



تأثیر عصاره خوراکی پونه‌کوهی (*Mentha longifolia*) بر عملکرد رشد و فراسنجه‌های خونی، سرمی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و میزان مقاومت در برابر بیماری باکتریایی

محدثه حیدری^{۱*}، فرید فیروزبخش^۱، حامد پاک‌نژاد^۲

^۱ دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

^۲ دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

چکیده

نوع مقاله:

پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۷/۰۷/۳۰

اصلاح: ۹۷/۱۰/۲۲

پذیرش: ۹۷/۱۲/۲۳

کلمات کلیدی:

پونه‌کوهی

رشد

فراسنجه‌های خونی

قزل‌آلای رنگین‌کمان

در این تحقیق اثر تجویز خوراکی عصاره پونه‌کوهی بر عملکرد رشد، برخی فراسنجه‌های خونی و سرمی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با باکتری *Yersinia ruckeri* ارزیابی شد. به این منظور ۳۶۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۰/۲ ± ۱۰/۴۸ گرم) به ۴ گروه تقسیم شدند و از جیره‌های مکمل شده با صفر (گروه شاهد)، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ درصد عصاره پونه‌کوهی به مدت ۴ هفته تغذیه نمودند. در پایان ۴ هفته، ۲۰ عدد ماهی از هر تیمار، انتخاب و میزان ۰/۱ میلی‌لیتر (۱۰۸) باکتری در هر میلی‌لیتر باکتری به روش داخل صفاقی تزریق گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که وزن نهایی، ضریب رشد ویژه و کارایی تبدیل غذایی، تعداد گلبول سفید و قرمز خون، هماتوکریت، هموگلوبین، پروتئین کل، آلبومین و میزان فعالیت لیزوزیم سرم ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی عصاره هیدروالکلی پونه‌کوهی به ویژه غلظت‌های بالا (۰/۲ و ۰/۳ درصد)، افزایش معنی‌داری با تیمار شاهد نشان دادند. در معرض قرار گرفتن ماهی با باکتری *Yersinia ruckeri*، تیمار ۰/۳ درصد، کمترین درصد تلفات را به خود اختصاص داد. به‌طور کلی تجویز پونه‌کوهی در سطح ۰/۲ و ۰/۳ درصد به صورت خوراکی موجب افزایش مقاومت، بهبود عملکرد رشد، افزایش برخی شاخص‌های خونی و سرمی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌گردد.

مقدمه

تقاضای روزافزون بشر برای مصرف فرآورده‌های آبزیان از طرفی و کاهش ذخایر وحشی آبزیان از طرف دیگر، موجب تلاش‌های زیادی برای توسعه صنعت آبی‌پروری در دنیا شده است. از جمله مواد پروتئینی، پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است. ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بعد از ماهی آزاد اقیانوس اطلس، مهم‌ترین گونه در بین آزادماهیان است که در بسیاری از کشورها پرورش داده می‌شود (Pandian and Koteeswaran, 1998). این ماهی به دلیل سرعت رشد بالا و گوشت لذیذ دارای ارزش اقتصادی بالایی است. اگرچه بیماری‌ها، رخدادی طبیعی در انواع موجودات به شمار می‌روند، اما پرورش متراکم و فوق‌متراکم ماهیان سبب شیوع انواع بیماری‌های غیرمنتظره شده است که در نهایت منجر به محدودسازی

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: Mohades_heydari@yahoo.com

میزان تولید و افزایش ضرر و زیان اقتصادی می‌گردد (Austin and Austin, 1999). مطالعه واکنش‌های دفاعی حیوان و آگاهی از نحوه عملکرد مواد مغذی در بهینه‌سازی کارایی سیستم ایمنی در جلوگیری، درمان و کنترل بیماری‌های آبزیان بسیار مؤثر است. به منظور رهایی از معایب استفاده از آنتی‌بیوتیک، به کارگیری مواد محرک سیستم ایمنی در صنعت آبزی‌پروری، برای بهبود و تحریک فعالیت سیستم ایمنی غیراختصاصی و مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا عمومیت یافته است (Sakai, 1999). داروهای گیاهی با مزیت‌های مختلف از قبیل در دسترس بودن، سازگار بودن با محیط‌زیست و جانور، تجزیه خود به خودی و امکان تولید در سطح وسیع با قیمت پایین، امروزه در آبزی‌پروری بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (Jian and Wu, 2004; Govind et al., 2012). مطالعات متعددی پیرامون استفاده از محرک‌های گیاهی در افزایش ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان صورت گرفته است که از جمله می‌توان به گیاه گزنه (*Urtica dioica*)، داروаш (*Viscum album*)، زنجبیل (*Zingiber officinale*) (Dugenci et al., 2003)، آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) (Ghareghanipoor et al., 2014)، نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) (Adel et al., 2016a) و جلبک سارگاسوم (Zeraatpisheh et al., 2018) اشاره نمود. همچنین تغذیه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با مرزنجوش (*Origanum onites* L) (Diler et al., 2017)، روغن گیاهان کنجد، بذر کتان و آفتابگردان (Yildiz et al., 2015) باعث افزایش رشد این نوع ماهی شده است. یکی از گیاهان پرکاربرد در طب سنتی ایران، گیاه پونه‌کوهی (*Mentha longifolia*) از خانواده نعناعیان (Lamiaceae) است. این گیاه به صورت طبیعی در مکان‌های مرطوب مانند حاشیه رودخانه‌ها روئیده و در سراسر مناطق معتدل نواحی مرکزی و جنوب اروپا، جنوب غربی آسیا و استرالیا رشد می‌کند. برگ‌ها و جوانه‌های تازه‌ی آن به دلیل داشتن ترکیبات بیوشیمیایی مختلفی از جمله اسید سینامیک، اگلیکون، گلیکوزاید یا فلاونوئیدهای استیل شده و استرادیول‌های گلیکوزایدی و روغن‌های ضروری نظیر - 1,8 کینول، منتول، کاروون، لیمونن، اکسید پیپریتون، بتا کاریوفیلن، اپوکسید ترانس پیپتریتون و پولگون، دارای خاصیت آنتی‌اکسیدان، تقویت‌کننده سیستم ایمنی، ضد قارچ، ضدالتهاب و ضد میکروب است (Unnithan et al., 2013; Koliopoulos et al., 2010). تأثیر مثبت پونه‌کوهی در بهبود رشد و سیستم ایمنی (Durrani et al., 2008) در جوجه‌های گوشتی به اثبات رسیده است. اگرچه تاکنون مطالعات صورت گرفته نشان‌دهنده اثرات مثبت گیاه پونه‌کوهی به عنوان محرک ایمنی در طیور بوده است و بررسی‌های تحقیقاتی بر روی آن رو به افزایش است، اما در به‌کارگیری عصاره هیدروالکلی این گیاه در ارتباط با تحریک سیستم ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، اطلاعاتی وجود ندارد. با توجه به ترکیبات بالقوه موجود در این گیاه، مطالعه حاضر به منظور ارزیابی پتانسیل پونه‌کوهی بر بهبود شاخص‌های رشد و ایمنی و همچنین افزایش مقاومت ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر *Yersinia ruckeri* انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی جیره و دوره پرورش

