Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics

Print ISSN: 2345-427X
Online ISSN: 2345-4288

Effects of different levels of Thymol on blood, feeding and survival factors in *Oncorhinchus mykiss* against *Yersinia ruckeri*

Saleh Benam[*1], Mohammad Mazandarani[2], Seyed Hossein Hoseinifar[3], Tahereh Bagheri[4], Parastoo Pourashouri[5]

1. Corresponding Author, Dept. of Aquaculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: benam.saleh@gmail.com
2. Dept. of Aquaculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: mazandarani57@gmail.com
3. Dept. of Aquaculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: hoseinifar@gau.ac.ir
4. Offshore water Research Center (OWRC), Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Educational and Extension Organization (AREEO), Chabahar, Iran. E-mail: bagheri1360@gmail.com
5. Dept. of Sea Food Processing, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: pourashouri.p@gmail.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 09.21.2022
Revised: 10.06.2022
Accepted: 10.17.2022

Keywords:
Bacterial resistance,
Immune booster,
Oral administration,
red-mouth disease

ABSTRACT

The current research aimed at assessing the effects of different levels of Thymol on blood, feeding and survival factors in *Oncorhinchus mykiss* against *Yersinia ruckeri*. In this order, three experimental treatments including control (fed with commercial food), first treatment (commercial food with 0.5 percent Thymol) and second treatment (commercial food with one percent Thymol) were used with three replications for each treatment within a factorial analysis for completely randomized design. Then, fish were fed for seven weeks using associated diets. The result showed that different levels of Thymol had no significant effect on survival rate of *Oncorhinchus mykiss* ($P>0.05$). Regarding blood indices before the challenge, we found that the 0.5 percent Thymol had no significant effect, however, the one percent Thymol treatment showed significant difference ($P<0.05$) which caused an increase in the amount of hemoglobin and the concentration of intraglobulin hemoglobin. Measuring blood indices after the challenge, however, showed no significant different. The comparison of growth indices among different Thymol treatments showed that the 0.5 percent Thymol had significant effect on final weight, weight gain, special growth rate, protein yield ratio and food conversion factor compared to the control and one percent Thymol treatments. The result from current study showed that Thymol stimulates growth and improves nutritional conditions in fish, especially rainbow trout.

Cite this article: Benam, Saleh, Mazandarani, Mohammad, Hoseinifar, Seyed Hossein, Bagheri, Tahereh, Pourashouri, Parastoo. 2024. Effects of different levels of Thymol on blood, feeding and survival factors in *Oncorhinchus mykiss* against *Yersinia ruckeri*. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 13 (2), 73-88.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2023.20601.1708
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا چاپی: ۲۳٤٥-٤۲۷X
شاپا آنلاین: ۲۳٤٥-٤۲۸۸

تأثیر سطوح مختلف عصاره تیمول بر شاخص‌های رشد، متغیرهای خونی و میزان مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhinchus mykiss*) در مواجه با باکتری یرسینیا راکری (*Yersinia ruckeri*)

صالح بنام*[۱]، محمد مازندرانی[۲]، سید حسین حسینی‌فر[۳]، طاهره باقری[٤]، پرستو پورعاشوری[٥]

۱. نویسنده مسئول، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. رایانامه: benam.saleh@gmail.com
۲. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. رایانامه: mazandarani57@gmail.com
۳. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. رایانامه: hoseinifar@gau.ac.ir
٤. مرکز تحقیقات آب‌های دور چابهار، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار، ایران. رایانامه: bagheri1360@gmail.com
٥. گروه عمل‌آوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. رایانامه: pourashouri.p@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۱/۰٦/۳۰
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۱/۰۷/۱٤
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۰۷/۲٥

واژه‌های کلیدی:
بیماری دهان قرمز،
تجویز خوراکی،
محرک ایمنی،
مقاومت باکتریایی

چکیده

هدف پژوهش حاضر بررسی اثر سطوح مختلف تیمول بر فاکتورهای خونی، تغذیه‌ای و بقای قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر باکتری *Yersinia ruckeri* بود. بدین‌منظور در قالب طرح کاملاً تصادفی از ۳ تیمار آزمایشی شامل کنترل (تغذیه شده با غذای تجاری)، تیمار اول (غذای تجاری حاوی تیمول ۰/۵ درصد) و تیمار دوم (غذای تجاری حاوی تیمول ۱ درصد) استفاده شد که هر تیمار شامل ۳ تکرار بود. سپس به‌مدت ۷ هفته با جیره‌های مربوطه غذادهی شدند. نتایج نشان داد که درصدهای مختلف عصاره تیمول تأثیر معناداری بر میزان بازماندگی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان ندارند ($P\geq ۰/۰٥$). در خصوص شاخص‌های خونی قبل از چالش، نتایج هم‌چنین نشان داد تیمار نیم درصد تیمول بر هیچ کدام از شاخص‌های خونی اثر معناداری نداشت اما تیمار یک درصد عصاره تیمول به شکل معناداری باعث افزایش مقدار هموگلوبین و غلظت هموگلوبین داخل گلبولی شد ($P\leq ۰/۰٥$). با این‌حال اندازه‌گیری شاخص‌های خونی پس از چالش باکتریایی تفاوت معناداری در هیچ کدام از پارامترهای خونی نشان نداد. مقایسه شاخص‌های رشد در بین تیمارهای مختلف نشان داد که افزودن نیم درصد عصاره تیمول به جیره غذایی اختلاف معناداری در مقادیر وزن نهایی، افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، نسبت بازده پروتئین و ضریب تبدیل غذایی در مقایسه با تیمار کنترل و تیمار ۱ درصد تیمول دارد. نتایج حاصل از

پژوهش حاضر نشان داد تیمول محرک رشد و هم‌چنین بهبوددهنده شرایط تغذیه‌ای در ماهیان و به‌خصوص قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد.

استناد: بنام، صالح، مازندرانی، محمد، حسینی‌فر، سید حسین، باقری، طاهره، پورعاشوری، پرستو (۱۴۰۳). تأثیر سطوح مختلف عصاره تیمول بر شاخص‌های رشد، متغیرهای خونی و میزان مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhinchus mykiss*) در مواجه با باکتری یرسینیا راکری (*Yersinia ruckeri*). *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۳ (۲)، ۸۸-۷۳.
DOI: 10.22069/japu.2023.20601.1708

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

با توجه به رشد جمعیت و افزایش تقاضا برای آبزیان، پرورش ماهی در سیستم‌های متراکم گسترش پیدا کرد (۱). تراکم بالا در یک محیط آبی محدود منجر به افزایش عوامل عفونی (انگل‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها) می‌شود که همواره مزارع پرورش متراکم ماهیان را مورد تهدید قرار می‌دهند و این امر زمینه‌ساز بروز بیماری‌های بیش‌تری است (۲، ۳). بیماری یرسینیوزیس یا بیماری دهان‌قرمز انتروباکتریایی که عامل مولد آن باکتری یرسینیا راکری است از جمله بیماری‌های باکتریایی است که خسارات اقتصادی قابل‌توجهی را در آزاد ماهیان پرورشی سبب می‌گردد. در سال‌های اخیر موارد متعددی از درگیری مزارع پرورش ماهی با بیماری یرسینیوزیس در مناطق مختلف کشور گزارش گردید که بیانگر گسترش این بیماری است (٤، ٥، ٦، ٧). از نظر میزان خسارت اقتصادی و گسترش بیماری، یرسینیوزیس بعد از استرپتوکوکوزیس به عنوان دومین بیماری باکتریایی مهم ماهیان سردابی کشور مطرح است (۸). علی‌رغم این‌که بیماری در تمام رده‌های سنی ماهیان دیده می‌شود، اما در ماهیان بزرگ‌تر عمدتاً به فرم مزمن وجود دارد و فرم حاد آن در نوزادان و انگشت قدها می‌باشد (٤).

