

"مقاله پژوهشی"

ارزیابی اثر اسانس اکالیپتوس (*Eucalyptus globulus*) بر شاخص های رشد، خون، ایمنی و افزایش مقاومت در برابر آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) در ماهیان کپور پرورشی (*Cyprinus carpio*)

مریم قیاسی^{*}، محمد بینایی^۱، بابک قائدنیا^۱، سید محمد وحید فارابی^۱، احترام السادات علوی^۱

۱- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران
۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۷/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۲۱

چکیده

امروزه استفاده از گیاهان دارویی به عنوان محرک رشد و ایمنی جایگاه ویژه‌ای در صنعت آبرزی پروری یافته‌است. در این بررسی اثر اسانس اکالیپتوس بر شاخص های خون، ایمنی، رشد و مقاومت کپور در برابر آئروموناس هیدروفیلا مورد ارزیابی قرار گرفت. ۲۴۰ عدد ماهی کپور (با میانگین وزنی $0/6 \pm 53/64$ گرم) در چهار تیمار شامل شاهد و سه گروه تیمار با اسانس اکالیپتوس به میزان ۰/۳، ۰/۱۵ و ۰/۳ میلی‌لیتر به ازاء کیلوگرم وزن ماهی به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. در پایان هفته هشتم آزمایش، ۱۲ ماهی از هر گروه بیهوش و زیست سنجی شدند. سپس از ۹ عدد آنها خون‌گیری انجام شد. همچنین در همین زمان ۳۰ ماهی از هر تیمار با تزریق داخل صفاقی ۰/۱ میلی‌لیتر باکتری آئروموناس هیدروفیلا (با شماره دستیابی JF313402) با غلظت نهایی $10^7 \times 1/2$ CFU/ml مواجهه و میزان تلفات تا دو هفته ثبت گردید. نتایج نشان داد میزان گلبول قرمز و هموگلوبین در تمام تیمارها در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌دار داشت، ولی هماتوکریت فقط در تیمارهای ۰/۳ و ۰/۶ بطور معنی‌داری از شاهد بیشتر بود. تعداد گلبول‌های سفید، میزان رادیکال آزاد اکسیژن، لیزوزیم و Igm با روند افزایش دوز عصاره افزایش معنی‌داری در گروه‌های تیمار نسبت به شاهد داشتند. ولی میزان آنزیم‌های سرمی ALT و AST تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌های تیمار و شاهد نشان ندادند. شاخص‌های رشد شامل میزان وزن نهایی، افزایش وزن بدن و ضریب رشد ویژه بطور معنی‌داری در تیمار ۰/۶ در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشت، ولی میزان ضریب تبدیل غذایی بطور معنی‌داری کمتر بود. بعد از مواجهه با باکتری آئروموناس هیدروفیلا درصد بقا پس از ۱۴ روز در گروه‌های شاهد، تیمار ۰/۱۵، ۰/۳ و ۰/۶ به ترتیب ۳۷/۸، ۵۴/۶۱، ۷۱/۹۳ و ۸۶/۲۳ بود. براساس نتایج به نظر می‌رسد اسانس اکالیپتوس یک محرک ایمنی و رشد مناسب در ماهیان کپور است و می‌تواند در پرورش کپورماهیان مورد استفاده قرار بگیرد.

کلمات کلیدی: کپور معمولی، اکالیپتوس، آئروموناس هیدروفیلا، لیزوزیم، ضریب رشد ویژه.

مقدمه

آبی‌پروری در دنیای صنعتی روبه رشد با هدف تولید پروتئین حیوانی با کیفیت است. در بین ماهیان پرورشی، کپور ماهیان از مهمترین ماهیان پرورشی آب شیرین هستند، بطوری که میزان تولید جهانی آنها از سال ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۸، ۲۲/۱٪ افزایش داشته است (FAO, 2020). تولید این گروه از ماهیان در ایران از جایگاه ویژه‌ای برخوردار بوده و میزان تولید ماهیان گرمابی از سال ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۹، یک افزایش ۱۹/۲٪ را نشان می‌دهد. این درحالی است که این افزایش تولید تنها در کنار ۷/۲٪ افزایش مساحت زیر کشت بدست آمده (سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۴۰۰) و این افزایش تولید ناشی از افزایش تراکم در واحد سطح بوده است. محدودیت منابع آب و زمین، آبی‌پروری را به سمت سیستم‌های پرورش نیمه متراکم و متراکم سوق داده، ولی این افزایش تراکم موجب افزایش استرس و در نهایت تضعیف ایمنی و حساسیت ماهیان به بیماری‌های عفونی شده‌است (Harikrishnan, 2011). آنتی‌بیوتیک‌ها مهم‌ترین ترکیبات مصرفی در کنترل بیماری‌های عفونی هستند، ولی ایجاد سوش‌های میکروبی مقاوم به درمان، هزینه بالا دارو درمانی، تخریب فلور میکروبی آب و ایجاد باقی‌ماندگی در گوشت ماهیان محدودیت مصرف آنها را سبب شده است (Biswas et al., 2010; Bulfon et al., 2015; Erguig et al., 2015; Syahidah et al., 2015; Cabello et al., 2016; Sneeringer et al., 2019). هرچند واکسیناسیون یکی از روش‌های موثر پیش‌گیری از بروز بیماری‌های عفونی شناخته شده ولی به دلیل

تفاوت‌های آنتی‌ژنی و نیز قیمت بالای واکنس محدودیت‌هایی در مصرف دارد. به همین دلیل محققین درصدد یافتن ترکیبات با قابلیت تحریک سیستم ایمنی و افزایش مقاومت ماهی در برابر پاتوژن‌ها هستند (Bulfon et al., 2013). گیاهان دارویی به دلیل داشتن اثرات ضد استرس، ضد التهاب، تحریک کننده سیستم ایمنی، خواص ضد میکروبی و انگلی، محرک رشد و خواص آنتی‌اکسیدانی، داشتن متابولیت‌های بی‌ضرر و قیمت ارزان از مهم‌ترین گزینه‌ها در جهت ارتقا سلامت و ایمنی ماهیان شناخته شده‌اند (Elumalai et al., 2020). گیاه اکالیپتوس بومی استرالیا است ولی از حدود ۸۰ سال پیش وارد ایران شده و امروزه در بسیاری از نقاط کشور خصوصا در استان‌های جنوبی و شمالی کشور به فراوانی یافت می‌شود (صادقی و همکاران، ۱۳۹۷). ۳۰۰ گونه اکالیپتوس در جهان وجود دارد، ولی تنها ۲۰ گونه از نظر تولید اسانس با مصارف دارویی و صنعتی ارزش اقتصادی دارند و *Eucalyptus globulus* یکی از آنها است. تهیه اسانس از بخش‌های مختلف این گیاه شامل برگ، پوست ساقه، شکوفه، ریشه و میوه انجام می‌شود (Barbosa et al., 2016). مطالعات مختلف نشان داده است که اسانس گرفته شده از این گیاه واجد خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد ویروس، باکتری، انگل، قارچ، ضد دیابت، بهبود دهنده زخم، ضد سرطان، ممانعت کننده از ایجاد پلاک دندانی، ضد التهاب، بهبود دهنده بیماری‌های تنفسی و مالاریا است (Kumar and Laxmidhar, 2011).

