اثر عصاره سرخار گل (*Echinacea purpurea*) بر برخی شاخص های ایمنی و بازماندگی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در برابر با استرپتوکوک اینیایی (*Streptococcus iniae*)

رضا پورغلام[۱]*؛ مصطفی شریف روحانی[۲]؛ رضا صفری[۳]؛ علی اصغر سعیدی[٤]؛ محمد بینایی[٥]؛راحله نجفیان[٦]؛ زهرا بانکه ساز[۷]؛ محمد جواد تقوی[۸] و ابوالفضل سپهداری[۹]

r_pourgholam@yahoo.com

۱، ۳، ٤، ٥، ٦، ۷ و ۸- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری صندوق پستی:۹٦۱

۲ و ۹- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی ایران، تهران صندوق پستی:۱۳۱۸٦-۱۱٦

تاریخ دریافت:اسفند ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش:آذر ۱۳۹۲

چکیده

در این تحقیق از عصاره گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea*) به منظور ارزیابی برخی از شاخص‌های ایمنی شناسی و خونشناسی در بچه ماهیان قزل‌آلا (باوزن متوسط ۱۶گرم و در دمای ۲۰-۱۴ درجه سانتیگراد) و مقاومت آنها در برابر استرپتوکوکوس اینیایی (*Streptococcus iniae*) استفاده گردید. سه غلظت از عصاره سرخارگل (۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم بر کیلوگرم غذا) به جیره غذایی ماهیان مذکور اضافه شد و با گروه کنترل (جیره فاقد سرخارگل) به مدت ۶۰ روز مورد ارزیابی قرار گرفت. شاخص‌های مورد بررسی شامل تغییرات اجزا کمپلمان (C_3، C_4)، رادیکال آزاد اکسیژن، لیزوزیم، تعداد گلبولهای سفید، درصد لنفوسیت، مونوسیت و نوتروفیل بوده و در انتهای کار نیز آلوده کردن با باکتری استرپتوکوکوس اینیایی انجام و درصد بقاء و ماندگاری ماهیان مورد آزمایش، ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که مقادیر C_3، لیزوزیم، رادیکال آزاد اکسیژن، تعداد کل گلبولهای سفید و درصد نوتروفیل پس از ۶۰ روز افزایش معنی‌داری در تیمارهای حاوی سرخارگل نسبت به گروه کنترل داشته ($P<0/05$) و غلظتهای بالاتر (۱/۵ گرم) آن نیز نتایج بهتری داشت. روند افزایشی C_4 و مونوسیت چشمگیر نبوده و در واقع دارای اختلاف معنی‌دار نبوده اند. آلوده کردن ماهیان مورد آزمایش با باکتری فوق الذکر، مشخص شد که ماهیان دریافت کننده عصاره سرخارگل (۱/۵ گرم) دارای ماندگاری ۹۱/۱۱ درصد بوده، در صورتی که در گروه کنترل این میزان ۴۴/۴۴ درصد بوده است. نتیجه‌گیری کلی آنکه گیاه مورد استفاده دارای اثرات تقویت کننده بر سیستم ایمنی ذاتی بوده و غلظت‌های بالاتر آن (۱/۵ گرم) نتایج بهتری به همراه دارد. ضمنا می‌توان ادعا نمود استفاده از عصاره سرخارگل (۱/۵ گرم بر کیلوگرم غذا) باعث افزایش مقاومت بچه ماهیان قزل‌آلا در برابر استرپتوکوکوزیس شده و می‌توان از آن به عنوان محرک ایمنی در جیره غذایی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: سرخارگل، ماهی قزل آلا، استرپتوکوکوس اینیایی، سیستم ایمنی

*نویسنده مسئول

مقدمه

استرپتو کوکوزیس تاکنون از کشورهای مختلف گزارش شده است (Evans *et al*., 2000; Agnew & Barner,2007; Elder, 1999; Austin & Austin, 2007). در ایران نیز این بیماری در ماهیان قزل آلای رنگین کمان در استانهای مختلف از جمله در استان مازندران (Ghiasi *et al*., 2000)، در استان فارس (اخلاقی و همکاران، ۱۳۸۱) در استانهای گیلان، مازندران، تهران، کهگیلویه و بویر احمد، چهار محال بختیاری، فارس، کرمانشاه و آذربایجان غربی (پورغلام و همکاران ۲۰۱۰ و ۲۰۱۱) و ماهی هامور در استان خوزستان (مظلومی، ۱۳۸۲) گزارش شده است. استرپتوکوکوزیس در بسیاری از گونه های ماهیان دریایی (Colorni *et al*., 2002; Elder, 1999) و ماهیان آب شیرین (Floyd *et al*., 2002)، در ماهیان پرورشی و ماهیان وحشی (Baya *et al*., 1990; Colorni *et al*., 2002) نیزگزارش شده است.

عفونتهای استرپتوکوکی می‌تواند سبب مرگ و میر بالایی (بیش از ۵۰ درصد) طی یک دوره ۳ تا ۷ روزه (Floyd *et al*., 2002) و گاه حتی بیش از ۷۵ درصد شود (Elder،1999).

یکی از راههای مناسب پیشگیری از بروز بیماریها، استفاده از محرک‌های سیستم ایمنی می‌باشد. از آنجایی که برخی از گیاهان دارویی دارای خواص مفید از جمله تحریک و تقویت سیستم ایمنی هستند به همین علت استفاده از آنها در مزارع پرورش ماهی سبب افزایش تولید می‌گردد (Ghasemi Pirbalouti *et al*., 2011).

