وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

عنوان :

امکان سنجی توسعه کاربرد گیاهان دارویی در آبزیان پرورشی کشور(فاز اول)

مجری مسئول :
مصطفی شریف روحانی

شماره ثبت
۴۶۵۴۱

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

عنوان طرح : امکان سنجی توسعه کاربرد گیاهان دارویی در آبزیان پرورشی کشور(فاز اول)
شماره مصوب طرح : ۸۹۱۳-۱۲-۷۴-۰۱۴
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : مصطفی شریف روحانی
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : مصطفی شریف روحانی
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : مصطفی شریف روحانی
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : رضا پورغلام ، مسعود حقیقی ، مهدی معصوم زاده، سهیل بازاری مقدم
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -
محل اجرا : استان تهران
تاریخ شروع : ۸۹/۱۰/۱
مدت اجرا : ۳ سال و ۳ ماه
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۵
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

طرح : امکان سنجی توسعه کاربرد گیاهان دارویی در آبزیان پرورشی کشور(فاز اول)

کد مصوب : ۸۹۱۳-۱۲-۷۴-۰۱۴

شماره ثبت (فروست) : ۴۶۵۴۱ تاریخ : ۹۳/۱۱/۱۱

با مسئولیت اجرایی جناب آقای مصطفی شریف روحانی دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته بهداشت و بیماری های آبزیان می‌باشد.

طرح توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماری های آبزیان در تاریخ ۹۳/۳/۲۸ مورد ارزیابی و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای طرح مجری در :

ستاد ■ پژوهشکده □ مرکز □ ایستگاه □

با سمت معاون تحقیقاتی در موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور مشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
بخش اول: مطالعه اثرات گیاهان دارویی مرزنگوش (*Origanum vulgareL.*) و صبر زرد (*Aloe vera*) بر سیستم بر ایمنی ماهی قزل آلا رنگین کمان پرورشی (*Oncorhynchus mykiss*) ۴
بخش دوم: اثر دو گیاه سرخارگل و گون بر تقویت سیستم ایمنی ماهی قزل آلا و مقاومت آن در برابر استرپتوکوکوزیس ۸۰
بخش سوم: بررسی تاثیر عصاره های سیر(*Allium sativum*) و آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر روی انگل ۱۵۳
بخش چهارم: بررسی تاثیر عصاره های سیر(*Allium sativum*) و آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر روی باکتری آئروموناس هیدروفیلا در بچه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)..... ۲۶۹
منابع ۳۳۷
چکیده انگلیسی ۳۵۰

چکیده

در سال های اخیر با وجود افزایش مصرف ماهی در جهان، ولی به دلیل عدم کنترل بسیاری از بیماری های شایع توسط پاتوژن های بیماری زای مختلف، تولید جهانی ماهی کاهش یافته است. ماهی قزل آلا رنگین کمان از ارجح ترین ماهیان سردآبی در صنعت آبزی پروری ایران است. افزایش سرعت رشد و حفظ وضعیت سلامت این ماهی در جهت توسعه اقتصادی صنعت آبزی پروری پایدار اهمیت عمده ای دارد. بیماری های ماهی از جدی ترین تهدیدات اقتصادی در اعمال آبزی پروری است. اخیراً صنعت آبزی پروری تجاری ترجیح داده است که از هزینه های تولید ناشی از مصرف آنتی بیوتیک های مورد استفاده در پیشگیری و درمان بیماری ها و نیز از مصرف هورمون های رشد جهت بهبود و سرعت عملکرد رشد، بکاهد. با این وجود، به دلیل توسعه نژادهای مختلف مقاوم به آنتی بیوتیک ها، تجمع باقی مانده های دارویی در بدن ماهی و مشکلات محیطی در ارتباط با مصرف مواد شیمیایی منجر به بررسی راهکارهای مناسب برای مدیریت بیماری شده است. لذا، رویکرد جدید ایمنی درمانی در پیشگیری از شیوع بیماری ها، افزایش مقاومت، بهره وری تغذیه و عملکرد رشد ماهیان پرورشی به طور فعال در صنعت آبزی پروری پایدار مورد استفاده قرار گرفته است. در این راستا، تحقیقات گسترده ای برای آزمودن مواد جدیدی که منجر به توسعه پیدار شود انجام شده است.

از این رو طرح توسعه استفاده از گیاهان دارویی در آبزی پروری با چهار بخش مجزا نتایج تحقیقات خود را به شرح زیر نشان میدهند:

بخش اول: در این تحقیق، از عصاره خشک گیاهان مرزنگوش و صبر زرد و نیز دارونما (ترکیبی از ۷۰٪ لاکتوز، ۱۰٪ نشاسته و ۲۰٪ تالک) هر یک به میزان ۱ درصد و از لوامیزول به میزان ۰/۱ در صد وزن غذای ماهی استفاده شد. نتایج تحقیق نشان داد پودر عصاره خشک گیاهان مرزنگوش و صبر زرد به میزان ۱٪ وزن غذا موجب افزایش پاسخ های ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی بچه ماهیان قزل آلا رنگین کمان (۱۳ گرم و ۲ گرم) در هفته های یکسان (۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ هفته) گردیدند. از این رو، می توان از این عصاره ها در ترکیب با غذا جهت ارتقاء سیستم ایمنی در صنعت پرورش ماهی استفاده نمود.

بخش دوم: در این تحقیق از عصاره دو گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea*)و گون (*Astragalus sp.*) به منظور ارزیابی برخی از پارامترهای ایمونولوژی، بیوشیمیایی و هماتولوژی در بچه ماهیان قزل آلا (۱۶باوزن متوسط گرم و در دمای ۲۰-۱۴ درجه سانتی گراد) استفاده شد و مقاومت آنها در برابر استرپتوکوکوس اینیایی (Streptococcus iniae) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که مقادیر C3، لیزوزیم و رادیکال آزاد اکسیزن پس از ۶۰ روز افزایش معنی داری در تیمارهای حاوی گون و سرخارگل نسبت به تیمار کنترل داشته و غلظتهای بالاتر عصاره های مورد استفاده نیز نتایج بهتری به همراه داشته است. روند افزایشی C4 و IgM چشمگیر نبوده و در واقع دارای اختلاف معنی دار نبوده اند($P>0/05$). میزان آلبومین، پروتئین کل و گلوکز در انتهای آزمایش باکاهش نسبی همراه بوده است. در ارزیابی نتایج مربوط به شمارش فاگوسیتها مشخص گردید که تعداد

نوتروفیل هابعد از ۶۰ روز به طور معنی دار افزایش داشته ولی افزایش نسبی سایر پارامترها، معنی دار نبوده است (P>0/05). در مواجهه سازی ماهیان مورد آزمایش با باکتری فوق الذکر، مشخص شد که ماهیان دریافت کننده عصاره های گیاهان گون و سرخارگل(بالاترین غلظت مورد آزمایش) به ترتیب دارای ماندگاری ۹۳/۳۳ و ۹۱/۱۱ درصد بوده اند، در صورتی که در تیمار کنترل این تعداد ۴۴/۴۴ درصد بوده است. نتیجه گیری کلی آنکه اولاً گیاهان مورد استفاده دارای اثرات تقویت کننده بر سیستم ایمنی ذاتی بوده و غلظتهای بالاتر نتایج بهتری به همراه داشته است. از طرف دیگر استفاده از عصاره های گیاهی باعث افزایش مقاومت بچه ماهیان قزل آلا در برابر استرپتوکوکوزیس شده و بنظر می رسد می توان از آن به عنوان محرک ایمنی در جیره غذایی استفاده نمود.

بخش سوم: امروزه همگام با توسعه پرورش ماهیان خاویاری در کشور، لزوم توجه به سلامت آبزیان و استفاده از موادی با منشاء طبیعی در مبارزه با عوامل بیماریزای این ماهیان امری ضروری محسوب می گردد. در این راستا کاربرد گیاهان دارویی بجای مواد شیمیایی در کنترل عوامل ایجاد کننده بیماری از جمله انگلها حائز اهمیت می باشد. از آنجائیکه انگلهای تک یاخته ای خارجی از مهمترین عوامل انگلی خارجی تهدید کننده ماهیان خاویاری محسوب می شوند. لذا این تحقیق با اهداف تعیین غلظتهای کشنده عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهی ایرانی، بررسی اثر بخشی و تعیین دوزهای تأثیرگذار عصاره های مذکور در کنترل انگل تک یاخته ای تریکودینا انجام پذیرفت. این نتایج نشان داد که انگل مذکور از سطح آبشش و پوست بچه تاسماهیان ایرانی در تمامی تیمارهای عصاره هیدروالکلی سیر در مدت زمان ۹ ساعت بطور کامل حذف گردید. این زمان برای عصاره هیدرو الکلی آویشن شیرازی ۱۲ ساعت تعیین شد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی بترتیب با EC_{50} ، ۱۷۲/۵۸و ۴۳۷/۶۲ میلی گرم در لیتر در دسته مواد با سمیت کم طبقه بندی شده و جهت جایگزینی با مواد شیمیایی مناسب می باشند.نتایج این مطالعه نشان داد که شاخص درمانی عصاره هیدرو الکلی سیر معادل ۷۳/۱۵ بوده که نسبت به عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی با میزان ۲۲/۶۹ از مقدار بیشتری برخوردار بوده و بالطبع با توجه به تعریف این شاخص، از سلامتی بیشتری برخوردار است. با توجه به نتایج بدست آمده می توان به سلامتی عصاره های گیاهی مورد استفاده در این تحقیق و امکان جایگزینی این گیاهان دارویی با مواد شیمیایی تأکید نمود.

بخش چهارم: این تحقیق که به منظور بررسی تاثیر عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی بر روی باکتری آئروموناس هیدروفیلا در بچه تاسماهی ایرانی صورت پذیرفت نسبت به جداسازی و شناسایی باکتری مورد بررسی ،تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره های سیر و آویشن شیرازی،تعیین غلظتهای کشنده عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهی ایرانی و نیز بررسی اثر بخشی و تعیین دوزهای تأثیرگذار عصاره های مذکور بر روی باکتری آئروموناس هیدروفیلا در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) و کارگاهی (in vivo) اقدام

گردید. بررسی تصاویر تهیه شده از مقاطع بافتی آبشش، کبد و پوست بچه تاسماهیان ایرانی که تحت تأثیر غلظتهای مختلف عصاره هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی در آزمایش مربوط به تعیین غلظتهای کشنده قرار داشتند، برخی از آسیب های میکروسکوپیک نظیر پرخونی، چسبندگی در رشته های آبششی، نکروز سلولی، وجود رنگدانه های ملانین رشته های اولیه در آبشش، عوارضی نظیر تورم ابری در هپاتوسیتها ، نکروزسلولی، پرخونی، افزایش رنگدانه های ملانین و مراکز ملانو ماکروفاژها در کبد و نیز تغییراتی نظیر پرخونی اتساع فضای گلومرولی و مسدود شدن فضای بومن، خونریزی، نکروز سلولی، تورم ابری وهیپرتروفی را در کلیه نشان دادند.

لغات کلیدی: گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea*)و گون (*Astragalus sp.*)، گیاه مرزنگوش، قزل آلا رنگین کمان، سیر و آویشن شیرازی و باکتری آئروموناس هیدروفیلا

بخش اول:

مطالعه اثرات گیاهان دارویی مرزنگوش (*Origanum vulgareL.*) و صبر زرد (*Aloe vera*) بر سیستم ایمنی ماهی قزل آلا رنگین کمان پرورشی (*Oncorhynchus mykiss*)

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۶
۱- مقدمه ۹
۲- مواد و روش ها ۴۴
۳- نتایج ۶۴
۴- بحث و نتیجه گیری ۷۲
پیشنهاد ها ۷۹

چکیده

در سال های اخیر با وجود افزایش مصرف ماهی در جهان، ولی به دلیل عدم کنترل بسیاری از بیماری های شایع توسط پاتوژن های بیماری زای مختلف، تولید جهانی ماهی کاهش یافته است. ماهی قزل آلا رنگین کمان از ارجح ترین ماهیان سردآبی در صنعت آبزی پروری ایران است. افزایش سرعت رشد و حفظ وضعیت سلامت این ماهی در جهت توسعه اقتصادی صنعت آبزی پروری پایدار اهمیت عمده ای دارد. بیماری های ماهی از جدی ترین تهدیدات اقتصادی در اعمال آبزی پروری است. اخیراً صنعت آبزی پروری تجاری ترجیح داده است که از هزینه های تولید ناشی از مصرف آنتی بیوتیک های مورد استفاده در پیشگیری و درمان بیماری ها و نیز از مصرف هورمون های رشد جهت بهبود و سرعت عملکرد رشد، بکاهد. با این وجود، به دلیل توسعه نژادهای مختلف مقاوم به آنتی بیوتیک ها، تجمع باقی مانده های دارویی در بدن ماهی و مشکلات محیطی در ارتباط با مصرف مواد شیمیایی منجر به بررسی راهکارهای مناسب برای مدیریت بیماری شده است. لذا، رویکرد جدید ایمنی درمانی در پیشگیری از شیوع بیماری ها، افزایش مقاومت، بهره وری تغذیه و عملکرد رشد ماهیان پرورشی به طور فعال در صنعت آبزی پروری پایدار مورد استفاده قرار گرفته است. در این راستا، تحقیقات گسترده ای برای آزمودن مواد جدیدی که منجر به توسعه پایدار شود انجام شده است. اثبات شده است که محرک های ایمنی خوراکی با منشاء گیاهی موجب بهبود سیستم ایمنی ماهی در برابر عفونت با باکتری های مختلف خصوصاً آئروموناس هیدروفیلا، که عمده ترین باکتری مسبب تلفات سنگین در گونه های مختلف ماهی و خسارت اقتصادی مزارع پرورش ماهی است، گردیده اند. هدف از تحقیق حاضر، ارزیابی اثرات عصاره آبی- الکلی دوگیاه دارویی مرزنگوش *Origanum Vulgare* L و صبر زرد *Aloe vera* بر سیستم ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان پرورشی بود. در این تحقیق، عصاره آبی- الکلی به روش پرکولاسیون تهیه وسپس تغلیظ گردید و با دستگاه خلاء به صورت عصاره خشک در آمد. این تحقیق در دو مرحله انجام شد. در مرحله اول از ۱۲۰۰ عدد بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorynchus mykiss*) با میانگین وزن اولیه ۱۳ گرم و در مرحله دوم از ۲۴۰۰ عدد بچه ماهی قزل آلا رنگین کمان با میانگین وزن اولیه ۲ گرم استفاده شد. در هر مرحله، ماهی ها در ۴ گروه شامل: ۱) گروه تیمار با دارونما (شاهد منفی)، ۲) گروه تیمار با پودر عصاره خشک گیاه مرزنگوش، ۳) گروه تیمار با پودر عصاره خشک آلوئه ورا و ۴) گروه تیمار با لوامیزول (شاهد مثبت) و هر گروه شامل ۳ تکرار و مجموعاً در ۱۲ حوضچه گرد بتنی با حجم آب ۱۰۰۰ لیتر و جریان آب ۲/۵ لیتر در ثانیه توزیع شدند. در مرحله اول، از ۱۰۰ عدد بچه ماهی ۱۳ گرمی و در مرحله دوم از ۲۰۰ عدد بچه ماهی ۲ گرمی در هر حوضچه استفاده شد. در طول مدت آزمایشات تعدادی از فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب شامل دما، اکسیژن محلول و pH مورد اندازه گیری قرار گرفتند. در این تحقیق، از عصاره خشک گیاهان مرزنگوش و صبر زرد و نیز دارونما (ترکیبی از ۷۰٪ لاکتوز، ۱۰٪ نشاسته و ۲۰٪ تالک) هر یک به میزان ۱ درصد و از لوامیزول به میزان ۰/۱ در صد وزن غذای ماهی استفاده شد. در هر مرحله از آزمایشات، هر گروه از ماهیان، یک بار در روز و در

اولین نوبت غذایی برای مدت ۱۰ هفته با غذ ای حاوی مواد مذکور مورد تغذیه قرار گرفتند. در دیگر وعده ها، از غذای معمولی (بدون هیچگونه ماده افزودنی) تغذیه شدند. در طول مدت آزمایش از ماهیان، بیومتری وزن به صورت هفتگی و بیومتری طول هر ۲ هفته یک بار انجام گردید. برای اندازه گیری وزن، بیوماس کل ماهی در هر حوضچه بدست آمد و بر تعداد ماهیان همان حوضچه تقسیم شد. برای اندازه گیری طول ماهی نیز از هر حوضچه تعداد ۱۵ بچه ماهی به صورت تصادفی صید و میانگین طول محاسبه گردید. در پایان هر دو هفته یک بار (هفته های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰) پس از تغذیه با مواد مورد اشاره، از تعداد ۱۵ ماهی در هر گروه خون گیری به عمل آمد. خون گیری از ماهی های مرحله اول (۱۳ گرمی ها) به روش پونکسیون وریدساقه دمی و از ماهی های ۲ گرمی به روش قطع ساقه دمی انجام شد. جهت کاهش استرس از هر ماهی ۱ میلی لیتر خون در عرض ۱ دقیقه گرفته شد. در پایان هر دو هفته، ۲۴ ساعت پس از تغذیه از ۱۵ عدد ماهی در هر گروه (۵ ماهی از هر تکرار) جهت آنالیز شاخص های خونشناسی و سرولوژی، خون گیری انجام شد. نیمی از خون هر۵ عدد ماهی در لوله های سرولوژیک حاوی هپارین ریخته شد و به آهستگی تکان داده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد جهت انجام آزمایشات خونشناسی و نیمی دیگر در لوله های عاری از ماده ضد انعقاد برای مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا لخته تشکیل شود، سپس با دور ۲۰۰۰ برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سرم با دقت به وسیله میکروپیپت جدا و در لوله اپندروف جمع آوری و در فریزر جهت انجام آزمایشات سرولوژی نگهداری شد. نمونه های خون جهت اندازه گیری پارامترهای خونی شامل شمارش سلول های قرمز (RBC) و سفید خون (WBC)، شمارش سلول های افتراقی (مونوسیت، لنفوسیت ونوتروفیل)، میزان هموگلوبین خون و اندیس های گلبولی به ترتیب شامل متوسط غلظت هموگلوبین گلبولی، متوسط حجم گلبولی و متوسط هموگلوبین گلبولی (MCHC, MCV, MCH)، درصد هماتوکریت، و اندازه گیری پارامترهای بیوشیمیایی خون شامل میزان پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین و نیز اندازه گیری پارامترهای ایمونولوژیک شامل فعالیت انفجار تنفسی، فعالیت فاگوسیتوز فعالیت لیزوزیم به آزمایشگاه منتقل شد. نتایج آزمایشات در هر دو گروه وزنی (۱۳ گرم و ۲ گرم) نشان دادند که بین پارامترهای خون شناسی گروه های آزمایش با گروه دارونما در هفته های یکسان تفاوت آماری معنی دار وجود نداشتند ($P>0.05$)؛ ولیکن بین پارامترهای بیوشیمیایی و ایمونولوژیک در هفته های یکسان تفاوت آماری معنی دار وجود داشتند ($P<0.05$). میزان پروتئین تام، آلبومین، گلوبولین و نیز فعالیت های انفجار تنفسی، فاگوسیتوز و لیزوزیم در گروه های آزمایش بیشتر از گروه دارونما در هفته های یکسان بودند ($p<0.05$). در مقایسه تغییرات شاخص های ایمنی شناسی بین دو گروه سنی ۱۳ گرم و ۲ گرم در پایان هفته هشتم پس از تغذیه مشاهده شد که پاسخ های فعالیت انفجار تنفسی، فعالیت فاگوسیتوز و فعالیت لیزوزیم سرم در بچه ماهیان ۱۳ گرمی بیشتر از بچه ماهیان ۲ گرمی بودند$p<0.05$). در نتیجه پودر عصاره خشک گیاهان مرزنگوش و صبر زرد به میزان ۱٪ وزن غذا موجب افزایش پاسخ های ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی بچه ماهیان قزل آلا رنگین کمان (۱۳ گرم و ۲ گرم) در هفته های یکسان (۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ هفته) گردیدند. از

این رو، می توان از این عصاره ها در ترکیب با غذا جهت ارتقاء سیستم ایمنی در صنعت پرورش ماهی استفاده نمود.

کلید واژگان: محرک های ایمنی؛ گیاهان دارویی ایران؛ ماهی؛ فعالیت انفجار تنفسی؛ لیزوزیم؛ فاگوسیتوز؛ نوتروفیل؛ ماکروفاژ؛ پروتئین تام

۱- مقدمه

۱-۱- گیاه مرزنگوش یا مرزنجوش وحشی *Origanum vulgare*

این گیاه از خانواده *Lamiaceae*، تیره نعناع *Labiatae* با نام علمی *Origanum Vulgare* L و نام انگلیسی Wild marjoram و Oregano marjoram و نام‌های فارسی مرزنجوش، مرزنگوش، آویشن کوهی، پونه کوهی و نام های عربی فودنج جبلی، صعتر می باشد. این گیاه به دلیل داشتن عطر خاص و کیفیت آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریایی اش در دنیا شناخته شده است.

گیاه شناسی

مرزنگوش وحشی گیاهی است پایا و ارتفاع آن بسته به منطقه رویشی به ۹۰-۳۰ سانتی متر می رسد. این گیاه دارای ساقه ای راست، منشعب، پوشیده از کرک و به رنگ سبز مایل به قرمز است. ساقه در قسمت های فوقانی شاخه دار بوده و در نوک شاخ ها خوشه ای از گل های بنفش می روید. برگ های این گیاه متقابل، تخم مرغی یا بیضی شکل و سبز تیره با اندازه های متغیر ۵ -۳ سانتی متر است. حاشیه برگ‌ها صاف یا کنگره‌ای است. سطح تحتانی پهنک و کناره های آزاد آن پوشیده از کرک است. این گیاه دارای گل های مجتمع گلی یا سفید رنگ به‌طول ۷ ـ ۴ میلی متر است که در ماه های تیر تا شهریور ظاهر می شوند. گل های آن دارای کاسه منتهی به ۵ دندانه مساوی و جام بزرگتر از کاسه است. درون جام گل دو پرچم بزرگ و ۲ پرچم کوچک جای دارد. میوه آن چهار فندقه ای و محصور در بقایای کاسه گل است. در بین پایه های متعدد این گیاه در یک ناحیه غالباً دو نوع گل دیده می شود. یکی گل هایی با وضع طبیعی و مشخصاتی منطبق با آنچه که ذکر شد و دیگری گل هایی که پرچم های آنها رشد کمتری داشته ولی مادگی آن ها بزرگتر از حالت طبیعی است.

انتشار جغرافیایی در جهان

گیاه مرزنگوش به حالت خودرو در نواحی خشک، سواحل دریاها، دامنه کوهستان ها و جنگل های نواحی مختلف اروپا و نواحی جنوب غربی و مرکزی آسیا می روید. منشاء این گیاه نواحی مدیترانه ای می باشد و در کشورهای دارای آب و هوای مدیترانه ای کشت می شود. مرزنجوش زیر گونه های متفاوتی بنام *barcense*، *viride* و *prismaticun* دارد که معمولاً در مناطق جنگلی و روی دیواره‌های پرشیب و گاهی در میان صخره‌ها می‌روید.

انتشار جغرافیایی در ایران

سه گونه مرزنگوش در ایران به حالت وحشی با نام های *Origanum vulgare L.* در لاهیجان، بندرانزلی، تالار، آستارا، چمن های مرطوب آبدار حوالی لنگرود، *Origanum Strobilaceum* در ارتفاعات بین تنکابن و چورته و

Origanum viride Boiss در شاه پسند، بهشهر، بین عباس آباد و قائم شهر، آمل، کجور، نوشهر، گردنه حیران، رشت، بین بجنورد و تپه مراوه انتشار دارند (قهرمان، ۱۳۸۳).

زمان برداشت

برداشت محصول بستگی به شرایط اقلیمی محل رویش گیاه دارد. قسمت‌های مورد استفاده مرزنجوش وحشی سر شاخه‌های گلدار آن است. از این رو اولین برداشت در همین مرحله انجام می گیرد. برای مصارف طبی سرشاخه های آن را در اوایل گل کردن گیاه در وسط روز جمع آوری می کنند. هنگام برداشت، پیکر رویشی از ۴۰ سانتی متری قسمت فوقانی بریده می شود. قسمت های جمع آوری شده را در لایه های نازک به طور دسته ای در سایه در حرارت کمتر از ۳۵ درجه سانتی گراد و در محلی که هوا کوران دارد آویزان کرده تا خشک شوند و یا به وسیله خشک کن الکتریکی، در حرارت ۴۰ درجه سانتی گراد خشک می کنند. گیاه خشک شده معطر بوده و طعم تلخ دارد. در سال اول تنها یک بار می توان محصول را برداشت نمود. اما از سال دوم به بعد می توان دو و یا حتی سه بار محصول برداشت کرد. این گیاه در مرحله گل دهی (اواخر خرداد یااوایل تیر) حاوی حداکثر مقدار اسانس (۰/۴درصد) است. پس از رویش مجدد گیاه و تولید شاخ و برگ های جدید و نمو گل ها، ماه های مرداد تا مهر زمان مناسبی برای دومین برداشت خواهد بود. مقدار برداشت محصول در هر هکتار ۲ تا ۳ تن می باشد. نسبت اندام تازه به خشک ۶-۵ به ۱ می باشد.

ترکیبات شیمیایی

مرزنگوش وحشی حاوی موادی چون تانن ها، صمغ، اسانس روغنی فرار، ماده تلخ، مقادیری تیمول، گلوکوزید و سابونوزید است (Gottumukkala Venkateswara*etal*., 2011; Prathyusha*et al*., 2009; Koukoulitsa *et al*., 2006)، که از آنها در ترکیبات جوشانده های ضد سرفه استفاده می کنند. مواد اصلی این گیاه تیمول و کارواکرول با خواص آنتی اکسیدانی است (Drãgan *et al*., 2008).

خواص و اثرات دارویی

طبع مرزنگوش وحشی گرم و خشک است. این گیاه دارای اثرات مقوی معده و بادشکن، معرق، ضد تشنج، خلط‌آور، مسکن سرفه، ضد اسهال، ضد التهاب (Silva *et al*., 2012)، مقوی عمومی بدن، تنظیم کنندگی قاعدگی، ادرار آور، ضدعفونی کنندهٔ مجاری تنفسی است و اسانس آن اثر تصفیه‌کننده خون دارد. مرزنجوش وحشی در موارد سوء هاضمه، عفونت‌های مجاری تنفسی، کورک و آبسه، سرفه، نزله‌های مزمن، آسم مرطوب، زردی، درد گلو، دردهای عصبی، آب‌آوردگی انساج، تأخیر حالت قاعدگی، دردهای ماهانه زنان، ضدعفونی کننده، خلط‌آور، ضد تشنج، استسقاء به‌کار می‌رود. این گیاه عطر دهنده خوبی است و برای معطر ساختن گوشت های چرخ کرده بکار می برند.

شکل ۱-- گیاه مرزنگوش

شکل ۱-۲- نمای شماتیک قسمت های مختلف گیاه مرزنگوش

شکل ۱-۳- سرشاخه های خشک شده گیاه مرزنگوش

۲-۱-گیاه صبرزرد یا آلوئه ورا *Aloe vera*

این گیاه با نام علمی *Aloe vera*، نام انگلیسیAloe و نام های فارسی صبر زرد، صبر تلخ، شاخ بزی و سگل است. آلوئه ورا (*Aloe vera*) گیاهی بادوام و گوشتی است. این گیاه، خاص مناطق آفریقایی است که به آن زنبق بیابانی

یا صحرایی هم می گویند. آلوئه ورا از مهمترین و شناخته ترین گونه های جنس آلوئه است. در برخی کشورها با نام هایی چون گیاه جاودانگی، گیاه دارویی، گیاه ملکه و نیز سایر اسامی نامیده می شود. نام این گیاه از زبان عربی به سایر زبان ها آمده است. در زبان عربی آلوئه به معنای «تند و تیز و تلخ» است. علت این نامگذاری مربوط به طعم و مزه مایع داخل برگ این گیاه می باشد. وقتی برگ آن بریده شود، ژلی از داخل گیاه خارج می شود که اثر دارویی خارق العاده ای دارد. نخستین بار مصری ها از این گیاه برای درمان زخم ها، سوختگی ها و عفونت ها استفاده کردند. پس از آن یونانی ها، اسپانیایی ها و آفریقایی ها به شیوه ها و منظورهای مختلف از این گیاه استفاده می کردند. برای مثال شکارچیان آفریقایی از ژل آن بر بدن خود می مالیدند تا عرق نکنند و بدنشان بوی بد نگیرد. از دهه ۱۹۳۰ به بعد تحقیقات علمی وسیعی بر روی ترکیبات و خواص دارویی این گیاه انجام شد. گزارش شده که ژل صاف شده این گیاه قدرت عجیبی در درمان زخم ها و سوختگی ها دارد (Choi *et al.*, 2001). تاکنون از این گیاه به عنوان یک گیاه شفا دهنده برای مقاصد مختلف پزشکی استفاده کرده اند. ژل غلیظ و شفاف موجود در بخش داخلی برگ این گیاه در انواع زخم ها استفاده می شود. شیره زرد رنگ با طعم تلخ این گیاه که از لایه بیرونی برگ این گیاه بدست می آید دارای ترکیبات آنتراکوئین بوده که خواص ملینی قوی دارد (Vogler and Ernest, 1999). آلوئه ورا در تمامی مواد آرایشی، بهداشتی و داروهای ترمیمی، جایگاه مصرفی وسیعی دارد. از آلوئه ورا در صنایع آرایشی و بهداشتی شامل انواع کرم‌ها، لوسیون‌ها، شامپوها، صابون‌ها، شوینده‌ها، تولید دستمال کاغذی و حتی تولید پوشک بچه ها استفاده می‌شود.