مواد و روش‌ها

آماده سازی جیره: اسانس گیاه اکالیپتوس (شرکت باریج اسانس، ایران) در دوزهای ۰/۱۵، ۰/۳ و ۰/۶ میلی‌لیتر به ازاء کیلوگرم وزن ماهی با استفاده از روغن مایع به غذای تجاری (بیضا ۲۱، ایران) افزوده شد (Gholipourkanani et al., 2017).

شرایط پرورش: تعداد ۲۴۰ عدد ماهی کپور (متوسط وزن گرم $0.6 \pm 53/64$) از یکی از مزارع پرورش ماهیان گرمابی در شهرستان جویبار تهیه و در ۱۲ تانک با گنجایش ۲۵۰ لیتر (در هر تانک ۱۵ عدد ماهی) توزیع شدند. ماهیان به مدت دو هفته آدپتاسیون را پشت سر گذاشته و در این مدت با جیره پایه (شرکت بیضا ۲۱) تغذیه شدند. پس از اطمینان از سلامت ماهیان، تیمار بندی و با جیره‌های پیش بینی شده به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. آب مورد استفاده برای پرورش آب چاه بود که پس از هوادهی وارد تانک‌ها می‌شد. میانگین شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی آب شامل اکسیژن محلول $7/8 \pm 6/6$ میلی‌گرم در لیتر، دما $22/1 \pm 2/2$ درجه سانتی‌گراد و $7/0 \pm 8/4$ pH بود. میزان غذای روزانه ماهیان بر حسب درصد وزن بدن، دمای آب و بر اساس جدول غذادهی ۳-۳/۵ درصد وزن بدن تعیین شد. تعداد دفعات غذادهی سه بار در روز (صبح، ظهر، عصر) به صورت دستی انجام می‌شد. تعویض آب تانک‌ها به صورت روزانه و به میزان ۵۰-۴۰ درصد حجم هر تانک انجام می‌شد.

خون‌گیری: بعد از ۸ هفته تغذیه، ماهیان ۲۴ ساعت قطع غذا و تعداد ۱۲ ماهی از هر تیمار بطور تصادفی صید و با استفاده از پودر گل میخک (۰/۵ گرم در لیتر) (قیاسی و همکاران، ۱۳۹۹) بیهوش و وزن آنها با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه-

مطالعات محدودی در خصوص اثرات مفید اسانس این گیاه در ماهیان پرورشی انجام شده است. Khosravi و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که اسانس اکالیپتوس قادر به کنترل آلودگی‌های قارچی در هجری ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان است. اسانس *Eucalyptus globulus* مانع از رشد برخی باکتری‌های بیماری‌زا در ماهی مانند استرپتوکوکوس اینیایی، استرپتوکوکوس پارایوبریس، لاکتوکوکوس گارویه، ادرواردزیلا تاردا، فتوباکتریوم دم‌سلا و ویبریو هاروی (Park et al., 2016) و آئروموناس هیدروفیلا (رودبارکی و همکاران، ۱۳۹۶) در شرایط آزمایشگاهی شده و به عنوان ترکیبی مناسب برای مقابله با بیماری‌های عفونی در ماهیان پیشنهاد شده است. مطالعه رودبارکی و همکاران (۱۳۹۷) نشان داد استفاده از عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس خصوصا در غلظت‌های پایین به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی در کنترل عفونت ناشی از آئروموناس هیدروفیلا در ماهی آمور قابل استفاده است. همچنین نتایج بدست آمده در خصوص مصرف خوراکی اسانس اکالیپتوس در ماهیان کپور پرورشی نشان داده که استفاده از اسانس این گیاه قادر به بهبود پاسخ‌های ایمنی در کپور ماهیان پرورشی است (شیخ‌زاده و همکاران ۱۳۸۸، Sheikhzadeh et al., 2011). از آنجایی که تاکنون اطلاعات جامعی در خصوص تاثیر مصرف خوراکی اسانس *Eucalyptus globulus* در کپور ماهیان پرورشی انجام نشده است، لذا در این مطالعه تلاش شده تا تاثیرات مصرف جیره‌های این اسانس بر شاخص‌های خون، سرم، ایمنی و رشد کپور پرورشی و نیز مقاومت آنها در برابر باکتری آئروموناس هیدروفیلا مورد ارزیابی قرار گیرد.

اندازه گیری شاخص های سرمی و ایمنی:

ارزیابی شاخص هایی چون پروتئین تام سرم، آلبومین، IgM تام سرم، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آلانین آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر (Eurolyzer ساخت بلژیک) و با استفاده از کیت تجاری (شرکت پارس آزمون، ایران) انجام شد (Binaii et al., 2014). در تعیین میزان فعالیت لیزوزیم سرم از روش Ellis (۱۹۹۰) استفاده شد. سطح فعالیت لیزوزیم به روش کدورت سنجی و با استفاده از سوسپانسیون باکتری میکروکوکوس لیزودیکتیکوس (سیگما، آمریکا) و آنزیم مورامیداز صورت گرفت. جهت ارزیابی میزان تولید رادیکال آزاد اکسیژن براساس روش توضیح داده شده توسط Ghiasi و همکاران (۲۰۱۸) و با استفاده از دستگاه Luminoscan Ascent (Thermo, Finland) انجام گردید.

