



University of Guilan

University of Guilan with collaboration of Iranian
Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 6, No. 4, 2021, pages: 11-24



The effect of turmeric (*Curcuma longa*) on blood parameters and histopathological study of liver, kidney and intestine in juvenile Stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*)

Elham Gholian¹, Seyyed Mehdi Hosseinifard^{*2}, Shayan Ghobadi^{*1}, Reza Changizi¹, Hamed Manouchehri¹

1- Department of Aquaculture, Babol branch, Islamic Azad University, Babol, Mazandaran, Iran

2- Department of Veterinary, Babol branch, Islamic Azad University, Babol, Mazandaran, Iran

Received 30 April 2020

Accepted 31 August 2020

KEYWORDS

Kemin multi-enzyme

Carassius auratus

gibelio

Growth

Blood biochemical

factors

The aim of this study is to evaluate the effect of different levels of dietary turmeric on blood indices and histopathological examination of liver, kidney and intestine in juvenile Stellate sturgeon. So, 120 fish (45 ± 0.5 g in weight) were randomly distributed in 12 concrete tanks. The fish were fed with 4 experimental diets containing different levels including 0, 0.5, 1 and 2% of turmeric-added formulated diet. At the end of the experiment, blood indices and histopathological examination of liver, kidney and intestine were evaluated. Increased dose of turmeric (2%) elevated the hematocrit, hemoglobin, RBC, AST, ALT ($p < 0.05$). The results also showed that by elevated dose (2%) of turmeric, the amount of WBC and Alb did not exhibit significant differences between the treatments ($p > 0.05$). The results showed that the MCV, MCH and MCHC levels significantly decreased by upraising the dose of turmeric ($p < 0.05$). In histological examinations of liver, kidney and intestine, hepatocytes did not display any cellular disturbances. In addition, no specific histological alterations were observed in the intestine of all treatments. The comparison of mean lymphocytes, neutrophils, monocytes, and eosinophils in different treatments revealed that the number of lymphocytes and neutrophils upraised, while eosinophils dropped. Based on the results of this study, adding turmeric powder to the diet at the level of 2% is recommended.

*Corresponding author: sm_hossenifard@yahoo.com; shgh_science@yahoo.com



"مقاله پژوهشی"

اثر پودر زردچوبه (*Curcuma longa*) بر شاخص‌های خونی و بررسی هیستوپاتولوژیک کبد، کلیه و روده در ماهی ازون‌برون (*Acipenser stellatus*)

الهام قلیان^۱، سید مهدی حسینی فرد^{۲*}، شایان قبادی^{۱*}، رضا چنگیزی^۱، حامد منوچهری^۱

۱- گروه شیلات، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، مازندران

۲- گروه دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، مازندران

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۹/۲۱

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۶/۱۳

کلمات کلیدی

چکیده

تحقیق حاضر به منظور بررسی افزودن اثر سطوح مختلف زردچوبه در جیره بر شاخص‌های خونی و بافت‌های کبد، کلیه و روده ماهی ازون‌برون به مدت ۶۰ روز اجرا شد. به این منظور، ۱۲۰ عدد بچه‌ماهی ازون‌برون (وزن $45 \pm 0/5$ گرم) به صورت تصادفی در ۱۲ استخر بتونی توزیع شدند. ماهیان با ۴ جیره آزمایشی محتوی صفر، ۰/۵، ۱ و ۲٪ زردچوبه تغذیه شدند. تغذیه ماهیان ۳ بار در روز و به میزان ۳٪ وزن بدن انجام شد. در پایان دوره نتایج نشان داد تیمار ۲٪ زردچوبه باعث افزایش میزان هماتوکریت، هموگلوبین، گلبول قرمز، AST و ALT شد و اختلاف بین تیمارها معنی‌دار بود ($p < 0/05$). همچنین، نتایج نشان داد که با افزایش میزان دوز در ۲٪ زردچوبه میزان WBC و آلبومین افزایش پیدا کرد، اما اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد ($p > 0/05$). میزان شاخص‌های MCV، MCH و MCHC با افزایش دوز زردچوبه کاهش یافت و اختلاف بین تیمارها معنی‌دار بود ($p < 0/05$). همچنین، با افزایش دوز، میزان لنفوسیت و نوتروفیل افزایش و ائوزونوفیل کاهش یافت، به طوری که بیشترین میزان آن‌ها مربوط به تیمار ۳ بود، اما اختلاف بین تیمارها معنی‌دار نبود ($p > 0/05$). در بررسی نتایج بافت‌شناسی کبد، کلیه و روده ماهیان در تیمارهای مختلف، اختلاف معنی‌دار در هیچ یک از تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد ($p > 0/05$). بر اساس نتایج این تحقیق، استفاده از پودر زردچوبه در سطح ۲٪ در جیره غذایی برای بهبود شاخص‌های خونی و آسیب‌شناسی بافتی در ماهی ازون‌برون پیشنهاد می‌شود.

مقدمه

گسترش آبی‌پروری در طی ۱۰ سال گذشته، آبزیان را به یک منبع پروتئینی حیوانی مهم در سراسر جهان تبدیل کرده است (Sánchez-Martínez et al. 2015). ماهی ازون برون یکی از گونه‌های مهم ماهیان خاویاری است که جمعیت قابل توجهی را در دریای خزر به خود اختصاص داده است. از مزیت‌های این گونه می‌توان به کیفیت بالای گوشت، بازار پسندی فوق‌العاده، مدت زمان کمتر برای رسیدن به مرحله بلوغ و تولید خاویار نسبت به اکثر گونه‌های خاویاری و همچنین میزان بالای خاویار استحصالی نسبت به وزن بدن اشاره کرد (Norouzi et al. 2008).

استفاده از برخی از مواد افزودنی به جیره غذایی می‌تواند بهبود عملکرد رشد را به همراه داشته باشد (Javed et al. 2009). گیاهان دارویی با داشتن مواد فعال می‌توانند به عنوان محرک تغذیه و رشد به غذای ماهیان اضافه شده و با داشتن مواد معطر و یا به عنوان محرک گوارشی موجب جذب ماهی از طریق تغییر الگوی غذایی، ترشح مایعات گوارشی، صفرا، موکوس و در نهایت، مصرف بیشتر غذا شوند (Ganguly et al. 2010).

