جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة المثنى / كلية الزراعة
قسم الإنتاج الحيواني

تأثير إضافة ثلاث أنواع من الزيوت النباتية على الأداء الإنتاجي والاستجابة المناعية والتعبير الجيني لبعض الجينات المرتبطة بالمناعة في علائق أسماك الكارب الشائع *Cyprinus carpio* L. المرباة في الأقفاص العائمة

رسالة تقدم بها

قاسم محسن سلطان

دبلوم عالي في العلوم الزراعية / إرشاد تخصصي

إلى مجلس كلية الزراعة في جامعة المثنى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في العلوم الزراعية / الإنتاج الحيواني

بإشراف

أ.د. طه ياسين فرحان **أ.م.د. نهاد عيال مطر**

1442 هـ 2020 م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ قَالُوا سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ ﴾

صدق الله العلي العظيم

(سورة البقرة آية 32)

الإهداء

إلى . . . مصابيح العلم وابوابه . . . محمد وآل بيته (صلى الله عليه واله)

إلى . . . من لم ينصفه الدهر . . . بلدي الجريح (العراق)

إلى . . . قناديل الحرية . . . (شهداء العراق)

إلى . . . من به يعلوا اسمي . . . (والدي الغالي)

إلى . . . من همها الأول سعادتي . . . (والدتي الغالية)

إلى . . . من هم اشدد ظهري . . . (إخوتي وأخواتي)

إلى . . روح من فارقتنا ولم تفارقنا . . . (أختي الكبرى رحمها الله)

إلى . . . صاحبة الايثار وخير عون . . . زوجتي العزيزة

إلى . . . ورود العمر وعطر الوجود بناتي . . . (رفل, جنة, رحمة)

قاسم

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين وبحمده تتم الصالحات والصلاة والسلام على سيد الأنام سيدنا ومولانا محمد وعلى آل بيته الطيبين الطاهرين.

أقدم وافر شكري وامتناني إلى الأستاذ الدكتور طه ياسين الخفاجي، والأستاذ المساعد الدكتور نهاد عيال لإشرافهم المباشر على رسالتي ولما قدموه لي من توجيهات سديدة ومتابعتهم المستمرة خلال مدة البحث والكتابة. سائلا المولى جل وعلا أن يوفقهم لكل خير.

كما أتقدم بالشكر والعرفان إلى عمادة كلية الزراعة وقسم الإنتاج الحيواني على طيب المعاملة وحسن الاهتمام وأخص بالذكر أساتذتي أ.م.د.علي عبدالله زعيري معاون العميد للشؤون العلمية وأ.م.د.هادي عواد حسوني رئيس قسم الانتاج الحيواني، وشكري وامتناني للاستاذ الدكتور علي حسين سلمان لما قدمه لي من النصح والمساعدة طيلة مدة البحث، وأيضا شكري وتقديري للاساتذة أ.د.علي الهلالي وأ.د. جاسم الغراوي لتجشمهم عناء السفر والحضور إلى موقع التجربة، كما وأتقدم بشكري وامتناني لكل من قدم لي يد العون والمساعدة والنصح وهم كل من أ.د. خالدة سالم النعيم كلية الزراعة /جامعة البصره، وأ.م.د حسين علي كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ذي قار، ومن جمهورية مصر أ.د.علاء الدين عيسى كلية الطب البيطري/جامعة القاهرة، و أ.د.نورهان السيد صالح المعهد القومي لعلوم البحار والمصايد/ مصر. ولا أنسى كل من وقف بجانبي لإتمام التجربة على أكمل وجه ومنهم عمادة كلية العلوم جامعة المثنى وأخص بالذكر كادر مختبر الدراسات العليا في كلية العلوم وكل من (سهير، جلال، فاطمة، مروه، شريهان، حوراء)، وأيضا شكري وامتناني لكل من الإخوة (محسن حسن، قحطان عطية، سجاد باسم، مرتضى علي، عباس باسم، حسين جخيور، عارف) لمساعدتهم لي من أجل إتمام التجربة، كما أشكر أخي وصديقي حيدر فاضل لوقوفه معي منذ بداية التجربة إلى نهايتها، كذلك شكري وتقديري لزملائي طلبة الماجستير (الإنتاج الحيواني والنباتي) دفعة 2019/2018 متمنياً لهم دوام الموفقية والنجاح. وأخيراً أسجل شكري وامتناني لعائلتي وإخوتي لمساندتهم المادية والمعنوية لي لإتمام البحث على أكمل وجه، وآخر دعوانا أن الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على أفضل الخلق سيدنا محمد وآل بيته الطاهرين.

الباحث

المستخلص

أجريت هذه الدراســـة لمعرفة تأثير إضــــافة ثلاثة أنواع من الزيوت النباتية (*Mentha Piperita* النعناع، *Matricaria chamomilla* البابونج، *Zingiber officinale* الزنجبيل) على الأداء الإنتاجي والمنــاعي والتعبير الجيني لبعض الجينــات المرتبطــة بــالمنــاعــة (IL-1β) Interleukin1β، Interleukin8 (IL-8) Interleukin 10 (IL-10)، Tumor Necrosis Factor Alpha (TNFα)، في أسماك الكارب الشائع *Cyprinus carpio* L المرباة في الأقفاص العائمة. اسُتخدمت 120 سمكة بمتوسط وزن 250 ±4 غم، وزعت عشوائياً على أربع معاملات بثلاث مكررات بواقع 10 سمكة لكل مكرر. استعملت أربع معاملات المعاملة الأولى السيطرة (T1) من دون إضافات، والمعاملة الثانية(T2) أضـيف زيت النعناع بنســبة(0.5%) والمعاملة الثالثة (T3) أضـيف زيت البابونج بنسـبة (0.5%) والمعاملة الرابعة (T4) أضـيف زيت الزنجبيل بنسـبة(0.5%). غذيت الأسـماك على العلائق التجريبية بواقع 5% من الوزن الحي مقسمة على وجبتين في اليوم، واستمرت التجربة لمدة 120 يوماً بضـمنها 8 أيام مدة الأقلمة. بينت نتائج بعض الفحوصـات البيئية لمياه نهر الفرات في موقع الأقفاص خلال مدة التجربة أن درجة حرارة الماء تراوحت بين 16-32 م°، فيما تراوح تركيز الأوكسجين المذاب بين 7.0 – 8.9 ملغم/لتر، في حين كـانـت ملوحـة المـاء من 1.67 -1.86 غم /لتر، أمـا قيمـة الأس الهيدروجيني(pH) تراوحت بين 8.0 – 8.2، وتراوحت سـرعة جريان الماء في موقع التجربة بين 17-20 سـم /ثانية. وأظهرت النتائج فروقاً معنوية بين المعاملات ($p\leq0.05$) في معايير النمو، إذ تفوقت معاملة البابونج (T3) ومعاملة النعناع (T2) على بقية المعاملات إذ سـجلتا أعلى معدل وزن نهائي بلغ على التوالي 656 غم و609 غم، وأيضـا سـجلتا أعلى معدل زيادة وزنية بلغ على التوالي 405غم و 358 غم. كذلك سـجلتا أفضـل معدل معامل تحويل غذائي (FCR) بلغ على التوالي 3.0 و3.14 غم علف/غم زيادة وزنية، وأعلى معدل كفاءة تحويل غذائي(FCE) بلغت على التوالي 33.36 و31.82%. فيما سجلتا أيضا أعلى معدل نمو يومي (DGR) بلغ على التوالي 3.62 و 3.20 غم/يوم. وسجلتا أعلى

معدل نمو نوعي(SGR) بلغ على التوالي 0.86 و0.79. كما أظهرت نتائج معايير الدم المناعية فروقاً معنوية ($p\leq0.05$) بين المعاملات، إذ سجلت معاملة النعناع(T2) أعلى معدل بروتين كلي Total protein (TP) بلغ 4.04 ملغم /100مل، في حين سجلت معاملة الزنجبيل(T4) أعلى معدل في مستوى إنزيم الفوسفات القاعدي Alkaline phosphatase (ALP) بلغ 90.66 وحدة دولية/ لتر، كما سجلت معاملة البابونج (T3) أعلى معدل في مستوى إنزيم ناقل اللنين Alanine amino transferase (ALT) بلغ 14.66 وحدة دولية/ لتر، فيما سجلتا معاملتي الزنجبيل (T3) والنعناع (T2) أعلى معدل في مستوى إنزيم ناقل السبارتيز Aspartate amino transferase (AST) بلغ على التوالي 93.33 و92.33 وحدة دولية/ لتر. كما بينت النتائج تفوق معاملة النعناع (T2) في مقاومة العدوى التجريبية ببكتيريا *Aeromonas hydrophila* إذ بلغت نسبة الإصابة (0%) فيما بلغت نسبة الإصابة في معاملة السيطرة (T1) 100%. وبينت النتائج أيضا ان معاملة النعناع حققت ارتفاعاً معنوياً ($p\leq0.05$) في مستوى التعبير الجيني للجينات(IL-8, IL-10, TNFα) قياساً بمعاملة السيطرة فيما لم تحقق فرقاً معنويا في مستوى التعبير الجيني لجين (IL-1β)، كما حققت معاملة البابونج ارتفاعا معنوياً ($p\leq0.05$) في مستوى التعبير الجيني لجينات (IL-8, IL-10) فيما لم تؤثر معاملة البابونج معنوياً ($p>0.05$) في مستوى التعبير الجيني للجينات (IL-1β, TNFα) قياساً بمعاملة السيطرة، اما معاملة الزنجبيل فقد حققت فرقاً معنويا ($p\leq0.05$) في مستوى التعبير الجيني للجينات(IL-8, TNFα, IL-1β) قياساً بمعاملة السيطرة بينما لم تؤثر معنويا ($p>0.05$) في مستوى التعبير الجيني للجين(IL-10) قياساً بمعاملة السيطرة.

نستنتج من هذه الدراسة أن إستعمال زيوت (النعناع، البابونج، الزنجبيل) بتركيز 0.5% في علائق أسماك الكارب الشائع، قد حسن من الأداء الإنتاجي والمناعي ورفع مستوى التعبير الجيني لبعض الجينات المرتبطة بالمناعة. كما أثبتت فعاليتها في مقاومة الأسماك للعدوى التجريبية ببكتيريا *Aeromonas hydrophila*.

قائمة المحتويات

التسلسل	العنوان	الصفحة
	المستخلص	أ - ب
	قائمة المحتويات	ت - ح
	قائمة الجداول	ح
	قائمة الاشكال والمخططات	خ - د
	قائمة الصور	د
	الفصل الأول	
1	المقدمة	1
	الفصل الثاني	
2	مراجعة المصادر	3
1.2	استخدام النباتات الطبية في الأستزراع السمكي	3
2.2	استخدام نبات النعناع في علائق الأسماك	4
3.2	استخدام نبات البابونج في علائق الأسماك	8
4.2	استخدام نبات الزنجبيل في علائق الأسماك	10
5.2	تربية الأسماك في الأقفاص العائمة	12
6.2	أسماك الكارب الشائع	13
7.2	مرض التسمم الدموي الإيروموناسي	14
8.2	المناعة في الأسماك	17
9.2	بعض الجينات المناعية في الأسماك	18
10.2	التعبير الجيني	21
11.2	تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي RT-PCR	24

التسلسل	العنوان	الصفحة
	الفصل الثالث	
3	المواد وطرائق العمل	26
1.3	موقع وأسماك التجربة	26
2.3	تصنيع العلائق	27
3.3	تصنيع الأقفاص	29
4.3	عزل وتحضير البكتيريا	30
5.3	حقن البكتيريا	31
6.3	تشريح الأسماك وجمع العينات	31
7.3	الدراسة الجزيئية	32
1.7.3	تحضير البادئ	32
2.7.3	استخلاص RNA الكلي	33
3.7.3	تحضير جل الترحيل الكهربائي	35
4.7.3	تصنيع الحامض النووي المكمل (cDNA)	35
5.7.3	تحضير تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي : Real-time PCR	36
8.3	المعايير المدروسة	36
1.8.3	الزيادة الوزنية الكمية Weight Gain (W.G)	36
2.8.3	معامل التحويل الغذائي Food Conversion Ratio (FCR)	37
3.8.3	كفاءة التحويل الغذائيFood Conversion Efficiency (FCE) %	37
4.8.3	معدل النمو اليومي Daily Growth Rate (D.G.R)	37
5.8.3	معدل النمو النوعي Specific Growth Ratio (SGR) %	37
9.3	الفحوصات البيئية	38
10.3	المعايير الدمية	38
1.10.3	جمع عينات الدم	38
2.10.3	قياس البروتين الكلي TP	39

3.10.3	قياس تركيز إنزيم الفوسفات القاعدي ALP	39
4.10.3	قياس تركيز إنزيم ناقل السبارتيز ALT	39
5.10.3	قياس تركيز إنزيم ناقل اللنين AST	39
11.3	القياسات الجزيئية	40
12.3	التحليل الأحصائي	40
الفصل الرابع		
4	النتائج والمناقشة	42
1.4	الفحوصات البيئية	42
2.4	معايير النمو	44
1.2.4	الوزن النهائي والزيادة الوزنية	44
2.2.4	معامل التحويل الغذائي(FCR) وكفاءة التحويل الغذائي(FCE)	48
3.2.4	معدل النمو اليومي (DGR) معدل النمو النوعي (SGR)	52
3.4	معايير الدم المناعية	56
1.3.4	البروتين الكلي في مصل الدم TP	56
2.3.4	إنزيم الفوسفات القاعدي ALP وإنزيم ناقل اللنينALT وإنزيم ناقل السبارتيز AST في مصل الدم	60
4.4	تحدي إصابة الأسماك ببكتريا *Aeromonas hydrophila*	65
5.4	النتائج الجزيئية	69
1.5.4	استخلاص RNA الكلي	69
2.5.4	التضخيم لجينات المؤشرات المناعية المدروسة	70
3.5.4	التعبير الجيني	71
الفصل الخامس		
5	الاستنتاجات والتوصيات	76
1.5	الاستنتاجات	76
2.5	التوصيات	77

الفصل السادس		
6	المصادر	78
1.6	المصادر الأجنبية	78

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
1	مكونات العلائق المستخدمة في التجربة	28
2	التركيب الكيميائي للعلائق محسوبة على أساس المادة الجافة	29
3	تسلسل البوادئ Primers	33
4	مكونات تفاعل Real time PCR	36
5	ظروف تفاعل Real time PCR	36
6	نتائج الفحوصات البيئية في موقع التجربة	43
7	بعض معايير النمو لمعاملات التجربة (المتوسط ± الخطأ القياسي)	44
8	كمية العلف ومعامل التحويل وكفاءة التحويل الغذائي ومعدل النمو اليومي والنوعي لمعاملات التجربة (المتوسط ± الخطأ القياسي)	48
9	نتائج البروتين الكليTP وإنزيم الفوسفات القاعدي ALP وإنزيم ناقل اللنين ALT وإنزيم ناقل السبارتيز AST لمعاملات التجربة (المتوسط ± الخطأ القياسي)	57
10	نتائج تحدي الأصابة ببكتريا *Aeromonas hydrophila* لمعاملات التجربة	67

قائمة الأشكال والمخططات

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
1	موقع التجربة	26
2	مكونات القفص البلاستيكي	30
3	برنامجPCR cDNA synthesis	35
4	مخطط التجربة مع المعايير المدروسة	41
5	الوزن النهائي للأسماك خلال مدة التجربة	45
6	الزيادة الوزنية للأسماك خلال مدة التجربة	47
7	معامل التحويل الغذائي خلال مدة التجربة	49
8	كفاءة التحويل الغذائي خلال مدة التجربة	50
9	معدل النمو اليومي للأسماك خلال مدة التجربة	53
10	معدل النمو النوعي SGR للأسماك خلال مدة التجربة	54
11	تركيز البروتين الكلي TP في معاملات التجربة	58
12	تركيز إنزيم الفوسفات القاعدي ALP في معاملات التجربة	60
13	مستوى إنزيم ناقل اللنين ALT في معاملات التجربة	62
14	مستوى إنزيم ناقل السبارتيز AST في معاملات التجربة	63
15	استخلاص RNA الكلي من نسيج رأس الكلى	69
16	مسار التضخيم لجين (IL−1β) Interleukin1β في معاملات التجربة	70
17	مسار التضخيم لجين (IL−1β) Interleukin1β في معاملات التجربة	70
18	مسار التضخيم لجين (IL−8) Interleukin8 في معاملات التجربة	70
19	مسار التضخيم لجين (IL−8) Interleukin8 في معاملات التجربة	70
20	مسار التضخيم لجين (IL−10) Interleukin10 في معاملات التجربة	71
21	مسار التضخيم لجين (IL−10) Interleukin10 في معاملات التجربة	71
22	مسار التضخيم لعينات التجربة للجين (TNFα) في معاملات التجربة	71

23	مسار التضخيم لعينات التجربة للجين (TNFα) في معاملات التجربة	71
24	الكمية النسبية للتعبير الجيني لجين (IL−1β) Interleukin1β	72
25	الكمية النسبية للتعبير الجيني لجين(IL−8) Interleukin8	73
26	الكمية النسبية للتعبير الجيني لجين (IL−10) Interleukin10	73
27	الكمية النسبية للتعبير الجيني لجين (TNFα)	74

قائـمة الصور

رقم الصورة	العنوان	الصفحة
1	توزيع معاملات التجربة	28
2	الأقفاص البلاستيكية	30
3	عزل البكتيريا	30
4	حقن الأسماك بالبكتيريا	31
5	تشريح الأسماك	32
6	سحب الدم من الوريد الذنبي في الأسماك	39
7	تقرحات دموية على جسم الأسماك	66
8	تشقق الزعنفة الذيلية	66
9	الأحشاء الداخلية للأسماك المصابة	66

الفصل الأول

1. المقدمة: Introduction

الاستزراع المائي هو القطاع الأسرع نموًا في إنتاج الأغذية الحيوانية، إذ تساهم الأسماك بنسبة حوالي 17% من البروتينات التي يستهلكها سكان العالم، ونظرا لهذه الأهمية ازداد الإنتاج العالمي من تربية الأحياء المائية، إذ بلغ في عام 2016 (53.367) مليون طن، وبمتوسط 20.3 كغم من الأسماك للفرد الواحد سنوياً (2018,FAO). في حين بلغ إنتاج الدول العربية من قطاع تربية الأحياء المائية (1.41) مليون طن لعام 2016 حصة العراق منها 47.5 ألف طن فقط بمتوسط 3 كغم من الأسماك نصيب الفرد العراقي سنوياً (2017,AOAD). ومع ذلك، فإن تربية الأحياء المائية يرتبط نموها في كثير من الأحيان بتكثيف الزراعة، مما يؤدي إلى التزاحم وسوء جودة المياه، وتسهيل انتشار المسببات المرضية وزيادة تفشي الأمراض وبالنتيجة حدوث الهلاكات (Bondad وآخرون,2005).

من أجل تجنب الخسائر الاقتصادية المتعلقة بأوجه القصور الصحية، تستخدم الأدوية البيطرية بشكل واسع في تربية الأسماك للوقاية من الأمراض وعلاجها(Rico وآخرون,2013). في حين يمثل الاستخدام المكثف للعقاقير الاصطناعية عيوبًا عديدة لكل من البيئة والصحة، كما ان الاستخدام المكثف للمضادات الحيوية أدى إلى تراكمها في أنسجة الأسماك (Cabello،2006).

ونظراً للعيوب الكثيرة للعقاقير الطبية الاصطناعية كان هناك حاجة متزايدة لتطوير استراتيجيات بديلة في إدارة أمراض الأحياء المائية، علاوة على ذلك غالبًا ما يرتبط تفشي الأمراض في الاستزراع المائي بكفاءة الأسماك وصحتها كون مسببات الأمراض انتهازية وتستفيد من نقص المناعة أو الإجهاد في الأسماك، إذ يجب إيجاد الحلول البديلة لتطوير مناعة الأسماك والكفاءة في مقاومة الأمراض (Ashley ،2007) .عليه يمكن للنباتات الطبية أن توفر بديلاً أرخص وأكثر استدامة من العلاج الكيميائي في

الاستزراع المائي، حيث تبين أنها تظهر الكثير من التأثيرات الحيوية مثل مضادات الإجهاد، والمنشطات المناعية ضد الأمراض الطفيلية، البكتيرية، الفطريات، الفيروسات والطفيليات الخارجية (Reverter وآخرون,2014). إضافة إلى ذلك، يمكن أن يؤدي استخدامها إلى تقليل تكاليف العلاج ويكون أكثر ملاءمة للبيئة إذ يكون أكثر قابلية للتحلل الحيوي من الجزيئات الاصطناعية، كما أنه أقل احتمالًا لإنتاج مقاومة للأدوية نظرًا للتنوع الكبير لجزيئات المستخلصات النباتية(Olusola وآخرون،2013).

كما حظيت الجينات ذات الصلة المناعية في الأسماك باهتمام كبير بسبب دورها في تحسين فهم كل من مناعة وتطور الجهاز المناعي في الأسماك، إذ تم تمييز الكثير من الجينات ذات الصلة المناعية لكل من المناعة الفطرية والمكتسبة (التكيفية) (Rosario و Carolina ،2015).

من جهة أخرى، أصبح الاستزراع السمكي في الأقفاص أحد الحلول المهمة لزيادة الإنتاج العالمي، إذ يُعد من الطرق الحديثة للاستزراع السمكي التي استُخدمت ومازالت تُستخدم في عدة دول من العالم ومنها العراق لغرض تربية أنواع محددة من الأسماك (Kassam ,2011). ومنها الكارب الشائع *Cyprinus carpio* الذي يُعد أحد أكثر أنواع أسماك المياه العذبة انتشارًا في العالم (Hasan وآخرون,2007). كما يمتاز بأن له تاريخاً طويلاً في الاستزارع المائي في الأحواض الترابية والأقفاص والقنوات وغيرها من نظم التربية (Napora وآخرون، 2017) إذ ساهم في الإنتاج العالمي للاستزراع المائي لعام 2013 بحدود 9% قياساً ببقية الانواع (FIGIS ،2013) .

هدفت هذه الدراسة إلى معرفة تأثير استخدام ثلاثة أنواع من الزيوت النباتية(النعناع, البابونج, الزنجبيل) على الأداء الإنتاجي والمناعي ومستوى التعبير الجيني لبعض الجينات المرتبطة بالمناعة IL-1β ,IL-8, IL-10, TNFα في أسماك الكارب الشائع *Cyprinus carpio* L. في الاقفاص العائمة.

الفصل الثاني

2. مراجعة المصادر : Literature Review

1.2: استخدام النباتات الطبية في الاستزراع السمكي: The use of medicinal plants in fish culture

يُعرف النبات الطبي بأنه أي نبات يحتوي في جزء أو أكثر من اجزاءه على مواد يمكن استخدامها لغرض العلاج، و له تأثير فسيولوجى على جسم الإنسان أو الحيوان، إذ يؤثر على الكائنات الحية التى تتطفل على جسم الإنسان أو الحيوان خارجياً أو داخلياً إما بالتنشيط Activation أو التثبيط Damping أو القتل Kill أو الطرد Expulsion (Abayomi وآخرون،2013).

ذكرت بعض الدراسات أن التأثير الضار للأدوية البيطرية المستخدمة في الاستزراع المائي سواء على الأسماك أو على البيئة وصحة الإنسان، أدى إلى جعل النباتات الطبية وسيلة واعدة بديلة لمكافحة أمراض الأسماك(Wang وآخرون ،2015). إذ تستخدم النباتات الطبية في الاستزراع المائي ليس فقط علاجاً كيميائياً ولكن أيضا إضافات علفية، وذلك لاحتوائها على مجموعة واسعة من العناصر الغذائية والمركبات الكيميائية (Chang ،2000). كما تم تسجيل الكثير من الأنشطة البيولوجية للنباتات الطبية منها تعزيز النمو، وتحفيز الشهية، وزيادة المناعة، ومضادات الميكروبات، ومكافحة الإجهاد في الأسماك (Chakraborty و Hancz ،2011).فيما أظهرت بعض النباتات الطبية نشاطاً مضاداً لبكتريا *Aeromonas hydrophila* في أسماك البلطي النيلي *Oreochromis niloticus* كما في دراسة (Park و Choi ،2012) الذي حصل على أعلى معدل بقاء للأسماك (83%) في المجموعة المغذاة على 50 ملغم /كغم من مستخلص نبات الهدال(الدبق) *Viscum* لمدة 80 يوماً. وأيضا تعمل النباتات الطبية محفزاً للاستجابة المناعية الخلوية والخلطية التي تم رصدها من خلال الارتفاع في المعايير

المناعية في دم الأسماك(Awad و Amani ،2017). كما يمكن إعطاء النباتات الطبية للأسماك عن طريق الحقن (داخل العضل وداخل الصفاق)، أو عن طريق الفم أو عن طريق الغمر (الحمامات)(Wu وآخرون،2010 و Ji وآخرون ،2012). في حين بينت Miriam وآخرون(2017) أن تناوله عن طريق الفم هو الأنسب للاستزراع المائي، إذ يمكن للنباتات الطبية أن تحدث تغييرات فسيولوجية في الأسماك لتحسين أدائها وتعزيز مقاومتها لمسببات الأمراض.

ذكرت بعض الدراسات أهمية مساهمة المستخلصات النباتية في تحفيز الشهية وزيادة الوزن عند استخدامها في علائق الأسماك المستزرعة(Takaoka وآخرون ،2011)، كما في دراسة (Pavaraj وآخرون،2011) إذ أظهرت النتائج أن افضل زيادة وزنية لأسماك الكارب الشائع *Cyprinus carpio* كانت في المجموعة المغذاة على نسبة 10 ppm من مستخلص نبات الريحان *Ocimum basilicum* قياساً بمجموعة السيطرة. استخدمت النباتات الطبية مصدراً رخيصاً للبروتين لتحل محل البروتين في مسحوق السمك وأثبتت فعاليتها في هذا الجانب(Awad و Amani ،2017). وأكدت دراسات أخرى أن تناول المستخلصات النباتية يحسن من هضم المواد الغذائية، مما يؤدي إلى زيادة كفاءة التحويل الغذائي للأعلاف، فضلا عن تخليق البروتين. (Putra وآخرون ، 2013؛ Talpur وآخرون،2013)

2.2: استخدام نبات النعناع في علائق الأسماك:The use of mint in fish diets

يعد نبات النعناع *Mentha piperita* من أهم النباتات الطبية والعطرية اقتصادياً إذ أنتج زيت النعناع في العالم بما يقارب 8000 طن لعام 2006(Yadegacinia،2006). كما يعد من أقدم الأعشاب الطبية في العالم التي استخدمت في التقاليد الشرقية والغربية (Keifer،2007). ويحتوي النعناع على زيت طيار يشكل 1.5 % واليه ترجع الفعالية العلاجية للنبات، إذ يمكن استخدامه مضاداً حيوياً طبيعياً، وقد تم تحديد ثلاثة وأربعين عنصرًا في زيت النعناع، وكانت أهم المكونات الرئيسية هي

المنثول (36.9%) Menthol، المنثون (28.8%) menthone، خـــلات الميثيل methyl acetate (4.5%) (Mohaddese و Nastaran،2014). اسـتخدم Ahilan وآخرون(2008) ثلاثة مسـتويات من زيت النعناع 1% ،3%، 5% في علائق الأســـماك الذهبية *Carassius auratus* ،إذ أظهرت النتائج تفوق المســـتوى الأول 1% على بقية المســـتويات من خلال الزيادة في معدل الوزن والحالة الصـحية. وأشـار Hajibeglou و Sudagar (2010) إلى أن حقن أسـماك الكارب الشـائع *Cyprinus carpio* ببكتريا *Aeromonas hydrophila* والمغذاة على نسـبة 1000 ملغم زيت النعناع / لكل كغم من العليقة ، أدى إلى حدوث نشـــاط مضـــاد للبكتريا، وارتفاع في نشـــاط الأجســـام الحالة أو المحللة Lysozyme، و نشـاط البلعمة، وارتفاع كريات الدم البيضـاء White Blood Cells (WBC)، وكريات الدم الحمراء Red Blood Cells (RBC)، الهيموغلوبين، بروتين المصل الكلي، الألبومين والغلوبيولين، فضـلا عن ارتفاع معدل البقاء. فيما توصـلت Ribeiro وآخرون (2016) إلى نتائج مماثلة عند اسـتخدام 0.5% من زيـت النعنـاع في علائق أســـمـاك البـاكو الاســـود (Black Pacu) *Colossoma macropomum* .

كما أكد Talpur (2014) على أن تغذية أســـماك القاروص الأســـيوي *Lates calcarifer* على مسـتخلص النعناع بتركيز 5 غم / لكل كغم، أدى إلى أنخفاض معدل الهلاكات بشـكل ملحوظ، مع زيادة في معدل الوزن وكفاءة التحويل الغذائي، كما زادت بشـــكل كبير كريات الدم الحمراء، الهيماتوكريت، الهيموغلوبين، نشـاط البلعمة، نشـاط الأجسـام الحالة lysozyme ومضـادات البروتيز والبكتيريا، كذلك أنخفاض في نسبة الكلوكوز في الدم، الدهون، الدهون الثلاثية ومستوى الكوليسترول في الدم.

بين Adel وآخرون (2015)، أن إضـافة مسـحوق النعناع بنسـبة 3% إلى علائق أسـماك قزوين البيضـــاء *Rutilus frisii kutum* أعطى نتـائج معنويـة ($p\leq0.05$) في زيـادة الوزن Weight

Gain(WG)، ومعدل النمو النوعي Specific Growth Ratio (SGR) ومعامل التحويل الغذائي Food Conversion Ratio (FCR)، كذلك تراكيز عالية من البروتين على مخاط الجلد، فيما تم الحصول على نتائج مماثلة عند دراسة نشاط الفوسفاتيز القلوي، وعلى العكس من ذلك، أنخفض معنويا ($p\leq0.05$) عدد الخلايا الليمفاوية في الدم بشكل واضح . كما حصل Adel وآخرون(2015) على نتائج مماثلة عند تطبيق تركيز مسحوق النعناع 3% في علائق أسماك السلمون البني *Salmo trutta caspius*. في حين استخدم Adem (2015) زيت النعناع بثلاثة مستويات(0.5% ،1% ،1.5%) في علائق أسماك التراوت *Oncorhynchus mykiss*، ومن خلال النتائج اتضح أن التركيز 1% قد رفع قيم احماض Epicosapentaenoic (EPA) و Docosahexaenoic (DHA) الاساسين في (الأوميكا3) المفيدة لصحة الإنسان، كذلك لوحظت نتائج مماثلة في قيم oleic acid، فضلا عن تحسين كفاءة التحويل الغذائي مع ارتفاع معدل البقاء قياساً مع مجموعة السيطرة، وقد لوحظ أن نشاط الإنزيمات المضادة للاكسدة، كإنزيم Superoxide dismutase (SOD)، وإنزيم Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)، وإنزيم Glutathione peroxidase (GPx) زادت بشكل كبير في أنسجة الكبد.

استخدم Adel وآخرون (2016) ثلاثة مستويات من مسحوق النعناع (1% ،2% ،3%) في علائق أسماك التراوت *Oncorhynchus mykiss*، وبعد ثمانية أسابيع أظهرت النتائج فروقات معنوية ($p\leq0.05$) في تراكيز خضاب الدم Haemoglobin (Hb) وكريات الدم الحمراء (RBC) في المستويين 2 و3% متفوقين بذلك على معاملتي السيطرة والمستوى 1%، فيما ارتفعت قيم كريات الدم البيضاء (WBC) وحجم الخلايا المكدسة Hematocrit (Ht) في المستوى 3% قياساً ببقية المستويات، وكانت أعلى معدلات البقاء على قيد الحياة في المستوى 3% إذ بلغ 75.2% قياساً بمجموعة السيطرة التي بلغت فيها نسبة البقاء 34.6% فقط . كما بين Valladaol وآخرون(2016) أن استعمال زيت النعناع

في علائق أسماك *Piaractus mesopotamicus* المصابة بطفيلي *Ichthyophthirius multifiliis*، أدى إلى بقاء 53.33 ٪ من الأسماك على قيد الحياة في المجموعة المعاملة بزيت النعناع قياساً بنسبة 0% في مجموعة السيطرة. في حين لم يؤثر معنويا($p\leq0.05$) استخدام زيت النعناع بنسب 100 و 250 مغلم/كغم في علائق أسماك البلطي النيلي *Oreochromis niloticus* L (Gustavo وآخرون، 2017)، كما أشارت Mohamed (2017) لعدم وجود اختلاف كبير في نشاط الأجسام الحالة lysozyme ونشاط أوكسيد النيتريك، خضاب الدم (Hb)، وحجم الخلايا المكدسة Packed cell volume (PCV)، إنزيم ناقل اللنين Alanine amino Transferase (ALT) ، إنزيم ناقل السبارتيز Aspartate amino Transferase (AST)، حمض اليوريك، اليوريا، الكرياتينين والألبومين بين المجموعات المختلفة في دم أسماك البلطي النيلي *Oreochromis niloticus*المغذاة على عليقة احتوت على 4% من مسحوق النعناع . وذكر Leyciane وآخرون(2019) أن استعمال زيت النعناع بثلاثة مستويات (0.075% ، 0.125% ، 0.25%) في مقاومة بكتريا *Streptococcus agalactiae* في أسماك البلطي النيلي Nile tilapia، أدى إلى مقاومة شديدة للأسماك عند التركيز 0.25% مع ارتفاع نسبة البقاء قياساً ببقية المعاملات.