مواجهه سازی با باکتری: پس از پایان دوره،

تیمارهای مختلف با باکتری آنروموناس هیدروفیلا (با شماره دستیابی JF313402) با تزریق ۰/۱ میلی لیتر باکتری با غلظت نهایی 1×10^7 CFU/ml به صورت داخل صفاقی مواجهه داده شدند. روند مرگ و میر در تیمارهای مورد آزمایش به مدت ۱۴ روز مورد بررسی قرار گرفت. تلفات و علائم بالینی در هر تیمار بصورت روزانه ثبت گردید تا درصد بقا محاسبه گردد. جهت تأیید تشخیص بیماری در ماهیان واجد علائم بالینی از بافت های کلیه و کبد نمونه تهیه و بر روی محیط کشت (TSA) کشت داده و به مدت ۴۸ ساعت در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد (Soltanian et al., 2016).

گیری و ثبت شد. خون گیری از ساقه دمی ۹ ماهی از هر تیمار با سرنگ استریل انجام و ۲ میلی لیتر خون اخذ و ۱ میلی لیتر از آن به میکروتیوب حاوی ماده ضد انعقاد هپارین (۰/۲ میلی گرم در هر لیتر خون) و ۱ میلی لیتر آن به میکروتیوب فاقد هپارین منتقل شد. نمونه ها در کنار یخ سریعاً به آزمایشگاه خون شناسی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل شدند (قیاسی و همکاران، ۱۳۹۹).

اندازه گیری شاخص های رشد: شاخص های

رشد شامل میانگین افزایش وزن بدن، ضریب رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی طبق روابط زیر محاسبه گردید (Tacon, 1990).

افزایش وزن بدن: وزن ابتدایی بر حسب گرم - وزن نهایی بر حسب گرم = افزایش وزن بدن (بر حسب گرم)
ضریب رشد ویژه: $100 \times \{(\text{تعداد روزهای پرورش})\}$
 میانگین وزن اولیه - میانگین وزن ثانویه

ضریب تبدیل غذایی: افزایش وزن بدن بر حسب گرم / مقدار غذای خورده شده بر حسب گرم

اندازه گیری شاخص های خونی: برای

شمارش گلبول قرمز و سفید، نمونه خون با محلول ریس به نسبت ۱ به ۲۰۰ (برای گلبول قرمز) و ۱ به ۲۰ (برای گلبول سفید) رقیق شده و در نهایت سلول ها با استفاده از لام هموسیتمتر شمارش شدند. میزان هماتوکریت با استفاده از لوله میکروهماوکریت پس از سانتریفوژ (۵ دقیقه در ۱۰۰۰ rpm) با استفاده از خط - کش مخصوص انجام گردید. میزان هموگلوبین نیز با استفاده از روش سیانومت هموگلوبین انجام شد. شمارش افتراقی گلبولهای سفید خون با تهیه گسترش خون و رنگ آمیزی با رنگ گیمسا و شمارش در زیر میکروسکوپ نوری انجام شد (Lee et al., 1998).

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با

استفاده از نرم‌افزار SPSS ۲۰ و با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) و مقایسه میانگین بین تیمارهای مختلف بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تعیین گردید (Zar, 1994).

نتایج

نتایج مربوط به ارزیابی شاخص‌های خونی در جدول ۱ آمده است. براساس نتایج تعداد گلبول قرمز و میزان هموگلوبین در تمام تیمارها بطور معنی‌داری بیشتر از شاهد بود ($p < 0.05$). میانگین درصد هماتوکریت در تیمارهای ۰/۳ و ۰/۶ بطور معنی‌داری در مقایسه با شاهد افزایش داشت ($p < 0.05$). تعداد گلبول‌های سفید با روند افزایش دوز عصاره افزایش معنی‌دار پیدا کرد، بطوریکه تیمارهای ۰/۳ و ۰/۶ افزایش معنی‌داری در مقایسه با شاهد داشتند ($p < 0.05$) و بیشترین میزان در بین تیمارها نیز مربوط به تیمار ۰/۶ بود. میانگین درصد لنفوسیت در تیمار ۰/۶ در مقایسه با سایر تیمارها کاهش معنی‌دار داشت ($p < 0.05$), در حالیکه نتایج میانگین درصد نوتروفیل کاملاً عکس این بود. همان‌طور که در جدول ۲ آمده است نتایج شاخص‌های سرمی نشان می‌دهد که میزان پروتئین تام و آلبومین سرم تنها در تیمار ۰/۶ در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌دار داشته است

($p < 0.05$). در ارزیابی آنزیم‌های سرمی ALT و AST تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیمار و شاهد مشاهده نشد ($p > 0.05$). در خصوص شاخص‌های ایمنی، میزان لیزوزیم در تیمارهای ۰/۳ و ۰/۶ در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). همچنین میزان IgM تام سرم در تیمار ۰/۳ و ۰/۶ در مقایسه با تیمار ۰/۱۵ و شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$) (جدول ۲). ارزیابی میانگین تولید رادیکال آزاد اکسیژن نشان داد که افزایش این شاخص وابسته به دوز بوده و در تیمارهای ۰/۳ و ۰/۶ افزایش معنی‌داری در مقایسه با شاهد داشته ($p < 0.05$) و در بین گروه‌های تیمار، گروه ۰/۶ بیشترین میزان را داشته است (شکل ۱). نتایج مربوط به شاخص‌های رشد نشان داد که میزان وزن نهایی، افزایش وزن بدن و ضریب رشد ویژه بطور معنی‌داری در تیمار ۰/۶ در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشته است ($p < 0.05$) در حالیکه میزان ضریب تبدیل غذایی در این تیمار بطور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود ($p < 0.05$). نتایج درصد بقا ماهیان پس از تجویز باکتری آئروموناس هیدروفیلا نشان داد که میزان درصد بقا پس از ۱۴ روز در گروه‌های شاهد، تیمار ۰/۱۵، ۰/۳ و ۰/۶ به ترتیب ۳۷/۸، ۵۴/۶۱، ۷۱/۹۳ و ۸۶/۲۳ بوده است (جدول ۳).