زردچوبه (*Curcuma longa*) از خانواده زنجبیل دارای ترکیبات شیمیایی متعدد از جمله کورکومین، روغن فرار، زینجیبرین، آلفا و بتا تومرین و مواد دیگری از جمله آرابینوز، فروکتوز، گلوکز، نشاسته و همچنین ترکیبات فنولی حاوی اسید فرولیک و اسید پروتوکاتونیک است (Yonar et al. 2019). در بررسی‌های متعدد، مزایای فراوانی برای این گیاه در انسان و دیگر موجودات گزارش شده است که از آن جمله می‌توان به فعالیت ضد اکسایشی و ضد باکتریایی (Masuda et al. 2002)، ضد التهابی و ضد سرطانی (Duvoix et al. 2005) اشاره کرد. Baldissera و همکاران (۲۰۱۸) در گربه ماهی نقره‌ای *Rhamdia quelen* نشان دادند که افزودن کورکومین به جیره غذایی باعث افزایش مقاومت در برابر *Streptococcus agalactiae* می‌شود. تحقیقات Yonar و همکاران (۲۰۱۹) حاکی از این است که شاخص‌های خونی به طور قابل توجهی توسط رژیم‌های غذایی حاوی کورکومین در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بهبود می‌یابد. همچنین، افزایش قابل توجهی در مقدار پروتئین کل و IgM

سرم مشاهده شد که ممکن است به دلیل فعال شدن ایمنی هومورال پس از تجویز کورکومین باشد (Yonar et al. 2021; Alagawany et al. 2019). مطالعات دیگر نیز نشان داده‌اند که افزودن زردچوبه به جیره غذایی در بسیاری از موارد، منجر به افزایش ایمنی و مقاومت در برابر بیماری‌ها و بهبود شاخص‌های خونی می‌شود (Abdelwahab and El-Bahr, 2012; Sodamola et al. 2016; Mohammad, 2020; Mooraki et al. 2019). امروزه به منظور افزایش بهره‌وری، پرورش متراکم ماهیان اجتناب‌ناپذیر است که از سویی به دلیل استرس ناشی از تراکم، خطر بروز بیماری‌های مختلف افزایش می‌یابد و از سوی دیگر استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان، به ظهور سویه‌های باکتریایی مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک کمک کرده و همچنین، ممکن است موجب تجمع آنتی‌بیوتیک در بافت‌های خوراکی شود. بنابراین، برای افزایش مقاومت در برابر بیماری و تقویت رشد، محققان در حال حاضر بر استفاده از تقویت‌کننده‌های رشد طبیعی و غیرآنتی‌بیوتیکی برای بهبود عملکرد دستگاه گوارش، رشد و سلامتی تأکید دارند. لذا این تحقیق در کنار خلأ پاره‌ای از اطلاعات فنی و تخصصی، با هدف افزودن پودر زردچوبه به جیره ماهی ازون برون، به بررسی اثر آن بر روی شاخص‌های خونی و آسیب‌شناسی کبد، کلیه و روده انجام شد تا با تولید اطلاعات کاربردی برای توسعه پایدار آبی‌پروری گونه‌های مذکور اقدام شود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در پاییز و زمستان ۱۳۹۷ در کارگاه خصوصی پرورش ماهی مداربسته اسلامی واقع در حسین آباد ساری بر روی بچه ماهی ازون برون به مدت ۶۰ روز انجام شد. به این منظور، تعداد ۱۲۰ عدد بچه ماهی با میانگین وزنی $0.5 \pm$ گرم و طول 2.6 ± 0.5 سانتی متر در ۱۲ استخر سیمانی توزیع شدند. ماهیان در ۴ گروه با ۴ جیره آزمایشی محتوی سطوح مختلف زردچوبه محتوی صفر، 0.5 ، 1 و 2% فرموله و تغذیه شدند.

تهیه جیره‌های آزمایش

توزین شد. پس از مخلوط کردن، مواد وارد دستگاه پلت ساز شده و پلت‌های ساخته شده پس از رطوبت‌گیری توسط دستگاه خشک کن تا زمان مصرف در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ساخت غذا در دانشگاه آزاد اسلامی واحد نور انجام شد. جیره غذایی به صورت دستی با قطر ۲ میلی‌متر و بر اساس جدول زیر تهیه و آماده سازی شد (جدول ۱). سنجش شیمیایی و تعیین درصد اجزای خوراک فوق در آزمایشگاه تخصصی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر واقع در شهرستان ساری انجام شد.

ریزوم زردچوبه به صورت خالص از بازار محلی شهرستان نور خریداری شد. سپس در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک، و بعد از آن با استفاده از آسیاب به صورت پودر در آورده شد. پودر به دست آمده با استفاده از الک با چشمه اندازه ۳۰ الک شد تا پودر با ذرات یکنواخت به دست آید. پس از الک شدن، مقدار مورد نیاز برای هر یک از اقلام غذایی توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم

جدول ۱ اجزای تشکیل دهنده جیره های غذایی مورد استفاده در دوره پرورش.

تیمار				شاهد	اقلام غذایی (%)
T ₃	T ₂	T ₁			
۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	پودر ماهی
۲۱	۲۱	۲۱	۲۱	۲۱	آرد سویا
۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	پودر گوشت
۲۴/۸	۲۴/۸	۲۴/۸	۲۴/۸	۲۴/۸	آرد گندم
۴	۴	۴	۴	۴	روغن ماهی
۰/۰۴۵	۰/۰۴۵	۰/۰۴۵	۰/۰۴۵	۰/۰۴۵	مکمل ویتامینه
۰	۱	۱/۵	۲	۲	سلولز
۲	۱	۰/۵	۰	۰	زردچوبه
۰/۱۵۵	۰/۱۵۵	۰/۱۵۵	۰/۱۵۵	۰/۱۵۵	کولین

شاهد: فاقد پودر زردچوبه؛ T₁، T₂ و T₃ به ترتیب حاوی ۰/۵، ۱ و ۲٪ پودر زردچوبه.

زی توده هر استخر با توجه به جداول تغذیه ماهیان تعیین شد. در طی دوره پرورش میزان خوراک دهی بر اساس ۴٪ از وزن بدن با توجه به دمای آب با میانگین ۱۶ درجه سانتی‌گراد (جدول ۲) انجام شد (Chebanov and Galich, 2011).

غذادهی به صورت روزانه در ۳ وعده در ساعات ۸، ۱۳ و ۱۸ انجام شد. برای تعیین زی توده استخرها و محاسبه میزان خوراک دهی، هر ۲ هفته یک بار متوسط وزن بچه ماهیان در هر استخر اندازه‌گیری شد و میزان خوراک مصرفی از روی

جدول ۲ فراسنجه‌های فیزیکی و شیمیایی آب.

شاخص	ابتدای دوره	انتهای دوره
دما (درجه سانتی‌گراد)	۱۸	۱۴
pH	۷-۸/۵	۷-۸/۵
اکسیژن (میلی‌گرم در لیتر)	۸/۸۸	۸/۸۸
آمونیاک (میلی‌گرم در لیتر)	۰/۰۱	۰/۰۱

اندازه گیری فراسنجه های بیوشیمیایی خون

برای خون گیری از بچه ماهیان از هر یک از تیمارهای آزمایشی، ۶ عدد بچه ماهی به طور تصادفی انتخاب و خون-گیری توسط سرنگ از طریق ساقه دمی انجام شد (Tacon et al. 2002). ارزیابی شاخص های خونی شامل شمارش گلبول قرمز و سفید خون با استفاده از لام هماسیتومتر انجام شد. اندازه گیری میزان هماتوکریت خون به روش میکروهیاتوکریت و اندازه گیری هموگلوبین به روش سیان مت هموگلوبین (Blaxhall and Daisley, 2006)، آلبومین به روش Bromocresol green، سنجش فعالیت آنزیم های کبدی آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارات آمینوترانسفراز (AST) به روش IFCC با استفاده از کیت های آزمایشگاهی پارس آزمون انجام شد (Vinod et al. 2018).