أشارت Tabatabaei وآخرون (2016) إلى أن طلاء لحوم أسماك التراوت القزحي *Oncorhynchus mykiss* بزيت النعناع والليمون بنسبة (1% و 0.5%) والمبردة على درجة حرارة 4 ±1 درجة مئوية لمدة 16 يوم، أدى إلى أنخفاض قيمة الاس الهيدروجيني pH الذي قد يمنع نمو البكتيريا ويعيق نشاط البروتياز الداخلي مما يؤخر تلف اللحوم ومن ثم يطيل من العمر الافتراضي لمنتجات اللحوم. كما استخدم زيت النعناع في تجارب تخدير الأسماك، ومنها اختبار فعالية زيت النعناع في تخدير أسماك المهرج *Amphiprion ocellaris* ،إذ تعرضت الأسماك لخمس تراكيز من زيت النعناع 17 ، 35 ، 50 ، 70 و 100 مل/لتر لمدة 15 دقيقة، لوحظ بعد 24 ساعة من التعرض

للزيوت أن أفضـــل تـأثير للمخدر عند تركيز 70 مل وبلغت فترة الاســـترداد 329.5 ثانيـة فقط (Pedrazzani و Antonio، 2014). في حين ذكرت Roohi و Mohammad (2014) أن وضـــع أسـماك الكارب الشـائع *Cyprinus carpio* في لتر من الماء درجة حرارته 23 درجة مئوية وتعريضـها إلى زيت النعناع مع زيت ساليسيلات المثيل المستحلب(CMSE) بتراكيز مختلفة، إذ اسفرت النتائج عن تفوق المستوى 526 مايكرولتر/لتر على بقية التراكيز من حيث فترة الأنتعاش وارتفاع معدل البقاء قياساً بمجموعة السيطرة.

3.2: اسـتخدام نبات البابونج في علائق الأسـماك: The use of chamomile in fish diets

يعد البابونج *Matricaria. chamomilla* من أشهر النباتات الطبية على الإطلاق حتى تربع على عرش النباتات الطبية والعطرية، كما يستخدم مصدراً أساسياً في الحصول على الدواء من المركـــبات الفعالة بيولوجياً والمفصـولة منه، إذ يسـتخرج من أزهاره زيت عطري طيار بنسـبة تتراوح بين (0.5 إلى 1.5%) من الوزن الجاف (Maqboul وآخرون ,1995). ويتميز زيته بلون ازرق غامق بســـبب وجود مادة الأزولين (Azulene) وغيرها، اذ تحتوي النســـبة الاعظم من زيت البابونج على β-farnesene (29.8 %)، α-farnesene (9.3 %)، α-bisabolol and its oxide (15.7 %)، chamazulene (6.4 %)، germacrene D (6.2 %)، spiroether (5.6 %) (Ljiljana وآخرون،2016).

ذكر Anthony (1999)، أن اسـتخدام مسـتخلص البابونج مع اعشـاب أخرى بنسـبة 10% من مجموع كمية الماء داخل الاحواض، أدى إلى خفض مستوى الاجهاد في الأسـماك بشـكل واضـح. فيما أشـار Abdelhamid وآخرون(2007) إلى امكانية اسـتخدام زهور البابونج بنسـبة 3% لإزالة سـموم aflatoxin B1 من دم أصبعيات البلطي النيلي أحادي الجنس *Oreochromis niloticus* . كما كشفت

بعض الدراســـات عن أن إضـــافة زيت البابونج إلى علائق أســـماك البلطي النيلي *Oreochromis niloticus* بنسبة 2 غم لكل 100 غم من العليقة أدى إلى ظهور فروق معنوية ($p\leq0.05$) في تحسين نمو الأسـماك وارتفاع معدل التحويل الغذائي، ورفع مسـتوى الشـهية، وارتفاع نسـب معدل البقاء قياسـاً بمعـاملـة السـيطرة كمـا في دراســـة (Abou Zied،2003 ؛ Hassouna،2008 ؛- Abdel Tawab،2010). في حين اسـتخدم Yasser وآخرون (2010) زيت البابونج بنسـبة 1% إذ أظهرت النتائج تحسين الاستجابة المناعية في أسماك الجري الافريقي *clarias gariepinus* من خلال ارتفاع قيم Hb و PCV و WBC. وحصـل Zaki وآخرون(2012) على نتائج مماثلة عند اسـتخدام نفس التركيز من زيت البابونج في علائق صـغار أسـماك البلطي النيلي أحادي الجنس *Oreochromis niloticus* . وقام Rahanandeh وآخرون (2015) بعمل جروح متساوية في الأسماك الذهبية Gold Fish واختبروا فعالية مسـتخلص البابونج في معالجة الجروح ، إذ أظهرت النتائج أن للبابونج تأثير جيد على التئام الجروح ، فضلا عن تأثيره المضاد للالتهابات. من جهة أخرى أكد Saidah وآخرون(2017) أن استخدام 6% من مسحوق البابونج في علائق أسماك البلطي الاحمر *Oreochromis sp* أدى إلى زيادة واضـحة في معدل النمو اليومي، والهيموغلوبين والهيماتوكريت وزيادة الإنتاجية من خلال ارتفاع معدل التحويل الغذائي، كذلك حفزت الاسـتجابة المناعية لدى الأسـماك وأظهرت مقاومة ضـد بكتريا *Aeromonas hydrophila* . كما أشـار Erkan وآخرون (2017) إلى أن اسـتعمال زيت البابونج مخدراً في نوعين من أسـماك الزينة *Sciaenochromis fryeri*، و *Labidochromis caeruleus* اثبت فعاليته بالتخدير العميق عند نسـبة 0.6 مل/ لتر ولمرحلة فقدأن التوازن بنسـبة 0.3 مل/لتر. وفي السياق نفسه أكدت Al-Niaeem وآخرون (2019) بأنه عند استخدم مسحوق البابونج بنسبة 450 ملغم / لتر ماء في التخدير الجزئي والكلي لأسـماك الكارب الشـائع *Cyprinus carpio* أدى إلى ظهور

اختلافات كبيرة ذات دلالة إحصائية ($p\leq0.01$) التي تستغرق وقتًا أقل إما للتعافي الجزئي أو الكلي قياساً بمجموعة السيطرة.

4.2: استخدام نبات الزنجبيل في علائق الأسماك: The use of ginger plant in fish diets

يعد الزنجبيل *Zingiber officinale* أحد أهم النباتات الطبية الذي ينتمي للعائلة الزنجبيلية *Zingiberaceae*، ذو أوراق تويجية مخضرة وأزهار صفراء مخططة باللـــون الأرجوانـــي, ويزرع في الأماكن وفيرة الأمطار(Gugnani و Ezenwanze ،1985). يتكون زيت الزنجبيل بشكل رئيسي من مركبات هيدروكربونات السيسكيترين sesquiterpene hydrocarbons التي في الغالب تتكون من (35%) الزينيبرين zingiberene و (18%) من كوركومين curcumene و(10%) من الفارينســين farnesene (Govindarajan ،1982). ويعد الزنجبيل من الأدوية العشـــبية الآمنة (Weidner و Sigwart, ،2000) كما أثبت الزنجبيل فعاليته في علاج الأمراض لدى البشـــر والحيوانات ومنها الأسماك بسبب مضادات الميكروبات ومضادات الأكسدة ومحفزات النمو وخصائصه المناعية (Nya و Austin،2009 ؛ Apines-Amar،2012). إذ أشـــار Abdelhamid وآخرون (2007) إلى أن استعمال الزنجبيل بنسبة 0.5% كان أفضل عامل لإزالة السموم aflatoxicosis من العليقة المقدمة إلى أصبعيات البلطي النيلي أحادي الجنس *Oreochromis niloticus*. فيما بينت Nya و Austin (2009) أن استخدام 0.5 غرام من الزنجبيل لكل 100 غرام من العلف لمدة (14) يوم في علائق أسماك التروات القزحي *Oncorhynchus mykiss* أدى إلى الســيطرة على العدوى التجريبية لبكتريا *Aeromonas hydrophila* من خلال أنخفاض مستوى الوفيات إلى 0% قياساً بـــ 64% لمجموعة السيطرة، كما أدى

إلى زيادة كبيرة في النمو مع ارتفاع معدل التحويل الغذائي ، فضـــلا عن تعزيز نشـــاط البلعة والأجســـام الحالة.

أكد Masoud و Mostafa (2013) أن للزنجبيل خصـائص مناعية من خلال النتائج التي حصـل عليها عند استخدام 1% من جذور الزنجبيل المجفف في تغذية أسماك التراوت القزحي *Oncorhyncus mykiss* إذ أظهرت النتائج ارتفاع معلمات الدم، خلايا الدم المكدسة (Ht) وخضاب الدم (Hb) وخلايا الدم الحمراء (RBC) والبيضاء (WBC)، إضافة إلى زيادة في نشاط الأجسام الحالة lysozyme قياساً بمجموعة السيطرة عند مستوى معنوية ($P \leq 0.05$). في حين أن إضـافة زيت الزنجبيل بنسـبة 1% إلى شـرائح الأسـماك أدى إلى زيادة العمر الافتراضـي للأسـماك، بفترة صـلاحية تصـل إلى (17) يوماً عند درجة خزن(4) درجة مئوية، كما كان له تأثير إيجابي على الجودة الحسية للأسماك(Emir، 2013).

اسـتخدم Talpur وآخرون(2013) جذور الزنجبيل بخمس مسـتويات (1, 2 , 3, 5, 10) غم لكل كيلو غرام علف في تغذية أســماك البرومون الشــائع *Lates calcarifer* المصــابة بالعدوى التجريبية ببكتيريا الضمة *Vibrio harveyi* ، إذ أظهرت النتائج تفوق المستويين 5 و 10 غم على بقية المستويات في تحقيق أعلى نسبة بقاء بنسبة (86.6%) قياساً بمجموعة السيطرة بنسبة بقاء (26.7%) ، بالإضافة إلى ذلك حقق الزنجبيل زيادة كبيرة في معدل الوزن ومعامل تحويل الاعلاف، فضــلا عن أن مســتويات الكلولكوز والدهون الثلاثية والكوليســترول كانت اقل نســبيا قياســاً بمجموعة الســيطرة. في حين أكدت Hosna وآخرون (2014) أن اســتخدام 1 غم من الزنجبيل لكل 100 غرام من العلف في تغذية أصـبعيات أسـماك *Huso huso*، أدى إلى ظهور فروق معنوية ذات دلالة إحصـائية($P \leq 0.05$) قياساً بمجموعة السيطرة من خلال ارتفاع مستويات كريات الدم الحمراء ومعلمات النمو ومستوى الألبومين كما أدى إلى ارتفاع مستوى البروتين الكلي والكلوبيولين.

كما استعمل Hassanin وآخرون(2014) عدة مستويات من الزنجبيل في تغذية أسماك البلطي النيلي *Oreochromis Niloticus* والمصـــابة بالعدوى التجريبية ببكتيريا *Aeromonas hydrophila*. ، فأظهرت النتائج مقاومة واضـــحة للعدوى وارتفاع في المعلمات المناعية في المســتويين 1% و 0.5% إذ بلغ معدل بقاء الأســماك 90% و80% على التوالي في هذين المســتويين قياســاً بمجموعة الســيطرة البــالغــة 36% فقط. واســـتخــدم Brum وآخرون(2018) زيــت الزنجبيــل بثلاث مســـتويــات (0.5%،1%،1.5%) في علائق أســـمــاك البلطي النيلي، فقــد دلــت النتــائج على ارتفــاع معنوي ($P \leq 0.05$) في نشاط الأجسام الحالة عند جميع المستويات قياساً بمجموعة السيطرة في حين لم تظهر مســـتويات الكلوكوز والبروتين الكلي و الكلوبيولين المناعي في مصـــل الدم اي فروق معنوية قياســـاً بمجموعة السيطرة. فيما اوضحت دراسة Ehsan وآخرون (2019) على أسماك الزرد البالغة *Danio rerio* أن اســـتخدام الزنجبيل بثلاث مســـتويات (1, 2, 3 %) من العليقة، أدى إلى ارتفاع مســـتوى البروتين الكلي 2.07 ملغم/100مل في المســتوى 3% كما حقق مســتوى الكلوبولين المناعي أعلى زيادة بلغت 0.479 ملغم/100مل، ولاحظ أيضا زيادة في نشاط الفوسفاتيز في جميع المستويات عدا مجموعة الســيطرة، وقد وجد نمط مماثل في النتائج الخاصــة بالإنزيمات المضــادة للاكســدة في جميع مجموعات الزنجبيل عدا مجموعة السيطرة. في حين وجد Mohammadi وآخرون(2020) ارتفاع مستويات نشاط الأجســـام الحالة و إنزيم الفوســـفات القاعدي Alkaline phosphatase (ALP) والكلوبيولوين المناعي (IG) في أسماك الكارب الشائع المغذاة على عليقة تحتوي 2% من مستخلص الزنجبيل قياساً بمجموعة السيطرة ، كما لاحظ ارتفاع مستويات(RBC) و(WBC) و (Ht) .

5.2: تربية الأسماك في الأقفاص العائمة : Breeding fish in floating cage

تعد تربية الأســـماك في الأقفاص من بين الابتكارات الحديثة التي جذبت اهتمامًا كبيرًا في أنتاج الأســـماك في معظم البلدان، إذ ســـجلت نمواً ملحوظاً في الســـنوات الاخيرة (Oliver وآخرون،2019).

واستحوذت تربية الأسماك في الأقفاص على اهتمام الكثير من مزارعي الأسماك، بسبب مزاياها قياساً بتربية الأسماك في الاحواض، فضلاً عن زيادة الإنتاج لكل وحدة حجم من المياه، وأنخفاض تكاليف الاستثمار، والادارة السهلة للاقفاص في التغذية والحصاد (Laban وآخرون،2019). وأكد Chu وآخرون (2020) أن الظروف البيئية تؤثر بشكل مباشر على حياة الأسماك وعلى سلامة القفص لذا يجب أن تكون الأقفاص قوية بما فيه الكفاية، لذلك اصبحت الأقفاص العائمة الصلبة هي النوع الاكثر شعبية بسبب قوتها وتحملها للظروف البيئية القاسية. فيما أشار Elenise وآخرون(2012) إلى أن تقنيات الاستزراع في الأقفاص مناسبة لعدة أنواع من الأسماك، وأصبحت مساهماً هاماً في الإنتاج في بعض بلدان العالم. وهذا التطور في الاستزراع المكثف داخل الأقفاص في السنوات الأخيرة أدى إلى ظهور تهديدات بارزة للبيئة (Ning وآخرون،2006 ؛ Sun وآخرون،2005). منها تزايد حدوث الأمراض في الأسماك ذات الأهمية الاقتصادية بسبب التكاثر السريع لمسببات الأمراض مخلفاً خسائر كبيرة في تربية الأحياء المائية، مما أثر على تطور هذا القطاع في بعض البلدان (Pillay و Kutty، 2005). وذكر El Gamal (2001) أن استزراع الأسماك في الأقفاص العائمة في العراق بدأ عام 1980 في بحيرة الحبانية، لأغراض بحثية فقط ولم يكن لاغراض تجارية.

6.2: أسماك الكارب الشائع: *Cyprinus carpio*

الكارب الشائع، *Cyprinus carpio* ينتمي إلى عائلة *Cyprinidae* الموطن الأصلي له غرب آسيا وتم نقله أو إدخاله إلى جميع أنحاء العالم، وأصبح الكارب الشائع أحد أسماك الطعام الأكثر أهمية مع الكثير من السلالات والأصناف الموجودة في أنحاء مختلفة من العالم(Xu وآخرون،2012) وبين Peteri (2009) أن أفضل نمو لأسماك الكارب الشائع عندما تكون درجة حرارة الماء تتراوح بين (23 – 30) درجة مئوية، وقيمة الأس الهيدروجيني(pH) المثالية تقع بين 6.5–9.0، و يتحمل تركيز

الأكسجين المذاب المنخفض عند مستوى يصل بين (3–5 ملغم / لتر)، كما يمكن للأسماك أن تتحمل درجة الملوحة إلى حوالي 5 غم/لتر. فيما أشار Iffat وآخرون(2019) أن أسماك الكارب الشائع صنفت مؤخراً ضمن عدة أنواع من أسماك المياه العذبة كأسماك البلطي النيلي *Oreochromis niloticus* والكارب الذهبي *Carassius uratus* والجري النهري *Pangasianodon hypophthalmus* وغيرها بوصفها نوعاً جيداً للتربية في معدلات الملوحة العالية.

ذكر Dimitry و Natalia (2009)،أن أسماك الكارب الشائع تمتلك 100– 104 كروموسوم تقريبا وهو يمثل مايقارب ضعف الكروموسومات الموجودة في بقية أنواع أسماك الكارب. كما يحتوي جينوم أسماك الكارب الشائع على (52610) من الجينات التي تعبر عن بروتينات متعددة ويتركز نحو 92.3 % من المعلومات الوراثية الخاصة بها في الكرموسومات الرباعية (Zhang،2013).

ادخلت سمكة الكارب من هولندا إلى العراق عام 1955 و من أندونيسيا عام 1956، وتم استزراعها في مزرعة أسماك الزعفرانية في بغداد، ثم اطلقت في نهر دجلة وبحيرة الحبانية عام 1958(Al–Hamid،1960).

7.2: مرض التسمم الدموي الإيروموناسي: Motile Aeromonas Septicemia (MAS)

يصيب هذه المرض جميع أنواع الأسماك المستزرعة في المياه العذبة والشروب والمالحة حتى الأسماك الحرة، بالإضافة إلى أسماك الزينة في درجات الحرارة المعتدلة والعالية (الربيع ، الصيف) وقد تصل نسبة الاصابة إلى 100% ونسبة الهلاكات تصل إلى 60% وخاصة في أصبعيات الأسماك، (AOAD، 2017).

تعاني الكثير من مزارع ومفاقس الأسماك في العراق من خسائر كبيرة نتيجة الهلاكات العالية التي يسببها مرض التسمم الدموي الإيروموناسي، إذ يلجأ المربون إلى علاج الأسماك باستخدام عدة أنواع من المضادات الحيوية التي بدورها يزيد من كلف الإنتاج، فضلا عن أن الاستعمال المفرط للمضادات الحيوية أدى إلى ظهور عتر مقاومة للعلاج وكذلك التأثير المثبط لجهاز المناعة (Abdulmotalib وآخرون،2013). وأشار Dunhua وآخرون(2020) إلى أنه من الصعوبة السيطرة على مرض MAS ، بسبب التطور السريع للمرض الذي جعل استخدام العلاج بالمضادات الحيوية واستراتيجيات التدخل الأخرى غير مجدية.

بين Ran وآخرون(2018) أن آلية مرض تسمم الدم في الأسماك معقدة وترتبط بعوامل عدة ، مثل الآثار التآزرية للبكتيريا الأخرى، وتدهور البيئة المعيشية، وعوامل الضراوة. كما أشار Samanta و Bandyopadhyay (2020) أن الكثافة العالية، أنخفاض الأوكسجين المذاب، المادة العضوية العالية، تراكم مبيدات الآفات الزراعية، وتقلبات درجة الحرارة هي من العوامل المساعدة للاصابة بالمرض. ويُعد مرض التسمم الدموي الإيروموناسي من الأمراض المشتركة بين الأسماك والإنسان، إذ يسبب في الإنسان التهابات حادة في الأمعاء والتهاب الجلد والأنسجة الرخوة. (Batra وآخرون،2016 ؛ Soltan وآخرون،2016).

تعد بكتيريا *Aeromonas hydrophila* المسبب الرئيسي لمرض التسمم الدموي الإيروموناسي في الأسماك ومنها الكارب الشائع *Cyprinus carpio* (HU وآخرون،2017 ؛ Nan وآخرون،2018).

ذكر Rafael (2019) أن بكتيريا *Aeromonas* تعود إلى عائلة *Aeromonadaceae*، كما يعتقد أن العزلات الأولى تمت في عام 1890، وأن مصطلح *Aeromonas* تم اقتراحه أولاً في عام 1936 من قبل Kluyver و van Neil ضمن البكتيريا المنتجة للغاز، فيما استخدمه Stanier رسميًا

في عام 1943. وفي عام 1984 تم أدخالها ضـمن الأنواع التي يمكن أن تصـيب مجموعة واسـعة من الحيوانات وأسـماك المياه العذبة أو المالحة (Samanta و Bandyopadhyay ,2020) كما تنتمي بكتيريا *Aeromonas* إلى مجموعة البكتيريا سالبة الغرام (Mishra وآخرون،2020) .

بينت دراسـة Alsaphar و Jamal (2012) بأن حقن أسـماك الكارب الشـائع بالجرعة المميتة $0.3 \times 10^{8.66}$ cfu/ml من عترة *aeromonad* أدى إلى ظهور الأعراض بعد 14 يوم من الاصـابة، إذ لوحظ نزف على سـطح الجسـم ، تجمع السـوائل في منطقة البطن، تقرح مع بروز العين و وجود بقع نزفية على الكبد وهشـاشـة الكلى . وأكدت Khamees وآخرون (2013) في دراسـتهم على أن حقن أسـماك الكارب الشـائع ببكتيريا *Aeromonas hydrophila* المسـببة لمرض الأنتان النزفي البكتيري MAS بجرعة 10^8 وحدة مكونة للمستعمرة cfu /100 غم من وزن الجسم، أدى إلى ظهور الأعراض بعد ثلاثة أيام من الاصـابة وتمثلت بخمول الأسـماك مع صـعوبة في التنفس والسـباحة قرب سـطح الماء وتآكل حافات الزعانف وبروز العين وتمدد البطن ،مع تضـخم الكلى والطحال والكبد. كما ذكر Ghazi و Rajaa(2013) في المسـح الذي اجراه على تواجد بكتيريا *Aeromonas hydrophila* في ثلاثة أنواع من الأسـماك جمعت من شـمال غرب الخليج العربي في البصـره، إذ أظهرت النتائج عن تواجد 24 عزلة من البكتيريا في عضـلات الأنواع الثلاثة منها (33.3%) في *Epinephelus tauvina* و (44.4) في *Hilsa ilisha* و(17.39%) في أسـماك *Lethriuns nebulosus*، وبينت الدراسـة أن العزلة التي حققت أعلى نسـبة للضـراوة تم الحصـول عليها في أسـماك *Epinephelus tauvina* . وأشـار Jiajie وآخرون(2019) إلى أن أسـماك البلطي النيلي *Oreochromis niloticus* المحقونـة ببكتيريـا *Aeromonas hydrophila* أظهرت دوراً في الاسـتجابة المناعية بعد التحدي البكتيري، إذ بينت نتيجة qRT– PCR أن mRNA للـ galectin–3 تم التعبير عنه على نطاق واسـع في الأنسـجة المختلفة (القلب والكبد والطحال والكلى والخياشـيم والدماغ والأمعاء والجلد والعضـلات والمبيض) ولوحظ

أيضـــا أن أعلى تعبير في الأنســـجة المرتبطة بالمناعة ظهرت على(الكبد والطحال). وأوضـــح Yilmaz (2019) بدراسـته أن أسـماك البلطي النيلي *Oreochromis niloticus* المصـابة بجرعة تجريبية من بكتيريا *Aeromonas* تم فيها تسـجيل البقاء التراكمي للأسـماك لمدة 20 يومًا، إذ ظهرت على الأسـماك أعراض منها السـباحة بشـكل غير طبيعي واللون الغامق وفقدأن الشـهيةِ، و لوحظ نزيف حاد على سـطح الكبد والأمعاء.

8.2: المناعة في الأسماك : Immunity in fish

في الفقاريات، تم تقسـيم المناعة بشـكل تقليدي إلى جزءين ، الاسـتجابة المناعية الفطرية والاسـتجابة المناعية التكيفية أو المكتسبة، المناعة الفطرية هي خط الدفاع الأول ضد العدوى وتشمل كلا من الحواجز المادية وكذلك الاســتجابات الخلطية والخلوية، أما الاســتجابة المناعية التكيفية تشــمل أيضــا الحواجز الخلطية والخلوية (Rosario و Carolina،2015). الجزء الخلطي humoral وتسمى باللمفاويات البائية B lymphocytes او الخلايا البائية B cells تُنْتِجُ الخلايا البائية جزيئات بروتينية، أو ما يســـمى أضـدادا antibodies ترتبط بالأجسـام الغريبة، أو ما يسـمى المسـتضـدات antigens الموجودة على سـطوح البكتيريا والفيروسـات الضـارة، واما الجزء الخلوي cellular ويطلق عليها اللمفاويات التائية T lymphocytes أو الخلايا التائية T cells، وهي عكس الخلايا البائية لاتنتج أضـــداداً، أنما تُمَيز المســتضــدات المرتبطة بأحد أنماط البروتينات الموجودة على ســطح نوع مختلف من الخلايا، لذا فهي مجهزة بصنف متخصص من الجزيئات، يسمى المُسْتَقْبِلة. (Secombes و Wang،2012).

لقد مرت الأســماك العظمية بعدة ســلاســل من ازدواج الجينوم في تاريخها التطوري، وكان لتكرار وحذف جيناتهم تأثير عميق على نظام المناعة والاســتجابات لديهم، إذ تحتوي الأســماك العظمية على جميع العنـاصـــر المـألوفـة في الجهـاز المنـاعي للفقـاريـات ومنهـا الخلايـا B، والخلايـا T (Brian

وآخرون،2016). وأشار Press و Evensen (1999) إلى أن الأسماك العظمية تمتلك جميع الجوانب المهمة لكل من المناعة الفطرية والمكتسبة، ومع ذلك ، فأن الاستجابة المناعية المكتسبة تكون أقل فاعلية في صغار الأسماك، إذ تظهر ببطىء (أسابيع بدلاً من الأيام). فيما ذكر Akira وآخرون (2006) أن الجهاز المناعي الفطري هو أول خط للدفاع ضد مسببات الأمراض، في حين أن المناعة المكتسبة تتضمن القضاء على مسببات الأمراض في المرحلة المتأخرة من الإصابة وكذلك توليد الذاكرة المناعية. والاستجابة الفطرية تسبق بشكل عام الاستجابة التكيفية، وتنشط وتحدد طبيعة الاستجابة التكيفية وتشارك في الحفاظ على التوازن (Bergljot،2006). وبالتالي، تلعب المناعة الفطرية دورًا مفيدًا في الدفاع ضد مسببات الأمراض(Gao وآخرون،2012)

أشارت معظم الدراسات إلى وجود مستوى عالٍ من التباين في عمر بدء تكوين الأعضاء للجهاز اللمفاوي، ولكن بشكل عام في أسماك المياه العذبة، مثل السلمون والسلمون المرقط والكارب، يحدث التكوين العضوي اللمفاوي بالترتيب التالي، الغدة الصعترية أو التيموسية والكلى والطحال(Sahoo ،2006؛ Klosterhoff وآخرون،2015).

9.2: بعض الجينات المناعية في الأسماك :Some immune genes in fish

اكتسبت الجينات ذات الصلة المناعية في الأسماك اهتماماً كبيراً بسبب دورها في تحسين فهم كل من المناعة السمكية وتطور الجهاز المناعي، إذ تم تمييز الكثير من الجينات ذات الصلة المناعية لكل من المناعة الفطرية والمكتسبة(التكيفية)، بما في ذلك تلك التي تشير إلى السيتوكينات والمكملات واللقاحات والكلوبيولينات المناعية ، وبعض جزيئات سطح الخلية، من مختلف أنواع الأسماك (Lv-yun وآخرون،2013). فيما عرف Savan و Sakai (2006) السيتوكينات بأنها مجموعة من البروتينات ذات الوزن الجزيئي المنخفض، تفرزها خلايا نشطة ذات صلة بالمناعة عند تحريضها بوساطة مسببات

الأمراض المختلفة مثل المسـببات الطفيلية أو البكتيرية أو الفيروسـية، ويمكن تقسـيمها إلى الأنترفيرون (IFNs)، الأنترلوكينات (ILs)، العامل في نخر الورم (TNFs)، العوامل المحفزة المستعمرة، والكيماويات. ومن الواضح أن جميع عائلات السيتوكينات الرئيسية موجودة في الأسماك، كما هو موضح في الكثير من الدراسـات السـابقة التي وصـفت الجينات الموجودة ومتى وأين يتم التعبير عنها على مسـتوى النسـخ(Secombes وآخرون،2011 ؛Secombes و Wang ،2012). ونظرًا لوجود عدد قليل من الأجسام المضادة لسيتوكينات الأسماك، فليس هناك أي بيانات عن تعبير البروتين، مع استثناءين (IFN و TNF) (Bird و Tafalla ،2015).

أشـار Secombes وآخرون(2011) إلى أن الأنترلوكينات Interleukins هي مجموعة فرعية من السـيتوكينات، وهي جزيئات تشـارك في التنظيم الخلوي للجهاز المناعي، إذ تمت صـياغة مصـطلح أنترلوكين لأول مرة في عام 1979 للأشـارة إلى الجزيئات التي تشـير إلى أنواع الكريات البيض المختلفة، على الرغم من أنها لا تقتصـر حصـريًا على الكريات البيض، في حين أنـه من المعروف الأن أن الإنترلوكينات يتم أنتاجها من قبل مجموعة واسـعة من أنواع الخلايا، ومع ذلك يتم تصـنيع الكثير منها بوساطة الخلايا المساعدة CD4 + T، الخلايا الضامة / الخلايا الفطرية والخلايا البطانية.

يعـد Interleukin1β (IL−1β) أول أنترلوكين يتميز بـالأسـماك العظميـة والغضـاريف (Zou وآخرون،1999 ؛Bird وآخرون،2002). يتم أنتاج IL−1β بوسـاطة مجموعة واسـعة من أنواع الخلايا بعد تنشـيط مسـتقبلات التعرف على أنماط المضـيف Pattern recognition receptor (PRRs) عن طريق المخططـات الجزيئيـة الممرضـة Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) أو المخططـات الجزيئيـة المرتبطـة بـالخطر Damage−associated molecular patterns (DAMPs)(Vojtech وآخرون،2012). وتوصـل Juriaan وآخرون (2006)

إلى أن جين IL−1β له علاقة مباشـرة بعمل الغدة النخامية والغدة الكظرية. كما أن IL−1β له وظائف فسـيولوجية متنوعة ويتم حفظ أدواره في تنظيم العملية الالتهابية في الأسـماك(Bo وآخرون،2015). بالإضـافة إلى دورها في تنظيم المناعة، تشـارك IL−1β في تنظيم العمليات الفسـيولوجية الأخرى، إذ أظهرت الدراسـات الحديثة أن التمثيل الغذائي في الأسـماك يتأثر بـ IL−1β، وتظهر خلايا عضـلات التراوت الأساسية المحتضنة بـ IL−1β تعبيرًا أعلى لكل من الجينات الوراثية والالتهابات المرتبطة بنمو العضلات والتمثيل الغذائي(Pooley وآخرون،2013).

أشـار Fernandez و Lolis (2002) إلى أن أنترلوكين 8 Interleukin (IL−8)، والمعروف أيضا باسم CXCL8، هو عضو في عائلة الكيموكينات chemokine متعددة الوظائف تتألف من حوالي 40 مركب من السـيتوكينات الصـغيرة القادرة على حث هجرة الخلايا إلى مواقع الإصـابة. كما يتم أنتاج IL−8 بوسـاطة مجموعة واسـعة من الخلايا استجابة لأنواع كثيرة من التحفيز، ومن أبرز خصـائصـه هو التغيير الديناميكي لمسـتوى التعبير في الأنسـجة السـليمة إذ لا يمكن اكتشـافه إلا بالكاد، ولكن يمكن التعبير عنه بسـرعة بمقدار 10−100 أضـعاف بوجود المسـببات المرضـية المختلفة(Brasier وآخرون،1998) إذ تتمثل الوظيفة الأساسية لـ IL−8 في تشجيع وتوظيف وتفعيل العدلات في مناطق الالتهاب الحاد(Mukaida وآخرون،2003).

وذكر Swain وآخرون(2011) أن أنترلوكين 10 Interleukin (IL−10)، هو سـيتوكين متعدد المظاهر، يتم التعبير عنه في أنواع مختلفة من الأسماك والفقاريات العليا، ويتم تنشيطه أثناء الإصابة. إذ تم التعرف على الجين IL−10 في عدد من الأسـماك العظميـة(Lutfalla وآخرون،2003). إذ تم اكتشـاف IL−10 في الأسـماك من خلال البحث عن جينوم أسـماك fugu *Fugu rubripes* (Zou وآخرون،2003). كما أشـار Zhang وآخرون(2009) إلى أن الدراسـات أظهرت أن تعبير IL−

10 يمكن زيادته عن طريق تحفيز Lipopolysaccharide (LPS) والعدوى البكتيرية، اوعن طريق إعطاء جرعة من المنشطات. كما تميزت وظائف IL-10 بالأسماك الذهبية والكارب بشكل عام، فهي تمارس دورًا في تثبيط الاستجابة الالتهابية(Piazzon،2015) ويحث IL-10 أيضا على الفسفرة والإزاحة النووية لـ Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) والتعبير السريع عن Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3)، بالإضافة إلى ذلك ، يمنع IL-10 التعبير عن الجينات المشاركة في اظهار مستضد البلعمة Major histocompatibility complex (MHC) في الكارب(Grayfer وآخرون،2011).