پونه‌کوهی (ساقه، برگ و گل) مورد نظر به صورت تازه از مناطق کوهستانی شهرستان سمنان جمع‌آوری و پس از شناسایی توسط متخصصین گیاه‌شناس، اقدام به خشک نمودن گیاه مورد نظر شد. ۱۰۰ گرم از پودر به دست آمده درون ارلن یک لیتری ریخته و به آن الکل اتیلیک ۷۰ درصد (نسبت ۱ به ۱۰) اضافه شد، به گونه‌ای که سطح پودر را پوشاند و بعد از ۲۴ ساعت محلول صاف گردید. در مرحله بعد به تفاله باقی‌مانده، الکل ۷۰ درصد اضافه و بعد از ۲۴ ساعت صاف شد. محلول‌های به دست آمده در آون و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و شرایط استریل خشک گردید. بدین ترتیب بعد از چند روز پودر خشک عصاره هیدروالکلی آماده شد و تا زمان استفاده در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری گردید (Erdemoglu et al., 2003).

برای تهیه جیره‌ها، از غذای تجاری (شرکت بیضاء، فارس- ایران) استفاده شد. عملیات غذایی بر اساس جدول استاندارد (درجه حرارت و درصد وزنی بدن) صورت گرفت. عصاره‌های هیدروالکلی گیاه متناسب با نیاز هر تیمار (۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ درصد) به جیره‌ها افزوده شد. پس از محاسبه میزان غذای مورد نیاز و عصاره، هر یک از این سطوح مختلف عصاره، ابتدا در

مقدار کمی روغن کانولا (۱۰ میلی لیتر) حل و همگن شده و سپس به هر کیلوگرم جیره غذایی اضافه گردید. جیره فاقد عصاره (فقط حاوی ۱۰ میلی لیتر روغن کانولا) برای تغذیه گروه شاهد به کار رفت. جیره‌های غذایی به صورت هفتگی آماده-سازی و تا زمان استفاده درون کیسه‌های نایلونی تیره‌رنگ در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) در شرایط تاریکی نگهداری گردید.

در تحقیق حاضر ۳۶۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) با میانگین وزن اولیه (± 0.2) ۱۰/۴۸ گرم) از یک مزرعه پرورش ماهی در ساری تهیه و به دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری منتقل شد. ابتدا سازش‌یابی بچه ماهی‌ها در تانک‌های فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری به مدت دو هفته انجام گرفت. آزمایش حاضر با ۳ تیمار غذایی حاوی عصاره هیدروالکلی گیاه پونه کوهی شامل ۱، ۲ و ۳ گرم عصاره هیدروالکلی بر کیلوگرم جیره و تیمار شاهد، بدون افزودنی در سه تکرار (هر تکرار ۳۰ قطعه بچه ماهی) در ۱۲ آکواریم ۱۰۰ لیتری به مدت ۴ هفته انجام شد. فاکتورهای محیطی هر هفته اندازه‌گیری شدند. محدوده دمای آب در طول پرورش 13 ± 0.30 درجه سانتی‌گراد، pH آن 7.2 ± 0.29 و اکسیژن محلول آب در محدوده 7.19 ± 0.58 میلی‌گرم در لیتر متغیر بود.

بررسی پارامترهای رشد

جهت بررسی تأثیر پونه کوهی مصرفی بر عملکرد رشد بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان، ۳۰ درصد از کل جمعیت هر تکرار به فاصله هر ۱۴ روز یک‌بار با استفاده از پودر گل میخک با غلظت ۰/۱ گرم در لیتر بی‌هوش و مورد زیست‌سنجی قرار گرفتند. طول بچه‌ماهیان با استفاده از تخته زیست‌سنجی با دقت ۱ میلی‌متر و وزن آن‌ها با استفاده از ترازوی رقمی با دقت ۰/۰۰۱ اندازه‌گیری شد. در انتهای دوره‌ی آزمایش، تمام ماهیان صید، بی‌هوش و مورد زیست‌سنجی قرار گرفتند. پارامترهای رشد مورد محاسبه قرار گرفت (Hevroy *et al.*, 2005) تا میزان تأثیر پونه کوهی مصرفی بر عملکرد رشد در بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار گیرد. پارامترهای اندازه‌گیری شده به قرار ذیل بودند:

افزایش وزن بدن: وزن اولیه (گرم) - وزن نهایی (گرم)

ضریب تبدیل غذایی: افزایش وزن بدن (گرم) ÷ مقدار غذای خورده شده (گرم)

نرخ رشد ویژه: $100 \times (\text{طول دوره پرورش} \div \text{لگاریتم وزن اولیه} - \text{لگاریتم وزن نهایی})$

کارایی تبدیل غذا: مقدار غذای خورده شده (گرم) ÷ افزایش وزن بدن (گرم)