سرخارگل گیاهی علفی، چند ساله و با ارتفاع ۱۵۰-۶۰ سانتیمتر می‌باشد. این گیاه فعالیت سیستم ایمنی غیراختصاصی را در برابر بیماریهای باکتریایی و ویروسی تقویت می کند (Melchart *et al*., 1998; Galina *et al*., 2009; Dahui *et al*., 2011). سرخارگل با افزایش تولید آنتی بادی، ایمنی هومورال را تقویت و با تحریک ماکرو فاژها و افزایش تولید سیتوکین ها و نیز افزایش تکثیر لنفوسیتهای T ایمنی سلولی را تقویت می کند (Stimpel, *et al*., 1984). برخی از ترکیبات موثره عصاره سرخارگل عبارتند از: آلکامیدهای لیپوفیلیک، B - caryophyllene ,Germacrene-D 1,8-Pentadecadiene و Propylparaben (Morrazoni *et al*., 2005; Dahui *et al*., 2011; Xu *et al*., 2008). این مطالعه با هدف ارزیابی تاثیر عصاره گیاه سرخارگل بر سیستم ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان و مقاومت آن در برابر استرپتوکوکوزیس انجام شده است.

مواد و روش کار

۲۴۰عدد ماهی قزل‌آلا (*Oncorhynchus mykiss*)با میانگین وزنی ۱۶ گرم و در دمای ۲۰-۱۴ درجه سانتی گراد، مجموعا در ۴ تیمار و هر تیمار ۳ تکرار (در ۱۲ حوضچه فایبرگلاس) مورد بررسی قرار گرفتند.

به پودر آسیاب شده گیاه سرخارگل مقداری الکل ۷۵ درصد اضافه و سپس در دکانتور ریخته شد. مدت نگهداری در دکانتور ۲ تا ۳ روز بود. سپس با باز کردن شیر دکانتور عمل فیلتراسیون انجام و با افزودن الکل ۷۵ درصد به دکانتور عمل فیلتراسیون ادامه یافت تا استخراج بطور کامل انجام گیرد. عصاره نهایی در حمام بخار قرار داده شد تا فرآیند تغلیظ بتدریج صورت گرفته و حجم به ۱/۳ حجم اولیه برسد. در نهایت عصاره بدست آمده در شرایط خلا و انجماد خشک شد (Morrazoni *et al*., 2005).

عصاره گیاه با سه غلظت ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم در کیلوگرم به غذای ماهی اضافه گردید. پس از اضافه نمودن عصاره ها، به مخلوط حاصله مقداری روغن گیاهی اضافه و کاملا مخلوط گردید. طول دوره آزمایش ۶۰ روز بود و از هر تیمار، ۹ عدد ماهی برای آزمایشهای مربوط به شاخصهای ایمنی شناسی و خون شناسی در ماههای اول و دوم مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی این عوامل با استفاده از کیت تجاری و دستگاه اتوآنالایزر براساس روش Shahsavani *et al*., 2010 و Johonson *et al*., 1999 انجام گردید.

اندازه گیری لیزوزیم سرم از طریق جذب نوری و با استفاده از دستگاه بیوفتومتر و با روش Ellis (۱۹۹۰) انجام گردید.

برای سنجش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و ارزیابی انفجار تنفسی از دستگاه Luminoscan Ascent (Thermo, Finland) و با استفاده از روش (Mathews, 1990) اقدام شد.

شمارش کلی و افتراقی گلبول های سفید به روش طبرستانی (۱۳۹۰) انجام شد . به منظور بررسی رویارویی (Challenge) با باکتریهای جدا شده از بافت کلیه ماهیان مشکوک به استرپتوکوکوزیس، با روش کشت میکروبی و تستهای بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفتند

(Buller, 2004; Austin & Austin, 2007). سپس در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر با استفاده از واکنش PCR و پرایمرهای اختصاصی طراحی شده از ژن 16srRNA، تائید تشخیص نهایی صورت گرفت . پس از تهیه رقت ۰/۱ از لگاریتم ۶ باکتری استرپتوکوکوس اینیایی، مقدار ۰/۱ میلی لیتر به صورت داخل صفاقی به ۴۵ عدد از ماهیان هر تیمار پس از دو ماه، تزریق شد. ماهیان مذکور حداکثر به مدت ۱۴ روز تحت نظر قرار گرفتند (Rodas *et al*., 2002). پس از بروز علائم بیماری، از ارگانهای مختلف نظیر کبد، کلیه و قلب نمونه گیری و کشت در محیطهای اختصاصی (نظیر Blood agar و Hipporate broth) با استفاده از روش Austin وAustin (۲۰۰۷) نیز انجام و وجود یا عدم وجود کلنی های مشکوک به استرپتوکوکوس اینیایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه ANOVA جهت تعیین ارتباط معنی دار بین داده های هر گروه و از آزمون Duncan جهت تائید نهایی تست آنالیز واریانس استفاده گردید. وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار با ضریب اطمینان ۹۵ درصد و ارزش P در محدوده ۰/۰۵ تعیین گردید.

جدول ۱: نتایج تغییرات برخی از شاخصهای ایمنی شناسی در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی غلظتهای مختلف عصاره سرخارگل در ماههای اول و دوم

	غلظت عصاره (گرم بر کیلوگرم غذا)	گلبول های سفید ($x10^3$) (mean± SD)	نوتروفیل (درصد) (mean± SD)	مونوسیت (درصد) (mean± SD)	لنفوسیت (درصد) (mean± SD)
ماه اول	۰/۵	۱۰/۵±۰/۳۵	۲/۲۲±۰/۹۷	۱/۵۶±۰/۱۲	۹۶/۲۲±۲/۱۱
	۱	۱۰/۸±۰/۷۶	۲/۳۵±۰/۷۸	۱/۷۱±۰/۱۳	۹۵/۹٤±۲/۸٦
	۱/۵	۱۰/۵±۰/۸۳	۳/۲۱±۰/۷	۱/۷۷±۰/۱۷	۹۵/۰۲±۲/۳۳
	کنترل	۹/۷±۰/۷۳	۱/٤٤±۰/۵۳	۰/٦۷±۰/۱۵	۹۷/۸۹±۱/۰۵
ماه دوم	۰/۵	۱٤/۷±۰/٦۵	۵/٤۳±۱/۱٦	۱/۷۷±۰/۱٤	۹۲/۸۰±۳/٤
	۱	۱۵/۳±۰/٦۵	٦/۳۳±۱/۲۷	۱/۸۸±۰/۱۲	۹۱/۷۹±٤/۹٦
	۱/۵	۱٦/۷±۰/۸۷	۸/۱۱±۱/۸۳	۱/۹۱±۰/۱۸	۸۹/۹۸±۲/۱٦
	کنترل	۱۳/۲±۰/۸۸	۲/۱۱±۰/۳۲	۱/۱۱±۰/۱۲	۹٦/۷۸±۲/۰٦

