاره در معرض عفونت باکتریایی نیز قرار داشته‌اند و نیز ماهی‌هایی که بدون دریافت هیچ گونه مکملی در معرض عفونت باکتریایی بوده‌اند نیز قابل ملاحظه بود ($P<۰/۰۵$) (شکل ۳).

میزان سطح لیزوزیم در روز ۲۸ام ماهیان در معرض عفونت باکتریایی در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) نشان داد. در سایر تیمارها در طی روزهای مختلف نمونه‌برداری هیچ اختلاف معنی‌داری در سطح لیزوزیم پلاسما مشاهده نگردید ($P<۰/۰۵$) (شکل ۴).

بحث

مطالعات متعددی در مورد اثرات درمانی عصاره گیاه درمنه دشتی صورت گرفته است. عصاره‌ی درمنه دشتی به‌عنوان ضدعفونی کننده، ضد انگل آسکاریس، تب‌بر، مسکن دردهای احشایی و در گذشته به‌عنوان تسکین دردهای عصبی و تسهیل کننده انقباضات رحم در هنگام زایمان استفاده شده است (Lavinia *et al.*, 2009). آرتمیزین یک سزکویی ترپن لاکتون است که از گیاه درمنه سیبری به‌دست می‌آید. آرتمیزن در ساختمان شیمیایی خود دارای یک گروه اندوپراکسید تری‌اکسان است که فعالیت بیولوژیک از جمه فعالیت ضدمالاریایی دارد (Khalaji *et al.*, 2011). در پزشکی سنتی ایران، از دم کرده این گیاه برای درمان نارسایی کبد، گلودرد، عفونت گوش، اشتهاآور، ضد انگل اسکاریس، درمان نفخ و ضد التهاب استفاده می‌شود (Cook and Samman, 1999; Dafwang *et al.*, 1985).

اسانس‌ها نقش شاخص و عملکردی مهمی در تغییر و اصلاح میکروفلور روده‌ای موضعی شدن

باکتری‌های پاتوژن ایفا می‌کنند (Eihabbak *et al*., 1989; Fararh *et al*., 2004). به‌نظر می‌رسد بیشترین خاصیت ضدمیکروبی در کلیه موارد از ترکیب‌های مونوترپنی ناشی می‌شود. ثابت شده است که ترکیب اصلی گیاه درمنه یک مونوترپن به نام تیوجن می‌باشد، مصرف این گیاه موجب افزایش ترشح اسید معده و تولید صفرا می‌شود که در دسترسی بهتر به مواد مغذی و تکوین سیستم ایمنی و حجم آنتی‌بادی تولیدی تأثیرگذار است (Lopes *et al*., 2008; Mahboubp and Farzin, 2009; Mitsch *et al*., 2004). پراکسیدازها آنزیم‌های واجد هم می‌باشند که در اکسیداسیون انواع بسیاری از گزنوبیوتیک‌ها توسط پراکسید هیدروژن نقش ایفا می‌نمایند (Ouweh *et al*., 2010). براساس نتایج این تحقیق، افزایش سطح فعالیت پراکسیدازها در پلاسمای ماهی‌هایی که از عصاره‌ی درمنه دشتی تغذیه نمودند، نشان دهنده افزایش توان سیستم آنزیمی آنتی‌اکسیدانی ماهی است. حال آن‌که کاهش سطح این آنزیم در ماهی‌هایی که در مواجه با عفونت باکتریایی بوده‌اند نشان از برهم خوردن تعادل بین سیستم دفاعی بدن است که این امر سبب بروز آسیب‌های جدی به بخش‌های مختلف بدن از جمله سیستم ایمنی ماهی‌ها می‌گردد.