خون‌گیری و انجام آزمایش‌های خون‌شناسی و سرمی

در انتهای دوره، تعداد ۵ ماهی از هر تکرار به طور تصادفی انتخاب و بعد از بی‌هوشی با پودر گل میخک، خون‌گیری از ورید ساقه‌ی دمی انجام شد. بعد از خون‌گیری، نمونه‌های خون جمع‌آوری شده به دو بخش تقسیم شدند. بخشی از خون در لوله‌های خون‌گیری حاوی مواد هپارینه قرار گرفتند تا شمارش گلبول سفید، گلبول قرمز، اندازه‌گیری میزان هماتوکریت و هموگلوبین صورت گیرد. برای اندازه‌گیری هماتوکریت با استفاده از روش میکروهماتوکریت (Stoskopf, 1993) و برای اندازه‌گیری هموگلوبین از روش سیانمت هموگلوبین استفاده شد (Drobkin, 1945). شمارش سلول‌های قرمز و سفید پس از رقیق‌سازی با محلول نات - هریک توسط لام هموسایتومتر انجام گرفت (Stoskopf, 1993). بخش دیگر خون در لوله‌های فاقد ماده ضد انعقاد خون قرار گرفتند و پس از تشکیل لخته، سرم خون با استفاده از سانتریفیوژ (به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه) توسط سمپلر از لخته جدا شده و در میکروتیوب‌های جداگانه قرار گرفت. نمونه‌های سرم جداسازی شده تا زمان اندازه‌گیری فراسنجه‌های سرمی در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پروتئین کل، آلبومین با استفاده از کیت‌های تولید شده توسط شرکت پارس‌آزمون (تهران، ایران) و دستگاه اتولایزر اندازه‌گیری شد و با تفاضل این دو گلوبولین به دست آمد (Nayak *et al.*, 2008). برای تعیین میزان لیزوزیم، ۲۵ میکرولیتر سرم به

میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای الیزا، افزوده شد. سپس ۱۷۵ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma M 3770) اضافه گردید. جذب نوری در دمای اتاق در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. از لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ لیوفلیزه شده (HEWL; Sigma, USA) به منظور ترسیم منحنی استاندارد استفاده گردید (Kumari et al., 2006).

مواجهه با باکتری *Yersinia ruckeri*

باکتری *Y. ruckeri* با شماره دستیابی KC291153 به فرم لیوفلیزه از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردید. نمونه باکتری در محیط TSB (Tryptic soy broth) کشت و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد و سوسپانسیون باکتری معادل استاندارد نیم مک فارلند (با غلظت تقریبی 10^8 باکتری در هر میلی‌لیتر) تهیه شد. در پایان ۴ هفته و پس از بیهوشی ماهیان با پودر گل میخک، ۳۰ عدد ماهی از هر تیمار، انتخاب و میزان ۰/۱ میلی‌لیتر (از رقت 10^8 باکتری در هر میلی‌لیتر) به روش داخل صفاقی تزریق گردید (Akhlaghi and Sharif Yazdi, 2008). تعداد تلفات روزانه به مدت ۱۰ روز ثبت گردید. در انتهای دوره، تلفات تجمعی هر گروه تعیین و نمودار تلفات تجمعی هر ۴ گروه ترسیم گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۲ مورد محاسبه قرار گرفت. با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk نرمال بودن پراکنش داده‌ها مشخص شد و سپس از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) وجود یا عدم وجود اختلاف بین تیمارها بررسی گردید. پس از مشاهده اختلاف معنی‌دار، به کمک آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p < 0/05$)، اختلاف بین تکرارها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین به همراه انحراف معیار نشان داده شد.

نتایج

تأثیر پونه کوهی بر فراسنجه‌های رشد

نتایج مربوط به اندازه‌گیری فراسنجه‌های رشد مورد بررسی، در تیمارهای مختلف تغذیه شده با جیره حاوی پونه کوهی در پایان ۴ هفته در جدول ۱ ارائه شده است. تغییرات میانگین وزن نهایی بیان‌گر آن است که هر سه گروه آزمایشی تغذیه شده با پونه کوهی افزایش معنی‌دار وزن نهایی ($p < 0/05$) را در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند. در بین تیمارهای آزمایشی، بالاترین میانگین وزن نهایی مربوط به تیمار تغذیه شده با ۰/۲ درصد پونه کوهی و کمترین مقدار در تیمار شاهد مشاهده گردید. در مقایسه نرخ رشد ویژه گروه‌های تغذیه شده با پونه کوهی در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری ($p < 0/05$) را نشان دادند. بیشترین و کمترین نرخ رشد ویژه، به ترتیب در تیمارهای تغذیه شده با ۰/۲ درصد پونه کوهی و شاهد مشاهده شد ($p < 0/05$). از نظر ضریب تبدیل غذایی، گروه‌های تغذیه شده با ۰/۲ درصد پونه کوهی در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری ($p < 0/05$) را نشان دادند. درحالی‌که این شاخص بین سایر تیمارهای آزمایشی تغذیه شده با پونه کوهی در مقایسه با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($p > 0/05$). همچنین شاخص کارایی تبدیل غذا، در تیمارهای آزمایشی تغذیه شده با ۰/۲ و ۰/۳ درصد پونه کوهی در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری داشتند ($p < 0/05$). بیشترین میانگین کارایی تبدیل غذا در تیمار تغذیه شده با ۰/۲ درصد پونه کوهی مشاهده شد، درحالی‌که تیمار آزمایشی تغذیه شده با ۰/۱ درصد پونه کوهی در مقایسه با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان ندادند ($p > 0/05$).

تأثیر پونه کوهی بر فراسنجه‌های خونی

همان‌طور که جدول ۲ نشان داده است تعداد گلبول سفید، گلبول قرمز، غلظت هموگلوبین و درصد هماتوکریت همه تیمار-های تغذیه‌شده با پونه کوهی در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0/05$). با افزایش درصد عصاره هیدروالکلی پونه کوهی در جیره ماهیان، تمام شاخص‌های خونی افزایش یافته است، اما بین تیمار ۰/۲ و ۰/۳ درصد پونه کوهی اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($p > 0/05$). بیشترین تعداد گلبول سفید، گلبول قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین

جدول ۱. مقایسه میانگین شاخص‌های رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره حاوی مقادیر مختلف عصاره هیدروالکلی پونه کوهی پس از ۴ هفته غذادهی (میانگین \pm انحراف معیار)