نتایج

نتایج آزمایشات ایمنی شناسی (C3و C4، رادیکال اکسیژن آزاد و لیزوزیم) در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی غلظتهای مختلف عصاره سرخارگل در ماههای اول و دوم در جدول ۱ نشان داده شده است.

همانگونه که در جدول ۱ مشاهده می شود غلظت جزء C3 کمپلمان در ماه اول بین ۲۹/۶ تا ۳۵/۲۱ میلی گرم بر دسی لیتر در نوسان بوده که این میزان در ماه دوم بین ۳۲/۵ تا ۳۶/۵۷ متغیر بود. بیشترین میزان C3 در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی عصاره سرخارگل با غلظت ۱/۵ گرم بر کیلوگرم مشاهده شد. نتایج آنالیز آماری حاکی از عدم اختلاف معنی دار بین تغییرات مشاهده شده در ماه اول و دوم و نیز بین غلظت های مختلف مورد استفاده بوده است. اما افزایش میزان C3 در جیره حاوی عصاره سرخارگل در مقایسه با گروه کنترل، معنی دار بوده است (P<۰/۰۵).

مقدار جزء C4 کمپلمان در ماه اول بین ۸/۰۴ تا ۸/۲۱ و در ماه دوم بین ۸/۲۹ تا ۸/۷۶ میلی گرم بر دسی لیتر متغیر بوده است. بیشترین میزان C4 در غلظت ۱/۵ گرم بر کیلوگرم جیره مشاهده شد. نتایج حاکی از عدم اختلاف معنی دار بین تغییرات مشاهده شده در ماه اول و دوم و همچنین بین غلظت های مختلف مورد استفاده بوده است. میزان جزء C4 در عصاره حاوی سرخارگل اندکی بیشتر از نمونه کنترل بوده ولی با این وجود اختلاف معنی دار نبوده است (P>۰/۰۵).

نتایج جدول ۱ نشان می دهد که میزان رادیکال آزاد اکسیژن در ماه اول بین ۵۸۶/۳۶ تا ۵۹۷/۴۳ و در ماه دوم بین ۱۱۰۰/۳۸ تا ۱۳۱۵/۲۶ نانومول بر میلی لیتر متغیر بوده است. بیشترین میزان رادیکال آزاد در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی عصاره سرخارگل با غلظت ۱/۵ گرم بر کیلوگرم مشاهده شد. نتایج آنالیز آماری حاکی از اختلاف معنی دار بین تغییرات مشاهده شده در ماه اول و دوم و همچنین بین غلظت های مختلف مورد استفاده بوده است (P<۰/۰۵). ضمنا نتایج تغییرات در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی عصاره سرخارگل به مراتب بیشتر از گروه کنترل بوده و اختلاف حاصله نیز معنی دار بوده است (P<۰/۰۵).

مقدار لیزوزیم در ماه اول بین ۴/۳۶ تا ۴/۸۶ و در ماه دوم بین ۵/۲۴ تا ۵/۶۷ میلی گرم بر میلی لیتر متغیر بوده است بیشترین میزان لیزوزیم در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی عصاره سرخارگل با غلظت ۱/۵ گرم بر کیلوگرم مشاهده شد. نتایج آنالیز آماری حاکی از عدم اختلاف معنی دار بین تغییرات مشاهده شده در ماه اول و دوم و همچنین بین غلظت های مختلف مورد استفاده بوده است. اما نتایج تغییرات لیزوزیم در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی عصاره سرخارگل بیشتر از گروه کنترل بوده و تغییرات حاصله نیز معنی دار بوده است (P<۰/۰۵).

با توجه به استفاده از آزمون دانکن نمونه هایی که تفاوت معنی دار در هر گروه یا دوز داشته اند در بالای هر عدد در جدول بصورت حروف a،b و... باید نشان داده شود. اینگونه کار برای خواننده راحتتر و مطلب بهتر فهمیده می شود که این موضوع چه در جداول خصوصیات سرمی و چه شاخص خونی مشاهده نشده است.

نتایج آزمایشهای خونشناسی (تعداد گلبولهای سفید و درصد نوتروفیل، مونوسیت و لنفوسیت) در جیره غذایی حاوی عصاره سرخارگل که در ماه اول و دوم مورد بررسی قرار گرفت در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲: نتایج تغییرات برخی از شاخصهای خون شناسی ماهی قزل‌آلا تغذیه شده با جیره حاوی عصاره سرخارگل در ماه اول و دوم