فيما اوضح Gao وآخرون(2008) أن جين عامل نخر الورم TNFα هو السيتوكين التنظيمي الفعال يتكون من خمسة اكسونات وأربعة أنترونات، مماثلة لجينات TRAIL في الثدييات. وتم تحديد عدد محدود فقط من أفراد أسرة TNFα في الأسماك العظمية، مشابه لعدد كبير منهم في الثدييات كأسماك الكارب الشائع *C. carpio* (Saeij وآخرون،2003)، وأسماك التراوت (Ordas وآخرون،2007). وتلعب عائلة TNFα دورًا رئيسيًا في الالتهابات، والدفاع المضاد، المناعة الذاتية، التخليق العضوي، موت الخلايا المبرمج الخلوي، والتمايز(Ware،2003). عمومًا أن TNFα يمارس آثاره من خلال الارتباط بمستقبلين متشابهين، معروفين بمستقبلات عامل نخر الورم 1 (TNFR1) و 2 (TNFR2). (Dembic وآخرون،1990) وفي السنوات الاخيرة، اهتم الباحثون بجين TNFα في الأسماك أكثر من الثدييات (Goetz وآخرون،2004).

10.2: التعبير الجيني: Gene expression

التعبير الجيني هو عملية استخدام المعلومات في جين معين إلى تخليق منتج بروتيني وظيفي، وعادة ما تكون هذه المنتجات بروتينات (Clough و Barrett ،2016). و يُعد الأكثر أساسية الذي

يرتقي عنده النمط الجيني إلى نمط ظاهري، أي سمة ملحوظة، والشفرة الجينية المخزنة في DNA يفسرها التعبير الجيني، إذ تؤدي خصـائص التعبير الجيني إلى النمط الظاهري للكائن الحي. وعادة ما يُعبر عن مثـل هـذه الأنمـاط الظـاهريـة عبر تخليق البروتينـات التي تتحكم في شـكـل العضـيـة(Moretto واخرون،2016). في السـنوات الاخيرة بعد عام 2000 تزايدت الدراسـات عن التعبير الجيني والدراسـات الجينومية الوظيفية الأخرى، وفي عام 2002، بدأت المجلات الرئيسـية تطلب إيداع بيانات ميكروأري Microarray في المسـتودعـات العـامـة(Edgar وآخرون،2002). ومنهـا دراسـة Thomas وآخرون(2003) من خلال اصـابة أسـماك السـلمون المرقط بعدوى طفيلية خارجية *Gyrodactylus derjavini*، إذ أشـارت النتائج إلى أهمية التفاعلات المناعية المخاطية الموضـعية في اسـتجابة الأسـماك تجاه *Gyrodactylus derjavini* من خلال ارتفاع التعبير الجيني لجين IL−1β. واوضـحت دراسـة Maureen وآخرون(2004) على أسـماك السـلمون المرقط التي تم اصـابتها بفايروس Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)، واختبرت مجموعة من الجينات منها (IL−1β و IL−8 و NTFα) فأظهرت النتائج ارتفاع التعبير الجيني لهذه الجينات مما شكل خطاً دفاعياً لمقاومة الفايروس. فيما أكدت دراسـة Santiago وآخرون(2007) على أسـماك الكارب الشـائع *Cyprinus carpio* L والمصـابة بطفيلي *Ic hthyophthirius multifiliis*، على ارتفاع التعبير الجيني في جينات IL−1β و TNFα في خلايا الجلد والدم. وقام Chuntao وآخرون(2008) بحقن أسـماك الكارب الشـائع *Cyprinus carpio* L بجرعـة من Astragalus polysaccharides (APS)، إذ أظهرت النتـائج ارتفاع مسـتوى mRNA لجين IL−1β في رأس الكلية، بينما لم يرتفع التعبير الجيني في الخياشـيم والطحال، وعند رفع جرعة APS أدى إلى ارتفاع مستوى mRNA لجين TNFα في الخياشيم والطحال، بينما أنخفض مسـتوى TNF−α mRNA بشـكل واضـح في رأس الكلية. واوضـحت Chakrabarti وآخرون(2014) في دراستهم أن استخدام بذور ازهار القشر *Achyranthes aspera* بتركيز 1% في

علائق أسماك الكارب الهندي *Catla catla*، أدى إلى ارتفاع التعبير عن جين TNF-α بينما لم تظهر فروق معنوية لتعبير جين IL-10 في رأس الكلى، بينما ارتفع IL-10 في الخياشيم، في حين سجل تعبير جين TNF-α ارتفاعاً في نسيج البنكرياس. ودرس Xiaohong وآخرون(2017) تأثير إضافة مستخلص الزعرور Hawthorn بتركيز 0.50 غم /كغم$^{-1}$ في علائق أسماك البومبانو الذهبي *Trachinotus ovatus*، إذ دلت النتائج على ارتفاع تعبير بعض الجينات المناعية المقاومة للالتهابات في الخياشيم والكلي ومنها (IL-8و TNF-α) في حين لم تظهر فروق معنوية ($p\leq0.05$) في كمية mRNA لجين IL-10 بالقياس مع مجموعة السيطرة. فيما بين Nan وآخرون(2018) أن اختبار اصابة أسماك المندرين *Siniperca chuatsi* ببكتيريا *Aeromonas hydrophila* ، أدى إلى ارتفاع التعبير الجيني عن جينات (IL-8 و TNFα) في رأس الكلية والطحال. وفي دراسة Abdel Rahmana وآخرون(2018) إذ استخدمت مزيجاً من مستخلص ازهار القنفذية الارجوانية *Echinacea purpurea* وفيتامين C في عليقة أسماك البلطي النيلي، إذ خلصت النتائج إلى ارتفاع قيم التعبير عن جينات (IL-1β و TNF-α) في الامعاء ورأس الكلى قياساً مع مجموعة السيطرة.

أشار Sevdan (2019) إلى أن تغذية أسماك البلطي النيلي *Oreochromis niloticus* على عليقة تحتوي على 5 غرام /كغم من حمض الكافيين على مدى 60 يومًا التي اصيبت ببكتيريا *Aeromonas*، كانت كافية لتحسين المعلمات المناعية للأسماك، وارتفاع كمية التعبير الجيني لمجموعة من الجينات ومنها جينات IL-8 و TNFα في كبد الأسماك. وأكدت Ghelichpour وآخرون(2019) في دراستهم حول أسماك الكارب الشائع *Cyprinus carpio* المعرضة إلى تركيز منخفض(0.75ppm) من مبيد indoxacarb، أدى إلى زيادة تعبير جينات السيتوكينات الالتهابية ومنها (IL-1β و IL-8 و IL-10 و TNF-α) في الكلى والكبد. وأشار Ravindra وآخرون(2019) إلى بعض الجينات المناعية ومنها (IL-1β و IL-10) فقد زادت بشكل ملحوظ في أسماك الكارب الهندي *Catla catla*

في الخياشـــيم والمصـــابة تجريبياً ببكتيريا *Flavobacterium columnare*. وبين Ehsan وآخرون (2019) في دراستهم، أن إضافة 3% من مسحوق الزنجبيل إلى علائق أسماك الزرد البالغة *Danio rerio*، لم تظهر فروق معنوية ($p\leq0.05$) في التعبير الجيني لبعض الجينات المرتبطة بالمناعة ومنها (IL-1β و Il-8 و NTFα) قياساً بمجموعة السيطرة.

أكد Seyed وآخرون(2020) أن إضـــافة 2% من مســـحوق اوراق اللويزة الليمونية *Aloysia citrodora* في علائق أسماك السلمون المرقط *Oncorrhyncus mykiss* ، أدى إلى التعبير بشكل ملحوظ عن بعض الجينات ذات الصـــلة المناعية (IL-1β، IL-8 و TNF- α) قياســاً مع مجموعة السيطرة. وأكدت Moustafa وآخرون(2020) أن استخدام بذور الحلبة بنسبة 3% في علائق أسماك البلطي النيلي *Oreochromis niloticus* والمحقونة ببكتيريا *Aeromonas hydrophila*، أدى إلى ارتفاع التعبيرالجيني لبعض الجينات المرتبطة بالمناعة ومنها TNF-α , IL-1β في رأس الكلية والكبد. وبينت Fazelan وآخرون(2020) أن استخدام مسحوق الزنجبيل بنسبة 10 غم لكل كغم $^{-1}$ في علائق أسماك الكارب الشائع *Cyprinus carpio* L،أدى إلى أنخفاض التعبير الجيني لجينات(IL-1β، IL-8، TNFα) بينما ارتفع التعبير الجيني في جين IL-10.

وقد بين Chao و Miao (2020) أن معظم الجينات المناعية ســريعة التطور قد تم التعبير عنها على نطاق واســع على التوالي في رأس الكلى والطحال والكبد والخياشـيم والأنســجة الجلدية، التي اثرت بشكل معنوي على تنشيط الاستجابة المناعية.

11.2: تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي: Real-time PCR

يُعد تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) تقنية علمية في البيولوجيا الجزيئية لتضخيم نسخة واحدة أو بضـــع نســـخ من قطعة من الحامض النووي DNA عبر عدة أوامر من حيث الحجم، وتوليد ملايين إلى

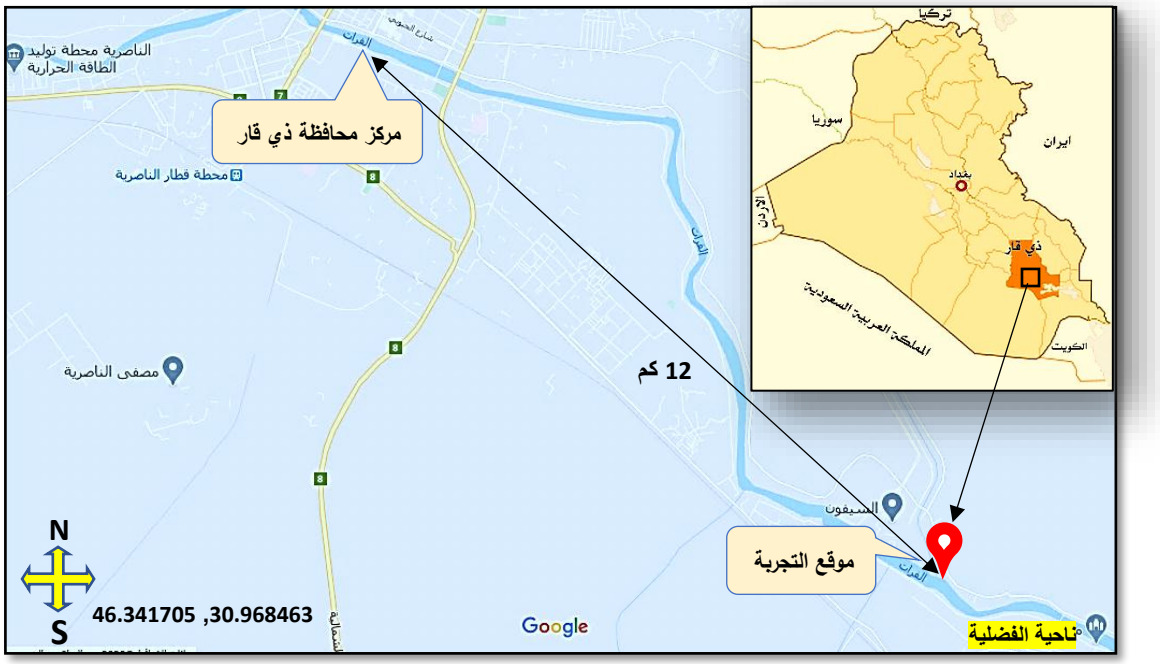
مليارات النسخ من تسلسل DNA معين، وتم تطويره من قبل عالم الكيمياء الحيوية الأمريكي، Kary Mullis في عام 1984(Bartlett و Stirling ،2003). استخدم PCR استخدامًا واسعًا في مجموعة واسعة من التطبيقات بما في ذلك استنساخ الجينات ورسم خرائط الجينات واكتشاف الطفرة وتسلسل الحمض النووي وتحديد هوية الإنسان. وكان أهم معلم في استخدام PCR هو إدخال مفهوم مراقبة تضخيم DNA في الوقت الحقيقي(اللحظي) من خلال رصد التألق(fluoresces)، وتعكس شدة أشارة التوهج fluoresces كمية DNA في العينة في ذلك الوقت المحدد، وسميت هذه التقنية بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي qPCR (Higuchi وآخرون،1992). ويعد تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي أو الكمي (qPCR) طريقة راسخة للكشف عن مستوى التعبير الجيني ،العوامل الميكروبية المختلفة وكميتها وغيرها(Kralik و Ricchi ،2017). إضافة إلى ذلك، يمكن لـ qPCR أيضا توفير نتائج شبه كمية دون معايير ولكن مع استخدام عناصر التحكم بوصفها مواداً مرجعية، في هذه الحالة يمكن التعبير عن النتائج المرصودة بأنها مضاعفات أعلى أو أدنى مع الأشارة إلى السيطرة وقد استخدم هذا التطبيق على نطاق واسع لدراسات التعبير الجيني.(Bustin وآخرون،2009). وتعد qPCR طريقة كمية على عكس PCR التقليدي، مما يعني أنها تمكن من تحديد الكميات الدقيقة (النسبية أو المطلقة) للحمض النووي المتضخم في العينات، اما في PCR التقليدي لا يمكن اكتشاف الحمض النووي المتضخم إلا بعد إجراء التضخيم (اكتشاف نقطة النهاية) (Kralik و Ricchi ،2017). وبغض النظر عن DNA، يمكن أيضا استخدام الحمض النووي الريبي (RNA) قالباً (على سبيل المثال في حالة دراسة التعبير الجيني أو اكتشاف فيروسات الحمض النووي الريبي) في هذه الحالة يحتاج RNA إلى إعادة نسخه إلى DNA (يُطلق عليه أيضا الحمض النووي التكميلي cDNA) قبل تضخيمه باستخدام qPCR (Liu وSaint ،2002).

الفصل الثالث

3. المواد وطرائق العمل:Materials and Methods

1.3: موقع وأسماك التجربة: Zone Of Experiment And Fish

أجريت التجربة في محافظة ذي قار / جنوب شرق مدينة الناصرية يبعد الموقع 12 كم عن مركز محافظة ذي قار الشكل (1). للمدة من 2019/8/23 ولغاية 2019/12/21 بضمنها مدة الأقلمة 8 أيام في أقفاص عائمة على نهر الفرات. جُلبت 150 سمكة نوع كارب شائع من مفقس اهلي في الناصرية، تُركت الأسماك لمدة 8 أيام في الأقفاص العائمة لغرض الاقلمة قبل بداية التجربة وقدم لها الغذاء بنسبة 3% من وزن الكتلة الحية وبواقع وجبيتن في اليوم. ثم اختيرت منها 120 سمكة بمتوسط وزن 250 ±4 غم، ووزعت عشوائياً على أربع معاملات بثلاث مكررات وبواقع 10 سمكة لكل مكرر.



شكل (1) موقع التجربة * Google Maps

2.3 : تصنيع العلائق: Manufacture of Diets

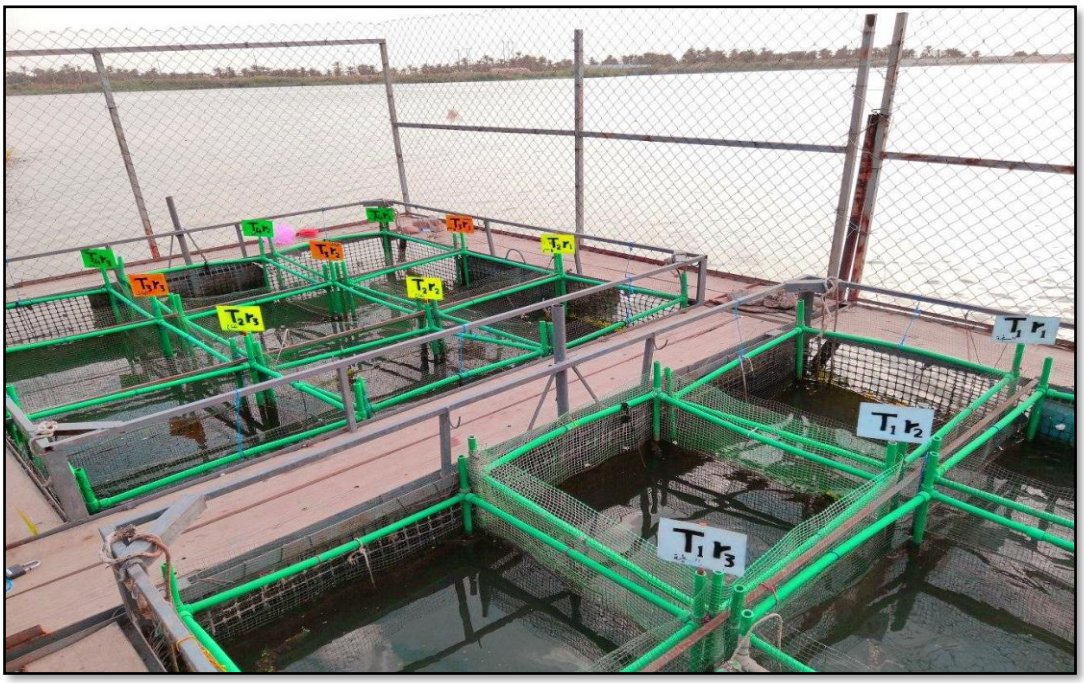
صُـــنعت العلائق محلياً في موقع التجربة من المواد العلفية المتوفرة في الأســـواق المحلية وكما موضح في الجدول (1) وأخذت عينات منها لمعرفة التركيب الكيميائي للعلائق كما موضح في الجدول (2). تم جرش وطحن المواد في مطحنة اهلية في مدينة الناصـرية، صـنعت العلائق بحسـب النسـبة المئوية لكل مادة، وحضـرت بخلط مقدار 10 كغم من المواد الجافة المسـتعملة ومزجت جيدا لغرض تجانســها باســتعمال الأيدي وأضــيف إليها الماء بنســبة 10% تقريبا، كما أضــيفت الزيوت النباتية (النعناع، البابونج، الزنجبيل) بنسبة 0.5% للعلائق المراد اختبارها، جُلبت الزيوت النباتية من الأسواق المحلية ذات منشأ باكستاني انتاج شركة هيماني Hemani. ثم كُبست المواد على شكل أقراص(بلت) بحجم 6 ملم بوسـاطة ماكنة تصـنيع محلي، وتُركت في الشـمس لمدة 12 سـاعة، ثم عُبئت في أكياس خاصة سعة 50 كغم، وخُزنت في مكان جاف لحين الاستعمال. غُذيت الأسماك بنسبة 5% من الكتلة الحية للأســـماك وزعت بواقع وجبتين في اليوم، تعدل كميات الاعلاف من خلال وزن الأســـماك كل أسبوعين وتقرب الأوزان إلى أقرب مرتبة عشرية. قِيسَ متوسط وزن الأسماك كل أسبوعين لتحديد كمية العلف اليومي على اســـاس 5% من وزنها. واســـتخدمت طريقة التغذية بوســـاطة الأواني الغاطسة(الصواني). فيما وزعت التجربة إلى اربع معاملات كما في صورة (1) بالترتيب التالي:

1- المعاملة الاولى T1 : السيطرة خالية من الاضافات.

2- المعاملة الثانية T2 : تم إضافة زيت النعناع إلى العليقة بنسبة 0.5% .

3- المعاملة الثالثة T3 : تم إضافة زيت البابونج إلى العليقة بنسبة 0.5% .

4- المعاملة الرابعة T4 : تم إضافة زيت الزنجبيل إلى العليقة بنسبة 0.5% .



صورة (1) توزيع معاملات التجربة

جدول(1) مكونات العلائق المستخدمة في التجربة

المواد العلفية	النسب الداخلة في العليقة(%)			
	T1	T2	T3	T4
كسبة فول الصويا	35	35	35	35
*بروتين حيواني	15	15	15	15
ذرة صفراء	17	17	17	17
شعير علفي	10	10	10	10
نخالة الحنطة	10	10	10	10
حنطة علفية	10	10	10	10
زيت (زهرة الشمس)	1	0.5	0.5	0.5
ملح	1	1	1	1
فيتامينات ومعادن	1	1	1	1
زيت النعناع	0	**0.5**	0	0
زيت البابونج	0	0	**0.5**	0
زيت الزنجبيل	0	0	0	**0.5**
المجموع	%100	%100	%100	%100

*** بروتين حيواني مستورد نسبة البروتين 50% ارجنتيني المنشأ**

جدول(2) التركيب الكيميائي للعلائق محسوبة على اساس المادة الجافة

العناصر الغذائية	النسبة المئوية
بروتين خام	30.61
مستخلص الايثر	5.78
الالياف	6.81
الرماد	7.09
*المستخلص الخالي من النتروجين Nitrogen Free Extract (NFE) (الكربوهيدرات الذائبة)	50.29
** الطاقة الايضية (كيلو سعرة/100غم)	447.15

تم اجراء التحليل الكيميائي للعلائق في وزارة العلوم والتكنولوجيا/دائرة البحوث الزراعية

*حسبت الكربوهيدرات الذائبة (NFE) رياضيا بطريقة الفرق وحسب معادلة (Wee و Shu ،1989) NFE= 100 – (% البروتين + % مستخلص الايثر + % الرماد + % الالياف)

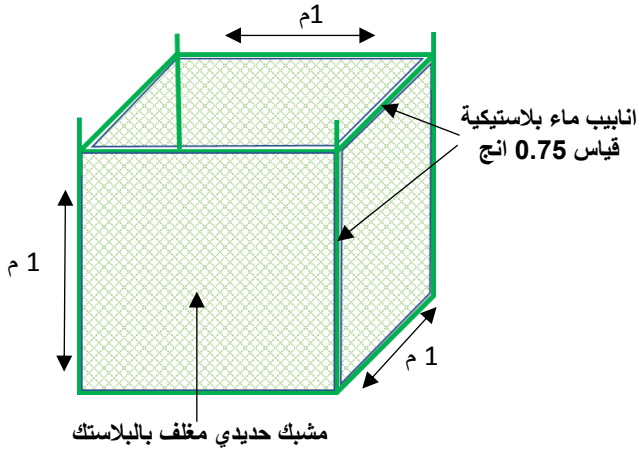
** الطاقة الايضية حسبت وفق المعادلة التي ذكرها كل من Hepher و Pruginin (1981) =(بروتين × 5.56)+(الكربوهيدرات الذائبة × 4.45)+(مستخلص الايثر×9.2)

3.3: تصنيع الأقفاص : Cages Manufacturing

تم تصنيع أقفاص بلاستيكية من أنابيب الماء البلاستيكية قياس 0.75 انج ومشبك حديدي مغلف بالبلاستك، تبلغ قطر فتحات المشبك 2 سم. صمم القفص بأبعاد 1 × 1×1 متر (1 متر مكعب) ثبت المشبك على الأنابيب بوساطة الأقفال البلاستيكية (الشناطات) مع أسلاك كهربائية قياس 1.5 ملم كما في الشكل(2). وضعت الأقفاص البلاستيكية داخل أقفاص حديدية عائمة في

نهر الفرات بأبعاد 3 × 3 × 2 متر، مغلفة بمشـــبك بلاســـتيكي ومزودة بطوافات من (الفلين) تبعد الأقفاص 6 متر عن حافة النهر.

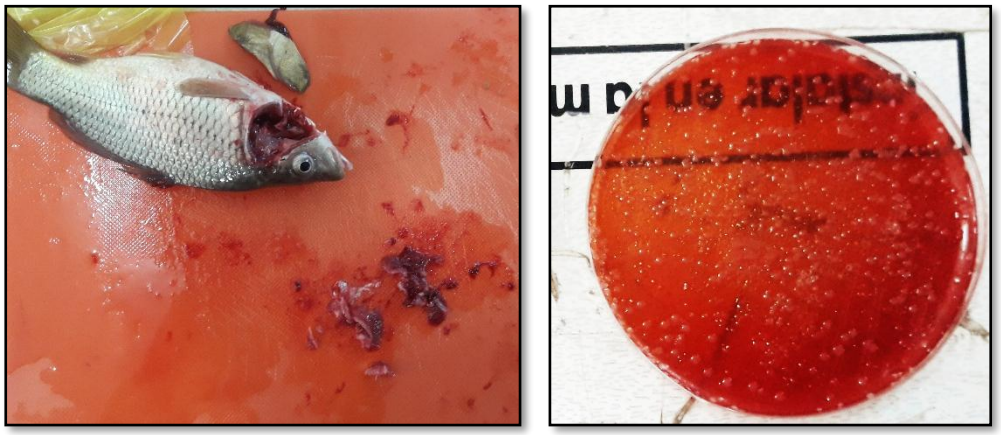
صورة (2) الأقفاص البلاستيكية



شكل(2) مكونات القفص البلاستيكى

4.3: عزل وتحضير البكتيريا: Isolate and prepare bacteria

عُزلت بكتيريا *Aeromonas hydrophila* من أسماك مصابة بمرض التسمم الإيروموناسي في أحد مشاريع تربية الأسماك على نهر الفرات يبعد 20 كم تقريباعن موقع التجربة. وعُزلت البكتيريا في كلية العلوم جامعة ذي قار، وشُـــخصـــت في كلية العلوم /جامعة المثنى. وتم تحضـــير بكتيريا *Aeromonas hydrophila* في مختبر كلية العلوم/ جامعة المثنى.



صورة (3) عزل البكتيريا

5.3: حقن البكتيريا : Bacterial injection

بعد 105 يوم من بداية التجربة، أخذت 5 أســماك عشــوائيا من كل معاملة وعزلها في أقفاص خاصــة. تم تحضــير العالق البكتيري من خلال أخذ مســتعمرات بكتيرية من الطبق وتعليقها بالمحلول الفسيولجي وتجهيز الجرعات 1 مل بتركيز $1x\ 10^7$ لكل فرد من الاسماك. حُقنت الأسماك بوساطة محقنة معقمة بحجم 5 مل تحت الزعنة الكتفية كما في الصورة (4).

صورة (4) حقن الأسماك بالبكتيريا

6.3: تشريح الأسماك وجمع العينات(رأس الكلى): Fish anatomy and sample collection (kidney head)

تم تشريح الأسماك بوساطة مشرط ومقص معقمين وذلك بعمل شق طولي من فتحة المخرج إلى نهاية الفم ثم شق عرضي من فتحة المخرج إلى الزعنفة الظهرية، استخرجت رأس الكلية(الجزء العلوي من الكلية) وغسلت بماء مقطر، ثم وضعت العينة بأنبوبة اختبار معقمة سعة 10 مل ثم خزنت على درجة −18 لحين الاستخدام. كما في صورة (5).

صورة (5) تشريح الأسماك

7.3: الدراسة الجزيئية: Molecular study

1.7.3: تحضير البادئ: Preparation the primers

تم اختيار البوادئ (Primers) وكما موضح في الجدول(3) لإجراء اختبار التعبير الجيني تبعا لأهداف الدراسة. جُهز البادئ من شركة Macrogen الكورية على هيئة مسحوق مجفف Lyophilized product (تم تحضير محلول الخزين) Stock solution (ومحولول العمل) Working solution، إذ تم تحضير محلول الخزين وذلك بإضافة Nuclease Free Water بحسب تعليمات الشركة المصنعة (للحصول على التركيز النهائي للعالق)، أما محلول العمل، فقد تم تحضيره بوساطة إضافة 10 مايكرولتر من محلول الخزين Foreword إلى 90 مايكرولتر Nuclease Free Water، ثم إضافة 10 مايكرولتر من محلول الخزين Revers إلى 90 مايكرولتر Nuclease Free Water، ثم مزجهما معاً ليصبح البادئ الخليط (Primer mix) بعدها خزن بدرجة – 20 لحين الاستخدام.

جدول(3) تسلسل البوادئ Primers

اسم الجين	التسلسل	المصدر
IL-1β	F: 5'- ACATTGCCAACCTCATCATCG -3' R: 5'-TTGAGCAGGTCCTTGTCCTTG -3'	Qiang) واخرون،2016)
IL-8	F: 5'-AGAATGTCAGCCAGCCTTGT -3' R: 5'-TCTCAGACTCATCCCCTCAGT -3'	Ming) واخرون،2013)
IL-10	F: 5'-CG CAG TGC AGA AGA GTC GAC-3' R: 5'-CCC GCT TGA GAT CCT GAA ATA T-3'	Chakrabarti) وآخرون،2014)
TNFα	F: 5'-CCA GGC TTT CAC TTC AGG-3' R: 5'-GCC ATA GGA ATC GGA GTA G-3'	Chakrabarti) وآخرون،2014)
β-Actin	F: 5'-AGACCACCTTCAACTCCATCATG-3' R: 5'-CCGATCCAGACAGAGTATTTACG-3'	Chakrabarti) وآخرون،2014)

Interleukin 1β (**IL-1β**) , Interleukin 8 (**IL-8**) , Interleukin 10 (**IL-10**) , Tumor Necrosis Factor Alpha (**TNFα**) , Internal Reference Gene (**β -Actin** , House-Keeping Gene) .

2.7.3: استخلاص RNA الكلي:

تم استخلاص Total RNA من نسيج الكلى باستخدام عدة مختبرية RNA-spinTM Total RNA Extraction Kit، من شـــركة iNtRON Biotechnology الكوريـة. على وفق الخطوات التالية:

1. أخذت 20 ملغم من نسيج الكلى (رأس الكلية) وضعت في أنبوبة استخلاص حجمها 1.5 مل .
2. أضيف 450 مايكرولتر من محلول الترايزول إلى العينة مع تكسير بسيط للعينة.
3. تُركت العينة لمدة 10 دقائق بعدها وضـــعت في جهاز الطرد المركزي الخفيف 2000 دورة لمدة 30 ثانية، بعدها أخذ المحلول وترك النسيج.

4. أضـــيف 350 مايكروليتر من محلول R–buffer إلى العينة، تمت مجانســـة المحلول مع العينة بعمل vortex لمدة 30 ثانية بعدها تُرك بدرجة حرارة الغرفة لمدة 7 دقائق .

5. اعُيد عمل vortex لمدة 30 ثانية، ثم وضـــعت العينة في جهاز الطرد المركزي البارد 4 درجات مئوية لمدة 3 دقائق بسرعة 14000 دورة/ دقيقة.

6. نقُلت العينة بعناية إلى أنبوب جديد بحجم 1.5 مل، وأضيف 350 مايكرولتر من الإيثانول (تركيز 70%) إلى العينة وخلطت جيدا بعمل pipetting.

7. وضعت العينة في أنبوبة column وأدخلت إلى جهاز الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة / دقيقة لمدة 30 ثانية، بعدها نبذ الراشح وبقيت الأنبوبة.

8. أضـــيف 700 مايكرولتر من Buffer A إلى العينة وعمل طرد مركزي 13000 دورة لمدة 30 ثانية، بعدها نبذ الراشح وبقيت الأنبوبة.

9. أضـــيف 700 مايكرولتر من محلول Buffer B إلى العينة ووضُـــعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة لمدة 30 ثانية، بعدها سكب الراشح وبقيت نفس الأنبوبة.

10. ادُخلت العينة إلى جهاز الطرد المركزي لمدة 2 دقيقة بســـرعة 13000 دورة / دقيقة لتجفيف الغشاء RNA–spinTM .

11. نُقل column إلى أنبوبة جديدة بحجم 1.5 مل وأضـــيف 50 مايكرولتر من Elution مباشـــرة على الغشـــاء Membrane. تركت العينة لمدة دقيقة واحدة بعدها وضـــعت في جهاز الطرد المركزي لمدة 1 دقيقة بسرعة 13000 دورة / دقيقة .

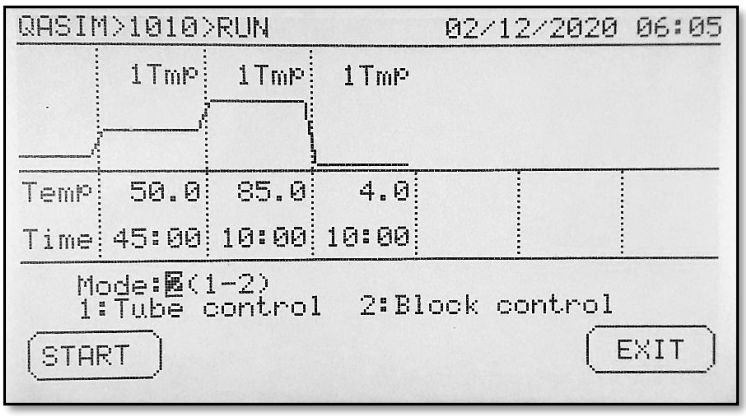
12. خُزنت العينة على درجة –20 درجة مئوية لحين الاستخدام.