تیمار / شاخص	میانگین وزن اولیه (گرم)	وزن نهایی (گرم)	نرخ رشد ویژه (درصد)	ضریب تبدیل غذا	کارایی تبدیل غذا
صفر (شاهد)	۱۰/۲۵ \pm ۰/۳ ^a	۲۳/۵۸ \pm ۰/۱۲ ^a	۲/۷۷ \pm ۰/۲۱ ^a	۰/۷۷ \pm ۰/۰۴ ^b	۱/۲۸ \pm ۰/۲۴ ^a
۰/۱ درصد	۱۰/۲۰ \pm ۰/۱ ^a	۲۵/۸۹ \pm ۱/۲۴ ^b	۳/۱۰ \pm ۰/۲۵ ^b	۰/۷۱ \pm ۰/۰۹ ^b	۱/۳۹ \pm ۰/۳۱ ^{ab}
۰/۲ درصد	۱۰/۰۸ \pm ۰/۲۳ ^a	۳۱/۷۲ \pm ۱/۱۳ ^d	۳/۸۲ \pm ۰/۳۳ ^d	۰/۵۶ \pm ۰/۰۵ ^a	۱/۷۵ \pm ۰/۲۸ ^c
۰/۳ درصد	۱۰/۱۶ \pm ۰/۲۵ ^a	۲۸/۷۷ \pm ۱/۲۲ ^c	۳/۴۶ \pm ۰/۲۷ ^c	۰/۶۵ \pm ۰/۰۷ ^{ab}	۱/۵۱ \pm ۰/۱۸ ^b

حروف غیر همنام در هر ستون نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

جدول ۲. اثر مکمل‌سازی جیره قزل‌آلای رنگین‌کمان با عصاره هیدروالکلی پونه کوهی بر فراسنجه‌های خون‌شناسی (میانگین \pm انحراف معیار) در مدت ۴ هفته

تیمار / شاخص	گلبول سفید $\times 10^3$ (میلی‌متر مکعب)	گلبول قرمز $\times 10^6$ (میلی‌متر مکعب)	هماتوکریت (درصد)	هموگلوبین (گرم بر دسی لیتر)
صفر (شاهد)	۱۶/۷۰ \pm ۰/۲۷ ^a	۰/۹۵ \pm ۰/۲۵ ^a	۳۳/۰۰ \pm ۰/۷۶ ^a	۱۰/۰۰ \pm ۰/۰۳ ^a
۰/۱ درصد	۲۵/۰۴ \pm ۰/۱ ^b	۱/۱۵ \pm ۰/۲۰ ^b	۴۵/۳۳ \pm ۰/۵ ^b	۱۴/۹۳ \pm ۰/۰ ^b
۰/۲ درصد	۲۷/۱۶ \pm ۰/۱۶ ^c	۱/۳۱ \pm ۰/۲۶ ^c	۴۷/۸۳ \pm ۰/۳۷ ^c	۱۵/۵۶ \pm ۰/۰۵ ^c
۰/۳ درصد	۲۷/۸۵ \pm ۰/۱ ^c	۱/۳۸ \pm ۰/۱۵ ^c	۴۸/۶۶ \pm ۰/۱ ^c	۱۶/۱۷ \pm ۰/۰ ^d

حروف غیر همنام در هر ستون نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

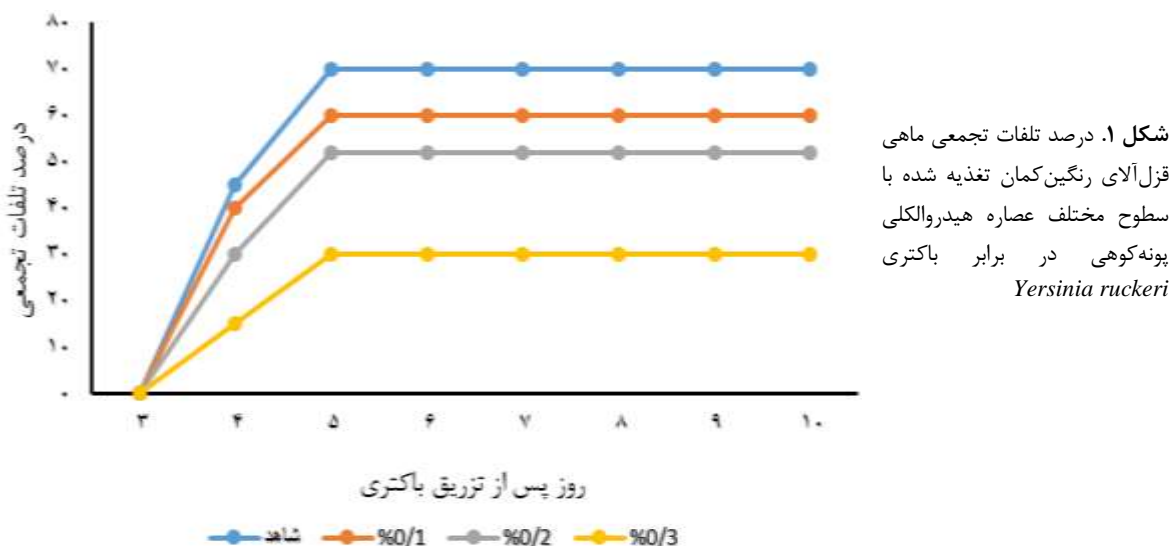
در گروه ۰/۲ و ۰/۳ درصد پونه کوهی مشاهده شد که در مقایسه با گروه شاهد و تیمار تغذیه شده با ۰/۱ درصد پونه کوهی اختلاف معنی‌داری نشان داد ($p < 0.05$).