محرک‌های ایمنی، عصاره‌های زیستی و مواد سنتزی هستند که با افزایش عملکرد سلول‌های بیگانه‌خوار و فعالیت باکتری‌کشی و نیز با تولید آنتی‌بادی موجب تحریک پاسخ ایمنی می‌گردند (۹). محرک‌های ایمنی علاوه بر کاهش خطر شیوع بیماری مقاومت موجود را نسبت به بیماری‌های عفونی نیز بیش‌تر می‌کنند (۱۰). محرک‌های ایمنی موجب کاهش مرگ و میر در مقابل عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب می‌شوند. این محرک‌ها هم‌چنین باعث افزایش مقاومت در برابر پارازیت‌ها می‌شوند که افزایش درصد بازماندگی آبزیان را در پی دارد (۱۱). پژوهش‌ها نشان می‌دهد که محرک‌های ایمنی بازماندگی در مواجهه با پاتوژن‌های باکتریایی مانند ویبریو آنگوئیلاروم (*Vibrio anguillarum*)، ویبریو سالمونیسیدا (*Vibrio salmonicida*)، آئرومونا‌س سالمونیسیدا (*Aeromonas salmonicida*)، یرسینیا راکری (*Yersinia ruckeri*) واسترپتوکوکوس (*Streptococcus iniae*) و آلودگی‌های انگلی مثل عامل بیماری لکه سفید (*Ichtyophthyrius multifiriis*) می‌شوند (۱۲، ۱۳). زمان استفاده، مقدار ماده محرک، روش ارائه ماده محرک به ماهی و شرایط فیزیولوژیکی ماهی برای استفاده مؤثر از محرک‌های ایمنی باید مورد توجه قرار گیرند (۹). تجویز خوراکی به‌دلیل این‌که بدون استرس بوده و استفاده از محرک را بدون توجه به اندازه ماهی مقدور می‌سازد عملی‌ترین روش برای استفاده و معرفی محرک‌های ایمنی است (١٤). تاکنون روش خوراکی برای محرک‌های ایمنی هم‌چون گلوکان‌ها، لاکتوفرین، لوامیزول و کیتوزان گزارش شده است. یکی از ویژگی‌های اصلی محرک‌های ایمنی، افزایش بقای ماهی‌های واکسینه پس از چالش است (١٥، ١٦). به‌طورکلی محرک‌های ایمنی نقش محرک و تنظیم سیستم ایمنی را داشته و به صورت بالقوه نقش ایمنی‌زایی دارند (۱۷).

عصاره‌های گیاهی جزء مرسوم‌ترین محرک‌های ایمنی هستند که با افزودن آن‌ها به جیره غذایی طیف میکروبی روده را تحت‌تأثیر قرار داده و موجب جذب بهتر مواد مغذی، افزایش رشد و تحریک سیستم ایمنی می‌گردد (۱۸). محرک‌های گیاهی به‌علت ارزانی و در دسترس بودن آن‌ها از نظر اقتصادی به‌صرفه‌تر هستند. هم‌چنین مقاومت دارویی به‌علت تنوع مولکولی موجود در عصاره‌های گیاهی به ندرت اتفاق می‌افتد و تجزیه ترکیبات گیاهی نسبت به داروهای سنتتیک راحت‌تر انجام می‌شود (۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳). غلظت‌های مختلف از عصاره‌های گیاهی یا مشتقات

آن‌ها باعث افزایش پاسخ ایمنی ذاتی و ایمنی اکتسابی آبزیان در مقابل بیماری‌های انگلی، باکتریایی و ویروسی می‌شود (۲٤). عصاره‌های گیاهی علاوه بر آن‌که داری فعالیت ضد استرسی هستند موجب تحریک اشتها، بهبود افزایش وزن، تحریک ایمنی، تقویت قوای جنسی و افزایش مقاومت در برابر پاتوژن‌ها در پرورش آبزیان می گردند (۲٤، ۲۵). عصاره گیاهانی مانند آویشن، پونه و زنیان یک ترکیب فنلی به نام تیمول با فرمول شیمیایی $C_{10}H_{14}O$ است که ساختار آن به‌صورت ۵-ایزوپروپیل-۲- متیل فنول است (۲٦، ۲۷). این ترکیبات با تأثیر بر روی دیواره‌های سلولی خواص ضد میکروبی را در گیاهان ایجاد می‌نمایند (۲۸). تیمول به عنوان یک افزودنی گیاهی، موجب بهبود شاخص‌های رشد، بهبود عملکرد سیستم گوارش، تولیدمثل و سیستم ایمنی می‌گردد. هم‌چنین موجب افزایش جذب و متابولیسم مواد مغذی، تغییر فلور میکروبی روده، بهبود کیفیت لاشه، کاهش مرگ و میر در آبزیان و کاهش ترکیباتی خطرناک مانند رادیکال‌های آزاد شده است. ترکیبات مؤثر و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موجود در تیمول، دارای توان بالقوه برای افزایش تولید گوشت هستند (۲۹، ۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳۳). استفاده از دوزهای مختلفی عصاره تیمول موجب افزایش پاسخ‌های ایمنی در ماهی تیلاپیا در مقابل باکتری استرپتوکوکوس گردید (۳٤). هم‌چنین عصاره تیمول تأثیر قابل‌توجهی بر عملکرد رشد گربه‌ماهی کانالی (*Ictalurus panctatus*) دارد و موجب افزایش بقای ماهیان در مقابل عفونت آئروموناس هیدروفلیا می‌گردد (۳۵). علاوه بر این به‌کار بردن سطوح مختلف عصاره تیمول در جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث به‌دست آمدن کم‌ترین مقدار اسید چرب در بافت ماهیان مورد تغذیه شده است (۳٦).

فاکتورهای خونی تحت‌تأثیر شرایط مختلف، دچار تغییرات می‌شود. بنابراین تعیین مقادیر پارامترهای خونی می‌تواند به‌عنوان شاخصی در تشخیص بیماری‌ها، تعیین شرایط بهداشتی و سلامت آبزیان مفید باشد (۳۷، ۳۸، ۳۹، ٤۰). با توجه به اهمیت عصاره‌های گیاهی در بهبود شاخص‌های رشد و تقویت سیستم ایمنی و همچنین سهولت کاربرد آن‌ها در مزارع پرورش آبزیان از طریق خوراکی، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات سطوح مختلف تیمول بر فاکتورهای خونی، تغذیه‌ای و بقای قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر باکتری یرسینیا راکری (*Yersinia ruckeri*) انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی، طراحی آزمایش و سیستم پرورشی: در ابتدای کار ۱۳۵ قطعه قزل‌آلای رنگین‌کمان به ظاهر سالم با میانگین وزنی ۱٦ گرم (فاضل‌آباد گرگان، گلستان) تهیه شد. پس از زیست‌سنجی (اندازه‌گیری وزن) و تعیین بیومس (زیست‌توده) ۱۵ عدد از این ماهیان در هر یک از تانک‌های (ونیرو) ۳۰۰ لیتری شستشو و ضدعفونی‌شده، ذخیره‌سازی شدند. منبع آب مورد استفاده آب شهر بوده که پس از کلرزدایی و هوادهی مورد استفاده قرار گرفت و روزانه ۷۰ درصد آب تانک‌ها تعویض گردید. متوسط دمای آب ۲±۱٦ درجه سانتی‌گراد و pH در محدوده ۰/۲±۷/٤ در طول دوره پرورش ثبت گردید. قبل از شروع آزمایش ماهی‌ها به‌مدت دو هفته با شرایط مخازن و جیره آزمایشی سازگار شدند. در این پژوهش ۳ تیمار آزمایشی شامل تیمار کنترل (تغذیه شده با غذای تجاری)، تیمار ۱ (غذای تجاری حاوی تیمول ۵/ درصد) و تیمار ۲ (غذای تجاری حاوی تیمول ۱ درصد) که هر تیمار شامل ۳ تکرار در مجموع ۹ مخزن در نظر گرفته شد. سپس به‌مدت ۷ هفته با جیره‌های مربوطه غذادهی شدند.