گیاه شناسی

آلوئه ورا، *Aloe vera* یک گیاه بادوام و گوشتی باگل های زرد است. برگ های پهن تیغ دار، نیزه ای و آبدار این گیاه به اندازه ۵۰ سانتی متر و طول کل گیاه به ۲ متر می رسد. آلوئه ورا گیاهی است که به طور عمده در مناطق خشک رشد می کند. آلوئه ورا با اینکه به خانواده زنبق تعلق دارد اما در ظاهر شباهت بسیار زیادی به کاکتوس دارد. بیش از ۲۴۰ گونه آلوئه ورا در جهان شناسایی شده اند که از این میان چهار گونه آن دارای ارزش غذایی هستند. تنها برگ های این گیاه ارزش دارویی دارند، اما بخش های مختلف برگ ها نیز برای اهداف گوناگونی مورد استفاده قرار می گیرند. از قسمت های داخلی برگ های این گیاه ژله شفاف و سفتی ترشح می شود. اگر تیغ هایی را که در لبه برگ ها قرار دارند جدا کنیم از جای خالی آنها ژلی ترشح می شود که بسیاری از خواص گیاه در آن نهفته است. بین این ژله و پوست بیرونی برگ سلول های خاصی حاوی مایع زرد رنگ تلخ قرار دارد. وقتی که این مایع خشک می شود، سبب تولید شیره *Aloe* می شود. گیاه آلوئه که به نام شاخ بزی معروف است، در منزل وآپارتمان قابل نگهداری است. آلوئه‌ورا گونه وحشی این خانواده است که گرچه زینتی نیست اما معروف و پر بهاء است و یکی از منابع بسیار خوب مواد دارویی و بهداشتی است. در میان آلوئه‌ها، آلوئه سایوناریا و آلوئه آربورسنس، *Aloe arboresence* در منزل کشت و کار مناسب‌تر و سریع تری

دارند. تکثیر گیاهان آلوئه بوسیله قلمه، ساقه و بذرامکان‌پذیر است. گیاه آلوئه شاخه گل دهنده زیبا با گل‌های نارنجی دارد. وقتی گل‌های نارنجی به بذر تبدیل می‌شوند، قابل رویش و جوانه زدن هستند. آلوئه ورا بوسیله تقسیم بوته و بذر تکثیر می‌شود. امکان بوجود آمدن پاجوش بر روی ریشه‌های اصلی آلوئه ورا بیشتر از دیگر آلوئه‌ها است.

انتشار جغرافیایی در جهان

آلوئه ورا سابقه ای بسیار طولانی و درخشان دارد. اولین گزارش مکتوب متعلق به چهار هزار سال پیش از میلاد مسیح است و در غارنوشته ها و کنده کاری های روی ظروف در معابد باستانی مصرکشف شده است. نخستین بار این گیاه در کشور مصر مورد استفاده قرار گرفت. حدود سال ۱۵۵۲ پیش از میلاد بود که ملکه زیبای مصری «کلئوپاترا» اعلام کرد زیبایی خود را مدیون استفاده از این گیاه معجزه گر است. کلئوپاترا ملکه مصر پوست خود را هر روزه با آن ماساژ می داد که از شر آفتاب مصر در امان باشد. در افسانه های به جای مانده از مصر باستان آمده است که آلوئه گیاهی چنان گرامی بوده که افراد برای حضور در مراسم پس از مرگ یک فرعون باید تحفه ای ازبرگ های آلوئه ورا تقدیم می کردند. همچنین مصریان آنرا برای مومیایی مردگان خود بکار می بردند. نام این گیاه در کتاب مقدس به کرات ذکر شده است. اما تنها مصریان باستان نبودند که آلوئه ورا را می شناختند. بلکه شهرت این گیاه باعث ایجاد جنگ و خونریزی هم شد. براساس منابع قدیمی ارسطو یکی از طرفداران بسیار معتقد به خواص آلوئه ورا بوده است. او رایزن الکساندر کبیر نیز بوده است. قدر و ارزشی که او برای آلوئه ورا قائل بود چنان بوده است که او در سال ۳۳۳ قبل از میلاد الکساندر را که مصر را فتح کرده بود

متقاعد نمود جزیره سوکوترا Socotra در اقیانوس هند را تصرف کند. زیرا این جزیره به دلیل رویش آلوئه ورا در آن شهرت داشت و در آن زمان برای درمان زخم های سربازان سپاه الکساندر از آلوئه ورا استفاده شد. آلوئه ورا در طب سنتی ۵ هزار ساله هندی، آیورودا Ayurveda، نیز به همین ترتیب ارزشمند شمرده می شود. تمدن های یونانی، رومی، آفریقایی، مایایی، سرخپوستان آمریکایی و چینی نیز آلوئه ورا را گرامی می داشتند. همچنین، مسلمانان بسیاری از نقاط جهان در بازگشت از سفر حج، برگ های آلوئه ورا را بالای در خانه هایشان آویزان می کنند. براساس مطالبی که توسط دانشگاه فلوریدا منتشر شده، منشاء این گیاه که به علت رویش آن در مناطق بیابانی به لاله بیابان مشهور است، آفریقا بوده و در ایران باستان از آن استفاده می‌شد. در کشورهای کارائیب، آلوئه‌ورا فقط به‌صورت برگ فروخته می‌شود و در خانه‌ها مردم به عنوان کمک های اولیه از آن نگه داری می‌کنند. یکی از دلایلی که این گیاه از آفریقا به مناطق دیگر جهان منتقل شده است مؤثر بودن آن در درمان برخی بیماری ها بود و مسافرانی که با لنج ها به سفر دریایی می‌پرداختند، این گیاه را به عنوان کمک های اولیه به همراه خود می‌بردند.

انتشار جغرافیایی در ایران

براساس اظهار نظرسالخوردگان قشمی، گیاه آلوئه ورا یا صبر زرد از سالیان طولانی در جزیره قشم وجود داشته است و خاستگاه آن آفریقا است. به نظر می رسد، در طی قرون گذشته این گیاه توسط بازرگانان یا جهان گشایان به جزیره قشم حمل شده و با سازگاری با شرایط آب و هوای قشم و به علت اثرات شفابخش آن به گیاه معجزه گر مشهور شده است. صبر نام فارسی آلوئه است و صرف نظر از مصارف درمانی آن توسط افراد بومی، آن را روی قبرها می کارند ونشانه ای از محل خاکسپاری کسی است که فوت شده است. برگزیدن نام صبر برای این گیاه نیز احتمالاً ایجاد آرامش و صبر برای بازماندگان است. در جزیره قشم تراکم بسیار زیاد گیاه را در قبرستان قدیم شهر سوزا به صورت چند هکتار فشرده که عملاً قبرها را کاملاً در بر گرفته است، می توان مشاهده کرد. مرکز پژوهش های بیوتکنولوژی خلیج فارس در جزیره قشم ایران ، تنها عضو منطقه خاورمیانه این انجمن است که مقر آن در تگزاس آمریکا می‌باشد. بر اساس تجارب پژوهشی، مرکز پژوهش های بیوتکنولوژی خلیج فارس منطقه آزاد قشم، کارخانه تولید صنعتی آن را با ظرفیت سالانه ۲۰۰ تن ژل و پودر آلوئه طراحی و تدوین و دانش فنی آن را به یک شرکت خصوصی واگذارکرده است. پشتوانه این واحد صنعتی، کشت و پرورش آلوئه ورا به مساحت ۵۰ هکتار است که ۵ هکتار توسط منطقه آزاد قشم، ۱۵ هکتار توسط شرکت خریدار دانش فنی و ۳۰ هکتار توسط مردم جزیره قشم باید کاشته شود. تکثیر آلوئه ورا به صورت تولید پاجوش و کاشت بذر است. در بسیاری ازموارد هر بوته تا ده پاجوش تولید می کند. این گیاه پایدار و چند ساله است و هرسه ماه یک بار می توان از هر بوته ۳ تا ۴ برگ کناری برداشت و برای استخراج محصول درکارخانه مورد استفاده قرار داد. توسعه کاشت آلوئه ورا توسط مردم جزیره قشم صرف نظر از تأمین

ماده اولیه کارخانه در دست احداث، زمینه ای مناسب برای ایجاداشتغال بومی، ایجاد فضای سبز (در زمین های ساحلی و غیر قابل استفاده کشاورزی و بی نیازی آن به آب شیرین و آبیاری دایم) است.

نیازهای اکولوژیک

آلوئه ورا گیاهی است که برای ماندن و رشد به حداقل آب نیاز دارد و در خاک های شور و ساحلی به آسانی رشد و پرورش می یابد و نسبت به آفات و بیماری ها مقاوم است. جزیره قشم به دلیل قرار گرفتن در منطقه گرمسیری یکی از مکان های مناسب و دارای پتانسیل بالا برای تولید گیاه معجزه‌آسای آلوئه ورا است. آلوئه ورا از جمله گیاهانی است که در صفر درجه سانتی گراد می‌میرد و محیط رشد آن معمولاً باید بالاتر از ۲ درجه سانتی گراد باشد و به‌همین دلیل‌مناطق جنوبی کشور که درجه حرارت دراین مناطق به صفر درجه نمی‌رسد از مناطق مستعد برای تولید این گیاه محسوب می‌شوند. بیماری در این گیاه نسبت به سایر گیاهان بسیار کم تر اتفاق می افتد.

زمان برداشت

برگ بوته‌های گیاه دارویی صبر زرد یا آلوئه ورا معمولاً بعد از گذشت دو سال از زمان کاشت و هنگامی که بوته‌ها به اندازه کافی رشدکردند برداشت می‌شود. این گیاه از جمله گیاهانی است که یک سال کاشته می‌شود و تا شش سال مورد استفاده قرار می گیرد.

ترکیبات شیمیایی آلوئه ورا

۹۶ درصد ساختمان ژل آلوئه ورا از آب تشکیل شده است. ۴ درصد مابقی حاوی مواد فراوانی است که ۷۵ نوع آن شناخته شده اند. ژل آلوئه ورا بیش از ۷۵ ماده مغذی ازلحاظ غذایی، ۲۰۰ ترکیب فعال، ۲۰ نوع ماده معدنی، ۱۸ نوع آمینو اسید و ۱۲ نوع ویتامین است. این ژل بی نهایت مطبوع است. آلوئه ورا حاوی موادی نظیر آلوئین، فامودین، آنتراکینون، ایزوباربالوئین و در حدود ۱۲ درصد صمغ می باشد (Atherton, 1998; Shelton, 1991; Mandrioli *et al*., 2011). پلی ساکاریدها ترکیباتی هستند که در ژل آلوئه ورا یافت شده اند. ژل آلوئه ورا حاوی گلیکوپروتئینی است که از تورم و درد جلوگیری و روند بهبود را تسریع می بخشد. همچنین ژل آلوئه ورا حاوی ترکیبی است که موجب تحریک رشد و ترمیم پوست می شود. آسمانان Acemannan یک کربوهیدرات کمپلکس موجود در ژل آلوئه ورا است که دارای اثر قوی در تولید سیتوکین است و فعالیت ضد تومور و ضد ویروس دارد و همچنین دارای خاصیت تحریکی در ترمیم زخم است. در ژل آلوئه ورا آنتی اکسیدان هایی در قالب ویتامین هایA، B_1، B_2، B_6، B_{12}، C، E، اسید فولیک و نیاسین، آمینو اسیدها و اسیدهای چرب ضروری است که بدن انسان به سادگی نمی تواند بعضی از این ویتامین ها را ذخیره کند (Singh *et al*., 2000; Yagi *et al*., 2002,

2003; Wu *et al*., 2006). این گیاه حداقل دارای سه اسید چرب با خاصیت ضدالتهابی است که برای معده، روده کوچک و روده بزرگ مفید است. آلوئه ورا با خاصیت اعجاب انگیز خود می تواند تمام اسید آمینه های ضروری بدن را در اختیار شخص مصرف کننده قرار دهد. هیچ چیز این گیاه به تنهایی شگفت انگیز و خارق العاده نیست بلکه همراهی و یک جا جمع شدن تمام مواد مورد نیاز بدن از گروه های مختلف غذایی است که آن را منحصر به فرد کرده است. از دیگر ترکیبات این گیاه، بعضی از مواد معدنی است که شامل کلسیم، سدیم، آهن،پتاسیم، کلر، منگنز، مس و روی است. آلوئین (Aloin) دیگر ترکیب موجود در آلوئه ورا است که خاصیت ملینی بسیار قوی دارد. آنتراکوئین موجود درشیرهٔ آلوئه ورا به عنوان مسهل مؤثر عمل می کند. اما چون می تواند سبب گرفتگی دردناک عضلات شود، غالباً استفاده نمی شود.این مواد شیمیایی در مقادیر کم، از تشکیل سنگ کلیه جلوگیری می کنند. آلوئین B موجود در گیاه، محرک سیستم ایمنی می باشد و نیز دارای خاصیت مهاری بر روی پروستاگلاندین ها می باشد و به همین دلیل اثرات ضد التهابی دارد (Davis *et al*., 1994; Vázquez *et al*., 1996; Esua and Rauwald,2006). ترکیبات فعال پلی ساکارید، پروتئین و گلیکوپروتیئن موجود در این گیاه دارای فعالیت فاگوسیتوزی بوده که در درمان آسم برونشیال بزرگسالان مؤثر است (Shida*et al*., 1985).

خواص و اثرات دارویی آلوئه ورا

قرن هاست که برگ‌های گیاه صبر زرد به طورگسترده‌ای در کشورهای مختلف به عنوان دارو مصرف می‌شود. اثرات درمانی مختلفی که برای این گیاه عنوان شده غالباً بر اساس سابقه طب سنتی است؛ اما درسالهای اخیر مطالعات بالینی نیز روی آن صورت گرفته است. یک مطالعه گسترده نشان می دهدکه استفاده موضعی از ژل این گیاه موجب التیام زخم‌های به جا مانده از آکنه روی صورت شده است (Jones, 2004). ژل گیاه صبر زرد به صورت موضعی برای درمان سوختگی‌های خفیف، آفتاب سوختگی، بریدگی ها، آکنه (Fulton, 1990) و التهاب مخاط دهان کاربرد دارد.کاربرد موضعی آلوئه ورا بر روی زخم‌های جراحی مجاز نیست زیرا موجب تأخیر در بهبود و التیام زخم‌ها می شود (ضیایی و همکاران، ۱۳۸۴). این گیاه دارویی در درمان آرتریت، آسم، سندرم خستگی مزمن، صرع، سوء هاضمه و اختلالات روده‌ای مانند یبوست آتونیک، سندرم روده تحریک پذیر، کولیت اولسراتیو (Kathi and Kemper, 1999; Davis *et al*., 2006)، اختلالات پوستی مانند اگزما، سوختگی، عفونت قارچی پا (Zawahry *et al*., 1973; Rosca-Casian*et al*., 2007)، هرپس تناسلی (Syed *et al*., 1996b, 1997)، آسیب‌های ورزشی و زخم‌های داخلی و خارجی اثر بخش است. در منابع دارویی فهرست مصارف آلوئه ورا تقریباً به اندازه فهرست مواد تشکیل دهنده آن طویل است. از بارزترین خواص آلوئه ورا جلوگیری از ضایعات پوستی و ترمیم آن است. مصرف خوراکی آلوئه ورا به گوارش غذا کمک می کند، سلامتی قلب (Yagi *et al*., 1982) و عملکرد کبد (Singh*et al*., 2000) را بهبود می بخشد، قند خون (Beppu*et al*., 1993; Vogler and Ernest, 1999) و کلسترول خون (Nassiff *et al*, 1993) را کنترل میکند، تولید انرژی را افزایش می دهد، درد مفاصل را

تسکین می بخشد، شش ها را پاک می سازد، موجب تقویت سیستم ایمنی بدن (t'Hart *et al*., 1989; Pugh *et al*., 2001) و تحریک رشد می شود (Tan and Vanitha, 2004).

اما با وجود خواص بسیار آلوئه ورا، پزشکان مصرف خوراکی آن را برای خانم ها در طول دوران بارداری و شیردهی منع می کنند. گزارشاتی نیز مبنی بر ایجاد هپاتیت حاد در مصرف خوراکی آلوئه ورا وجود دارند (Mueller and Stopper, 1999; Rabe *et al*., 2005; Kanat*et al*., 2006; Bottenberg *et al*., 2007). از عوارض مصرف موضعی آلوئه ورا سوزش (Fulton, 1990)، درماتیت تماسی (Williams *et al*., 1996) و خارش خفیف (Syed *et al*., 1996a, 1997) در بعضی بیماران گزارش شده است که همه این عوارض برگشت پذیر بوده و اصولاً تحمل به مصرف آلوئه ورا بسیار خوب است. از آلوئه ورا که امروز در تمام دنیا کاشته می شود برای درمان گستره وسیعی از بیماری ها از انواع میگرن گرفته تا سوءهاضمه، درمان جوش و سوختگی استفاده می شود. ژل آلوئه ورا برای درمان بسیاری از بیماری ها مفید است، از آن جمله می توان به درمان اگزما و سایر مشکلات و حتی عفونت های پوستی، سرمازدگی، سوختگی، ترمیم جای عمل سزارین، هموروئید (Eshghi *et al*., 2010) و انواع دیابت (Yongchaiyudha *et al*., 1996; Bunyapraphatsara *et al*., 1996; Chalaprawat, 1997) اشاره کرد. شیرهٔ این گیاه مسهل مفیدی است (Schorkhuber *et al*., 1998). این ماده به عنوان تسهیل کننده دفع مدفوع به ویژه در افرادی که مبتلا به بواسیر هستند مفید است. عصارهٔآلوئه وراشکل ژل این گیاه است که مصارف داخلی دارد و چون دارای خواص ضد میکروبی است، از آن برای درمان عفونت های میکروبی مجاری معده ای- روده ای نیزمی توان استفاده کرد. چون این ماده اسیدهای معده را که سبب تشدید زخم ها می شود، کاهش می دهد برای درمان زخم های معده نیز مؤثر است. تحقیقات اخیرنشان داده که مانوز استیله به عنوان یک ترکیب ضد ویروسی، دارای خواص درمانی ضد ویروس ایدز است. مانوز استیله، ویروس را مورد حمله قرار می دهد اما مهم تر اینکه، میزان تأثیر AZT (3'-Azido-3'-Deoxythymidine)، داروی مؤثر در درمان HIV را تا حد زیادی افزایش می دهد. اگر این ترکیب دارویی باآلوئه ورا مصرف شود، میزانAZT، را می- توان تا ٪۹۰ تقلیل داد که این امر از هزینه ها و عوارض جانبیAZT تا حد زیادی خواهد کاست (Kathi and Kemper, 1999).همچنین دانشمندان اسپانیایی از گیاه آلوئه ورا ژلی ساخته‌اند که می‌تواند عمرنگه داری میوه‌ها را طولانی‌تر کند. با استفاده از این ژل می‌توان میوه‌ها را پوشاند و زمان نگه داری آنها را با حفظ تازگی و بدون تغییرات شیمیایی طولانی‌تر کرد. محققان اسپانیایی می‌گویند با استفاده از این ژل خوردنی می‌توان میوه‌ها را تازه نگه داشت .این ژل که طعم و ظاهر غذاها راتغییر نمی‌دهد می‌تواند به صورت یک پوشش کاملاً طبیعی و بی‌ضرر جایگزین مواد نگه دارنده مصنوعی شود که بعد از برداشت میوه‌ها به آنها اضافه می‌شود (Valero, 2005).

تاریخچه مصرف آلوئه ورا در قرن بیستم

استفاده بالینی از گیاه آلوئه ورا در سال **۱۹۳۵**برای درمان التهاب های پوستی (درماتیت) ناشی از اشعه ایکس ثابت شد. در یک کارآزمایی بالینی دو سو بی خبر، ژل آلوئه ورا را به عنوان ماده پیشگیری کننده از آسیب پوستی ناشی از اشعه مورد ارزیابی قرار گرفت (Williams *et al*., 1996). در آن سال نشریه رونتولوژی (رادیولوژی‌آمریکا) استفاده از این گیاه را برای این منظور توصیه کرد. به صورت سنتی، از پماد وشیره این گیاه برای درمان زخم ها، اگزما، بواسیر و حتی نابینایی استفاده می کردند. اما امروزه در تحقیقات بالینی مستمری که بر روی این گیاه انجام شده است، تنها بعضی از اثرات آن ثابت شده است. در کاهش درد سوختگی و ترمیم ناحیه سوختگی (البته سوختگی های درجه دو و سه مانند آفتاب سوختگی و یا سوختگی ناشی از اشعه) مؤثر است. مصرف خوراکی آن به عنوان مسهل کاربرد دارد. ژل این گیاه به دلیل داشتن آب فراوان و روغن موجود در خود، از خشک شدن پوست جلوگیری می کند، در نتیجه در ترمیم ناحیه سوختگی مؤثر است. همچنین به علت وجود درصد بالای قند در ژل آن، باعث بالا رفتن خاصیت اسمزی شده و از رشد باکتری ها جلوگیری می کند. برخی از تحقیقات حاکی از آن است که ماده آنتروکینون موجود در شیره گیاه، خواص ضد ویروس، ضد باکتری (Vogler and Ernest, 1999)، ضد التهابی، فعالیت ضد آرتریت و کاهنده قند خون (Newall *et al*., 1996)، و فعالیت ضد سرطانی (Singh *et al*., 2000; Lee *et al*., 2000; Pecere*et al*., 2003; Sampedro *et al*., 2004) دارد. در خصوص تداخلات دارویی هنگام استفاده از این ژل، عنوان شده است که اثرات پایین آورندگی قند خون گلی بن کلامید را به خاطر داشتن اثر ضد قند خون افزایش می دهد (Volger and Ernest, 1999) و بر اثر ضدالتهابی هیدروکورتیزون استات به هنگامی که به عنوان یک حامل استفاده شود، می افزاید (Kathi and Kemper, 1999). این گیاه در درمان بیماری پسوریازیس psoriasis به صورت عصاره در کرم در طی تحقیقات بسیاری، ثابت شده است (Syed *et al*., 1996a; Choonhakarn *et al*., 2010). مصرف این گیاه به عنوان مسهل در بیمارانی که تحت درمان با داروهای قلبی وکورتون هستند باید با احتیاط بسیار صورت گیرد. این گیاه در کودکان، زنان شیرده و باردار و نیز افراد مبتلا به بواسیر، نباید به صورت خوراکی مصرف شود. استفاده از این گیاه درانسداد روده، بیماری های التهابی روده و بیماری های کبد و کلیه، ممنوع است. همچنین از شیره برگ گیاه برای بهبود زخم های سطحی و اگزما استفاده می شود.

۳-۱- لوامیزول Levamisole

لوامیزول یک فنیل امیدازول تیازول صناعی است که به عنوان داروی ضد کرم هم در پزشکی و هم در دامپزشکی به طوز وسیعی استفاده می شود (Janssen, 1976). قدرت این ماده در افزایش پاسخ لنفوسیت های- T و ماکروفاژها هم در افراد سالم (Renoux, 1980) و هم در افرادی که دچار سرکوب ایمنی هستند (Amery, 1988; Morimoto *et al*., 1979; Ogubiyi *et al*., 1978) به خوبی مستند شده است. در ماهی از لوامیزول به عنوان افزایش

دهنده پاسخ ایمنی غیر اختصاصی (Siwicki, 1987, 1989; Kajita *et al*., 1990; Baba *et al*., 1993) و یاور واکسن ها (Anderson and Jeney, 1992; Jeney and Anderson, 1993) استفاده شده است. در تحقیقات انجام شده بر روی ماهی به روش *in vivo*، از لوامیزول به صور غوطه وری (Siwicki and Korwin-Kosskowski, 1988)، تزریقی (Siwicki, 1987) و خوراکی (Siwicki, 1989; Siwicki and Studinicka, 1994; Mulero *et al*., 1998; Alvarez *et al*., 2006; Abdelkhalek, *et al*., 2008) و یا در روش *in vitro* (Siwicki, *et al.,* 1992) استفاده شده است. نتایج حاصله از این تحقیقات نشان می دهند که از لوامیزول در ماهی می توان به عنوان محرک ایمنی بالقوه استفاده نمود ولی ضروری است که به مقدار و مدت زمان مصرف آن توجه خاصی نمود زیرا که اثر آن به مقدار تجئیز و مدت زمان مصرف بستگی دارد. مقادیر زیاد لوامیزول ممکن است موجب سرکوب پاسخ ایمنی، و مقادیر بسیار کم بی تأثیر باشد. مدت زمان هر گونه افزایش پاسخ ایمنی در ماهی پس از تجویز لوامیزول و نیز مدت زمان محافظت از مواردی هستند که باید تعیین شوند. لوامیزول به دلیل داشتن اثر بالقوه در تحرک سیستم ایمنی ماهی، منافع قابل توجهی را در طرح های فعلی آبزی پروری جهت مبارزه با بیماری های باکتریایی و انگلی ماهی داشته است، چنان که سازمان غذا و داروی آمریکا، لوامیزول را برای درمان عفونت های کرمی در نشخوار کنندگان تأیید نموده است. . نشان داده شده است که لوامیزول قادر به تنظیم افزایش پاسخ ایمنی غیر اختصاصی در انواعی از ماهیان شامل ماهی کپور، قزل آلا رنگین کمان و غیره می باشد (Stickney, 2000). فعالیت های این ماده شامل ۱) افزایش سمیت سلولی، تولید لنفوکین و سرکوب عمل سلول، و ۲) تحریک فعالیت فاگوسیته ماکروفاژها و نوتروقیل ها می باشد. در تحقیقی، لوامیزول، لاکتوفرین، گلوکان و ویتماین-سی در ترکیب با غذا موجب افزایش معنی دار اکثر پارامترهای ایمنی غیر اختصاصی گربه ماهی آسیایی، *Clarias batrachus* سالم و سرکوب ایمنی شده در مقایسه با کنترل شدند. لوامیزول موجب افزایش معنی دار فعالیت های فاگوسیتیک از طریق مشاهده افزایش فعالیت انفجار تنفسی و فعالیت میلوپراکسیداز در مقایسه با کنترل در هر دو ماهی سالم و سرکوب ایمنی شده، گردید (Kumari and Sahoo, 2006). اخیراً اثر تعدیل ایمنی لوامیزول در ماهی کپور معمولی آلوده شده با آئروموناس هیدروفیلا با مشاهده افزایش فعالیت های نوتروفیل و لیزوزیم نشان داده شد (Maqsood *et al*., 2009). مقادیر ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم لوامیزول در هر کیلوگرم غذا برای تحریک عمل ایمنی ماهی کپور معمولی مناسب بودند و از ماهی به میزان زیادی از هجوم پاتوژن باکتریایی محافظت کرد. این مقادیر نیز در تحریک رشد و افزایش بازماندگی ماهی کپور معمولی مؤثر بودند.

٤-١-تشکیل و بلوغ سیستم ایمنی ماهی

تشکیل و بلوغ سیستم ایمنی ماهیان استخوانی در گونه هایی از ماهیان شامل قزل آلا رنگین کمان، گربه ماهی، گورخر ماهی یا زبرافیش و ماهی گروپر مورد بررسی قرار گرفته اند. ماهیان استخوانی اولین مدل هماتوپوئزیس توصیف شده اند. اولین اندام هماتوپوئتیک تحت عنوان توده سلولی میانجی (intermediate cell mass, ICM)

نامیده شده است. هماتوپوئزیس در ماهی قزل آلا رنگین کمان برای یک دوره کوتاه در کیسه زرده وجود دارد و سپس به توده سلولی میانجی تبدیل می شود (Zapata *et al*., 2006). در ارتباط با اندام های دخیل در پاسخ ایمنی، تکامل اندام های کلیه قدامی و تیموس در ماهی قزل آلا رنگین کمان و سالمون آتلانتیک، قبل از هچ شدن واقع می شود (Razquin *et al*., 1990)؛ که این تا پایان دوره انکوباسیون بسیاری از گونه های دریایی روشن نشده است. علیرغم این تفاوت ها، توالی تکامل اندام لنفومیلوییید در ماهیان دریایی به ترتیب کلیه، طحال و تیموس است (Mulero *et al*., 2007)؛ ولی در طحال لارو ماهی عمل اریتروپوئتیک بیشتر از عمل لنفوپوئتیک است (Schrode *et al*., 1998). دودمان سلول های میلوییدی ۲۴ ساعت پس از لقاح در اطراف کیسه زرده یافت می شوند ولی در توده سلولی میانجی یافت نمی شوند. میلوبلاست ها و میلوسیت های نوتروفیلی ۳۴ و ۴۸ ساعت پس از لقاح مشاهده می شوند. از طرف دیگر تعداد زیادی اریتروسیت و نیز گرانولوسیت های بالغ در سیستم خونی بافت همبند یافت می شوند که ۳۴ ساعت پس از لقاح کیسه زرده را احاطه می کنند و ۴۸ ساعت پس از لقاح با نخستین توبول های کلیوی مجاور می شوند. بعلاوه در همین زمان میلوسیت های جوان و نوتروفیل ها از طریق دیواره رگ های خونی مهاجرت می کنند. نوتروفیل های بالغ ۷۲ ساعت پس از لقاح در بافت های مختلف مشاهده می شوند (Willett *et al*., 1999).

از طرف دیگر، پیدایش نخستین ایمونوگلوبولین ام (IgM) در لنفوسیت ماهیان مختلف متفاوت است (Magnadottir *et al*., 2005). ظهور نخستین لنفوسیت های B و ایمونوگلوبولین ها در ماهیان دریایی دیرتر از ماهیان آب شیرین و لارو ماهی حدود ۳۰-۲۰ میلی متری، تا بیان نخستین IgM، ایجاد می شود (Chantanachookhin *et al*., 1991; Magnadottir *et al*., 2005). انتقال آنتی بادی از مادر به تخم و جنین نیز در انواع ماهیان نشان داده شده است (Dalmo, 2005). پیشنهاد شده است که نخستین نقش آنتی بادی های مادری، حفاظت از تخم در برابر پاتوژن های خاصی است که به صورت عمودی منتقل می شوند و نیز IgM مادری به فاگوسیتوز یا فعال سازی مسیر کمپلمان در مراحل اولیه تکامل کمک می کند و حتی ممکن است که IgM به عنوان یک پروتئین غذایی در کیسه زرده عمل کند (Magnadottir *et al*., 2005). در مطالعات انجام شده جزء C_3 کمپلمان در تخم های لقاح نیافته گرگ ماهی خال خال (*Anarhichas minor* Olfsen) یافت شده است که نشانه انتقال آن از طریق مادر است (Ellingsen *et al*., 2005). با استفاده از روش های ایمونوهیستوشیمی، در اندام ها و بافت های در حال تکامل ماهی کاد و هالیبوت، C_3 را یافته اند (Lange *et al*., 2004a, b). این مطالعات نشان می دهند که کمپلمان نه تنها در دفاع بر ضد پاتوژن های مهاجم، بلکه در تولید اندام های مختلف هم نقش دارد (Dalmo, 2005).