3.7.3: تحضير جل الترحيل الكهربائي: Electrophoresis

أضـــيف 1 غم من الاكاروز إلى 100 مل من محلول 1X TBE buffer في دورق زجاجي ووضُـع المزيج في الفرن الكهربائي (Microwave oven) اخُرج المزيج قبل البدأ بالغليان وتُرك حتى يصـــل إلى درجة حرارة معتدلة 50° درجة مئوية تقريباً، ثم أضـــيف الإثيديوم بروماید Ethidium bromide بمقدار 2.5µl وخلط المزيج حتى اصـبح رائق(Sambrook و Russell ،2001). تُرك المزيج من 10–20 دقيقة ليتصـلب الهلام ،ثم وضُـعت عينات RNA مع صـبغة Loding dey ومزجت جيدا بعدها وضـع المزيج في جهاز الترحيل الكهربائي وضـبط الجهاز على 100 فولت لمدة 15 دقيقة.

4.7.3: تصنيع الحامض النووي المكمل complementary Nucleic Acid (cDNA)Synthesis

تم اعتمـاد برنـامج شـــركـة iNtRON Biotechnology في اعـداد cDNA بوســـاطـة HiSenScript RH(−) RT PreMixKit . وذلك بوضـع 5µl من Total RNA في أنبوبة التفاعل ويضاف اليه 15µl من الماء الخالي من النيوكليز (الإنزيمات الهاضمة للحامض النووي) Nuclease Free Water وترك في الحاضـنة لمدة 5 دقائق على درجة 65° درجة مئوية، ثم وضـعت الأنبوبة بجهاز PCR وحسب برنامج الشركة كما في الشكل(3).



شكل(3) برنامج PCR cDNA synthesis

5.7.3: تحضير تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي : Real-time PCR

تم استخدم جهاز نوع Agilent Stratagene Mx3000p الماني المنشأ. وتم تحضير تفاعل Real-time PCR بوساطة عدة مختبرية RealMODTM Green SF 2X qPCR mix kit من شـركة iNtRON Biotechnology وحسـب جدول(4). بعدها مزجت المواد المذكورة آنفاً بوسـاطة جهاز الرجاج ثم نُقلت الأنابيب إلى جهاز Real-time PCR، وتم ضـبط ظروف التفاعل بحسـب تعليمات الشركة وكما في الجدول (5).

جدول(4) مكونات تفاعل Real-time PCR

المكونات	الكمية 20 µl
RealMODTM Green SF 2X qPCR mix	10 µl
Forward Primer (10 pmol/ul)	0.5 – 1.0 µl
Reverse Primer (10 pmol/ul)	0.5 – 1.0 µl
Template DNA	2 µl
DNase/RNase free Water	لغاية 20 µl

جدول(5) ظروف تفاعل Real-time PCR

خطوات qPCR	درجة الحراة	الوقت	عدد الدورات
Initial activation	95℃	10 دقيقة	1
Denaturation	95℃	30 ثانية	40 -30
Annealing‡	58℃ - 65℃	20-60 ثانية	

8.3: المعايير المدروسة : Studied parameters

1.8.3: الزيادة الوزنية الكمية Weight Gain (W.G)

الزيادة الوزنية/غم = الوزن النهائي(F.W)/غم – الوزن الإبتدائي (I.W)/غم.

(Schmalhousen, 1926)

2.8.3: معامل التحويل الغذائي Food Conversion Ratio (FCR):

$$\text{معامل التحويل الغذائي} = \frac{\text{كمية العلف المتناول} \left(\frac{\text{غم}}{\text{سمكة}}\right)}{\text{مقدار الزيادة الوزنية للاسمك} \left(\frac{\text{غم}}{\text{سمكة}}\right)}$$

(Uten, 1978)

3.8.3: كفاءة التحويل الغذائيFood Conversion Efficiency % (FCE)

$$\text{كفاءة التحويل الغذائي\%} = \frac{\text{مقدار الزيادة الوزنية للأسماك} \left(\frac{\text{غم}}{\text{سمكة}}\right)}{\text{كمية الغذاء المتناول} \left(\frac{\text{غم}}{\text{سمكة}}\right)} \times 100$$

(Uten, 1978)

4.8.3: معدل النمو اليومي Daily Growth Rate (D.G.R)

$$\text{معدل النمو اليومي} = \frac{\text{الوزن النهائي} \left(\frac{\text{غم سمكة}}{\text{يوم}}\right) - \text{الوزن الابتدائي} \left(\frac{\text{غم سمكة}}{\text{يوم}}\right)}{\text{مدة التجربة}}$$

(Schmalhousen, 1926)

5.8.3: معدل النمو النوعي Specific Growth Ratio (SGR) %

$$\text{معدل النمو النوعي \%} = \frac{\text{اللوغاريتم الطبيعي للوزن النهائي} \left(\frac{\text{سمكة}}{\text{غم}}\right) - \text{اللوغاريتم الطبيعي للوزن الابتدائي} \left(\frac{\text{سمكة}}{\text{غم}}\right)}{\text{مدة التجربة}} \times 100$$

(Brown, 1957)

9.3: الفحوصات البيئية: Environmental parameters

أخذت عينات من ماء النهر (الفرات) من وسط الأقفاص في موقع التجربة مرة كل شهر، وقيست بعض الصـــفات الفيزياوية والكيمياوية للماء في مختبرات مديرية زراعة ذي قار ومديرية بيئة ذي قار بوساطة الاجهزة التالية:

1- درجة حرارة الماء قيست باستخدام محرار الكتروني نوع KT300.

2- الاوكسجين المذاب في الماء استخدم جهاز Dissolved Oxygen Meter نوع NANNA .

3- درجة حموضة الماء pH استخدم جهاز نوع Inolab.

4- ملوحة الماء استخدم جهاز نوع Inolab لقياس التوصيلية الكهربائية للماء وحسبت الملوحة حسب المعادلة:

$$\text{الملوحة} = 0.64 \times \left(\frac{\text{التوصيلية الكهربائية}}{\mathbf{1000}} \right) \qquad \text{(Mackereth وآخرون،1978)}$$

5- سرعة جريان الماء استخدمت قطعة من الفلين لقياس سرعة الجريان.

10.3: المعايير الدمية: Blood parameters

1.10.3: جمع عينات الدم: Collect blood samples

جُمع دم الأسماك بالسحب المباشر من الوريد الذنبي بوساطة محقنة معقمة قياس 5 مل وسُحب 2- 3 مل من دم الأسماك كما في الصورة (6)، ووضع الدم بأنبوبة اختبار معقمة سعة 10 مل، بعدها وضع بجهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق وبسرعة 10000 دورة في الدقيقة ثم سحب المصل بوساطة ماصة خاصة. بعدها قيست معايير الدم المطلوبة .

صورة (6) سحب الدم من الوريد الذنبي في الأسماك

2.10.3: قياس البروتين الكلي : Total protein

تم قياس البروتين الكلي (TP) في مصل الدم بوساطة عدة مختبرية جاهزة (Kit) بجهاز Erba Chem 7 الماني المنشأ. قدر التركيز بوحدة (ملغم/100 مل).

3.10.3: قياس تركيز إنزيم الفوسفات القاعدي: Alkaline phosphatase

قُدرت فعالية إنزيم الفوسفات القاعدي (ALP) في مصل الدم بوساطة عدة مختبرية جاهزة (Kit) بجهاز Erba Chem 7 الماني المنشأ. ويكون التركيز مقدر بـ (الوحدة الدولية/لتر) (U/L).

4.10.3: قياس تركيز إنزيم ناقل اللنين : Alanine amino Transferase

قُدرت فعالية إنزيم ناقل الألنين (ALT) في مصل الدم بوساطة عدة مختبرية جاهزة(Kit) بجهاز Erba Chem 7 الماني المنشأ. ويكون التركيز مقدر بـ (الوحدة الدولية/لتر) (U/L).

5.10.3: قياس تركيز إنزيم ناقل السبارتيز Aspartate amino Transferase

قُدرت فعالية إنزيم ناقل الأسبارتيز (AST) في مصل الدم بوساطة عدة مختبرية جاهزة (Kit) بجهاز Erba Chem 7 الماني المنشأ. ويكون التركيز مقدر بـ (الوحدة الدولية/لتر) (U/L).

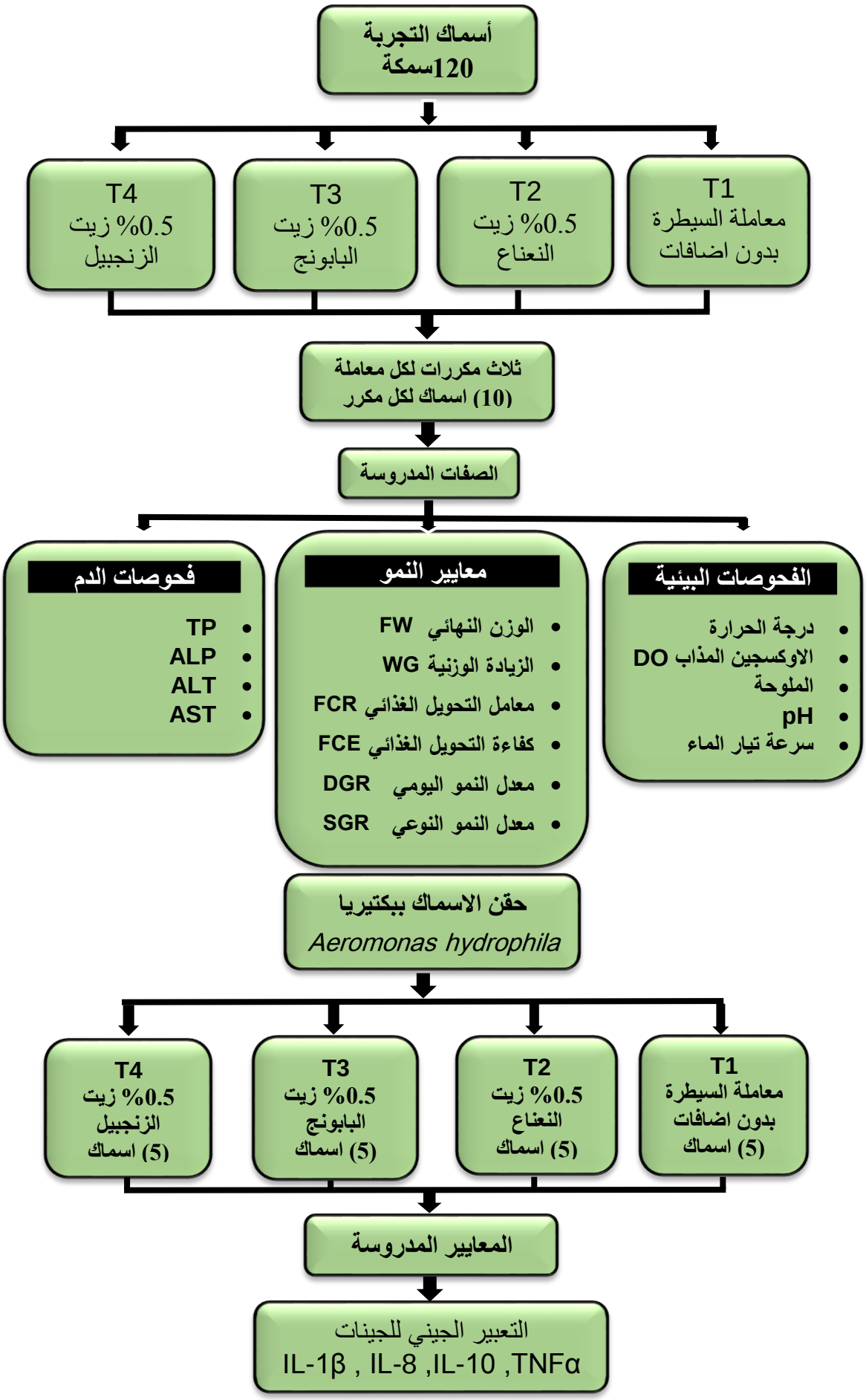
11.3: القياسات الجزيئية: Molecular Parameters

تم تحليل نتائج RT-PCR للجينات المختارة والجينات المحافظة عن طريق قياس الكمية النسبية لمستوى التعبير الجيني وتغير معدل الطيات Fold change على وفق طريقة (Livak و Schmittgen ،2001). واستخدمت المعادلات ادناه لايجاد قيم ΔCt لمعاملات التجربة من خلال مقارنة قيم دورة العتبة cycle threshold (Ct) للجينات المختارة target genes والجينات المحافظة (housekeeping gene):

- **ΔCT لمعاملة السيطرة** = Ct للجينات المختارة في معاملة السيطرة – Ct للجين المحافظ (Housekeeping Gene)
- **ΔCt لمعاملات (النعناع،البابونج،الزنجبيل)** = Ct للجينات المختارة في المعاملة – CT للجين المحافظ (Housekeeping Gene)
- **ΔΔCt** = ΔCt للمعاملة – ΔCt للسيطرة
- **تغير معدل الطيات (Fold change)** = 2^ ΔΔCt

12.3: التحليل الإحصائي : Statistical Analysis

صُممت التجربة على وفق التصميم العشوائي الكامل (Complete Random (CRD Design، واجري التحليل الاحصائي بأستخدام برنامج (spss) إصدار 20، وتم اختبار الفروق المعنوية بين المعاملات بوساطة اختباردنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمالية 0.05 (Duncan،1955).



شكل (4) مخطط التجربة مع المعايير المدروسة.

الفصل الرابع

4. النتائج والمناقشة Results and Discussion

1.4: الفحوصات البيئية:

يُظهر جدول (6) نتائج بعض الفحوصات البيئية لمياه نهر الفرات في موقع الأقفاص خلال مدة التجربة، إذ سجلت درجة حرارة الماء أعلى معدل لها في شهر أيلول بلغ 32 درجة مئوية، فيما بلغ أدنى معدل لها 16 درجة مئوية في شهر كانون الأول، كما سُجل أعلى معدل لتركيز الأوكسجين المذاب في شهر كانون الأول بلغ 8.9 ملغم/ لتر، في حين سُجل أدنى معدل لتركيز الأوكسجين المذاب في شهر أيلول بلغ 7.0 ملغم/لتر، وكان أعلى معدل للملوحة سُجل في شهر أيلول إذ بلغ 1.86 غم/لتر، فيما سُجل أدنى معدل للملوحة في شهر كانون الأول إذ بلغ 1.67 غم /لتر، وتطابقت النتائج أعلاه مع نتائج دراسة (Abbas وآخرون ،2017). أما قيمة الأس الهيدروجيني(pH) فسجل أعلى معدل له في شهر كانون الأول إذ بلغ 8.2 في حين سُجل أدنى معدل لقيمة الأس الهيدروجيني في شهر تشرين الأول إذ بلغ 8.0. وتطابقت هذه النتائج مع نتائج دراسة (Husian وآخرون،2017). وسُجل أعلى معدل لسرعة جريان الماء في موقع التجربة في شهر تشرين الثاني بلغ 20 سم/ثانية، فيما سجل أدنى معدل لسرعة جريان الماء في شهر تشرين الأول بلغ 17 سم/ ثانية.

تعد درجة حرارة الماء من أهم الخصائص في البيئة المائية من خلال تأثيرها المباشر على وجود الاحياء المائية وكثافتها ونموها ، كذلك تفاعلها مع بعض خواص الماء الكيميائية (Hussein و Khan ،2000). ومن خلال النتائج نلحظ تبايناً في درجة الحرارة، وقد يعود سبب التغير في درجة حرارة الماء إلى تباين شدة سطوع الشمس وطول مدة الإضاءة خلال اليوم وغيرها من الاختلافات المناخية (Talling،1980). ولوحظ من خلال النتائج تزايد تراكيز الأوكسجين المذاب في الماء خلال مدة التجربة وقد يعود ذلك إلى أن قابلية ذوبان الأوكسجين في الماء تتناسب عكسيا مع درجة الحرارة

وطرديا مع سـرعة الجريان فضـلا عن انها تتأثر بنسـب الاسـتهلاك نتيجة تنفس الاحياء المائية والفعاليات الحيوية الأخرى(Weiner،2000). ومن خلال النتائج أيضـا لوحظ ارتفاع تراكيز الملوحة في شـهر أيلول وانخفاضـها في شـهر كانون الأول، وقد يعزى سـبب ذلك إلى انخفاض مناسـيب المياه في اشـهر الصـيف وزيادة معدلات التبخر نتيجة ارتفاع درجة الحرارة (Al-Hussaniy ،2019). ومن خلال نتائج قيم الـ pH لوحظ انسجامها مع طبيعة المياه العراقية، وقد يعود سبب تغير قيم الـ pH إلى نظام الموزانة بين ثاني اوكسيد الكاربون والكاربونات والبيكاربونات، إذ تنخفض قيم الـ pH بزيادة تركيز ثاني اوكسـيد الكاربون و ترتفع بانخفاض تركيز ثاني أوكسـيد الكاربون (Al-Nimma،1982). ومن خلال النتائج أيضـا لوحظ تقارب سـرعة جريان الماء خلال مدة التجربة، إذ تعتمد سـرعة جريان النهر على درجة الانحدار ومقدار الاحتكاك بجوانب وقاع النهر فضـلا عن كمية المياه التي ينقلها النهر. وتعد التراكيز أعلاه مناسبة لنمو الأسماك الكارب الشائع (Peteri،2009)

جدول(6): نتائج الفحوصات البيئية في موقع التجربة

الاشهر	نوع الفحوصات البيئية				
	درجة الحرارة /درجة مئوية	الأوكسجين المذاب(DO)/ ملغم/لتر	الملوحة غم/لتر	تركيز الاس الهيدروجيني pH	سرعة الجريان سم/ثانية
أيلول	32	7.0	1.86	8.1	18
تشرين الأول	29	7.9	1.83	8.0	17
تشرين الثاني	23.1	8.6	1.77	8.05	20
كانون الأول	16	8.9	1.67	8.2	19

2.4: معايير النمو:

1.2.4: الوزن النهائي والزيادة الوزنية:

في العقود الأخيرة، ركزت جزء كبير من الدراسات على استخدام الأعشاب الطبية في ضوء الكثير من المزايا، مثل الاستدامة والآثار الجانبية الأقل، ومنها التأثير المباشر على الزيادة الوزنية للأسماك (Mohammadi وآخرون،2020). ويتضح من خلال الجدول (7) فروقاً معنوية ($p\leq0.05$) في معدلات الوزن النهائي للأسماك، إذ بلغ أعلى معدل وزن نهائي 656.95 غم/ سمكة في معاملة البابونج(T3) يليه 609.05 غم / سمكة في معاملة النعناع (T2)، و 592.22 غم / سمكة في معاملة الزنجبيل (T4)، فيما سجلت معاملة السيطرة (T1) أقل معدل وزن نهائي إذ بلغ 502.22 غم/سمكة. فيما لم يكن هناك فروق معنوية بين المعاملتين (T2) و(T4).

جدول (7) بعض معايير النمو لمعاملات التجربة (المتوسط ± الخطأ القياسي)

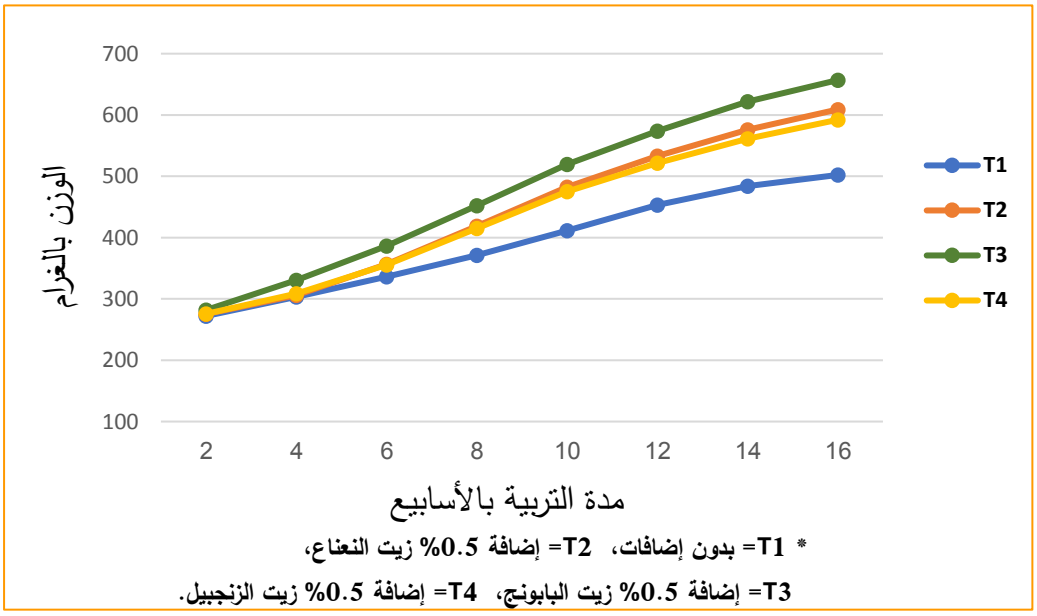
المعايير المدروسة	المعاملات			
	T1	T2	T3	T4
الوزن الابتدائي(IW) غم/سمكة	250.33± 0.88	250.33± 0.67	251.34± 0.88	249.67± 0.33
الوزن النهائي (FW) غم/ سمكة	^{b}502.22 ±32.56	^{ab}609.05 ±60.05	^{a}656.95 ±24.57	^{ab}592.22 ±28.95
الزيادة الوزنية غم / سمكة	^{b}251.88 ±31.76	^{ab}358.72 ±60.59	^{a}405.61 ±24.55	^{ab}342.55 ±28.77

***الحروف المختلفة في الصف الواحد تدل على وجود فروقات معنوية عند مستوى معنوية ($p\leq0.05$)**

**** T1= بدون إضافات، T2= إضافة 0.5% زيت النعناع، T3= إضافة 0.5% زيت البابونج، T4= إضافة 0.5% زيت الزنجبيل**

حققت معاملة البابونج (T3) أعلى معدل زيادة وزنية عند مستوى احتمالية ($p\leq0.05$) إذ بلغ 405.61 غم/ سمكة، في حين حققت معاملتي النعناع(T2) والزنجبيل(T4) 358.72 غم/سمكة، 342.55غم / سمكة على التوالي، أما معاملة السيطرة فقد سجلت أقل معدل زيادة وزنية بلغ 251.88غم/ سمكة. فيما لم يكن هناك فروق معنوية بين المعاملتين (T2) و(T4).

يبين الشكل(5) وجود تقارب في أوزان الأسماك في الاسبوع الثاني من التجربة إذ سجلت معاملة البابونج (T3) أعلى معدل وزن بقيمة 281.9 غم/سمكة في حين سجلت معاملة السيطرة (T1) اوطأ قيمة 272.2 غم/سمكة. أما في الاسبوع السادس عشر كان التباين واضحاً بين المعاملات إذ تفوقت معاملة البابونج (T3) على بقية المعاملات وسجلت أعلى معدل وزن بقيمة 656.95 غم/سمكة، بينما سجلت معاملة السيطرة (T1) أقل معدل وزن بقيمة 502.22 غم/سمكة.



شكل (5) الوزن النهائي للأسماك خلال مدة التجربة

جاءت نتائج التجربة مطابقة إلى حدٍ ما مع نتائج تجربة(Saidah وآخرون،2017) الذي استعمل مسحوق البابونج في تغذية أسماك البلطي الاحمر الهجين بعدة مستويات، إذ دلت النتائج على تحقيق أعلى وزن نهائي وزيادة وزنية في المستوى 6%. وأيضا تطابقت النتائج إلى حدٍ ما مع نتائج دراسة

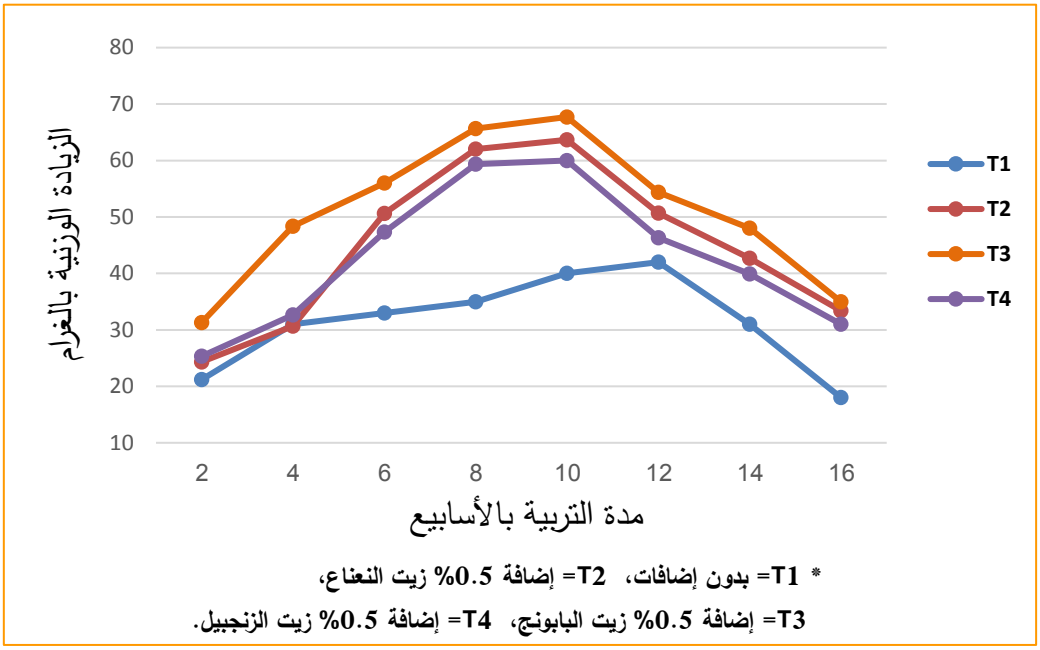
Zaki وآخرون(2012) إذ استخدم زيت البابونج بنسبة 1% في علائق أسماك البلطي النيلي، وأيضا مطابقة لحد ما مع ما توصل اليه Adel وآخرون (2015) الذي استخدم مسحوق النعناع بنسبة 3% في علائق أسماك السلمون ودراسة Leyciane وآخرون (2019) الذي استخدم زيت النعناع بنسبة2.5% في علائق أسماك البلطي النيلي، وغير متطابقة مع نتائج دراسة Adem وآخرون(2015) حينما استخدم زيت النعناع بثلاثة مستويات (0.5 ، 1 ، 1.5) غم / كغم$^{-1}$ في علائق الأسماك السلمون، كما تطابقت لحد ما النتائج مع نتائج دراسة Ehsan وآخرون (2019) على الأسماك الزرد البالغة *Danio rerio* إذ استخدم فيها ثلاثة مستويات من الزنجبيل (1, 2, 3 %) من العليقة، إذ حصل على أعلى معدل نمو بالمستوى 2%. وأيضا تطابقت مع نتائج دراسة Brum وآخرون (2018) الذي حصل على أعلى معدل نمو عندما استخدم زيت الزنجبيل بتركيز 1% في علائق أسماك البلطي النيلي *Oreochromis niloticus*.

ومن خلال النتائج أعلاه، قد يرجع السبب في تفوق معاملة البابونج إلى خصائص البابونج التي تنشط عمل الجهاز الهضمي وخصوصاً الامعاء وتأثيره الفاتح للشهية بسبب احتوائه على مركبات الفلافونيدات المضادة للأكسدة التي بدورها ترفع من الحالة المناعية للأسماك بالتالي تنعكس على ارتفاع الأداء الإنتاجي للأسماك (Ajay و Neelam، 1997 و Gupta وآخرون ،2006 و Joanne وآخرون،2007 و Nouri و Abad ،2012)

كما أن سبب تفوق معاملة النعناع (T2) على معاملة السيطرة(T1) قد يرجع إلى فعالية زيت النعناع على معالجة عسر الهضم وتشنجات الامعاء وإعطاء الشعور بالنشاط والحيوية، فضلا عن احتوائه على مادة المنثول ذات النكهة الجذابة والفاتحة للشهية (Tyler واخرون ،1988 ؛ Foster، 1996؛ Longe ،2005). أما تفوق معاملة الزنجبيل (T4) على معاملة السيطرة (T1) قد يرجع

السبب إلى وجود المركبات الفينولية في الزنجبيل التي تعمل على تهدئة الجهاز الهضمي وتعمل على رفع كفاءة امتصاص المواد الغذائية كما له خصائص فاتحة للشهية(Agrawal وآخرون،2001؛ Grzanna وآخرون،2005 ؛ Kim وآخرون،2007 ؛ Maqsood وآخرون،2011).

يُلحظ من الشكل(6) وجود تفاوت في معدل الزيادة الوزنية للمعاملات خلال مدةالتجربة، إذ سجلت معاملة البابونج(T3) أعلى معدل زيادة وزنية في الاسبوع الثاني بقيمة 31.3 غم ، وسجلت معاملة السيطرة(T1) أقل معدل زيادة وزنية بقيمة 21.2 غم فقط، في حين حافظت معاملة البابونج(T3) على تفوقها إذ سجلت أعلى معدل زيادة وزنية في الاسبوع السادس عشر من التجربة بقيمة 34.95 غم، أما أقل معدل زيادة وزنية سُجل في معاملة السيطرة (T1) بقيمة 18 غم.



شكل (6) الزيادة الوزنية للأسماك خلال مدة التجربة

2.2.4: معامل التحويل الغذائي(FCR) وكفاءة التحويل الغذائي(FCE)

يوضـــح جدول(8) نتائج معامل التحويل الغذائي لمعاملات التجربة، إذ يســـتخدم معيار معامل التحويل الغذائي لتقييم كفاءة العليقة المقدمة للأســـماك. وقد أظهرت نتائج معامل التحويل الغذائي تفوق معاملة البابونج (T3) على جميع المعاملات عند مستوى معنوية ($P\leq0.05$)، إذ حققت أفضل معامل تحويل غذائي بلغ 3 غم علف/غم زيادة وزنية، في حين لم تحقق المعاملتين الثانية والرابعة أي فروق معنوية بينهما، إذ حققت معاملة النعناع (T2) 3.14 غم علف/غم زيادة وزنية ومعاملة الزنجبيل (T4) 3.23 غم علف /غم زيادة وزنية أما معاملة الســـيطرة (T1) فحققت 3.8 غم علف /غم زيادة وزنية.