جدول ۱: مقایسه میانگین شاخص های خونی ماهیان کپور تغذیه شده با دوزهای مختلف اسانس اکالیپتوس بعد از ۸ هفته

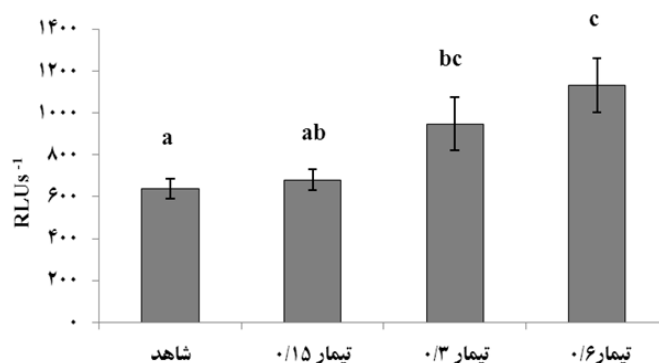
شاخص تیمار	گلبول قرمز (mm ³ × ۱۰ ^۶ سلول)	هموگلوبین (gdL ⁻¹)	هماتوکریت (%)	گلبول سفید (mm ³ سلول)	لنفوسیت (%)	نوتروفیل (%)
شاهد	۱/۴۰ ± ۰/۵۶ ^a	۲/۷۵ ± ۰/۱۴ ^a	۱۰/۴۹ ± ۰/۳۶ ^a	۸۶۵۵ ± ۳۸۹/۴۸ ^a	۵۸/۳۰ ± ۱/۶۷ ^b	۴۱/۷۰ ± ۱/۶۷ ^a
تیمار ۰/۱۵	۱/۶۰ ± ۰/۳۹ ^b	۳/۷۲ ± ۰/۱۱ ^b	۱۱/۸۶ ± ۰/۳۹ ^{ab}	۹۵۱۵ ± ۲۱۸/۳۳ ^{ab}	۵۶/۳۰ ± ۱/۴۳ ^{ab}	۴۳/۷۰ ± ۱/۴۳ ^{ab}
تیمار ۰/۳	۱/۶۱ ± ۰/۳۲ ^b	۳/۷۶ ± ۰/۱۷ ^b	۱۲/۰۹ ± ۰/۵۴ ^b	۱۰۱۵۰ ± ۴۴۷/۰۳ ^{bc}	۵۵/۳۰ ± ۲/۰۷ ^b	۴۴/۷۰ ± ۲/۰۷ ^b
تیمار ۰/۶	۱/۸۰ ± ۰/۸۹ ^b	۴/۲۳ ± ۰/۲۷ ^b	۱۳/۲۷ ± ۰/۶۲ ^b	۱۰۹۹۰ ± ۱۲۹/۴۸ ^c	۵۱/۷۰ ± ۲/۳۹ ^a	۴۸/۳۰ ± ۲/۳۹ ^b

جدول ۲: مقایسه میانگین شاخص های سرمی ماهیان کپور تغذیه شده با دوزهای مختلف اسانس اکالیپتوس بعد از ۸ هفته

شاخص تیمار	پروتئین تام (gdL ⁻¹)	آلبومین (gdL ⁻¹)	ALT IUdL ⁻¹	AST IUdL ⁻¹	IgM تام (mgdL ⁻¹)	لیزوزیم (μgmL ⁻¹)
شاهد	۳/۳۳ ± ۰/۱۱ ^a	۱/۴۰ ± ۰/۱۱ ^a	۷/۱۳ ± ۱/۲۰ ^a	۷۹/۱۸ ± ۶/۹۶ ^a	۵۶/۵۷ ± ۳/۸۹ ^a	۴/۹۹ ± ۰/۶۹ ^a
تیمار ۰/۱۵	۳/۶۰ ± ۰/۱۶ ^a	۱/۸۹ ± ۰/۱۶ ^{ab}	۷/۰۷ ± ۰/۶۷ ^a	۷۶/۱۵ ± ۷/۳۶ ^a	۶۲/۵۷ ± ۳/۹۲ ^a	۵/۲۸ ± ۰/۹۴ ^{ab}
تیمار ۰/۳	۳/۷۹ ± ۰/۶۷ ^{ab}	۱/۸۴ ± ۰/۱۸ ^{ab}	۶/۱۸ ± ۰/۶۶ ^a	۷۳/۹۲ ± ۷/۲۱ ^a	۷۷/۲۲ ± ۳/۶۴ ^b	۵/۶۹ ± ۰/۲۱ ^b
تیمار ۰/۶	۴/۱۷ ± ۰/۲۰ ^b	۲/۱۶ ± ۰/۲۱ ^b	۵/۹۹ ± ۰/۲۱ ^a	۶۲/۴۲ ± ۴/۶۶ ^a	۷۸/۱۹ ± ۵/۰۸ ^b	۷/۰۳ ± ۰/۳۷ ^b

جدول ۳: مقایسه میانگین شاخص های رشد ماهیان کپور تغذیه شده با دوزهای مختلف اسانس اکالیپتوس بعد از ۸ هفته

شاخص	شاهد	تیمار ۰/۱۵	تیمار ۰/۳	تیمار ۰/۶
وزن اولیه (گرم)	۵۲/۵۸ ± ۲/۹۴ ^a	۵۳/۴۱ ± ۲/۵۵ ^a	۵۴/۱۲ ± ۱/۹۶ ^a	۵۳/۴۹ ± ۲/۵۵ ^a
وزن نهایی (گرم)	۱۱۴/۹۱ ± ۳/۴۹ ^a	۱۲۱/۶۶ ± ۲/۸۰ ^{ab}	۱۲۸/۹۱ ± ۵/۵۴ ^{ab}	۱۴۱/۱۹ ± ۶/۴۵ ^b
افزایش وزن بدن (گرم)	۶۲/۳۱ ± ۵/۷۶ ^a	۶۸/۷۱ ± ۳/۶۰ ^{ab}	۷۴/۷۹ ± ۴/۳۷ ^{ab}	۸۴/۹۷ ± ۵/۲۱ ^b
ضریب رشد ویژه (%)	۰/۷۲ ± ۰/۰۸ ^a	۰/۸۵ ± ۰/۰۵ ^{ab}	۰/۹۱ ± ۰/۱۴ ^{ab}	۱/۰۷ ± ۰/۰۹ ^b
ضریب تبدیل غذایی	۲/۹۳ ± ۰/۲۴ ^b	۲/۶۷ ± ۰/۲۲ ^{ab}	۲/۶۲ ± ۰/۲۳ ^{ab}	۲/۴۱ ± ۰/۲۱ ^a



شکل ۱: مقایسه میانگین تولید رادیکال آزاد اکسیژن ماهیان کپور تغذیه شده با دوزهای مختلف اسانس اکالیپتوس بعد از ۸ هفته