۵-۱- توصیف دستگاه سیستم ایمنی ماهی

بدن ماهی برای مقابله با عوامل بیماری زا به سیستم دفاعی یا ایمنی مجهز است. دستگاه ایمنی بخشی ازبدن است که وظیفه شناسایی سلول ها و مولکول های خودی از بیگانه و از بین بردن یا بی خطر کردن آن ها را برعهده دارد. فلس ها، مخاط پوست و آبشش ها به عنوان اولین سد دفاعی در برابر عفونت می باشند (Ingram, 1980; Shepard, 1994; Ellis, 2001). مخاط ماهی حاوی موادی مانند لکتین، پنتراکسین ها، لیزوزیم ها، پروتئین های کمپلمان، پپتیدهای ضد باکتریایی و ایمونوگلوبولین M (IgM) می باشد که این مواد نقش مهمی را در مهار ورود پاتوژن ها به بدن را دارند (Alexander and Ingram, 1992; Boshra *et al*., 2006; Saurabh and Sahoo, 2008). علاوه بر این لایه بیرونی پوست می تواند نسبت به حملات مختلف (ضخیم شدن و هایپرپلازی سلولی) واکنش نشان دهد و بی نقص بودن این لایه برای تعادل اسموتیک و جلوگیری از ورود مواد بیگانه به بدن ضروری است (Hibiya, 1994). از طرف دیگر، سلول هایی چون لنفوسیت ها، ماکروفاژها و سلول های دانه دار ائوزینوفیلیک نیز در دفاع از بدن وجود دارند (Sveinbjornsson *et al*., 1996; Ellis, 2001; Fischer *et al*., 2006). علیرغم تفاوت هایی که میان سیستم ایمنی ماهیان و مهره داران عالی تر وجود دارد، ولی از نظر فیزیولوژیک شبیه به هم هستند و از نظرعملکردی نیز به دو نوع سیستم ایمنی طبیعی یا ذاتی (غیراختصاصی) و سیستم ایمنی اکتسابی (اختصاصی) تقسیم می شوند. سیستم ایمنی غیر اختصاصی به وسیله یک سری از اجزای سلولی و هومورال، و سیستم ایمنی اختصاصی، به وسیله پاسخ ایمنی هومورال از طریق تولید آنتی بادی ها و پاسخ ایمنی سلولی به وسیله لنفوسیت های T فراهم می شوندکه قادرند به طور اختصاصی با آنتی ژن ها واکنش نشان دهند (Maurilio, 2011).

سیستم ایمنی اکتسابی

سیستم ایمنی اکتسابی یا اختصاصی نقش مهمی در حفاظت از بدن درمقابل عفونت های عود کننده دارد که از طریق تولید سلول های خاطره ایمنی (ایمنی با واسطه سلولی) و گیرنده های قابل حل و متصل شدن به غشاء (دفاع هومورال) نظیر گیرنده های سلول های T و ایمونوگلوبولین ها (IGs) امکان از بین بردن سریع و مؤثر پاتوژن های مهاجم را می دهد. توسعه واکسن ها بر اصل ایمنی اکتسابی استوار است. در هر حال، وجود سیستم ایمنی اکتسابی، ایمنی ذاتی را بلا استفاده نمی سازد. در مقابل، پاسخ ایمنی ذاتی به عنوان خط اول دفاعی میزبان می تواند بسیاری از تهاجمات میکروبی را خنثی و یا تا زمان بروز پاسخ ایمنی اکتسابی آن را متوقف سازد.

سیستم ایمنی ذاتی یا طبیعی

ماهیان با محیط خود مأنوس هستند، که این محیط می تواند حاوی غلظت های بسیار زیادی از باکتری ها و ویروس ها باشد. بسیاری از این ها ساپروفیت، بعضی پاتوژنیک هستند و هر دو فرم قادرند که بافت های ماهی را هضم و تخریب کنند. ولیکن ماهی بالقوه در شرایط طبیعی وضعیت سلامت خود را در برابر مهاجمان از طریق

سیستم پیچیده مکانیسم های دفاع ذاتی حفظ می کند. این مکانیسم ها هم تشکیل شونده و هم واکنشی هستند و محافظت را از طریق ممانعت از استقرار، هجوم یا تکثیر میکروب ها در داخل یا روی بافت ها فراهم می آورند. ماهیان برخلاف مهره داران عالی تر موجوداتی هستند که از ابتدای مراحل جنینی دارای زندگی آزاد بوده و برای بقاء به سیستم ایمنی ذاتی خود وابسته هستند (Rombout, 2005).در ماهی سیستم ایمنی غیر اختصاصی یک مکانیسم دفاعی ضروری است و از طریق سیستم پروتئین های گیرنده نقش کلیدی در پاسخ ایمنی اکتسابی و هموستاز دارد. پروتئین های گیرنده، الگو های مولکولی را که مشخصاً میکروارگانیسم های پاتوژنیک هستند مانند پلی ساکاریدها، لیپوپلی ساکارید، دی. ان. ا. پپتید وگلیکان باکتریایی، آر. ان. ا. ویروسی و سایر مولکول هایی که معمولاً در سطح موجودات پر سلولی نیستند، شناسایی می کنند.

پاسخ سیستم ایمنی ذاتی

پاسخ ایمنی شامل افزایش سلول ها، بیان سلول ها و مولکول ها و نهایتاً هماهنگی پاسخ توسط عوامل تنظیم کننده است. ماهیان دارای جمعیت لنفوسیتی هستند که شبیه به سلول های T، سلول های B، سلول های سیتوتوکسیک (شبیه سلول های طبیعی کشنده)، ماکروفاژها و لکوسیت های پلی مورفونوکلئر می باشند. سیستم ایمنی ماهیان استخوانی، دارای زیر جمعیت هایی از لنفوسیت ها می باشند که پاسخ های افتراقی به میتوژن ها، واکنش های حاد پیوندی سلول B، واکنش های لکوسیتی مخلوط و تداخلات همکاری بین سلول های T، سلول های B، و ماکروفاژها را نشان می دهند که برای تولید آنتی بادی ها ضروری هستند. بعلاوه ماهیان استخوانی و ماهیان غضروفی ابتدایی ترین گروهی هستند که دارای کمپلکس سازش پذیری بافتی عمده و گیرنده سلول T است (Manning and Nakanishi, 1996). مقاومت به بیماری در ماهی عبارت از مکانیسم دفاع ذاتی ماهی در برابر عوامل خارجی است. مطالعات ایمنی و مقاومت به بیماری در ماهیان در مقایسه با پستانداران در مراحل اولیه خود است. بیشتر تحقیقات اولیه ایمنی شناسی ماهیان روی جنبه های مقایسه ای سیستم ایمنی بین ماهیان و سایر گونه ها متمرکز شده است. با این وجود، تحقیقات اخیر بر دانش نحوه پاسخ سیستم ایمنی به عوامل خارجی و این که مقاومت ذاتی چگونه می تواند از طریق تکثیر، به تولید ماهیان مقاوم تر به بیماری منجر گردند، متمرکز شده است. با توجه به محدودیت های سیستم اکتسابی، محدودیت و تکثیر آهسته آنتی بادی ها، بلوغ و حافظه لنفوسیت ها، و نیز طبیعت خونسرد بودن ماهیان، پاسخ ذاتی یکی از اساسی ترین اجزاء مبارزه با پاتوژن ها یا عوامل بیماری زا در ماهیان می باشد (Whyte, 2007). پاسخ ذاتی معمولاً به سه بخش شامل سد دفاع پوششی و مخاطی، شاخص های خونی و نیز اجزای سلولی تقسیم می شود. سد پوششی و مخاطی پوست، آبشش ها و مجرای گوارش ماهی مدام در معرض مواد بالقوه مضر هستند که در ممانعت از بیماری ماهیان نقش بسیار مهمی دارند (Magnadottir, 2010). این نوع پاسخ به یک سری مکانیسم هایی شامل عوامل هومورال یا خونی، پپتیدهای ضد باکتریایی سلولی و بافتی و فاکتورهای کمپلمان نیاز دارد. گیرنده ها و مولکول های سلولی محلول در

پلاسما و سایر مایعات بدن از عوامل هومورال می باشند (Magnadottir, 2006; Subramnian *et al*., 2007, 2008). تغییرات دما، استرس و تراکم از جمله عواملی هستند که موجب سرکوب پاسخ ایمنی ذاتی می شوند، درحالی که افزودنی های غذایی و محرک های ایمنی موجب افزایش کارایی پاسخ ایمنی ذاتی می شوند (Magnadottir, 2006; 2010).

مکانیسم های سیستم ایمنی با واسطه سلولی

نخستین خط دفاعی ماهی در برابر پاتوژن های مهاجم، توسط اجزای عمده سیستم ایمنی ذاتی تشکیل می شود (Namaware *et al*., 1994). سیستم ایمنی با واسطه سلولی در انواع مختلفی از گلبول های سفید شامل مونوسیت ها، ماکروفاژها، گرانولوسیت ها و سلول های سیتوتوکسیک غیراختصاصی و نیز در عناصر هومورال مانند لیزوزیم و سیستم کمپلمان شرکت دارند (Magnadóttir, 2006). احتمالاً، مونوسیت ها یا ماکروفاژهای بافتی از مهمترین سلول ها در پاسخ ایمنی ماهی هستند، که نه تنها در تولید سیتوکین ها مهم هستند، بلکه سلول های ابتدایی دخیل در فاگوسیتوز و کشتن پاتوژن ها به محض شناسایی اولیه و عفونت ثانویه هستند. همچنین Vallejo و همکارانش در سال ۱۹۹۲ پیشنهاد کردند که ماکروفاژها به عنوان سلول های اولیه معرفی کننده آنتی ژن در ماهیان استخوانی بوده و از این رو موجب ارتباط پاسخ های ایمنی غیراختصاصی و اکتسابی می شوند. در ماهی، گرانولوسیت ها (به ویژه نوتروفیل ها) نخستین سلول های دخیل در مراحل شروع التهاب (۲۴-۱۲ ساعت) هستند. گرانولوسیت هابسیار متحرک وفاگوسیت کننده بوده و گونه های اکسیژن واکنشگر را تولید می کنند. به نظر می رسد این سلول ها واجد گیرنده های Fc (Fragment crystallizable) و کمپلمان هستند. نقش نوتروفیل ها در ایمنی احتمالاً وابسته به گونه ماهی بوده و متغیر می باشد. سلول هایی که موجب شروع چرخه تجزیه برای از بین بردن سلول های تومور هدف از طریق اتصال به گیرنده ها عمل کرده و سلول های سایتوتوکسیک غیراختصاصی (NCC) نامگذاری شده اند. به نظر می رسد سلول های سایتوتوکسیک غیراختصاصی (NCC) در ایمنی ویروسی و انگلی مهم باشند. سلول های دانه دار ائوزینوفیلیک موجود در قشر گرانولوزوم روده، آبشش، پوست، منتژها و عروق خون محیطی به عنوان ماست سل تا ائوزینوفیل در نظر گرفته شده اند.

مکانیسم های سیستم ایمنی هومورال

سرم، موکوس و تخم ماهی ها حاوی انواعی از مواد هستند که به طور غیراختصاصی رشد میکروارگانیسم های عفونی را مهار می کنند. این مواد غالباً پروتئین ها یا گلیکوپروتئین ها هستند و تصور می شود که بسیاری از آنها پیش ساز ها یا مخالف پیش سازهای آنها در خون و لنف بی مهره گان وجود دارند. این مواد اختصاصی هستند که فقط با یک گروه یا یک وضعیت شیمیایی واکنش می کنند ولی به آن ها غیراختصاصی گویند زیرا این مواد

با موادی که واکنش می کنند بسیار مشترک هستند و تنها بر روی رشد یک ارگانیسم تأثیر دارند. اکثر مولکول های غیراختصاصی هومورال که در مقاومت طبیعی ماهی دخیل هستند به شرح ذیل می باشند:

مهار کننده های غیراختصاصی هومورال

این مواد از متابولیسم انگل ها، یا محروم نمودن انگل ها از مواد غذایی ضروری، و یا از طریق قطع مسیرهای متابولیک در سلول جلوگیری می کنند.

ترانسفرین: یک نوع گلیکوپروتئین با باندهای آهنی است که نقش عمده ای در انتقال آهن بین نقاط جذب، ذخیره و مصرف در تمام مهره داران دارد. بنابراین میزان ترانسفرین خون میزبان یک پارامتر مهم در استنباط وضعیت حساسیت میزبان به پاتوژن می باشد.

پپتیدهای ضدباکتریایی: موادی هستند که در ترشحات موکوسی گونه هایی از ماهیان شناسایی شده اند اما هنوز اطلاعات اندکی درباره توانایی آنها در کشتن باکتری های بیماریزای ماهی وجود دارد. مطالعات انجام شده بر روی پوست و ترشحات پوستی ماهی اهمیت این مواد را در دفاع از میزبان در برابر ویروس ها و باکتری ها نشان داده اند اند (Ellis, 2001; Chinchar *et al*., 2004; Maier *et al*., 2008). این پپتیدها در مخاط، کبد و بافت آبششی ماهیان استخوانی یافت شده اند (Birkemo *et al*., 2003). این پلی پپتیدهای با وزن مولکولی کم قادر به شکستن دیواره باکتریایی هستند (Ellis, 2001). این پپتیدها ممکن است خط دفاعی مهمی را در لارو ماهیان، قبل از توسعه پاسخ ایمنی اختصاصی، داشته باشند.

اخیراً نشان داده شد که پلوروسیدین pleurocidin صناعی، از ماهی سالمون کوهو در برابر عفونت ویبریو آنگیلاروم *Vibrio anguillarum* محافظت نموده است (Jia et al., 2000).

لکتین ها: به دلیل اتصال غیراختصاصی با قندهای مستقر در سطح باکتری ها و پاتوژن ها که منجر به واکنشهای رسوب و آگلوتینه شدن می شوند، مهم هستند. لکتین ها وابسته به یون Ca^{+2}بوده و می توانند موجب آگلوتینه شدن تعدادی از پاتوژن های باکتریایی ماهیان شوند. محققین پیشنهاد داده اند که لکتین ها در تشخیص و اتصال به سلول ها نیز دخیل بوده و بنابراین نقش مهمی در ارتباطات سلولی و عملکرد دفاعی دارند (Sharon and Lis, 1993)

اینترفرون ها: پروتئین هایی هستند که موجب بازدارندگی از رونویسی ویروس ها می شوند. سه نوع اینترفرون وجود دارد: اینترفرون نوع I شامل اینترفرون آلفا و بتا است و اینترفرون نوع II شامل اینترفرون گاما است. سیستم اینترفرون نوع I، یک مکانیسم دفاع ضد ویروسی سریع و قوی در سلول های مهره داران به شمار می رود که به محض شناسایی اسید نوکلئیک ویروس اینترفرون آلفا و بتا را ترشح می نمایند (Robertsen, 2006). اینترفرون ها، سیتوکین های مقاوم به pH هستند که توسط انواع مختلفی از سلول ها در پاسخ به آلودگی ویروسی تولید می شوند. تولید آن ها متعاقب آلودگی ویروسی به سرعت صورت می گیرد. اینترفرون آلفا و بتا سیتوکین های با عمل ضد ویروسی غیر اختصاصی هستند که از تکثیر اسید نوکلئیک در سلول های آلوده به ویروس جلوگیری

می کنند. مهار تحریک ماکروفاژهای سالمون سالار با Polyinosinic-polycytidylic acid (Poly I: C) ، موجب تولید پیک اینترفرون در عرض ۲۴ ساعت و تولید پیک پروتئین پس از ۴۸ ساعت گردید (McBeath et al., 2007). از این رو، مکانیسم دفاع ضد ویروسی فراهم شده از اینترفرون قادر به پاسخ در مراحل اولیه عفونت ویروسی است که با پاسخ های اینترفرون غیراختصاصی سیستم ایمنی ذاتی فراهم می شود؛ در حالی که محافظت طولانی مدت با سیستم ایمنی اکتسابی فراهم می شود.

لیزین ها: موادی هستند که موجب لیز شدن یا تحلیل رفتن سلول می شوند. تمام آنزیم ها یی که وجود دارند ممکن است از یک ماده مثل هیدرولازها، لیزوزیم ها، و کیتینازها، و یا از آبشاری از چند آنزیم مثل آن چه در سیستم کمپلمان مشاهده می شود، تشکیل شده باشند.

هیدرالازها: بر روی گلیکوزیدها عمل کرده و ممکن است عملکردهای دفاعی داشته باشند. سه نوع هیدرالاز در بافت های ماهیان شناسایی شده اند که شامل ان- استیل میورامید گلیکانوهیدرالاز، کیتین گلیکانوهیدرولاز و کیتوبیوز استیل آمینو دزوکسی گلوکوهیدرولاز می باشند.

لیزوزیم: لیزوزیم آنزیمی باکتریولیتیک است که به طور گسترده در تمامی بدن و بخش هایی از مکانیسم های دفاع غیر اختصاصی اکثر حیوانات انتشار دارد و یکی از عوامل دفاعی علیه میکروارگانیسم های مهاجم است. لیزوزیم موجب تخریب اتصالات ۱-۴- بتا در بین ان- استیل مورامیک اسید و ان- استیل گلوکوزامید موجود در دیواره های سلولی (لایه های پپتیدوگلیکان) باکتری های گرم مثبت شده و از این رو مانع از هجوم آن ها می شوند. در موردباکتری های گرم منفی که مستقیماً توسط لیزوزیم آسیب نمی بینند، این آنزیم پس از کمپلمان و دیگر آنزیم ها دیواره خارجی سلول را تخریب می کند، از این رو لایه پپتیدوگلیکان داخلی باکتری ها آشکار می شود. لیزوزیم علاوه بر اثر ضد باکتری مستقیم، عمل فاگوسیتوز را به عنوان اپسونین، یا از طریق فعال سازی مستقیم لکوسیت ها و ماکروفاژهای چند هسته ای (پلی مورفونوکلوئر) ارتقاء می بخشد. لیزوزیم در ماهی نقش مهمی در مکانیسم های دفاعی میزبان در برابر بیماری های عفونی دارد.در ماهیان پهن (پلاژیک) فعالیت لیزوزیم به صورت سیتوشیمیایی در مونوسیت ها و نوتروفیل ها شناسایی شده است. احتمالاً این سلول ها در فعالیت لیزوزیم سرم مشارکت می کنند، زیرا تعداد این سلول ها همراه با افزایش سطح لیزوزیم سرم افزایش می یابد. لیزوزیم از سرم، ترشحات، غشاءهای مخاطی و بافت های غنی از لکوسیت ها، عمدتاً بافت های کلیه و روده آزاد ماهیان (سالمونیدها) جدا شده است (Grinde *et al*., 1988; Lie *et al*., 1989). ظاهراً مونوسیت ها، ماکروفاژها و نوتروفیل ها منبع اصلی لیزوزیم هستند. ولی اخیراً، لیزوزیم را از دانه های سلول های دانه دار ائوزینوفیلیک روده ماهی سالمون آتلانتیک (*Salmo salar* L.) نیز جدا کرده اند (Sveinbjornsson *et al*., 1996). فعالیت باکتری کشی این آنزیم، هیدرولیز نمودن پپتیدوگلیکان دیواره سلول باکتری است که منجر به تخریب و تحلیل سلول می شود. ابتداً تصور می شد که لیزوزیم یک عامل دفاعی بر علیه باکتری های گرم مثبت است ولی دریافتند که

قادر به تخریب و تحلیل دیواره باکتری های گرم منفی نیز می باشد. بعلاوه، این آنزیم آغازگر اپسونین سیستم کمپلمان و سلول های فاگوسیتیک می باشد (Magnadottir, 2006).

کیتیناز: در بافت های لنفوئیدی و خون ماهیان یافت شده است، ولی عملکرد آن در سرم و سایر بافت های ماهی مشخص نیست.

کیتوبیاز: در تعدادی از ماهیان شناسایی شده است. به نظر می رسد که هیچ نوع همبستگی بین سطوح فعالیت کیتیناز و کیتوبیاز در روده ماهیان وجود ندارد. در صورتی که ثابت شود کیتیناز و کیتوبیاز عملکرد دفاعی دارند قادر به نابودی ارگانیسم های دارای پوسته کیتینی در لایه خارجی خواهند بود.

پروتئین های فاز حاد: پروتئین های دخیل در دفاع غیر اختصاصی سرم هستند که متعاقب آسیب بافتی یا عفونت در سرم و مغز جانوران مشاهده می شوند. پروتئین های واکنش گر C، سروپلاسمین و پنتراکسین ها سه نوع پروتئین فاز حاد هستند که در سرم ماهی شناسایی شده اند.

پنتراکسین ها (**Pentraxins**): پروتئین واکنشگر- C و پروتئین آمیلوئید سرم در مایعات بدن مهره داران و بی مهرگان وجود دارند و معمولاً در پاسخ مرحله حاد التهاب دخالت دارند (Bayne and Gerwick, 2001; Wu *et al*., 2003) قادر به اتصال به تعدادی از ساختار پلی ساکاریدی در حضور یون های Ca^{+2} هستند. نقش دفاعی آن ها به خوبی شناخته نشده است، اما در پستانداران قادر به فعال سازی کمپلمان بوده و فاگوسیت ها، حاوی گیرنده هایی برای این مواد می باشند.

سروپلاسمین: مسئول اتصال مس بوده و نشان داده شده است که در حضور کادمیوم افزایش پیدا می کند. به نظر می رسد نقش دفاعی سروپلاسمین بیشتر بواسطه فعالیت فرواکسیداز تا اتصال به مس باشد، چرا که با تبدیل آهن فرو به فریک موجب افزایش حذف آهن از محیط شده و موجب کاهش دسترسی آن برای میکروارگانیسم می شود.

پروتئین های واکنشگر-C: بیان پروتئین واکنشگر-C در جندین گونه ماهی استخوانی شامل قزل آلا رنگین کمان (Hoover *et al*., 1998)، گربه ماهی (Szalai *et al*., 1992)، سالمون آتلانتیک، کاد، ماهی روغن معمولی (*Gadus morhua*)، هالیبوت، ماهی پهن بزرگ (*Hippoglossus hippoglossus*) و سگ ماهی (*Hoplias malabaricus*) گزارش شده اند (Lund and Olafsen, 1998). محرک های مختلفی مانند ضربه، آسیب های بافتی و عفونت موجب تولید انواع مختلفی از پروتئین های پروتئین واکنشگر-C در ماهیان استخوانی شده که یا سطح پروتئین واکنشگر-C در سرم کاهش (پروتئین فاز حاد منفی) (Szalai *et al*., 1994; Liu *et al*., 2004) و یا افزایش (پروتئین فاز حاد مثبت) داشت (Kodama *et al*., 2004). این پروتئین ها نقش مهمی را در سیستم ایمنی (Cook *et al*., 2003)، فعالیت مسیر کلاسیک کمپلمان (De Hass *et al*., 2000)، و زدودن سلول های آپوپتوتیک (Nauta *et al*., 2003) بازی می کنند. همچنین، نقش این پروتئین ها درعملکرد سیستم ایمنی با فعال سازی عمل زوال با واسطه کمپلمان در گلبول های قرمز گوسفند نشان داده شده است (Cook *et al*., 2003; 2005). پروتئین های واکنشگر-

C در پاسخ به افزایش سطح کورتیزول و تحریک اندوتوکسین افزایش می یابد. تغذیه (سطوح پروتئین)، نیز سطح پروتئین های واکنشگر C را تحت تأثیر قرار داده است. احتمالاً این پروتئین ها در پاسخ به استرس تولید شده و در مقاومت طبیعی در برابر عفونت نقش دارند.

کمپلمان: یکی از اجزاء ضروری سیستم ایمنی ذاتی است و دارای عملکردهای متعددی است اما شناخته شده ترین عملکرد کمپلمان قابلیت آن در کشتن پاتوژن ها با ایجاد سوراخ هایی در سطح غشای آنهاست. کشتن میکروارگانیسم ها توسط کمپلمان وقتی ایجاد می شود که کمپلمان از طریق فعال سازی مستقیم توسط میکروارگانیسم ها یا تشکیل کمپلکس آنتی بادی – آنتی ژن موجب کشته شدن پاتوژن می شود. فعال سازی از طریق کمپلکس Ag-Ig، کمپلمان را به یک مکانیسم مهم مؤثر در پاسخ ایمنی اکتسابی تبدیل می نماید. علاوه بر این، کمپلمان در پاکسازی کمپلکس ایمنی نقش داشته و در واکنش های التهابی با جذب سلول های فاگوسیتیک به سمت محل جراحت حرکت می کنند. پروتئین های کمپلمان قادرند با اپسونیزاسیون پاتوژن ها از طریق گیرنده های کمپلمان موجود در سطح سلول های فاگوسیت کننده، موجب تحریک فاگوسیتوز شوند. همچنین کمپلمان در تعدیل پاسخ ایمنی اکتسابی از طریق اتصال به گیرنده های خاص در سطوح لنفوسیت پستانداران و سلول های دندرتیک فولیکولی نقش دارد. از این رو کمپلمان پیوند مهمی بین پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی فراهم می آورد.

فعال سازی کمپلمان: فعال سازی سیستم کمپلمان در ماهیان استخوانی و مهره داران عالی می تواند از سه مسیر، فعال سازی کلاسیک کمپلمان (CCP)، مسیر فرعی کمپلمان (ACP) و مسیر لکتین کمپلمان (LCP)، صورت گیرد. هر سه مسیر فعال سازی در ماهیان به استثنای ماهیان بدون فک، که به نظر می رسد مسیر کلاسیک و لکتین هستند، شناسایی شده اند. محققان بیان داشته اند که مسیر CCP توأم با اتصال آنتی بادی به سطح سلول باکتریایی است (Holland and Lambris, 2002). مسیر ACP مستقیماً به وسیله ویروس، باکتری، قارچ یا حتی سلول های سرطانی فعال شده و مستقل از آنتی بادی است. بررسی ها نشان می دهند که مسیر فرعی یا آلترناتیو کمپلمان از مهم ترین مسیرهای پاسخ ایمنی ذاتی در ماهیان استخوانی هستند (Yano, 1996). مسیر LCP از نظر مسیر فعال سازی با CCP متفاوت است. مسیر لکتین کمپلمان به جای فعال سازی با کمپلکس Ag-Ig از طریق فعال سازی کمپلکس لکتین با پروتئین حاوی مانوز/مانان (mannose/mannan) بر روی سطح سلول های باکتریایی آغاز می شود که منجر به کشته شدن پاتوژن می شود (Sakai, 1992). از این رو فعال سازی آن مستقل از آنتی بادی است. با وجود مکانیسم ها و مولکول هایی که در این سیستم دخالت دارند، ولی در ماهیان استخوانی به استثنای توالی ژنتیکی پروتئاز لکتین متصل به مانوز به خوبی شناخته نشده اند (Matsushita *et al*., 1998; Nikoskelainen *et al*., 2002). کمپلمان گروهی از پروتئین های غیرفعال در پلاسما هستند که با حروف C_1 تا C_9 (سه نوع C_1) نشان داده می شوند. کمپلمان ها این نام را به خاطر اینکه هم کامل کننده دفاع اختصاصی و هم دفاع غیراختصاصی هستند، گرفته اند. هرپروتئین درگروه کمپلمان توانایی برهم کنش با بعدی را دارد و تشکیل

یک واکنش آبشاری را می دهند که فرآیند التهاب و نیز تجزیهٔ سلول باکتری را تقویت می-کند. کمپلمان ها بیش از ۲۰ نوع پروتئین متفاوت را در خون شامل می شوند.در ماکروفاژها، سلول پوششی روده و کبد وجود دارند. این پروتئین ها در خون به صورت غیرفعال و محلول وجود دارند. کمپلمان از دو طریق یکی مسیر کلاسیک و دیگری مسیر جایگزین ممکن است که فعال شوند. درمسیرکلاسیک، آنتی بادی به میکروارگانیسم ها متصل شده و C_1 نیز به این مجموعه افزوده می شود. سپس C_1 فعال شده روی C_2 و C_4 عمل می کند. پس از آنC_2وC_4روی C_3 عمل می کنندکه مولکول کلیدی است. در مسیرآلترناتیو، بعضی پلی ساکارید های دیوارهٔ سلولی میکروارگانیسم ها و فاکتورهایB، D و P باعث فعال شدن C_3 می شوند. هردو مسیرکلاسیک و آلترناتیو یا فرعی منجر به فعال شدن C_3 می شوند و C_3 به C_{3a} و C_{3b} می شکند و مسیر مشترکی را ایجاد می کند. این مسیر مشترک نهایتاً به از بین بردن میکروارگانیسم ها از طریق فعال شدن فاگوسیتوز بافت سلولی و فرآیند التهاب منجرمی شود. جزء کمپلمان، C_{3b}در اُپسونیزاسیون (تحویل میکروارگانیسم به فاگوسیت ها) و نیز چسبیدن به غشاء سلولی نقش دارد. همچنین C_{3a}در ایجاد پاسخ التهابی نقش دارد. درطی اُپسونیزاسیون یا چسبندگی ایمنی C_{3b} به سطح میکروارگانیسم ها که توسط آنتی بادی ها (اُپسونین ها) پوشیده شده، می چسبند و به خورده شدن آن توسط فاگوسیت ها کمک می کنند. همچنین C_{3b}در طی اتصال به غشاء سلول، باعث فعال کردن C_5، C_6، C_7، C_8 و C_9 می شود که به این مجموعه کمپلکس حمله به غشاء (Membrane Attach Complex; MAC) می گویند که باعث ایجاد سوراخ هایی در غشاء پلاسمایی میکروارگانیسم ها و بافت سلولی می شود. این پروسه همچنین سیتولیز ایمنی نامیده می شود. در طی پروسهٔ التهاب، C_{3a} با C_{5b} و C_6 و C_7 باعث ایجاد پاسخ التهاب می شوند.