	غلظت عصاره (گرم بر کیلوگرم غذا)	C3 (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	C4 (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	رادیکال آزاداکسیژن ($RLUs^{-1}$)	لیزوزیم (میلی‌گرم بر دسی لیتر)
ماه اول	۰/۵	۲۹/۶±۶/۵۲	۸/۰۴±۲/۴۷	۵۸۶/۳۶±۶۵/۲۵	۴/۳۶±۰/۳۶
	۱	۳۳/۳۳±۵/۲۳	۸/۱۱±۲/۷۵	۵۸۵/۱۹±۵۶/۸۵	۴/۴۶±۰/۴۴
	۱/۵	۳۵/۲۱±۴/۶۳	۸/۲۱±۲/۶۱	۵۹۷/۴۳±۴۵/۱۱	۴/۸۶±۰/۳۴
	کنترل	۲۵/۵۳±۷/۲۱	۸/۴۹±۳/۸۵	۴۵۳/۵۹±۶۱/۳۲	۲/۳۲±۰/۶۷
ماه دوم	۰/۵	۳۲/۵±۷/۱۱	۸/۲۹±۳/۵	۱۱۰۰/۳۸±۱۲۱/۲۵	۵/۲۴±۰/۴۴
	۱	۳۴/۴۳±۶/۱۱	۸/۵۶±۲/۴۱	۱۲۱۳/۵۳±۱۵۶/۳۵	۵/۳۹±۰/۶۵
	۱/۵	۳۶/۵۷±۵/۶۴	۸/۷۶±۲/۳۶	۱۳۱۵/۲۶±۲۱۴/۲	۵/۶۷±۰/۴۷
	کنترل	۲۱/۲۵±۶/۲۵	۶/۳±۲/۶۲	۴۸۶/۲۳±۵۶/۳۲	۲/۴۲±۰/۵۶

نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد که تعداد کل گلبولهای سفید در ماه اول بین ۱۰۵۰۰ – ۱۰۸۰۰ عدد و در ماه دوم روندی افزایشی داشته و بین ۱۴۷۰۰-۱۶۷۰۰ عدد بوده است. بیشترین تعداد گلبولهای سفید در ماهیان تغذیه شده با غلظت ۱ و ۱/۵ گرم بر کیلوگرم جیره حاوی عصاره سرخارگل در ماه دوم مشاهده شد که در مقایسه با گروه کنترل اختلاف آن معنی دار بوده است ($P<0/05$).

درصد نوتروفیل ها در روز ۳۰ بین ۲/۲۲ تا ۳/۲۱ درصد بوده که این میزان در روز ۶۰ بین ۵/۴۳ تا ۸/۱۱ درصد بوده است. بیشترین درصد نوتروفیل در ماهیان تغذیه شده با غلظت ۱/۵ گرم بر کیلوگرم جیره مشاهده شد. نتایج آنالیز آماری حاکی از اختلاف معنی دار بین تغییرات مشاهده شده در روزهای ۳۰ و ۶۰ بوده ($P<0/05$). ولی با این وجود اختلاف معنی دار بین غلظت های مورد استفاده وجود نداشته است. نتایج آنالیز آماری حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین درصد نوتروفیلها در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی عصاره سرخارگل با گروه کنترل بوده است ($P<0/05$).

درصد مونوسیت ها در روز ۳۰ بین ۱/۵۶ تا ۱/۷۷ و در روز ۶۰ بین ۱/۷۷ تا ۱/۹۱ بوده است. بیشترین درصد مونوسیت در ماهیان تغذیه شده با غلظت ۱/۵ گرم بر کیلوگرم جیره مشاهده شد. نتایج آنالیز آماری حاکی از عدم اختلاف معنی دار بین تغییرات مشاهده شده در زمانهای ۳۰ و ۶۰ روز، غلظت های مورد استفاده و نیز در مقایسه با گروه کنترل بوده است ($P>0/05$).

درصد لنفوسیت ها در ماه اول بین ۹۵/۲ تا ۹۶/۲۲ در ماه دوم بین ۸۹/۹۸ تا ۹۲/۸ بوده است. نتایج آنالیز آماری حاکی از عدم اختلاف معنی دار بین تغییرات مشاهده شده در ماه اول و دوم بوده است ($P>0/05$).

نتایج آلوده شدن ماهیها با باکتری استرپتوکوکوس اینیایی نشان داد که از تعداد ۴۵ قطعه ماهی مورد بررسی برای هر تیمار، در صد بقاء نسبی ماهیان برای تیمارهای دریافت کننده غلظت ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم بر کیلوگرم عصاره سرخارگل به ترتیب ۸۴/۴۴، ۸۶/۶۶ و ۹۱/۱۱ درصد، و برای گروه کنترل نیز ۴۴/۴۴ درصد بوده است (جدول ۳).

بیشترین درصد بقاء ماهیان مربوط به بالاترین غلظت مصرفی بوده و آنالیز آماری حاکی از اختلاف معنی دار بین ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی عصاره با گروه کنترل بوده است ($P<0/05$).

جدول ۳: میانگین درصد بقاء نسبی ماهیان در تیمارهای مختلف ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی عصار ه سرخارگل و گروه کنترل بعد از آلوده شدن با استرپتوکوکوس اینیایی

تیمار	تعداد تلفات	تعداد باقیمانده	درصد بقاءنسبی
کنترل	۲۵	۲۰	٤٤/٤٤±٦/١١
۰/۵ (گرم بر کیلوگرم غذا)	۷	۳۸	۸٤/٤٤±۳/۳۹
۱ (گرم بر کیلوگرم غذا)	٦	۳۹	۸٦/٦٦±۳/۱۷
۱/۵ (گرم بر کیلوگرم غذا)	٤	٤۱	۹۱/۱۱±۲/۲۳