آماده‌سازی جیره‌های غذایی: در این پژوهش از جیره غذایی تولید شده توسط شرکت فرادانه (شهرکرد- ایران) استفاده شد (جدول ۱). تیمول (خلوص ۹۹/۵ درصد) از شرکت سیگما (کمپانی سیگما، ایالات متحده آمریکا) تهیه شد. با توجه به حلالیت تیمول در اتانول ابتدا مقدار تعیین شده از ماده مؤثره در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول به‌ازای هر کیلوگرم غذا حل شده و سپس به‌صورت اسپری به غذا افزوده شد. غذای مورد نیاز هر روز محاسبه و ساخته شد (٤١). در نهایت، با توجه به میانگین وزنی بچه‌ماهیان و دمای آب، مقدار غذای روزانه هر تیمار از روی جدول استاندارد غذادهی محاسبه شد.

جدول ۱- آنالیز شیمیایی غذای مورد استفاده (درصد).

جیره غذایی	پروتئین خام	چربی خام	فیبر خام	خاکستر کل	رطوبت
FFT	٤٠-٤٤	١٢-١٦	٢-٤	٧-١١	٥-١١
GFT1	٣٨-٤٢	١٣-١٧	٢-٤	٧-١١	٥-١١

تهیه و آماده‌سازی باکتری: در این مطالعه از باکتری *Yersinia ruckeri* (PTCC No1888) عامل ایجاد بیماری یرسینیوزیس استفاده شد که به فرم لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی کشور تهیه گردیده شده بود. این سویه قبلاً به شیوه طبیعی از مزارع قزل‌آلای رنگین‌کمان منطقه فاضل‌آباد در استان گلستان جدا شده است (٤٢). باکتری مذکور در محیط کشت تریپتیک سوی براث[1] به‌مدت ٤٨ ساعت غنی‌سازی گردیده و سپس به صورت سطحی بر روی محیط کشت تریپتیک سوی آگار[2] تلقیح گردید. ٤٨ ساعت پس از کشت، باکتری‌ها از سطح محیط کشت جمع‌آوری شده و با کمک سرم فیزیولوژی سوسپانسیون باکتریایی تهیه گردید. بار باکتریایی سوسپاسپانسون به روش کدورت‌سنجی و براساس جدول استاندارد مک‌فارلند و دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٦٤٠ نانومتر و OD برابر با ۰/۳ تنظیم گردید. در عین‌حال پس از تهیه رقت‌های سریالی جهت تعیین بار باکتری‌های زنده در هر سی‌سی از سوسپانسیون، ۱ سی‌سی از هر رقت بر روی محیط کشت نوتریت‌آگار کشت داده شد و بر مبنای تشکیل CFU، بار باکتریایی هر سی‌سی از سوسپانسیون‌های مذکور برابر با $۷/۲\times۱۰^{٦}$ سلول باکتری زنده تعیین گردید.

چالش ماهیان با باکتری و تعیین درصد بقا: پس از پایان هفته هفتم جهت بررسی مقاومت ماهیان، تیمارهای موردنظر با باکتری *Yersinia ruckeri* مورد مواجه قرار گرفتند. برای انجام این کار تعداد ۱۵ عدد ماهی از هر تیمار (از هر تکرار ۵ قطعه) به‌طور تصادفی برداشته و به تانک‌های جدید انتقال داده شد. ابتدا ماهیان با مقدار ۵۰ پی‌پی‌ام، یوجینول (کمپانی سیگما، ایالات متحده آمریکا) بیهوش شده و با باکتری زنده یرسینیا راکری (*Yersinia ruckeri*) به مقدار هر ماهی ۰/۱ سی‌سی از سوسپانسیون باکتریای حاوی $۷/۲\times۱۰^{٦}$ cell/ml سلول باکتری به‌وسیله سرنگ انسولین به‌صورت داخل صفاقی تزریق انجام شد. در ماهیان گروه کنترل بدون تزریق و به گروه کنترل مثبت ۰/۱ سی‌سی سرم فیزیولوژی به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد (٤٣). تعداد تلفات روزانه به‌مدت ۲۱ روز ثبت شد. از نشانه‌های ظاهری و نمونه‌برداری

1- Tryptic Soya Broth
2- TSA

از کلیه ماهی‌های تازه مرده برای تأیید علت مرگ و میر به‌دلیل حضور باکتری *Yersinia ruckeri* استفاده شد. در طی مدت چالش غذادهی ماهیان با جیره‌های قبلی ادامه یافت (۲۲، ٤٤، ٤٥، ٤٦، ٤٧).

اندازه‌گیری شاخص‌های خونی: پس از پایان هفته هفتم نمونه‌برداری طی دو مرحله (قبل از مواجهه با باکتری، پس از مواجهه باکتریایی) انجام شد. به‌منظور بررسی شاخص‌های خونی نمونه خون با استفاده از سرنگ از ساقه‌دمی گرفته‌شده و در ظرف‌های پلاستیکی هپارینه (جهت مطالعات خون‌شناسی) و غیرهپارینه ریخته شد. نمونه خون غیر هپارینه جهت به‌دست آوردن سرم به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سرم به ظرف‌های جدید منتقل شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای اندازه‌گیری تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) و تعداد گلبول‌های سفید (WBC) از لام نئوبار استفاده گردید. نمونه‌های خون به نسبت ۱۰۰ برابر با محلول دیس[1] رقیق شده و سپس شمارش سلولی طبق روش استاندارد صورت پذیرفت (٤٨). هماتوکریت توسط روش استاندارد میکروهماتوکریت انجام شده و به‌صورت درصد بیان گردید. مقادیر هموگلوبین توسط روش سیانومت هموگلوبین و با کیت تجاری پارس آزمون اندازه‌گیری شد (۷). اندیس‌های خونی، حجم متوسط گلبولی (MCV)، وزن هموگلوبین داخل گلبولی (MCH) و غلظت هموگلوبین داخل گلبولی (MCHC) براساس فرمول‌های مربوطه محاسبه گردید (٤٨).

بررسی پارامترهای رشد و تغذیه: برای اندازه‌گیری وضعیت عملکرد رشد، پس از اندازه‌گیری دقیق طول و وزن ماهیان مورد بررسی، شاخص‌های وزن نهایی (FW)، شاخص وضعیت (CF)، درصد افزایش وزن بدن (WGP)، نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR) و نسبت بازده پروتئین (PER) ماهیان براساس فرمول‌های مربوطه با دقت مورد ارزیابی قرار گرفته و محاسبه گردید (٤٩).