٦-١- تقویت سیستم ایمنی

سیستم دفاع طبیعی بدن یکی از پیچیده‌ترین و مهم‌ترین دستگاه‌های مجهز و خودکار بدن است. گلبول‌های سفید و آنتی‌بادی‌ها از عوامل مهم سیستم دفاعی بدن در برابر بیماری‌ها هستند. گلبول‌های سفید این توانایی را دارند که به سرعت و با شدت، باکتری‌های مضر ورودی به بدن را شناسایی و نابود کنند. این سازوکار ایمنی یا در عروق خونی در حال گردش هستند و یا در غدد لنفاوی به حالت آماده باش قرار دارند. غدد لنفاوی که محل استقرار گلبول‌های سفید است، در نقاط مختلف بدن نظیر طحال، آپاندیس و سلول‌های کوپفر کبد پراکنده‌اند. همچنین پروتئین خاص آلبومین، از جمله مواد بسیار مؤثر در انتقال مواد سمی از سراسر بدن به سلول‌های کبدی است. این مواد سمی پس از انتقال به کبد شکسته شده و از بدن دفع می‌شوند. عدم وجود مقادیر معینی آلبومین در خون، کبد و کلیه‌ها و سایر اعضای حیاتی قادر به ایفای نقش خود نخواهند بود.آلبومین یکی از باارزش‌ترین عوامل انتقال ویتامین‌ها، املاح معدنی، اسیدهای چرب غیراشباع، هورمون‌ها و سایر مواد و ترکیبات با ارزش در کل سیستم بدن است. گلبول‌های سفید جهت رشد، تکثیر و تقسیم مناسب و همچنین تأمین مقادیر لازم آلبومین در خون، نیاز به تغذیه پروتئین‌های با کیفیت دارند. اگر تغذیه صحیح نداشته باشیم، سیستم ایمنی ما نیز دچار

آسیب خواهد شد. مسلماً تضعیف سیستم ایمنی بدن منجر به کاهش مقاومت فرد در برابر عوامل عفونی و بیماری‌زا خواهد شد و حتی ممکن است توانایی بدن در پاسخگویی به برخی داروها نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها کاهش پیدا کند. علاوه بر سوءتغذیه، آفتاب سوختگی هم موجب کاهش میزان گلبول سفید می شود، زیرا گلبول‌های سفیدی که در مویرگ‌ها قرار دارند توسط اشعه ماورای بنفش موجود در نور خورشید از بین می‌روند. بدون تردید تقویت سیستم ایمنی می تواند تأثیرات گسترده‌ای بر بدن داشته باشد. به‌عنوان مثال تقویت سیستم ایمنی می‌تواند در پروتکل‌های بهبود زخم‌ها و بازسازی بافت‌های آسیب‌دیده، مقابله با بیماری‌های عفونی، مسمومیت‌های غذایی و پیشگیری از انواع سرطان مورد توجه قرار گیرد. حتی تقویت سیستم ایمنی بدن، شدت آلرژی‌های فصلی را نیز می‌تواند کاهش دهد. استفاده از فرآورده‌های طبیعی برای تقویت سیستم ایمنی یک نقطه عطف در دورانی است که تغذیه بشر مبتنی بر فرآورده‌های شیمیایی شده است. در چنین رویکردی علاوه بر تقویت سیستم ایمنی، طیف گسترده‌ای از اثرات بیولوژیک سودمند دیگر نیز در اختیار بدن قرار می‌گیرد. در این میان استفاده از عصاره جلبک‌های سبز نظیر کلرلا(Chlorella) نه تنها به منظور بهره‌مندی از مواد مغذی نظیر پروتئین‌ها، ویتامین‌ها، املاح و بسیاری مواد سودمند دیگر مفید است بلکه برای سود جستن از اثرات بیولوژیک بسیار جالب نظیر توانایی آنان در خارج کردن سموم از بدن، بهبود سوخت وساز بدن، ایجاد تعادل در عملکرد دستگاه گوارش، تأمین سلامت قلب و عروق از طریق تنظیم فشار خون، تأثیر مثبت در دیابت، تقویت سیستم ایمنی و تأثیرات مفید دیگر صورت می‌گیرد. دستگاه ایمنی بدن، ما را از ابتلای به عفونت توسط عوامل بیماری زا یا پاتوژن ها ،مثل ویروس ها، باکتری ها و قارچ ها محافظت میکند. یک سیستم ایمنی سالم به قدری مؤثر است که اگر توانایی تشخیص خودی از غیرخودی را از دست بدهد بدن را هم همراه با مواد بیگانه از بین می برد. توانایی تشخیص خودی از غیرخودی عامل اصلی در سیستم ایمنی است.

اندام های لنفوییدی ماهی

تیموس، کلیه (قدامی و میانی) و طحال بزرگترین اندام های لنفوییدی در ماهیان استخوانی هستند (Zapata *et al*., 2006). در ماهیان استخوانی آب شیرین، تیموس اولین عضوی است که لنفوییدی می شود ولی قبل از آن، امکان دارد که کلیه حاوی پیش سازهای هماتوپوئتیک، غیر از لنفوسیت ها باشد (Lam *et al*., 2004).

تیموس

تیموس از دو بخش مشابه تشکیل شده که توسط صفحه نازکی از بافت لنفوییدی تخمدان پدیدار می شود و به صورت زیر جلدی در اوپرکولوم پشتی قرار دارد و تا بافت موکوسی اپیتلیوم حلقی کشیده شده است (Ellis, 2001). ساختمان تیموس در ماهی به شکل کپسول است که پوست بافت لنفوییدی آن را احاطه می کند. اساساً، تیموس تجمع ماکروفاژها است که به تکثیر سلول های T داخل کپسول کمک می کند (Davis *et al*., 2002).

تفکیک ساختمان تیموس در ماهیان استخوانی فوق العاده متفاوت است و در بعضی از گونه ها امکان مشاهده تفکیک روشنی بین کورتکس و مدولا مشابه آنچه که در مهره داران عالی تر یافت می شود، وجود ندارد (Bowden *et al*., 2005). بعلاوه، دراین اندام ها، سلول های میلوییدی و سلول های دانه دار ائوزینوفیلیک یافت می شوند. بعضی مطالعات به شرح پیدایش شبکه های اپیتلیال مرکزی بنام گلبول های هاسل پرداخته اند (Zapata *et al*.,2006). تیموس مسئول تولید سلول های T است. در گورخر ماهی توسعه تیموس شامل سلول های کرست عصبی با منشأ نورواکتودرم است که به سومین و چهارمین کیسه حلقی مهاجرت کرده و با آندودرم تداخل می کنند (Trede *et al*., 2001). تکامل اولیه تیموس در انواعی از ماهیان استخوانی مورد مطالعه قرار گرفته است و زمان تکامل متفاوت از اثرات دما بر روی رشد است. ارتباط بین تکامل و رشد دینامیکی است که با سن فیزیولوژیکی به درجه روز بیان می شود و عامل تفاوت دمای تاریخی نیست (Bowden*et al*., 2005).

کلیه

کلیه در ماهیان استخوانی مثابه مغز استخوان در مهره داران است و تا سن بلوغ بزرگترین محل هماتوپوئزیس است (Zapata *et al*., 2006). اندام کلیه در ماهی قزل آلا رنگین کمان، پس از هچ شدن و به هنگام تولید سلول های قرمز خون وگرانولوسیت ها، به خوبی تکامل یافته است. پیشنهاد شده است که حضور سلول های لنفوییدی بین روزهای ۱۲ و ۱۴ پس از لقاح، موجب آزاد سازی IgM می شود (Castillo *et al*., 1993)، و نیز دو نوع IgM توسط ELISA در جنین ۸ روزه قبل از پایان دوره انکوباسیون نشان داده شده است (Sanchez *et al*., 1995). این نتایج نشان می دهند که منبع سلول های B قبل از پایان دوره انکوباسیون در اندام کلیه یا دیگر محل های هماتوپوئتیک وجود دارد. کلیه قدامی از نظر ساختمانی، شبکه ای از فیبرها یا رشته های رتیکولر است و به بافت لنف کمک می کند و این رشته ها، بین سلول های سیستم هماتوپوئتیک کشیده شده تا رتیکولواپیتلیوم سینوزوییدی، یافت می شوند (Press *et al*., 1994). سلول های اصلی کلیه قدامی ماکروفاژهای مجتمع در مراکز ملانوماکروفاژ و سلول های لنفوییدی هستند که این سلول ها در تمام مراحل رشد یافت می شوند و عمدتاً به عنوان سلول های ایمونوگلوبولین مثبت (سلول های B) وجود دارند (Press *et al*., 1994). سلول های رتیکولر نقش مهمی را در تأمین تداخلات ضروری برای عمل سلول های لنفوییدی و سلول های اندوتلیال سینوزوییدها بازی می کند (Press *et al*., 1994). این سیستم جزء اصلی تصفیه خون است که به دنبال توانایی آن در تشکیل آندوسیتوز می باشد (Dannevinget *al*., 1994).

طحال

طحال از الیپسوییدهای طحالی، مراکز ملانژوماکروفاژ و بافت لنفوییدی تشکیل شده است. الیپسوییدها در اکثر ماهیان به صورت خوشه ای و در اطراف دو جزء دیگر قرار دارند (Ferguson, 1989). الیپسوییدها، مویرگ های

با دیواره کلفت هستند که به پالپ باز می شوند و از شریانچه های طحالی منشاء می گیرند. این سلول ها به همراه دیواره ها به طور فعال در فاگوسیتوز ماکروفاژ آنتی ژن ها شرکت می کنند. معمولاً این امکان وجود دارد که آنتی ژن ها به شکل آنتی بادی ها یا محصولات متابولیکی برای یک دوره زمان طولانی متوقف شوند که نقش مهمی را در خاطره ایمونولوژیک ایفا می کنند. در گورخر ماهی، ۳۰ روز پس از لقاح در طحال عضو کوچکی باقی می ماند که حاوی مقادیر زیادی اریتروبلاست است. در ماه سوم، وقتی لنفوبلاست ها در طحال ظاهر می شوند، الیپسوییید های پدیدار شده در توقیف آنتی زن دخالت می کنند. الگوی مشابه ای در تکامل طحال دیگر ماهیان استخوانی مثل سالمون آتلانتیک، گروپر و گربه ماهی بیان شده اند (Ainsworth, 2000).

۷-۱- وظایف دستگاه ایمنی بدن

۱ – جلوگیری از ورود میکروب ها به بدن

۲ - به دام انداختن وخروج مواد خارجی از بدن

۳ – ایجاد محیط نامساعد برای زندگی میکروب ها در سطح بدن

۴ – تشخیص و از بین بردن یا بی خطر ساختن میکروب ها

۵ – تشخیص و بی خطر ساختن مواد بیگانه وارد شده به بدن

۶ – تشخیص و از بین بردن سلول های خودی سرطانی شده

۸-۱- تعریف دفاع ایمنی

مقاومت بدن در مقابل عوامل بیماریزا را دفاع گویند. همانطور که قبلاً اشاره شد، بدن ما در مقابل عوامل بیماری زا دو نوع دفاع انجام می دهد:

۱-۸-۱- دفاع غیراختصاصی سیستم ایمنی

دفاع غیر اختصاصی نوعی مکانیسم دفاعی است که در برابر اغلب میکروب ها به طور یکسان عمل می کند. در این نوع دفاع، مکانیسم عمل متفاوت است مثلاً برخی اجزای دفاع غیراختصاصی مانع از ورود میکروب ها به بدن می شوند و در نتیجه بین عوامل خارجی، میکروبی و غیرمیکروبی تفاوت قائل نمی شوند مانند پوست. ولی برخی از عوامل تا حدودی بین میکروب ها و عوامل غیرمیکروبی تفاوت قائل می شوند مثلاً در این مکانیسم، گلبول های سفید فاگوسیت، سلول های باکتری را از سلول های خودی تشخیص می دهند ولی شناسایی بین سلول های باکتری صورت نمی گیرد. دفاع اختصاصی هم از مولکول های پروتئینی و هم از سلول های اختصاصی تشکیل شده است. اجزای دفاع غیراختصاصی شامل پوست، لایه های مخاطی، موادآنتی ویروس و آنتی باکتری غیراختصاصی، التهاب، تب، پروتئین ها (مکمل و اینترفرون) و گلبول های سفید به جزء لنفوسیتها

می باشد. دفاع غیر اختصاصی، نخستین خط دفاعی بدن است که در برابر همه میکروب ها به طور یکسان عمل می کند.

۲-۸-۱- دفاع اختصاصی پاسخ ایمنی

دفاع غیر اختصاصی پاسخ ایمنی بین انواع مواد خارجی فرق نمی گذارد ولی دفاع اختصاصی که پاسخ ایمنی را ایجاد می کند با تولید آنتی بادی ها و سلول های مختلف ایمنی، بین مواد خارجی فرق می گذارد که به این مکانیزم حفاظتی، مصونیت (immunity) می گویند. این واژه از کلمهٔ immunis که در لاتین معنی معاف از مالیات را می دهد، گرفته شده است. سیستم ایمنی مذکور از بافت ها و اندام های لنفاوی که در سراسر بدن قرار دارد تشکیل شده است. این بافت ها و اندام های مجزا از طریق چرخش سلول ها توسط رگ های لنفاوی و خون با هم ارتباط دارند. واحد کاری سیستم ایمنی یک ردهٔ خاصی از لوکوسیت ها به نام لنفوسیت ها می باشد. دو نوع مختلف لنفوسیت داریم. لنفوسیت های B که به سلول های پلاسما تبدیل شده و آنتی بادی و لنفوسیت های T را تولید می کند. حدود ۲ تریلیون لنفوسیت B در بدن حدوداً ۱۰۰ میلیون تریلیون آنتی بادی در طول عمرشان می سازند. آنچه مؤثرتر از این تعداد زیاد است این است که همهٔ آنتی بادی ها مشابه هم نیستند. میلیون ها فرم مولکولی برای مبارزه با شمار زیادی از آنتی ژن ها و ترکیبات آنتی ژنی ممکن وجود دارد. تخمین زده می شود که بدن انسان تقریباً یک میلیون شاخص آنتی ژنیک را می تواند شناسائی کند. آنتی بادی ها توانایی بدن را برای تشخیص خودی از غیر خودی بسیار افزایش می دهند.

آنتی ژن ها

آنتی ژن مولکولی پروتئینی یا پلی ساکاریدی است که وقتی به عنوان یک مادهٔ خارجی وارد بدن شود باعث تولید و ازدیاد سلول های T ویژه ویا هر دو می شود، به این ویژگی ایمنی زایی آنتی ژن immunugenicity می گویند. آنتی ژن ها همچنین با آنتی بادی خاص خود واکنش شیمیایی بر قرار کرده و کمپکس آنتی ژن -آنتی بادی را می سازد. آنتی ژن می تواند به گیرندهٔ ویژهٔ خود در سطح سلول های B و T بچسبد و آن ها را وادار به ایجاد پاسخ خاص ایمنی کند. آنتی بادی بر علیه تمام آنتی ژن ها واکنش نشان نمی دهد بلکه در یک جایگاه خاص در سطح آن واکنش می دهد. این جایگاه های خاص را شاخص های آنتی ژنیک یا اپی توپ می گویند که از بخش های مجزای پروتئینی یا پلی ساکاریدی تشکیل شده اند. سلول های B و T نه تنها میتوانند آنتی ژن ها را از روی علامت های سطحی آن ها تشخیص دهند بلکه یک آنتی ژن را از میان ۱۰۰ هزار نوع شناخته شده تشخیص داده و واکنش متناسب با آن را ایجاد می کند. تقریباً هر پروتئینی می تواند به عنوان آنتی ژن عمل کند. سلول های ناسازگار خونی، پروتئین های سطحی بافت های پیوندی،گرده ها، گرد و غبار، تکه کوچک پوست و دیگر اجزای بیرون بدن حیوانات، مو و بعضی ترکیبات غذایی مثال های معمول آنتی ژن های

بالقوه هستند. چون فقط حفره های آنتی ژنیک (اپی توپ ها) برای ایجاد پاسخ ایمنی لازمند نه تمام اورگانیزم، بنابراین اجزای باکتری مثل تاژک کپسول، دیوارهٔ سلولی و توکسین ها می توانند آنتی ژنیک باشند. پاره ای از موا دکوچک با وزن مولکولی خیلی کم نیز می توانند آنتی ژنیک باشند، به این مواد هاپتن میگویند و در صورتی خاصیت آنتی ژنی دارند که به مولکول های حامل بزرگتری مثل پروتئین ها متصل شوند. پنی سیلین مثالی از یک هاپتن است. بعضی افراد وقتی پنی سیلین دریافت می کنند، پنی سیلین با یک حامل پروتئینی ترکیب می شود و باعث تولیدآنتی بادی برعلیه پنی سیلین می شود. دوزهای بعدی پنی سیلین باعث واکنش شدید یاآلرژی در بدن می شود.

سرنوشت آنتی ژن ها در بدن

آنتی ژن هایی که از راه پوست یا مخاط به درون بدن نفوذ می کنند سه مسیر را ممکن است طی کنند. آنتی ژن هایی که از طریق گردش خون وارد بدن می شوند به طحال رفته و با ماکروفاژها و سلول های B وT واکنش می دهند. سلول های پلاسما در طحال آنتی بادی به درون خود آزاد می کنند.آنتی ژن هایی که از طریق پوست وارد می شوند ممکن است یک پاسخ التهاب ایجاد کنند.آنتی ژن ها ممکن است آزاد بمانند یا توسط ماکروفازها به دام افتند و از بافت های اپیدرمی ودرمی یا زیر جلدی پوست از طریق رگ های لنفاوی آوران به گره لنفی برده شوند و در آنجا آنتی ژن گره لنفی ماکروفاژها و سلول های B و T بر هم کنش کرده و پاسخ ایمنی ایجاد شود.آنتی ژن هایی که از طریق دستگاه تنفس یا گوارش وارد شده اند در بافت لنفی وابسته به مخاط جمع شده و با ماکروفازها و لنفوسیت درگیر می شوند.

آنتی بادی ها

آنتی بادی ها پروتئین هایی هستند که توسط سلولهای B در پاسخ به آنتی ژن تولید می شوند.آنتی بادی ها برای واکنش با آنتی ژن و نیز شروع فرآیند پیچیدهٔ ایمنی (مصونیت) که بدن را در مقابل عوامل مهاجم محافظت میکند، تخصص یافته اند. بر عکس فاگوستیوز که دفاع خوبی را بر علیه عفونت انجام می دهد، آنتی بادی ها یک ایمنی فعال و طولانی مدت را ایجاد می کنند. آنتی بادی ها نمی توانند خودشان اورگانیزم های خارجی را از بین ببرند، بلکه از طریق فعال کردن کمپلمان، فاگوسیت ها و NKC (سلول های کشندهٔ طبیعی از نوع T) باعث مرگ آن می شوند. آنتی بادی ها از طریق ترکیب با توکسین ها، ویروس ها و باکتری ها مانع اتصال آنها به گیرندهٔ سلول های هدف می شوند.

ساختار و ویژگی آنتی بادی ها

ساختمان مولکولی آنتی بادی ها یک بخش مهم از توانایی های آنها در واکنش باآنتی ژن های اختصاصی است. مولکول آنتی بادی به شکل Y و متفارن است (چون مولکول انعطاف پذیراست می توان شکل T را هم برای آن فرض کرد). مولکول از چهار زنجیرهٔ پلی پپتیدی تشکیل شده است؛ دو زنجیرهٔ سنگین یکسان و دو زنجیرهٔ سبک یکسان. زنجیره های سبک هر کدام ۲۲۰ اسید آمینه و زنجیره های سنگین هر کدام ۴۴۰ اسید آمینه دارند. ساقهٔ اصلیY توسط دو زنجیرهٔ سنگین موازی که با پیوندهای دو سولفید به هم متصل شده اند شکل می گیرد. دو بازوی Y با کج شدن زنجیره های سنگین به خارج شکل می گیرد. موازی با قسمت خم هر زنجیرهٔ سنگین یک زنجیرهٔ سبک وجود دارد که به پیوندی دو سولفید به بخش خم شدهٔ زنجیرهٔ سنگین متصل شده است. ویژگی های مولکولی آنتی بادی ها فقط در بخشی که با آنتی ژن واکنش می دهد فرق می کند. این بخش که بخش متغیر نام دارد در نوک هر بازوی Y بوده و شامل یک جایگاه اختصاصی برای اتصال به آنتی ژن است. بقیهٔ قسمت های بازوهای Y، مثل تمام ساقهٔ اصلی،همیشه در آنتی بادی های مختلف مشابه است. به این قسمت آنتی بادی بخش ثابت می گویند. هر زنجیرهٔ سنگین دارای یک بخش لولایی انعطاف پذیر است، بنابراین نیاز نیست جایگا ه های اتصال به آنتی ژن در فاصلهٔ ثابتی از هم قرار داشته باشند.

انواع آنتی بادی ها

چون آنتی بادی ها از دستهٔ گلوبولین ها هستند و در پاسخ ایمنی دخالت دارند به آنها ایمنوگلوبولین (Ig) میگویند. ایمونوگلوبولین ها ۲۰ درصد از وزن کل پروتئین های پلاسما را تشکیل می دهند. پنج دسته ایمونوگلوبولین شناخته شده اند که شامل IgA، IgD، IgG، IgE و IgM می باشند. بخش ثابت روی زنجیرهٔ سنگین هر آنتی بادی کلاس آن را مشخص می کند. ایمونوگلوبولین ها ممکن است ۲ یا تعداد بیشتری جایگاه واکنش با آنتی ژن داشته باشند که بر این اساس دو ظرفیتی یا چند ظرفیتی هستند. نوعD، E و G دو ظرفیتی و A و M چند ظرفیتی اند. تمام کلاس ها به جزء IgM و IgA از یک مولکول با ساختار اساسی Y تشکیل شده اند. ایمونوگلوبولین ام (IgM) از پنج مولکول یکسان که به صورت یک پنتامر به هم متصل شده اند، درست شده و IgA به صورت یک دایمر است. هر کلاس ایمونوگلوبولین نقش دفاعی مجزایی دارد.

اساس ژنتیکی تنوع ایمونوگلوبولین ها

بدن ما توانایی تولید شمار بسیار زیادی آنتی بادی را دارد و بسیاری از آنها برای آنتی ژن هایی ساخته می شوند که هرگز در معرض آنها قرار نمی گیرند. اساس این تنوع بر مکانیزم ژنتیکی بی نظیر تولید اشکال بسیار زیاد ایمونوگلوبولین ها در لنفوسیت هاست. این تنوع بخشی مربوط به این است که آنتی بادی ها می توانند دو نوع مختلف زنجیره سبک و پنج نوع مختلف زنجیرهٔ سنگین داشته باشند. بخش متغیر زنجیره های سبک و سنگین

هر آنتی بادی توسط صدها ناحیهٔ ژن رمز می شود. این قطعات ژنی مربوط به آنتی بادی ها می توانند به صورتهای مختلف به هم بپیوندند و میلیون ها نوع آنتی بادی مورد نیاز بدن ما را تولید کنند.

فعال شدن کمپلمان توسط آنتی بادی ها

کمپلمان در چندین دفاع غیر اختصاصی دخالت دارد ولی همچنین نقش مهمی را همراه با آنتی بادی در دفاع اختصاصی بر علیه آنتی ژن ها بر عهده دارد. جایگاه اتصال آنتی بادی به کمپلمان فقط بعد از واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در معرض کمپلمان قرار می گیرد.وقتی دو مولکول IgG کنار به کنار به یک آنتی ژن می چسبند اولین پروتئین کمپلمان را فعال می کنند که این پروتئین به دو مولکول آنتی بادی می چسبد. یک مولکول IgM نیز می تواند کمپلمان را فعال کند. اولین پروتئین گروه کمپلمان به یک آنزیم فعال تبدیل می شود که پروتئین بعدی گروه را فعال می کند.پروتئین های کمپلمان به ترتیب به اتصال به یکدیگر ادامه می دهند. هر پروتئین که به کمپلکس آنتی ژن - آنتی بادی- کمپلمان می چسبد کمی آن را تغییر می دهد تا پروتئین بعدی بتواند به آن بچسبد. وقتی تمام پروتئین ها به آنتی ژن چسبیدند سوراخی در غشاء پلاسمایی آن ایجاد می کند که باعث ورود آزادانهٔ آب ویون ها به درون سلول می شود و سلول می ترکد. مجموعهٔ پروتئین های کمپلمان ترجیحاً کمپلکس حمله به غشاء (MAC) نامیده می شود.

تشکیل و بلوغ لنفوسیت ها

دفاع اختصاصی درارتباط نزدیک با سلول های B و T است. این دو نوع سلول منشاء یکسان دارند. هر دو از سلول های بنیادی خون ساز در مغز استخوان درست می شوند.سلولهای B در مغز استخوان چند مرحلهٔ تکوینی را می گذرانند. سلول هایB بالغ به بافت های لنفاوی محیطی مثل طحال و یا به دیگر بخش های مغز استخوان مهاجرت می کنند. در پاسخ به آنتی ژن این سلول های بالغ به سلول های پلاسما تبدیل می شوند که آنتی بادی ترشح می کنند؛ بعضی سلول های بنیادی مغز استخوان را ترک کرده و به غدهٔ تیموس مهاجرت می کنند و در آنجا به سلول های T غیر فعال تبدیل می شوند. سلول های T غیر فعال در بافت های لنفاوی محیطی به سلولهای T فعال تبدیل می شوند. سلول های T فعال آنتی بادی ترشح نمی کنند. تیموس و مغز استخوان،جایی که سلولهای بنیادی به لنفوسیت ها تکوین می یابند، بافت های لنفاوی مرکزی نام دارند. لنفوسیت های تازه تشکیل شده که هنوز غیر فعال هستند می توانند از طریق خون به بافت های لنفاوی محیطی شامل گره های لنفی، طحال، GALT (تجمعی از گروهک های لنفاوی فاقد کپسول در روده کوچک)، آپاندیس، لوزه ها و آدنوئید بروند و در آنجا با آنتی ژن های خارجی واکنش داده و فعال می شوند. سلول های B و T فقط بعد از فعال شدن توسط یک آنتی ژن خاص تمایز و تکثیر می یابند. وقتی آنتی ژن وارد بدن می شود، توسط ماکروفاژها فاگوسیته شده،بعد در سطح ماکروفاژ قرار می گیرد و به سلولهای B و T ارایه می شود که آن را تشخیص میدهند. همزمان

ماکروفاژها، اینتر لوکین-۱، پروتئینی که فعال شدن سلول های B و T را تحریک میکند، را ترشح می کنند. پس از فعال شدن سلول های B و T در اثر تشخیص آنتی ژن اختصاصی اشان باعث میشوندکه فاگوسیت های مجاورعفونت در بلعیدن و هضم آنتی ژن های مهاجم مؤثرتر عمل کنند.

پاسخ های ایمنی به آنتی ژن

دو نوع لنفوسیت B و T پاسخ های متفاوتی به آنتی ژن می دهند.

پاسخ هومورال

وقتی برای اولین بار سلول های B با آنتی ژن خاص خود روبرو می شوند، تقسیم شده و به سلول های پلاسما تبدیل می شوند. سلول های پلاسما آنتی بادی ساخته و به درون خون یا لنف ترشح می کنند. این واکنش را پاسخ ایمنی اولیه می گویند. آنتی بادی ها نمی توانند جدا جدا حرکت کنند بلکه توسط خون و لنف به محل عفونت یا جراحت می روند و در آنجا به آنتی ژن مربوطه متصل می شوند. چون اولین بار خون و لنف هومور humor نامیده شده اند به این نوع ایمنی، ایمنی هومورال یاخونی می گویند.

پاسخ سلولی

لنفوسیت‌های T با سلول‌های آلوده به ویروس و باکتری، و سلول‌های سرطانی مبارزه کرده و پس از اتصال با آنتی‌ژن خاص، تکثیر پیدا کرده و انواعی از سلول‌های T را ایجاد می کنند که شامل:

سلول‌های T کشنده یا سیتوتوکسیک

این سلول‌ها قادر به شناسایی و حمله مستقیم به سلول آلوده یا سرطانی هستند و با ترشح پروتئینی به نام پرفورین، منافذی را در سلول‌های آلوده ایجاد می‌کنند که منتهی به مرگ آن‌ها می شود.

سلول‌های T کمک‌کننده

این سلول ها فراوان‌ترین نوع لنفوسیت‌های T هستند که به اعمال دستگاه ایمنی کمک می‌کنند. ویروس HIV این سلول ها را مورد هدف قرار می دهند.

سلول‌های T تضعیف‌کننده

این سلول‌ها کنترل کننده اعمال سلول‌های T کشنده و کمک‌کننده هستند و به پاسخ ایمنی خاتمه می‌دهند و از پاسخ‌های بیش از حد شدید ممانعت به عمل می‌آورند.

سلول‌های T خاطره

این سلول‌ها در حالت آماده‌باش در بدن می‌مانند و طریقه مبارزه با ویروس را به نسل های بعدی انتقال می دهند.

۹-۱- التهاب و مراحل پاسخ التهابی در ماهی

بطور کلی، شروع التهاب بسیار پیچیده بوده و وابسته به فاکتورهای متعددی است. تعدادی از سیستم های آنزیمی خون شامل سیستم انعقاد خون، سیستم کینین و سیستم کمپلمان نقش اساسی دارند و با اینکه جزئیات کمتری در ماهیان شناخته شده است، پر واضح است که تشابهات بسیاری با پستانداران دارند. در طول فعال سازی سیستم کمپلمان توسط باکتری (بطور مستقیم از طریق مسیر فرعی یا غیر مستقیم از طریق لکتین ها یا CRP) فاکتورهای آنافیلاکتیک C_3a و C_5a تولید می شوند. در پستانداران این فاکتورها موجب تحریک رهاسازی آمین ها بوسیله پلاکت ها و ماست سل هامی شوند. در ماهی احتمالاً ترومبوسیت ها و سلول های دانه دار ائوزینوفیل (EGCs) نقش معادلی را داشته باشند، از آنجایی که به نظر نمی رسد ماهیان واجد هیستامین باشند و دگرانوله شدن EGCs توسط تولیدات باکتریایی ممکن است که در نتیجه رهاسازی 5-HT باشد. آمینها موجب اتساع موضعی عروق و حرکت نوتروفیل ها و منوسیت ها به محل آلودگی می شوند. مؤلفه C_5a کمپلمان فعال شده، نیز فعالیت کموتاکتیک نسبت به فاگوسیت های ماهی داشته و بنابراین در محل آلودگی تجمع می یابند. این هجوم فاگوسیت ها بوسیله سایتوکین ها و ایکوزانوئیدها بیشتر تحریک می شود. در پستانداران باکتری و لیپوپلی ساکارید موجب تحریک ماکروفاژها به تولید اینترلوکین-۱ (IL-1) می شوند که متوالیاً موجب تحریک رهاسازی ایکوزانوئیدها، که واجد فعالیت پیش التهابی و کموتاکسیک هستند، می شود. در ماهی فرآیند مشابهی قابل رؤیت است، چرا که نشان داده شده است که لیپوپلی ساکارید موجب تحریک تولید IL-1 توسط لکوسیت های ماهی و تولید ایکوزانوئیدها توسط انواع مختلفی از گلبول های سفید می شود (Grayfer and Belosevic, 2013).