بررسی های بافت شناسی

برای تهیه مقاطع بافت شناسی از اندام های روده، کلیه و کبد نمونه برداری به عمل آمد. نمونه ها به داخل ظروف محلول تثبیت کننده فرمالین بافر خنثی ۱۰٪ به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. بعد از این مرحله، نمونه های تثبیت شده در دستگاه اتوماتیک آماده سازی بافتی (Shandon, China) به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند (Suvarna et al. 2018). نمونه های آماده سازی شده با پارافین مذاب توسط دستگاه پارافین دیسپنسر در دمای ۶۰-۵۸ درجه سانتی گراد با قالب های استیل و کاست های یکبار مصرف قالب گیری و از نمونه ها بلوک های پارافینی تهیه شد. برای تهیه برش، بلوک های اشاره شده توسط صفحه سرد کننده در دمای ۵- تا ۱۰- درجه سانتی گراد، سرد و توسط میکروتوم (Shandon, China) برش هایی با ضخامت ۷-۵ میکرومتر از آنها تهیه شد. برش های تهیه شده پس از شناورسازی در بن ماری (۴۲ درجه سانتی گراد) بر روی لام قرار گرفته و با استفاده از صفحه حرارتی خشک شدند. لام ها به روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین رنگ آمیزی شده و سطح آنها با استفاده از لامل و چسب انتلان پوشیده شد و در نهایت برای خشک شدن و تهیه نهایی لام به مدت یک هفته در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در پایان، این لام ها برای

تفسیر بافتی با میکروسکوپ نوری ارزیابی شدند (Meyer et al. 2009).

تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه ثبت داده ها در نرم افزار Microsoft 2013 office Excel و تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS 23 انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده ها از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) استفاده شد و در صورت مشاهده اختلاف، آزمون Duncan برای مقایسه میانگین بین تیمارها به عنوان post-hoc اعمال شد. کلیه سنجش آماری در سطح معنی داری $p < 0.05$ انجام و میانگین داده ها به همراه انحراف استاندارد ارائه شد.

نتایج

نتایج آماری داده های مربوط به شاخص های خونی در بچه ماهیان ازون برون تغذیه شده با مقادیر مختلف پودر زردچوبه در جدول ۲ ارائه شده است. مقایسه میانگین هماتوکریت، هموگلوبین، گلبول قرمز، AST و ALT در تیمارهای مختلف آزمایش نشان داد که با افزایش دوز میزان شاخص های اشاره شده افزایش می یابد، به طوری که بیشترین میزان آنها مربوط به تیمار ۳ (حاوی ۲٪ پودر زردچوبه) و اختلاف بین تیمارها معنی دار بود ($p < 0.05$). همچنین، مقایسه میانگین گلبول قرمز و آلبومین در تیمارهای مختلف آزمایش نشان داد که با افزایش دوز، میزان گلبول قرمز و آلبومین افزایش می یابد، به طوری که بیشترین میزان آنها مربوط به تیمار ۳ (حاوی ۲٪ پودر زردچوبه) بود، ولی اختلاف بین تیمارها معنی دار نبود ($p > 0.05$). نتایج آماری مربوط به میانگین MCV، MCH و MCHC نشان داد که با افزایش دوز، میزان MCV، MCH و MCHC کاهش یافت، به طوری که بیشترین میزان آنها در گروه شاهد نسبت به دیگر تیمارها مشاهده شد و اختلاف بین تیمارها معنی دار بود ($p < 0.05$). همچنین، مقایسه میانگین لنفوسیت، نوتروفیل، مونوسیت و ائوزینوفیل در تیمارهای مختلف نشان داد که با افزایش دوز، میزان لنفوسیت و نوتروفیل افزایش، و ائوزینوفیل کاهش می یابد، به طوری که بیشترین میزان آنها مربوط به تیمار ۳ (حاوی ۲٪ پودر زردچوبه) بود، اما اختلاف بین تیمارها

معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). همچنین، نتایج آماری حاکی از آن بود که با افزایش دوز، میزان مونوسیت کاهش یافت و اختلاف بین تیمارها معنی‌دار بود ($p < 0.05$).

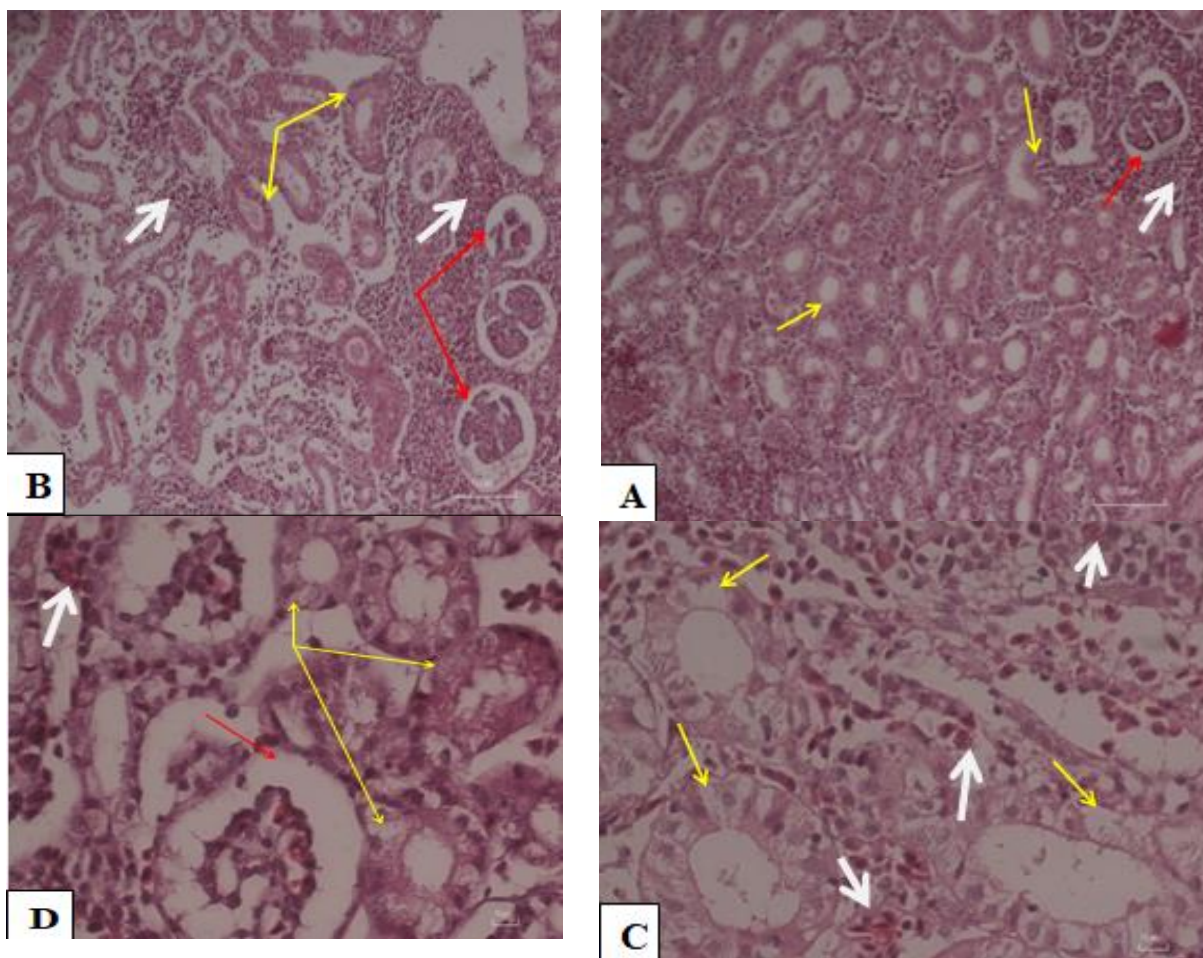
جدول ۲ میانگین شاخص‌های خونی ماهی ازون‌برون تحت تأثیر دوزهای مختلف زردچوبه.