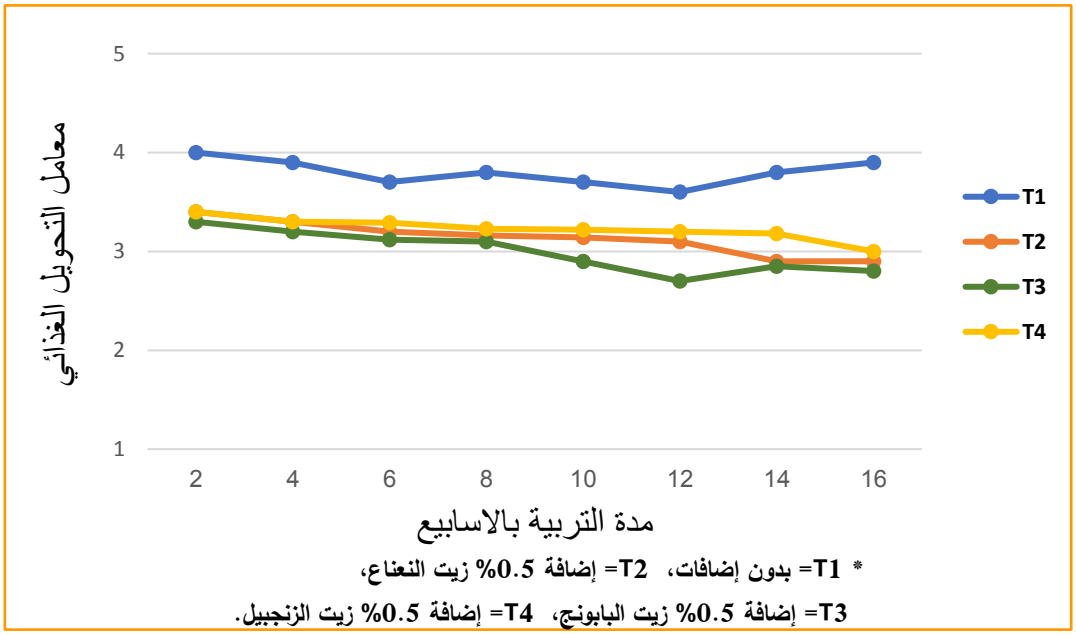
جدول(8) كمية العلف ومعامل التحويل وكفاءة التحويل الغذائي ومعدل النمو اليومي والنوعي لمعاملات التجربة (المتوسط ± الخطأ القياسي)

المعايير المدروسة	المعاملات			
	T1	T2	T3	T4
كمية العلف المتناول(FI) غم / سمكة	959.70 ±129.28	1130.57 ±199.93	1217.35 ±82.12	1103.57± 69.39
معامل التحويل الغذائي (FCR) غم علف/غم زيادة وزنية	^{c} 3.8 ±0.06	^{ab} 3.14 ± 0.03	^{a} 3.0 ±0.06	^{b} 3.23 ±0.09
كفاءة التحويل الغذائي % (FCE)	^{c} 26.32 ±0.40	^{ab} 31.82 ±0.29	^{a} 33.36 ±0.64	^{b} 30.97 ±0.83
معدل النمو اليومي (DGR) غم / يوم	^{b} 2.25 ±0.28	^{ab} 3.20 ±0.54	^{a} 3.62 ±0.22	^{ab} 3.06 ±0.26
معدل النمو النوعي (SGR) %/ يوم	^{b} 0.62 ±0.06	^{ab} 0.79 ±0.09	^{a} 0.86 ±0.03	^{ab} 0.77 ±0.04

***الحروف المختلفة في الصف الواحد تدل على وجود فروقات معنوية عند مستوى معنوية ($p\leq0.05$)**

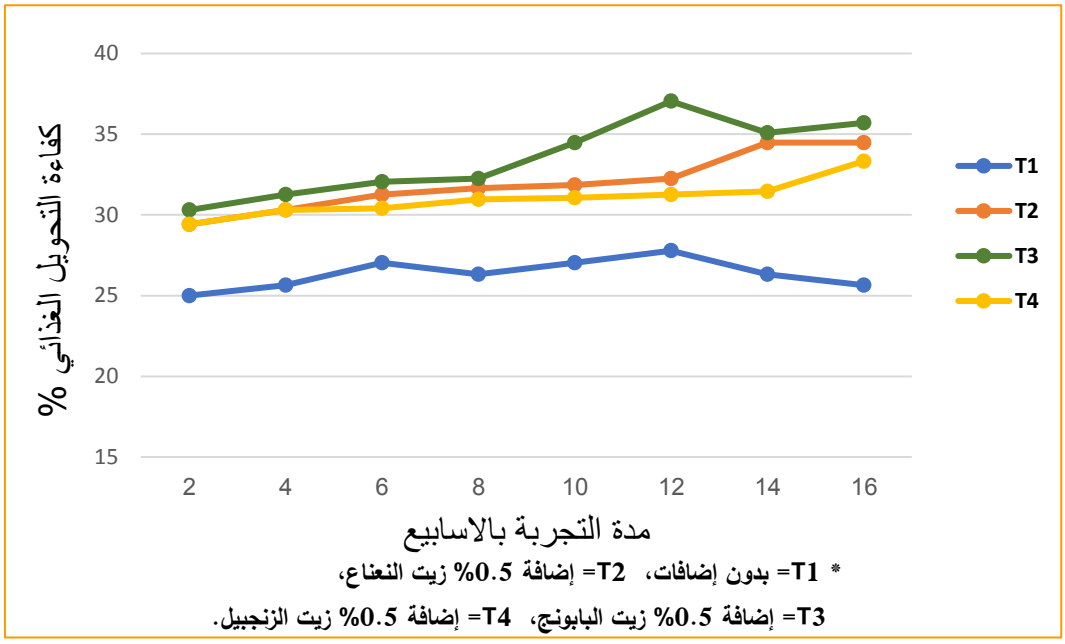
**** T1= بدون إضافات، T2= إضافة 0.5% زيت النعناع، T3= إضافة 0.5% زيت البابونج، T4= إضافة 0.5% زيت الزنجبيل**

ويُلحظ في شـــكل(7) تذبذب قيم معامل التحويل الغذائي خلال مدة التجربة، إذ ســـجلت معاملة البابونج (T3) أفضـــل معامل تحويل غذائي في الاســـبوع الثاني من التجربة بلغ 3.3 غم علف/غم زيادة وزنية، أما معاملة السـيطرة (T1) فسـجلت أقل معامل تحويل غذائي بلغ 4 غم علف/ غم زيادة وزنية، في حين ارتفع معامل تحويل معاملة البابونج (T3) في الاسـبوع السـادس عشـر إذ حققت 2.8 غم علف/ غم زيادة وزنية، فيما سـجلت معاملة السـيطرة (T1) أقل معامل تحويل بلغ 3.9 غم علف /غم زيادة وزنية. كما يبين جدول(8) نتائج كفاءة التحويل الغذائي لمعاملات التجربة. إذ وجُدت فروق معنويـة بين المعـاملات عنـد مســـتوى معنويـة ($P\leq0.05$)، إذ حققـت معـاملتي البـابونج (T3) والنعنـاع(T2) أعلى معدل كفـاءة تحويل غذائي بلغ 33.36% و31.82% على التوالي، وحققت معاملـة الزنجبيل(T4) 30.97%، فيما ســـجلت معاملـة الســـيطرة (T1) أقل كفـاءة تحويل بلغ 26.32%.



شكل(7) معامل التحويل الغذائي FCR خلال مدة التجربة

من خلال الشـــكل(8) نلحظ وجود تفاوت بين قيم كفاءة التحويل الغذائي بين المعاملات خلال مدة التجربة. إذ سجلت معاملة البابونج (T3) أعلى قيمة خلال أول أسبوعين بلغت 30.30% فيما سجلت معاملة السيطرة (T1) أقل معدل كفاءة تحويل بلغت 25%. أما في الأسبوع السادس عشر بقيت معاملة البابونج (T3) محققةً أعلى قيمة كفاءة تحويل بلغ 35.71%، في حين سجلت السيطرة أدنى معدل كفاءة تحويل بلغ 25.64%.



شكل(8) كفاءة التحويل الغذائي FCE خلال مدة التجربة

تطابقت هذه النتائج إلى حدٍ ما مع نتائج دراســـة Saidah وآخرون (2017) الذي اســـتعمل مسحوق البابونج في تغذية أسماك البلطي الاحمر الهجين بعدة مستويات، إذ دلت النتائج على تحقيق أعلى معدل معامل تحويل غذائي في المســـتوى 2% بلغ 3.72 غم علف/غم زيادة وزنية. وأيضـــا تطابقت مع نتائج دراسـة Tonsy وآخرون (2011) التي اسـتخدمت مسـحوق اوراق البابونج بنسـبة 2% في عليقة أســماك البلطي النيلي *Oreochromis niloticus*، إذ دلت النتائج على تفوق معامل التحويل وكفاءة التحويل الغذائي لمعاملة البابونج على معاملة الســـيطرة عند مســـتوى معنوية ($p\leq0.05$). فيما تطابقت نتائج تفوق معاملة النعناع (T2) على معاملة السيطرة (T1) مع ماتوصل

إليه(Leyciane وآخرون،2019) عند استخدامه زيت النعناع بتركيز 0.125% في علائق أسماك البلطي النيلي إذ حصل على أعلى معدل كفاءة تحويل غذائي بلغت 47.01% . وتطابقت مع نتائج دراسة Mohamed (2017) التي استخدمت مسحوق النعناع بتركيز 4% في علائق أسماك البلطي النيلي. ولم تتطابق مع نتائج دراسة Adem وآخرون(2015) الذي استخدم زيت النعناع بثلاثة تراكيز (500،1000،1500) ملغم/كغم $^{-1}$ في علائق أسماك السلمون المرقط *Oncorhynchus mykiss*. وأيضا لم تتطابق مع نتائج دراسة Ribeiro وآخرون(2016) على أسماك Tambaqui المغذاة على عليقة تحتوي على ثلاث تراكيز من زيت النعناع (0.5،1،1.5%)/ كغم . كذلك تطابقت نتائج تفوق معاملة الزنجبيل (T4) على معاملة السيطرة (T1) مع نتائج دراسة Mohammadi وآخرون(2020) الذي استعمل مستخلص الزنجبيل بنسبة 0.2% في علائق أسماك الكارب الشائع التي حققت أفضل معامل تحويل قياساً مع بقية النسب ومعاملة السيطرة إذ بلغت 1.32 غم علف/غم زيادة وزنية. وأيضا تطابقت مع نتائج دراسة Hosna وآخرون(2014) عند استعماله زيت الزنجبيل بتركيز 1% في علائق اصبعيات أسماك البيلوجا *Huso huso* إذ حققت أفضل معامل تحويل غذائي قياساً مع معاملة السيطرة بلغ 1.84 غم علف/ غم زيادة وزنية.

من النتائج السابقة يلحظ تفوق معاملة البابونج (T3) على جميع المعاملات، وقد يُعزى ذلك إلى غنى زيت البابونج بمركبات متعدد الفينول المضاد للاكسدة وذات تأثيرات مثبطة للالتهابات وكذلك اشتراكها في تنظيم عمليات الأيض داخل الجسم وبالتالي رفع كفاءة الجهاز الهضمي في عملية التحويل الغذائي (Zargaran وآخرون،2014).

كما أظهرت النتائج تفوق معاملة النعناع (T2) على معاملة السيطرة (T1) وقد يعزى سبب التفوق إلى وجود مادة المنثون menthone في زيت النعناع التي تلعب دوراً مهماً في تنشيط الامعاء

كذلك يحتوي زيت النعناع على مواد مضـــادة للاكســـدة ومقاومة للجراثيم مما يزيد من كفاءة الجهاز الهضمي في الاستفادة من المواد الغذائية (Mohaddese و Nastaran ،2014).

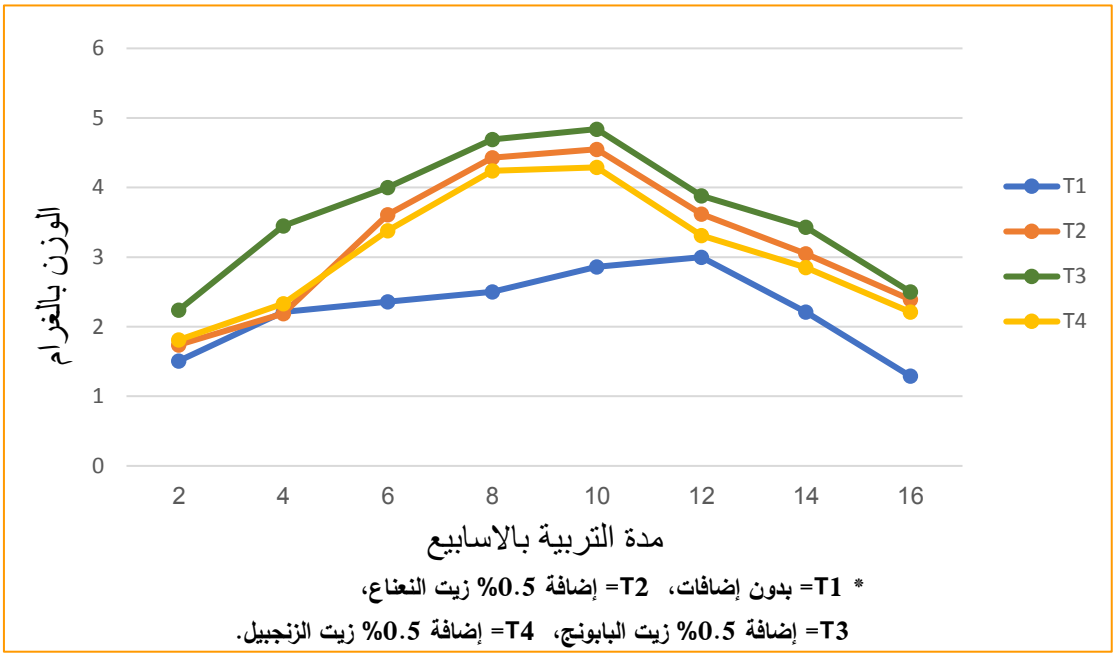
أما تفوق معاملة الزنجبيل (T4) على معاملة الســـيطرة (T1) قد يرجع الســـبب إلى وجود المركبات الفينولية في الزنجبيل التي تعمل على رفع كفاءة امتصـــاص المواد الغذائية كما له خصـــائص فاتحة للشـــهية، فضـــلا عن احتوائه على مواد عضـــوية طبيعية تســـاعد في زيادة النمو (Maqsood وآخرون،2011).

3.2.4: معدل النمو اليومي (DGR) معدل النمو النوعي (SGR)

تحتوي العديد من النباتات الطبية على مركبات تمتلك الكثير من الأنشطة البيولوجية منها تعزيز النمو، وتحفيز الشـهية (Reverter وآخرون،2014). يتضـح من جدول(8) نتائج معدل النمو اليومي (DGR) لمعـاملات التجربـة، إذ وجـدت فروق معنويـة على مســـتوى احتمـاليـة ($p\leq0.05$) بين المعـاملات، ودلـت النتـائج على تفوق معـاملـة البـابونج (T3) على بقيـة المعـاملات مســـجلـة 3.62غم/يوم، فيما حققت معاملة النعناع (T2) 3.20 غم/يوم، وســـجلت ومعاملة الزنجبيل (T4) 3.06 غم/يوم، فيما سجلت معاملة السيطرة (T1) أقل معدل نمو يومي بلغ 2.25 غم /يوم.

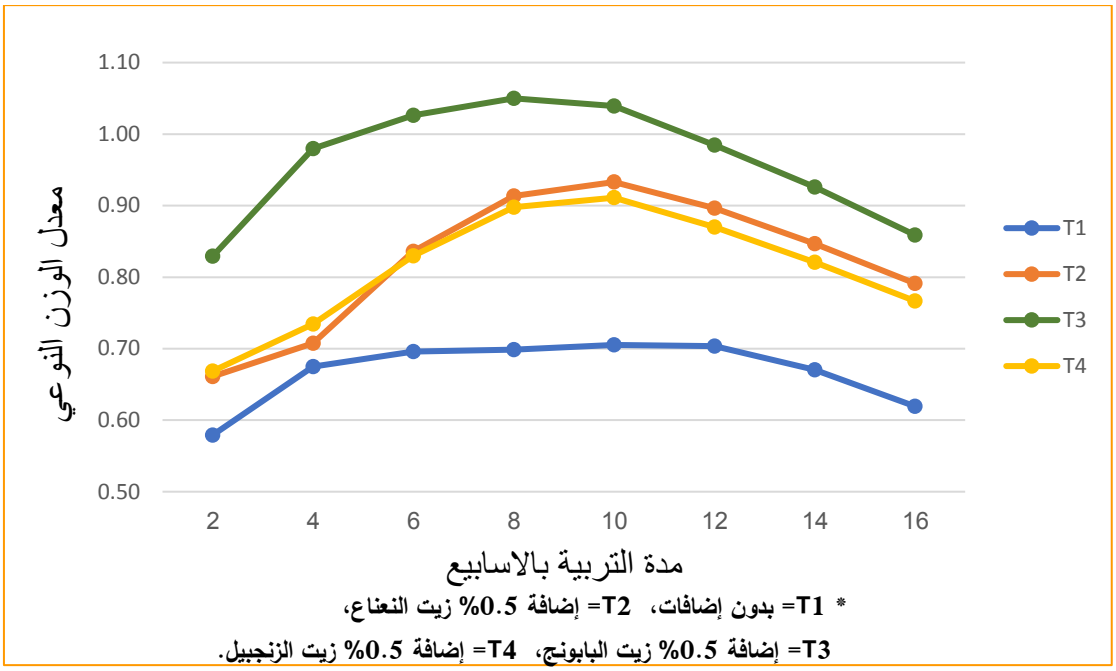
وأيضـا من جدول (8) تتضـح نتائج معدل النمو النوعي (SGR) لمعاملات التجربة، إذ وجدت فروق معنوية على مستوى احتمالية ($p\leq0.05$) بين المعاملات، وأظهرت النتائج تفوق معاملة البابونج (T3) على بقية المعاملات مســـجلة 0.86، فيما لم توجد فروق معنوية بين المعاملتين الثانية والرابعة إذ حققت معاملة النعناع (T2) 0.79، ومعاملة الزنجبيل (T4) 0.77، فيما ســجلت معاملة الســيطرة (T1) أقل معدل نمو نوعي بلغ 0.62.

من الشكل (9) نلحظ وجود تذبذب بمعدلات النمو اليومي للمعاملات خلال مدةالتجربة. إذ سجلت معاملة البابونج (T3) أعلى معدل نمو يومي في اول اسبوعين بلغت 2.24 غم/يوم، فيما سجلت معاملة السيطرة (T1) أقل معدل نمو يومي بلغت 1.51 غم/يوم. أما في بالاسبوع السادس عشر سجلت معاملة البابونج (T3) أعلى معدل نمو يومي بلغ 2.50 غم/يوم، في حين سجلت السيطرة أدنى معدل نمو يومي بلغ 1.29 غم/يوم.



شكل (9) معدل النمو اليومي DGR للأسماك خلال مدةالتجربة

نلحظ من الشكل (10) وجود تذبذب بمعدلات النمو النوعي(SGR) للمعاملات خلال مدةالتجربة. إذ سجلت معاملة البابونج (T3) أعلى معدل نمو نوعي في اول اسبوعين بلغت 0.83، فيما سجلت معاملة السيطرة (T1) أقل معدل نمو نوعي (SGR) بلغت 0.58. أما في بالاسبوع السادس عشر سجلت معاملة البابونج (T3) أعلى معدل نمو نوعي بلغ 0.86، في حين سجلت السيطرة أدنى معدل نمو نوعي بلغ 0.62.



شكل (10) معدل النمو النوعي SGR للأسماك خلال مدة التجربة

جاءت نتائج تفوق معاملة البابونج (T3) بمعدل النمو اليومي والنوعي على معاملة السيطرة (T1) متطابقة إلى حدٍ ما مع نتائج دراسة Saidah وآخرون(2017) الذي استعمل مسحوق البابونج في تغذية أسماك البلطي الاحمر الهجين بعدة مستويات، إذ دلت النتائج على تحقيق أعلى معدل نمو يومي في المستوى 6% بلغ 0.089 غم/يوم وأعلى معدل نمو نوعي في المستوى 6% بلغ 1.0%. وأيضا تطابقت إلى حدٍ ما مع نتائج دراسة Abdelhadi وآخرون (2010) الذي استخدم زيت البابونج بنسبة 1% في علائق أسماك الجري الافريقي *clarias gariepinus*، إذ حصل على معدل نمو يومي بمقدار 0.25 غم /يوم. وتطابقت أيضا مع نتائج دراسة Abdel –Tawab (2010) إذ دلت نتائجه إلى أفضل معاملة باستعمال مسحوق اوراق البابونج بتركيز 0.5% في علائق أسماك البلطي النيلي.

كما أظهرت النتائج تفوق معاملة النعناع (T2)على معاملة السيطرة (T1) في معدل النمو اليومي والنوعي إذ تطابقت هذه النتائج إلى حدٍ ما مع نتائج Talpur (2014) الذي درس تأثير

اضـافة مسـتخلص النعناع بعدة مسـتويات (1،2،3،4،5 %) في علائق الأسـماك القاروص الاسـيوي *Lates calcarifer*، إذ أظهرت النتائج تفوق جميع المستويات على مجموعة السيطرة في معدل النمو النوعي (SGR). ولم تتطابق هذه النتائج مع نتائج دراسة Adem وآخرون(2015) الذي استخدم زيت النعنـاع بثلاث تراكيز (500،1000،1500) ملغم/كغم $^{-1}$ في علائق أسـماك السـلمون المرقط *Oncorhynchus mykiss*. إذ لم تحقق معاملات النعناع فروقاً معنوية مع معاملة السـيطرة في معدل النمو اليومي والنوعي .

أيضـا دلت النتائج على تفوق معاملة الزنجبيل (T4) على معاملة السـيطرة (T1) في معدلات النمو اليومي والنوعي إذ تطابقت هذه النتائج إلى حدٍ ما مع نتائج دراسـة Nya و Austin (2009) اللذان استخداما مستخلص الزنجبيل بأربعة مستويات(0.05 ،0.1 ، 0.5 ، 1) لكل 100 غرام من العلف لمدة (14) يوم في علائق أسـماك السـلمون المرقط *Oncorhynchus mykiss*، إذ أظهرت النتائج تفوق جميع المسـتويات بمعدلات النمو اليومي والنوعي على معاملة السـيطرة.وأيضـا تطابقت النتائج مع نتائج دراسـة Abdelhamid وآخرون (2007) حين اسـتعمل مسـتخلص الزنجبيل بنسـبة 0.5% في العليقة المقدمة إلى إصبعيات البلطي النيلي أحادي الجنس *Oreochromis niloticus*.إذ حصل على أعلى معدل نمو نوعي (SGR) بلغ 1.09%. وأيضا تطابقت النتائج إلى حدٍ ما مع نتائج دراسـة Talpur وآخرون (2013) الذي درس تأثير جذور الزنجبيل بخمس مسـتويات (1, 2 , 3, 5, 10) غم لكل كيلو غرام علف في تغذية أسماك البرومون الشائع *Lates calcarifer*، إذ حصل على أفضل معدل نمو نوعي (SGR) في المستويين 5 ،10 غم بلغ 1.9 ، 1.6 % على التوالي.

من النتائج السـابقة نلحظ تفوق معاملة البابونج (T3) على جميع المعاملات في معدلات النمو اليومي والنوعي وقد يعزى سبب التفوق إلى قدرة زيت البابونج على تقليل الإجهاد وزيادة إفراز هرمون النمو فضلا عن زيادة التفاعلات الحيوية وبالتالي زيادة بناء الأنسجة العضلية في الأسماك (Schulz وآخرون،1998). في حين تفوقت معاملة النعناع (T2)على معاملة السيطرة(T1) قد يعود السبب إلى الدور الإيجابي للمركبات الرئيسية في زيت النعناع (ومنها الفينولية) في تحسين عملية الهضم ، فضلا عن المحافظة على التوازن المايكروبي في الأمعاء (Lovkova وآخرون،2001). أما تفوق معاملة الزنجبيل(T4) على معاملة السـيطرة(T1) قد يعزى إلى تأثير المركبات النشـطة بيولوجيا الموجودة في الزنجبيل بشكل مباشر على صحة الأسماك عن طريق تنشيط آلية المناعة، كما ان لمادة البوليفينول والفلافونويد خصـائص مضـادة للأكسـدة وبالتالي تعمل على تنشـيط الجهاز الهضـمي(Scalbert وآخرون،2005).

3.4: معايير الدم المناعية:

1.3.4: البروتين الكلي في مصل الدم: Total protein

يتضـــح من جدول (9) والشـــكل (11) وجود فروقات معنوية ($p\leq0.05$) في تراكيز البروتين الكلي بين معاملات التجربة،إذ دلت النتائج على تفوق معاملة النعناع(T2) على بقية المعاملات، إذ ســـجلت أعلى معدل بروتين كلي بلغ 4.04 ملغم/100مل ،في حين لم توجد فروقات معنوية ($p>0.05$) بين معاملة البابونج (T3) والزنجبيل (T4) إذ ســـجلتا 3.6 ملغم/100مل، 3.5 ملغم/100مل على التوالي،أما معاملة السـيطرة (T1) فقد سـجلت أدنى معدل لتركيز البروتين الكلي بلغ 3.13 ملغم/100مل.

تطابقت نتائج تفوق معاملة النعناع (T2) على معاملة السيطرة (T1) إلى حدٍ ما مع نتائج دراسة Leyciane وآخرون(2019) الذي حصل على أعلى معدل بروتين كلي بلغ 5.23 ملغم/100مل عندما استعمل زيت النعناع بتركيز 0.25% في علائق أسماك البلطي النيلي. وتطابقت إلى حدٍ ما مع نتائج دراسة Talpur (2014) الذي استخدم مستخلص النعناع بعدة مستويات(1،2،3،4،5)% في علائق أسماك القاروص الآسيوي *Lates calcarifer*، إذ أظهرت النتائج أعلى معدل بروتين كلي بلغ 2.5 ملغم/100مل في المستوى 5%. وأيضا مطابقة مع ما توصل اليه Adel وآخرون (2015) الذي استخدم مسحوق النعناع بنسبة 3% في علائق أسماك السلمون المرقط *Oncorhynchus mykiss* إذ سجلت أعلى معدل لتركيز البروتين الكلي بلغ 4.08 ملغم/100مل. كما لم تتطابق مع نتائج دراسة Ribeiro وآخرون (2016) على أسماك Tambaqui المغذاة على عليقة تحتوي على ثلاثة تراكيز من زيت النعناع (0.5،1،1.5%) ،إذ لم تحصل على اي فروق معنوية ($p\leq0.05$) بين معاملات التجربة.

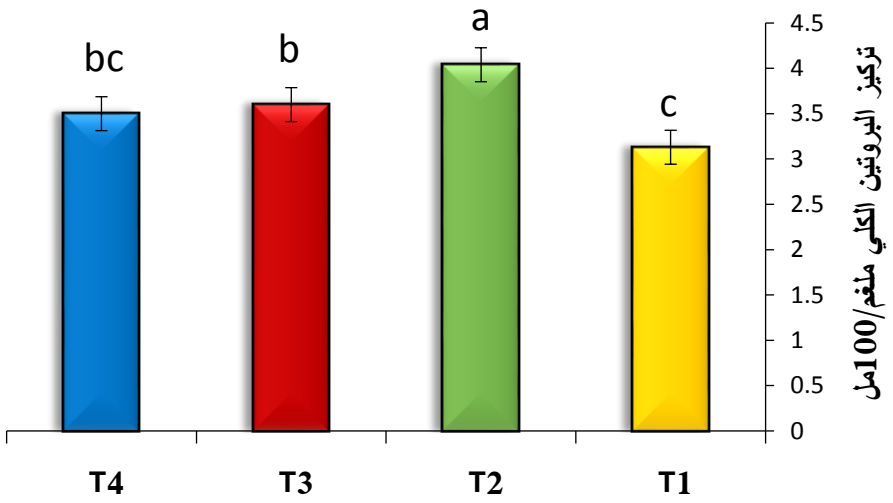
جدول(9) نتائج البروتين الكليTP وإنزيم الفوسفات القاعدي ALP وإنزيم ناقل اللنينALT وإنزيم ناقل السبارتيزAST لمعاملات التجربة (المتوسط ± الخطأ القياسي)

المعاملات	المعايير المدروسة			
	البروتين الكلي(TP) ملغم/100مل	إنزيم ALP U/L	إنزيم ALT U/L	إنزيم AST U/L
T1	^{c}3.13 ±0.09	^{b}83.00 ±1.15	^{b}10.67 ±0.33	^{b}85.67 ±2.85
T2	^{a}4.04 ±0.09	^{a}89.33 ±1.45	^{a}13.66 ±1.20	^{a}92.33 ±0.88
T3	^{b}3.6 ±0.15	^{a}87.67 ±1.45	^{a}14.66 ±0.88	^{ab}90.0 ±1.15
T4	^{bc}3.5 ±0.17	^{a}90.66 ±1.20	^{a}13.5 ±0.76	^{a}93.33 ±1.20

***الحروف المختلفة في العمود الواحد تدل على وجود فروقات معنوية عند مستوى معنوية ($p\leq0.05$)**

**** T1= بدون إضافات، T2= إضافة 0.5% زيت النعناع، T3= إضافة 0.5% زيت البابونج، T4= إضافة 0.5% زيت الزنجبيل**

من النتائج أيضـا نلحظ تفوق معاملة البابونج (T3)على معاملة السـيطرة (T1) إذ تطابقت هذه النتائج مع ماتوصـلت إليه Tonsy وآخرون(2011) التي اسـتخدمت مسـحوق أوراق البابونج بنسـبة 2% في عليقة أسـماك البلطي النيلي *Oreochromis niloticus*، إذ حصـلت على فروق معنوية ($p\leq0.05$) قياساً مع معاملة السيطرة في مستوى البروتين الكلي إذ بلغ 7.6 ملغم/100مل في معاملة البابونج. ولم تتطابق مع نتائج دراسـة Abdelhamid وآخرون (2007) عندما اسـتعمل مسـتخلص البابونج بنسبة 0.5% في علائق أسماك البلطي النيلي *Oreochromis niloticus*، إذ تفوقت معاملة السـيطرة على معاملة البابونج في تركيز البروتين الكلي. ومن النتائج نلحظ عدم وجود فروق معنوية ($p>0.05$) بين معاملة الزنجبيل ومعاملة السـيطرة، إذ تطابقت هذه النتائج مع نتائج دراسـة Brum وآخرون (2018) الذي اسـتخدم زيت الزنجبيل بعدة تراكيز (0.5، 1، 1.5 %) في علائق أسـماك البلطي النيلي *Oreochromis niloticus* إذ دلت النتائج على عدم وجود فروقات معنوية($p>0.05$) في مستوى البروتين الكلي.



* T1= بدون إضافات، T2= إضافة 0.5% زيت النعناع،
T3= إضافة 0.5% زيت البابونج، T4= إضافة 0.5% زيت الزنجبيل.

شكل(11) تركيز البروتين الكلي TP في معاملات التجربة

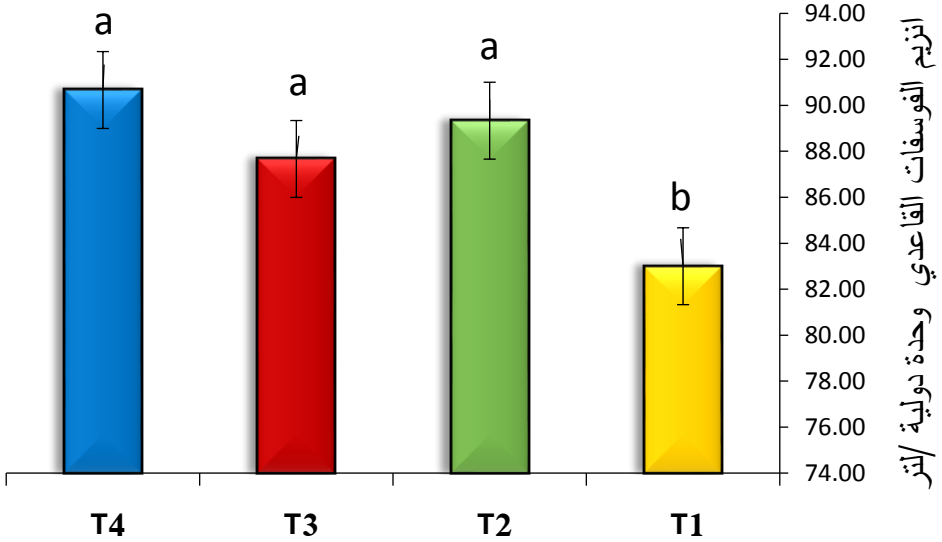
أيضـا تطابقت النتائج مع نتائج دراسـة Abdelhamid وآخرون (2007) الذي اسـتخدم مسـتخلص البابونج بنسبة 0.5% في علائق أسماك البلطي النيلي *Oreochromis niloticus*، إذ تفوقت معاملة السـيطرة على معاملـة الزنجبيل في تركيز البروتين الكلي. في حين لم تتطـابق النتـائج مع نتـائج Mohammadi وآخرون (2020) الذي استعمل مستخلص الزنجبيل بنسبة 0.2% في علائق أسماك الكارب الشـائع إذ حصـل على مسـتوى بروتين كلي بلغ 2.86 ملغم /100مل أعلى قياسـاً بمجموعة السيطرة.

تحدث التغيرات في تركيز البروتين الكلي في مصل الدم بشكل رئيسي بسبب التغيرات في حجم البلازما بسبب عدم التوازن التناضحي بين داخل الخلايا وخارجها وبالتالي، فإن أي ضغوط قد تسبب تغيرات في قيم البروتين الإجمالية (Melo وآخرون،2009).

من خلال النتائج نلحظ تفوق معاملة النعناع (T2) على بقية المعاملات في مسـتوى البروتين الكلي وقد يعود ذلك إلى المركبات الفينولية الموجودة في زيت النعناع التي لها تأثير إيجابي على قابلية الهضـم للغذاء مما يحسـن من معدلات النمو والصـحة العامة لجسـم السـمكة (Giannenas وآخرون،2003) بالتالي إنتاج كمية أكبر من البروتين. كما نلحظ في الشـكل (11) تفوق معاملة البابونج (T3) على معاملة السـيطرة وقد يعود السـبب إلى خصـائص البابونج المهدئة للمعدة (Ruhollah وآخرون،2015) التي بدورها تسـاهم في زيادة كفاءة الجهاز الهضـمي. أيضـا نلحظ في الشـكل(11) ان مسـتوى البروتين الكلي في معاملة الزنجبيل (T4) أعلى من معاملة السـيطرة (T1)، ولكن لاتوجد فروقات معنوية إحصائية بينهما ($p>0.05$).