ایمنوگلبولین‌ها یا آنتی‌بادی‌ها دسته‌ای از گلیکوپروتئین‌ها می‌باشند که در سرم و مایعات بافتی تمام مهره‌داران یافت می‌شود. آنتی‌بادی‌ها توسط پلاسموسیت‌ها تولید می‌شود و پلاسموسیت‌ها نیز از لنفوسیت‌های B مشتق می‌شوند (Royo *et al*., 1999). ایمنوگلبولین‌ها نقش مهمی در مقابله با بیماری‌های عفونی باکتریایی ایفا می‌کند. بنابراین کاهش سطح فعالیت آن‌ها می‌توان منجر به تضعیف سیستم ایمنی ماهی‌ها گردد. براساس نتایج این تحقیق، کاهش معنی‌دار سطح ایمنوگلبولین در ماهی‌های مواجه شده با عفونت باکتریایی در مقایسه با نمونه‌های گروه شاهد و ماهیانی که با عصاره‌ی درمنه دشتی تغذیه شده‌اند، نشان دهنده تاثیر باکتری در کاهش سطح ایمنوگلبولین پلاسما در این ماهیان است. عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین ماهیانی که با عصاره‌ی درمنه دشتی تغذیه شده‌اند و در مواجه با عفونت باکتریایی نیز قرار داشتند نیز حاکی از تاثیر عصاره‌ی درمنه دشتی در کاهش عوارض ناشی از عفونت باکتریایی بر سیستم ایمنی این ماهی‌ها است.

کمپلمان‌ها در واقع پروتئین‌های فاز حاد سیستم ایمنی محسوب می‌شوند و غلظت آن‌ها معمولاً پس از نکروز سلولی و مرگ بافتی تغییر می‌کند. به عبارتی، تغییر سطح کمپلمان‌ها به‌عنوان یک پاسخ فاز حاد سیستم ایمنی نوعی واکنش سیستمیک تعمیم یافته محسوب می‌شود که می‌توان آن را به التهاب و پاسخ ایمنی ذاتی مربوط دانست (Takahashi *et al*., 2000). کاهش سطح کمپلمان تام پلاسما می‌تواند ماهیان را نسبت به ابتلا به عفونت‌های باکتریایی مستعد نماید. با توجه به نتایج، کاهش سطح کمپلمان تام پلاسما در ماهی‌های در معرض عفونت باکتریایی می‌تواند نشان دهنده تاثیر آن در تضعیف سیستم ایمنی ماهی‌ها باشد. حال آنکه عصاره‌ی درمنه دشتی با پیشگیری از مرگ سلولی و افزایش توان ترمیمی بافت‌ها می‌تواند سیستم ایمنی ماهی‌ها تقویت نماید.

لیزوزیم توسط گلبول‌های سفید منتشر در بافت‌های مختلف و گردش خون ترشح می‌شود در ترشحات موکوسی، آبشش‌ها، بافت‌های کلیه، طحال و دستگاه گوارش و سرم خون ماهیان یافت می‌شود و قادر به شکستن پیوندهای گلیکوزیدی لایه پپتیدوگلیکان موجود در دیواره‌ی سلولی باکتری‌های گرم مثبت است (Dong *et al*., 2007; Engberg *et al*., 2000). کاهش سطح لیزوزیم در ماهی‌هایی که در مواجه با عفونت باکتریایی قرار داشتند، تضعیف سیستم ایمنی را نشان می‌دهد. براساس نتایج این تحقیق، عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین سطح لیزوزیم در ماهی‌های گروه کنترل و ماهی‌هایی که با عصاره‌ی درمنه دشتی تغذیه شده‌اند نیز حاکی از تاثیر این عصاره‌ی در تقویت سیستم ایمنی است.

با توجه به نتایج می‌توان چنین استدلال کرد که ترکیبات موجود در عصاره‌ی درمنه دشتی به‌ویژه ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، می‌تواند با تقویت سیستم ایمنی از اثرات سوء باکتری‌ها بر سیستم ایمنی ماهی‌ها پیشگیری نماید. در واقع، آنتی‌اکسیدان‌ها از غشای سلول‌های فاگوسیتوز کننده محافظت می‌نمایند (Greathead, 2003; Haq *et al*., 1999). علاوه براین سایر ترکیبات موجود در عصاره گیاهان

دارویی می‌تواند موجب تقویت سیستم ایمنی گردد (Goel *et al*., 2002)، از سویی دیگر، از بروز بسیاری از بیماری‌های ناشی از خود سرکوبی سیستم ایمنی نیز جلوگیری نماید (Takahashi *et al*., 2000).

عصاره‌ی درمنه دشتی به‌عنوان یک عصاره دارویی موجب افزایش توان سیستم ایمنی می‌شود. بنابراین استفاده از مکمل گیاهی عصاره‌ی درمنه دشتی در جیره غذایی ماهی‌ها می‌تواند با افزایش توان سیستم ایمنی سبب تقویت آن شود و راه‌کار مناسبی برای پیشگیری اثرات سوء احتمالی ناشی از تضعیف سیستم ایمنی ماهی‌ها در نتیجه عوامل بیماری‌زا در مزارع پرورشی و تاثیر آن بر سیستم ایمنی ماهی‌ها باشد.