تیمارها				شاخص‌های خونی
T ₃	T ₂	T ₁	شاهد	
۱۷/۳۳ ± ۱/۵۲ ^a	۱۷/۰ ± ۱/۰ ^a	۱۶/۰ ± ۱/۰ ^{ab}	۱۴/۳۳ ± ۰/۵۷ ^a	هماتوکریت (/.)
۳/۷۴ ± ۰/۳۷	۳/۷۳ ± ۰/۲۱	۳/۶۹ ± ۰/۱۵	۳/۵۹ ± ۰/۲۳	هموگلوبین (g/dL)
۰/۹۱ ± ۰/۰۳ ^a	۰/۸۳ ± ۰/۰۴ ^b	۰/۷۸ ± ۰/۰۳ ^b	۰/۶۷ ± ۰/۰۵ ^c	گلبول قرمز (۱۰ ^۶ در mm ³)
۸۸۶۶/۶۶ ± ۳۲۱/۴۵ ^c	۷۸۳۳/۳۳ ± ۲۵۱/۶۶ ^b	۷۵۱۶/۶۶ ± ۲۷۵/۳۷ ^b	۶۸۳۳/۳۳ ± ۳۵۱/۱۸ ^a	گلبول سفید (تعداد در mm ³)
۱۸۶/۳ ± ۳/۸۸ ^b	۲۰۴/۲ ± ۸۰/۲۷ ^a	۲۰۵/۴ ± ۰/۹۳ ^a	۲۱۲/۱۱ ± ۳۸/۶۲ ^a	MCV (fL)
۴۰/۹۲ ± ۲/۶ ^b	۴۵/۱۱ ± ۵ ^b	۴۷/۳۱ ± ۱/۳۵ ^{ab}	۵۳/۲۷ ± ۳/۵۷ ^a	MCH (pg/cell)
۲۱/۹۸ ± ۰/۹۶ ^b	۲۲/۰۲ ± ۲/۴۲ ^b	۲۳/۰۹ ± ۰/۹۱ ^{ab}	۲۵/۰۷ ± ۰/۷۱ ^a	MCHC (/.)
۹۱/۰ ± ۸/۴۱ ^a	۸۲/۱۳ ± ۵/۶ ^{ab}	۸۱/۵۰ ± ۳/۸۳ ^{ab}	۷۸/۱ ± ۴/۵۵ ^b	AST (IU/dL)
۲۶/۳ ± ۸/۱۸ ^a	۱۷/۰۶ ± ۴/۷۴ ^b	۱۶/۲۳ ± ۲/۲۰ ^b	۱۳/۲۶ ± ۲/۹۰ ^b	ALT (IU/dL)
۶۸/۴۳ ± ۱۴/۱۵	۷۶/۷۰ ± ۱۶/۷۱	۸۴/۴۳ ± ۵/۳۵	۸۴/۴۶ ± ۲۲/۴۷	گلوکز (mg/dL)
۲ ± ۰/۱۰ ^a	۱/۴۳ ± ۰/۰۵ ^{ab}	۱/۳۶ ± ۰/۰۵ ^{ab}	۱/۲۴ ± ۰/۰۶ ^b	آلبومین (g/dL)
۷۰/۲ ± ۲/۹۴ ^a	۶۵/۶ ± ۰/۸۹ ^b	۶۲/۶ ± ۱/۳۴ ^c	۵۸/۶۰ ± ۰/۸۹ ^d	لنفوسیت (/.)
۲۰/۰ ± ۱/۲۲ ^a	۱۶/۶ ± ۱/۳۴ ^b	۱۶/۲ ± ۱/۴۸ ^b	۱۴/۲ ± ۱/۰۹ ^c	نوتروفیل (/.)
۱/۰ ± ۴/۵۴ ^a	۱/۰ ± ۰/۷۰ ^{ab}	۱/۰ ± ۶۰/۵۱ ^{ab}	۲/۰ ± ۰/۷ ^b	مونوسیت (/.)
۸/۱ ± ۲۰/۹ ^d	۱۴/۰ ± ۴۰/۸۹ ^c	۱۷/۱ ± ۸۰/۹۲ ^b	۲۲/۲ ± ۴/۳ ^a	ائوزینوفیل (/.)

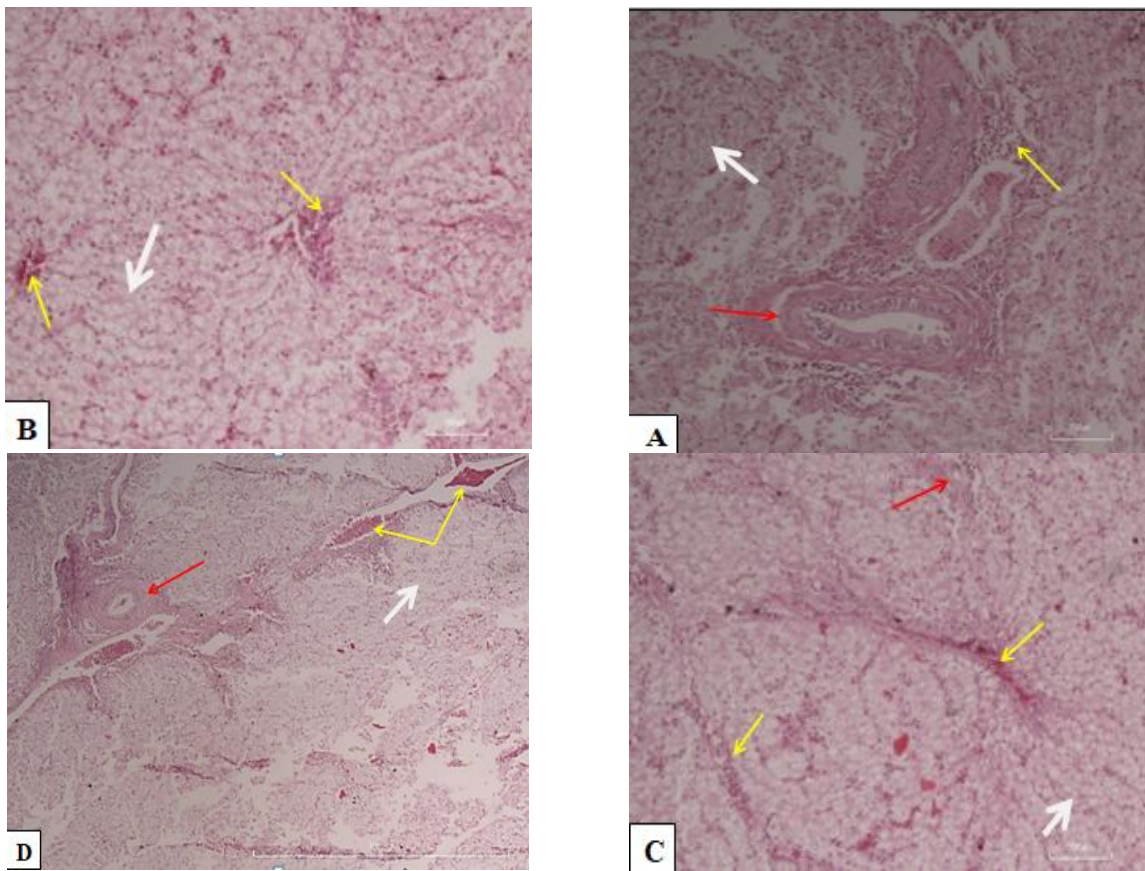
شاهد: فاقد پودر زردچوبه، T₁، T₂ و T₃ به ترتیب حاوی ۰/۵، ۱ و ۲٪ پودر زردچوبه؛ حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهاست ($P < 0.05$).