2.3.4: إنزيم الفوسفات القاعدي ALP وإنزيم نأقل اللنينALT وإنزيم نأقل السبارتيز AST في مصل الدم:

يتضح من الجدول (9) والشكل (12) نتائج مستوى إنزيم الفوسفات القاعدي ALP في معاملات التجربة إذ أظهرت النتائج وجود فروق معنوية على مستوى احتمالية($P\leq0.05$) في معاملات الزيوت (T2)،(T3)،(T4) قياساً بمعاملة السيطرة ولم توجد فروق معنوية بين معاملات الزيوت، إذ سجلت معاملة الزنجبيل(T4) أعلى مستوى من إنزيم الفوسفات القاعديALP بلغ 90.66 وحدة دولية /لتر، في حين جاءت معاملة النعناع(T2) بالترتيب الثاني مسجلة 89.33 وحدة دولية /لتر تلتها معاملة البابونج(T3) التي سجلت 87.67 L/U، أما معاملة السيطرة(T1) فقد سجلت أدنى مستوى لإنزيم الفوسفات القاعديALP بلغ 83.0 وحدة دولية /لتر. جاءت النتائج مطابقة لنتائج دراسة Abdelhamid وآخرون(2007) الذي استخدم مستخلص البابونج والزنجبيل بنسبة 0.5% في علائق أسماك البلطي النيلي *Oreochromis niloticus*، إذ وجد فروقاً معنوية ($p\leq0.05$) في مستوى إنزيم ALP في معاملتي البابونج والزنجبيل بالقياس مع مجموعة السيطرة إذ سجلتا 34 ، 32 وحدة دولية



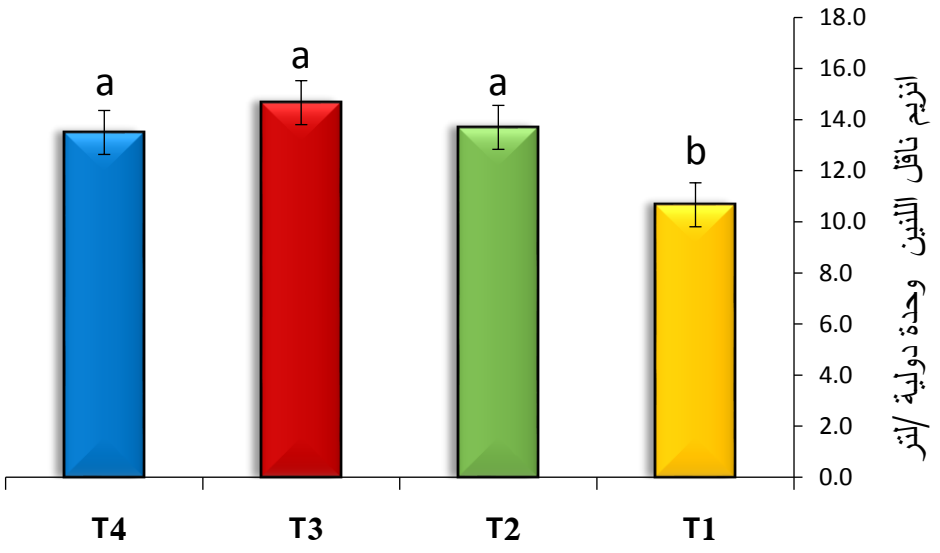
* T1= بدون إضافات، T2= إضافة 0.5% زيت النعناع،
T3= إضافة 0.5% زيت البابونج، T4= إضافة 0.5% زيت الزنجبيل.

شكل(12) تركيز إنزيم الفوسفات القاعدي ALP في معاملات التجربة

/لتر على التوالي. كما تطابقت نتائج معاملة الزنجبيل إلى حدٍ ما مع نتائج دراسة Sukumaran وآخرون (2016)، إذ حصل على أعلى مستوى من إنزيم ALP بلغت 171.6 وحدة دولية /لتر عند استعمال مسحوق الزنجبيل بنسبة 1% في علائق أسماك الرهو *Labeo rohita*. وتطابقت النتائج أيضا مع نتائج دراسة Mohammadi وآخرون (2020) الذي استعمل مستخلص الزنجبيل بنسبة 0.2% في علائق الأسماك الكارب الشائع التي حققت أفضل مستوى لإنزيم الفوسفات القاعدي ALP بلغ 21.60 U/ mL $^{-1}$. في حين لم تتطابق النتائج مع نتائج دراسة Sattar و Al-Faragi (2013) عنده استخدامه مستخلص الزنجبيل في علائق الأسماك الكارب الشائع بتركيز 10غم /كغم إذ لم يجد فروقاً معنوية($p>0.05$) قياساً بمعاملة السيطرة.

كذلك لم تتطابق هذه النتائج مع نتائج دراسة Adel وآخرون(2015) الذي استخدم مسحوق النعناع بثلاثة مستويات (1، 2، 3%) في علائق أسماك السلمون إذ لم يجد فروقاً معنوية ($p>0.05$) في مستوى إنزيم الفوسفات القاعدي ALP بين معاملات النعناع ومعاملة السيطرة .

كما يتضح من جدول (9) والشكل (13) نتائج مستوى إنزيم ناقل اللنين ALT في معاملات التجربة، إذ أظهرت النتائج وجود فروق معنوية على مستوى احتمالية ($P\leq0.05$) في معاملات الزيوت (T2)،(T3)،(T4) قياساً بمعاملة السيطرة، ولم توجد فروق معنوية ($P\leq0.05$) بين معاملات الزيـــــــــوت، إذ حققت معاملة البابونج (T3) أعلى مستوى من إنزيم ALT بلغ 14.66 وحدة دولية / لتر في حين حققت معاملة النعناع (T2) 13.66 وحدة دولية / لتر تلتها معاملة الزنجبيل(T4) محققةً 13.5 وحدة دولية / لتر، فيما سجلت معاملة السيطرة (T1) أدنى مستوى من إنزيم ALT بقيمة 10.67 وحدة دولية / لتر.



* T1= بدون إضافات، T2= إضافة 0.5% زيت النعناع،
T3= إضافة 0.5% زيت البابونج، T4= إضافة 0.5% زيت الزنجبيل.

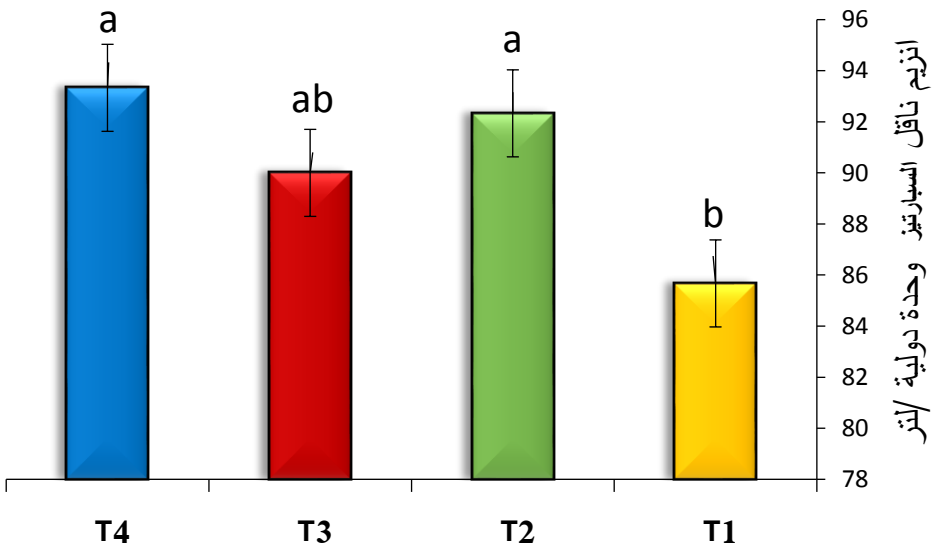
شكل(13) مستوى انزيم ناقل اللنين ALT في معاملات التجربة

تطابقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسة Abdelhamid وآخرون (2007) الذي استخدم مستخلص البابونج والزنجبيل بنسبة 0.5% في علائق أسماك البلطي النيلي *Oreochromis niloticus*، إذ وجد فروقاً معنوية($p\leq0.05$) في مستوى إنزيم ALT في معاملتي البابونج والزنجبيل بالقياس مع مجموعة السيطرة إذ سجلتا 34 ، 31 وحدة دولية / لتر على التوالي. ولم تتطابق مع نتائج دراسة Sattar و Al-Faragi (2013) عندما استخدم مستخلص الزنجبيل في علائق أسماك الكارب الشائع بتركيز 10غم /كغم إذ لم يجد فروقاً معنوية($p>0.05$) في مستوى إنزيم ALT قياساً بمعاملة السيطرة.

أيضا تطابقت نتائج معاملة النعناع (T2) مع نتائج دراسة Gustavo وآخرون (2017) الذي استخدم زيت النعناع بتركيز (100 و 250)غم/كغم، إذ وجد فروقاً معنوية في مستوى إنزيم ALT عند المستوى 100غم/كغم قياساً بمجموعة السيطرة. ولم تتطابق مع نتائج دراسة Adel وآخرون (2015) الذي استخدم مسحوق النعناع بثلاثة مستويات (1، 2، 3 %) في علائق أسماك السلمون، إذ دلت النتائج على عدم وجود فروقات معنوية ($p>0.05$) في مستوى إنزيم ALT بين معاملات النعناع

ومعاملة السيطرة. كما لم تتطابق نتائج معاملة البابونج (T3) مع نتائج دراسة Tonsy وآخرون،2011) التي استخدمت مسحوق أوراق البابونج بنسبة 2% في عليقة أسماك البلطي النيلي *Oreochromis niloticus*، إذ دلت النتائج على عدم وجود فروق معنوية($p>0.05$) بين المعاملات في مستوى إنزيم ALT.

يتضح من جدول (9) والشكل (14) نتائج إنزيم ناقل السبارتيز AST فقد أظهرت النتائج فروقاً معنوية على مستوى احتمالية ($p\leq0.05$) في معاملات الزيوت (النعناع، البابونج، الزنجبيل) قياساً بمعاملة السيطرة، في حين لم يوجد فرق معنوي($p>0.05$) بين معاملتي الزنجبيل (T4) والنعناع (T2)، إذ حققت معاملة الزنجبيل (T4) أعلى مستوى من إنزيم AST بلغ 93.33 وحدة دولية /لتر، فيما تلتها معاملة النعناع (T2) إذ حققت 92.33 وحدة دولية /لتر، بينما سجلت معاملة البابونج(T3) 90.0 وحدة دولية / لتر، أما معاملة السيطرة (T1) فسجلت أدنى مستوى من إنزيم AST بلغ 85.67 وحدة دولية / لتر.



شكل(14) مستوى إنزيم ناقل السبارتيز AST في معاملات التجربة

تطابقت هذه النتائج الى حد ما مع نتائج دراسة Abdelhamid وآخرون (2007) عندما استعمل مستخلص البابونج والزنجبيل بنسبة 0.5% في علائق أسماك البلطي النيلي *Oreochromis niloticus*، إذ دلت النتائج على وجود فروق معنوية ($p\leq0.05$) في معاملتي البابونج والزنجبيل بالقياس مع مجموعة السيطرة إذ سجلتا أعلى مستوى من إنزيم AST بقيمة 37 ، 34 وحدة دولية /لتر على التوالي. ولم تتطابق مع نتائج دراسة Sattar و Al-Faragi (2013) حينما استخدم مستخلص الزنجبيل في علائق أسماك الكارب الشائع بتركيز 10غم /كغم إذ انخفضت معاملة الزنجبيل معنوياً ($p\leq0.05$) قياساً بمعاملة السيطرة. كما لم تتطابق مع نتائج دراسة Tonsy وآخرون (2011) التي استخدمت مسحوق اوراق البابونج بنسبة 2% في عليقة أسماك البلطي النيلي *Oreochromis niloticus*، إذ دلت النتائج على عدم وجود فروق معنوية ($p>0.05$) بين المعاملات في مستوى إنزيم AST.

تطابقت نتائج معاملة النعناع (T2) مع نتائج دراسة Gustavo وآخرون (2017) الذي استخدم زيت النعناع بمستوى (100 و 250 غم)/كغم، إذ وجد فروقاً معنوية ($p\leq0.05$) في مستوى إنزيم AST عند المستوى 100غم/كغم قياساً بمجموعة السيطرة. كما لم تتطابق مع نتائج دراسة Adel وآخرون (2015) الذي استخدم مسحوق النعناع بثلاثة مستويات (1، 2، 3 %) في علائق أسماك السلمون، إذ دلت النتائج على عدم وجود فروقات معنوية في مستوى إنزيم AST بين معاملات النعناع ومعاملة السيطرة.

تعتمد فحوصات وظائف الكبد على رصد مستويات عدّة إنزيمات ومنها إنزيم الفوسفاتاز القلوي(ALP) الذي يفرز من الكبد وزيادته عن الحد الطبيعي دلالة على خلل في عمل الكبد

(Friedman،2015). كما يعتبر إنزيم ناقل أمين اللنين (ALT) احد إنزيمات الكبد الذي يوجد بكميات قليلة في الدم وزيادته تدل على حدوث مشاكل في الكبد (Johansen واخرون ،2019).

أكدFriedman (2015) على ان الكبد يقوم بإفراز إنزيم نأقل السبارتيز(AST) بشكل رئيسي وكذلك تقوم العضلات والقلب والكليتين بإفراز كميات قليله منه، إذ يرتفع هذا الإنزيم في الدم عند حدوث مشكلة في الكبد غير ان ارتفاعه وحده لايؤكد وجود مشكلة في الكبد .

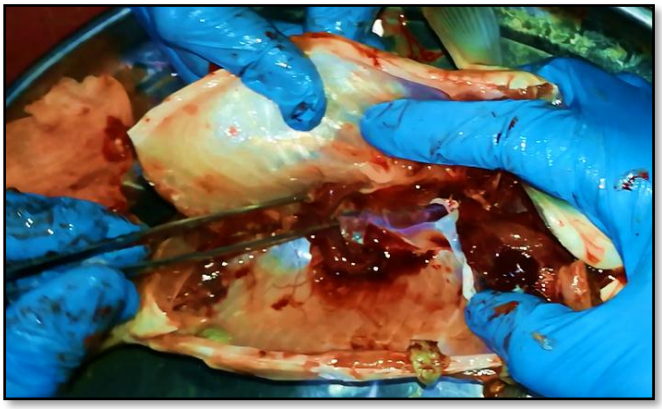
من النتائج أعلاه نلحظ وجود فروقات معنوية بسيطة في مستوى إنزيم (ALP) وهذا يدل على سلامة الكبد وان المعاملة بالزيوت لم تؤثر سلباً على وظيفة الكبد. أما مستويات (ALT) و(AST) فقد وجدت فروقاً معنوية ولكن تعتبر زيادة ضمن المدى الطبيعي وهذا يدل على سلامة وصحة الكبد وقد يعود السبب إلى احتواء الزيوت (النعناع، البابونج، الزنجبيل) على مركبات داعمة للمناعة.

4.4: تحدي إصابة الأسماك ببكتيريا *Aeromonas hydrophila* :

بعد 105 يوم من بداية التجربة حُقنت الأسماك ببكتيريا *Aeromonas hydrophila* ، وبعد 7 ايام من حقن الأسماك ظهرت علامات متوسطة الشدة للإصابة بمرض التسمم الدموي الإيروموناسي(MAS) على الأسماك وتمثلت الأعراض بخمول الأسماك، السباحة قرب السطح وتشقق الزعنفة الذيلية مع ظهور تقرحات دموية على جسم الأسماك، وغزارة المادة المخاطية المحيطة بالجسم، فقدان الشهية، أما العلامات العيانية على أحشاء الأسماك فقد ظهرت هشاشة على كلى الأسماك المصابة، مع تغير لون الطحال إلى أحمر داكن كما في الصور (7، 8، 9).

صورة (7) تقرحات دموية على جسم الأسماك

صورة (8) تشقق الزعنفة الذيلية



صورة (9) الاحشاء الداخلية للأسماك المصابة

يُظهر جدول (10) نتائج تحدي إصـــابة الأســـماك ببكتيريا *Aeromonas hydrophila*، إذ خلصت النتائج إلى عدم إصابة الأسماك بمرض تسمم الدم الإريموناسي في معاملة النعناع، إذ بلغت نسبة الإصـابة 0%، وفي معاملتي البابونج والزنجبيل فقد بلغت نسـبة الإصـابة في كل منهما 20%، أما معاملة السيطرة فقد بلغت نسبة الإصابة فيها 100%.

تطابقت النتائج إلى حدٍ ما مع نتائج دراســـة Hajibeglou و Sudagar (2010) إذ قاموا بإصابة أسماك الكارب الشائع ببكتيريا *Aeromonas hydrophila* والمغذاة على خليط من زيـــت النعنـــــاع ونباتات أخرى بتركيز 1% إذ أظهرت النتائج بعد 45 يوم نسبة بقاء الأسماك في معاملة النعناع بواقع 94%، بينما في معاملة السيطرة بلغت نسبة البقاء 48%. وتطابقت أيضا مع نتائـــج

دراسة Ribeiro وآخرون (2016) على أسماك Tambaqui المغذاة على عليقة تحتوي على ثلاثة تراكيز من زيت النعناع (0.5،1،1.5%) لمدة 30 يوماً والمصابة تجريبياً ببكتيريا *Aeromonas hydrophila*، إذ دلت النتائج على نسبة بقاء 100% للأسماك المغذاة على زيت النعناع ولكافة المستويات.

جدول(10) نتائج تحدي الاصابة ببكتيريا *Aeromonas hydrophila* لمعاملات التجربة

المعايير المدروسة	المعاملات			
	T1	T2	T3	T4
عدد الأسماك المحقونة	5	5	5	5
عدد الأسماك المصابة	5	0	1	1
نسبة الإصابة %	100	0	20	20

*** T1= بدون إضافات، T2= إضافة 0.5% زيت النعناع، T3= إضافة 0.5% زيت البابونج، T4= إضافة 0.5% زيت الزنجبيل**

تطابقت نتائج معاملة الزنجبيل(T4) إلى حدٍ ما مع نتائج دراسة Nya و Austin (2009) اللذان استخدما زيت الزنجبيل بأربعة مستويات (0.05، 0.1 ، 0.5 ، 1) غم لكل 100 غرام علف لمدة (14) يوماً في علائق أسماك السلمون المرقط *Oncorhynchus mykiss*، بعدها اصيبت تجريبياً ببكتيريا *Aeromonas hydrophila*، إذ أظهرت النتائج انخفاضاً ملحوظاً في عدد الهلاكات في معاملات الزنجبيل إذ بلغت 0% في المستوى 1% و 16% في المستوى 0.5%، أما في مجموعة السيطرة بلغت الهلاكات 64%. كما تطابقت إلى حدٍ ما مع نتائج دراسة Sukumaranوآخرون (2016) حينما حقن أسماك الرهو *Labeo rohita* تجريبياً ببكتيريا *Aeromonas hydrophila*، إذ حصل على أعلى نسبة بقاء بلغت 65.52٪ في الأسماك المغذاة

على مسـحوق الزنجبيل بنسـبة 0.8%. كما تطابقت نتائج معاملة البابونج (T3) إلى حدٍ ما مع نتائج دراســة Abdelhadi وآخرون (2012) الذي اثبت فعالية مســحوق البابونج بتركيز 1% في مقاومة الإصابة ببكتيريا *Aeromonas hydrophila*.

من خلال النتائج أعلاه يتبين فعالية زيت النعناع في مقاومة العدوى ببكتيريا *Aeromonas hydrophila* ودعم مناعة الأســـماك لمقاومة الامراض، وقد يعود ذلك إلى فعالية مركبات النعناع ومنها المنثول التي تمتلك نشــاطًا مضــادًا قويًا للبكتيريا ضــد المكورات العنقودية، المكورات العنقودية الذهبية، المكورات العنقودية الجلدية، وخاصـة ضـد سـلالات العصـيات القولونية Escherichia coli (Mimica وآخرون،2003 ؛Mohaddese وآخرون،2008).

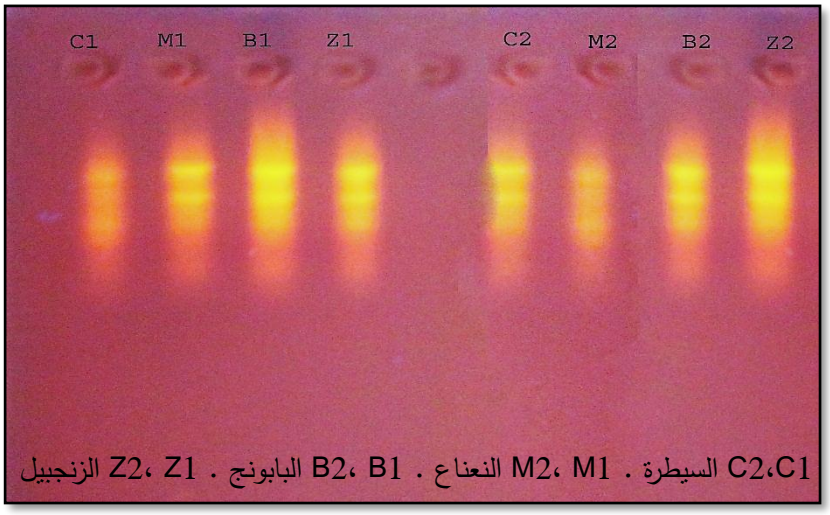
كما أثبت زيت البابونج فعاليته في مقاومة العدوى ضـــد بكتيريا *Aeromonas hydrophila* وزيادة مناعة الأسماك في مقاومة الأمراض وقد يعود ذلك إلى مادة الكاما ازولين في البابونج المضادة للأكسدة التي تمتلك نشاطًا قوياً مضادًا للبكتيريا العصيات القولونية *Escherichia coli* وغيرها (Mahdieh،2017). فضـــلاً عن ان للبابونج تأثير جيد على التئام الجروح، فضـــلا عن تأثيره المضاد للالتهابات.

كذلك أظهرت النتائج فعالية زيت الزنجبيل في مقاومة العدوى ببكتيريا *Aeromonas hydrophila* وقد يعود ذلك إلى احتواء الزنجبيل على مركبات ومنها الزينيبرين zingiberene ذات فعالية جيدة في مقاومة الأمراض المعدية عن طريق زيادة آليات المناعة المحددة وغير المحددة (Harikrishnan وآخرون،2011). كما دلت الدراســـات على أن الزنجبيل فعال في الســـيطرة على مجموعة من الأمراض البكتيرية والفيروسية والفطرية والطفيلية (Grzanna وآخرون،2005 ؛ Kim وآخرون،2007).

5.4: النتائج الجزيئية:

1.5.4: استخلاص RNA الكلي : Total RNA

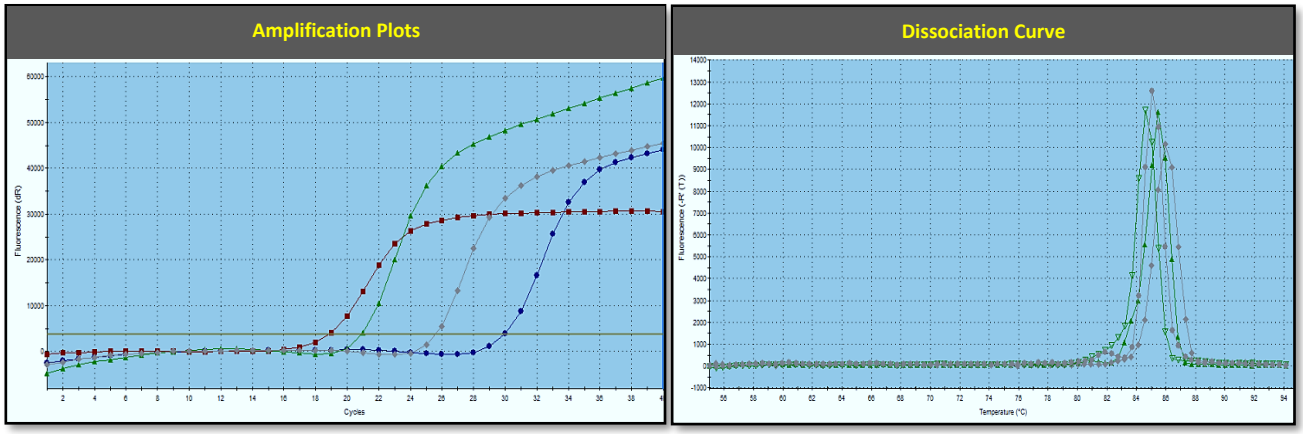
تم استخلاص Total RNA من جزء الكلية الأمامي (رأس الكلية) لتقييم مؤشرات التعبير الجيني للاستجابة المناعية للبكتيريا، من الواضح أن أنسجة رأس الكلية تلعب دورًا مهمًا في الاستجابة المناعية في الأسماك. كما تتوفر قواعد بيانات وراثية مهمة لأنسجة رأس الكلية يمكن منها تحديد الجينات ذات الصلة بالمناعة. (Chao و Miao ،2020؛Fazelan وآخرون،2020). استخدمت عدة تشغيلية لعزل الحامض النووي (RNA)، ولمراقبة نجاح عملية الاستخلاص تم الترحيل الكهربائي لمحصلة الاستخلاص على هلام الاكاروز لتكون مادة التفاعل في تفاعل صناعة cDNA synthesis . ودلت النتائج على وجود حزم RNA في العينة وكما في الشكل(15).



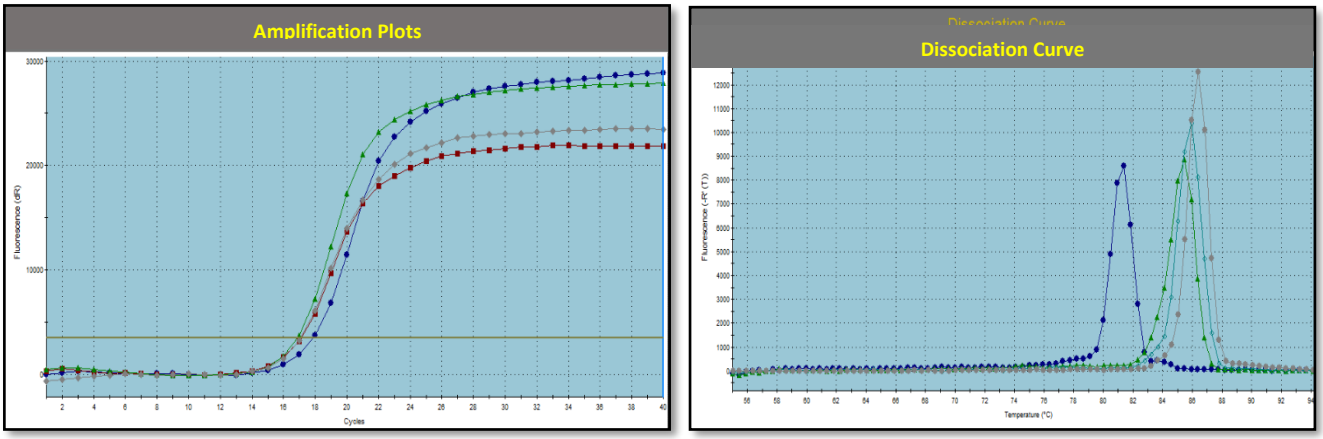
شكل (15) استخلاص RNA الكلي من نسيج رأس الكلى

2.5.4: التضخيم لجينات المؤشرات المناعية المدروسة:

يبين الشـــكل (16) و(17) منحى الانصـــهار Dissociation Curve ومســـار التضـــخيم Amplification Plots لعينات التجربة للجين (IL-1β)، والشـــكل(18) و(19) يوضـــح منحى الانصـهار و مسـار التضـخيم لعينات التجربة للجين (IL-8)، كما يتضـح من الشـكل (20) و(21) منحى الانصـــهارومســـار التضـــخيم لعينات التجربة للجين (IL-10)، أما الشـكل(22) و(23) يبين منحى الانصهار مسار التضخيم لعينات التجربة للجين (TNFα).

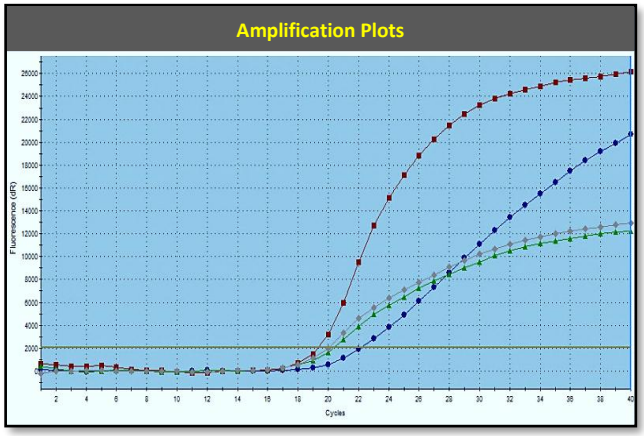


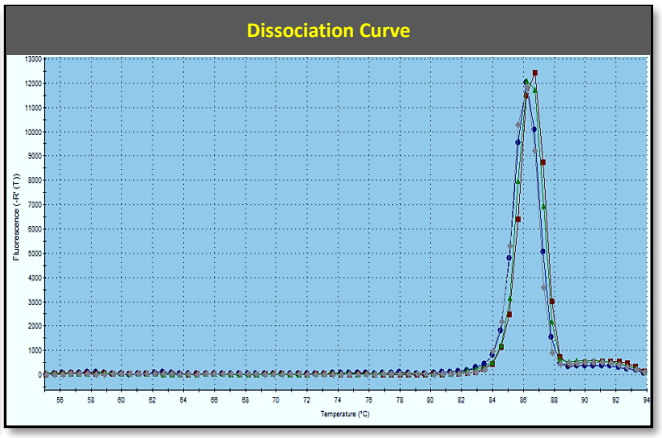
شكل(16) و(17) مسار التضخيم لجين (IL-1β) Interleukin1β في معاملات التجربة



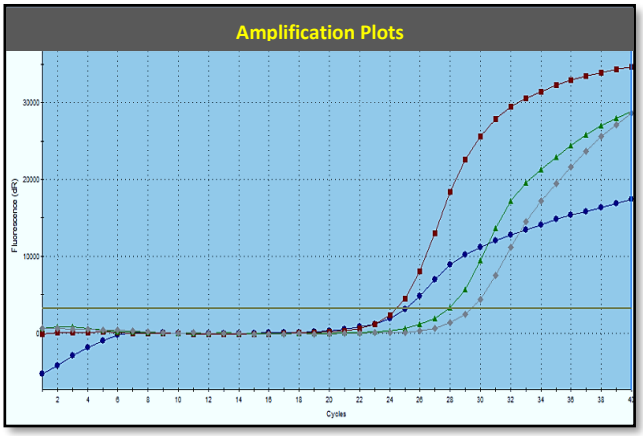
شكل(18) و(19) يوضح مسار التضخيم لجين (IL-8) Interleukin8 في معاملات التجربة

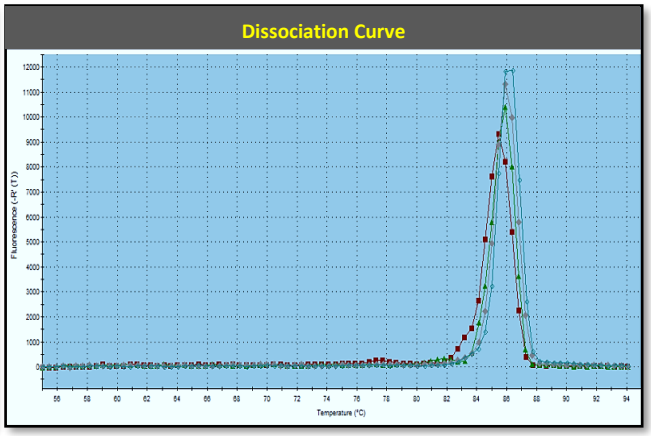
●السيطرةT1 ■النعناع T2 ▲البابونج T3 ◆الزنجبيل T4





شكل(20) و(21) مسار التضخيم لجين (IL−10) Interleukin10 في معاملات التجربة

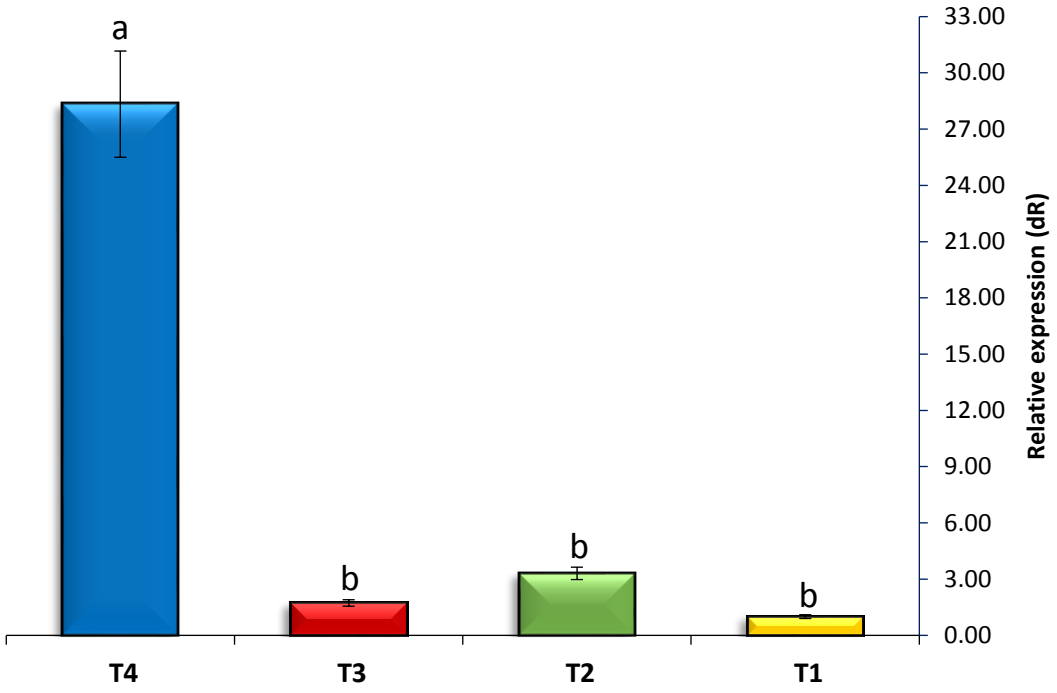




شكل(22) و(23) مسار التضخيم لعينات التجربة للجين (TNFα)
Tumor necrosis factor alpha في معاملات التجربة

3.5.4: التعبير الجيني Gene expression:

يتضح من الشكل (24) ارتفاعاً معنوياً ($P\leq0.05$) في مستوى التعبير الجيني لجين (IL−1β) في معاملة الزنجبيل (T4) قياساً ببقية المعاملات، فيما لم يتأثر معنويا مستوى التعبير الجيني في معاملتي النعناع (T2) والبابونج (T3) قياساً بمستوى التعبير الجيني لمعاملة السيطرة (T1).