بحث

در ایـن مطالعـه میـزان اجـزاء کمپلمـان (C3 و C4) در تیمارهای سرخارگل در انتهای آزمـایش(بعـد از دو مـاه)، کمـی افزایش داشته اما اخـتلاف معنـی داری بـا ۳۰ روز اول نداشـته است، با این وجـود تغییـرات حاصـله در جـزء C3 کمپلمـان در تیمارهای حاوی عصاره سرخارگل و کنترل دارای اختلاف معنـی دار بوده است. بنظر می رسد تـاکنون مطالعـه ای در خصـوص تاثیر عصاره سرخارگل بر اجزاء کمپلمان بویژه جزء C3 و C4 در ماهی انجام نشده و شاید این اولین گزارش باشد. در هر حـال از بـین اجـزای سیسـتم کمپلمـان C_3 و C_4 از بقیـه مهمترنـد. C_3 توسط سلولهای کبـدی و ماکروفاژهـا سـاخته شـده و بیشـترین غلظت سـرمی را در میـان اجـزای کمپلمـان دارد، ضـمنا بـرای پیشرفت آبشار کمپلمان فعال‌شـدن آن ضـروری اسـت. C_4 نیـز توسط ماکروفاژها ساخته می‌شود و دومین میزان غلظت مربـوط به ایـن جـزء سیسـتم کمپلمـان مـی‌باشـد (تیـرزاد، ۱۳۸۳). در ماهیـان کمپلمـان نقـش مهمـی در کشـتار باکتریهـا در سـرم و موکـوس دارد (Ellis 2001; Holland & Lambirs 2002) و بعنوان اپسونین با باند شدن با بخشهای اختصاصی در سطح بدن عامل عفـونی در فاگوسـیتوز دخالـت مـی کنـد(Leiro *et al.*, 1996). اصولا مسیر آلترناتیو کمپلمان توسـط محـرکین ایمنـی تحریـک و فعـال مـی شـود (Engstad *et al.*, 1992). در بـین محرکهای ایمنی حذفبطور کلی عملکرد گیاهان دارویی بر فعـال شدن و تحریک فعالیت کمپلمان به اثبات رسـیده اسـت و مـی توان ادعا نمـود کـه نتـایج مطالعـه حاضـر بـا مشـاهدات سـایر محققین مطابقت دارد. Awad و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند کـه اسـتفاده از لوبیـا گرگـی (*Lupinus perennis*)، انبـه (*Managifera indica*) و گزنـه (*Urtica dioica*) خصوصـا در غلظتهای ۱ و ۲ درصد در جیره ماهیان قزل آلای رنگین کمـان بعد از ۱۴ روز موجـب افـزایش معنـی دار در فعالیـت کمپلمـان می‌گردد. همین نتایج در تغذیه کپـور (jian carp) و کروکـر زرد (Yellow croaker) با جیره حاوی ۱ و ۱/۵ درصد مخلـوطی از دو گیاه طبی چینی (*Radix astragalin seu* و *R. angelicae sinensisa*) طی ۲۰ و ۳۰ روز بدسـت آمـد (Jian & Wu, 2003, 2004). همچنـین اسـتفاده از عصـاره *Eclipta alba* بطور معنی داری موجب افزایش فعالیت کمپلمان بعد از ۲ هفتـه پس از تجویز در ماهی تیلاپیا گردیـد (Christybapita *et al.*, 2007).

در این بررسی تغییرات تعداد کل گلبولهای سفید در انتهای ماه اول در غلظتهای مختلف عصاره مورد استفاده در جیره غذایی چندان محسوس نبوده ولی درانتهای ماه دوم رونـدی افزایشـی داشته و بیشترین تعداد گلبولهای سفید در ماهیان تغذیه شده با غلظت ۱و ۱/۵ گرم بر کیلوگرم جیره در ماه دوم مشاهده شد که در مقایسه با گروه کنترل نیز اختلاف آن معنی دار بوده است که بـا مطالعـات سـایر محققـین تطبیـق مـی کنـد. Hajibeglu و Sudagar (۲۰۱۰) نشان دادند که تغذیه با عصـاره‌هـای گیـاهی باعث افزایش میزان هموگلوبین، تعداد گلبولهـای قرمـز و سـفید می شود. نتایج مطالعات Sahu و همکاران(۲۰۰۷) نیـز حـاکی

از افـــزایش WBC و RBC مـــی باشـــد. مطالعـــه Arul و Gopulakannan (۲۰۰۶) نشان داد کـه میـزان WBC بعـد از تغذیه ماهی کپور با تحریک کننده‌های گیاهی مانند کیتین بطور معنی‌داری افزایش می یابد. Oskoii و همکـاران (۲۰۱۲) اثـرات مثبـت عصـاره سـرخارگل بـر روی شاخصـهای خـونی از جملـه افزایش گلبولهای سفید در قزل آلا را مشاهده کردند.

فرآیند فاگوسیتوز و فعالیـت کشـندگی توسـط سـلول‌هـای فاگوسیت کننده یکی از مهمترین مکانیسم‌های دفـاعی در برابـر باکتری‌های بیماریزا می‌باشد. فاگوسیتهای ماهی قـادر بـه تولیـد سوپر اکسید (O_2^-) در طی فرآیندی تحت عنوان انفجـار تنفسـی می‌باشند. رادیکال آزاد اکسیژن یکی از فاکتورهای اختصاصی در انفجار تنفسی بوده که توسـط برخـی از سـلولهای فاگوسـیتوزی مثل نوتروفیل ها وماکروفاژها تولید می شـود (سـلطانی، ۱۳۸۷). نتایج این مطالعه نشان داد که تغییرات رادیکال آزاد اکسـیژن در تیمارهای ماهیان تغذیـه شـده بـا جیـره غـذایی حـاوی عصـاره سرخارگل در انتهای آزمایش دارای افزایش معنی داری بوده و در غلظت ۱/۵ گرم عصاره نتایج بهتر نیز بوده است. نتایج حاضـر بـا نتایج مطالعـات Peddie و Secombes (۲۰۰۳) مطابقـت دارد. آنها نشان دادند که عصاره سرخارگل گونه anguistifola بهمراه دو عصـاره گیـاهی *Eupatorium perfoliatum* و *Baptista tinctoria* باعث افزایش فعالیـت انفجـار تنفسـی و متعاقـب آن رادیکال آزاد در ماهی قزل آلا میشود.