جدول ۳. اثر مکمل‌سازی جیره قزل‌آلای رنگین‌کمان با عصاره هیدروالکلی پونه کوهی بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون (میانگین \pm انحراف معیار) در مدت ۴ هفته

تیمار / شاخص	پروتئین تام (گرم بر دسی لیتر)	آلبومین (گرم بر دسی لیتر)	گلوبولین (گرم بر دسی لیتر)	آلبومین / گلوبولین	لیزوزیم (واحد بر میلی لیتر)
صفر (شاهد)	۳/۲۹ \pm ۰/۰۶ ^a	۱/۳۳ \pm ۰/۲۰ ^a	۱/۹۶ \pm ۰/۳۱ ^b	۰/۶۷ ^a	۴۲۸/۱۱ \pm ۰/۱۵ ^a
۰/۱ درصد پونه کوهی	۳/۳۸ \pm ۰/۱۵ ^a	۱/۷۶ \pm ۰/۵۶ ^b	۱/۶۲ \pm ۰/۴۱ ^a	۱/۰۸ ^b	۴۲۸/۴ \pm ۰/۲۵ ^a
۰/۲ درصد پونه کوهی	۳/۷۶ \pm ۰/۱ ^b	۱/۹ \pm ۰/۴۵ ^c	۱/۸۶ \pm ۰/۲۸ ^b	۱/۰۲ ^b	۴۳۱/۹۴ \pm ۰/۳۴ ^b
۰/۳ درصد پونه کوهی	۳/۸۶ \pm ۰/۱۲ ^b	۱/۹۵ \pm ۰/۴۳ ^c	۱/۹۱ \pm ۰/۲۳ ^b	۱/۰۲ ^b	۴۳۱/۹۲ \pm ۰/۱۱ ^b

حروف غیر همنام در هر ستون نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

نتایج ارائه‌شده در جدول ۳، افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون (پروتئین تام، آلبومین و نسبت آلبومین به گلوبولین) ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با تمامی سطوح پونه کوهی را نسبت به تیمار شاهد نشان می‌دهد. کمترین میزان گلوبولین در تیمار ۰/۱ درصد ثبت شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد ($p < 0.05$) در حالی که این شاخص در سایر تیمارها با هم و با گروه شاهد هیچ اختلاف معنی‌داری نداشتند ($p > 0.05$). بر اساس نتایج



شکل ۱. درصد تلفات تجمعی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره هیدروالکلی پونه‌کوهی در برابر باکتری *Yersinia ruckeri*

نشان داده شده در جدول ۳، در پایان ۴ هفته، افزایش معنی‌دار لیزوزیم سرم ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سطوح ۰/۲ و ۰/۳ درصد جیره، نسبت به گروه شاهد و تیمار تغذیه شده با ۰/۱ درصد پونه‌کوهی مشاهده شد ($p < 0.05$). اما بین تیمار ۰/۲ و ۰/۳ درصد پونه‌کوهی اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($p > 0.05$).

نتایج تلفات ماهیان در پایان ۱۰ روز رویارویی با باکتری *Yersinia ruckeri*، کاهش معنی‌دار تلفات ($p < 0.05$) را در تیمارهای تغذیه شده با پونه‌کوهی نشان داد (شکل ۱). بالاترین درصد تلفات در پایان آزمایش چالش با باکتری، در تیمار شاهد و کمترین تلفات در گروه تغذیه شده با ۰/۳ درصد پونه‌کوهی مشاهده شد ($p < 0.05$).

نشان داده شده در جدول ۳، در پایان ۴ هفته، افزایش معنی‌دار لیزوزیم سرم ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سطوح ۰/۲ و ۰/۳ درصد جیره، نسبت به گروه شاهد و تیمار تغذیه شده با ۰/۱ درصد پونه‌کوهی مشاهده شد ($p < 0.05$). اما بین تیمار ۰/۲ و ۰/۳ درصد پونه‌کوهی اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($p > 0.05$).

نتایج تلفات ماهیان در پایان ۱۰ روز رویارویی با باکتری *Yersinia ruckeri*، کاهش معنی‌دار تلفات ($p < 0.05$) را در تیمارهای تغذیه شده با پونه‌کوهی نشان داد (شکل ۱). بالاترین درصد تلفات در پایان آزمایش چالش با باکتری، در تیمار شاهد و کمترین تلفات در گروه تغذیه شده با ۰/۳ درصد پونه‌کوهی مشاهده شد ($p < 0.05$).

بحث

در بسیاری از مزارع پرورشی شرایط محیطی نامطلوب نظیر پایین بودن اکسیژن محلول، نوسانات دمایی، افت کیفیت آب جهت پرورش و یا مشکلات مدیریتی شامل تغذیه ناکافی، تغذیه بیش از حد و تراکم خارج از استاندارد، استرس‌هایی را بر ماهیان پرورشی ایجاد نموده که سبب کاهش رشد و تضعیف سیستم ایمنی شده و آن‌ها را در برابر بیماری‌ها مستعد می‌سازد (Winton, 2001). همچنین صنعت آبی‌پروری در دهه‌ی گذشته با چالش‌هایی از قبیل پاتوژن‌های مقاوم و محدودیت در مصرف مواد شیمیایی در درمان بیمارها روبرو بوده است (Dawood and Koshio, 2016). تلاش برای یافتن محرک‌های ایمنی مناسب و مقرون به صرفه، در جهت افزایش پاسخ سیستم ایمنی و بهبود وضعیت سلامت ماهی در برابر عوامل بیماری‌زا افزایش یافت (Dawood and Koshio, 2016; Hossain et al., 2016; Van Hai, 2015). در این بین استفاده از گیاهان برای کنترل عوامل بیماری‌زا با تحریک سیستم ایمنی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر مورد توجه محققان قرار گرفته است (Adel et al., 2016b; Zeraatpisheh et al., 2018; Zolfaghari and Firouzbaksh, 2013).

همان‌طور که نتایج نشان داد، تغذیه ماهی‌ها با جیره‌ی غنی‌شده با پونه‌کوهی سبب بهبود فاکتورهای رشد در قزل‌آلای رنگین‌کمان گردید. اما بیشترین افزایش وزن، نرخ رشد ویژه و کمترین ضریب تبدیل غذایی در ماهی‌های تحت تیمار ۰/۲ درصد از عصاره پونه‌کوهی در طول ۴ هفته تغذیه مشاهده شد. تحقیقات نشان داده که منتول موجود در گیاه خانواده