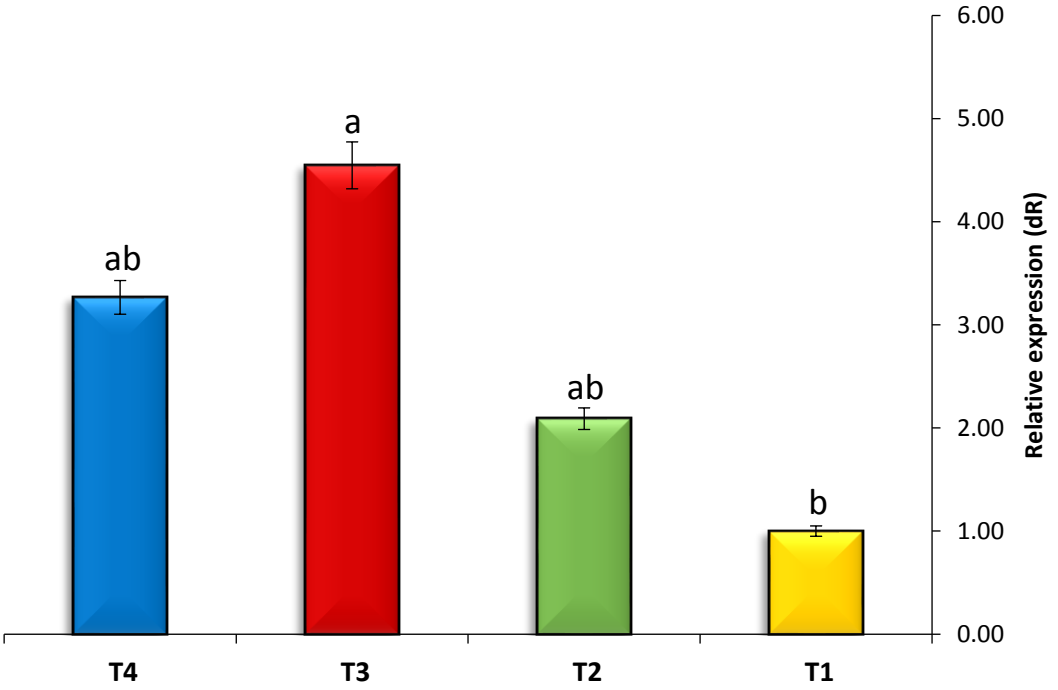


* T1= بدون إضافات، T2= إضافة 0.5% زيت النعناع، T3= إضافة 0.5% زيت البابونج، T4= إضافة 0.5% زيت الزنجبيل

شكل (24) الكمية النسبية للتعبير الجيني لجين Interleukin1β (IL-1β)

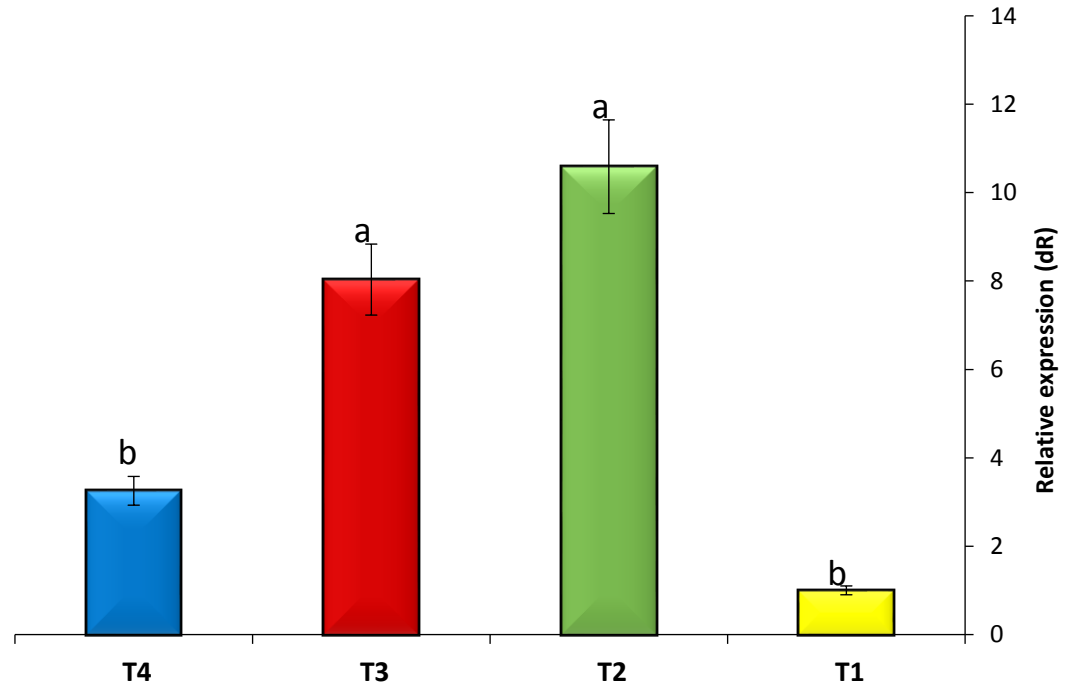
كما يبين الشـــكل (25) مســـتوى التعبير الجيني لجين (IL-8) في معاملات التجربة، إذ حققت المعاملات الثلاثة البابونج (T3)، الزنجبيل(T4)، النعناع(T2) ارتفاعاً معنوياً ($P\leq0.05$) في مستوى التعبير الجيني قياساً بمستوى التعبير الجيني في معاملة السيطرة(T1). في حين لم توجد فروق معنوية بين المعاملات (T3) و(T4) و(T2).

يتضـــح من الشـــكل (26) مســـتوى التعبير الجيني لجين (IL-10) لمعاملات التجربة، إذ دلت النتائج على ان معاملة النعناع(T2) حققت ارتفاعاً معنوياً ($P\leq0.05$) في مســـتوى التعبير الجيني قياســـاً بمعاملتي الســـيطرة (T1) والزنجبيل (T4)، في حين لم تحقق فرقاً معنوياً مع معاملة البابونج (T3)، كما ان مســـتوى التعبير الجيني في معاملة البابونج (T3) حقق ارتفاعاً معنوياً ($P\leq0.05$) قياســـاً بمعاملتي الســـيطرة (T1) و الزنجبيل (T4)، فيما لم توجد فروق معنوية في مســـتوى التعبير الجيني بين معاملتي الزنجبيل (T4) والسيطرة (T1).



* T1= بدون إضافات، T2= إضافة 0.5% زيت النعناع، T3= إضافة 0.5% زيت البابونج، T4= إضافة 0.5% زيت الزنجبيل

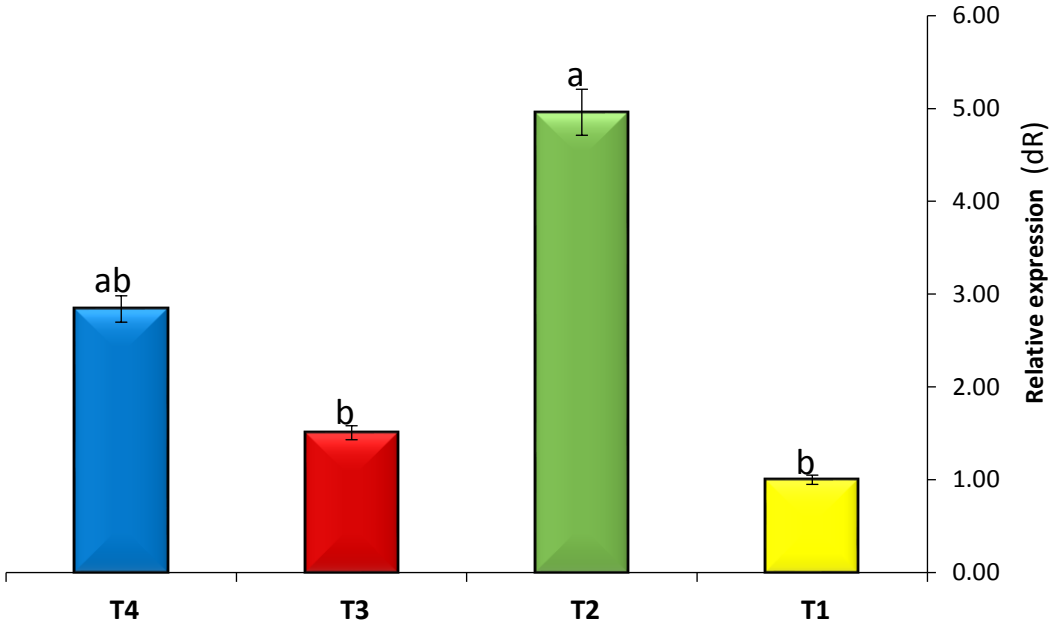
شكل(25) الكمية النسبية للتعبير الجيني لجين(IL-8) Interleukin8



* T1= بدون إضافات، T2= إضافة 0.5% زيت النعناع، T3= إضافة 0.5% زيت البابونج، T4= إضافة 0.5% زيت الزنجبيل

شكل(26) الكمية النسبية للتعبير الجيني لجين (IL-10) Interleukin10

كما يتضـــح من الشـــكل (27) مســـتوى التعبير الجيني لجين (TNFα) لمعاملات التجربة، إذ حققت معاملة النعناع (T2) ارتفاعاً معنوياً ($P\leq0.05$) في مســـتوى التعبير الجيني قياســـاً بمعاملتي الســـيطرة (T1) والبابونج(T3)، في حين لم تحقق فرقاً معنوياً مع معاملة الزنجبيل (T4)، كما ان مســـتوى التعبير الجيني في معاملة الزنجبيل (T4) حقق ارتفاعاً معنوياً ($P\leq0.05$) قياســـاً بمعاملتي السيطرة (T1) والبابونج (T3)، فيما لم توجد فروق معنوية في مستوى التعبير الجيني لجين (TNFα) بين معاملتي البابونج (T3) والسيطرة (T1).



* T1= بدون إضافات، T2= إضافة 0.5% زيت النعناع، T3= إضافة 0.5% زيت البابونج، T4= إضافة 0.5% زيت الزنجبيل

شكل(27) الكمية النسبية للتعبير الجيني لجين
Tumor necrosis factor alpha (TNFα)

تطابقت نتائج معاملة النعناع(T2) إلى حدٍ ما مع نتائج دراســـة Gustavo وآخرون (2017) ودراســة Abdelhamid وآخرون (2007) الذين اســتخدموا النعناع في تجاربهم إذ دلت بعض معايير الدم ذات الدلالة المناعية(البروتين الكلي،ALP ،ALT ،AST) على تفوقها في معاملات النعناع

قياســـاً بمجموعة الســـيطرة. وقد تعود فعالية زيت النعناع إلى محتواه على نســـبة كبيرة من مركب المنثول (menthol) الذي يعمل على تنشـــيط الدورة الدموية وتقوية مناعة الجســـم ضـــد الأمراض (Mohaddese وآخرون،2008).

كما تطابقت نتائج معاملة البابونج (T3) الحالية إلى حدٍ ما مع نتائج دراســة Mohammadi وآخرون (2020) الذي وجد بعض معايير الدم ذات الدلالة المناعية (البروتين الكلي،ALP،ALT ،AST) مرتفعة في معاملة البابونج مما يدل على القوة المناعية للبابونج. وقد يعود تفوق البابونج في بعض معايير الدم المناعية إلى احتوائه على مركبات الفلافونويد والكومارين التي لها القدرة على رفع مناعة الجسم وتكوين مواد مضـادة للبكتيريا وغيرها من المسـببات المرضـية (McKay و Blumberg ،2006). أما نتائج معاملة الزنجبيل فقد تطابقت مع نتائج دراســة Fazelan وآخرون (2020) التي استخدمت مستخلص الزنجبيل بمستويين 5 و 10 غم/ كغم $^{-1}$ في علائق أسماك الكارب الشائع وكان أعلى مســـتوى للتعبير الجيني في الجينات TNFα, IL-8, IL-1β في معاملتي الزنجبيل قياســـاً بمعاملة الســيطرة، في حين لم يحقق جين IL-10 تفوقاً في معاملة الزنجبيل قياســاً بمعاملة الســيطرة. ولم تتطابق النتائج أعلاه مع نتائج دراســة Ehsan وآخرون (2019) الذي اســتعمل ثلاثة مســتويات من الزنجبيل 1, 2, 3 % في علائق أســماك الزرد البالغة *Danio rerio*، إذ وجد انخفاضــاً معنويا ($p\leq0.05$) في التعبير الجيني للجينات TNFα, IL-8, IL-1β في معاملات الزنجبيل قياساً بالتعبير الجيني لمعاملة الســيطرة. كما لم تتطابق النتائج مع نتائج دراســة Sukumaran وآخرون (2016) الذي لاحظ انخفاضاً معنوياً للتعبير الجيني في الجينات TNFα, IL-1β في راس الكلى في أسماك الرهو *Labeo rohita* عند اســتخدام مســحوق الزنجبيل بعدة مســتويات، فيما وجد ان أعلى مســتوى للتعبير الجيني لجين IL-10 قياساً بمعاملة السيطرة عند استخدام الزنجبيل بنسبة 0.8 %.

الفصل الخامس

5. الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations

1.5: الاستنتاجات: Conclusions

1- إن استخدام الزيوت لنباتات (النعناع، البابونج، الزنجبيل) أثرت بشكل إيجابي في اسماك الكارب الشائع من خلال ارتفاع بعض المعايير الانتاجية والمناعية والتعبير الجيني لبعض الجينات المرتبطة بالمناعة. إذ تفوقت معاملة زيت البابونج على بقية المعاملات في المعايير الإنتاجية (الزيادة الوزنية، معامل التحويل الغذائي، كفاءة التحويل الغذائي، معدل النمو اليومي والنوعي).

2- حققت معاملات زيوت(النعناع،البابونج، الزنجبيل) تفوقا ملحوظاً على معاملة السيطرة في بعض معايير الدم المناعية AST،ALT،ALP,TP .

3- فيما حققت معاملة زيت النعناع تفوقاً واضحاً في مقاومة العدوى التجريبية ضد بكتيريا *Aeromonas hydrophila* .

4- تفوق معاملات زيوت(النعناع،البابونج، الزنجبيل) في مستوى التعبير التعبير الجيني للجينات المرتبطة بالمناعة (IL-1β ,IL-8, IL-10, TNFα).

5- إن العوامل البيئية درجة الحرارة، الاوكسجين المذاب(DO)، الملوحة، الاس الهيدروجيني pH، سرعة التيار كانت مناسبة لتربية الأسماك في الاقفاص العائمة.

2.5: التوصيات: Recommendations

1- امكانية اســـتخدام الزيوت النباتية بدائلاً ناجحة للوقاية من بعض الأمراض فضـــلا عن فوائدها الإنتاجية.

2- تكثيف الدراسات والبحوث التطبيقية حول استخدام النباتات الطبية في مجال تربية الأسماك.

3- نوصـــي باســـتخدام احد زيوت (النعناع، البابونج، الزنجبيل) في علائق الأســـماك من قبل مربي الأسماك عن طريق خلطها بنسبة 0.5% اذ تعد بديلاً ناجحاً عن استخدام المضادات الحيوية.

4- نوصـــي بدراســـة تأثير خلط الانواع الثلاثة من زيوت (النعناع، البابونج ،الزنجبيل) بنســـب معينة للحصول على أفضل النتائج.

5- نوصـــي بإجراء الدراســـات والبحوث التطبيقية حول فعالية(النعناع، البابونج ،الزنجبيل) في دعم مقاومة الأسماك لأنواع أخرى من البكتيريا .

6- نوصي بإجراء المزيد من الدراسات لدراسة تأثير النباتات الطبية المحلية في مستوى التعبير الجيني للجينات ذات الصلة المناعية في الأسماك لأنها قليلة في هذا المجال.

الفصل السادس

6. المصادر: References

1.6: المصادر الاجنبية:

Abayomi ,S. ;Eyitope, O. ; Adedeji O.(2013). The role and place of medicinal plants in the strategies for diseas prevention .Afr J Tradit complement altern med. 10(5):210-229.

Abbas, L. M.; Abdulkareem J. Abu-Elhine; Aseel G. Radhy ; Hassan A. Hassan (2017). Evaluating the Fish Structure Community at Euphrates River near Al-Hindyah Barrier, Babylon Province/ Iraq. Journal Tikrit Univ. for Agri. Sci., Vol.(17) No.(Special).

Abdel-Tawab, A. M.(2010). Evaluation of usig garlic and chamomile oils as feed additives in diets of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fry. African J. Biol. Sci., 6 (1): 73-82.

Abdelhamid, A.M.; M.F.I. Salem; A.I. Mehrim; M.A.M. El-Sharawy (2007). Nutritious Attempts To Detoxify Aflatoxic Diets Of Tilapia Fish Performance, Feed And Nutrients Utilization, Organs Indices, Residues And Blood Parameters. Egyptian J. Nutrition And Feeds,10 (1): 205-223.

Abdelhadi, Y. M.; Khairie, I.; Safuan, M. (2012)."Chamomile; *Matricaria chamomilla*; The magic herb in aquaculture". World Aquaculture Society.

Abdelhadi, Y.M.; Osama, A. Saleh And Saleh, F. Sakr (2010). Study on the effect of wormseed plant ,*Artemisia cina* L and chamomile, *matricaria chamomilla* l ,on growth parameters and immune response of african catfish,clarias gariepinus.journal fisheries internstional. 5(1):1-7.

Abdulmotalib, J. Al-Rudainy and Abdulhussien, K. Salman(2013). Effect of ozonated water on the blood picture of the common carp *Cyprinus carpio* infected with *Aeromonas hydrophila*. Iraqi Veterinary Medical Journal.(2)37:71-78 .

Adem, Y. S.; Soner, B.; Gonca, A.; Olcay, H.; Talat, Y.G . (2015). Growth performance and antioxidant enzyme activities in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* juveniles fed diets supplemented with sage, mint and thyme oils .BiswasFish Physiol Biochem, Turkey . 41:165-175.

Adel, M. ; Amiri, A.; Zorriehzahra, J.; Nematolahi, A.; Esteban, M. (2015). Effects of dietary peppermint *Mentha piperita* on growth performance, chemical body composition and hematological and immune parameters of fry Caspian white fish *Rutilus frisii kutum*. Fish & Shellfish Immunology, 45(2): 841-847.

Adel, M.; Reza, S.; Reza, P.; Jalil, Zorriehzahra; Maria, Angeles Esteban(2015). Dietary peppermint *Mentha piperita* extracts promote growth performance and increase the main humoral immune parameters

(both at mucosal and systemic level) of Caspian brown trout *Salmo trutta caspius Kessler*, 1877. Fish & Shellfish Immunology 47 : 623-629.

Adel, M.; Reza, P.; Jalil, Zorriehzahra; Maryam, Ghiasi (2016). 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. Fish & Shellfish Immunology. 55: 267–273.

Abdel, R. ,A. ; Abdel, Rahmana; Alshimaa A.; Khalila, H.M.; Abdallahb, Mohamed (2018). The effects of the dietary supplementation of Echinacea purpurea extract and/or vitamin C on the intestinal histomorphology, phagocytic activity, and gene expression of the Nile tilapia. Fish and Shellfish Immunology (82): 312–318.

Ahilan, B.; Jegan, K.; Felix,N.; Ravaneswaran,K. (2008). Influence Of Botanical Additives On The Growth And Colouration Of Adult Goldfish , *Carassius auratus* (Linnaeus Tamil Nadu) J. Veterinary & Animal Sciences 4 (4): 129-134.

Akira,S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O.(2006). Pathogen recognition and innate immunity, Cell .vol 124 :783–801.

Al-Hamid, Mahmoud. Ibrahim (1960). Carp culture in Iraq, Iraqi Journal of Agricultural Research. (1) 3: 14-23.

Al-Hussaniy, Qusay. Fadl(2019). Climate change and its impact on the phenomenon of desertification in Iraq. Journal of the College of Basic Education for Educational Sciences and Statistics / University of Babylon.(43).

Al-Nimma , B.A.(1982) . Study on the limnology Tigris and Euphrates rivers. M.Sc . Thesis . Univ . Salahaddyn , Iraq .

Al-Niaeem, K. S.; Nasreen, M.A.; Abdulrahman, Raaed S. Attee.(2019). Using of Anise *Pimpinella anisum* and Chamomile *Matricaria chamomilla* powders for common carp *Cyprinus carpio* L. anesthesia. Biological and applied environmental research.3(2): 111-117.

Alsaphar ,S. A. and Al-Faragi, Jamal. K.(2012). Detection and study of the experimental infection of *Aeromonas* strain in the common carp *Cyprinus carpio L.* The Iraqi J. Vet. Med. 36 (2):222- 230.

Ana, S. P. and Antonio, O. N.(2014). The anaesthetic effect of camphor *Cinnamomum camphora*, clove *Syzygium aromaticum* and mint *Mentha arvensis* essential oils on clown anemonefish, Amphiprion ocellaris (Cuvier 1830) Aquaculture Research.1:8.

Anthony, c.(1999). composition with plant additives and treatment method for reducing stress levels in fish. Rolf C. Hagen, Inc., Montreal, Canada. 08: 397 - 407.

AOAD."**Arab Organization For Agricultural Development** "(**2017**). A study on fish diseases in the Arab world:1-201.

AOAD."**Arab Organization For Agricultural Development**".(**2017**). Food Security Situation Report. 3:4. Apines-Amar, M.J.S.; Amar, E.C.; Faisan, J.P.Jr.; Pakingking, R.V.J,.

Apines,**A**. ; **Mary**,**S**; **Amar**,**Edgar C**.;**Faisan**,**P**.; **Pakingking**,**V**.;**Satoh**, **S**. (**2012**). Dietary onion and ginger enhance growth, hemato immunological responses, and disease resistance in brown-marbled grouper, Epinephelus fuscoguttatus. Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislatio (4) ,5:231-239.

Ashley, **P**.**J**. (**2007**).Fish Welfare: Current Issues In Aquaculture. Applied Animal Behaviour Science, Fish Behavior And Welfare, 104: 199–235.

Awad ,**E**. **and Amani**, **A**.(**2017**). Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. Fish & Shellfish Immunology. 67 : 40-54.

Banskota, **A**.**H**.; **Tezuka**, **Y**.; **Le Tran**, **Q**.; **Kadota**, **S**. (**2003**). Chemical Constituents and Biological Activities of Vietnamese Medicinal Plants. Current Topics In Medicinal Chemistry, 3: 227–248.

Bartlett, **J**. **M**.; **and Stirling**, **D**.(**2003**). A short history of the polymerase chain reaction. Methods in Molecular Biology. 226:3-6.

Batra, P.; Mathur, P.; Misra, M.C.(2016). *Aeromonas spp.*: an emerging nosocomial pathogen.J. Lab. Phys. 8: 1–4.

Bergljót, M.(2006). Innate immunity of fish (overview), Fish Shellfish Immunol. 20:137-151.

Bird, S. and Tafalla, C.(2015). Teleost chemokines and their receptors. Biology , 4: 756–784.

Bird, S.;Wang, T.; Zou, J.; Cunningham, C.; Secombes, C.J.(2002). The first cytokine sequence within cartilaginousfish: IL-1 in the small spotted catshark *Scyliorhinus canicula*. J. Immunol, 168: 3329–3340.

Bo,Y.X.; Song, X.H.;Wu, K.; Hu, B.; Sun, B.Y.; Liu, Z.J.; Fu, J.G(2015). Characterization of interleukin-1beta as a proinflammatory cytokine in grass carp *Ctenopharyngodon idella*.Fish Shellfish Immunol,46:584–595.

Bondad-Reantaso,M.G.; Subasinghe, R.P.; Arthur, J.R. (2005). Disease and Health Management in Asian Aquaculture. From Science to Solutions, Plenary Lectures Presented at the 20th Conference of The World Association for The Advancement of Veterinary Parasitology.132: 249–272.

Brasier, J. C.; Duan, W; Shen, Q; Garofalo, A.(1998). promoter recruitment mechanism for tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 transcription in type II pulmonary epithelial cells, dependence on nuclear

abundance of Rel A, NF-kappaB1, and c-Rel transcription factors. J Biol Chem. 61: 273-355.

Brian,Dixon.; George,H.; Shawna, L.S(2016). The Immune System of Bony Fish. Encyclopedia of Immunobiology. 1: 481-485.

Brown, M.E. (1957). Experimental studies on growth .In: Fish physiology, M.E. Brown (ed.) New York, N.Y. Academic press, 1: 361-400.

Brum, A.; Pereira, S.; Cardoso, L.; Chagas, E.; Chaves, F.; Maia, Mouriño J.; Martins,M.(2018). Blood biochemical parameters and melanomacrophage centers in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger. Fish and Shellfish Immunology. (74):444-449.

Bustin,S.; Benes, V.; Garson,J.; Hellemans,J.; Huggett, J.; Kubista, M.(2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin. Chem. 55: 611–622.

Chakraborty, S.B. and Hancz, C.(2011). Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and anti-stress agents in finfish culture.Rev. Aquac. 3, 103–119.

Chakrabarti, Rina; Praveen Kumar S.; Nandini, V.; JaiGopal S.(2014). Effect of seeds of Achyranthes aspera on the immune responses and expression of some immune-related genes in carp *Catla catla*. Fish & Shellfish Immunology (41) : 64-69.

Chang, .J. (2000). Medicinal Herbs: Drugs or Dietary Supplements. Biochem. Pharmacol. 59: 211-219.

Chao,T. and Miao,L.(2020). Transcriptomic signature of rapidly evolving immune genes in a highland fish. Fish and Shellfish Immunology 97 : 587–592.

Chu.Y.; Wang,C.M.; J.C.Park; F.Lader (2020). Review of Cage and Containment Tank Designs for Offshore Fish Farming Aquaculture.319(30):1-35.

Chuntao, Y.; Xuping, P.; Yi, G.; Aijun, X.; Guanghong, W.; Jianqing T.; Xiaodong, H.(2008). Effects of Astragalus polysaccharides (APS) on the expression of immune response genes in head kidney, gill and spleen of the common carp, *Cyprinus carpio* L. International Immunopharmacology (8): 51–58.

Clough, E. and Barrett, T. (2016). "The Gene Expression Omnibus Database". Methods in Molecular Biology. 1418: 93–110.

Dembic, Z.; Loetscher, H.; Gubler, U.; Pan, Y.; Lahm, H.; Gentz, R.(1990) Two human TNFα receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequences. Cytokines. 2:231.

Dimitry, A. Chistiakov and Natalia, V. Voronova (2009). Genetic evolution and diversity of common carp *Cyprinus carpio* L.Cent.Eur.J.Biol4(3):304–312.

Dunhua, Zhang.;De-Hai, Xu; Craig, A.; Shoemaker, Benjamin, H. Beck.(2020). The severity of motile *Aeromonas septicemia* caused by virulent *Aeromonas hydrophila* in channel catfish is influenced by nutrients and microbes in water. Aquaculture 519 : 734898.

Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F test. Biometrics,1: 1-42.

Edgar, R.; Domrachev, M.; Lash, AE. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. Nucleic Acids Res 30(1):207-210.

Ehsan, A.; Najmeh, Sh.; Kambiz, R.; Narges, D.; Caterina F. (2019). Can dietary ginger *Zingiber officinale* alter biochemical and immunological parameters and gene expression related to growth, immunity and antioxidant system in zebrafish (*Danio rerio*). Aquaculture. vol.507:341-348.

El Gamal, A. R. (2001). Status and development trends of aquaculture in the Near East. In:Aquaculture in the Third Millennium. Subhasinghe, R.P.; Bueno, P.; Phillips, M. J.; Hough,C.; McGladdery, S.E. and Arthur, J.R. (Eds.): 357-376. Technical proceedings of the Conference on

aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand, 20-25 Feb 2000, NACA, Bangkok and FAO, Rome.

Elenise, G. O.; Alberto, B.P.; Valdemir, Q.O; Antônio, R.M.; Jůnior,M. G.; Castelo, B. R.; Rommel, R.; Francisco, H. (2012). Effects of stocking density on the performance of juvenile pirarucu *Arapaima gigas* in cages. Aquaculture 370-371 :96–101.

Emir, Ç. O. (2013). Effect of Ginger oil on the sensory and chemical changes of fish finger *Sarda sarda,* Heckel 1843 during refrigerated storage. International Food Research Journal 20(4): 1575-1578.

Erkan, C.; Volkan, K.; Esin, O.; Şafak, S.(2017). The Efficacy of Chamomile *Matricaria chamomilla* Oil as a Promising Anaesthetic Agent for Two Freshwater Aquarium Fish Species. Journal of Aquaculture. 6:,1-8.

FAO. The State Of World Fisheries And Aquaculture.(2018). Food And Agriculture Organization .2-4.

Fazelan, Z.; Yury, A.; Evgeny, V.; Vadim, G.; Morteza, Y. (2020). Effects of dietary ginger *Zingiber officinale* administration on growth performance and stress, immunological, and antioxidant responses of common carp *Cyprinus carpio* reared under high stocking density. J.Aquaculture. (518)، 15: 734833.

Fernandez,E. and Lolis, E.(2002). Structure, function and inhibition of chemokines. Annual Review of Pharmacology and Toxicology.42:469–499.

FIGIS "Fisheries Global Information System.(2013). (FAO-FIGIS) - Web site. Fisheries Global Information System (FIGIS). FI Institutional Websites.

Friedman, L.(2015). Approach to the patient with abnormal liver biochemical and function tests. https://www.uptodate.com/contents/search. Accessed June 30.

Gao, L.; He, X.; Liu, H.; Su, X.; Gao, Y.; Li, W. L. (2012). The innate immune-related genes in catfish, Int. J. Mol. Sci. 13 :14172–14202.

Gao, Y.; Chang, M.X.; Sun, B.J.; Nie, P.(2008). Trail in the mandarin fish Siniperca chuatsi: gene and its apoptotic effect in HeLa cells. Fish Shellfish Immunol. 24:55–66.

Ghazi, M.; Al-Maleky, Rajaa ; A. Haneff.(2013). Survey of *Aeromonas hydrophila* in three marine fish species from north west Arabian Gulf , Iraq. Journal Of Thi-Qar Science.(3)4:3-8.

Goetz, F.; Planas, J.; MacKenzie, S.(2004). Tumor necrosis factors. Dev Comp Immunol. 28:487-97.

Govindarajan,V.(1982). Ginger-chemistry technology and quality evaluation: Part-I CRC. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 17:1-96.

Grayfer, L.;Hodgkinson, J.W.; Hitchen, S.J.; Belosevic, M.(2011). Characterization and functional analysis of goldfish *Carassius auratus* L. interleukin-10. Mol. Immunol., 48:563–571.

Grzanna, R.; Lindmark, L.; Frondoza, C.G.(2005) Ginger – herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. Journal of Medicinal Food 8: 125–132.

Gugnani,H.C. and Ezenwanze, E.C.(1985). Antibacterial activity of extract of ginger *Zingiber officinale* and African oil bean seed *Pentaclethora macrophylla* .J.commun Dis .17:p233.

Gustavo, M.R.Valladao; Sılvia, U.Gallani; Gabriela, Pala; Raphael, B. Jesus; Suzana, Kotzent ; Jaqueline, C. Costa ; Thiago, F. A. Silva; Fabiana, Pilarski. (2017). Practical diets with essential oils of plants activate the complement system and alter the intestinal morphology of Nile tilapia. WILEY. Aquaculture Research.13386. 1-10.

Ghelichpour, M.; Ali, Taheri. M.; Seyed, H.; Mohsen, K.; Morteza, Y.; Hien, V.; Amalia, P.(2019). Expression of immune, antioxidant and stress related genes in different organs of common carp exposed to indoxacarb. Aquatic Toxicology 208 :208–216.

Hajibeglou, A. and Sudagar, M.(2010). Immune Response Of Common Carp *Cyprinus Carpio* fed with herbal Immunostimulants Diets. J. Animal and Veterinary Advances 9(13):1839-1847.