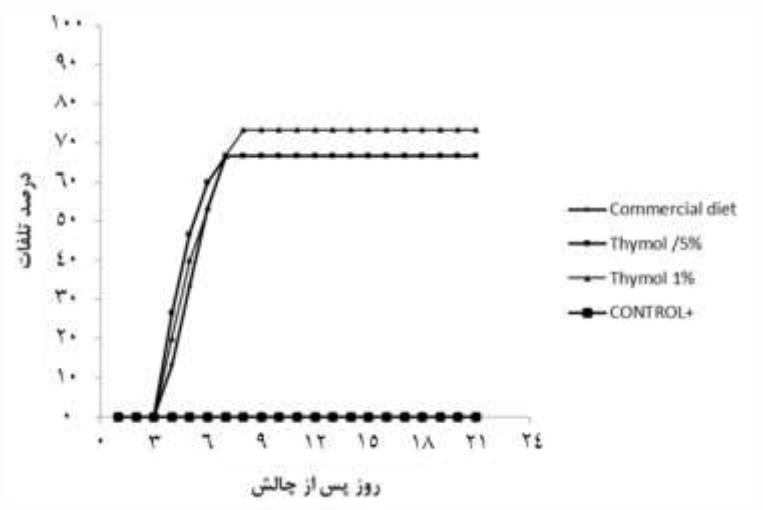
تجزیه و تحلیل آماری: این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی (Completely Randomized Design) انجام گرفت. ثبت داده‌ها در زمان نمونه‌برداری به‌وسیله نرم‌افزار Microsoft Excel نسخه ۲۰۱۰ انجام گردید. همه تجزیه و تحلیل داده‌ها در محیط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ صورت گرفت. برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و جهت مقایسه میانگین تیمارهای آزمایشی از آزمون دانکن (Duncan) در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P<۰/۰۵$) استفاده شد.

نتایج و بحث

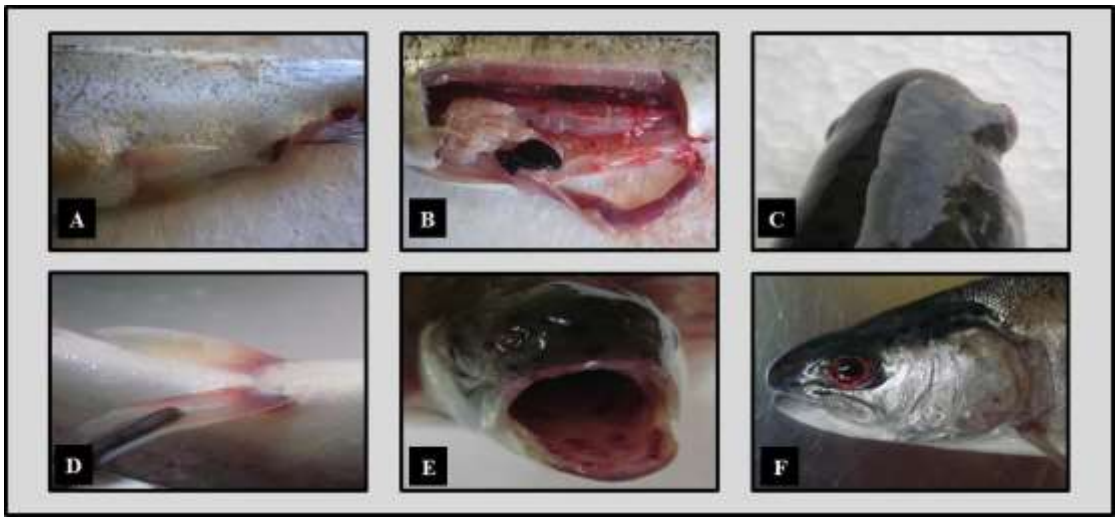
چالش با باکتری *Yersinia ruckeri*: تلفات حاصل از چالش قزل‌آلای رنگین‌کمان با باکتری یرسینیا راکری به روش تزریق داخل صفاقی پس از سه هفته در شکل ۱ نشان داده شده است. بر اساس این نتایج در سه روز اول پس از چالش هیچ تلفاتی ثبت نگردید ولی غذاگیری ماهیان در هر سه تیمار متوقف شد. اولین تلفات در روز چهارم پس از چالش، در تیمارهای تغذیه شده با عصاره تیمول و تیمار کنترل ثبت گردید. علاوه بر آن‌ها علایمی مثل تیرگی بدن، خونریزی در قاعده باله‌ها، پرخونی روده و خونریزی در اطراف دهان نیز مشاهده شد. روند تلفات در تیمار کنترل و تیمار ۰/۵ درصد تیمول تا روز هفتم و تیمار ۱ درصد تیمول تا روز نهم بعد از مواجه ادامه داشت و در این مدتی اگزوفتالمی یک‌طرفه و دوطرفه در ماهیان مشاهده شد و پس از آن تا روز بیست و یکم پس از مواجهه روند تلفات ثابت ماند. هیچ‌گونه

1- Dacie

تلفاتی در ماهیان گروه‌های کنترل مثبت در طی دوره آزمایش مشاهده نگردید. تأیید مرگ و میر به‌دلیل مواجهه باکتریایی از روی علائم بالینی صورت گرفت که برخی از نشانه‌های ظهور بیماری در شکل ۲ مشخص شده است. برخی از این علائم بالینی عبارت بودند از خونریزی در قاعده باله‌ها (به‌ویژه باله مخرجی)، ناحیه دهان و فک، محوطه شکمی و روده، پرولاپس مخرج، بزرگی طحال و کبد، پرخونی کلیه، آب‌آوردگی شکم و هم‌چنین حالت اگزوفتالمی دوطرفه و یک‌طرفه مشاهده شد. نتایج به‌دست آمده پس از مواجه باکتریایی نشان می‌دهد تفاوت معناداری بین تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد وجود نداشت ($P\geq ۰/۰۵$).



شکل ۱- نمودار مقایسه درصد تلفات ناشی از مواجه باکتریایی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در گروه‌های آزمایشی مختلف.



شکل ۲- برخی از علایم بالینی پس از مواجهه تجربی با باکتری یرسینیا راکری: A) پرولاپس مخرج همراه با خونریزی، B) بزرگ شدن طحال و خونریزی در ناحیه انتهایی روده، C) اگزوفتالمی، D) خونریزی در قاعده باله‌ها، E) خونریزی در ناحیه دهان و F) خونریزی در ناحیه چشم.

پارامترهای خونی: نتایج مربوط به شاخص‌های خونی قبل از مواجه باکتریایی در جدول ۲ آمده است. با توجه به نتایج حاصل در هیچ‌کدام از شاخص‌های خونی اختلاف معنی‌داری بین ماهیان تیمار ۱ (۰/۵ درصد تیمول) با ماهیان گروه کنترل مشاهده نشد ($P\geq$۰/۰۵). اما همان‌گونه که داده‌های جدول ۲ نشان می‌دهد هموگلوبین و MCHC در ماهیان تیمار ۲ با دو گروه دیگر دارای تفاوت معناداری بودند ($P\leq$۰/۰۵). اما در سایر شاخص‌ها بین تیمار ۲ و دو تیمار دیگر تفاوت معناداری مشاهده نگردید ($P\geq$۰/۰۵).

جدول ۲- مقایسه میانگین (± انحراف معیار) پارامترهای خونی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با مقادیر مختلف ماده موثره تیمول قبل از مواجه باکتریایی.

فاکتور خونی	تیمار کنترل	تیمار ۱ (۰/۵ درصد تیمول)	تیمار ۲ (۱ درصد تیمول)
هموگلوبین (g/L)	۵/۹۵ ± ۰/۰۹ [a]	٦/۱ ± ۰/۰۸ [a]	٦/٦۳ ± ۰/۱٦ [b]
هماتوکریت (درصد)	۳۹/۱۷ ± ۰/٦۷ [a]	۳۸/٦۷ ± ۰/٦[a]	۳۷/۳۳ ± ۰/٤٤ [a]
تعداد گلبول سفید (mm^3)	۲۵/٦۳ ± ۲/۳۳ [a]	۲٤/۹۲ ± ۱/۲٤ [a]	۲۰/۳۷ ± ۰/۵۸ [a]
تعداد گلبول قرمز ($mm^3 \times ۱۰^٦$)	۱/۳٤ ± ۰/۱۸ [a]	۱/٤۵ ± ۰/۰۱ [a]	۱/٦۸ ± ۰/۱٤ [a]
MCV (pg)	۳۰۸/٤۲ ± ۵٤/٦۷ [a]	۲٦٦/٦٦ ± ۳/۷٤ [a]	۲۲٤/٦۳ ± ۱٤/۷٤ [a]
MCH (پیکوگرم)	٤٦/۷۸ ± ۸/۰٦ [a]	٤۲/۰۵ ± ۰/۷۱ [a]	۳۹/۹٦ ± ۳/۳۱ [a]
MCHC (درصد)	۱۵/۱۹ ± ۰/۱۳[a]	۱۵/۷۷ ± ۰/۲۵[a]	۱۷/۷٦ ± ۰/۳٤[b]

[*] حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است ($P\leq$۰/۰۵)

نتایج حاصل از مقایسه میانگین شاخص‌های خونی بعد از مواجهه باکتریایی در جدول ۳ آماده است. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد در هیچ‌کدام از شاخص‌های خونی تفاوت معناداری بین تیمارهای آزمایشی و گروه کنترل وجود ندارد ($P\geq$۰/۰۵).