بحث

استفاده از محرک‌های ایمنی با منشا گیاهی با توجه به مزیت‌های متعدد، در سالهای اخیر جایگاه ویژه‌ای در تحقیقات آبی‌پروری یافته و بررسی اثرات تحریک‌رشد و ایمنی و افزایش مقاومت ماهیان در برابر بیماری‌های عفونی در پی تجویز فرآورده‌های گیاهی هدف بسیاری از تحقیقات قرار گرفته‌است (Stratev et al., 2018; Shakya, 2017). نتایج این بررسی نشان داد که استفاده از اسانس *Eucalyptus globulus* سبب افزایش معنی‌دار میزان گلبول قرمز و سفید، هماتوکریت و هموگلوبین ماهیان کپور شده است. Belo (2015) نشان داد که افزودن برگ خشک شده این گیاه به جیره غذایی بلدرچین ژاپنی سبب افزایش میزان گلبول‌های قرمز و سفید، هموگلوبین و هماتوکریت شده‌است. همچنین در تجویز جیره‌های اکالیپتول (مهمترین ترکیب تشکیل دهنده اسانس اکالیپتوس) به کپور ماهیان به میزان ۰/۵ و ۱٪ در کیلوگرم جیره به مدت ۱۴ روز میزان گلبول‌های قرمز و سفید و هموگلوبین در گروهای تیمار بطور معنی‌داری افزایش داشت (Hoseini et al., 2018). بررسی‌های مختلف نشان داده‌است که برگ و اسانس حاصل از برگ گیاه *Eucalyptus globulus* سرشار از ویتامین C، بتا کاروتن، B12، آهن، روی و منیزیوم است (Hayat et al., 2015). مطالعات نشان داده ویتامین C نقش مهمی در جذب آهن دارد (Adel and Khara, 2016) و غنی بودن اسانس این گیاه از این دو ماده می‌تواند دلیل افزایش تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت باشد. همچنین اکالیپتوس به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی می‌تواند روند خون‌سازی را بهبود بخشد و تولید گلبول‌های سفید و قرمز را افزایش دهد

(Cho, 2012; Ciftci et al., 2011). بیگانه‌خواری و تولید رادیکال آزاد اکسیژن یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های باکتری‌کشی در ماهیان است که توسط سلول‌های بیگانه‌خوار در خون (نوتروفیل و مونوسیت) و بافت‌ها (ماکروفاژ) انجام گرفته و سبب حذف باکتری‌ها می‌شوند (Adel et al., 2016). در این بررسی میزان تولید رادیکال آزاد اکسیژن در تیمارهای ۰/۳ و ۰/۶ بطور معنی‌داری در مقایسه با شاهد افزایش داشت. Serafino و همکاران (2008) نشان دادند فعالیت بیگانه‌خواری و تولید رادیکال آزاد اکسیژن مونوسیت‌های انسان در شرایط آزمایشگاهی پس از مواجهه با اسانس اکالیپتوس افزایش می‌یابد. از سوی دیگر در بررسی حاضر معلوم شد تعداد نوتروفیل‌ها در دو تیمار ۰/۳ و ۰/۶ نیز افزایش معنی‌داری در مقایسه با شاهد داشته است، که خود می‌تواند افزایش معنی‌دار تولید رادیکال آزاد اکسیژن در این مطالعه را توجیه نماید. در این مطالعه تعداد لنفوسیت‌ها در تیمارها در مقایسه با شاهد کمتر بود. باید توجه داشت این کاهش دلیل بر کم شدن لنفوسیت‌ها نیست بلکه به دلیل روش شمارش این سلول‌ها است. در روش شمارش تفریقی با استفاده از گسترش خون بر روی لام، ۱۰۰ عدد سلول شمارش می‌شود و تعداد سلول‌ها در این ۱۰۰ عدد محاسبه می‌شود و به دلیل تراکم بیشتر نوتروفیل شمارش شده درصد لنفوسیت در محاسبه نهایی کمتر شده است (قیاسی و همکاران، ۱۳۹۹). اصولاً افزایش پروتئین تام سرم و آلبومین معمولاً با ایجاد پاسخ‌های قوی ایمنی در ماهیان همراه است (Ghiasi et al., 2018). در این بررسی میزان پروتئین تام و آلبومین سرم در تیمار ۰/۶ در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌دار داشت. مطالعه Hoseini و همکاران (2018) نشان داد تجویز

(Karimi Pashak *et al.*, 2018) و خار مریم (علیشاهی و همکاران، ۱۳۹۰) سبب افزایش میزان IgM در ماهیان کپور شده است. مکانیسم این افزایش به خوبی روشن نیست ولی از آنجایی که مهمترین منبع IgM گلبولهای سفید هستند (Hordvik, 2015)، در این بررسی تعداد آنها بطور معنی دار افزایش داشته است دلیل افزایش IgM را می تواند توجیه کند. لیزوزیم بخش مهم و موثری از سیستم ایمنی ذاتی است و محرک های ایمنی اغلب سبب افزایش آن در ماهی می شوند (Saurabh and Sahoo, 2008). در این مطالعه میزان لیزوزیم در تیمارهای ۰/۳ و ۰/۶ بطور معنی داری در مقایسه با شاهد افزایش داشت. افزایش لیزوزیم در ماهیان کپور به دنبال مصرف عصاره گیاه سلمک (*Chenopodium album*) (Amhamed *et al.*, 2018)، خار مریم (علیشاهی و همکاران، ۱۳۹۰)، رهمانیا (*Rehmannia glutinosa*) (Feng *et al.*, 2020)، زردچوبه (Giri *et al.*, 2019) و اکالیپتول (Hoseini *et al.*, 2018) نیز مشاهده شده است. این مطالعات نشان می دهد که استفاده از گیاهان دارویی سبب تقویت ایمنی ذاتی در کپور ماهیان می شود. در این بررسی بهبود در وزن نهایی، افزایش وزن بدن، ضریب رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی مشاهده شد. بهبود شاخص های رشد با مصرف مرزنجوش (*Oregano vulgaris*) (Abdel-Latif *et al.*, 2020)، گیاه سلمک (Amhamed *et al.*, 2018)، چای کوهی (*Stachys lavandulifolia*) (Bahrami Khanal *et al.*, 2014)، آلوئه ورا (Khanal *et al.*, 2020)، آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) (Mohiseni *et al.*, 2019) زنجبیل (عباسی قادیکلایی و همکاران، ۱۳۹۷) و سیر (Karimi Pashaki *et al.*, 2018) نیز در ماهیان کپور مشاهده شده است. به