یک‌دست و بدون هرگونه اختلال و بی‌نظمی سلولی بود، هرچند که در بخش‌هایی از نمونه‌های کبد، نکروز ملایمی که ناشی از استحال چربی بود، مشاهده شد که ارتباط معنی‌داری با افزایش میزان دوز زردچوبه نداشت. ساختار سینوزوئیدهای کبدی طبیعی و در بعضی موارد دچار پرخونی بود. همچنین، در بررسی مقاطع بافت‌شناسی روده، در ارزیابی اولیه در تمام تیمارها تغییرات بافتی خاصی مشاهده نشد و ساختار بافتی روده از یکپارچگی و سلامت ساختاری برخوردار بود.

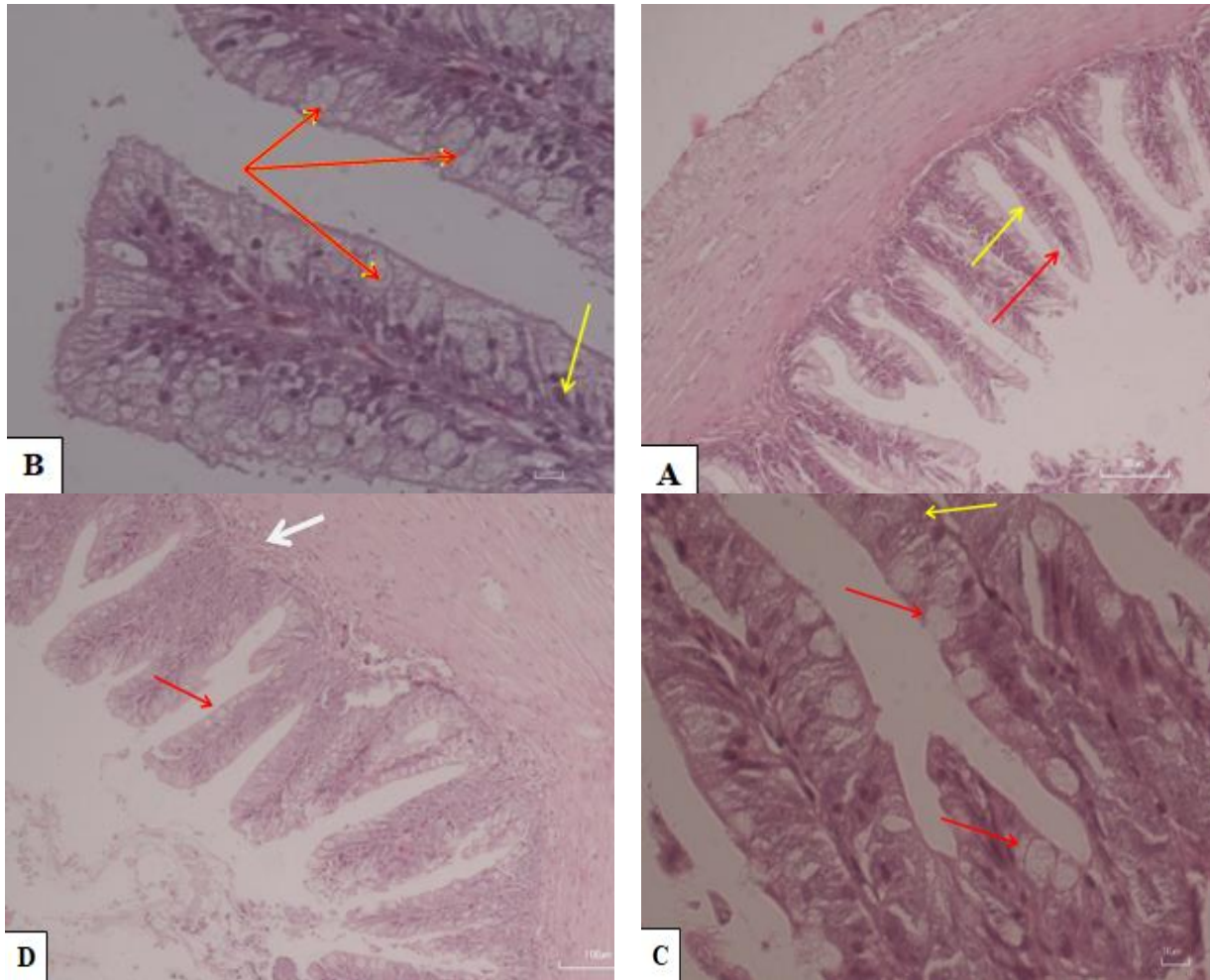
در بررسی‌های بافت‌شناسی کبد، کلیه و روده ماهیان ازون‌برون تغذیه شده با درصد‌های مختلف زردچوبه در جیره غذایی، هیچ نوع تغییرات آسیب‌شناسی که حاکی از تأثیر ترکیب زردچوبه بر بافت کلیه باشد، در مقایسه با شاهد دیده نشد. از مهم‌ترین علائم مشاهده شده در تمامی نمونه‌ها (اعم از شاهد و تیمار) می‌توان به افزایش فضای کپسول بومن، استحال مختصر توبول‌های کلیوی، نفوذ گلبول‌های سفید از نوع ائوزینوفیل اشاره کرد. در بررسی مقاطع بافت‌های کبد ماهیان گروه شاهد و دیگر تیمارها، سلول‌های کبدی کاملاً



شکل ۱ اثر غلظت های مختلف پودر زردچوبه بر روی تغییرات آسیب شناسی بافت کلیه ماهیان اوزون برون (با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین): تصویر A: گروه شاهد (فاقد پودر زردچوبه) نمایی از گلوبول و توپول های کلیوی (بزرگنمایی $\times 100$): تصویر B: گروه تغذیه شده با ۰/۵٪ پودر زردچوبه (با بزرگنمایی $\times 100$): تصویر C: گروه تغذیه شده با ۱٪ پودر زردچوبه (با بزرگنمایی $\times 400$): تصویر D: گروه تغذیه شده با ۲٪ پودر زردچوبه (با بزرگنمایی $\times 400$): پیکان زرد: استحاله سلول توپول های کلیه؛ پیکان قرمز: پروکیدیگی و افزایش فضای بومن در گلوبول های کلیوی؛ پیکان سفید: پرخونی و ارتشاح و نفوذ ائوزینوفیل به داخل بافت کلیه.