تشکر و قدردانی

از تمام همکاران محترمی که در انجام این تحقیق همکاری نموده‌اند تشکر می‌گردد.

منابع

Akhlaghi M., Keshavarz M. 2002. The occurrence of Streptococcus in trout breeding farms of Fars province. *Journal of Iranian Veterinary Research* 3(2), 189-183.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446-75.

Bauer R. 1996. Echinacea drugs, effects and active ingredients. *Zeitschrift für ärztliche Fortbildung* 90, 111-115.

Caspary W.F. 1992. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition* 55, 299-308.

Cook N.C., Samman S. 1999. Flavonoids-chemistry metabolism, cardio perfective effects and dietary sources. The *Journal of Nutritional Biochemistry7*, 66-76.

Dafwang I.I., Cook M.E., Sunde M.L., Bird H.R. 1985. Bursal, intestinal and spleen weights and antibody response of chicks fed subtherapuetic levels of dietary antibiotics. *Poultry Science* 64, 634-639.

Dong X.F., Gao W.W., Tong J.M., Lia H.Q., Sa R.N., Zhang Q. 2007. Effect of polysavone (AlfaAlfa extract) on abdominal fat deposition and immunity in broiler chickens. *Poultry Science* 86, 1955-1959.

El-Habbak M.M.E., Saleh K., Arbid M.S., Hagazi A.G., Sofy H. 1989. Influence of Garlic (*Allium sativum* L.) on some biological and biochemical changes in Japanese quails with special refrence to its hypocholestrolemic activity. *Archive fur Geflugclkunde* 53, 73-79.

Engberg R.M., Hedemann M.S., Jensen B.B., Lesser T.D. 2000. Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and perfor- mance of broilers. *Poultry Science* 79, 1311-1319.

Fararh K.M., Atoji Y., Shimizu Y., Shiina T., Nikami H., Takewaki T. 2004. Mechanisms of the hypoglycaemic and immunopotentiating ef- fects of Nigella sativa L. oil in streptozotocin induced diabetic hamsters. *Research in Veterinary Science* 77, 123-9.

Gee J.M., Lee-Finglas W., Wortley G.W., Johnson J.T. 1996. Fermentable carbohydrate ele- vate plasma entroglucagon but high viscosity is also necessary to stimulate small bowell mucosal cell proliferation in rats. *Journal of Nutrition* 105, 827-838.

Goel V., Chang C., Slama J.V., Barton R., Bauer R., Gahler R., Basu T.K. 2002. Alkylimides of *Echinacea purpurea* stimulate alveolar macrophage function in normal rats. *International Immunopharmacology* 2, 381-387.

Goudarzi M., Rahbari S., Hadadzadeh H., Yeganeh Parsat M., Shafiyi A., Pourmaydani A. 2005. Study the effect of leaf and extract of Artemisia annua on coccidiosis in broiler chickens. *Journal of Veterinary Research (University of Tehran)* 61, 339-344.

Greathead H. 2003. Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proceedings of the Nutrition Society* 62, 279-290.

Haq A.U., Meraj K.A., Rasool S. 1999. Ef-fect of supplementing *Allium sativum* (Garlic) and *Azadirachta indica* (Neem) leaves in broiler feeds on their blood cholesterol, triglycerides and antibody titre. *International Journal of Agriculture and Biology* 1, 125-127.

Hashemi S.R., Zulkifli I., Davoodi H., Zunita Z., Ebrahimi M. 2012. Growth performance, intestinal microflora, plasma fatty acid profile in broiler chickens fed herbal plant (*Euphorbia hirta*) and mix of acidifiers. *Animal Feed Science and Technology* 178, 167-174.

Iji P.A., Saki A.A., Tivey D.R. 2001. Intestinal development and body growth of broiler chicks on diets supplemented with non-starch polysaccharides. *Animal Feed Science and Technology* 89, 175-188.

Khalaji S., Zaghari M., Hatami K.H., Lotfi L., Nazarian H. 2011. Black Cumin seeds, *Artemisia* leaves (*Artemisia sieberi*), and *Camellia* L. plant extract as phytogenic products in broiler di- ets and their effects on performance, blood constituents, immunity and cecal microbial population. *Poultry Science* 90, 2500-2510.