نعناعیان، ترکیبی اشتها آور، محرک هضم و دارای خاصیت ضد عفونی کنندگی شدید است و این امر غذای مصرفی را افزایش و در نهایت سبب افزایش رشد می‌شود (Sharifi *et al.*, 2011). از طرف دیگر وجود ترکیبات و اسیدهای چرب سمی موجود در عصاره پونه کوهی احتمالاً سبب کاهش نرخ رشد بچه ماهیان شده است. به عبارت دیگر ماهی‌ها، انرژی دریافتی از مواد غذایی را به جای آنکه صرف رشد کنند، صرف بر قرار هموستازی و مقابله با تأثیرات سمی ترکیبات موجود در عصاره پونه کرده‌اند. بنابراین همین امر می‌تواند علت کاهش رشد ماهی در دوز ۰/۳ درصد پونه کوهی باشد. مشابه این وضعیت در ماهی‌های کپور معمولی که با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد عصاره هیدروالکلی پونه کوهی تغذیه شدند نیز مشاهده شده است. نتایج نشان داد که غلظت ۰/۱ درصد پونه کوهی موجب افزایش رشد و دوزهای بالای پونه کوهی کاهش رشد ماهیان را در بر داشت که علت کاهش رشد ماهیان در دوزهای بالای پونه کوهی وجود ترکیبات و اسیدهای چرب سمی موجود در عصاره گزارش شد (Banaee *et al.*, 2016). اثرات مثبت گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) به عنوان محرک رشد در افزایش معنی‌دار ($p < 0/05$) وزن ماهی در گروه‌های آزمایشی ماهی باس دریایی (*Lates calcarifer*) در مقایسه با گروه کنترلی مشاهده شد (Diler, Talpur, 2014). همکاران (۲۰۱۷) طی یک آزمایش ۹۰ روزه تأثیر سطوح مختلف اسانس گیاه مرزنجوش (*Origanum onites*) شامل ۰/۱۲۵، ۱/۵، ۲/۵ و ۳ میلی‌لیتر در کیلوگرم جیره غذایی را روی رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی کردند و مشخص شد که استفاده از اسانس گیاه مرزنجوش وزن نهایی را در مقایسه با گروه کنترلی به طور معنی‌دار افزایش می‌دهد ($p < 0/05$). ضریب تبدیل غذایی با مصرف ۱/۵ و ۳ میلی‌گرم اسانس در هر کیلوگرم جیره در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری بهبود یافت ($p < 0/05$) و Shalvei و همکاران (۲۰۱۷) با استفاده از ۲/۵ و ۵ گرم عصاره اتانولی زنجبیل در کیلوگرم جیره به مدت ۴۵ روز، افزایش معنی‌دار رشد نهایی، کارایی تبدیل غذا و کاهش ضریب تبدیل غذایی را در قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش نمودند ($p < 0/05$).

شاخص‌های خونی به عنوان یک شاخص مهم وضعیت فیزیولوژیک اندام‌های داخلی به شمار می‌روند و به عبارت دیگر، آنالیز خون از نظر پارامترهای خون‌شناسی و بیوشیمیایی در تشخیص بسیاری از بیماری‌ها در آبزیان از اهمیت فراوانی برخوردار است، به طوری که واکنش و تغییر شاخص‌های خونی در استرس‌های محیطی مختلف به عنوان شاخص زیستی مناسب برای ارزیابی وضعیت سلامت ماهی شناخته شده‌اند (Brunt and Austin, 2005). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن سطوح مختلف عصاره هیدروالکلی پونه کوهی به جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان بر پارامترهای خونی تمام تیمارهای تغذیه‌شده با پونه کوهی تأثیر گذاشته است و پارامترهای خونی یک روند افزایشی و معنی‌داری را نشان دادند ($p < 0/05$). تحقیقات نشان داده که گیاهان خانواده‌های نعناعیان دارای ویتامین C هستند، احتمالاً دلیل تأثیر پونه کوهی می‌تواند به علت حضور این ویتامین در گیاه باشد که باعث افزایش جذب آهن و سایر مواد معدنی و ویتامین‌ها از طریق روده می‌شوند و به این صورت تأثیر مثبتی بر پارامترهای خونی دارند (Lim *et al.*, 2000; Rita, 2011; Sharifzadeh *et al.*, 2015).

De Pedro و همکاران (۲۰۰۵) گزارش نمودند که تعداد گلبول‌های سفید به عنوان شاخص مهمی از ایمنی غیراختصاصی در ماهیان به شمار می‌آیند. همچنین آن‌ها در زمان چالش با عوامل بیماری‌زای باکتریایی، ویروس‌ها و انگل‌ها با فعالیت فاگوسیتیک و پاسخ‌های ایمنی مناسب، ماهی را محافظت می‌نماید. مطالعه Ghasemi Pirbalouti و همکاران (۲۰۱۱) نیز نشان داد که استفاده از اسانس پونه کوهی به میزان ۱ درصد در جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از ۸ هفته تغذیه، منجر به افزایش معنی‌دار جمعیت گلبول‌های سفید می‌گردد. بررسی انجام شده روی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با آویشن شیرازی نشان داد که از لحاظ تعداد گلبول قرمز و گلبول سفید در تمام تیمارهای مورد آزمایش، افزایش معنی‌داری ($p < 0/05$) در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند (Ghareghanipoor *et al.*, 2014). Adel و همکاران (۲۰۱۶a) اثر گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) روی پاسخ هماتولوژی و پاسخ ایمنی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) را بررسی نمودند. در پایان ۸ هفته با نمونه‌گیری از خون این ماهیان، محققان عنوان نمودند که میزان هموگلوبین، تعداد گلبول سفید و قرمز در تیمارهایی که از عصاره هیدروالکلی این گیاه در جیره غذایی استفاده نمودند، در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری ($p < 0/05$) نشان دادند. همچنین اثرات مثبت گیاه ریحان (*Ocimum sanctum*)

به عنوان محرک سیستم ایمنی در افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) تعداد گلبول قرمز، گلبول سفید و غلظت هموگلوبین در گروه‌های آزمایشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مقایسه با گروه کنترلی مشاهده شد (Zolfaghari and Firouzbaksh, 2013).