جدول ۳- مقایسه میانگین (± انحراف معیار) پارامترهای خونی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با مقادیر مختلف ماده موثره تیمول بعد از مواجه باکتریایی.

فاکتور خونی	تیمار کنترل	تیمار ۱ (۰/۵ درصد تیمول)	تیمار ۲ (۱ درصد تیمول)
هموگلوبین (g/L)	۵/۷۹ ± ۰/٤٦[a]	٦/۷٦ ± ۰/۸٤ [a]	۵/۹۹ ± ۱/۲۳[a]
هماتوکریت (درصد)	۳۱/۳۳ ± ۱/۲۰[a]	۳۰/٦۷ ± ۲/۰۵[a]	۲۵/۳۳ ± ۳/۲٤[a]
تعداد گلبول سفید (mm^3)	۵/٤۷ ± ۰/٦۹[a]	۷/۳۳ ± ۱/۹٦[a]	٦/۷۷ ± ۱/٦۲[a]
تعداد گلبول قرمز ($mm^3 \times ۱۰^٦$)	۱/۰۵ ± ۰/۱۵[a]	۰/۹۵ ± ۰/۰۹[a]	۰/۷۲ ± ۰/۱۷[a]
MCV (pg)	۳۱۲/٦۳ ± ۵٤/۹۱[a]	۳۳۳/٦۷ ± ٤۹/۵٦[a]	۳۸۱/٤٤ ± ۸۳/۵۷[a]
MCH (پیکوگرم)	۵۷/۲۸ ± ۸/۸۵[a]	۷۲/۸۳ ± ۱۱/۸۸[a]	۸۳/٤۹ ± ۲/٤۰[a]
MCHC (درصد)	۱۸/٤۵ ± ۰/۹۲[a]	۲۲/۱۱ ± ۲/۵٦ [a]	۲٤/۳٦ ± ۵/٦۷[a]

[*] حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است ($P\leq$۰/۰۵)

فاکتورهای تغذیه‌ای و رشد: نتایج مربوط به شاخص‌های رشد و تغذیه در جدول ٤ آمده است. با توجه به نتایج حاصل در هیچ‌کدام از شاخص‌های تغذیه‌ای و رشد اختلاف معنی‌داری بین ماهیانی که با جیره حاوی ۱ درصد عصاره تیمول تغذیه شدند با ماهیان گروه کنترل که با جیره تجاری تغذیه شده بودند مشاهده نشد ($P\geq$۰/۰۵). اما همان‌گونه که در جدول ٤ مشاهده می‌شود وزن نهایی، درصد افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، نسبت بازده پروتئین و ضریب تبدیل غذایی در ماهیان تغذیه شده با عصاره ۰/۵ درصد تیمول با دو گروه دیگر دارای تفاوت معناداری بودند ($P\leq$۰/۰۵). اما شاخص وضعیت در هیچ‌کدام از گروه‌های آزمایشی تفاوت معناداری نشان نداد ($P\geq$۰/۰۵).

جدول ٤- مقایسه میانگین (± انحراف معیار) شاخص‌های رشد قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با مقادیر مختلف ماده مؤثره تیمول.

شاخص رشد	تیمار کنترل	تیمار ۱ (۰/۵ درصد تیمول)	تیمار ۲ (۱ درصد تیمول)
وزن اولیه	۱٦/۵۳ ± ۰/۱۹[a]	۱٦/۰۹ ± ۰/۱[a]	۱٦/۳۸ ± ۰/۱[a]
وزن نهایی	٦۳/۱ ± ۳/۲٤[a]	۷۱/۹٤ ± ۰/٦۸[b]	٦۲/۸۲ ± ۰/۸۵[a]
درصد افزایش وزن	۲۸۱/٤۳ ± ۱۷/۱٤[a]	۳٤۷/۱۵ ± ۳/۸۳[b]	۲۸۳/۵۵ ± ۳/٦۷[a]
فاکتورهای وضعیت	۱/۳۲ ± ۰/۰٤[a]	۱/۱۵ ± ۰/۰۰[a]	۱/۱۲ ± ۰/۰٦[a]
میزان رشد ویژه	۲/۷۳ ± ۰/۰۹[a]	۳/۰٦ ± ۰/۰۲[b]	۲/۷٤ ± ۰/۰۲[a]
میزان کارآیی پروتئین	۲/۷۰ ± ۰/۱۸[a]	۳/۲٤ ± ۰/۰٤[b]	۲/۷۰ ± ۰/۰۵[a]
ضریب تبدیل غذایی	۰/۹۳ ± ۰/۰٦[a]	۰/۷۷ ± ۰/۰۱[b]	۰/۹۳ ± ۰/۰۲[a]

[*] حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است ($P\leq$۰/۰۵)

عمدتاً تلفات ناشی از مواجهه ماهیان با باکتری یرسینیوزیس با توجه به اندازه ماهی، شرایط پرورش و عوامل تنش‌زا پس از ۵ تا ۱۰ روز مواجهه رخ می‌دهد (۵۰). در این مطالعه اولین تلفات چهار روز پس از مواجهه باکتریایی در تیمارهای حاوی تیمول یک و نیم درصد و تیمار کنترل ثبت گردید. تلفات در تیمار کنترل و تیمار ۰/۵ درصد تیمول تا روز هفتم و تیمار ۱ درصد تیمول تا روز نهم بعد از مواجه ادامه داشت و پس از آن تا روز بیست یکم پس از مواجهه تلفاتی ثبت نگردید. مطالعه انجام شده توسط بوسچ (۱۹۷۵) بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان تلفات ٦ روز پس از عفونت اولیه شروع شده و در روز ۹ به حداکثر میزان خود رسید. هم‌چنین در مطالعه مشابه بیرینسیوگلو و آوسی (۲۰۰۵) شروع تلفات چهار روز پس از ابتلا بوده و در روزهای شش تا هشت پس از ابتلا به حداکثر میزان رسید (۵۱، ۵۲). نتایج حاصل از این پژوهش تفاوت چندانی در الگوی تلفات را نشان نداد. هرچند تفاوت‌های جزئی مشاهده گردید که ناشی از حدت سویه‌های مختلف است که در سایر مطالعات نیز به آن اشاره شده است (۵۳، ٥٤).