گلبول های سفید

گلبول های سفید مهمترین بخش دومین خط دفاع غیراختصاصی بدن می باشد. فاگوسیت ها، بازوفیل ها و ائوزینوفیل ها (اسیدوفیل ها)، گلبول های سفید شرکت کننده در دفاع غیراختصاصی هستند. بیشتر دفاع غیراختصاصی توسط گروهی ازگلبول های سفید به نام فاگوسیت ها (سلول های فاگوسیتوزکننده) انجام میگیرد. گلبوهای سفید (فاگوسیت) با عمل فاگوسیتوز خود، میکروب ها را می بلعند و سپس از بین می برند. بنابراین درون سیتوپلاسم خود، آنزیم های لازم برای تجزیه انواع میکروب ها را دارند. ابتدا سلول باکتری به درون کشیده می شود و در اطراف آن غشاء پلاسمایی تشکیل شده، واکوئل غذایی را می سازد سپس با اتصال لیزوزوم به واکوئل غذایی واکوئل گوارشی بوجود می آید.

گلبول های سفید فاگوسیت عبارتند از : گرانولوسیت ها (نوتروفیل ها)، آگرانولوسیت ها (مونوسیت ها) و ماکرو فاژها. همه فاگوسیت ها به جزء ماکروفاژها خاصیت دیاپدز دارند. فاگوسیت ها نه تنها خود می توانند میکروب ها را در بافت ها یافته و از بین ببرند بلکه میکروب هایی هم که توسط لنفوسیت ها یا پروتئین های دیگر به دام افتاده اند را نیز از بین می برند (یعنی کار دفاع اختصاصی رانیز تکمیل می کنند). ماکروفاژها، نسبت به بقیه سلول های سفید درشت ترند و در نتیجه قابلیت فاگوسیتوز در بافت ها (خارج از خون) را بیشتر از بقیه انجام می دهند. فاگوسیتوز ابتدایی ترین روش دفاع محسوب می شود (البته اگر توسط گلبول های سفید انجام گیرد).

پروتئین ها

انواع بسیار زیادی از پروتئین ها در دفاع شرکت می کنند که برخی از آن ها دردفاع اختصاصی و برخی دیگر در دفاع غیراختصاصی شرکت می کنند. پروتئین های مکمل و اینترفرون، پروتئین هایی هستند که در دفاع غیراختصاصی شرکت می کنند.

فاگوسیتوز

دفاع غیراختصاصی در ماهیان با تکیه بر فاگوستیوز، ابتدائی ترین مکانیسم دفاعی به جنگ عفونت می رود. مرحله آغازین فاگوسیتوز، حرکت سلول های ایمنی (عمدتاً نوتروفیل ها و ماکروفاژها) در پاسخ به عامل خارجی است. حرکت از طریق کموکینز (حرکت غیر مستقیم فاگوسیت) یا کموتاکسی (حرکت مستقیم فاگوسیت) صورت می گیرد. تشخیص بین خودی وغیرخودی با پوشیده شدن مواد خارجی توسط گروه خاصی از گلبولین ها به نام اپسونین ها قبل از فاگوسیتوز تقویت می شود (اپسونین ها نسبت به سلول های طبیعی و سالم بدن واکنش نشان نمی دهند). پس از جابجایی در پاسخ به عامل خارجی، اتصال از طریق لکتین ها صورت می گیرد و توسط اپسونیزاسیون افزایش می یابد (Ainsworth et al.,1994). در مرحله بعدی فاگوسیتوز، عمل بلع عامل خارجی که حرکت ساده عامل خارجی به درون سلول و متعاقباً تشکیل فاگوزوم است، صورت می گیرد. بالاخره مرحله نهایی فاگوسیتوز، کشتن و هضم عامل خارجی است. در ماهی انهدام یا کشتن عامل خارجی از طریق مکانیسم های وابسته به اکسیژن و غیر وابسته به اکسیژن انجام می گیرد. مکانیسم های غیر وابسته به اکسیژن شامل pH پایین، لیزوزیم، لاکتوفرین و آنزیم های پروتئولیتیک و هیدرولیتیک است. مکانیسم های وابسته به اکسیژن در سالمونیدها به خوبی تعریف شده اند و مسیرها در سایر گونه ها بهتر تعریف شده است. ماکروفاژها و نوتروفیل ها از سلول های اصلی دخیل در فاگوسیتوز، به هنگام انفجار تنفسی عمدتاً از طریق تولید گونه های واکنشگر اکسیژن عوامل خارجی مثل باکتری ها را از بدن خارج می کنند (Secombes and Fletcher, 1992). بعلاوه دانه های سیتوپلاسمیک نوتروفیل ها برخوردار از میلوپراکسیداز هستند که در حضور هالید

(halide) و پراکسید هیدروژن از طریق هالوژناسیون دیواره سلول باکتری موجب مرگ باکتری می شود. و بعلاوه این سلول ها در لیزوزوم های خود از لیزوزیم ها و دیگر آنزیم های هیدرولیتیک برخوردارند (Fischer *et al.*, 2006). همچنین، ماکروفاژها در حیوانات تولید ناتریک اکساید می کنند که قدرتی بابر با مواد ضد باکتریایی، پراکسید نیترات ها و گروه های هیدروکسیل دارد (Secombes and Fletcher, 1992).

به طور خلاصه مراحل فاگوسیتوز شامل موارد ذیل می باشند:

۱- ذره خارجی یا میکروب به لوکوسیت ها می چسبد.

۲- لوکوسیت ها به دور میکروب پای کاذب درست می کنند.

۳- پای کاذب ذرهٔ خارجی یا میکروب را به داخل سلول می کشد و یک واکوئل فاگوسیتیک (فاگوزم) درون سیتوپلاسم ایجاد می کند .

۴- فاگوزم به یک لیزوزوم می چسبد و آنزیم های هیدرولیتیک به درون آن رها می شود که قادر به تجزیهٔ پروتئین ها، چربی ها،اسیدهای نوکلئیک و پلی ساکارید های پیچیده هستند.

۵- بعد از الحاق فاگوزوم و لیزوزوم، فاگولیزوزوم ایجاد می شود که ذرات خارجی در آن کشته می شوند.

۶- بعضی مواد هضم شده به عنوان غذا توسط لوکوسیت ها مصرف می شوند و بقیه توسط اگزوسیتوز خارج می شوند.

۱۰-۱- ارتباط بین تغذیه و سیستم ایمنی ذاتی

اثرات احتمالی فاکتورهای تغذیه ای روی شیوع بیماری های ماهیان پرورشی سالیان زیادی است که تشخیص داده شده است. اطلاعات در زمینه سیستم ایمنی ماهی و فاکتورهای غیر اختصاصی مقاومت به بیماری افزایش یافته و روش های بررسی مکانیسم های تأثیرات تغذیه ای روی بیماری های عفونی موجود است. بسیاری از مطالعات اخیر تأثیرات مواد مغذی مختلف روی عملکرد ایمنی اختصاصی، میزان مرگ و میر و امراض را مورد بررسی قرار داده اند. البته اطلاعات موجود در زمینه تغذیه و نیازهای غذایی نیز پیشرفت قابل توجهی داشته است. اخیراً محققین دریافته اند غذاهایی که رشد سریع تری را فراهم می سازند ممکن است بهترین مقاومت را در برابر بیماری فراهم نیاورند. در مطالعات اولیه تغذیه ای ماهیان، نیازها اکیداً بر اساس رشد، ضریب تبدیل غذایی و عدم سندروم های کمبود تغذیه ای بود. اکنون توجه محققین روی ترکیبی از میان کنش های تغذیه ای، اثرات فیزیولوژیکی، حساسیت به بیماری ها و سلامت عمومی متمرکز شده است.

مشکلات متعددی در رابطه با مطالعه تأثیرات تغذیه‌ای روی بیماری‌های ماهیان و در نتیجه مقایسه نتایج محققین مختلف وجود دارد: هیچ نوع جیره آزمایشی که پذیرش جهانی داشته باشد، حتی برای ماهیانی نظیر آزاد ماهیان که به صورت متراکم پرورش داده می‌شوند، وجود ندارد. همچنین جیره فرموله شده معینی که به خوبی توسط گونه‌های مختلف ماهیان مصرف شود وجود ندارد. علاوه بر این ایجاد شرایط محیطی مشابه و کامل، که در

مطالعات تغذیه‌ای موجودات خونگرم امکان پذیر است، وجود ندارد. جیره‌های آزمایشی معینی برای ماهیان پرورشی رایج دنیا وجود دارد که بیشتر محققین از این فرمولاسیون استفاده می‌کنند، اگرچه این جیره‌ها قابلیت هضم و جذب متفاوتی نسبت به جیره‌های تجاری دارند. برخی دیگر از محققین نیز غذاهای تجاری را که مناسبت بیشتری با پرورش دهندگان ماهی دارد، ترجیح می‌دهند. هر کدام از روش‌های مذکور دارای مزایا و معایبی است. با توجه به اینکه میان کنش مهمی بین اجزای مختلف جیره وجود دارد هر گونه تغییر در فرمولاسیون جیره ممکن است تأثیرات معنی‌داری روی نتایج بدست آمده داشته باشد.

ماهیان علاوه بر آبزی بودن موجوداتی خونسرد نیز هستند. تعیین مقدار واقعی غذای خورده شده و مقدار مواد مغذی مشخص بخصوص ویتامین‌های B که احتمال حل شدن آن در آب قبل از به مصرف رسیدن توسط ماهی وجود دارد مشکل است. همچنین میزان نیازمندی واقعی ماهیان به بسیاری از مواد مغذی وابسته به سن و درجه حرارت آب تغییر می‌کند. در نتیجه یافته‌های بدست آمده در مورد یک گونه ممکن است مطابقت جهانی نداشته باشد.

نکته سوم میان کنش بین استرس، تغذیه و بیماری های عفونی است. ماهیان یک نوع پاسخ استرسی کلاسیک در مقابل مشکلات محیطی (سموم، دما، شرایط اکسیژنی و تغییرات سریع محیطی)، شرایط نگهداری (تراکم، صید و حمل ونقل) و میان کنش های دسته جمعی از خود نشان می دهند. زمانی که ماهیان تحت استرس قرار می گیرند حساسیت به بیماری های عفونی افزایش می یابد. نشان داده شده است که کورتیزول مکانیسم مقاومت به بیماری های مختلف را تحت تأثیر قرار می دهد. تولید کورتیزول منجر به تخلیه اسید اسکوربیک شده و نیز به طور معنی داری فرآیندهای متابولیکی متعدد و فاکتورهای تغذیه ای (نظیر میزان کربوهیدرات مصرف شده قبل از استرس) را تحت تأثیر قرار می دهد. اگرچه سطوح کورتیزول در گردش در آزمایشات تغذیه ای و بیماری اندازه گیری نمی شود، ممکن است یک فاکتور مختل کننده باشد.

۱۱-۱- محرک های ایمنی

مواد شیمیایی طبیعی و صناعی متعددی به عنوان محرک سیستم ایمنی مهره داران شناخته شده اند. موادی که به عنوان محرک ایمنی مؤثر در ماهیان گزارش شده اند شامل ترکیبات شیمیایی، ترکیبات باکتریایی، پلی ساکاریدها، عصاره های گیاهی و جانوری، فاکتورهای تغذیه ای و سیتوکین ها می باشد. گزارش شده است که محرک های ایمنی گیاهی نسبت به سایر محرک های ایمنی ارزان تر، بی خطرتر و قابل دسترس تر هستند (Raa, 1996). اخیراً استفاده از محرک های ایمنی گیاهی در صنعت آبزی پروری به ویژه پرورش ماهی جهت تقویت سیستم ایمنی و افزایش مقاومت ماهی ها در برابر انواعی از بیماری های عفونی گسترش یافته است. تحقیقات زیادی نشان داده اند که محرک های ایمنی گیاهی قادرند مکانیسم های دفاع اختصاصی و غیر اختصاصی را افزایش دهند و یا موجب کاهش تلفات ماهی در برابر انواعی از بیماری های ویروسی و باکتریایی و یا عفونت

هـای انگلـی شـوند (Kim *et al*., 1999; Dügenci *et al*., 2003; Yin *et al*., 2006; Yin *et al*., 2009; Nya and Austin, 2009; Bilen and Bulut, 2010; Harikrishnan *et al*., 2010a; Bilen *et al*., 2011; Begum and Navaraj, 2012; Govind, 2013; Ardo, 2013; Haghighi and Sharifrohani, 2013). لازم است این نکته در نظر گرفتـه شـودکه محـرک هـای ایمنی از طریق تحریک مکانیسم پاسخ هومـورال و سـلولی ایمنـی ذاتـی، و نـه از طریـق تحریـک پاسـخ ایمنـی اکتسابی، مقاومت در برابر بیماری های عفونی را افزایش می دهند. ماهیان بیش از پستانداران بـه مکانیسـم هـای دفاع ذاتی خود وابسته هستند و لذا استفاده از محرک های ایمنـی در آبزیـان نسـبت بـه پسـتانداران از ارجحیـت بیشتری برخوردارند (Swain *et al*., 2006; Zapata *et al*., 2006). مکانیسم های دفاع غیر اختصاصی مهـم در ماهیـان شامل عوامل فیزیکی نظیر پوست و فلـس، آنـزیم هـای تجزیـه کننـده سـرم و موکـوس و اعضـای سـلولی نظیـر مونوسیت ها، ماکروفاژها، نوتروفیل ها و سلول های سیتوتوکسیک می باشد.

به منظور مطالعه فعال سازی اجزای سیستم ایمنی هومورال و سلولی نیاز به انجام آزمایشـات بیولوژیـک مربوطـه نظیر فعالیت کمپلمان، تولید لیزوزیم، فاگوسیتوز، کموتاکسی و نیز تولید مواد کشنده باکتری ها نظیر گونه هـای اکسیژن فعال (ROS)، هستند که فاکتورهای مناسبی برای پایش فعال سازی سیستم ایمنی ذاتـی مـی باشـند؛ زیـرا مستقیماً در افزایش فعالیت کشندگی دخیل بوده و روش آنالیز آنها نسبتاً ساده است.

پیشنهاد شده است که یکی از مهمترین روش های مدیریت بیماری در صنعت پرورش آبزیان، استفاده از محرک های ایمنی پیشگیری کننده جهت تقویت مکانیسم دفاعی است (Raa *et al*., 1992). شناخته شده است که محرک های ایمنی در ماهی سبب افزایش بعضی از جنبه های خاص ایمنی ذاتـی مـی شـود (Harikrishnan*et al*., 2010b). پیشرفت های اخیر در ارتبـاط بـا ایمونـو- مغـذی هاآشـکار سـاخته اسـت کـه بعضـی از مغـذی هـا بـه وضـعیت ایمونولوژیکی ماهی مرتبط هستند (Kumar *et al*., 2005). تعدادی از محققـین بـه بررسـی تـأثیر جیـره غـذایی در ایجاد پاسخ ایمنی در ماهی پرداخته اند و نشان دادند که افزایش مقاومت ماهی در برابر بیماری ها به جیره غذایی وابسته است (Landolt, 1989; Blazer, 1992; Waagbo, 1994). اگر چه اطلاعاتی در این زمینـه موجـود اسـت، ولـی مکانیسم های دخیل در این زمینه هنوز تا حدودی مبهم است.

۱-۱۱-۱- تعریف محرک ایمنی

طبق تعریف، محرک ایمنی یک ماده شیمیایی، دارویی، استرس زا و یـا عملـی اسـت کـه از طریـق میـان کـنش مستقیم با سلول هایی از سیستم ایمنی که آن ها را فعال می سازند، موجب افزایش ایمنی ذاتی یا غیر اختصاصـی می شوند. محرک های ایمنی وقتی به تنهایی بکار روند موجب افزایش پاسخ ایمنی غیراختصاصی می شوند ولی اگر با واکسن ها بکار گرفته شوند علاوه بر افزایش پاسخ ایمنی غیر اختصاصـی، موجـب افـزایش پاسـخ ایمنـی اختصاصی نیز می شوند. در عمل، محرک های ایمنی مکمل هـای غـذایی هسـتند کـه بـه کنتـرل بیمـاری هـای

ارگانسیم های متعدد نظیر ماهی کمک کرده و مقاومت به بیماری را با تنظیم مکانیسم های دفاعی میزبان در مقابل میکروارگانیسم های بیماریزای فرصت طلب موجود در محیط، افزایش می دهند.

۲-۱۱-۱- طبقه بندی محرک های ایمنی

ترکیبات محرک ایمنی اغلب بر اساس عملکرد، منشاء و ترکیب گروه ناهمگن دسته بندی می شوند. ترکیبات غیر مغذی که توانایی آنها در تحریک پاسخ ایمنی ماهیان در مطالعات متعدد مورد بررسی قرار گرفته اند شامل موارد متعددی نظیر بتا گلوکان(Yano et al., 1991; Jenny and Anderson, 1993)، پپتیدوگلیکان و لیپو پلی ساکارید (Yano *et al*., 1991) می باشد. با این وجود، ترکیبات مشتق شده از جانوران نظیر کیتین و کیتوزان (Anderson and Swicki, 1994; Sahoo and Mukherjee, 1999; Bullock *et al*., 2000)،عصاره صدف دوکفه ای abalone، مشتقات باکتریایی نظیر مورامیل دی پپتید(MDP)، آلگینات ها و نیز اسپیرولینا و تعداد زیادی از عصاره های گیاهان دارویی (Dugenci et al., 2003; Jain and Wu, 2003; 2004; Christybapita *et al*., 2007; Divyagnaneswari *et al*., 2007) مورد بررسی قرار گرفته اند. در مطالعات صورت گرفته در زمینه تحریک ایمنی در ماهیان، پاسخ هایی از سیستم ایمنی که به طور مکرر گزارش شده اند شامل فعال سازی ماکروفاژها، افزایش فاگوسیتوز به وسیله نوتروفیل ها و مونوسیت ها، افزایش تعداد لنفوسیت ها، افزایش ایمونوگلوبولین های سرم و افزایش لیزوزیم بوده است (Raa, 1999). محرک های ایمنی که در جیره ماهیان در شرایط آزمایشگاهی مؤثر بوده اند در سطوح مختلف روی سیستم ایمنی غیر اختصاصی تأثیر می گذارند. اولین دفاع سیستم ایمنی موادی هستند که در موکوس یافت شده و توسط سلولهای آندوتلیال ترشح می شوند، ماکروفاژهایی که به طور مستقیم به عوامل پاتوژن حمله می کنند، و شامل فاکتورهای تجزیه کننده و آگلوتینه کننده هستند. پروتئین ها و آنزیم ها مستقیماً بر مولکولهای سطح میکروب ها عمل کرده و سبب بازدارندگی رشد باکتری یا افزایش فاگوسیتوز می شوند. اکثر محرک های ایمنی میکرو ارگانیسم های غیر عفونی یا محصولات فرعی آنها هستند. این ترکیبات توسط اجزای سلولی سیستم ایمنی ذاتی شناسایی شده و همانند زمان مواجهه با عامل بیماری زا، پاسخ های هومورال و سلولی آغاز می شوند. تاریخچه تکاملی هر موجود آبزی تعیین کننده فاکتورهای ایمنی موجود، دامنه و موفقیت پاسخ آنها در برابر عوامل محرک ایمنی یا پاتوژن است. توجیه بیولوژیک استفاده از محرک های ایمنی در جیره ماهیان بر اساس تاریخچه توسعه تکامل سیستم ایمنی در موجودات آبزی است. ایمنی غیر اختصاصی ماهی نسبت به ایمنی اختصاصی تکامل بیشتری دارد. زنده ماندن در محیط های آبی نیازمند به سیستم ایمنی است که توان مقابله با چالش دائمی پاتوژن های آبزی را داشته باشد. در آبزی پروری یکی از امیدوار کننده ترین روش های تقویت مکانیسم های دفاعی مدیریت بیماری ها تجویز پیشگیرانه محرک های ایمنی است (Raa et al., 1992). محرک های ایمنی موجود در جیره غذایی سبب تحریک سیستم ایمنی غیر اختصاصی می گردند، در حالیکه مواد آنتی ژنیک نظیر باکترین ها یا واکسن ها موجب شروع فرآیند طولانی تولید آنتی بادی و ایمنی

اکتسابی می شوند (Maurilio, 2011). موجودات آبزی واجد پاسخ های سریع و عمومی که در معرض مداوم پاتوژن ها قرار می گیرند جهت جبران پاسخ ایمنی اختصاصیبه زمان طولانی تری نیاز دارند. ایمنی شناسان مطالعات خود در زمینه تحریک ایمنی را روی تحقیقات آزمایشگاهی طراحی شده، جهت تشریح عملکردهای اجزای پاسخ ایمنی فردی متمرکز کرده اند. استفاده از محرک های ایمنی روشی بی نظیر برای پرورش دهندگان ماهی است که به دنبال بکارگیری روش های کنترل تلفات ناشی از بیماری ها هستند. میزان علاقمندی به استفاده از این روش به دلیل مشکلات ناشی از بیماری های ویروسی، باکتریایی، انگلی و قارچی که از عوامل محدود کننده در بسیاری از مزارع پرورش ماهی، تفریخ گاه ها و ایستگاه های آبزی پروری می باشند، افزایش یافته است. علاوه بر این، مشکل جدی دیگر کمبود مواد شیمیایی- دارویی مورد تأیید در دسترس است که به دلیل وجود نگرانی ها در مصرف کنندگان و تجمع مواد در محیط، در غذای ماهیان مورد استفاده قرار می گیرد. مصرف آنتی بیوتیک ها در آبزیان وسیع بوده و نگرانی هایی در زمینه افزایش نژادهای مقاوم به آنتی بیوتیک در محیط اطراف مکان هایی که دارو استفاده شده است، وجود دارد. در واقع، با اینکه آنتی بیوتیک اغلب در درمان یا کنترل عوامل بیماری مؤثر هستند، روش های دیگری برای کنترل بیماری های ماهیان نیاز است. مشکلات موجود مربوط به آنتی بیوتیک ها، داروها و درمان شیمیایی در پیشگیری بیماری های ماهی، موجب پایه گذاری مرحله جدید پیشگیری از بیماری شده است. امروزه در صنعت آبزی پروری توجه بیشتری به استفاده از محرک های ایمنی به عنوان جایگزین مناسب آنتی بیوتیک ها و یا کاهش مصرف آنان و نیز جهت افزایش فعالیت مکانیسم های دفاع غیر اختصاصی و ایجاد مقاومت در برابر بیماری های شایع شده است (Raa, 1996; Sakai, 1999).

۳-۱۱-۱- روش های تجویز محرک های ایمنی در ماهی

شرایط مختلف حاکم در مزارع پرورشی موجب ایجاد روش های مختلف تجویز محرک های ایمنی شده است. روش های پذیرفته شده شامل تزریق، غوطه وری و خوراکی است.

٤-۱۱-۱- روش های ارزیابی محرک های ایمنی

دو روش عمده برای ارزیابی کارآیی محرک های ایمنی وجود دارد.

روش *in vivo* به طور مثال آزمایشات محافظتی در برابر پاتوژن های ماهی

روش *in vitro* به طور مثال اندازه گیری کارآیی مکانیسم های ایمنی هومورال و سلولی

آزمایشات محافظتی در مقابل پاتوژن های ماهی با نتایج موفقیت آمیزی همراه بوده است. افزایش پاسخ ایمنی و نیز افزایش مقاومت در برابر پاتوژن ها در اثر استفاده از محرک های ایمنی نشان داده شده و حاکی از نقش آنها در آبزی پروری است. اما در هر حال دانسته ها در مورد سیستم ایمنی بیشتر گونه ها و نیز طریقه عمل اکثر مواد

محرک ایمنی بسیار محدود است. ارزیابی محرک های ایمنی از طریق روش *in vitro* در مطالعات مقدماتی اولیه ترجیح داده می شوند. با این وجود، در صورت امکان بایستی آزمایشات *in vitro* همراه با آزمایشات *in vivo* انجام گیرد تا مکانیسم های دخیل در حفاظت میزبان شفاف سازی گردد. ارزیابی *in vitro* بایستی حداقل بر اساس پارامترهایی چون لیزوزیم سرم، کمپلمان، تعداد کل گلبول های سفید و قرمز خون، فعالیت انفجار تنفسی، فاگوسیتوز، کموتاکسی، کموکینز و ازدیاد لنفوسیت ها باشد. برخی دیگر از پارامترهای توصیه شده برای اندازه گیری شامل پروتئین های واکنشگر C، فعالیت سیتوتوکسیک طبیعی و عامل فعال کننده ماکروفاژ، MAF هستند.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد شیمیایی و معرف ها

مواد شیمیایی ذیل جهت آزمایشات ایمونولوژی خون از شرکتSigma-Aldrich خریداری شد به جزء ماده میکروکوکوس لیزودکتیکوس که از شرکت Merck تهیه گردید.

Histopaque-1.119
Histopaque-1.077
Hanks' Balanced Salt Solution
Cytochrome c from bovine heart
Phorbol 12-myristate 13 –acetate
Superoxide Dismutase bovine
Lysozyme from chicken egg white
Congo red
Yeast from Saccharomyces cerevisiae
Trypsin-EDTA Solution 10X
Albumin from bovine serum
Glucan
Nitro Blue Tetrasolium
Phosphate buffered saline solution
Micrococcus Lysodeikticus

مواد آزمایشات خون شناسی و بیوشیمیایی خون شامل محلول هایم، رنگ گیمسا، متانول، اتانول، آب مقطر، محلول هپارین هلال احمر جمهوری اسلامی ایران، کیت های تشخیص کمی پروتئین تام و آلبومین سرم (شرکت پارس آزمون)، کیت اندازه گیری هموگلوبین شرکتZiestChem Diagnostics, Tehran, Iran، بودند.

۲-۲- دستگاه ها و وسایل مورد استفاده

برای تهیه عصاره مایع غلیظ گیاهان مرزنجوش و صبر زرد از دستگاه عصاره گیری شرکت کشت وصنعت سها جیسا وابسته به سازمان هلال احمر جمهوری اسلامی ایران و برای تهیه عصاره خشک از دستگاه Rotatory evaporator مدل R-124 ساخت کشور سوئیس مجهز به حمام آب گرم، مدل BÜCHI B-480 در مرکز رشد واحدهای فن آوری فرآورده های دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی دانشگاه تهران استفاده شد (شکل۲-۱). برای انجام آزمایشات خون شناسی از دستگاه های سانتریفیوژ اپندورف مدل

5418، سانتریفیوژ چند سرعتی مدل ALC PK131، میکروسانتریفیوژ هماتوکریت با سیستم کنترل دیجیتالی مدلPM22 شرکت پارس آزما، لرزانگرمدل B.M.P. Vibramix، دستگاه شمارشگر سلولی Sysmex K1000، پیپت های ملانژور، میکروسکوپ دوربین دارNikon Eclipse مدلE200، انکوباتور یخچال دار، اسپکتروفتومتر مدلElectron Corporation Thermo، اتوکلاو ۲۵ لیتری شرکت کاووش میکا، بن ماری، و برای توزین مواد از ترازوی Metler Toledo مدلAB204-N با دقت ۴ رقم اعشار استفاده شد. لام و لامل، لام نئوبار، پیپت ملانژور قرمز و سفید، خط کش هماتوکریت، سینی رنگ آمیزی، سرنگ، لوله آزمایش، شان، تامپون از دیگر لوازم مورد استفاده بودند.

شکل۲-۱. نمایی از دستگاه تقطیر در خلاء

۳-۲- تهیه نمونه گیاهان مرزنگوش و صبر زرد

پس از شناسایی رویشگاه گونه گیاهی مرزنجوش در سطح استان مازندران، جهت جمع آوری نمونه گیاهی به منطقه رویشی مراجعه شد و نمونه سرشاخه های گیاهی جهت شناسایی گونه (هرباریوم) جمع آوری گردید. نمونه گیاهی جمع آوری شده جهت شناسایی به پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی ارسال و از نظر علمی تأیید نام گردید (اشکال۲-۲ و ۲-۳).

شکل ۲-۲. سرشاخه های هوایی گیاه مرزنگوش *Oliganum vulgare*

شکل۲-۳ .گیاه مرزنگوش خشک و خرد شده

ابرگ های کاملاً ارگانیک گیاه آلوئه ورا طبی *Aloe vera barbadensis* از شرکت هاوین کشت جنوب به مقدار لازم خریداری شد (شکل ۲-۴).

شکل۲-٤. برگ گیاه آلوئه ورا*Aloe vera*

٤-۲- لزوم عمل عصاره گیری از گیاهان

برای استخراج مواد مؤثره و فعال گیاه لازم است که عمل عصاره گیری از گیاه انجام شود. در نمونه های آزمایشگاهی، عصاره گیری از گیاه توسط حلال های مناسب و به روش های مختلف ماسراسیون (خیساندن)، پرکولاسیون و سوکسله تهیه می شود.

٥-۲- آماده سازی نمونه گیاهان جهت عصاره گیری

سرشاخه های جمع آوری شده گیاه مرزنجوش در شرایط پایه و به وسیله تخته پرس و برگ گیاه آلوئه ورا پس از تخلیه ژل در خشک کن الکتریکی با دمای زیر ۴۰ درجه سانتی گراد خشسک شدند و سپس توسط دستگاه آسیاب خردشدند و آماده عصاره گیری شدند.