شکل ۲ اثر غلظت‌های مختلف پودر زردچوبه بر روی تغییرات آسیب‌شناسی بافت کبد ماهیان اوزون‌برون (با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین): تصویر A: گروه شاهد فاقد پودر زردچوبه (بزرگنمایی $\times 100$): تصویر B: گروه تغذیه شده با ۰/۵٪ پودر زردچوبه (با بزرگنمایی $\times 100$): تصویر C: گروه تغذیه شده با ۱٪ پودر زردچوبه (با بزرگنمایی $\times 100$): تصویر D: گروه تغذیه شده با ۲٪ پودر زردچوبه (با بزرگنمایی $\times 40$): پیکان زرد: پرخونی در سینوزوئیدهای کبدی؛ پیکان قرمز: وجود مجاری صفراوی طبیعی؛ پیکان سفید: استحاله چربی در سلول‌های کبدی.



شکل ۳ اثر غلظت‌های مختلف پودر زردچوبه بر روی تغییرات آسیب‌شناسی بافت روده ماهیان اوزون برون (با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین): تصویر A: گروه شاهد فاقد پودر زردچوبه (بزرگنمایی ۱۰۰×)؛ تصویر B: گروه تغذیه شده با ۰/۵٪ پودر زردچوبه (با بزرگنمایی ۴۰۰×)؛ تصویر C: گروه تغذیه شده با ۱٪ پودر زردچوبه (با بزرگنمایی ۴۰۰×)؛ تصویر D: گروه تغذیه شده با ۲٪ پودر زردچوبه (با بزرگنمایی ۱۰۰×)؛ پیکان زرد: بافت پوششی روده پیکان قرمز: سلول های ترشح کننده موکوس در پرزهای روده پیکان سفید: پرخونی و نفوذ سلول‌های آماسی.

مرحله رشد و نمو، اندازه نمونه‌ها (Bani and Haghi, 2010)، استرس ناشی از صید و نمونه‌برداری، رژیم غذایی، سن، مرحله تولیدمثلی، جنسیت، فعالیت‌های فردی، شرایط پرورش، تراکم، اکسیژن محلول و شوری به آسانی تغییر می‌کند و روی مقدار داده‌های خون شناسی تأثیر می‌گذارد (Hoseinifar et al. 2011). تعداد گلبول‌های قرمز با توجه به گونه‌های ماهیان و استرس‌های محیطی، از جمله دما تغییر می‌کند، به طوری که تعداد آنها در ماهیان گرمابی بیش از ماهیان سردابی و

بحث

یافته‌های به‌دست آمده از پژوهش‌های خون‌شناسی آبزیان در ارزیابی وضعیت سلامت آبزیان، ارزیابی مقاومت غیراختصاصی آبزیان مولد، جداسازی گله‌های مولد مناسب به منظور تولید لارو و بچه‌ماهیان سالم و مقاوم مؤثر واقع می‌شود (Sherrill et al. 2009). بیان دقیق مقایسه داده‌های خونی بین افراد یک گونه و گونه‌های مختلف امری دشوار است، زیرا خصوصیات فیزیولوژیک خون و سرم ماهیان با تغییرات محیطی، اختلاف گونه‌ها، روش‌های نمونه‌برداری،

گونه باس آسیایی (*Lates calcarifer*) و همچنین، Yonar و همکاران (۲۰۱۹) در بررسی اثر کورکومین در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در تضاد است.

در پاسخ به استرس‌های موجود در محیط آبی، کاهش تعداد گلبول‌های سفید ممکن است بیانگر سرکوب ایمنی موجود زنده، ولی افزایش میزان آنها نشان‌دهنده پاسخ به استرس یا عفونت باشد. همچنین، گلبول سفید خون سبب حفاظت در برابر بیماری‌های عفونی ناشی از عوامل میکروبی می‌شود. از جمله ارزیابی‌هایی که باید پس از کاربرد محرک‌های ایمنی انجام داد، بررسی شمارش تعداد کل گلبول‌های سفید در موجودات مورد آزمایش است. از جمله عوامل مؤثر بر تعداد گلبول سفید، درصد نوتروفیل، لنفوسیت و مونوسیت می‌توان به استرس، بیماری، عوامل آلاینده، تغذیه، شرایط بوم‌شناختی، سن و جنس اشاره کرد (Giordano et al. 2021). در تحقیق حاضر تعداد گلبول سفید، مونوسیت، نوتروفیل، بازوفیل و لنفوسیت اختلاف معنی دار با گروه شاهد از خود نشان داد. تعداد گلبول سفید در تیمار دریافت کننده پودر زردچوبه در مقایسه با گروه شاهد، همان‌طور که پیش‌تر گفته شد، به‌طور معنادار دارای بیشترین مقدار بود. این نتیجه نشان‌دهنده افزایش تحریک دستگاه ایمنی ماهی در ماهیان دریافت کننده پودر زردچوبه است. Sodamola و همکاران (۲۰۱۶) با بررسی اثر کورکومین در گربه ماهی آفریقایی تحت تأثیر دوزهای صفر، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰٪ نشان دادند که در دوز ۷/۵٪، کورکومین اضافه شده به جیره، باعث کاهش میزان ائوزینوفیل و افزایش لنفوسیت، مونوسیت و بازوفیل می‌شود. همچنین، Arunkumar و همکاران (۲۰۱۶) با بررسی اثر کورکومین در گونه کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) تحت تأثیر دوزهای ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ نشان دادند که دوز ۰/۹ کورکومین اضافه شده به جیره باعث افزایش میزان نوتروفیل و لنفوسیت می‌شود. Yonar و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که شاخص‌های خونی و ایمنی با استفاده از مکمل کورکومین در رژیم غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان به طور چشمگیری بهبود می‌یابد که دلیل آن را فعال شدن ایمنی هومورال پس از تجویز کورکومین می‌دانند. بر اساس نتایج حاصل از این

در دماهای بالا بیش از دماهای پایین است (Pradhan et al. 2014). همچنین، مشخص شده است که تعداد گلبول‌های قرمز و هموگلوبین خون در ماهی با تغییرات فصلی، سیکل جنسی یا دیگر موارد فیزیولوژیک دچار تغییرات معنی‌دار می‌شود (Fazio et al. 2018). میزان هموگلوبین و هماتوکریت، تابعی از تغییرات گلبول قرمز بوده و رابطه مستقیم با آن دارد. افزایش غلظت هموگلوبین بر قابلیت انتقال گازهای تنفسی درخون، بازده قلب و افزایش وزن ماهی مؤثر است (Adel et al. 2016). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش دوز زردچوبه در جیره غذایی، میزان گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت افزایش پیدا می‌کند و اختلاف بین تیمارها معنی دار بوده است. همچنین، نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن است که با افزایش دوز پودر زردچوبه، میزان آلومین افزایش می‌یابد، اما اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد که با نتایج برخی از تحقیقات صورت گرفته مطابقت دارد (Sodamola et al. 2016; Ayoub et al. 2019; Mohammad, 2020).

مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش دوز زردچوبه در جیره غذایی ماهی ازون‌برون، حجم متوسط گلبول قرمز، متوسط هموگلوبین گلبول قرمز و میزان هموگلوبین گلبول قرمز کاهش پیدا کرده است.