Lavinia S., Dumitrescu G., Drinceanu D., Stef D. 2009. The effect of medicinal plants and plant extracted oils on broiler duodenum mor- phology and immunological profile of broiler. *Romanian Biotechnological Letters* 9, 1906-1914.

Lee K.W., Everts H., Beyen A.C. 2003. Di- etary carvacrol lowers body gain but improves feed conversion in female broiler chickens. *The Journal of Applied Poultry Research* 12, 394-399.

Lopes-Lutz D., Alviano D.S., Alviano C.S., Kolodziejczyk P.P. 2008. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. *Phytochemistry* 69: 1732-1738.

Lis-Balchin M., Deans S.G., Eaglesham E. 1998. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 13, 98-104.

Mahboubi M., Farzin N. 2009. Antimicrobial activity of Artemisia sieberi essential oil from central Iran. *Iranian Journal of Microbiology* 1, 43-48.

Mitsch P., Zitter-Eglseer K., Kohler B., Gabler C., Losa R., Zimpernik I. 2004. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of Clostridium perfingens in the intestines of broiler chickens. *The Journal of Poultry Science* 83, 669-675.

Nafisi Behabaadi M. 2006. A Practical Guide to Oncorhynchus mykiss Reproduction. Hormozgan University Press. 282 p.

Nie W., Zhang Y.X. 1999. Progress of the immunomodulating effect of polysaccharides and their mechanism. *Chinese Pharmacological Bulletin* 15, 3-5.

Nikaido H., Vaara M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological Reviews* 49, 1-23.

Ouweh A.C., Tiihonen K., Kettunen H., Peuranen S., Schulze H., Rautonen N. 2010. In vitro effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. *Veterinary Medicine* 55, 71-78.

Royo P., Martin-Casabona N., Martinez E., Andonegui M. 1999. In vitro susceptibility of Mycobacterium Kansasii to the difluorinated quinolone of spoufloxacin using a broth microdilution and macrodilution MIC system. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 3, 349-53.

Takahashi K., Mashiko T., Akiba Y. 2000. Effects of dietary concentration of xylitol on growth in male broiler chicks during immuno- logical stress. *Poultry Science* 79, 743-747.

Toghyani M., Tohidi M., Gheisari A.A., Tabeidian S.A. 2010. Performance, immunity, se- rum biochemical and hematological parameters in broiler chicks fed dietary thyme as alternative for an antibiotic growth promoter. *African Journal of Biotechnology* 9, 6819-6825.

Tiihonen K., Kettunen H., Bento M.H.L., Saarinen M., Lahtinen S., Ouwehand A.C., Schulze H., Rautonena N. 2010. The effect of feeding essential oils on broiler performance and gut microbiota. *British Poultry Science* 51, 381-392.

Viveros A., Chamorro S., Pizarro M., Arija I., Centeno C., Brenes A. 2011. Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal mi- croflora and gut morphology in broiler chicks. *Poultary Sciences* 90(3), 566-78.

Effect of *Artemisia sieberi* Besser extract on the humoral immunity of *Oncorhynchus mykiss* exposed to *Streptococcus iniaie*

Mina Rabie

Department of Natural Resources, Payame Noor University, Tehran. Iran.
*Corresponding author: minarabie@pnu.ac.ir

Received: 2018/12/2 Accepted: 2019/10/6

Abstract

Bacterial infections are one of the most important threats in the aquaculture. One of the most prevalent infectious diseases in rainbow trout farms in recent years is Streptococcus in many countries. In recent years, the aromatic plants and their extracts have attracted a lot of attention. This study aimed to evaluate the effect of bacterial infection caused by strain of *Streptococcus iniaie* on the immune system of fish and the use of the extract of *Artemisia sieberi* to reduce the devastative effect of this bacterial infection on the immune system of *Oncorhynchus mykiss*. Reducing levels of the plasma peroxidase, IgM, total complement, lysozyme in fish exposed to bacteria showed the toxic effects of this bacteria on the immune system of fish. However, there was no significant change in the fish fed the extract of *Artemisia sieberi* and exposed to bacterial infection ($P<0.05$) compared to control group. This suggests the reinforcement and protective effect of the extract of *Artemisia sieberi* on the immune system of *O. mykiss*.

Keywords: *Artemisia sieberi*, *Streptococcus iniaie*, *Oncorhynchus mykiss*, Humoral Immunity.