لیزوزیم یکی از اجزای سیستم دفاع غیراختصاصی بدن است که بر دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت تاثیر گذاشته و پیوند ۴-۱ گلیکوزیدی بین پپتیدوگلیکان را از بین می‌برد. نتایج تغییرات آنزیم لیزوزیم در تیمارهای ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی عصاره سرخارگل نشان داد که در انتهای آزمایش (پس از ۲ ماه) میزان فعالیت لیزوزیم افزایش داشته ولی اختلاف معنی دار نبوده است. با افزایش غلظت عصاره در جیره غذایی ماهیان، فعالیت لیزوزیم نیز افزایش بیشتری یافته است. میزان تغییرات لیزوزیم در تیمارهای ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی عصاره سرخارگل نسبت به گروه کنترل دارای اختلاف معنی دار بوده است. مطالعات انجام شده توسط محققین نشان داد که بدنبال استفاده از عصاره‌های گیاهی در جیره غذایی ماهی، میزان لیزوزیم افزایش یافته که این افزایش در برخی از مواقع نیز معنی‌دار بوده که بسته به گونه ماهی، غلظت عصاره گیاهی و نوع عصاره مورد استفاده متفاوت بوده است (Yin *et al*., 2009).

سرخارگل ایمنی هومورال را تقویت و با تحریک ماکرو فاژها و افزایش تولید سیتوکین ها و نیز افزایش تکثیر لنفوسیتهای T ایمنی سلولی را تقویت می کند (Stimpel, *et al.*, 1984). سرخارگل اثرات مفیدی بر گلبول‌های سفید خون نشان می‌دهد. این گیاه اثرات کشندگی سلول‌های کشنده طبیعی را بطور معنی داری افزایش می دهد. ترکیبات موثره موجود در آن بویژه آلکامیدهای لیپوفیلیک باعث افزایش فعالیت ماکروفاژها می‌شوند (Dahui *et al*., 2011; Melchart *et al*., 1998).

در بررسی شاخصهای خون شناسی، برخی از گلبول‌های سفید نظیر نوتروفیل، مونوسیت و لنفوسیت در روزهای ۳۰ و ۶۰ مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد بیشترین تغییرات مربوط به غلظتهای بالای (۱/۵گرم) عصاره سرخارگل بوده است و افزایش نوتروفیل بین تیمارهای ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی عصاره و گروه کنترل معنی‌دار بوده است. نوتروفیل‌ها از جمله سلولهای دفاعی بدن هستند که در دفاع غیر اختصاصی دخالت مستقیم داشته و از مهمترین سلول‌های تولید کننده رادیکال آزاد اکسیژن و از سلول‌های اصلی دخیل در فعالیت انفجار تنفسی می‌باشند. مطالعات Peddie و Secombes (۲۰۰۳) درخصوص عصاره گیاه سرخارگل بهمراه دو عصاره گیاهی دیگر نشان داد که عصاره‌های مورد استفاده باعث افزایش مهاجرت لوکوسیت های محیطی و همچنین افزایش فرآیند فاگوسیتوز در ماهی قزل‌آلا می‌شوند. افزایش نوتروفیل ها با افزایش انفجار تنفسی در این تحقیق نیز همخوانی دارد. همچنین نتایج این بررسی با نتایج مطالعه Oskoii و همکاران (۲۰۱۲) در خصوص وضعیت شاخصهای خون شناسی بویژه افزایش درصد نوتروفیل ها بعد از مصرف عصاره سرخارگل در ماهی قزل آلای رنگین کمان مطابقت دارد. در مطالعه Ardo و همکاران (۲۰۰۸) نیز افزایش فعالیت سلول‌های فاگوسیتی در ماهی تیلاپیا بدنبال استفاده از عصاره‌های گون و عصاره Lonicera بصورت منفرد و یا ترکیبی با یکدیگر و فلز بور (B) مشاهده شده است. Rao و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که بدنبال تغذیه ماهی *Leba rahita* با عصاره گیاه *Achyranthes aspera*، لکوسیت‌های خونی از جمله نوتروفیل افزایش یافته و متعاقب آن تولید آنیون سوپراکسید نیز افزایش نشان می‌دهد. مطالعه مذکور با نتایج تحقیق حاضر که نشان دهنده افزایش رادیکال آزاد اکسیژن و همچنین نوتروفیل بوده مطابقت دارد.

نتایج آزمایشات آلوده شدن ماهی در برابر استرپتوکوکوس اینیایی نشان داد که میزان بقاء نسبی ماهیان در تیمارهای دریافت کننده عصاره سرخارگل نسبت به تیمار کنترل به مراتب بیشتر بوده و غلظتهای بالاتر عصاره (۱ و ۱/۵ گرم در کیلوگرم غذا) نتایج بهتری را بهمراه داشته است. به نظر می رسد که استفاده از عصاره سرخارگل باعث تقویت سیستم ایمنی ماهی شده و مقاومت آن را در برابر استرپتوکوکوزیس افزایش می دهد که با نتایج سایر محققین مطابقت دارد. مطالعات Hajibeglu و Sudagar (۲۰۱۰) نشان داد که تغذیه با عصاره‌های گیاهی مورد استفاده باعث افزایش مقاومت ماهی کپور به آئروموناس هیدروفیلا می‌شود. نتایج مطالعات Sahu و همکاران (۲۰۰۷) و همچنین Ardo و همکاران (۲۰۰۸) در رویارویی با هیدروفیلا نیز نتایج مشابه به همراه داشته است. مطالعه Pachanawan و همکاران(۲۰۰۸) نشان داد که عصاره الکلی برگ *Psidium guajava* باعث افزایش مقاومت ماهی تیلاپیا در برابر آئروموناس هیدروفیلا می‌شود. Chaves و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که گونه‌های *purpurea*, *pallida*, *angustifolia* سرخارگل باعث مهار ویروس های عامل آنفلوآنزا و هرپس شده و عمده تاثیر آن مربوط به متابولیت هایی نظیر آلکامیدها و مشتقات کافئیک اسید می باشد.