اکالیپتوس به میزان ۰/۵ و ۱٪ جیره مانع از کاهش میزان آلبومین در ماهیان کپور بعد از مواجهه با سولفات مس گردید. سولفات مس با بهم زدن فشار اسمزی سبب مرگ ماهی می شود و آلبومین به عنوان مهم ترین ترکیب پروتئینی حفظ کننده این فشار ضامن بقای ماهی است (Hoseini *et al.*, 2016). لذا استفاده از این ترکیب سبب افزایش بازماندگی ماهیان در مواجهه با سولفات مس شد. در این تحقیق میزان آنزیم های کبدی ALT و AST در بین گروه های تیمار و شاهد فاقد تفاوت معنی دار بود. ALT و AST آنزیم هایی هستند که به فراوانی در کبد وجود دارند و افزایش میزان آنها می تواند ناشی از آسیب کبدی باشد (Ghiasi *et al.*, 2018). در تجویز اکالیپتول به ماهیان کپور در مواجهه با سولفات مس تفاوت معنی داری در میزان ALT مشاهده نشد ولی میزان AST در دوز ۱٪ کاهش معنی دار در مقایسه با شاهد داشت. در حالیکه تجویز اسانس آویشن شیرازی به ماهیان کپور میزان AST و ALT در گروه تیمار در مقایسه با شاهد تفاوت معنی داری نداشت (Mohiseni *et al.*, 2019). به نظر می رسد استفاده از ترکیبات موثره (اکالیپتول) در مقایسه با اسانس کامل می تواند با تفاوت هایی در یافته های سرمی همراه داشته باشد، هر چند که دلیل آن چندان روشن نیست. IgM مهمترین آنتی بادی سرم در ماهیان است، ولی در پوست و آبشش نیز حضور دارد و تنها ایمونوگلوبولین سرمی است که سبب محافظت ماهیان استخوانی در برابر عوامل بیماریزای عفونی می شود (Hordvik, 2015). طی این بررسی میزان IgM بطور معنی داری در تیمارهای ۰/۳ و ۰/۶ در مقایسه با شاهد و تیمار ۰/۱۵ افزایش معنی دار داشت. مصرف گیاهان دارویی چون زردچوبه (Giri *et al.*, 2019)، سیر

نتایج این بررسی به نظر می‌رسد اسانس اکالیپتوس در دوز ۰/۳ تا ۰/۶ میلی لیتر به ازاء هر کیلوگرم وزن ماهی با بهبود شاخص‌های رشد، ایمنی و افزایش مقاومت به عنوان یک مکمل خوراکی محرک رشد و ایمنی در ماهیان کپور پرورشی می‌تواند مطرح شود. بنابراین مطالعات بعدی باید در جهت شناسایی مکانیسم عمل این عصاره و تاثیرات آن بر رشد و ایمنی و تولید فرم کپسوله آن جهت استفاده آسان در خوراک متمرکز گردد.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

منابع

۱. رودبارکی، س.م.ص.، ارشاد، ه.، خارا، ح.، معصوم زاده، م.، ۱۳۹۶. اثرات سمیت حاد (LC50) عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس بر بافت کبد و بافت آبشش ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*) و فعالیت ضد باکتریایی آن علیه *Aeromonas hydrophila* فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۵(۳)، ۷۳-۵۹.
۲. رودبارکی، س.م.ص.، ارشاد، ه.، خارا، ح.، معصوم زاده، م.، ۱۳۹۷. تاثیر مقادیر مختلف عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس بر فراسنجه‌های خونی ماهیان آمور (*Ctenopharyngodon idella*) آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*). مجله پژوهش‌های جانوری، ۳۱(۱)، ۹۲-۷۹.

نظر می‌رسد بهبود شاخص‌های رشد با استفاده از گیاهان دارویی ارتباط مستقیمی با ترکیبات بیواکتیو موجود در آنها دارد، که از یک سو سبب بهبود وضعیت ایمنی کپورماهیان شده و از سوی دیگر با بهبود ساختار میکروبی دستگاه گوارش، عملکرد آنزیمی و نیز ساختار اپیتلیوم پوششی روده افزایش جذب و راندمان غذایی را سبب می‌شود. در نهایت به رشد بهتر و ضریب تبدیل کمتر منجر می‌شوند (Parvaaz et al., 2020). در این مطالعه پس از مواجهه ماهیان در پایان هفته ۸ آزمایش با باکتری آئروموناس هیدروفیلا درصد بقا در پایان دوره ۱۴ روزه در گروه شاهد، تیمار ۰/۱۵، تیمار ۰/۳ و تیمار ۰/۶ به ترتیب ۳۷/۸، ۵۴/۶۱، ۷۱/۹۳ و ۸۶/۲۳٪ بود. مطالعات مختلف نشان داده است که استفاده از اسانس و عصاره گیاهان دارویی مانند عصاره حنا (Soltanian and Abdel-Tawwab, 2016)، زردچوبه (Fereidouni, 2016) و اسانس مرزنجوش (Abdel-Abbass, 2016) سبب افزایش مقاومت و بقا ماهیان کپور در مواجهه با باکتری آئروموناس هیدروفیلا شده است. از مهمترین اثرات مصرف گیاهان دارویی (در اشکال مختلف خشک، عصاره و اسانس) در ماهیان، بهبود شاخص‌های ایمنی چون فعالیت لیزوزیم، تولید رادیکال آزاد اکسیژن، میزان گلبول‌های سفید و گلوبولین‌ها بوده است (Buflon, 2015). به نظر می‌رسد بهبود عملکرد ایمنی ماهیان کپور پس از دریافت اسانس اکالیپتوس و نیز خاصیت ضد میکروبی این اسانس (Park et al., 2016)؛ رودبارکی و همکاران، ۱۳۹۷) سبب شده تا ماهیان دریافت کننده اسانس ماندگاری بیشتری در مقایسه با شاهد در مواجهه با باکتری آئروموناس هیدروفیلا داشته باشند. با توجه به