٦-۲- عمل عصاره گیری، تغلیظ نمونه ها و تهیه عصاره خشک

عصاره گیری از گیاهان به روش پرکولاسیون انجام شد. ابتدا هر یک از گیاهان خشک و آسیاب شده، در دستگاه عصاره گیری صنعتی شرکت کشت وصنعت سها جیسا قرار داده شد (شکل ۲-۵). سپس با افزودن الکل اتانول ۸۰٪ در دمای ۵۵-۵۰ درجه سانتی گراد از گیاهان عصاره گیری به عمل آمد. نسبت گیاه به حلال ا به ۳ بود. پس از اتمام عصاره گیری، عصاره حاصله توزین و با دستگاه تقطیر در خلاء (روتاری) در دمای ۵۵-۵۰ درجه سانتی گراد تا حد امکان تغلیظ و عملیات پاستوریزاسیون انجام شد (شکل ۲-۶). همچنین وزن عصاره تغلیظ شده و بازده عصاره گیری بدست آمد. جهت تعیین باقیمانده خشک مقدار ۲-۱ گرم از عصاره وزن گردید و به یک ظرف شیشه ای کاملاً خشک منتقل گردید. سپس ظرف مربوطه در یک آون با دمای ۱۳۰-

۱۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا زمانی که تفاوت دو وزن متوالی بیش از ۵ میلی گرم نباشد (حداقل زمان سپری شده جهت وزن اولیه یک ساعت می باشد). سپس با در دست داشتن وزن اولیه و وزن ثانویه در صد کاهش وزن محاسبه گردید. جهت تعیین میزانpH عصاره با توجه به غلیظ بودن عصاره و نیز جهت جلوگیری از آسیب دیدن الکترود، ابتدا محلول ۱۰٪ از عصاره تهیه گردید. سپس دستگاه pH متر توسط محلول های بافر ۴، ۷ و ۹ به طور جداگانه کالیبره گردید. لازم به توضیح است که پس از هر یک از مراحل کالیبراسیون، الکترود کاملاً با آب مقطر شستشو داده شد و کاملاً خشک گردید. سپس با قرار دادن الکترود در داخل محلول عصاره ۱۰٪ مقدار pH هر یک از عصاره قرائت گردید. عصاره تغلیظ شده تا زمان مصرف و تبدیل به پودر در فریزر ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری گردید (Ozakan *et al*., 2007).

جداول ۲-۱ و ۲-۲ به ترتیب آنالیز و آزمایشات میکروبی عصاره مرزنگوش و صبر زرد را نشان می دهند.

شکل ۲-۵. دستگاه های خشک کن و عصاره گیری شرکت کشت و صنعت کیاهان دارویی سها جیسا (بترتیب از راست به چپ)

شکل ۲-٦. عصاره تغلیظ شده گیاهان مرزنگوش و صبرزرد (به ترتیب از راست به چپ)

جدول۲-۱- آنالیز عصاره مرزنگوش شامل رنگ، بو، باقیمانده خشک، چگالی وpH، و نیز نتایج آزمایشات میکروبی

SOHA JISSA Co.
Plantation Industries & Processing of Medicinal Plants

DOC.NO:F. 0439	Certificate of Analysis	No: 1
Batch No: 001	Origanum Vulgare	Date: 90.03.23

Product Name: Ori-CE156	Type of Product: Concentrated Extract	Plant Part Used: Leaf
Mfc. Date: 90.01.22 (Apr.11.2011)	Best use before: 6 Months	Preservative: Methyl & Propyl Paraben
Quantity: 1 Lit	Customer: Dr. Haghighi	

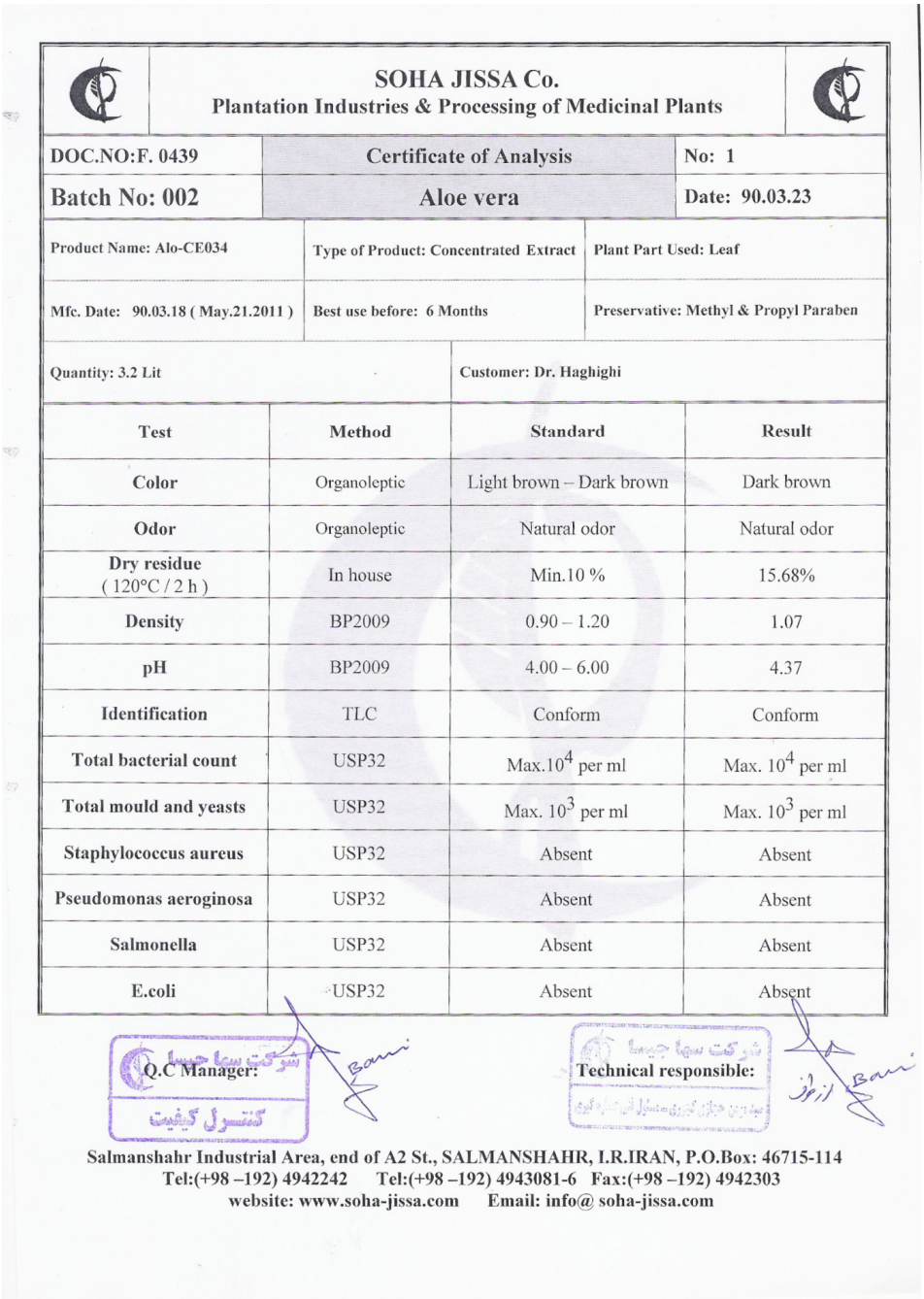
Test	Method	Standard	Result
Color	Organoleptic	Light brown – Dark brown	Dark brown
Odor	Organoleptic	Natural odor	Natural odor
Dry residue (120°C / 2 h)	In house	Min.15 %	27.82%
Density	BP2009	0.90 – 1.20	1.09
pH	BP2009	4.00 – 6.00	5.07
Identification	TLC	Conform	Conform
Total bacterial count	USP32	Max.10^4 per ml	Max. 10^4 per ml
Total mould and yeasts	USP32	Max. 10^3 per ml	Max. 10^3 per ml
Staphylococcus aureus	USP32	Absent	Absent
Pseudomonas aeroginosa	USP32	Absent	Absent
Salmonella	USP32	Absent	Absent
E.coli	USP32	Absent	Absent

شرکت سها جیسا
کنترل کیفیت
Q.C Manager:

شرکت سها جیسا
Technical responsible:

Salmanshahr Industrial Area, end of A2 St., SALMANSHAHR, I.R.IRAN, P.O.Box: 46715-114
Tel:(+98 –192) 4942242 Tel:(+98 –192) 4943081-6 Fax:(+98 –192) 4942303
website: www.soha-jissa.com Email: info@ soha-jissa.com

جدول۲-۲- آنالیز عصاره آلوئه ورا شامل رنگ، بو، باقیمانده خشک، چگالی وpH، و نیز نتایج آزمایشات میکروبی



SOHA JISSA Co.
Plantation Industries & Processing of Medicinal Plants

DOC.NO:F. 0439	Certificate of Analysis	No: 1
Batch No: 002	Aloe vera	Date: 90.03.23
Product Name: Alo-CE034	Type of Product: Concentrated Extract	Plant Part Used: Leaf
Mfc. Date: 90.03.18 (May.21.2011)	Best use before: 6 Months	Preservative: Methyl & Propyl Paraben
Quantity: 3.2 Lit	Customer: Dr. Haghighi	

Test	Method	Standard	Result
Color	Organoleptic	Light brown – Dark brown	Dark brown
Odor	Organoleptic	Natural odor	Natural odor
Dry residue (120°C / 2 h)	In house	Min.10 %	15.68%
Density	BP2009	0.90 – 1.20	1.07
pH	BP2009	4.00 – 6.00	4.37
Identification	TLC	Conform	Conform
Total bacterial count	USP32	Max.10^4 per ml	Max. 10^4 per ml
Total mould and yeasts	USP32	Max. 10^3 per ml	Max. 10^3 per ml
Staphylococcus aureus	USP32	Absent	Absent
Pseudomonas aeroginosa	USP32	Absent	Absent
Salmonella	USP32	Absent	Absent
E.coli	USP32	Absent	Absent

Q.C Manager: شرکت سها جیسا کنترل کیفیت

Technical responsible: شرکت سها جیسا

Salmanshahr Industrial Area, end of A2 St., SALMANSHAHR, I.R.IRAN, P.O.Box: 46715-114
Tel:(+98 –192) 4942242 Tel:(+98 –192) 4943081-6 Fax:(+98 –192) 4942303
website: www.soha-jissa.com Email: info@ soha-jissa.com

۷-۲- روش تهیه پودر خشک عصاره های مرزنگوش و صبر زرد

برای تهیه پودر خشک عصاره هیدرو الکلی گیاهان مرزنگوش و آلوئه ورا ازامکانات مرکز رشد واحدهای فن آوری فرآورده های دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی دانشگاه تهران استفاده شد. در این راستا عصاره هیدروالکلی مایع تغلیظ شده نمونه های گیاهی، به کمک کاغذ صافی، صاف شده و با ۲۰ درصد اکسی پیان متشکل از مالتو دکسترین و کاربوکسی متیل سلولوز (به نسبت مساوی)، مخلوط شد و به کمک دستگاه spray dryer به پودر خشک تبدیل گردید (شکل ۲-۷).

شکل ۲-۷. پودر عصاره خشک گیاهان مرزنگوش و صبر زرد (بترتیب از راست به چپ)

۸-۲- طراحی آزمایش و ماهی

در این تحقیق از دو گروه وزنی ماهی قزل آلای رنگین کمان پرورشی استفاده شد. در مرحله اول از ۱۲۰۰ عدد بچه ماهی قزل آلا رنگین کمان با میانگین وزنی ۱۳ گرم و در مرحله دوم از ۲۴۰۰ عدد بچه ماهی قزل آلا رنگین کمان با میانگین وزنی بالای ۲ گرم استفاده شد. ماهی های مورد نیاز پروژه از کارگاه پرورش ماهی قزل پاک (شاه منصوری) پس از اطمینان از سلامتی کامل ماهی ها تأمین گردید و به مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی تنکابن منتقل و پس از هم دما سازی به حوضچه های گرد بتونی منتقل و برای مدت ۲ هفته جهت سازگاری با محیط نگه داری شدند. در طول این مدت ماهی ها با غذای معمولی ساخت شرکت چینه مورد تغذیه قرار گرفتند. سپس برای انجام آزمایش مرحله نخست، ماهیان در ۴ گروه و هر گروه با ۳ تکرار در ۱۲ حوضچه گرد بتنی با ظرفیت آبی ۱۰۰۰ لیتر (در مرحله اول، هر حوضچه حاوی ۱۰۰ عدد بچه ماهی ۱۳ گرمی و در مرحله دوم تعداد ۲۰۰ عدد بچه ماهی ۲ گرمی) توزیع شدند.گروه ها شامل ۱) گروه کنترل (دارونما)، ۲) گروه مرزنگوش، ۳) گروه صبر زرد، ۴) گروه لوامیزول بودند. در شروع آزمایش، ۴ نوع غذا شامل غذای حاوی ۱٪ پودر دارونما (لاکتوز)، غذای حاوی۱٪ پودر خشک عصاره مرزنگوش، غذای حاوی۱٪ پودر خشک عصاره صبرزرد یا آلوئه ورا و غذای حاوی۰/۱ ٪ پودر لوامیزول،ساخته شد (شکل ۸-۲). تغذیه ماهی های هر گروه با غذای ساخته شده خاص فقط یک بار در روز و در اولین وعده غذایی (ساعت ۸ صبح) صورت گرفت و در بقیه وعده ها از غذای معمولی (بدون مواد افزودنی) استفاده شد. تغذیه ماهی ها با غذای حاوی مواد افزودنی مورد اشاره به مدت ۱۰ هفته انجام شد. در طول دوره آزمایش دمای آب به طور روزانه در دو نوبت صبح و عصر توسط دماسنج دیجیتالی (Digital Poket Themometer, France) مورد اندازه گیری قرار گرفت.

شکل ۲-۸. نمایی از ٤ نوع غذای حاوی مکمل های مختلف شامل عصاره خشک صبرزرد، مرزنگوش، لوامیزول و دارونما و ظروف حاوی مقدار غذای مکمل روزانه

۹-۲- روش های خونگیری

برای اندازه گیری پارامترهای خونی مورد نظر هر ۲ هفته یک بار و در ۵ نوبت (هفته های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ پس از تغذیه با غذای های حاوی مواد خاص مورد اشاره) از ۱۵ماهی در هر گروه خونگیری انجام شد. برای بیهوش نمودن ماهی ها جهت خونگیری از داروی بیهوشی تری کایین متان سولفونات(MS_{222}) به میزان ۱۰۰ppm استفاده شد. خونگیری از ماهیان مرحله نخست (بچه ماهیان ۱۳ گرمی) از طریق پونکسیون ورید ساقه دمی به وسیله سرنگ های انسولین و از ماهیان مرحله دوم (بچه ماهیان ۲ گرمی) از طریق قطع ورید ساقه دمی انجام شد (اشکال ۹-۲ و ۱۰-۲). نمونه های خونهم به صورت هپارینه و هم غیر هپارینه (تهیه سرم) تهیه گردید. برای اندازه گیری فاکتورهای خونی از نمونه خون هپارینه و برای اندازه گیری فاکتورهای سرمی از نمونه خون غیر هپارینه استفاده شد. فاکتورهای خونی شامل شمارش گلبول های سفید و قرمز خون، شمارشسلول های افتراقی (مونوسیت، لنفوسیت ونوتروفیل)، میزان هماتوکریت، هموگلوبین و اندیس های گلبولی (MCHC, MCV, MCH)، فاکتورهای بیوشیمیایی شامل پروتئین تام، آلبومین، گلوبولین، و فاکتورهای ایمونولوژی شامل فعالیت آنزیم لیزوزیم، فعالیت فاگوسیتوز و فعالیت انفجار تنفسی اندازه گیری شدند.

۱۰-۲- آزمایشات خون شناسی

۱-۱۰-۲- خون گیری

پس از پایان هر دوره تغذیه در هفته های مختلف (هفته های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰) تعداد ۱۵ ماهی از هر گروه به صورت تصادفی توسط ساچوک صید شده و توسط ماده بیهوشی MS_{222} به میزان ۱۰۰ppm بیهوش شدند. سپس هر یک از ماهیان بیهوش شده بر روی شان سبز قرار داده شده و رطوبت بدن توسط تامپون تعدیل و خونگیری از ماهیان مرحله اول به وسیله سرنگ انسولین و از ورید ساقه دمی و در ماهیان مرحله دوم از طریق قطع ورید ساقه دمی صورت گرفت. نمونه های خون از سرنگ به لوله های آغشته به هپارین (۰/۱ سی سی) و فاقد هپارین منتقل شده و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگه داری شدند. برای تعیین فاکتورهای خونی مورد نظر این تحقیق، تمام نمونه های خون در پایان هر دوره در یک روز مورد آزمایش قرار می گرفتند.

شکل ۲-۹. نمایی ازوسایل مور د نیاز خونگیری شامل: لوله های آغشته و غیر آغشته به هپارین، جا لوله ای، سرنگ، شان سبز و تامپون

شکل ۲-۱۰.نمایی از روش خونگیری از ورید ساقه دمی و جمع آوری نمونه های خون اخذ شده در لوله های آغشته و یا غیر آغشته به هپارین (به ترتیب از راست به چپ)

۲-۱۰- ۲- شمارش سلول های قرمز و سفید خون

شمارش سلول های سفید و قرمز خون با استفاده ازمحلول رقیق کننده هایم Hyem ولام هماتوسیومتر یا نئوبار انجام شد (حقیقی، ۱۳۸۸).به طور خلاصه برای شمارش گلبول های قرمز خون از پیپت ملانژور قرمز استفاده شد که به وسیله شیلنگ مخصوص پیپت، خون تا خط ۰/۵ کشیده شد و تا درجه ۱۰۱ با محلول هایم رقیق و رقت یک دویستم بدست آمد و پس از ۱۰ دقیقه تکان دادن در همزن (shaker) و دور ریختن چند قطره اول آن از لام هماتوسیتومتر (نئوبار) برای شمارش گلبول های قرمز استفاده شد. برای این منظور یک قطره خون رقیق شده را به وسیله یک پیپت پاستور به لبه لامل تماس داده تا در اثر عمل مویینگی خون رقیق شده به داخل اتاقک کشیده شود. سپس برای شمارش سلولی، لام هماتوسیتومتر را در زیر میکروسکوپ قرار داده و پس از گذشت حدود ۲ دقیقه جهت بی حرکت شدن سلول ها، تعداد گلبول های قرمز خون را در ۵ مربع کوچک شامل ۴ مربع در گوشه ها و یک مربع در مرکز و با استفاده از دستگاه شمارشگر سلولی Sysmex K1000 شمارش نموده و عدد به دست آمده در عدد ۱۰۰۰۰ ضرب شد. تعداد گلبول های قرمز خون برحسب میلی متر مکعب خون محاسبه شد.

برای محاسبه اندیس های گلبول قرمز خون (MCHC, MCV, MCH)که شاخص سلامتی در پزشکی و دامپزشکی شناخته شده اند، به روش ذکر شده در کتاب روش های آزمایشگاهی خون شناسی ماهی مورد محاسبه قرار گرفتند (حقیقی، ۱۳۸۸).

اجمالاً برای شمارش گلبول های سفید از پیپت ملانژور سفید استفاده شد. ابتدا خون تا خط ۰/۵ کشیده شد و تا درجه ۱۱ با محلول رقیق کننده (اسید استیک ۲٪ + ۱۰۰ سی سی آب مقطر+ ۲ سی سی اسید استیک گلاسیل + ۱ سی سی ویوله دوژانسین) رقیق شد. از مزایای محلول رقیق کننده فوق این که گلبول های قرمز خون لیزه شده و گلبول های سفید فیکس می شوند. پس از ۱۰ دقیقه تکان دادن در همزن (shaker) و دور ریختن چند قطره اول آن از لام هماتوسیتومتر برای شمارش گلبول های سفید استفاده شد. برای این منظور یک قطره خون آماده شده را به وسیله پیپت پاستور به لبه لامل نئوبار تماس داده تا در اثر عمل مویینگی خون رقیق شده به داخل اتاقک کشیده شود. سپس برای شمارش سلولی، لام هماتوسیتومتر را درزیر میکروسکوپ قرار داده و پس از گذشت حدود ۲ دقیقه جهت بی حرکت شدن سلول ها، تعداد گلبول های سفید خون در ۴ مربع کناری لام که هریک شامل ۱۶ مربع کوچک تر هستند شمارش و عدد حاصله در عدد ۵۰ ضرب شد(حقیقی، ۱۳۸۸).

برای تعیین سلول های افتراقی خون از طریق تهیه اسمیر و رنگ آمیزی گیمسا استفاده شد (حقیقی، ۱۳۸۸). ابتدا یک قطره کوچک خون را بر روی یک انتها های لام میکروسکوپ تمیز و خشک قرار داده و با انتهای صاف یک لام دیگر را که کاملاً با ماده پاک کننده مانند اتانول یا متانول مطلق تمیز شده را با زاویه ۳۵ تا ۴۰ درجه سانتی گراد روی لامی که قطره خون بر روی آن قرار دارد نزدیک کرده تا با خون تماس حاصل نماید و اجازه داده شد تا خون بر اثر شعریه در کناره لام پخش شود. این عمل مانع از له شدن و غیر طبیعی شدن سلول هایخون

می شود. سپس این لام را با یک حرکت آرام و ملایم بر روی لام گسترش به طرف جلو رانده تا خون در سطح لام گسترش یافته و لایه نازکی از خون تهیه شد. بعد لام را به سرعت در هوا خشک نموده و به مدت ۲-۱ دقیقه در متانول ۹۵٪ ثابت گردید. این نمونه خون ها را می توان قبل از رنگ آمیزی برای چندین هفته نگه داری کرد. حداکثر ظرف مدت ۴ ساعت از آماده سازی اسمیر خون، آن را با رنگ گیمسا رنگ نموده که در این راستا رنگ گیمسا را روی لام گسترش خون ریخته به نحوی که تمام سطح لام را بپوشاند و پس از گذشت ۲۰- ۱۵ دقیقه آن را در زیر جریان آب تند شستشو داده تا رسوبات از سطح لام زدوده شود. سپس لام را به طور عمودی قرار داده تا خشک گردید. پس از آن، با قرار دادن یک قطره روغن ایمرسیون بر روی لام آماده شده آن را در زیر میکروسکوپ قرار داده و با عدسی روغنی با درشت نمایی ۱۰۰ برابر مورد آنالیز قرار گرفت. لکوسیت های یافت شده توسط دستگاه شمارشگر سلولی Sysmex K1000 شمارش گردید و سپس درصد انواع لکوسیت ها محاسبه شد. در صورت دقیق بودن داده های مربوط به تعداد کلی لکوسیت ها، داده های لکوگرام می تواند به اطلاعات موجود در تعداد مطلق انواع مختلف لکوسیت ها کمک کند.

۳-۱۰- ۲- اندازه گیری هموگلوبین خون

هموگلوبین به روش سیان مت هموگلوبین بر مبنای همولیز گلبول قرمز در محلول درآبکین (ترکیبی از ۲۰۰ میلی گرم فری سیاناید پتاسیم، ۵۰ میلی گرم سیاناید پتاسیم و ۱۰۰۰ میلی گرم بی کربنات سدیم در یک لیتر آب مقطر) و آزاد شدن هموگلوبین صورت گرفت. هموگلوبین آزاد شده در ترکیب با پتاسیم فری سیاناید محلول درآبکین اکسیده شده و به اکسی هموگلوبین تبدیل می شود؛ اکسی هموگلوبین با پتاسیم سیاناید محلول درآبکین به ترکیب با ثبات سیان مت هموگلوبین تبدیل می شود که در طول موج ۵۴۰ نانومتر حداکثر جذب را دارد. شدت رنگ حاصل با غلظت هموگلوبین نمونه نسبت مستقیم دارد. تبدیل هموگلوبین به سیان مت هموگلوبین به سرعت صورت می گیرد و می توان پس از ۳ دقیقه به وسیله فتوکالریمتر آن را قرائت نمود.

کیت توتال هموگلوبین

در تحقیق حاضر، برای اندازه گیری مقدار هموگلوبین خون از کیت توتال هموگلوبین استفاده شد که شامل ۳ معرف ذیل می باشد:

1) RGT
Stock Drabkin's reagent
2) RGT
StockCyanide reagent
3) RGT
Hemoglobin Standard (HbSt.20g/dl)

روش آماده سازی معرف ها

محتویات یک ویال از معرف ۱ و ۲ را با احتیاط به بالن ژوژه ۵۰۰ میلی لیتری منتقل کرده و حجم آن با آب مقطر پر گردید. این محلول در شیشه های رنگی و در حرارت آزمایشگاه به مدت ۳ ماه پایدار می ماند. محلول

آماده درآبکین شفاف و به رنگ زرد روشن است. جذب آن در طول موج ۵۴۰ نانومتر صفر می باشد. چون معرف ۲ و محلول درآبکین حاوی ماده سمی سیانور است از تماس با پوست و دهان خود داری شود.

طرز ترسیم منحنی با استفاده از استاندارد هموگلوبین

جهت ترسیم منحنی، استاندارد هموگلوبین را از یخچال خارج نموده و در دمای محیط قرار می دهند. سپس ۵ لوله آماده نموده و شماره گذاری می کنند و بعد به ترتیب جدول ذیل عمل می نمایند.

شماره لوله	استاندارد هموگلوبین	محلول آماده درآبکین	ارزش استاندارد (گرم درصد)
۱	۰ میلی لیتر	۵ میلی لیتر	۰
۲	۲ میلی لیتر	۳ میلی لیتر	۸
۳	۳ میلی لیتر	۲ میلی لیتر	۱۲
۴	۴ میلی لیتر	۱ میلی لیتر	۱۶
۵	۵ میلی لیتر	۰ میلی لیتر	۲۰

سپس مواد موجود در هر لوله آزمایش را به خوبی مخلوط نموده و پس از گذشت ۵ دقیقه در طول موج ۵۴۰ نانومتر، جذب آن ها را در مقابل بلانک (لوله شماره ۱) قرائت می نمایند. سپس بر روی منحنی، ارزش استاندارد را روی محور افقی و میزان جذب را بر روی محور عمودی درج می نمایند.

در تحقیق حاضر، غلظت هموگلوبین نمونه خون از طریق مقایسه با منحنی استاندارد محاسبه شد. برای اندازه گیری هموگلوبین خون، ۲۰ میکرولیتر از نمونه خون توسط یک پیپت به ۵ میلی لیتر محلول درآبکین (Drabkin) موجود در یک لوله آزمایش اضافه شد و با یکدیگر مخلوط گردید. سپس جهت رسم منحنی از استانداردهای مطمئن هموگلوبین که در تجارت وجود دارد (محلول همی گلوبین سیانايد، یا محلول اسیدی دی کرومات پتاسیم) استفاده شد.مقدار هموگلوبین از منحنی مدرج تعیین گردید. منحنی مدرج به روش معمول با استفاده از سیان مت هموگلوبین و محلول تبدیلی استاندارد رسم می شود. مقدار هموگلوبین خون بر حسب گرم در لیتر بیان می شود.

٤-۱۰-۲- اندازه گیری هماتوکریت خون

برای انجام آزمایش، ابتدا لوله مویینه هپارینه هماتوکریت با طول ۷۵ میلی متر و قطر ۱ میلی متر را از جهتی که دارای خط قرمز رنگ است به داخل واکوتاینر ۳ میلی لیتری حاوی خون تازه وارد و با کمی تأمل اجازه داده شد تا دو سوم لوله مویینه از خون پر شود. سپس لوله مویینه حاوی خون را از واکوتاینر خارج نموده و ته لوله به وسیله خمیر هماتوکریت مسدود گردید. پس از آن لوله های مویینه را در میکروسانتریفوژ هماتولوژی قرار داده طوری که انتهای مسدود شده آن در لبه خارجی چرخنده قرار گیرد و بعد درب سانتریفوژ را بسته و با قدرت

چرخش ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه برای متراکم ساختن گلبول های قرمز خون سانتریفوژ شد. سپس درصد حجم اریتروسیت (هماتوکریت) و لکوسیت (لکوکریت) از طریق قرار دادن لوله های مویینه بر روی خط کش هماتوکریت محاسبه شدند(حقیقی، ۱۳۸۸).

۱۱-۲- آزمایشات بیوشیمیایی خون

۱-۱۱-۲- سنجش پروتئین های سرم

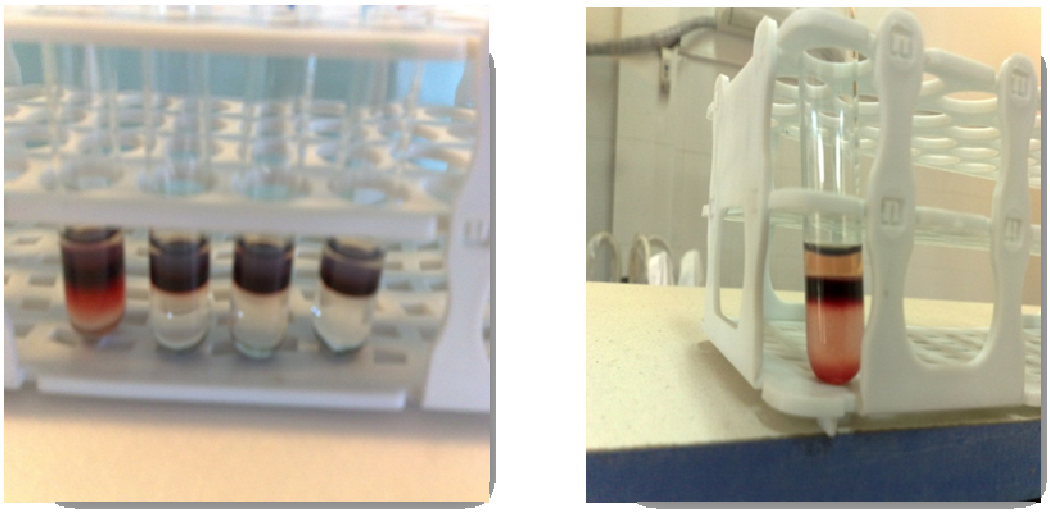
برای سنجش پروتئین های سرم از کیت های تشخیص کمی پروتئین تام و آلبومین شرکت پارس آزمون ساخت کشور ایران و به روش فتومتریک استفاده شد. برای انجام آزمایش ابتدا نمونه های سرم و محلول های کیت تشخیصی آماده شدند. برای آماده سازی محلول های کیت ابتدا محلول های معرف ۱ و ۲ را که به صورت آماده می باشند به نسبت ۴ به ۱ (به طور مثال ۲۰ میلی لیتر محلول ۱ و ۵ میلی لیتر محلول ۲) با یکدیگر مخلوط شدند. سرم خون نیز از طریق سانتریفیوژ با دور ۲۰۰۰ در دقیقه برای مدت ۵ دقیقه تهیه شدند. سپس در ۲ لوله آزمایشگاهی یک لوله نمونه استاندارد و دیگری به عنوان بلانک در نظر گرفته شدند. در لوله استاندارد ۲۰ میکرولیتر از سرم با ۱۰۰۰ میکرولیتر از مخلوط استاندارد محلول های ۱ و ۲ ریخته و در لوله بلنک ۲۰ میکرولیتر آب مقطر با ۱۰۰۰ میکرولیتر از مخلوط استاندارد محلول های ۱ و ۲ پر نموده و سپس برای مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه و سپس جذب نوری استاندارد و نمونه ها را در برابر بلانک اندازه گیری گردید.