نتیجه گیری کلی اینکه عصاره سرخارگل باعث تقویت ایمنی غیر اختصاصی در ماهی قزل آلای رنگین کمان و افزایش مقاومت آن در برابر استرپتوکوکوزیس می شود و نتایج مطلوب تر بدنبال استفاده از غلظتهای بالاتر عصاره سرخارگل بدست می‌آید.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور انجام شده است. ضمنا " از زحمات سرکار خانم احترام السادات علوی نیز سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

اخلاقی،م و کشاورزی، م.، ۱۳۸۱. وقوع استرپتوکوکوزیز در مزارع پرورش قزل آلای استان فارس، مجله تحقیقات - دامپزشکی ایران ،دوره سوم،شماره دوم، صفحات۱۸۳تا .۱۸۹

تیرزاد، ا.، ترجمه: ربانی، م. و محزونیه، م.، ۱۳۸۳. ایمنی شناسی دامپزشکی، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات ۱۵۰ تا ۷۰۶.

سلطانی، م.، ۱۳۸۷. ایمنی شناسی ماهیان و سخت پوستان، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات ۱۰۵تا ۱۰۶

طبرستانی، م.، ۱۳۹۰. خونشناسی پزشکی، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد، صفحه ۱۴۳و صفحه ۹۵۰.

مظلومی، م.، ۱۳۸۲. استرپتوکوکوزیس، انتروکوکوزیس، بیماریهای مهم اقتصادی در پرورش ماهی، انتشارات نوید، ۹۴ صفحه.

Agnew, W. and Barnes, A.C., 2007. *Sterptococos iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significans and challenging candidate for reliable *vaccination. Journal of Microbiology* ,122: 1-15.

Ardo, L., Yin, G., Xu, P., Varadi, L., Szigeti, G., Jeney, Z. and 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(1-4): 26 – 33.

Austin, B., Austin, D.A. 1999. Bacterial Fish Pathogens. Diseases of Farmed and Wild Fish, 3rd ed. Springer, London, pp. 457.

Austin, B and Austin, D.A., 2007. Bacterial fish pathogens. Diseases of farmed and wild fish. Springer, pp.552

Awad, E. and Austin, B., 2010. Use of lupin, Lupinus perennis, mango, mangifera indica, and stinging nettle, urtica dioica, as feed additives to prevent Aeromonas hydrophila infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 33, 413-420.

Baya, J., Blankeship, L., Cox, N., 1990. Effect of fructooligos a ccharide on salmonella colonization of the chicken intestine. Poult Sci. 70, pp: 2433-2438.

Chaves, F., Chacon, M., Badilla, B. and Arevalo, C., 2007. Effect of *Echinaceae purpurea* (Astraceae) aqueous extract on antibody response to *Bothrops asper* venom and immune cell response, Rev.Biol.Trop, 55(1): 113-119.

Christybapita, D., Divyagnaneswari, M. and Michael, D. 2007. Oral administration of Eclipta alba leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of Oreochromis mossambicus. Fish Shellfish Immunol. 23, 840-852.

Colorni, A., Diamant, D., Eldar, A., Kvitt, H., Zlotkin, A., 2002. *Streptococcus iniae* infection in red sea cage culture and wild fishes. *Dis. Aquat.Org*.49, pp: 165-170.

Dahui, L., Wang Zaigui, W. and Yunhua, Z. 2011. Antifungal activity of extracts by supercritical carbon dioxide extraction from roots of *Echinacea angustifolia* and analysis of their constituents using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) Journal of Medicinal Plants Research Vol. 5(23), pp. 5605-5610.

Elder, A., 1999. *Lactococcus garvieae* and *Streptococus iniae* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). pp:227-231

ELLIS A.E. 1990. Lysozoyme Assays. In techniques in fish immunology (eds. J.S. stolen, T.C fletcher, D.P. Anderson, B.S.Robertson & W.B.van muisvinkel) 1990:101-103 S.O.S PUBLICATIONS , FAIR Haven , NJ, USA.

Ellis A.E. 2001. Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria. Dev. Comp. Immunol. 25, 827-839.

Engstad, R.E., Robertson, B. and Frivold, E. 1992. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish Shellfish Immunol. 2, 287-297.

Evans, A.E.2000. Lysozyme assaye. In: stolen., J.S., Fletcher, T., Anderson, D.P., Roberson, B.S., W.B., editors, 2000, Techniques in fish immunology. Fair Haven, NJ: SOS Publication, pp: 101-103.

Floyd, M.D., Sims, D.E., Burka, G.F., Mustafa, A. and Ross, N.W., 2002. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and atlantic salmon. Comp. Biochem. Physiol. 132(A), pp: 645-657.

Galina, J., Yin, G., Ardo, L. and Jeney, Z., 2009. The Use of Immunostimulating herbs in fish. An overview of research, *Fish Physiol Biochem*, 35: 669 – 676.

Ghasemi Pirbalouti, A., Nikobin Broujeni, V., Momeni M., Malek Poor, F. and Hamedi, B. 2011. Antibacterial activity of Iranian medicinal plants against *Streptococcus iniae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Archive Biological Scicence*., 63: 59-66.

Ghiasi, M., Zahedi, A. and Rostami, H., 2000. Streptococcosis outbreaks in Mazadaran province, 1st conference of fish health and diseases, Ahvaz, 13-15, Feb

Hajibeglu, A. and Sudagar, M., 2010. Immune response of common carp (Cyprinus carpio) fed with herbal immunostimulants diets. Journal of

Animal and Veterinary Aduaces. 9(13), 1839-1897.

Holland, M.C.H. and Lambris, J.D. 2002. The complement system in teleosts. Fish Shellfish Immunol. 12, 399-420.

Jian, J. and 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.

Jian, J. and Wu, Z. 2004. Influence of traditional Chinese medicine on non specific immunity of Jian Carp (*Cyprinus carpio var*. Jian). Fish Shellfish Immunol. 16,185-191.

Leiro, J., Ortega, M., Estevez, J., Ubeira, F.M. and Sanmartin, M.L. 1996. The role of opsonization by antibody and complement in vitro phagocytosis of microsporidian parasites by turbot spleen cells. Vet. Immunol. Immunopathol. 51, 201-210.