9. Abdel-Latifa, H.M.R., Mohsen Abdel-Tawwab, M., Khafaga, A.F., Dawood, M.A.O., 2020. Dietary oregano essential oil improved the growth performance via enhancing the intestinal morphometry and hepato-renal functions of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings. *Aquaculture*, 526, 735432.
10. Abdel-Tawwab, M., Abbass, F.E., 2016. Turmeric powder, *Curcuma longa* L., in common carp, *Cyprinus carpio* L., diets: growth performance, innate immunity, and challenge against pathogenic *Aeromonas hydrophila* infection. *Journal of the World Aquaculture Society*, 48(2), 303-312.
11. Adel, A., Khara, H., 2016. The effects of different dietary vitamin C and iron levels on the growth, hematological and immunological parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fingerlings, *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15(2), 886-897.
12. Adel, M., Pourgholam, R., Zorriehzadra, J., Ghiasi, M., 2016. Hemato e Immunological and biochemical parameters, skin antibacterial activity, and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following the diet supplemented with *Mentha piperita* against *Yersinia ruckeri*. *Fish and Shellfish Immunology*, 55, 267-273.
13. Amhamed, I.D., Mohamed, G. A., Almabrok, A. A., Altief, T. A. S., Bilen, S., 2018, Efficacy of dietary *Chenopodium album* extract on some health parameters, digestive enzymes and growth performance in juvenile *Cyprinus carpio*, *Alinteri Journal of Agriculture Sciences*, 33(2), 165-176.
14. Bahrami Babahydari, S., Dorafshan, S., Paykan Heyrati, F., Mahboobi Soofiani, N., Vahabi, M. R., 2014, the physiological changes, growth performance and whole-body composition of common carp, *Cyprinus carpio* fed on diet containing wood betony, *Stachys lavandulifolia* extract, *Journal of Agricultural Science and Technology*, 16, 1565-1574.
15. Barbosa, L.C.A., Filomeno, C.A., Teixeira, R.R., 2016. Chemical variability and
 ۳. سالنامه آماری سازمان شیلات ایران ۱۳۹۹ - ۱۳۹۴، ۱۴۰۰، سازمان شیلات ایران.
 ۴. شیخزاده، ن.، سلطانی، م.، ابراهیم زاده موسوی، ح.ع.، خسروی، ع.ر.، باقری، ه.، فتحی، ع.، زرگر، ا.، ۱۳۸۸. مطالعه اثر اسانس اکالیپتوس (*Eucalyptus globulus*) بر برخی فاکتورهای ایمنی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). *مجله تحقیقات دامپزشکی*، ۶۴(۱)، ۵۴ - ۴۷.
 ۵. صادقی، س.م.، سردابی، ح.، کازرونی، ح.، شریفی، م.، فرار، ن.، رشوند، س.، ۱۳۹۷، سازگاری و عملکرد گونه های صنعتی اکالیپتوس در استان بوشهر (دشتستان). *فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران*، ۲۶(۲)، ۲۷۵-۲۶۴.
 ۶. عباسی قادیکلای، ح.، کمالی، ا.، سلطانی، م.، شریفیان، م.، ۱۳۹۷، مطالعه مصرف کوتاه مدت پودر زنجبیل (*officinale Zingiber*) بر برخی شاخص های رشد ماهی کپور معمولی جوان در جیره تجاری. *نشریه علمی توسعه آبرزی پروری*، ۱۲(۱)، ۵۴ - ۴۵.
 ۷. علیشاهی، م.، سلطانی، م.، مصباح، م.، اسمعیلی راد، ا.، ۱۳۹۰، تجویز عصاره خوراکی خار مریم (*Silybum marinum*) بر پاسخهای ایمنی ماهی کپور معمولی. *مجله تحقیقات دامپزشکی*، ۶۶(۳)، ۲۶۳ - ۲۵۵.
 ۸. قیاسی، م.، سلیمانی، ن.، شجاعی، ل.، بینایی، م.، ۱۳۹۹. ارزیابی تغییرات برخی شاخص های خونی، سرمی و ایمنی ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) طی زمستان گذرانی. *نشریه علمی توسعه آبرزی پروری*، ۱۴(۱)، ۹۱ - ۸۱.

- aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 33-57.
24. Erguig, M., Yahyaoui, A., Fekhaoui, M., Dakki, M., 2015. The use of garlic in aquaculture. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 8, 28-33.
 25. FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome.
 26. Feng, J., Cai, Z., Zhang, X., Chen, Y., Chang, X., Wang, X., Qin, C., Yan, X., Ma, X., Zhang, J., Nie, G., 2020. The effects of oral *Rehmannia glutinosa* polysaccharide administration on immune responses, antioxidant activity and resistance against *Aeromonas hydrophila* in the common carp, *Cyprinus carpio* L. *Front in Immunology*. 1-12.
 27. Ghiasi, M., Binaii, M., Naghavi, A., Khoshbavar Rostami, H., Nori, H., Amerizadeh, A., 2018. Inclusion of *Pediococcus acidilactici* as probiotic candidate in diets for beluga (*Huso huso*) modifies biochemical parameters and improves immune functions, *Fish Physiology Biochemistry*, 44, 1099–1107.
 28. Gholipourkanani, H., Jamali, F., Jafaryan, H., Gholamalipour Alamdari, E., 2017, Dietary effect of *Lippia citrodora* essential oil on some hematological, biochemical, growth performance and body composition of *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758. *Iranian Journal of Aquatic Animal Health*, 3(1), 1-15.
 29. Giria, S.S., Sukumaran, V., Park, S.C., 2019. Effects of bioactive substance from turmeric on growth, skin mucosal immunity and antioxidant factors in common carp, *Cyprinus carpio*. *Fish and Shellfish Immunology*, 92, 612–620.
 30. Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S., 2011. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, 317(1-4). 1-15.
 31. Hayat, U., Jilani, M.I., Rehman, R., Nadeem, F., 2015. A review on *Eucalyptus globulus*: a new perspective in therapeutics. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*, 8, 85-9.
 16. Binaii, M., Ghiasi, M., Farabi, S. M. V., Pourgholam, R., Fazli, H., Safari, R., Alavi, SE., Taghavi, MJ., Bankehsaz, Z., 2014. Biochemical and hemato-immunological parameters in juvenile beluga (*Huso huso*) following the diet supplemented with nettle (*Urtica dioica*). *Fish and Shellfish Immunology*, 36, 46-51.
 17. Biswas, G., Korenaga, H., Nagamine, R., Kawahara, S., Takeda, S., Kikuchi, Y. and Sakai, M., 2013. Cytokine mediated immune responses in the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) administered with heat-killed *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* (06TCa22) isolated from the Mongolian dairy product. *International Immunopharmacology*, 17, 358-365.
 18. Bulfon, C., Volpatti, D., and Galeotti, M., 2015. Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. *Aquaculture Research*, 46, 513-551
 19. Cabello, F.C., Godfrey, H.P., Buschmann, A.H., Dölz, H.J., 2016. Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 16, 127-133.
 20. Cho, K. H., 2012. 1, 8-cineole protected human lipoproteins from modification by oxidation and glycation and exhibited serum lipid-lowering and anti-inflammatory activity in zebra fish. *BMB R eports*, 45, 565– 750.
 21. Ciftci, O., Ozdemir, I., Tanyildizi, S., Yildiz, S., & Oguzturk, H., 2011. Antioxidative effects of curcumin, β -myrcene and 1, 8-cineole against 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in rats liver. *Toxicology and Industrial Health*, 27, 447–453.
 22. Ellis, A. E., 1990. In: Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Robertson BS, Van Muiswinkel WR (eds) *Lysozyme assay in techniques in fish immunology*. Fair Haven, USA.
 23. Elumalai, P., Kurian, A., Lakshmi, S., Faggio, C., Estebanc, M. A., Ringød, E., 2020. Herbal immunomodulators in