اگرچه در مطالعات زیادی استفاده از عصاره‌های گیاهی منجر به کاهش مرگ و میر ماهی‌ها در برابر عوامل بیماری‌زا گردید (۵۵). در پژوهش حاضر نتایج حاصل از چالش ماهیان با باکتریایی یرسینیا راکری نشان داد که درصدهای مختلف عصاره تیمول تأثیر معناداری بر میزان بازماندگی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان ندارند. احمدی‌فر و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه اثر تیمول در جیره‌های غذایی حاوی پودر

تیمول-کارواکرول در سطوح مختلف (صفر، ۱، ۲ و ۳ گرم در کیلوگرم) در قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن اولیه ۰/۱±۸/٤ گرم به‌مدت ٤٥ روز نیز تفاوت معناداری از نظر بقا در تیمارهای مختلف مشاهده نکردند (٥٦). هم‌چنین افزودن تیمول-کارواکرول در سطوح مختلف (صفر، ۱، ۲ و ۳ گرم در کیلوگرم) به جیره غذایی فیل‌ماهی پرورش (*Huso huso*) با وزن اولیه ۱/٦±٤۳/٦ گرم تأثیری بر روی بقا نداشت (٥۷). اما پژوهش انجام شده توسط ژانگ و همکاران (۲۰۰۹) بر روی گربه‌ماهی کانالی (*Ctalurus panctatus*) با وزن اولیه ٥۰ گرم نشان داد افزودن تیمول و کارواکرول به جیره غذایی در طی هشت هفته باعث افزایش مقاومت ماهیان نسبت به عفونت آئروموناس هیدروفیلا شد (۳٥).

اندازه‌گیری شاخص‌های خونی از جمله لنفوسیت‌ها که اولین دیوار دفاعی بدن در برابر باکتری‌های بیماریزا هستند، فاکتور مناسبی جهت سنجش سلامت ماهیان می‌باشند (٥۸، ٥۹). گیاهان دارویی با تأثیر مثبت بر سلول‌های خونی سیستم ایمنی ماهی را بهبود می‌بخشند (٦۰). وظیفه اصلی گلبول‌های قرمز خون حمل و انتقال گازهای تنفسی در سراسر بدن است، از این‌رو مشخص نمودن تعداد گلبول‌های قرمز اهمیت زیادی در تشخیص کلینیکی مشکلات بهداشتی و سلامتی بدن دارد، چون تعداد گلبول‌های قرمز رابطه مستقیمی با سلامت ماهی دارد (٦۱). در این پژوهش تأثیر درصدهای مختلف عصاره تیمول در جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان بر شاخص‌های خونی قبل از چالش باکتریایی نشان داد که اضافه کردن عصاره نیم درصد تیمول به جیره غذایی بر هیچ‌کدام از شاخص‌های خونی اثر معناداری ندارد اما اضافه کردن ۱ درصد عصاره تیمول به شکل معناداری باعث افزایش مقدار هموگلوبین و غلظت هموگلوبین داخل گلبولی (MCHC) می‌شود. این نتایج در پژوهش‌های یانگتونگ و همکاران (۲۰۱٦)، بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان و مازندرانی و همکاران (۱۳۹٥) بر روی بچه‌ماهیان تاس‌ماهی ایرانی نیز گزارش گردید (٤۲، ٦۲).

احمدی‌فر و همکاران (۲۰۱٤) در ارزیابی اثر تیمول و کارواکرول در فیل‌ماهی پرورشی تفاوت معناداری در تعداد کل گلبول‌های قرمز و سفید خون گزارش نکردند. در مطالعه حاضر نتایج اندازه‌گیری شاخص‌های خونی پس از چالش باکتریایی تفاوت معناداری در هیچ کدام از پارامترهای خونی نشان نداد (٥۷).

رشد به‌عنوان یکی از فاکتورهای ارزیابی سلامت ماهی محسوب می‌شود (٦۳). مقایسه شاخص‌های رشد در بین تیمارهای مختلف در این پژوهش نشان داد که افزودن نیم درصد عصاره تیمول به جیره غذایی اختلاف معناداری در مقادیر وزن نهایی، افزایش وزن، نرخ رشد ویژه (SGR)، نسبت بازده پروتئین (PER) و ضریب تبدیل غذایی (FCR) در مقایسه با تیمار کنترل و تیمار ۱ درصد تیمول دارد در حالی‌که شاخص وضعیت (CF) تفاوت معناداری را نشان نداد. از طرفی دیگر در هیچ‌کدام از شاخص‌های تغذیه‌ای و رشد اختلاف معنی‌داری بین ماهیانی که با جیره حاوی ۱ درصد عصاره تیمول تغذیه شدند با ماهیان گروه کنترل که با جیره تجاری تغذیه شده بودند مشاهده نشد. ساکای (۱۹۹۸) بیان کرد که استفاده از میزان بالای محرک‌های ایمنی به‌مدت طولانی باعث کاهش اثر آن‌ها می‌شود و شاید دلیل عدم تفاوت معناداری در تیمار ۱ درصد تیمول نسبت به تیمار کنترل در مطالعه حاضر همین موضوع باشد (۹).

گیاناس و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی اثرات جیره‌های حاوی کارواکرول و تیمول بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان تفاوت معناداری در ضریب تبدیل غذای

و افزایش وزن گزارش کردند (٦٤). در مطالعات انجام‌شده با افزودن تیمول به جیره غذایی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhinchus mykiss*)، تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) و گربه‌ماهی کانالی (*Ictalurus panctatus*) افزایش معنی‌دار رشد نسبت به سایر گروه‌ها گزارش شدند (٦٥، ٦٦، ٥٧، ٣٥). هم‌چنین احمدی‌فر و همکاران (٢٠١٤) گزارش نمودند که افزودن تیمول و کارواکرول به جیره غذایی بچه‌ماهیان فیل‌ماهی پرورشی به‌طور معنی‌داری وزن نهایی، نرخ رشد ویژه (SGR) و ضریب تبدیل غذایی (FCR) را افزایش می‌دهد. علی‌رغم نتایج مثبت به‌دست آمده مبنی بر افزودن تیمول بر رشد، آنیو و همکاران (٢٠١٨) گزارش دادند که تیمول تأثیر مستقیمی بر روی رشد ماهی تیلاپیا ندارد (٦٧). عمدتاً پژوهش‌های انجام شده بر روی اثرات تیمول بر روی پارامترهای رشد در قزل‌آلای رنگین‌کمان و سایر گونه‌ها با مطالعه حاضر در یک راستا قرار داشتند که نشان‌دهنده ظرفیت تیمول به‌عنوان یک محرک رشد و هم‌چنین بهبود دهنده شرایط تغذیه‌ای در ماهیان و به‌خصوص قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد. با توجه به پژوهش‌هایی که با نتایج مطالعه حاضر تناقض دارند، باید به اهمیت نوع ماهی و شرایط ژنتیکی علاوه بر میزان دُز مصرفی و پرورشی در تأثیر مکمل‌های غذایی توجه نمود (٦٧، ٦٨، ٦٩).

نتیجه‌گیری کلی

در نتیجه‌گیری نهایی می‌توان بیان کرد که درصدهای مختلف عصاره تیمول بر میزان بازماندگی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان نداشت. هم‌چنین پیش از چالش‌دهی ماهی‌ها، هرچند جیره غذایی محتوی نیم‌درصد تیمول بر هیچ‌یک از شاخص‌های خونی اثر معنی‌داری نداشت، اما جیره حاوی ۱ درصد عصاره تیمول به‌طور قابل‌توجهی بر شاخص‌های خونی اثر گذاشت. با این‌حال پس از چالش باکتریایی تفاوت معنی‌داری در هیچ‌یک از تیمارهای تیمول در خصوص پارامترهای خونی مشاهده نشد. هم‌چنین این‌که سطح ۰/۵ درصد تیمول بر شاخص‌های رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان اثر معنی‌داری داشت. بنابراین استفاده از عصاره تیمول در سطوح مشخص‌شده می‌تواند برای بهبود شاخص‌های خونی و رشد و افزایش ایمنی بدن ماهی در مقابل بیماری‌ها به‌کار گرفته شود. از آن‌جا که کارایی استفاده از این عصاره و عصاره‌های دیگر گیاهی وابستگی زیادی به دُز و نوع ماهی دارد، پیشنهاد می‌شود سطوح مناسب از طریق مطالعات پژوهشی برای سایر گونه‌های آبزیان تعیین گردد.