Mathews, E.S., Warinner, J.E. and Weeks, B.A., 1990. Assay of immune function in fish macrophages. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., van Muiswinkel, W.B. (Eds.), Techniques in Fish Immunology, vol.2. SOS publications, pp. 155-163.

Melchart, D., Walther, E., Linde, K., Brandmier, R. and Lersch, C., 1998. Echinacea Root Extracts for the prevention of upper Respiratory Tract infections, *American Medical Association*, 7: 541 – 545.

Morrazoni, P., Cristoni, A., Di Pierro, F., Avanzini, C., Ravarino, D., Stornello, S., Zucca, M. and Musso, T., 2005. In Vitro and In Vivo immune stimulating effects of a new standardized *Echinacea angustifolia* root extract (Polinacea), *Fitoterapia*, 76: 401 – 411.

Oskoii, S.B., Kohyani, A.T., Parseh, A., Salati, A.P. and Sadeghi, E., 2012. Effects of dietary administration of Echinacea purpurea on growth indices and biochemical and hematological indices in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Fish Physiol Biochem*. 38(4):1029-34.

Pachanawan, A., Phumkhachorn, P., Rattanachaikunsopon, P., 2008. Potential of Psidium guajava supplemented fish diets in controlling Aeromonas hydrophila infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Biosci Bioeng*.,106(5):419-24.

Peddie, S. and Secombes, C.J., 2003. The Immunostimulatory effects of Chevimmun in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 23: 48 – 51.

Pourgholam R., Mokarami, A., Saeedi, A.A., Sharifpour, I., Ghoroghi, A and Pourgholam, H.,2010. Assessment of acute effects of streptococcus faecium on some hematological and histopathological parameters of *rainbow trout* (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 19(2), 9-18. (In Persian with English abstract).

Pourgholam, R., Laluei, F., Saeedi, A.A., Zahedi, A., Safari, R., Taghavi, M.J., Nasrollahzadeh Saravi, H. and Pourgholam, H., 2011. Distribution and molecular identification of some causative agents of streptococcosis isolated from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) in Iran. *Journal of Iranian Fisheries Sciences*, 10(1), 109-122.

Rao, Y.V. and Das, J. 2006. Effect of Achyranthes asperaon the immunity and survival of Labeo

rohita infected Aeromonas hydrophyla. Fish, *Shelfish Immunology*, 20: 263-273.

Rodas, B.A., Angulo, J.O., Cruz, J. and Garcia, H.S., 2002, Proparatian of probiotic buttermilk with *Lactobacillus reuteri*. Milchwissenschoff Milk Sclence International. 57,pp: 26-28

Shahsavani, D., Mohri, M. and Gholipour Kanani, H. 2010. Determination of normal values of some blood serum enzymes in *Acipenser stellatus* Pallas. *Fish. Physiol. Biochem*. 36: 39–43

Soudi, S., Hashemi, S.M., Zavaran Hosseini, A., Ghaemi, A. and Asghari Jafarabadi, M., 2007. Antileishmanial Effect of *Echinaceae purpurea* Root extract cultivated in Iran, *Iranian Journal of Pharmaceutical research*. 6(2): 147 – 149.

Stimpel, M., Proksch, A., Wagner, H. and Lohman, M.L. 1984. Macrophage activation an induction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharide fraction from the plant *Echinacea purpurea*. Infection and Immunity 46: 845-849.

Xu, D.J., Xia, Q., Wang, J.J., Wang, P.P., 2008. Molecular Weight and Monosaccharide Composition of *Astragalus* polysaccharides, Molecules, 13: 2408 – 2415.

Yin, G., Ardo, L., Thopmpson, K.D., Adams, A., Jeney, Z. and Jeney, G., 2009. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp , Cyprinus carpio, and protection against *Aeromonas hydrophila*, *Fish & Shellfish Immunology*, 26(1): 140 – 145.

Effect of *Echinacea purpurea* extract on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and its resistance to Streptococcusis

Pourgholam R.*[(1)]; Sharif Rohani M.[(2)]; Safari R. [(3)]; Saeeidi A.A.[(4)]; Binaeei M.[(5)]; Najafeyan R.[(6)]; Bankehsaz Z.[(7)]; Taghavi M.J. [(8)] and Sepahdari A.[(9)]

r_pourgholam@yahoo.com

1,3,4,5,6,7,8-Capian Sea Ecology Center, P.O.Box: 961 Sari, Iran

2,9- Iranian Fisheries Research Center, P.O.Box:13185-116 Tehran, Iran

Received: March 2013 Accepted**:** December 2013

Keywords: *Echinacea purpurea,* rainbow trout, Streptococcusis, immune system

Abstract

In this study, some non-specific immune responses and hematological parameters in rainbow trout juveniles (16g mean weight) and their resistance to Streptococcusis were invetigated following dietary administration of 3 concentrations (0.5, 1, 1.5g/kg of feed) of *Echinacea purpurea* extract. The non-pecific immune response and hematological parameter compared with control group for 60 days. Evaluated parameters included were of C3, C4, (complement components), superoxide ions (respiratory burst), lysozyme activity, number of WBC, percentage of blood lymphocytes, monocytes and neutrophils. At the end of trial, the relative survival rate (RSR) of fish was evaluated against *S. iniae*. The results showed that the levels of C3, lysozyme activity, superoxide ions, number of WBC and percentage of neutrophils in the experiment groups (the highest concentration, 1.5g/kg of feed) were increased significantly compared to the control group. Whereas, no significant difference was found in the value of C4 and the percentage of monocytes and lymphocytes in comparison to the control group. The relative survival rates of fish following challenge with *Streptococcus iniae*, were 91.11 and 44.44 percent in experiment (*Echinacea purpurea,* concentration of 1.5g/kg of feed) and control group, respectively.

In conclusion, the results of the present study demonstrated that *Echinacea purpurea.* extract enhanced the non-specific immune system and fish resistance against streptococcusis, suggesting that this extract might be used as immunostimulant in fish feed.

*Corresponding author