کاهش حجم گلبول‌های قرمز نشان دهنده نبود التهاب است و سبب تسهیل حرکت و تعلیق گلبول‌های قرمز شده و سرعت رسوب و تشکیل لخته‌های درون‌رگی را کاهش می‌دهد که این امر یک ویژگی مثبت در فیزیولوژی دستگاه گردش خون محسوب می‌شود (Tangestani et al. 2011). کورکومین باعث کاهش التهاب و کاهش پاسخ سیتوکین‌های تولید شده مانند کیموکین‌ها و اینترلوکین‌ها از طریق اتصال مستقیم به TNF- α serum tumor necrosis factor-alpha و مهار transcription factor kappa B (NF-kB) nuclear factor Anthwal et (al. 2014) در طول التهاب می‌شود.

نتایج این مطالعه با نتایج Mooraki و همکاران (۲۰۱۸) با بررسی اثر کورکومین در گونه گرین ترور (*Andinoacara rivulatus*) مطابقت داشته و با نتایج Abdelwahab و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی اثر زیره سیاه و کورکومین در

که ممکن است منجر به آسیب سلول های کبدی شود. در ضمن، افزایش فعالیت آنزیم های ALT و AST در این تحقیق ممکن است مؤید همین مطلب باشد، زیرا با افزایش دوز زردچوبه، میزان این دو آنزیم در سرم خون افزایش یافته است. آنزیم های ALT و AST که در بافت های مختلفی مانند قلب، ماهیچه های اسکلتی، کلیه، لوزالمعده، طحال، گلبول های قرمز و به خصوص در کبد ماهیان یافت می شوند، به دنبال آسیب به غشای سلولی به داخل خون آزاد می شوند و سطح فعالیت آنها در خون افزایش می یابد (Mohamed et al. 2020). نتایج این مطالعه با نتایج Abdelwahab و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی اثر زیره سیاه و کورکومین در ماهی باس آسیایی و Sodamola و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی اثر کورکومین در گربه ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) مطابقت دارد.

در پژوهش حاضر، بدون در نظر گرفتن تغییرات اندک آسیب بافت کبد که البته در بین تیمارها معنی دار هم نبوده است، افزودن پودر زردچوبه به میزان ۲٪ در جیره غذایی ماهی، سبب بهبود قابل توجهی در عملکرد بچه ماهیان ازون برون شده است. پیشنهاد می شود که در مطالعات آتی در زمینه تأثیر پودر زردچوبه بر مقاومت این گونه در برابر بیماری ها نیز مطالعاتی انجام شود.

منابع

- Abdelwahab, A.M., El-Bahr, S. 2012. Influence of Black cumin seeds *Nigella sativa* and Turmeric *Curcuma longa* mixture on performance and serum biochemistry of Asian sea bass, *Lates calcarifer*. World Journal of Fish and Marine Sciences 4: 496-503.
- Adel, M., Palanisamy, S.K., Shafiei, S., Fazli, H., Zorriehzakra, M.J. 2016. Comparative study of haematological, serum electrolyte and nonelectrolyte parameters of male and female Persian sturgeon *Acipenser persicus* brood stocks. Acta Oceanologica Sinica 35: 39-43.
- تحقیق، میزان گلوکز به دلیل افزایش روند گلیکوژنز به دنبال افزودن پودر زردچوبه به جیره کاهش نشان داد (Priyadarsini, 2014; El-Barbary, 2018).
- در بررسی های آسیب شناسی، در کلیه و روده تغییرات بافتی ناشی از تأثیر ترکیب زردچوبه بر بافت کلیه و روده، در مقایسه با گروه شاهد وجود نداشت، اما بافت کبد در ماهیان گروه شاهد و دیگر تیمارها، در جاتی از واکنش ها شدن سلول های کبدی ناشی از استحاله چربی، پرخونی در سینوزوئیدهای کبدی با حفظ ساختار طبیعی و تجمع هموسیدرین در اطراف رگ های خونی در بعضی از موارد مشاهده شد، هر چند که اختلاف معنی دار وابسته به دوز زردچوبه بین تیمارها وجود نداشت. در مطالعه ای که توسط El-Barbary در سال ۲۰۱۸ بر روی تأثیر سیر و کورکومین بر بافت شناسی کبد و بیان ژن سیتوکروم P450 در مجاورت آفلاتوکسین انجام شد، در تیماری که فقط ۱۰ گرم در کیلوگرم کورکومین دریافت کردند، نتیجه ای مشابه این تحقیق در ساختار بافتی کبد پدید آمد. همچنین، تحقیق ایشان نشان داد که به رغم انتظار، بیان ژن CYP1A در این تیمار افزایش یافته است. بنابراین، به نظر می رسد افزایش بیان ژن CYP1A در تحقیق حاضر نیز مسئول اثر جانبی پودر زردچوبه بر نمای آسیب شناسی بافت کبد باشد، زیرا Harikumar و Kuttan (۲۰۰۶) و Yarru و همکاران (۲۰۰۹) ثابت کردند که بیان بیش از حد ژن CYP موجب تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) بیشتری می شود. بنابراین، استرس اکسیداتیو ایجاد می کند
- Alagawany, M., M.R. Farag, S.A. Abdelnour, M.A.O. Dawood, S.S. Elnesr, K. Dhama. 2021. Curcumin and its different forms: A review on fish nutrition. Aquaculture 532: 73-83.
- Alishahi, M., Soltani, M., Mesbah, M., Zargar, A. 2012. Immunostimulatory and growth stimulation effects of Ergosan, Levamisole and herbal extracts in *Cyprinus carpio*. Journal Of Veterinary Research 67: 135-142.
- Anthwal, A., Thakur, B.K., Rawat, M.S.M., Rawat, D.S., Tyagi A.K., Aggarwal, B.B. 2014. Synthesis, characterization and in