افزایش سطح پروتئین‌های سرم خون، آلبومین، گلوبولین و آنزیم لیزوزیم سرمی به عنوان یک عامل افزایش‌دهنده ایمنی در ماهیان شناخته‌شده است (Wiegertjes et al., 1996). نتایج حاصل از این پژوهش در اندازه‌گیری پروتئین‌های سرم خون ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از ۴ هفته تغذیه با جیره‌های غذایی حاوی عصاره هیدروالکلی پونه‌کوهی، نشان داد که استفاده از عصاره‌ها سهم بسزایی در افزایش پروتئین‌های سرم خون (پروتئین کل، آلبومین، لیزوزیم) داشته است ($p < 0.05$). در مشابهت با نتایج حاضر، Adel و همکاران (۲۰۱۶a) گزارش نمودند که، بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) تغذیه شده با عصاره هیدروالکلی نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) به مدت ۸ هفته، میزان لیزوزیم، پروتئین تام و آلبومین در خونشان افزایش معنی‌داری ($p < 0.05$) در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند. همچنین به دنبال مصرف اسانس گیاه مرزنجوش (*Origanum onites*) (از خانواده نعنائیان) به مدت ۹۰ روز، در قزل‌آلای رنگین‌کمان فعالیت لیزوزیم در تیمارهای تغذیه شده با ۳٪ اسانس اریگانوم افزایش معنی‌داری ($p < 0.05$) یافت (Diler et al., 2017). در مطالعه‌ی حاضر تغذیه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با جیره‌ی غذایی مکمل شده با عصاره‌هیدروالکلی پونه کوهی، با بهبود پارامترهای ایمنی خون ماهیان کاهش معنی‌دار ($p < 0.05$) تلفات در مواجهه با *Yersinia ruckeri* نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید. همچنین نتایج نشان داد که از روز پنجم، تلفات در تمام گروه‌های آزمایشی متوقف شد و ماهیان سلامتی عمومی خود را به دست آورده و شروع به تغذیه نمودند که احتمالاً این امر به دلیل افزایش مقاومت ماهیان بوده است. در مطالعه‌ی Zeraatpisheh و همکاران (۲۰۱۸) با مصرف عصاره آب داغ جلبک سارگاسوم (*Sargassum angustifolium*) در جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان در روز چهارم، تلفات متوقف شد که مشابه نتایج حاضر است. همچنین ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با تغذیه از جیره غذایی مکمل شده با عصاره گیاهی رازیانه (*Foeniculum vulgare*) و آویشن (*Thymus vulgaris*) پارامترهای ایمنی خونشان افزایش یافت و کاهش معنی‌داری در تلفات بعد از رویارویی با باکتری یرسینیا راکری (*Yersinia ruckeri*) نسبت به گروه کنترلی نشان داد (Kucukgul Gulec et al., 2013). همچنین در مطالعه‌ی دیگر به‌کارگیری عصاره آب داغ جلبک سارگاسوم (*Sargassum angustifolium*) به میزان ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره‌ی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مدت ۵۶ روز، بهبود فراسنجه‌های سرمی و خونی ماهیان را در پی داشت و در نهایت باعث افزایش معنی‌دار بازماندگی آن‌ها در برابر *Yersinia ruckeri* نسبت به گروه کنترل شد (Zeraatpisheh et al., 2018). به‌کارگیری عصاره هیدروالکلی نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) در جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) به مدت ۸ هفته، با بهبود پارامترهای ایمنی، افزایش بقای ماهیان را در مواجهه با *Yersinia ruckeri* در برداشت (Adel et al., 2016a).

در ماهی، مکمل‌های غذایی مختلف با خواص محرک سیستم ایمنی مانند پروبیوتیک‌ها (Stoskopf, 1993)، مواد تولید شده توسط باکتری‌ها و ترکیبات گیاهی، می‌توانند به طور مستقیم مکانیسم‌های دفاعی اولیه را فعال سازند (Bricknell and Dalmo, 2005). در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر آن است که استفاده از عصاره هیدروالکلی پونه کوهی به ویژه میزان ۰/۲ و ۰/۳ درصد از جیره ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان منجر به بهبود رشد، تقویت برخی شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی و افزایش مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر باکتری *Yersinia ruckeri* می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از جناب مهندس جانی خلیلی، مسئول آزمایشگاه گروه شیلات دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، به سبب همکاری ارزنده‌شان تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- Adel, M., Pourgholam, R., Zorriehzahra, J., Ghiasi, M. 2016a. Hemato – Immunological and biochemical parameters, skin antibacterial activity, and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following the diet supplemented with *Mentha piperita* against *Yersinia ruckeri*. Journal of Fish and Shellfish Immunology. 55: 267-273.
- Adel, M., Yeganeh, S., Dadar, M., Sakai, M., Dawood, M.A.O. 2016b. Effects of dietary *Spirulina platensis* on growth performance, humoral and mucosal immune responses and disease resistance in juvenile great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1754). Journal of Fish and Shellfish Immunology. 56: 436-444.
- Akhlaghi, M., Sharif Yazdi, H. 2008. Detection and identification of virulent *Yersinia ruckeri* the causative agent of enteric red mouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Fars province, Iran. Iranian Journal of Veterinary Research Shiraz University. 9(4): 347-352. (in persian)
- Austin, B., Austin, D.A. 1999. Bacterial fish pathogens disease in farmed and wild fish 3rd edition, Springer-Praxis Godalming UK.
- Banaee, M., Nemat Dust Haghi, B., Shokat, P. 2016. Effect *Mentha longifolia* on Biochemical parameters and growth indices in common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Aquaculture Development. 10(3): 39-55.
- Bricknell, I., Dalmo, RA. 2005. The use of immune stimulants in fish larval aquaculture. Journal of Fish and Shellfish Immunology. 19: 457-472.
- Brunt, J., Austin, B. 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Disease. 28: 693-701.
- Dawood, M.A.O., Koshio, S. 2016. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: a review. Journal of Aquaculture. 454: 243-251.
- de Pedro, N., Guijarro, A.I., Lopez-Patino, M.A., Martinez-Alvarez, M.J., Delgado R. 2005. Daily and seasonal variations in hematological and blood biochemical parameters in the tench, *Tinca tinca* Linnaeus, 1758. Journal of Aquacult Research. 36: 1185-1196.
- Diler, O., Gormez, O., Diler, I., Metin, S. 2017. Effect of oregano (*Origanum onites* L.) essential oil on growth, lysozyme and antioxidant activity and resistance against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Aquaculture Nutrition. 23(4): 844-851.
- Drobkin, D.R. 1945. Crystallographic and optical properties of human hemoglobin: a proposal for the standardization of hemoglobin. American Journal of Medicine Science. 209: 268-270.
- Dugenci, S.K., Arda, N., Candan, A. 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. Journal of Ethnopharmacology. 88: 99-106.
- Durrani, F.R., Abidullah, N., Chand, Z., Durrani, S. 2008. Hematological, biochemical, immunomodulatory and growth promoting effect of feed added wild mint (*Mentha longifolia*) in broiler chicks. Sarhad Journal of Agriculture. 24(4): 661-664.
- Erdemoglu, N., Kupeli, E., Yesilada, E. 2003. Anti – inflammatory and antinociceptive assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. Journal of Ethnopharmacology. 89(1): 123-129.
- Ghareghanipoor, M., Akbary, P., Akhlaghi, M., Fereidouni, M.S. 2014. Non-specific immune responses and immune related genes expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) fed *Zataria multiflora* Boiss extract. Journal of Bulletin Environment, Pharmacology and Life Sciences. 3(5): 140-146.
- Ghasemi Pirbalouti, A., Piralı, A., Pishkar, GH., Jalali, S.M.A., Raissy, M., Jafarian- Dehkordi, M., Hamedi, B. 2011. Effect of some drug herbal essential oil on immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Herbal Drugs. 2(2): 149-155. (in persian)
- Govind, P., Madhuri, S., Mandloi, AK. 2012. Medicinal plants useful in fish diseases. Journal of Plant Archives. 12(1): 1-4.
- Hevroy, E.M., Espe, M., Waagbo, R., Sandness, K., Rund, M., Hemre, G.I. 2005. Nutrition utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) fed increased level of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. Journal of Aquacult Nutrition. 11: 301-313.