۱۲-۲- آزمایشات ایمونولوژی خون

۱-۱۲-۲- جداسازی لکوسیت های خون

جدا سازی لکوسیت های خون بر اساس روش درجه غلظت به وسیله نیروی گریز از مرکز (سانتریفیوژ) انجام شد (Rowley, 1990; Jenyey et al., 1997). به طور خلاصه، در این روش ابتدا ۱ میلی لیتر از هیستوپک ۱/۱۱۹(Histopaque 1.119) حاوی ۱۰۰ میکرولیتر باکتوهماگلوتیناسیون بافر با pH ۷/۳ (شرکت Sigma-Aldrich) درون یک لوله آزمایش ریخته شد. سپس ۱ میلی لیتر ازهیستوپک ۱/۰۷۷حاوی باکتو هماگلوتیناسیون بافر با pH ۷/۳ (شرکت Sigma-Aldrich) به همان لوله آزمایش اضافه شد. بعد از آن ۱ میلی لیتر از نمونه خون هپارینه با دقت به صورت لایه به درون همان لوله آزمایش ریخته شد. نمونه های آماده شده در دستگاه سانتریفیوژ قرار داده شدند و برای مدت ۲۵ دقیقه با ۷۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد مورد سانتریفیوژ قرا گرفتند. پس از سانتریفیوژ، پلاسمای هر نمونه خون جمع آوری شدند و تا زمان انجام آزمایشات در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند (شکل ۱۱-۲). لکوسیت های جدا شده نیز به وسیله سمپلر به آرامی برداشت شده و به درون لوله آزمایش حاوی محلول نمکی متعادل شده هنکس فاقد فنل قرمز (phenol red free Hank's balanced

salts solution; HBSS) شرکت Sigma-Aldrich ریخته شد. بعد سلول ها را دو بار با محلول نمکی تعدیل شده هنکس فاقد فنل قرمز شستشو داده وبه تعداد ۲×۱۰^{۶} سلول در هر میلی لیتر تنظیم شد.



شکل ۲-۱۱. نمایی از جدا سازی لکوسیت های خون قبل و پس از سانتریفیوژ (به ترتیب از راست به چپ)

۲- ۱۲-۲- سنجش فعالیت انفجار تنفسی

فعالیت انفجار تنفسی لکوسیت های جدا شده از خون به روش احیاء فری سیتوکروم سی اندازه گیری شد (Secombes, 1990). به طور خلاصه، در این روش ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون لکوسیت و ۱۰۰ میکرولیتر سیتوکروم سی (Cytochrome C، ۲ میلی گرم در هر میلی لیتر از محلول نمکی تعدیل شده هنکس فاقد فنل قرمز از شرکت Sigma-Aldrich) و ۱ میکروگرم در میلی لیتر فوربول ۱۲-میریستات ۱۳-استات (phorbol 12-myristate 13-acetate; PMA) از شرکت Sigma-Aldrich به داخل لوله های آزمایش با سه تکرار ریخته شد. برای آزمایش اختصاصی، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سیتوکروم سی حاوی فوربول ۱۲- میریستات ۱۳- استات و سوپراکساید دیسموتاز (Superoxide dismutase; SOD, Sigma-Aldrich) به میزان ۳۰۰ واحد در میلیلیتر به ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون لکوسیت درون لوله آزمایش در سه تکرار اضافه شدند. پساز ترکیب نمودن، نمونه ها برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند (شکل ۱۲-۲). در اسپکتروفتومتر، خاموشی در طول موج ۵۵۰ نانومتر در مقابل سیتوکروم سی به عنوان بلانک اندازه گیری شد. اعداد قرائت شده از طریق تفریق تراکم نوری (Optical density; O.D.) سوپرناتانت تیمار با فوربول ۱۲-میریستات ۱۳- استات/ سوپر اکساید دیسموتاز از تراکم نوری سوپرناتانت تیمار با فوربول ۱۲-میریستات ۱۳- استات به تنهایی برای هر نمونه خون محاسبه شدند. ارقام بدست آمده با ضرب در عدد ۱۵/۸۷ به نانومول های O_2^- تبدیل شدند. نتایج نهایی به صورت نانومول های O_2^- تولید شده در $۱۰^{۵}$ لکوسیت خون بیان شدند.

تعاریف

سیتوکروم (Cytochrome)

پروتئین حامل و رنگدانه‌ای است که در تمام سلول های هوازی و برخی باکتریها وجود دارد. سیتوکروم ها اغلب به غشاء (مثل غشاء داخلی میتوکندری) متصل میشوند و در زنجیره انتقال الکترون و تشکیل ATP فعالند. سیتوکروم C یک هموپروتئین (ترکیب آهن و پروتئین) بسیار فشرده باوزن تقریبی ۱۲ کیلودالتون متشکل از ۱۰۴ اسید آمینه پپتیدی است.آهن موجود در سیتوکروم با دریافت یا از دست دادن الکترون به ترتیب احیاء یا اکسید می شود. بسیاری از سیتوکروم ها در دسته دهیدروژنازها هستند. سیتوکروم سی به عنوان یک میانجی مهم در مسیر آپوپتوز شناخته شده است. انتشار سیتوکروم C از میتوکندری به سیتوپلاسم موجب تحریک آپوپتوز می شود. به طور معمول از سیتوکروم سی به عنوان شاخص روند آپوپتوز در سلول استفاده می شود. در درجه اول سیتوکروم سی به عنوان پروتئین میتوکندریایی اتتقال الکترون شناخته شده است. انتقال بین حالات فروس و فریک در داخل سلول سبب شده که سیتوکروم سی به عنوان یک ناقل کارآمد بیولوژیکی انتقال الکترون شناخته شود و در اکسیداسیون سلولی در گیاهان و حیوانات نقش حیاتی دارد. از این رو به عنوان کاتالیزور منحصر به فرد در تنفس سلولی محسوب می شود که پل الکترونی ضروری را بین سوبسترای مسئول و اکسیژن تشکیل می دهد. به طور کلی، عمل اصلی آن حمل الکترون مصرفی جانشین شونده هم (heme) در تنفس سلولی می باشد. سیتوکروم C یک پروتئین مونومر است. سیتوکروم C اکسیداز در باکتری ها مشاهده می شود.

فوربول Phorbol

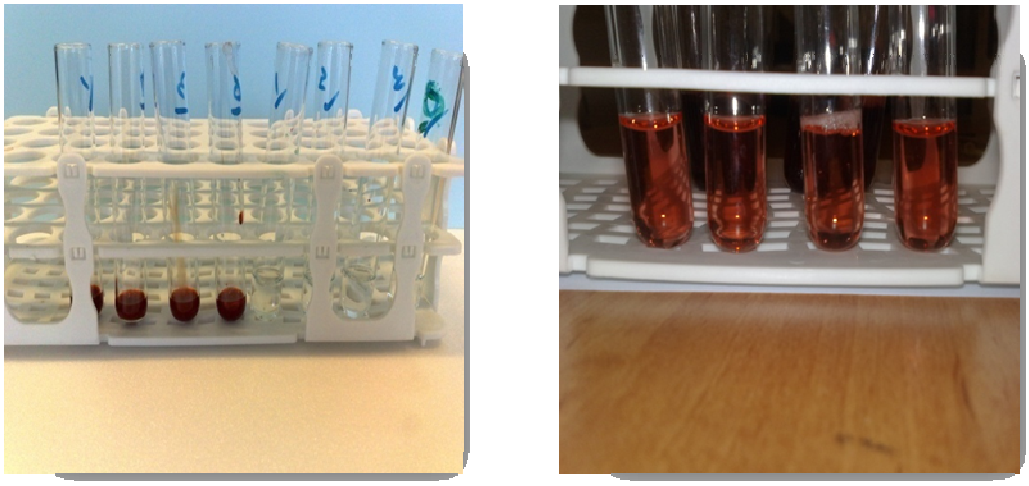
فوربول الکل چند حلقه ای است که در روغن croton یافت می شود؛ این ترکیب زوج استرفوربل است.

فوربول استر

فوربول استر گروهی از استرهای فوربول است که قویاً به کارسینوژن ها کمک می کند و پروتئین کیناز سلولی را فعال می کنند. در تحقیقات به منظور القاء موتاسیون یا ایجاد تومور توسط کارسینوژن ها از این ماده استفاده می شود. معمولاً فعالیت سلول-T از طریق تداخل گیرنده موجود در سطح سلول با مولکول لیگاند خاص خودش آغاز می شود. این پیوند از طریق فسفولیپاز سی موجب هیدرولیز سریع فسفولیپیدهای اینوزیتول به دی آسیل گلیسرول و فسفات های اینوزیتول می شود. دی آسیل گلیسرول فعال کننده آلوستریک فعالیت پروتئین کیناز و فسفات های اینوزیتول است که فراهم سازی و آزادسازی یون های کلسیم را شروع می کنند و منجر به آبشار پاسخ های سلولی اضافی فراهم شده از فعالیت سلول تی می شود. یکی از این پاسخ های سلولی تولید و ترشح اینترلوکین-۲ است. فربول ۱۲- میریستات ۱۳- استات ساختمانی شبیه به دی آسیل گلیسرول دارد که قادر است پروتئین کیناز C را فعال کند.

سوپراکساید دیسموتاز Superoxide dismutase (SOD)

هر ترکیبی که شامل رادیکال شدیداً فعال و سمی اکسیژن باشد. یک ترکیب واسطه ای عمومی در اکسیداسیون های بیولوژیکی است.



شکل۲-۱۲. نمایی از آماده سازی آزمایش فعالیت انفجار تنفسی قبل و پس از رقیق شدن (بترتیب از راست به چپ)

۳-۱۲-۲- سنجش فعالیت فاگوسیتوز

فعالیت فاگوسیتوز لکوسیت های خون به روش اسپکتروفتومتر تعیین شد. در این روش، از سلول های مخمر رنگ شده با کنگو قرمز و فاگوسیت ها استفاده شد. برای انجام این کار از روش Seeley و همکارانش (۱۹۹۰) استفاده شد. ابتدا ۱/۵ گرمسلول مخمر ساکارومیسس سرویسیایی (*Saccharomyces cervisiae*) با ۳ میلی لیتر از محلول کنگو قرمز،۰/۸۷٪ در محلول فسفات بافر (شرکت Sigma – Aldrich) رنگ شد و ترکیب حاصله اتوکلاو شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از محلول لکوسیت با ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلول های مخمر که با کنگو قرمزرنگ آمیزی و اتوکلاو شده بود (۴۰ سلول مخمر به ازای هر لکوسیت) مخلوط شدند وترکیب حاصله برای مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. پس از انکوباسیون،۱ میلی لیتر از محلول سرد هنکس تعدیل شده با نمک سدیم به مخلوط اضافه شد و ۱ میلی لیتر از محلول هیستوپک ۱/۰۷۷ نیز در قسمت پایینی هر لوله نمونه تزریق شد. برای جدا سازی لکوسیت ها از سلول های مخمر آزاد، نمونه های تهیه شده به مدت ۵ دقیقه با ۸۵۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. لکوسیت های برداشت شده ۲ بار با محلول هنکس شستشو داده شد. پس از آن مجدداًسلول ها در ۱ میلی لیتر از محلول تریپسین،Trypsine EDTA (۵ گرم در لیتر تریپسین و ۲ گرم در لیتر EDTA) تهیه شده از شرکت Sigma-Aldrich به حالت تعلیق در آمد و برای یک نیمه شب در انکوباتور با دمای

۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد (شکل ۱۳-۲). سپس جذب نمونه ها در طول موج ۵۱۰ نانومتر در برابر Trypsine EDTA به عنوان بلانک مورد اندازه گیری قرار گرفتند.

تعاریف

تریپسین Trypsine

تریپسین پروتئاز عمده ای است که در سلول های زنده یافت می شود که موجب هیدرولیز پروتئین می شود. تریپسین به صورت تریپسینوزن از لوزالمعده ترشح شده و در روده کوچک به فرم فعال تبدیل می شود. این آنزیم کاتالیزور تقسیم پیوندهای پپتیدی حاوی گروه کربوکسیل لیزین یا آرژینین است.خون ماهی دارای تعدادی از آنتی پروتئاز ها یا مهار کننده های پروتئاز، مانند آلفا-۱ آنتی پروتئاز، آلفا-۲ آنتی پلاسمین و آلفا-ماکروگلوبولین است (Ellis, 2001). مهار این پروتئاز می تواند هیدرولیز پروتئین (داخل سلولی) را در آزمایش برون تنی *in vivo* تنظیم کند و از این رو مکانیسم دفاع ایمنی بر ضد پاتوژن ها را ترقی بخشد. بعلاوه حضور این بازدارنده در سرم ماهی درمان شده می تواند مجموعه سیستم بیوشیمیایی خون را که موجب تقویت مکانیسم های دفاع ایمنی می شوند را بر ضد ارگانیسم های پاتوژن فعال کند (Tremacoldi and Pascholati, 2002). تریپسین آ نزیمی است که از پانکراس خوک بدست می آید که معمولاً به منظور تفکیک و عدم تجمع سلول ها و بافت ها استفاده می شود.غلظت تریپسین مورد نیاز بستگی به از جا راندن سلول ها از سوبسترایشان دارد که عمدتاً به نوع سلول و سن کشتبستگی دارد.

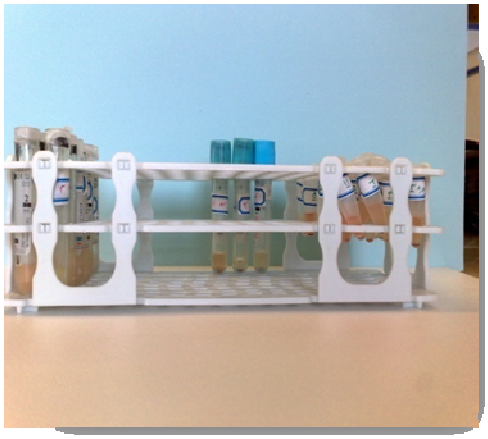
اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (EDTA)

یک ماده شلاته یا جداکننده است واغلب به محلول های تریپسین جهت افزایش فعالیت آنزیمی از طریق خنثی نمودن یون های کلسیم و منیزیوم که موجب افزایش چسبندگی سلولی به سلول دیگر می شود و تفکیک باندهای پپتیدی که بر روی تریپسین عمل می کنند، اضافه می شود.

شکل ۲- ۱۳. نمایی از رنگ آمیزی سلول مخمر ساکارومیسس سرویسیایی (*Saccharomyces cervisiae*) با کنگو قرمز قبل و پس از اتوکلاو (به ترتیب از راست به چپ)

٤-۱۲-۲- سنجش فعالیت لیزوزیم سرم

لیزوزیم آنزیمی است که با چسبیدن به دیواره سلول باکتری و شکستن قند پپتیدوگلیکان موجود در دیواره سلول موجب تخریب دیواره باکتری می شود. باکتری های گرم مثبت که دارای دیواره سلولی هستند نسبت به این هیدرولیز کاملاً حساس هستند. باکتری های گرم منفی به دلیل داشتن غشاء خارجی و پپتیدوگلیکان کمتر در دیواره سلولی خود نسبت به باکتری های گرم مثبت حساسیت کمتری به هیدرولیز توسط آنزیم لیزوزیم دارند. ولیکن باکتری های گرم منفی در حضور EDTA به راحتی توسط آنزیم لیزوزیم هیدرولیز می شوند. زیرا EDTA با یون های فلزی موجود در غشاء خارجی اتصال یافته و موجب تخریب باکتری می شوند. فعالیت آنزیم لیزوزیم سرم(از سرم تازه حداکثر ۱ ساعت پس از جمع آوری خون و یا از سرم نگه داری شده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد) از طریق اسپکتروفتومتر به روش Parry و همکارانش (۱۹۶۵) اندازه گیری شد. برای انجام این کار ابتدا سوبسترای لیزوزیم(سوسپانسیون ۰/۰۲٪ (وزن/حجم) پودر میکروکوکوس لیزودیکتیکوس در فسفات سدیم بافر (۰/۰۵ مول، pH۶/۲) ساخته شد. پس از آن، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سرم آماده شده تا حجم ۳ میلی لیتر به این سوسپانسیون اضافه شد (شکل ۱۴-۲). سپس در دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر پس از سپری شدن ۰/۵ و ۴/۵ دقیقه از انکوباسیون در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد، قرائت گردید. برای محاسبه فعالیت لیزوزیم، هر ۰/۰۰۱ واحد کاهش نوری برابر با ۱ واحد فعالیت آنزیم لیزوزیم در نظر گرفته شد.



شکل۲-۱٤. نمایی از مواد شیمیایی و سرم جهت اندازه گیری فعالیت لیزوزیم سرم

۱۳-۲- آنالیز آماری

ارقام هر یک از پارامترهای اندازه گیری شده در پایان هفته های یکسان به صورت میانگین±انحراف معیار بیان شدند. اثرات مکمل ها بر روی پارامترهای اندازه گیری شده در هفته های یکسان با استفاده از واریانس یک طرفه مورد آنالیز و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و در صورت معنی دار بودن ارقام میانگین از آزمایش چند مقایسه ای دانکن برای تعیین تفاوت آماری بین هر دو میانگین استفاده شد. تفاوت آماری بین گروه ها در سطح $p<0.05$ در نظر گرفته شد. تمام داده ها با استفاده از بسته آماری SPSS ورژن ۱۳ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای رسم نمودارها از برنامه Excel بهره گرفته شد.

۳- نتایج

۱-۳- پارامترهای خون شناسی

در بررسی پارامترهای خون شناسی شامل گلبول های سفید و قرمز خون، هموگلوبین، هماتوکریت، سلول های افتراقی خون (مونوسیت، لنفوسیت و نوتروفیل) و اندیس های گلبولی (هموگلوبین متوسط گلبول قرمز، حجم متوسط گلبول قرمز و غلظت متوسط هموگلوبین در حجم معینی از گلبول قرمز) در پایان هفته های یکسان (۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ هفته پس از تغذیه) در هر دو مرحله از آزمایشات چه در بچه ماهیان با میانگین وزن اولیه ۱۳ گرم و چه در بچه ماهیان با میانگین وزن اولیه ۲ گرم، تغییرات آماری معنی داری بین گروه های آزمایشی(مرزنگوش، صبرزرد و لوامیزول) با گروه دارونما وجود نداشتند ($p>0.05$؛ جداول ۱ و ۲).

جدول۱- پارامترهای خون شناسی شامل: شمارش سلول های سفید خون (WBC)، شمارش سلول های قرمز خون (RBC)، هماتوکریت (Hct)، هموگلوبین (Hb)، هموگلوبین متوسط گلبولی (MCH)، حجم متوسط گلبولی (MCV)، غلظت متوسط هموگلوبین گلبولی (MCHC)، نوتروفیل (.Neut)، مونوسیت (.Mon) و لنفوسیت (.Lymp) ماهی قزل آلا رنگین کمان با میانگین وزن اولیه ۱۳ گرم تغذیه شده با دارونما (P)، یا پودر عصاره مرزنگوش (O) یا پودر عصاره آلوئه ورا (A) هر یک به میزان ۱٪ وزن غذا و یا لوامیزول (L) به میزان ۰/۱٪ وزن غذا به مدت ۱۰ هفته. داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان می شود (تعداد: ۱۵ ماهی از هر گروه).

Week	2				4				6				8				10			
Groups																				
Para-meter	P	O	A	L	P	O	A	L	P	O	A	L	P	O	A	L	P	O	A	L
WBC (10^3/ml)	3.90 ±0.7	3.92 ±0.2	4.11 ±0.1	3.99 ±0.4	4.00 ±0.1	4.06 ±0.6	4.00 ±0.2	4.05 ±0.3	4.20 ±0.5	4.10 ±0.2	4.56 ±0.4	4.80 ±0.3	4.95 ±0.1	5.31 ±0.5	5.03 ±0.3	4.76 ±0.6	4.85 ±0.3	4.33 ±0.3	4.18 ±0.3	4.48 ±0.2
RBC (10^6/ml)	0.98 ±0.06	1.08 ±0.08	1.02 ±0.07	0.94 ±0.08	1.69 ±0.05	1.71 ±0.04	1.77 ±0.05	1.75 ±0.03	1.69 ±0.03	1.76 ±0.06	1.79 ±0.03	1.74 ±0.05	1.53 ±0.03	1.46 ±0.06	1.55 ±0.05	1.50 ±0.06	1.45 ±0.06	1.47 ±0.03	1.51 ±0.03	1.53 ±0.05
Hct (%)	27.33 ±3.3	27.77 ±2.2	28.33 ±1.9	27.66 ±1.5	40.50 ±4.1	40.50 ±5.5	40.50 ±3.2	40.00 ±2.9	36.00 ±2.9	37.00 ±2.6	38.66 ±3.6	37.33 ±3.2	33.00 ±3.5	36.66 ±3.0	38.33 ±2.8	36.83 ±3.3	39.33 ±2.3	39.00 ±2.6	39.66 ±3.0	38.33 ±4.1
Hb (g/dL)	9.07 ±0.6	9.32 ±0.9	9.77 ±0.7	9.13 ±1.1	13.5 0±0.9	13.56 ±1.5	13.10 ±1.1	13.10 ±0.9	12.00 ±1.5	12.06 ±0.8	12.66 ±0.6	12.33 ±1.2	10.98 ±1.8	12.33 ±1.3	12.68 ±1.8	12.43 ±2.1	13.10 ±2.6	13.13 ±3.1	13.16 ±1.6	12.60 ±1.9
MCH (pg)	92.55 ±2.7	86.29 ±4.6	95.78 ±2.1	97.12 ±3.2	79.88 ±3.10	79.29 ±2.9	74.01 ±3.5	74.85 ±2.9	71.00 ±3	68.52 ±1.9	70.72 ±2.6	70.86 ±3.1	71.76 ±3.9	84.45 ±4.1	81.80 ±3.6	82.86 ±3	90.34 ±2.1	89.31 ±6.2	87.15 ±5.3	82.35 ±6.2
MCV (fL)	278.8 ±16	257.1 ±11	277.7 ±13	294.2 ±20	239.6 ±13	236.8 ±9	228.8 ±10	228.5 ±13	213.0 ±6	210.2 ±6	215.9 ±9	214.5 ±5	215.6 ±8	251.0 ±14	247.2 ±11	245.5 ±7	271.2 ±13	265.3 ±15	262.6 ±12	250.5 ±11
MCHC (%)	3.31 ±0.4	3.35 ±0.5	3.44 ±0.2	3.30 ±0.3	3.33 ±0.3	3.34 ±0.4	3.23 ±0.5	3.27 ±0.4	3.33 ±0.3	3.25 ±0.2	3.27 ±0.3	3.30 ±0.3	3.32 ±0.2	3.36 ±0.3	3.30 ±0.2	3.37 ±0.4	3.07 ±0.2	3.36 ±0.3	3.31 ±0.2	3.28 ±0.4
Neut (%)	7.66 ±0.1	7.66 ±0.3	7.33 ±0.4	7.33 ±0.2	8.33 ±0.1	7.66 ±0.5	7.66 ±0.4	8.66 ±0.3	7.66 ±0.3	8.33 ±0.2	8.66 ±0.5	8.33 ±0.1	8.00 ±0.1	7.66 ±0.5	7.66 ±0.3	8.33 ±0.1	7.00 ±0.5	8.33 ±0.1	7.33 ±0.5	7.66 ±0.4
Mon (%)	3.0 ±0.3	2.66 ±0.1	2.66 ±0.3	2.33 ±0.2	2.33 ±0.2	2.0 ±0.5	2.33 ±0.4	2.33 ±0.1	3.33 ±0.3	3.0 ±0.2	3.66 ±0.1	3.33 ±0.2	2.33 ±0.2	2.0 ±0.6	2.0 ±0.4	1.66 ±0.6	3.0 ±0.3	2.0 ±0.4	2.66 ±0.1	2.66 ±0.4
Lymp (%)	89.0 ±1.2	90.0 ±1	90.3 ±0.9	91.0 ±0.8	89.0 ±2	90.3 ±0.7	90.0 ±1	89.3 ±1.1	89.0 ±2.1	88.6 ±0.9	88.0 ±1.3	88.3 ±1.2	89.6 ±1.2	90.0 0.6±	90.3 ±0.5	90.0 ±1.4	90.0 ±0.7	89.6 ±1.2	90.0 ±0.8	89.3 ±1.3

اختلاف معنی دار در هیچیک از پارامترهای اندازه گیری شده در هفته های یکسان (10، 8، 6، 4، 2 هفته پس از تغذیه) بین گروه های آزمایشی با گروه دارونما مشاهده نشد ($p>0.05$)

جدول۲- پارامترهای هماتولوژی شامل: شمارش سلول های سفید خون (WBC)، شمارش سلول های قرمز خون (RBC)، هماتوکریت (Hct)، هموگلوبین (Hb)، هموگلوبین متوسط گلبولی (MCH)، حجم متوسط گلبولی (MCV)، غلظت متوسط هموگلوبین گلبولی (MCHC)، نوتروفیل (.Neut)، مونوسیت (.Mon) و لنفوسیت (.Lymp) ماهی قزل آلا رنگین کمان با میانگین وزن اولیه بالای ۲ گرم تغذیه شده با دارونما (P)، یا پودر عصاره مرزنگوش (O) یا پودر عصاره آلوئه ورا (A) هر یک به میزان۱٪ وزن غذا و یا لوامیزول (L) به میزان ۰/۱٪ وزن غذا به مدت ۱۰ هفته. داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان می شود (تعداد: ۱۵ ماهی از هر گروه).

Week	2				4				6				8				10			
Groups																				
Para-meter	P	O	A	L	P	O	A	L	P	O	A	L	P	O	A	L	P	O	A	L
WBC (10^3/ml)	2.20 ±0.7	3.28 ±0.1	2.65 ±0.3	2.80 ±0.5	2.43 ±0.3	3.85 ±0.2	3.01 ±0.7	2.93 ±0.5	2.95 ±0.2	3.86 ±0.5	3.56 ±0.1	3.93 ±0.2	3.40 ±0.3	3.86 ±0.4	3.60 ±0.2	3.80 ±0.5	2.66 ±0.2	2.70 ±0.4	2.76 ±0.2	2.86 ±0.1
RBC (10^6/ml)	0.87 ±0.06	0.98 ±0.08	0.94 ±0.06	0.86 ±0.09	0.91 ±0.06	1.06 ±0.03	1.05 ±0.06	1.04 ±0.03	1.23 ±0.0 6	1.32 ±0.03	1.20 ±0.04	1.32 ±0.06	1.35 ±0.03	1.40 ±0.06	1.46 ±0.05	1.42 ±0.06	1.30 ±0.06	1.37 ±0.03	1.40 ±0.03	1.45 ±0.05
Hct (%)	26.00 ±3.3	27.33 ±1.2	27.33 ±1.5	27.66 ±1.9	28.00 ±5.2	31.66 ±5.0	30.00 ±5.2	33.00 ±4.6	25.00 ±3.7	28.33 ±2.1	26.00 ±3.3	30.33 ±2.3	29.00 ±3.3	29.00 ±4.0	30.50 ±2.5	30.33 ±1.3	27.66 ±4.3	29.33 ±3.5	30.10 ±3.2	31.33 ±3.5
Hb (g/dL)	8.90 ±0.6	9.26 ±0.9	9.20 ±0.7	9.60 ±1.1	9.46 ±1.6	10.16 ±1.7	10.76 ±1.3	11.03 ±0.8	8.46 ±1.5	9.26 ±1.1	8.63 ±1.6	9.36 ±0.9	9.63 ±1.9	9.75 ±1.5	9.93 ±1.6	9.98 ±2.3	9.33 ±3.6	9.46 ±3.2	9.63 ±2.3	10.13 ±1.1
MCH (pg)	102.3 ±2.1	94.48 ±4.1	97.87 ±1.1	111.6 ±1.7	103.9 ±5.6	95.84 ±4.9	102.4 ±7.3	106.1 ±5.7	68.78 ±4	70.15 ±1.5	71.91 ±1.6	70.90 ±1.9	71.33 ±4.2	69.65 ±4.6	68.01 ±3.6	70.28 ±3	71.76 ±1.1	69.05 ±3.6	68.78 ±4.3	69.86 ±1.2
MCV (fL)	298.8 ±12	278.8 ±17	290.7 ±12	321.6 ±20	307.6 ±9	298.6 ±7	285.7 ±14	317.3 ±6	203.2 ±5	214.6 ±2	216.6 ±6	229.7 ±7	214.8 ±9	207.2 ±12	208.9 ±14	213.6 ±10	212.7 ±15	214.3 ±8	215.0 ±10	216.0 ±6
MCHC (%)	3.42 ±0.3	3.38 ±0.8	3.36 ±0.6	3.47 ±0.7	3.37 ±0.8	3.34 ±0.4	3.20 ±0.9	3.34 ±0.2	3.38 ±0.4	3.26 ±0.8	3.27 ±0.3	3.31 ±0.9	3.32 ±0.6	3.36 ±0.2	3.25 ±0.5	3.29 ±0.4	3.37 ±0.3	3.22 ±0.5	3.19 ±0.9	3.23 ±0.3
Neut (%)	12.33 ±0.6	12.00 ±0.4	13.00 ±0.3	13.33 ±0.3	13.00 ±0.3	12.00 ±0.6	12.00 ±0.5	13.00 ±0.6	11.00 ±0.6	12.00 ±0.5	11.33 ±0.3	13.00 ±0.1	11.66 ±0.6	11.66 ±0.5	12.66 ±0.2	12.66 ±0.2	11.66 ±0.4	12.66 ±0.3	13.33 ±0.2	12.66 ±0.5
Mon (%)	1.66 ±0.7	3.00 ±0.2	2.00 ±0.2	2.66 ±0.3	1.66 ±0.3	3.0 ±0.1	2.33 ±0.3	2.66 ±0.2	2.33 ±0.5	3.33 ±0.3	3.00 ±0.2	3.33 ±0.3	2.00 ±0.1	3.00 ±0.4	2.33 ±0.3	2.33 ±0.5	2.33 ±0.5	3.66 ±0.4	2.66 ±0.1	2.66 ±0.4
Lymp (%)	86.0 ±1.1	85.0 ±0.9	85.0 ±0.1	84.0 ±0.8	85.3 ±0.3	85.0 ±0.5	86.0 ±0.9	84.3 ±1.1	86.6 ±1.9	84.6 ±0.8	85.7 ±1.6	83.6 ±1.9	86.4 ±1.2	85.4 ±0.5	85.0 ±0.5	85.0 ±1.4	86.0 ±0.7	83.7 ±2.2	84.0 ±1.8	84.7 ±1.6

اختلاف معنی دار در هیچیک از پارامترهای اندازه گیری شده در هفته های یکسان (10، 8، 6، 4، 2 هفته پس از تغذیه) بین گروه های آزمایشی با گروه دارونما مشاهده نشد ($p>0.05$)

۲-۳-پارامترهای بیوشیمیایی خون

۱-۲-۳- پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین

در تجزیه و تحلیل آماری مشخص گردید که افزایش مقادیر پروتئین تام سرم، آلبومین و گلوبولین(در هر دو مرحله از آزمایشات چه در بچه ماهیان با میانگین وزن اولیه ۱۳ گرم و چه در بچه ماهیان با میانگین وزن اولیه بالای ۲ گرم)در گروه های آزمایشی(مرزنگوش، صبرزرد و لوامیزول) بیشتر از گروه دارونما در هفته های

یکسان (۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ هفته پس از تغذیه) بودند($p<0.05$؛ جداول ۳ و ۴). بیشترین تغییرات درپروتئین های سرم (چه در بچه ماهیان ۱۳ گرم و چه در بچه ماهیان ۲ گرم) در دو گروه لوامیزول و صبرزرد مشاهده شد که اختلاف آماری معنی دار با یکدیگر نداشتند (جداول ۳ و ۴).نسبت آلبومین/ گلوبولین سرم بین گروه های آزمایشی با گروه دارونما در هفته های یکسان (چه در بچه ماهیان ۱۳ گرمی و چه در بچه ماهیان ۲ گرمی) اختلاف آماری معنی داری وجود نداشتند ($p>0.05$، جداول ۳ و ۴).