- vitro anticancer activity of C-5 curcumin analogues with potential to inhibit TNF- α -induced NF- κ B activation. *BioMed Research International* 2014: 52-65.
- Arunkumar, P., Ramasubramanian, V., Munirasu, S. 2016. Effect of *Curcuma longa* enriched mesocyclops thermocyclopoides on fresh water fish, *Cyprinus carpio*. *International Journal of Research and Development in Pharmacy & Life Sciences* 6: 2484-2492.
- Ayoub, H., Tantawy, M., Abdel-Latif, H. 2019. Influence of Moringa *Moringa oleifera* and Rosemary *Rosmarinus officinalis*, and Turmeric *Curcuma longa* on immune parameters and challenge of Nile tilapia to *Aeromonas hydrophila*. *Life Science Journal* 16: 8-15.
- Baldissera, M.D., Souza, C.F., Zeppenfeld, C.C., Descovi, S., Machado, V.S., Santos, R.C.V. Baldisserotto, B. 2018. Efficacy of dietary curcumin supplementation as bactericidal for silver catfish against *Streptococcus agalactiae*. *Microbial Pathogenesis* 116: 237-240.
- Bani, A., Hagi Vayghan, A. 2010. Temporal variations in haematological and biochemical indices of the Caspian kutum, *Rutilus frisii kutum*. *Ichthyological Research* 58: 126-133.
- Blaxhall, P., Daisley, K. 2006. Routine methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology* 5: 771-781.
- Chebanov, M., Galich, E. 2011. Sturgeon Hatchery Manual. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No. 558. Ankara. FAO, 297 p.
- Duvoix, A., Blasius, R., Delhalle, S., Schneckenger, M., Morceau, F., Henry, E., Dicato, M., Diederich, M. 2005. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Letters* 223: 181-190.
- El-Barbary, M. 2018. Impact of garlic and curcumin on the hepatic histology and cytochrome P450 gene expression of aflatoxicosis *Oreochromis niloticus* using RT-PCR. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 18: 405-415
- Fazio, F., Ferrantelli, V., Piccione, G., Saoca, C., Levanti, M., Mucciardi, M. 2018. Biochemical and hematological parameters in European sea bass *Dicentrarchus labrax* and Gilthead sea bream *Sparus aurata* in relation to temperature. *Veterinarski Arhiv* 88: 397-411.
- Ganguly, S., Paul, I., Mukhopadhyay, S. 2010. Application and effectiveness of immunostimulants, probiotics, and prebiotics in aquaculture. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 62: 130-138.
- Giordano, D., Corti, P., Coppola, D., Altomonte, G., Xue, J., Russo, R., di Prisco, G., Verde, C. 2021. Regulation of globin expression in Antarctic fish under thermal and hypoxic stress. *Marine Genomics* 57: 100831.
- Hari Kumar, K. B. and R. Kuttan 2006. Inhibition of drug metabolizing enzymes (Cytochrome P450) in vitro as well as in vivo by *Phyllanthus amarus*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29: 1310-1313.
- Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A., Merrifield, D.L., Amiri, B.M., Yelghi, S., Bastami, K.D. 2011. The study of some haematological and serum biochemical parameters of juvenile beluga *Huso huso* fed oligofructose. *Fish Physiology and Biochemistry* 37: 91-96.
- Javed, M.T., Durrani, F.R., Hafeez, A., Khan, R., Ahmad, I. 2009. Effect of aqueous extract of plant mixture on carcass quality of broiler chicks. *Journal of Agricultural and Biological Science* 4: 37-40.
- Masuda, T., Toi, Y., Bando, H., Maekawa, T., Takeda, Y., Yamaguchi, H. 2002. Structural identification of new curcumin dimers and their contribution to the antioxidant mechanism of curcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2524-2530.

- Meyer, U., Meyer, T., Handschel, J., Wiesmann, H.P. 2009. Fundamentals of tissue engineering and regenerative medicine. Springer, Berlin Heidelberg, 1076 p.
- Mohamed, A.A.R., El-Houseiny, W., El-Murr, A.E., Ebraheim, L.L.M., Ahmed, A.I., El-Hakim, Y.M.A. 2020. Effect of hexavalent chromium exposure on the liver and kidney tissues related to the expression of CYP450 and GST genes of *Oreochromis niloticus* fish: Role of curcumin supplemented diet. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 188: 109890.
- Mohammad, M. 2020. Influence of Different levels of turmeric *Curcuma longa* and red paprika *Capsicum annum*. Supplements on growth promoter and chemical composition of Common Carp *Cyprinus carpio*. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*. 201: 1-15.
- Mooraki, N., Batmany, Y., Zoriehzahra, S.J., Kakooolaki, S. 2019. Evaluating the effect of using turmeric (*Curcuma longa*) on growth performance and hematological parameters of the ornamental fish, Green Terror *Andinocara rivulatus*. *Journal of Survey in Fisheries Sciences* 5: 37-47.
- Norouzi, M., Pourkazemi, M., Keyvan, A., Fatemi, S.M.R., Kazemi, B. 2008. Population genetic structure of Stellate sturgeon *Acipenser stellatus* in the south Caspian Sea using microsatellite markers. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 3: 158-166.
- Pradhan, S.C., Patra, A.K., Mohanty, K.C., Pal, A. 2014. Hematological and plasma biochemistry in *Cirrhinus mrigala*. *Comparative Clinical Pathology* 23: 509-518.
- Priyadarsini, K.I. 2014. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. *Molecules* 19: 20091-20112.
- Sahu, S., Das, B., Pradhan, J., Mohapatra, B., Mishra, B.K., Sarangi, N. 2007. Effect of *Magnifera Indica* Kernel as a feed additive on immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Labeo rohita* fingerlings. *Fish & Shellfish Immunology* 23: 109-118.
- Sánchez-Martínez, J.G., Pérez-Castañeda, R., Aguirre-Guzmán, G., Vázquez-Sauceda, M. L., Rábago-Castro, J.L., Hernández-Acosta, M. 2015. Effects of the addition of a marigold extract to diets fed to channel catfish *Ictalurus punctatus* on growth parameters. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 14: 797-804.
- Shalaby, A.M., Yassir, E., Rahman, A. 2006. Effects of Garlic *Allium sativum* and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases - Journal of Venomous Animals and Toxins* 12: 172-201.
- Sherrill, J., Weber, E.S., Marty, G.D., Hernandez-Divers, S. 2009. Fish cardiovascular physiology and disease. veterinary clinics of North America: *Exotic Animal Practice* 12: 11-38.
- Sodamola, M., Jimoh, W., Adejola, Y., Akinbola, D., Olanrewaju, A., Apiakason, E. 2016. Effect of turmeric *Curcuma longa* root powder on the growth performance, hematology and serum biochemistry of African catfish *Clarias gariepinus*. *Academia Journal of Agricultural Research* 4: 593-597.
- Suvarna, K.S., Layton, C., Bancroft, J.D. 2018. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques E-Book: Elsevier Health Sciences. Churchill Livingstone, 672 p.
- Tacon, A.G.J., Cody, J.J., Conquest, L.D., Divakaran, S., Forster, I.P., Decamp, O.E. 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition* 8: 121-137.

- Tangestani, R., Alizadeh, E., Ebrahimi dorcheh, E., Zare, P. 2011. Effects of garlic essential oil as an immunostimulant on hematological indices of juvenile Beluga *Huso huso*. Journal of Veterinary Research 66: 209-216.
- Thanikachalam, K., Kasi, M., Rathinam, X. 2010. Effect of garlic peel on growth, hematological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in African catfish *Clarias gariepinus* fingerlings. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 3: 614-618.
- Vinod, K.S., Madathil, L.P., Shetty, P., Kaur, H., Patel, M., Gouraha, A. 2018. Salivary and serum aspartate aminotransferases and alanine aminotransferases in insulin-dependent diabetes mellitus and normal children: a comparative study. Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry 8: 229-234.
- Yarru, L.P., Settivari, R.S., Gowda, N. K.S., Antoniou, E., Ledoux, D.R., Rottinghaus, G.E. 2009. Effects of turmeric (*Curcuma longa*) on the expression of hepatic genes associated with biotransformation, antioxidant, and immune systems in broiler chicks fed aflatoxin. Poultry Science 88: 2620-2627.
- Yonar, M., yonar, S., Ispir, U., Ural, M. 2019. Effects of curcumin on haematological values, immunity, antioxidant status and resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* against *Aeromonas salmonicida* subsp. achromogenes. Fish & Shellfish Immunology 89: 120-127