Hasan, M.R.; Hecht,T.;De Silva, S. S. and Tacon, A. G. J.(2007). Study and analysis of feeds and fertilizers for sustainable aquaculture development. FAO Fisheries Technical Paper, 497. Rome

Hassanin, M. El-Sayed; Hakim,Y. ;Badawi, M. El-Sayed.(2014). Dietry Effect of Ginger *Zingiber Officinale Roscoe* on Growth Performance, Immune Response of Nile Tilapia *Oreochromis Niloticus* and Disease Resistance Against *Aeromonas Hydrophila*.Abbassa Int.J. Aquaculture 7(1):35-52.

Hassouna, M .A. (2008). Evaluation of some medicinal plants on productive performance of Nile Tilapia fry. M. SC Thesis, Faculty of agriculture, El-fayoum Univ., Egypt. African J. Biol. Sci., 6 (1): 73-82.

Higuchi, R.;Dollinger, G.; Walsh,P.S., and Griffith,R.(1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology 10: 413-417.

Hosna, G. K. ; Zahra N. ; Shapour, K. ; Hojatollah, J.(2014). Effect of ginger- and garlic-supplemented diet on growth performance, some

hematological parameters and immune responses in juvenile *Huso huso*. Fish Physiol Biochem ,40:481–490.

HU, X.; T.Ying, L.; Fenghui, L.; Yushuang, Y.; Pinhong, W. Wenbin (2017). The effect of *Aeromonas hydrophila* infection on the non-specific immunity of blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* Cent. Eur. J. Immunol. 42 : 239–243.

Hussein, M.S. and Khan, Y.S.A. (2000) . An environmental assessment of metals accumulation in the Karnafully estuary Bangladesh. , 115-177. Cited in final report for APN project – Ref Nos: 2001 – 20and 20020-05- (April 2001 – February 2004).

Husian, T. S.; Abdulkareem, J.; Abulheni, Abdul-Zahra J. K.; Saleh M. H., Shaimaa M., Ashwaq M. (2017). Growth Description Of Blue Tilapia Fish *Oreochromis aureus* (Steindachner, 1864) In Euphrates River/Al-Hindia Barrier. Tikrit University Journal For Agricultural Sciences – A Special Issue of The Proceedings of The Sixth Scientific Conference of Agricultural Sciences.28-29 March.

Iffat, J.; Tiwari, V.K.; Verma, A.K.; Pavan-Kumar, A. (2019). Effect of different salinities on breeding and larval development of Common carp,*Cyprinus carpio* in Inland saline groundwater.Aquaculture. 518, .734658.

Ji, J.; Lu, C.; Kang, Y.; Wang, G.X. And Chen, P. (2012). Screening Of 42 Medicinal Plants For In Vivo Anthelmintic Activity Against Dactylogyrus Intermedius (Monogenea) In Goldfish *carassius auratus*. Parasitology Research, 111: 97–104.

Jiajie, Z.; Min, W; Quanhe, wang; Qiuwei, Aoa; Yun, Tana; Yongju, Luoa; Hui, Wang; Hesheng Jianga; Qiaomu, Huc.(2019). Characterization and expression of galectin-3 after Streptococcus *agalactiae* and *Aeromonas hydrophila* challenge in GIFT strain Nile tilapia *Oreochromis niloticus.* Fish & Shellfish Immunology (86): 974-980.

Juriaan, R. M.; Mark, O.; Huising, Karin; Leon, B.; M Lidy Verburg-van Kemenade and Gert, Flik (2006). Central and peripheral interleukin-1b and interleukin-1 receptor I expression and their role in the acute stress response of common carp, *Cyprinus carpio* L. Journal of Endocrinology 191: 25–35.

Johansen, M. J.; Gade, J.; Stender, S.; Frithioff-Bøjsøe, C.; Lund, M. A. V.; Chabanova, E.; Holm, J.-C. (2019). The effect of overweight and obesity on liver biochemical markers in children and adolescents. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. Vol 105, Issue 2:430–442.

Kamondo, Friday N.; Christopher, A., Amon P.; Natugonza, A.; Richard, O. (2019). The extent of cage aquaculture, adherence to best practices and reflections for sustainable aquaculture on African inland water. Journal of Great Lakes Research. 45. 6: 1340-1347.

Kassam, L. (2011). FAO fisheries and aquaculture technical paper 563 FAO Consultant London,United Kingdom of great Britain and Northern Ireland.

Keifer,D.Md; C.Ulbricht; P. Rae .Abrams; P.D.Ethan Basch; M.D.N. Giese; M.S.M. Giles(2007). Peppermint *Mentha Piperita* An Evidence-Based Systematic Review By The Natural Standard Research Collaboration, J. Herb. Pharmacother.7: 91-143.

Khamees, E. S.; Abdulmotalib, Al-Rudainy and Enaam, B. Faleh (2013). Study of Histopathological Changes in the Common Carp *Cyprinus carpio* Experimentally Infected by Bacteria *Aeromonas hydrophila*. Basrah J. Agric. Sci. 26 (Special Issue 2).

Kim, J.K.; Kim, Y.; Na, K.M.; Surh, Y.J. and Kim, T.Y. (2007) Gingerol prevents UVB- induced ROS production and COX-2 expression in vitro and in vivo. Free Radical Research .41: 603-614.

Klosterhoff, M.C.; Pereira Junior, J.; Rodrigues, R.V.(2015). Ontogenic development of kidney, thymus and spleen and phenotypic expression of

CD3 and CD4 receptors on the lymphocytes of cobia *Rachycentron canadum*. Anais da Academia Brasileira de Ciências 87: 2111–2121.

Kralik, P. and Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. Front. Microbiol. 8:108. doi: 10.3389/fmicb.2017.00108 .

Lawrence, L.(1991). Anonymous chamomile In Dombekc, Review of Natural products". St. Louis: Facts and Comparisons.200pp.

Leyciane, T. d.; Souza S.; Ulisses P.; Hugo M.; Elenice M.; Scheila, A. P; Edsandra;Gabriel,F.;Alves,J.;LucasC.;JoséLuizP.Maurício,L.(2019). Hemato-immunological and zootechnical parameters of Nile tilapia fed essential oil of Mentha piperita after challenge with *Streptococcus agalactiae*. Aquaculture 506: 205–211.

Liu, W. and D.A. Saint (2002). A new quantitative method of real time reverse transcrip-tion polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reac-tion kinetics. Anal. Biochem. 302: 52 – 59.

Ljiljana, P. Stanojevic; Zeljka, R. Marjanovic-Balaban; Vesna, D. Kalaba; Jelena, S.Stanojevic; Dragan, J.Cvetkovic (2016). Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Chamomile Flowers

Essential Oil *Matricaria chamomilla* L. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 19(8): 2017-2028.

Livak ,K.J.and Schmittgen,T.D .(2001). Analysis of relative gene expression datd using real –time quantitative PCR and the2 (-Delta DeltaCT) Method .Methods. 25,pp: 402 -410.

Lovkova, M.; Buzuk, G.N.; Sokolova, S.M. &Klimentova, N. I. (2001). Chemical features of medicinal plants (areview) Appl. Biochem. Microbial.37:229-237.

Lutfalla, G.; Roest Crollius, H.; Stange-Thomann, N.; Jaillon, O.; Mogensen, K.;Monneron,D.(2003). Comparative genomic analysis reveals independent expansion of a lineage-specific gene family in vertebrates: The class II cytokine receptors and their ligands in mammals and fish. BMC Genomics .4-29.

Lv-yunZhu, Li.Nie; GuanZhu; Li-xin, Xiang; J ian-zhong, Shao (2013). Advances in research of fish immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. Developmental & Comparative Immunology. (39). 1-2: 39-62.

Maqboul, M. A. and M. M. Al-Sakit. (1995). Chemical of Medicinal Plants. Arabic Center for Student Services. Amman. Jordan. P. 22-44.

Maqsood, S.; Singh, P.; Samoon, M.; Munir, K. (2011). Emerging role of immunostimulants in combating the disease outbreak in aquaculture. International Aquatic Research; 3:147-163.

Maria, del.; Carmen, Romeroa; Adela, Valeroa; Joaquina, Martin-Sancheza;Maria,Concepcion;Navarro-Mollb(2012). Activity of *Matricaria chamomilla* essential oil against anisakiasis.J.Phytomedicine.19:520–523.

Masoud, H. and Mostafa, Sh. R. (2013). The effects of powdered ginger *Zingiber officinale* on the haematological and immunological parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*.J.Med.Plant Herbal Ther.Res,1:8-12.

Mackereth, J. H.; Heron, J.; and Talling, J. F. (1978). Water analysis: Somerevised methods limnologisis, Scientific Publication Freshwater Biological Association (England), 36: 1-120.

Maureen, K.Purcella; Gael, Kurathb; Kyle, A.; Garverc, Russell P. Herwiga; James, R.(2004). Winton Quantitative expression profiling of immune response genes in rainbow trout following infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) infection or DNA vaccination Fish & Shellfish Immunology 17 : 447-462.

Mckay, D.L.; Blumberg, J.B. (2006). A Review of The Bioactivity and Potential Health Benefits of Peppermint Tea *Mentha Piperita* L., Phytother. Res. 20: 619-633.

Melo, D.C.; D.A. Oliveira; M.M. Melo; D.V. Junior; E.A. Teixeira; S.R. Guimarães (2009). Proteic electrophoretic profile of chitralada tilapia nilotic *Oreochromis niloticus*, exposed to hypoxia chronic stress, Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61(5): 1183-1190.

Mimica-Dukic, N.; Bozin, B.; Sokovic, M.; Mihajlovic, B.; Matavulj, M.; (2003). Antimicrobial and antioxidant activities of three Mentha species essential oils. Planta Med. 69:413-419.

Mishra, S. S.; Das, R.; Sahoo, S. N.; Swain, P. (2020). Biotechnological tools in diagnosis and control of emerging fish and shellfish diseases. Genomics and Biotechnological Advances in Veterinary, Poultry, and Fisheries. 311-360.

Ming, C.; W. Rui; L. Liping; T. Huang; H. Weiyi; L. Jian; L. Chao; L. Aiying; L. Honglin; L. Wanwen (2013). Sequence and evolution differences of *Oreochromis niloticus* CXC contribute to the diversification of cellular immune responses in Tilapias with treatment of *Streptococcus* inane, J. Anim. Vet. Adv. 12 (3).

Mohaddese, M. and Nastaran, K. (2014). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Peppermint *Mentha Piperita* L. Essential Oil. Songklanakarin J. Sci. Technol. 36. (1): 83-87.

Mohaddese, M. and Ghasem, H. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L.essential oil.J.Ethnopharmacol.19: 325–327.

Mohamed, Ola Hasan. (2017). Effect of using peppermint extract on growth parameters, immune and health status of *Oreochromis niloticus*. Thesis (M.Sc.) – Cairo University. Faculty of Veterinary Medicine. Department of Fish diseases & management.

Mohammadi, G.; Rashidian, G.; Hoseinifar, S.; Naserabad, S.; Van Doan H. (2020). Ginger *Zingiber officinale* extract affects growth performance, body composition, haematology, serum and mucosal immune parameters in common carp *Cyprinus carpio*, Fish and Shellfish Immunology (99): 267-273.

Moretto, M.; Sonego, P.; Dierckxsens, N.; Brilli, M.; Bianco, L.; Ledezma-Tejeida, D.; Engelen,K.(2015). leveraging gene expression compendia for cross-species analyses. Nucleic Acids Research, 44(D1): D620–D623.

Mukaida, N.; Ketlinsky, SA.; Matsushima, K. (2003). Interleukin-8 and other CXC chemokines. In: Thomson AW, Lotze MT, editors. The cytokine handbook. 4. London: Academic Pres.: 1049–81.

Moustafa, E. M.; Mahmoud, A.O.; Dawood, Doaa; H. Assar, Amira A. Omar; Zizy, I.; Elbialy, Foad A.; Farrag, Mustafa Shukry; Mohamed M. Zayed. (2020). Modulatory effects of fenugreek seeds powder on the histopathology, oxidative status, and immune related gene expression in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* infected with *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture 515 :734589.

Nan, C.; Jingjing, J.; Xiaojian, G.; Xixi, L.; Yue, Z.; Xiaodan, L.; Hui, Y.; Xuwen, B.; Xiaojun, Z. (2018). Histopathological analysis and the immune related gene expression profiles of mandarin fish *Siniperca chuatsi* infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology 83: 410–415.

Napora, R.L.; Rakus,K.; Nowak, Z.; Szczygiel, J.; Pilarczyk, A.; Ostaszewska, and Irnazarow, I. (2017). Genetic Diversity of Common Carp *Cyprinus Carpio* L. Strains Breed In Poland Based On Microsatellite, Aflp, And Madan Genotype Data. Aquaculture, 473: 433-442.

Nemeez, G. (1998). Chamomile. US. Pharmacist. 115-116 pp .

Ning, F.; Gu, C.; You, X.; Cui, R. (2006). Pollution evaluation of net-cage aquiculture in Dahonghu reservoir. Environ. Sci. Technol.29(4):47–50.

Nya, E.J. and Austin, B. (2009). Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe, as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila*

infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases 32: 971–977.

Oliver, J.; Hasimuna, Sahya M.; Concillia, M.; Malawo, M. (2019). Cage aquaculture production in Zambia: Assessment of opportunities and challenges on Lake Kariba, Siavonga district. Egyptian Journal of Aquatic Research 45: 281–285.

Olusola, S.E.; Emikpe, B.O.; Olaifa, F.E.; (2013). The potentials of medicinal plants extract as bioantimicrobial in aquaculture. Int. J. Med. Arom. Plants 3:404–412.

Ordas, M.C.; Costa, M.M.; Roca, F.J.; Lopez-Castejon, G.; Mulero, V.; Meseguer, J.; Figueras, A.; Novoa, B. (2007). Turbot TNFalpha gene: molecular characterization and biological activity of the recombinant protein. Mol. Immunol.44:389–400.

Park, K.H. and Choi, S.H. (2012). The effect of mistletoe, Viscum album coloratum, extract on innate immune response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Fish and Shellfish Immunology. 32: 1016–1021.

Pavaraj, M.; Balasubram, V.; Baskaran, S. and 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.

Peteri, A. (2009). Cultured aquatic species information programme Cyprinus carpio.FAO fisheries and aquaculture department. www.fao.org /fishery/culturedspecies/ Cyprinus carpio /en.

Piazzon, M.C.; Savelkoul, H.S.; Pietretti, D.; Wiegertjes, G.F.; Forlenza, M. (2015). Carp IL10 has anti-inflammatory activities on phagocytes, promotes proliferation of memory T cells, and regulates B cell differentiation and antibody secretion. J. Immunol, 194: 187–199.

Pillay, T. V. and Kutty, M. N. (2005). Aquaculture: Principles and practices, 2nd edn. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, England, 624 p.

Pooley, N.J.; Tacchi, L.; Secombes, C.J.; Martin, S.A(2013). Inflammatory responses in primary muscle cell cultures in Atlantic salmon *Salmo salar*. BMC Genomics .14:747.

Press, C.M. and Evensen, O. (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. Fish Shellfish Immunol. 9: 309–318.

Putra, A.A.; Santoso, U.; Lee, M.C.; And Nan, F.H. (2013). Effects of Dietary Katuk Leaf Extract on Growth Performance, Feeding Behavior and Water Quality of Grouper Epinephelus Coioides. Aceh International Journal of Science and Technology. 2 (1): 17-25.

Qiang, J.; He, J.; Yang, H.; Xu, P.; Habte-Tsion, H.M.; Ma, X.Y.; Zhu, Z.X. (2016). The changes in cortisol and expression of immune genes of

GIFT tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) at different rearing densities under Streptococcus iniae infection.Aquaculture international 24 (5):1365–1378.

Rafael, B. G.; Weslley, F. O.; Diego, S. C.; Maria, T. S.Correia; Elba, V.M.; Maciel Carval;, Luana, C.; Breitenbach, B.Coelho. (2019). The genus *Aeromonas*: A general approach. Microbial Pathogenesis,130:81–94.

Rahanandeh, M.; Pour, A.; Mohsen, B. (2015). The Effect *Matricaria Chamomile* of Extract on Wound Healing Body of Gold Fish by Local and Therapeutic bath. National Congress on Medicinal Plants (4).12 .Tehran–Iran.

Ran, C.; Qin, C.; Xie, M.; Zhang, J.; Li, J.; Xie, Y.; Wang, Y.; Li, S.; Liu, L.; Fu, X.; Lin, Q.; Li N.; Liles, M.R.; Zhou, Z. (2018). *Aeromonas veronii* and aerolysin are important for the pathogenesis of motile aeromonad septicemia in cyprinid fish. Environ. Microbiol.20: 3442–3456.

Ravindra,B.; P.K. Pradhan; Anutosh, P.; Veena, P.; Dev, K.; P. Arya, G. Rathore; N. Sood (2019). Expression of immune genes in Indian major carp, *Catla catla* challenged with Flavobacterium columnare Fish and Shellfish Immunology 94: 599–606.

Reverter, M.; Bontemps, N.; Lecchini, D.; Banaigs, B. And Sasal, P. (2014). Use of Plant Extracts in Fish Aquaculture as An Alternative to

Chemotherapy: Current Status and Future Perspectives. Aquaculture, 433: 50–61.

Reverter, M.; Nathalie, T-B.; Pierre, S.; Denis, S. (2017). Use of Medicinal Plants in Aquaculture. Researchgate:244-246.

Rico, A.; Phu, T.M.; Satapornvanit, K. (2013). Use of Veterinary Medicines, Feed Additives and Probiotics in Four Major Internationally Traded Aquaculture Species Farmed in Asia.Aquaculture,412:231–243.

Ribeiro, S. C.; Antonielson, S.; Bruna, M.; Andreza, d.; Aldo A. (2016). Hematological responses of *tambaqui Colossoma* macropomum *Serrassalmidae* fed with diets supplemented with essential oil from *Mentha piperita Lamiaceae* and challenged with *Aeromonas hydrophila.* Acta Amazonica. 46(1): 99 – 106.

Roohi, Z. and Mohammad, Reza (2014). Effects of Spearmint (Carvon) Oil and Methyl Salicylate Oil Emulsion on Anesthesia of Common Carp *Cyprinus carpio* L. Aquaculture Research & Development. Iran. 5-2.

Rosario Castro; Carolina Tafalla(2015). Overview of fish immunity. Mucosal Health in Aquaculture :3-54.

Saeij, J.P.; Stet, R.J.; de Vries, B.J.; van Muiswinkel, W.B.; Wiegertjes, G. (2003). Molecular and functional characterization of carp TNF α: a link

between TNFα polymorphism and trypanotolerance. Dev. Comp. Immunol. 27, 29–41.

Sahoo, P.K. (2006). Immunocompetent organs in teleosts. In: Swain, P., Sahoo, P.K., Ayyappan, S. (Eds.), Fish and Shellfish Immunology. An Introduction. Delhi, Narendra Publishing House: 1–11.

Sambrook, J. and Russell, D.W.(2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd Ed. Chapter 6. Protocol 1: 6.9–6.11. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Saidah, F.; Muhammad, L.; Abdinasir, Y.; Ruhil, H.; Rumaizi, Mohd. M. and Rahman, A. (2017). The Effect of Matricaria Chamomilla L. On the Growth Performance of Red Hybrid Tilapia. Biomedical & Pharmacology Journal Vol. 10(4): 1905-1915.

Samanta, I. and Bandyopadhyay, S. (2020). *Aeromonas.* Antimicrobial Resistance in Agriculture, Elsevier. 293–298.

Santiago, F.Gonzalez; Kurt ,Buchmann; Michael, E. Nielsen (2007). Real-time gene expression analysis in carp *Cyprinus carpio* L. skin: Inflammatory responses caused by the ectoparasite *Ichthyophthirius multifiliis* Fish & Shellfish Immunology (22) :641-650.

Sattar, G. A. and Al-Faragi, Jamal. K. (2013). Effect of ginger *Zingiber officinale* and garlic *Allium sativum* to enhance health of common carp *Cyprinus carpio* L. The Iraqi Journal of Veterinary Medicine,37(1):59 – 62.

Savan, R. and Sakai, M.(2006). Genomics of fish cytokines. Comp. Biochem. Physiol., Part D: Genom. Proteom. 1: 89–101.

Scalbert, A.; Johnson, I.T.; Saltmarsh, M.(2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. American Journal of Clinical Nutrition . 81: 215–217.

Schmalhousen, L. (1926). Studien uber washtum and differenzierung III. Die embryonale wachsturmskurve des huhnchens. Wilhem roux. Arch entwic klungsmech. Ukrainische Akademie der Wissenschaf, pp:322-387.

Schulz, V. R. Hansel and V. E. Tyler. (1998). Rational phytotherapy: A physicians, Guide to herbal Medicine, 3rd ed. Be rlin, Germany: Springer – Verlag (Abstract): 256-266.

Secombes, C. J. and Wang, T. (2012). The innate and adaptive immune system of fish. Woodhead Publishing Limited :1-66.

Secombes, C.J.; Wang, T.; Bird, S. (2016). Vertebrate cytokines and their evolution. In The Evolution of the ImmuneSystem: Conservation and Diversification; Malagoli, D., Ed.; Academic Press Inc.: Cambridge, MA, USA, Chapter. 5: pp. 87–151.

Secombes, C.J.; Wang, T.H.; Bird, S. (2011). The interleukins of fish. Dev. Comp. Immunol., 35: 1336–1345.

Seyed, H.; Meysam, S.; Hien, V.; Shafigh, S.; Morteza, Y.; Mojtaba R.; Samira, Y.; Ramasamy, H. (2020). Reverter Dietary supplementation of lemon verbena *Aloysia citrodora* improved immunity, immune-related genes expression and antioxidant enzymes in rainbow trout *Oncorrhyncus mykiss*. Fish & Shellfish Immunology (99): 379-385.

Sharma, A.; Kumar, A.; and O.P. Virmani (1983). Cultivations of German chamomile a review. Curr Res Med Aromat Plants 5: 269–78.

Soltan, D.M.; Mazaheri, N.F.R.; Kavan, T.M.; Aghaiyan, L.; Salehipour, Z. (2016). Prevalence, virulence and antimicrobial resistance patterns of *Aeromonas spp*. isolated from children with diarrhea. Germs 6: 91–96.

Sun, J.; Zhong, X.; Liu, Y. Fu, J. (2005). Analysis of pollution status in lakes and reser-voirs caused by fish cage farming in Guizhou Province. Guizhou Environ. Prot.Sci. Technol. 11 (4): 30–37.

Sukumaran, V.; Park, S.C.; Giri, S.S.; (2016). Role of dietary ginger *Zingiber officinale* in improving growth performances and immune functions of *Labeo rohita* fingerlings. Fish Shellfish Immunol. 57:362-370.

Swain, B.; M. Basu And M. Samanta (2011). Cloning Of Interleukin-10 Gene In The Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton 1822) and its

functional characterization following *Aeromonas hydrophila* infection. Indian J. Fish., 58(4):39-47.

Takaoka, O.; Ji, S.C.; Ishimaru, K. (2011). Effect of rotifer enrichment with herbal extracts on growth and resistance of red sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel) larvae against Vibrio anguillarum. Aquaculture Research. 42: 1824–1829.

Talpur, A. D. (2014). Mentha piperita *Peppermint* as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch) against Vibrio Harvey infection. Aquaculture, 420: 71–78.

Talpur, A.D.; Ikhwanuddin, M. and Ambok B., A.M. (2013). Nutritional effects of ginger *Zingiber officinale Roscoe* on immune response of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) and disease resistance against Vibrio harveyi. Aquaculture, 400–401, 46–52.

Talling, J.F. (1980). Water characteristics in Euphrates and Tigris.In: J. RZOSKA (ed.), Mesopotamia ecology and destiny. 38.. Biol. London.

Tabatabaei, L. Moradi; Anousheh. S.; Kambiz, Larijani. (2016). Antimicrobial Activity of Lemon and Peppermint Essential oil in Edible Coating Containing Chitosan and Pectin on Rainbow Trout *Oncorhynchus*

mykiss FilletsJournal of Medical Microbiology and Infectious Diseases.3 (1-2): 38-43.

Thomas, L.; K. Buchmanna; C.J. Secombesb (2003). Gyrodactylus derjavini infection elicits IL-1_ expression in rainbow trout skin. Fish & Shellfish Immunology 15: 107–115.

Tonsy, H. D.; Samy, H.Mahmoud; Eman H.Labib and Mohamed A. Zaki (2011). Effect of some medicinal plants diets on the mono-sex Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* growth performance, feed utilization and some physiological parameters. Egypt J. Aquaculture. Biol.&Fish. (15).2: 53-72.

Uten, F. (1978). Standard methods and terminology in finfish nutritions from:proc. World symp on finfish nutrition and fish feed technology. Berlin, Hamburg,2 :20-23.

Valladao, G.M.; Gallani,S.U.; Ikefuti,C.V.; Cruz, C.; Levy-Pereira, N.; Rodrigues, M.V.N; Pilarski, F. (2016). Essential oils to control *ichthyophthiriasis* in pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg): Special emphasis on treatment with Melaleuca alternifolia. Journal of Fish Diseases, 39(10): 1143–1152.

Vojtech, L.N.; Scharping, N.;Woodson, J.C.; Hansen, J.D(2012). Roles of

inflammatory caspases during processing of zebrafish interleukin-1beta in Francisella noatunensis infection. Infect. Immun, 80: 2878–2885.

Wang, J.L; Meng, X-L; Lu, R-H; Wu, C.; Luo, Y.T. (2015). Effects of Rehmannia Glutinosa On Growth Performance, Immunological Parameters and Disease Resistance to *Aeromonas Hydrophila* In Common Carp *Cyprinus Carpio* L., Aquaculture 435 :293-300.

Ware, C.F. (2003). The TNFα superfamily. Cytokine Growth Factor Rev. 14: 181–184.

Weidner, M.S. and K. Sigwart, (2000). The Safety of a Ginger Extract in the Rat. J. Ethnopharmacol, 73 (3): 513–520.

Weiner, E.R. (2000). Application of Environmental Chemistry. Lewis Publishers, London.

Wu, C.C.; Liu, C.H.; Chang, Y.P. And Hsieh, S.L. (2010). Effects of Hot-Water Extract of Toona Sinensis On Immune Response and Resistance to *Aeromonas Hydrophila* In *Oreochromis Mossambicus*. Fish and Shellfish Immunology, 29: 258–263.

Xiaohong, T.; Zhenzhu, Sun; Zhong, Huang; Chuanpeng, Zhou; Heizhao Lin; Lianjie, Tan; Pengwei, Xun; Qian, Huang (2017). Effects of dietary hawthorn extract on growth performance, immune responses, growth- and immune-related genes expression of juvenile golden

pompano *Trachinotus ovatus* and its susceptibility to Vibrio harveyi infection. Fish & Shellfish Immunology. (70): 656-664.

Xu, J.; Ji, P.; Zhao, Z.; Zhang, Y.; Feng, J.; Wang, J.; Li, J.; Zhang, X.; Zhao, L.; Liu, G.; Xu, P.; Sun, X. (2012). Genome-wide SNP discovery from transcriptome of four common carp strains. Plops One 7: 48-140.

Yilmaz, S. (2019). Effects of dietary caffeic acid supplement on antioxidant, immunological and liver gene expression responses, and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* to *Aeromonas veronii*. Fish and Shellfish Immunology 86: 384–392.

Zaki, M.A.; Labib, E.M b; Nour, A.Ma; Tonsy , H. D. and S. H. (2012). Effect Some Medicinal Plants Diets on Mono Sex Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*, Growth Performance, Feed Utilization and Physiological Parameters. Elsevier B.V. Selection. 4: 220 – 227.

Zancan, K.C.; Marques, M.O.; Petenate, A.J. and Meireles, M.A. (2002). extraction of ginger *Zingiber officinale* Roscoe oleoresin with CO2 and co-solvents: a study of the anti-oxidant action of the extracts. J. Supercrit. Flu., 24: 47-76.

Zargaran, A.; Borhani-Haghighi, A.; Faridi, P.; Daneshamouz, S.; Kordafshari, G.; Mohagheghzadeh, A. (2014). Potential effect and mechanism of action of topical chamomile *Matricaria chammomila* L. oil

on migraine headache: A medical hypothesis. Medical hypotheses.83(5): 566-569.

Zhang, X. (2013). A consensus linkage map provides insights on genome character and evolution in common carp *Cyprinus carpio* L. Mar. Biotechnol. (15): 275–312.

Zhang, Z.B.; Swain, T.; Bogwald, J.; Dalmo, R.A.; Kumari, J. (2009). Bath immunostimulation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry induces enhancement of inflammatory cytokine transcripts, while repeated bath induces no changes. Fish Shellfish Immunol. 26: 677–684.

Zou, J.; Clarke, M.; Secombes, C.J. (2003). Characterisation, expression and promoter analysis of an interleukin 10 homologue in the puffer fish, Fugu rubripes. Immunogenetics 55: 325–335.

Zou, J.; Cunningham, C.; Secombes, C. (1999). The rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* interleukin-1 beta gene has a differ organization to mammals and undergoes incomplete splicing. Eur. J. Biochem, 259: 901–908.

Abstract

The present study was conducted to investigate the effect of the addition of three types of plant oils (mint, chamomile, and ginger) on productive and immune performance and the gene expression of some immune-related genes (IL-1β, IL-8, IL-10, TNFα) in common carp fish *Cyprinus carpio* L. in floating cages, 120 fishes were used at an average weight 250 ± 4 g, were randomly distributed over four treatments with three replicates, with 10 fish per replicate. The first is control group (T1) without additives, and the second treatment (T2), adding peppermint oil at (0.5%), the third treatment (T3), adding chamomile oil at (0.5%), and the fourth treatment (T4), adding ginger oil at (0.5%). Fish were fed on experimental diets by 5% of the weight divided into two meals per day .The experiment continued for 120 days with adaptation. The results of some environmental tests for the Euphrates River water were shown at the cage site during the experiment period. The water temperature was recorded from 16-32ºC, while the dissolved oxygen concentration ranged between 7.0 - 8.9 mg / L, while the water salinity was 1.67 -1.86 g / L, and the pH value ranged between 8.0 - 8.2, the flow velocity of water at the test site ranged between 17-20 cm / s. The results showed significant differences between the treatments ($p \leq 0.05$), the chamomile treatment (T3) and the mint treatment (T2) outperformed the rest of the treatments in the growth parameters as they

recorded the highest final weight increase rate, respectively, reaching 656 g and 609 g, and also recorded an increased rate the weight gain of respectively 405g and 358g. Also, they recorded the highest food conversion ratio (FCR), respectively, 3.0 and 3.14 gm / g weight gain, and the highest food conversion efficiency (FCE), respectively, were 33.36 and 31.82%. They also recorded the highest daily growth rate (DGR), respectively, of 3.62 and 3.20 g / day. It recorded the highest specific growth ratio (SGR), respectively, 0.86 and 0.79 .Also, the results of immunoassay parameters showed significant differences ($p \leq 0.05$) between the treatments, as the mint (T2) recorded the highest total protein (TP) rate of 4.04 mg / 100 ml, while the ginger (T4) treatment recorded the highest rate in alkaline phosphatase level (ALP) at 90.66 U/L, and chamomile treatment (T3) recorded the highest Alanine amino transferase level (ALT) at 14.66 U/L. The treatments of ginger (T3) and mint (T2) recorded the highest aspartate amino transferase level (AST), respectively, 93.33 and 92.33 U/L, and also showed the superiority of the mint treatment (T2) at challenging experimental infection with *Aeromonas hydrophila* as the infection rate (0%), while the infection rate in the control group (T1) reached 100%.

The results also showed that the treatment of mint achieved a significant increase ($p \leq 0.05$) in the level of gene expression of genes (IL-8, IL-10, TNFα) compared to the control group, and the treatment of chamomile achieved a

significant increase ($p \leq 0.05$) in gene expression level (IL-8, IL-10) While the treatment of chamomile not significantly ($p > 0.05$) in the level of gene expression of genes (IL-1β, TNFα) compared to the control group, whereas the treatment of ginger has achieved a significant difference ($p \leq 0.05$) in the level of gene expression of genes (IL-1β, IL -8, TNFα) compared to the control group, while not significantly affect ($p > 0.05$) in the level of gene expression (IL-10) compared to the control group.

The conclusion of this study is that the use of oils (mint, chamomile, and ginger) with a concentration of 0.5% in diets of common carp fish has improved productive and immune performance and raised the level of gene expression for some of the genes associated with immunity. It has been shown to be effective in fish challenging to infection with *Aeromonas hydrophila.*

Iraq Republic

Ministry of Higher Education and Scientific Research

Al-Muthanna University/ College of Agriculture

Animal Production Department

Effect of adding three types of Plant oils on the production performance and immune response and the gene expression of some genes associated with immunity in common carp fish *Cyprinus carpio* L. in floating cages

BY

Qasim Mohsen Sultan

Higher Diploma in Agricultural Sciences / Specialized Advising

A Thesis Submitted

To the Council of the Agriculture College/ for Al-Muthanna University in Partial Fulfillment of the Requirements the Degree of Master in Agriculturist Science/Animal Production

Supervised by

Prof. Dr.
Taha Yassen Al-Kafaji

Assist.Prof. Dr.
Nehad Ayal Mutar

2020 A.D

1442 H