منابع

1.Bagheri, S., Makaremi, M., Mirzajani, A., & Khodaparast, H. (2016). The impact of fish cage culture rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on phytoplankton abundance in the southern Caspian Sea. In Proceeding of national conference on the marine fish culture and Sustainable development fish cage culture, Research Centre of Aquaculture, Ahvaz-Iran. 696, 15-25.

2.Imani, P., & Akhlaghi, M. (2004). Immunogenicity of hemolysin, protease and Lipoplysaccharide extracted from *Aeromonas hydrophila* in common carp *Cyprinus carpio*. *Arch. Razi Ins.* 57, 55-66.

3.Holmstrom, K., Graslund, S., Wahlstrom, A., Poungshompoo, S., Bengtsson, B., & Kautsky, N. (2003). Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *International Journal of Food Science and Technology*. 38, 255-266.

4.Soltani, M., Fadaii, F., & Mehrabi, M. R. (1999). First report of a yersiniosis-like infection in Iranian farmed rainbow

trout. *Bulletin- European Association of Fish Pathologists*. 9, 173-177.
5.Soltani, M., Mousavi, S. H., Ebrahimzadeh Mousavi, H. A., Mirzargar, S., Shafiei, S. H., & Shohreh, P. et al. (2014). Molecular study of *Yersinia ruckeri* distribution, the cause of yersiniosis in farmed rainbow trout in Iran. *Ir. J. Vet. Med*. 40, 59-68.
6.Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Haesebrouck, F., & Chiers, K. (2007). *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *J. Fish. Dis.* 30, 257-68.
7.Hastein, T., Gudding, R., & Evensen, O. (2005). Bacterial vaccines for fish: an update of the current situation worldwide. *Dev Biol*. 121, 55-74.
8.Abdi, Iranian Fisheries Office of Budget and Planning. (2012). Statistical Yearbook of Fisheries. Fisheries organization. 64p.
9.Sakai, M. (1998). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*. 172, 63-92.
10.Raa, J. (1996). The use of immuno-stimulatory substances in fish and shellfish farming. *Rev. Fish. Sci*. 4, 229-288.
11.Nelson, M., Black, A. E., Morris, J. A., & Cole, T. J. (1989). Between- and within-subject variation in nutrient intake from infancy to old age: Estimating the number of days required to rank dietary intakes with desired precision. *Am. J. Clin. Nutr*. 50, 155-167.
12.Gatesoupe, F. J. (1999). The use of probiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture*, 180, 147-165.
13.Garcia, T., Otto, K., Kjelleberg, S., & Nelson, D. R. (1997). Growth of *Vibrio anguillarum* in salmon intestinal mucus. *Appl. Environ. Microbiol*. 63, 1034-1039.
14.Bøgwald, J., & Dalmo, R. A. (2021). Protection of Teleost Fish against Infectious Diseases through Oral Administration of Vaccines: Update 2021. *International Journal of Molecular Sciences*. 22 (20), 10932.
15.Gudmundsdóttir, B. K., & Magnadóttir, B. (1997). Protection of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against an experimental infection of *Aeromonas salmonicida* sub sp. achromogenes. *Fish Shellfish Immunol*. 7, 55-69.
16.Brunt, J., Newaj-Fizul, A., & Austin, B. (2007). The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis*. 30, 573-579.
17.Soltani, M. (2007) Fish and Shellfish Immunology. (1st ed.) University of Tehran Publication. Tehran, Iran.
18.Windisch, W., Schedle, K., Plitzner, C. & Kroismayr, A. (2008). Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. *J. Anim. Sci*. 86, 140-148.
19.Logambal, S. M., Venkatalakshmi, S., & Michael, R. D. (2000). Immunostimulatory effect of leaf extract of Ocimum sanctum Linn. in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Hydrobiologia*. 430, 113-120.
20.Blumenthal, M., Goldberg, A., Brinckmann, J., Foster, S. T., & Varro, E. (2000). Herbal medicine. Integrative Medicine Communications. Newton (Mass). 2000p.
21.Maqsood, S., Singh, P., Samoon, M. H., & Munir, K. (2011). Review Emerging role of immunostimulants in combating the disease outbreak in aquaculture. *International Aquaculture Research*. 3, 147-163.
22.Shoemaker, C. A., Vandenberg, G. W., Desormeaux, A., Klesius, P. H., & Evans, J. J. (2006). Efficacy of a *Streptococcus iniae* modified bacterin delivered using OraljectTM technology in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 255, 151-156.
23.Olusola, S. E., Emikpe, B. O., & Olaifa, F. E. (2013). The potentials of medicinal plants extracts as bioantimicrobial in aquaculture. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 3, 404-412.
24.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, 1-15.
25.Pavaraj, M., Balasubramanian, V., Baskaran, S., & Ramasamy, P. (2011).

Development of immunity by extract of medicinal plant Ocimum sanctum on common carp *Cyprinus carpio* (L.). *Research Journal of Immunology*. 4, 12-18.

26. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144 (5), 646-674.
27. White, S. B. (2011). Antibacterial efficacy of phosvitin, carvacrol, or nisin alone or combined against foodborne human enteric pathogens. Iowa State University.
28. Fachini-Queiroz, F. C., Kummer, R., Estev˜ao-Silva, C. F., de Barros Carvalho, M. D., Cunha, J. M., Grespan, R., Aparecida, C., Bersani-Amado, G., & Cuman, R. K. N. (2012). Effects of thymol and carvacrol, constituents of Thymus vulgaris L. essential oil, on the inflammatory response. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine Journal*. 1, 1-10.
29. Lee, K. W., Everts, H., Kappert, H. J., Frehner, M., Losa, R., & Beynen, A. C. (2003). Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *Br. Poult. Sci*. 44, 450-457.
30. Bento, M. H. L., Bento, A. C., Ouwehand, K., Tiihonen, S., Lahtinen, P., Nurminen, M. T., Saarinen, H., Schulze, T., & Mygind, J. (2013). Essential oils and their use in animal feeds for monogastric animals effects on feed quality, gut microbiota, growth performance and food safety: a review. *Journal of Veterinary Medicine*. 58, 449-458.
31. Hashemipour, H., Kermanshahi, H., Golian, A., & Veldkamp, T. (2013). Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. *Poultry science*. 92, 2059-2069.
32. Dhana, K. (2015). Multiple Beneficial Applications and Modes of Action of Herbs in Poultry. *International Journal of Pharmacology*. 100 (3), 152-176.
33. Engel, J. B., Heckler, C., Tondo, E. C., Daroit, D. J., & da Silva Malheiros, P. (2017). Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against Salmonella and Staphylococcus aureus adhered to stainless steel. *International journal of food microbiology*. 252, 18-23.
34. Wu, Y.R., Gong, Q.F., Fang, H., Liang, W.W., Chen, M., & He, R.J. (2013). Effect of Sophora flavescens on non-specific immune response of tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*) and disease resistance against Streptococcus agalactiae. *Fish Shellfish Immunol*. 34, 220-7.
35. Zheng, Z. L., Tan, J. Y. W., Liu, H. Y., Zhou, X. H., Xiang, X., & Wang, K. Y. (2009). Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*. 292, 214-218.
36. Sönmez, A. Y., Bilen, S., Alak, G., Hisar, O., Yanık, T., & Biswas, G. (2015) Growth performance and antioxidant enzyme activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles fed diets supplemented with sage, mint and thyme oils. *Fish Physiol. Biochem*. 41 (1), 165-175.
37. Ballarin, L., Dall'oro, M., Bertotto, D., Libertini, A., Francescon, A., & Barbaro, A. (2004). Haematological parameters in Umbrina cirrosa (Teleostei, Sciaenidae): a comparison between diploid and triploid specimens. *Comp Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol*. 138, 45-51.
38. Nafici Bahabadi, M. (2006). Practical Guide to Hatching and culture rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), 2rd ed: Bandarabbas, Bandarabbas university. 180-183.
39. Rehulka, J., Minarik, B., & Rehulkova, E. (2004) Red blood cell indices of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in aquaculture. *Aquacult Res*. 35, 529-546.
40. Cnaani, A., Tinman, S., Avidar, Y., Ron, M., & Hulata, G. (2004). Comparative

study of biochemical parameters in response to stress in *Oreochomis aureus*, *O. mossambicus* and two strains of *O. niloticus*. *Aquac Res*. 35, 1434-1440.