- Hossain, M.S., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Sony N.M., Dawood M.A.O., Kader, M.A., Bulbul, M., Fujieda, T. 2016. Efficacy of nucleotide related products on growth, blood chemistry, oxidative stress and growth factor gene expression of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. *Journal of Aquaculture*. 464: 8-16.
- KucukgulGulec, A., Danabas, D., Ural, M., Seker, E., Arslan, A., Serdar, O. 2013. Effect of mixed use of thyme and fennel oils on biochemical properties and electrolytes in rainbow trout as a response to *Yersinia ruckeri* infection. *Journal of Acta Veterinaria Brunensis*. 82(3): 297-302.
- Lim, C., Klesius, PH., Li, MH., Robinson, EH. 2000. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Journal of Aquaculture*. 185: 313 -327.
- Jian, J., Wu, Z. 2004. Influences of traditional chinese medicine on nonspecific immunity of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Journal of Fish and Shellfish Immunology*. 16: 185-191.
- Koliopoulos, G., Pitarokili, D., Kioulos, E., Michaelakis, A., Tzakou, O. 2010. Chemical composition and larvicidal evaluation of *Mentha*, *Salvia*, and *Melissa* essential oils against the West Nile virus mosquito *Culex pipiens*. *Journal of Parasitology Research*. 107: 327-335.
- Kumari, J., Sahoo, P.K., Swain, T., Sahoo, S.K., Sahu, B., Mohanty, B.R. 2006. Seasonal variation in the innate immune parameters of the Asia catfish *Clarias batrachus*. *Journal of Aquaculture*. 252: 121-127.
- Nayak, S.K., Swain, P., Nanda, P.K., Dash, S., Shukla, S., Meher, P.K., Maiti, N.K. 2008. Effect of endotoxin on the immunity of Indian major carp, *Labeo rohita*. *Journal of Fish and Shellfish Immunology*. 24: 394-399.
- Pandian, T.J., Koteeswaran, R. 1998. Ploidy induction and sex control in fish. *Journal of Hydrobiologia*. 384: 167-243.
- Rita, P., Animesh, D.K. 2011. An updated overview on peppermint (*Mentha piperita*). *International Research Journal of Pharmacy*. 2: 1-10.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Journal of Aquaculture*. 172: 63-92.
- Sharifi, S.D., Hasani Khorsandi, S., Khadem, A., Salehi, A. 2011. The effect of four medicinal plants on performance and concentration of serum lipids in broiler chicks. *Journal of Medicinal Plants*. 11(8): 83-92.
- Sharifzadeh, SH., Khara, H., Ghobadi, S. 2015. Effects of vitamins E and Riboflavin (B2) and combinations of them on the hematological parameters of common carp, *Cyprinus carpio* L., fingerlings. *Journal of Archives of Polish Fisheries*. 23: 107-111.
- Shaluei, F., Nematollahi, A., Naderi-Farsani, H.R., Rahimi, R., Kaboutari Katadj, J. 2017. Effect of ethanolic extract of *Zingiber officinale* on growth performance and mucosal immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Aquaculture Nutrition*. 23(4): 814-821.
- Stoskopf, M.K. 1993. *Fish Medicine*. Sanders, W.B. Philadelphia, USA.
- Talpur, AD. 2014. *Mentha piperita* (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch) against *Vibrio harveyi* infection. *Journal of Aquaculture*. (420-421): 71-78.
- Unnithan, C.R., Gebreselassie, H., Sushen, U., Reddy, D.N., Woldu, A., Muuz, M. 2013. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Mentha longifolia* L of Mekole, Ethiopia. *Journal of Biological and Scientific Opinion*. 1(3): 151-153.
- Van Hai, N. 2015. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: review. *Journal of Aquaculture*. 446: 88-96.
- Wiegertjes, G.F., Stet, R.J., Parmentier, H.K., Van Muiswinkel, W.B. 1996. Immunogenetics of disease resistance in fish; a comparable approach, *Development and Comparative Immunology*. 20: 365-381.
- Winton J.R. 2001. Fish health management. In: *Fish Hatchery Management*. Wedemeyer, G. (ed). (2nd ed.) American Fisheries Society. Bethesda, Maryland, USA. pp. 559-639.
- Yildiz M., Köse I., Issa Gh., Kahraman, T. 2015. Effect of different plant oils on growth performance, fatty acid composition and flesh quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*. 46(12): 2885-2896.

- Zeraatpisheh, F, Firouzbakhsh, F, Jani Khalili, Kh. 2018. Effect of the macroalga *Sargassum angustifolium* hot water extract on hematological parameters and immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with *Yersinia ruckeri*. Journal of Applied Phycology. 30(3), 2029-2037.
- Zolfaghari, A, Firouzbakhsh, F. 2013. The effect of Basil (*Ocimum basilicum*) aqueous extract on growth change, hematology and serum biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Veterinary Research. 68(4): 397-404.