- multipurpose tree. International Journal of Research Ayurveda and Pharmacy, 2 (5), 1527-1530.
40. Lee, R.G., Foerster, J., Jukens, J., Paraskevas, F., Greer, J.P., Rodgers, G.M., 1998. Wintrobe's clinical hematology. 10th ed. New York: Lippincott, Williams and Wilkins; p. 1484.
 41. Mohiseni, M., Sadeghian, M., Nematdust Haghi, B., Bagheri, D., 2019, Effects of dietary Shirazi thyme (*Zataria multiflora* Boiss) and vitamin E on growth and biochemical parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). Iranian Journal of Fisheries Sciences, 18(3), 517-530.
 42. Park, J.W., Wendt, M., Heo, G.J., 2016. Antimicrobial activity of essential oil of *Eucalyptus globulus* against fish pathogenic bacteria. Laboratory Animal Research, 32(2), 87-90.
 43. Parvaaz, Q. U., Asimi, O. A., Kumar, A., Ahmed Shah, F., Ahmed Khan, I., Bhat, B. A., 2020. Use of medicinal plants as growth and antioxidant agent in the diet of common carp (*Cyprinus carpio* Var. communis) fingerlings. Livestock Research International, 8 (2), 34-41.
 44. Saurabh, S., Sahoo, P. K., 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. Aquaculture Research, 39, 223-239.
 45. Serafino, A., Sinibaldi Vallebona, P., Andreola, F., Zonfrillo, M., Mercuri, L., Federici, M., Rasi, G., Garaci, E., Pierimarchi, P., 2008. Stimulatory effect of *Eucalyptus* essential oil on innate cell-mediated immune response. BMC Immunology, 9, 17.
 46. Shakya, S.R., 2017. Effect of herbs and herbal products feed supplements on growth in fishes: a review. Nepal Journal of Biotechnology, 5(1), 58-63.
 47. Sheikhzadeh, N., Soltani, M., Ebrahimzadeh-Mousavi, H. A., Shahbazian, N. Norouzi, M., 2011. Effects of *Zataria multiflora* and *Eucalyptus globulus* essential oils on haematological parameters and respiratory burst activity in *Cyprinus carpio*. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 10(2), 316-323.
 32. Hordvik, I., 2015, Immunoglobulin Isotypes in Atlantic Salmon, *Salmo Salar*. Biomolecules, 5, 166-177.
 33. Hoseini, S. M., Hedayati, A., Mirghaed, A. T., Ghelichpour, M., 2016. Toxic effects of copper sulfate and copper nanoparticles on minerals, enzymes, thyroid hormones and protein fractions of plasma and histopathology in common carp *Cyprinus carpio*. Experimental and Toxicologic Pathology, 68, 493-503.
 34. Hoseini, S.M., Hoseinifar, S. H., Van Doan, H., 2018. Effect of dietary eucalyptol on stress markers, enzyme activities and immune indicators in serum and haematological characteristics of common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to toxic concentration of ambient copper. Aquaculture Research, 49(9), 3045-3054.
 35. Karimi Pashaki, A., Zorriehzahra, S.M.J., Ghasemi, M, Sharif Rohani, M., Hosseini, S. M., 2018. Effects of dietary Garlic extract on some blood, immunity and growth parameters of Common Carp fingerlings (*Cyprinus carpio*). Iranian Journal of Aquatic Animal Health, 4(2), 28-39.
 36. Kassahun, A., Feleke, G., 2019. Chemical composition and physico-chemical analysis of *Eucalyptus globulus* leave and oil. Science Journal of Chemistry, 7(2), 36-38.
 37. Khanal, M., Lamichhane, S., Bhattarai, A., Kayastha, B.L., Labh, S. N., 2021. Extract of aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) enhances the growth, protein contents, and gastrosomatic index (GaSI) of common carp *Cyprinus carpio*. Journal of Nutrition and Metabolism, 1-14.
 38. Khosravi, A.R., Shokri, H., Sharifrohani, M., Ebrahimzadeh-Mousavi, H.E., Mousavi, Z., 2012. Evaluation of the antifungal activity of *Zataria multiflora*, *Geranium herbarium*, and *Eucalyptus camaldolensis* essential oils on *Saprolegnia parasitica*-infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. Foodborne Pathogens and Disease, 7, 674-679.
 39. Kumar, H.D., Laxmihar, S., 2011. A review on phytochemical and pharmacological of *Eucalyptus globus*: a

48. Sneeringer, S., Bowman, M., Clancy, M., 2019. The US and EU animal pharmaceutical industries in the age of antibiotic resistance; USDA Economic Research Service Report Number 264; USDA: Washington, DC, USA.
49. Soltanian, S., Fereidouni, M. S., 2016. Effect of Henna (*Lawsonia inermis*) extract on the immunity and survival of common carp, *Cyprinus carpio* infected with *Aeromonas hydrophila*. International Aquatic Research, 8, 247–261.
50. Stratev, D., Zhelyazkov, G., Noundou, X. S., Krause, R. W. M., 2018. Beneficial effects of medicinal plants in fish diseases. Aquaculture International, 26, 289–308.
51. Syahidah, A., Saad, C.R., Daud, H.M., Abdelhadi, Y.M., 2015. Status and potential of herbal applications in aquaculture: A review. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 14, 27-44.
52. Tacon, A.G., 1990. Standard methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. Feeding Methods. Agent Laboratories Press, Redmond, Taoka, 131–138.
53. Zar, J.H., 1994. Biostatistical analysis. New Jersey: Prentice-Hall; p. 662.