41. Aanyu, M. (2016). Effects of phytogenic compounds on growth and nutritional physiology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). PHD Thesis of Stirling University, Stirling, Scotland, United Kingdom.
42. Mazandarani, M., & Taheri Mirghaed, A. (2015). Pathogenicity of *Yersinia ruckeri* bacterium in Persian sturgeon, Acipenser persicus, fingerlings. *Journal of Aquatic Ecology*. 5 (4), 79-87.
43. Aboyadak, I. (2016). Standard method for experimental infection & treatment of Nile Tilapia. Lap Lambert Academic Publishing. 220 p.
44. Ismail, M. S., Siti-Zahrah, A., Syafiq, M. R. M., Amal, M. N. A., Firdaus-Nawi, M., & Zamri-Saad, M. (2016). Feed-based vaccination regime against streptococcosis in red tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis mossambicus*. *BMC veterinary research*. 12 (1), 194.
45. Jaafar, R. M., Al-Jubury, A., Dalsgaard, I., Mohammad Karami, A., Kania, P. W., & Buchmann, K. (2019). Effect of oral booster vaccination of rainbow trout against *Yersinia ruckeri* depends on type of primary immunization. *Fish & Shellfish Immunology*. 85, 61-65.
46. Zhang, D. X., Kang, Y. H., Chen, L., Siddiqui, S. A., Wang, C. F., Qian, A. D., & Shan, X. F. (2018). Oral immunization with recombinant Lactobacillus casei expressing OmpAI confers protection against Aeromonas veronii challenge in common carp, *Cyprinus carpio*. *Fish & shellfish immunology*. 72, 552-563.
47. Wang, E., Wang, X., Wang, K., He, J., Zhu, L., He, Y., Chen, D., Ouyang, P., Geng, Y., Huang, X., & Lai, W. (2018). Preparation, characterization and evaluation of the immune effect of alginate/chitosan composite microspheres encapsulating recombinant protein of *Streptococcus iniae* designed for fish oral vaccination. *Fish & shellfish immunology*. 73, 262-271.
48. Dacie, J. V., & Lewis, S. M. (2001). Practical Haematology. 9th edition. Churchill Livingstone. London. 633p.
49. Salas-Leiton, E., Anguis, V., Martín-Antonio, B., Crespo, D. V., Planas, J., Infante, C., et al. (2010). Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Potential effects on the immune response. *Fish & Shellfish Immunology*. 28 (2), 296-302.
50. Rucker, R. (1966). Red mouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Bulletin - Office International des Epizooties. 65, 5. 825-830.
51. Busch, R. A., & Lingg, A. J. (1975). Establishment of an asymptomatic carrier state infection of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board. Can.* 32, 2429-2432.
52. Avci, H., & Birincioglu, S. S. (2005) Pathological findings in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972) experimentally infected with *Yersinia ruckeri*. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 29, 1321-1328.
53. Austin, D. A., Robertson, P. A. W., & Austin, B. (2003). Recovery of a new biogroup of *Yersinia ruckeri* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 127-131.
54. Fouz, B., Zarza, C., & Amaro, C. (2006). First description of nonmotile *Yersinia ruckeri* serovar I strains causing disease in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in Spain. *J. Fish. Dis.* 29: 339-346.
55. Nya, E. J., & Austin, B. (2011). Development of immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Aeromonas hydrophila* after the dietary application of garlic. *Fish and Shellfish Immunology*, 30(3), 845-850.
56. Ahmadifar, E., Falahatkar, B., & Akrami, R. (2011). Effects of dietary thymol-carvacrol on growth performance, hematological parameters and tissue composition of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Appl. Ichthyol.* 27, 1057-1060.

57. Ahmadifar, E., Mansour, M. R., Amirkolaie, A. K., & Rayeni, M. F. (2014). Growth efficiency, survival and haematological changes in great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juveniles fed diets supplemented with different levels of thymol–carvacrol. *Animal Feed Science and Technology*. 198, 304-308.
58. Ahmadifar, E., Jalali, M., Sodagar, M., Azari, T., & Mohammadi, Z. (2009). Effects of AquaVac Ergosan on growth, survival and blood indicators related to Beluga (*Huso huso*). *Journal of Agricultural Sciences*. 16 (1), 72-80.
59. Adel, M., Pourgholam, R., Zorriehzahra, S. J., & Ghiasi, M. (2015). The effect of different level of Mentha piperita on some of the hematological, biochemical and immune parameters of *Oncorhynchus mykiss*. *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 24, 37-46.
60. Oskoii, S. B., Kohyani, A. T., Parseh, A., Salati, A. P., & 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 Physiology and Biochemistry*. 38 (4), 1029-1034.
61. Harikrishnan, R., Balasundaram, C., & Heo, M. S. (2012). Effect of Inonotus obliquus enriched diet on hematology, immune response, and disease protection in kelp grouper, Epinephelus bruneus against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*. 344-349, 48-53.
62. Yangthong, M., Hutadilok-Towatana, N., Thawonsuwan, J., & Phromkunthong, W. (2016). An aqueous extract from *Sargassum sp.* enhances the immune response and resistance against *Streptococcus iniae* in the Asian sea bass (*Lates calcarifer* Bloch). *Journal of Applied Phycology*. 28 (6), 3587-3598.
63. Khaj, H., Dashtizadeh, M., Kabirifard, A. M., Kamali, A. A., Sadeghi, M. H., Sadeghi, S. A., & Eslampanah, M. (2020). Effect of *Sargassum Angustifolium* feeding on growth performance and some blood parameters in adani male native goat kids. *Veterinary Researches & Biological Products*, 33 (2), 84-92.
64. Giannenas, I., Triantafillou, E., Stavrakakis, S., Margaroni, M., Mavridis, S., Steiner, T., & Karagouni, E. (2012). Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 350, 26-32.
65. Amer, S. A., Metwally, A. E., & Ahmed, S. A. (2018). The influence of dietary supplementation of cinnamaldehyde and thymol on the growth performance, immunity and antioxidant status of monosex Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*). *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44 (3), 251-256.
66. Yousefi, M., Hoseini, S. M., Aydın, B., Mirghaed, A. T., Kulikov, E. V., Drukovsky, S. G., ... & Van Doan, H. (2022). Anesthetic efficacy and hemato-biochemical effects of thymol on juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 547, 737540.
67. Aanyu, M., Betancor, M., & Monroig, O. (2018) Effects of dietary limonene and thymol on the growth and nutritional physiology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Aquaculture*, 488, 217-226.
68. Bascinar, N., Cakmak, E., Cavdar, Y., & Aksungur, N. (2007). "The effect of feeding frequency on growth performance and feed conversion rate of black sea trout, *Salmo trout labrax* Pallas, 1811". *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 7, 13-17.
69. Lim, C., & Poernomo, A. (1985). Problems in Shrimps Feed and Feeding, In: Fish nutrition and Feed Technology Research in Indonesia. RIIF. CRFI. AARP. Ministry of Agriculture, Republic of Indonesia. 139-149.