جدول۳- تغییرات در پروتئین تام (TP)، آلبومین (AL)، گلوبولین (GL) و نسبت آلبومین:گلوبولین (AL:GL) سرم بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان (با میانگین وزن اولیه ۱۳ گرم) تغذیه شده با دارونما (P)، یا پودر عصاره مرزنگوش (O) یا پودر عصاره آلوئه ورا (A)، هر یک به میزان ۱٪ وزن غذا و یا لوامیزول (L) به میزان ۰/۱٪ وزن غذا برای مدت ۱۰ هفته نشان داده می شود. داده ها به صورت میانگین±انحراف معیار بیان می شود (تعداد: ۱۵ ماهی در هر گروه).

Week	2				4				6				8				10			
Groups																				
Para-meter	P	O	A	L	P	O	A	L	P	O	A	L	P	O	A	L	P	O	A	L
TP (g/dL)	4.10 ±0.01	4.23 ±0.01	4.47 ±0.03*	4.60 ±0.02*	4.03 ±0.01	4.26 ±0.02*	4.45 ±0.03*	4.60 ±0.01*	3.40 ±0.02	3.80 ±0.04*	3.93 ±0.03*	4.10 ±0.05*	3.93 ±0.01	4.19 ±0.02	4.33 ±0.01*	4.46 ±0.01*	3.26 ±0.03	3.73 ±0.03*	3.80 ±0.02*	4.10 ±0.03*
AL (g/dL)	1.80 ±0.08	1.90 ±0.07	2.00 ±0.08*	2.10 ±0.06*	1.80 ±0.04	1.90 ±0.05*	1.99 ±0.03*	2.10 ±0.05*	1.53 ±0.06	1.73 ±0.03*	1.75 ±0.05*	1.87 ±0.03*	1.75 ±0.06	1.89 ±0.05*	1.97 ±0.06*	2.09 ±0.03*	1.50 ±0.03	1.73 ±0.03*	1.77 ±0.05*	1.90 ±0.06*
GL (g/dL)	2.20 ±0.08	2.33 ±0.03	2.47 ±0.05*	2.50 ±0.06*	2.23 ±0.08	2.36 ±0.04	2.46 ±0.07*	2.50 ±0.02*	1.87 ±0.01	2.07 ±0.06*	2.18 ±0.09*	2.23 ±0.03*	2.18 ±0.03	2.30 ±0.05*	2.36 ±0.02*	2.37 ±0.04*	1.76 ±0.07	2.00 ±0.08*	2.03 ±0.05*	2.20 ±0.06*
AL:GL Ratio (g/dL)	0.81 ±0.01	0.81 ±0.02	0.81 ±0.01	0.84 ±0.01	0.80 ±0.02	0.80 ±0.02	0.80 ±0.01	0.84 ±0.04	0.81 ±0.01	0.83 ±0.01	0.80 ±0.02	0.83 ±0.03	0.80 ±0.01	0.82 ±0.01	0.83 ±0.02	0.88 ±0.03*	0.85 ±0.03	0.86 ±0.01	0.87 ±0.02	0.86 ±0.01

اختلافات معنی دار بین هر یک از گروه های آزمایشی با گروه دارونما در هفته های یکسان (۱۰، ۸، ۶، ۴، ۲ هفته پس از تغذیه) مشاهده می شود. علامت ستاره در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین هر یک از گروه های آزمایشی با گروه دارونما در هفته های یکسان می باشد ($p<0.05$*)

جدول٤- تغییرات در پروتئین تام (TP)، آلبومین (AL)، گلوبولین (GL) و نسبت آلبومین:گلوبولین (AL:GL) سرم بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان (با میانگین وزن اولیه ۲ گرم) تغذیه شده با دارونما (P)، یا پودر عصاره مرزنگوش (O) یا پودر عصاره آلوئه ورا (A)، هر یک به میزان ۱٪ وزن غذا و یا لوامیزول (L) به میزان ۰/۱٪ وزن غذا برای مدت ۱۰ هفته نشان داده می شود. داده ها به صورت میانگین±انحراف معیار بیان می شود (تعداد: ۱۵ ماهی در هر گروه).

Week	2				4				6				8				10			
Groups																				
Para-meter	P	O	A	L	P	O	A	L	P	O	A	L	P	O	A	L	P	O	A	L
TP (g/dL)	3.26 ±0.03	3.53 ±0.08*	3.58 ±0.03*	3.78 ±0.02*	3.59 ±0.05	3.84 ±0.04*	3.73 ±0.05*	3.82 ±0.02*	3.87 ±0.09	4.82 ±0.5*	4.28 ±0.07*	4.79 ±0.06*	3.88 ±0.05	4.34 ±0.03*	4.82 ±0.02*	4.92 ±0.05*	3.92 ±0.04	4.20 ±0.02*	4.28 ±0.03*	4.40 ±0.02*
AL (g/dL)	1.31 ±0.01	1.39 ±0.02*	1.44 ±0.03*	1.55 ±0.02*	1.49 ±0.04	1.57 ±0.03*	1.59 ±0.02*	1.62 ±0.04*	1.53 ±0.02	1.86 ±0.05*	1.63 ±0.04*	1.91 ±0.04*	1.60 ±0.05	1.73 ±0.03*	1.86 ±0.06*	1.96 ±0.04*	1.60 ±0.05	1.73 ±0.03*	1.86 ±0.06*	1.96 ±0.04*
GL (g/dL)	1.95 ±0.02	2.14 ±0.03*	2.14 ±0.01*	2.23 ±0.03*	2.10 ±0.02	2.27 ±0.04*	2.14 ±0.03*	2.20 ±0.01*	2.34 ±0.03	2.96 ±0.03*	2.65 ±0.04*	2.88 ±0.02*	2.28 ±0.04	2.61 ±0.02*	2.96 ±0.02*	2.96 ±0.02*	2.32 ±0.02	2.47 ±0.04*	2.42 ±0.05*	2.44 ±0.03*
AL:GL Ratio (g/dL)	0.67 ±0.01	0.64 ±0.01	0.67 ±0.02	0.69 ±0.03	0.70 ±0.04	0.69 ±0.02	0.74 ±0.02	0.73 ±0.03	0.65 ±0.03	0.62 ±0.04	0.61 ±0.02	0.66 ±0.01	0.70 ±0.03	0.66 ±0.02	0.62 ±0.03	0.66 ±0.01	0.68 ±0.02	0.70 ±0.02	0.76 ±0.03*	0.80 ±0.01*

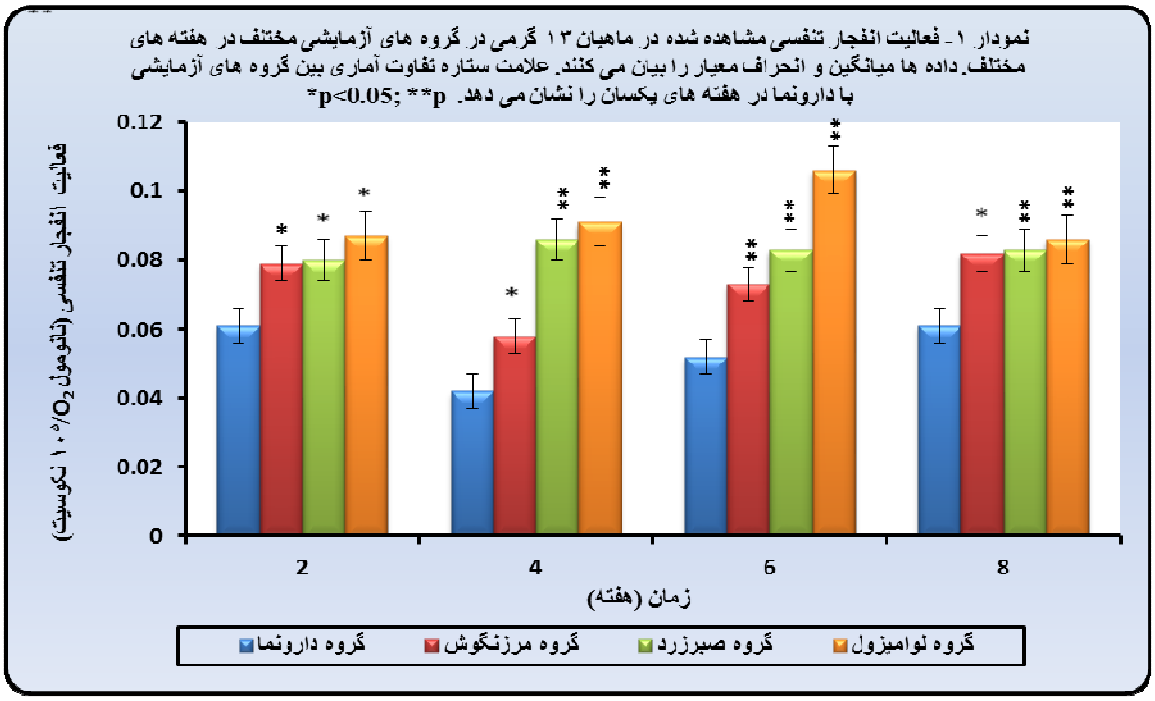
اختلافات معنی دار بین هر یک از گروه های آزمایشی با گروه دارونما در هفته های یکسان (۱۰، ۸، ۶، ۴، ۲ هفته پس از تغذیه) مشاهده می شود. علامت ستاره در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین هر یک از گروه های آزمایشی با گروه دارونما در هفته های یکسان می باشد ($p<0.05$*)

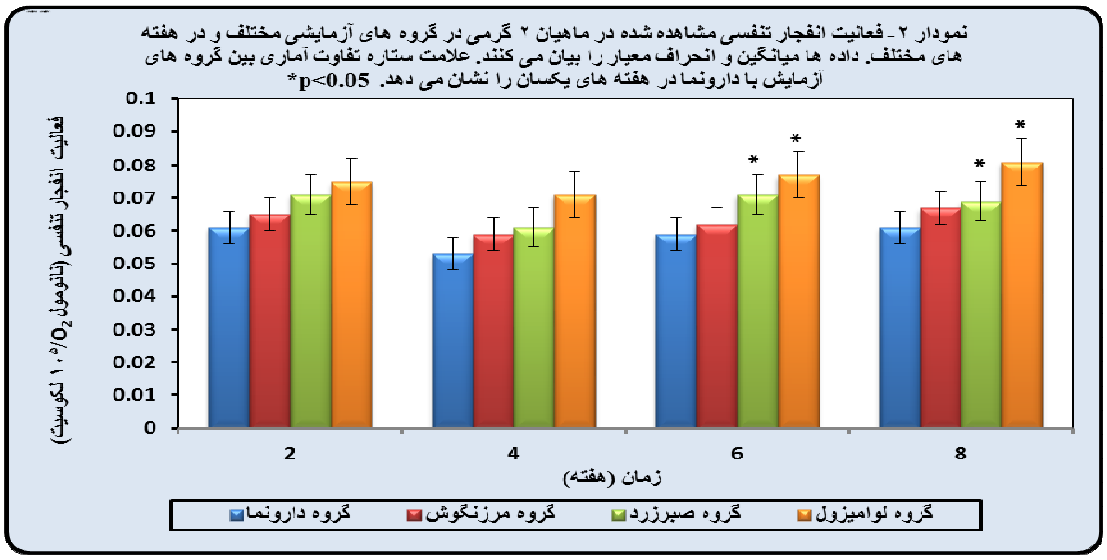
۳- ۳- پارامترهای ایمونولوژی خون

۱-۳-۳- فعالیت انفجار تنفسی

نتایج تحقیق در مرحله اول با بچه ماهیان با میانگین وزن اولیه ۱۳ گرم نشان داد که فعالیت انفجار تنفسی لکوسیت ها در گروه های آزمایشی(مرزنگوش، صبرزرد و لوامیزول) در مقایسه با گروه دارو نما در تمام دوره

های یکسان (۲، ۴، ۶ و ۸ هفته پس از تغذیه) افزایش معنی دار داشتند ($p<0.05$؛ نمودار ۱). حداکثر فعالیت انفجار تنفسی لکوسیت ها در این وزن از بچه ماهیان در تمامی دوره های یکسان (۲، ۴، ۶ و ۸ هفته پس از تغذیه) به ترتیب در گروه های آزمایشی لوامیزول، صبرزرد و مرزنگوش ایجاد شد ($p<0.05$؛ نمودار ۱). نتایج تحقیق در بچه ماهیان با میانگین وزن اولیه ۲ گرم نشان داد که فعالیت انفجار تنفسی لکوسیت هادر گروه های آزمایشی لوامیزول و صبر زرد در مقایسه با گروه دارونما افزایش آماری داشتند. حداکثر فعالیت انفجار تنفسی در این وزن از بچه ماهیان به ترتیب در گروه های آزمایشی لوامیزول و صبرزرد در مقایسه با گروه دارونما در دوره های یکسان ۶ و ۸ هفته پس از تغذیه بود ($p<0.05$؛ نمودار ۲). اگر چه در این وزن از بچه ماهیان، فعالیت انفجار تنفسی لکوسیت های گروه مرزنگوش در تمامی دوره های یکسان (۲، ۴، ۶، ۸ هفته پس از تغذیه) بیشتر از گروه دارونما نشان داد ولی از نظر آماری اختلاف معنی دار وجود نداشت ($p>0.05$؛ نمودار ۲).

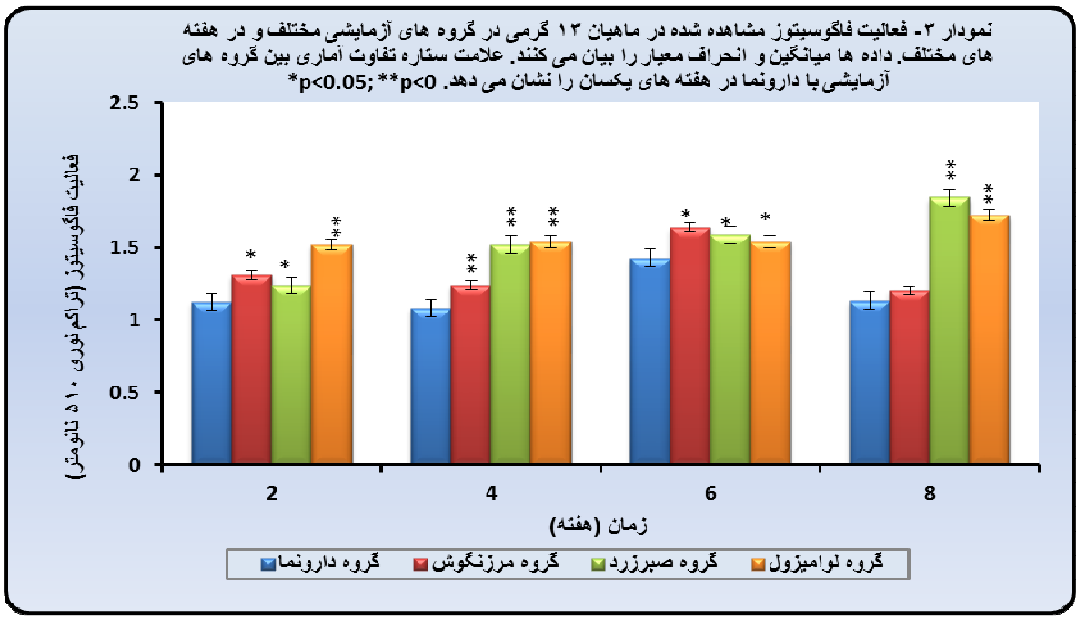


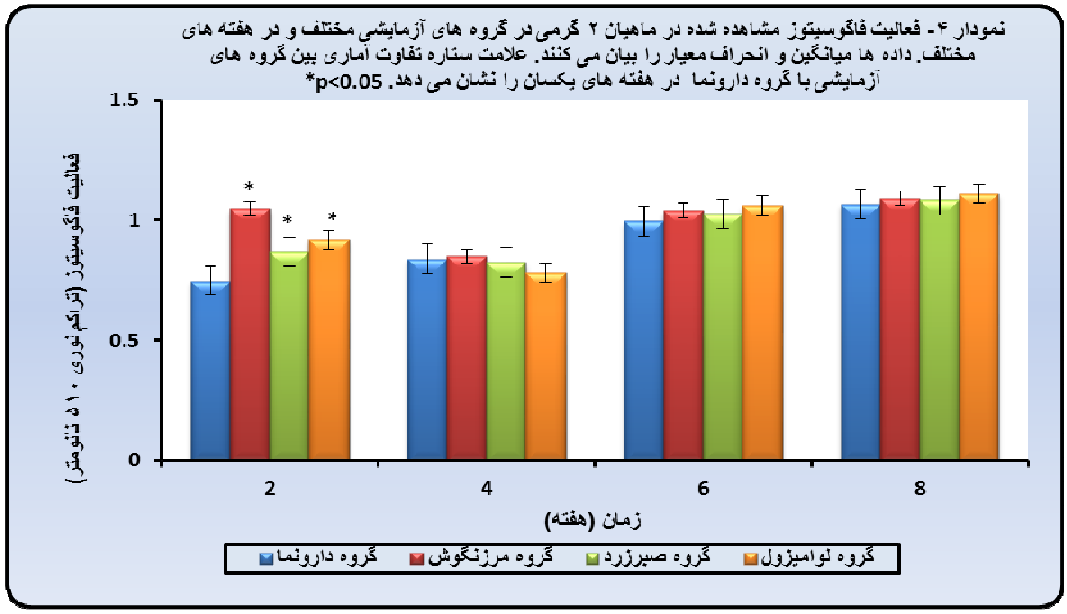


۲-۳-۳- فعالیت فاگوسیتوز

نتایج این تحقیق در ماهیان با میانگین وزن اولیه ۱۳ گرم نشان داد که از نظر آماری، میزان فعالیت فاگوسیتوز بین گروه های آزمایشی (مرزنگوش، صبرزرد و لوامیزول) باگروه دارونما در هفته های یکسان افزایش داشتند ($p<0.05$؛ نمودار ۳). حداکثر فعالیت فاگوسیتوز را دو گروه آزمایشی صبرزرد و لوامیزول در هفته هشتم پس از تغذیه نشان دادند ($p<0.05$؛ نمودار ۳) که از نظر آماری بین این دو گروه اختلاف معنی داری وجود نداشت ($p>0.05$).

همچنین نتایج این تحقیق بر روی بچه ماهیان با میانگین وزن اولیه ۲ گرم نشان داد که فعالیت فاگوسیتوز بین گروه های آزمایشی با گروه دارونما، فقط در پایان هفته ۲ پس از تغذیه افزایش معنی دار داشت ($p<0.05$؛ نمودار ۴). حداکثر فعالیت فاگوسیتوز در پایان هفته دوم و در گروه آزمایشی مرزنگوش مشاهده شد. ولی فعالیت فاگوسیتوز در هفته ۸ پس از تغذیه به حداکثر مقدار خود رسید (نمودار ۴) که از نظر آماری اختلافی بین گروه های آزمایشی با گروه دارو وجود نداشت ($p>0.05$؛ نمودار ۴).

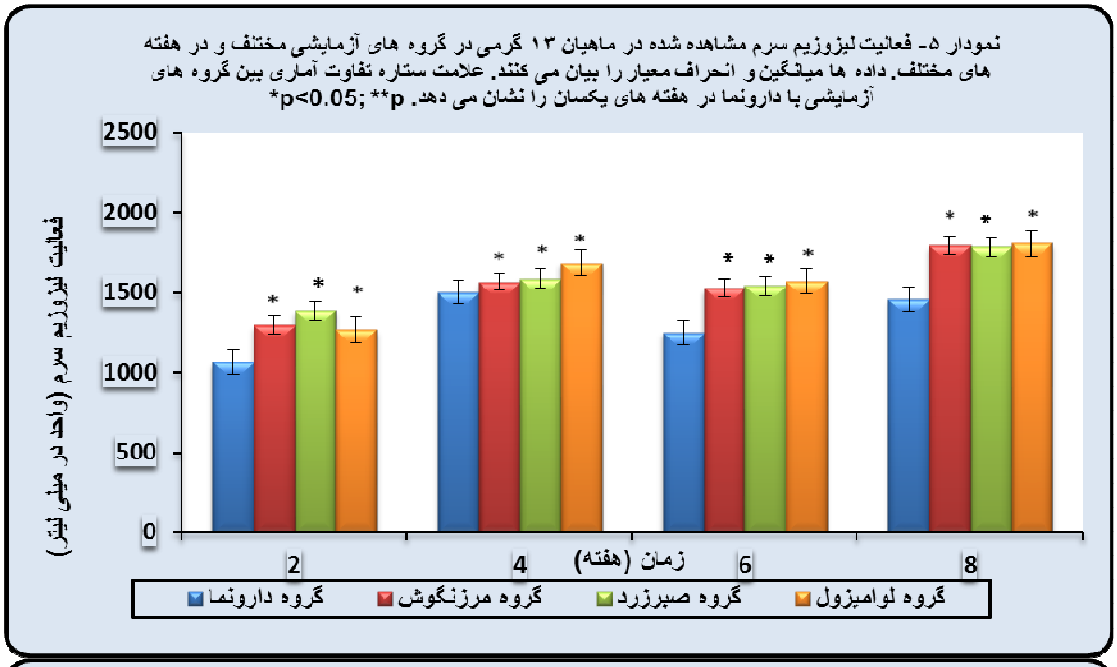


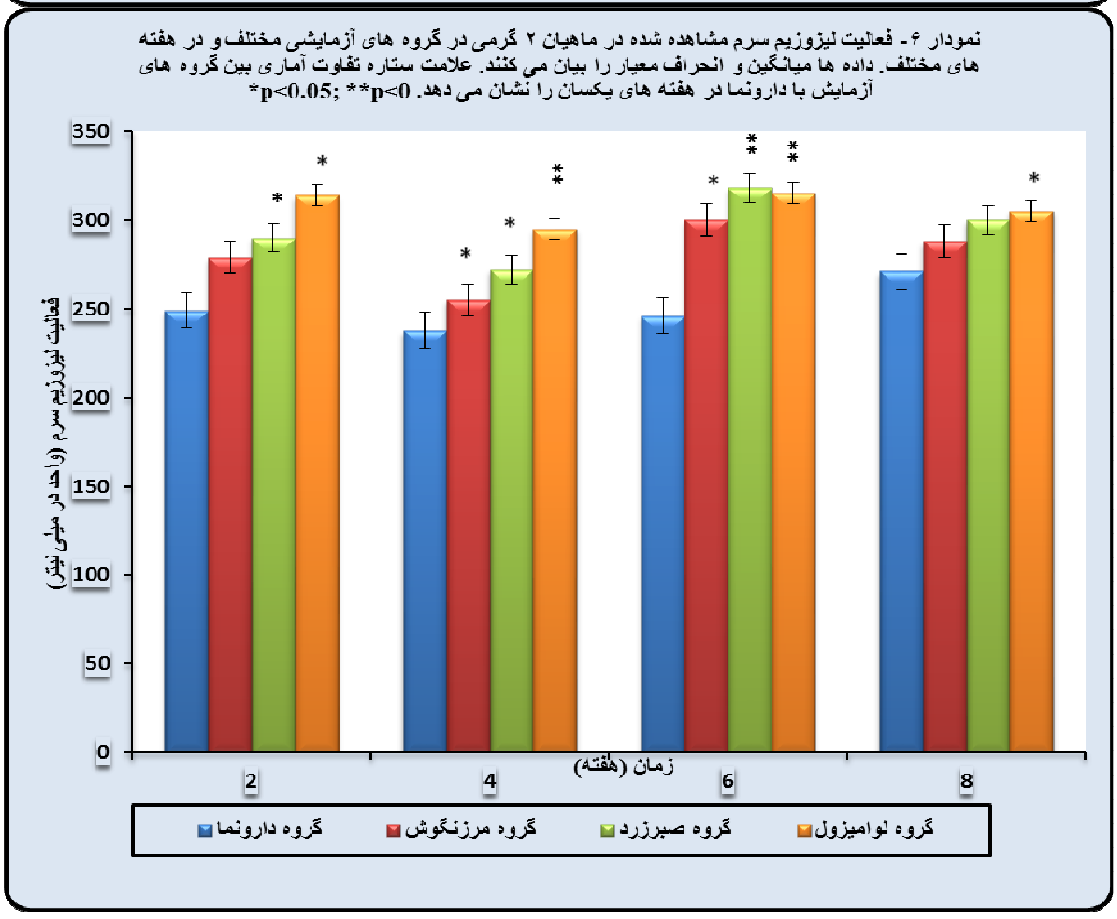


۳- ۳- ۳- فعالیت لیزوزیم سرم

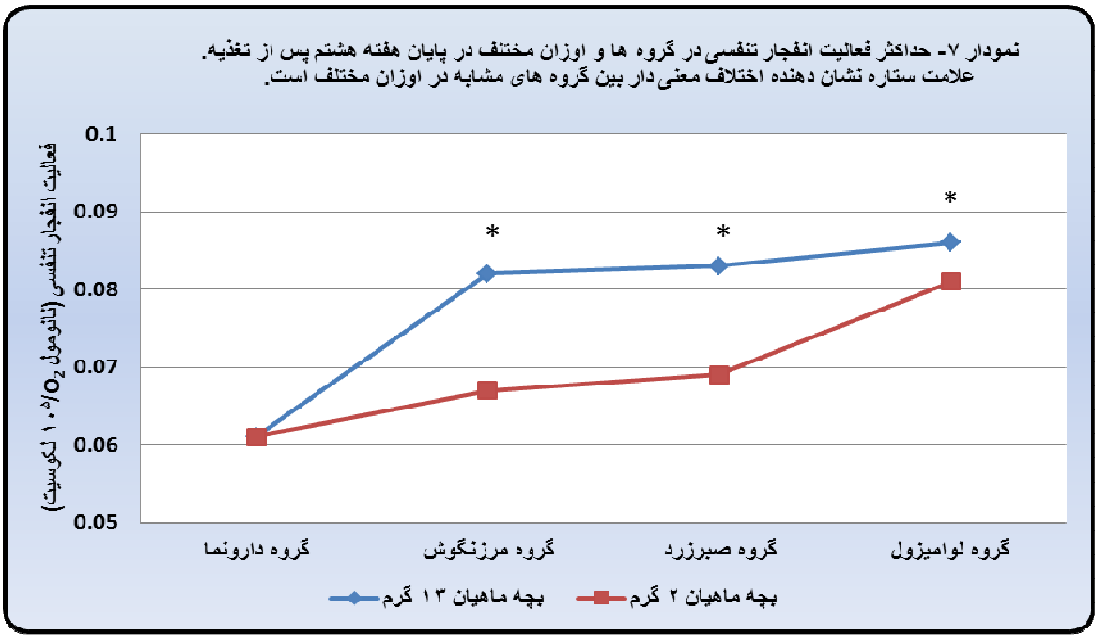
نتایج تحقیق در ماهیان ۱۳ گرمی نشان داد که فعالیت لیزوزیم سرم بین تمامی گروه های آزمایشی (مرزنگوش، صبرزرد و لوامیزول) با گروه دارونما در تمام هفته های یکسان افزایش داشتند ($p<0.05$؛ نمودار ۵). حداکثر فعالیت لیزوزیم سرم در این گروه وزنی را گروه های آزمایشی در هفته ۸ پس از تغذیه نشان دادند که از نظر آماری با یکدیگر اختلاف نداشتند ($p>0.05$). در حالی که نتایج تحقیق در بچه ماهیان با میانگین وزن اولیه ۲ گرم نشان داد که فعالیت لیزوزیم سرم در گروه لوامیزول در تمامی هفته های یکسان نسبت به دارونما افزایش داشتند ولی در مقایسه بین گروه های صبرزرد و دارونما، فعالیت لیزوزیم در هفته های یکسان ۲، ۴ و ۶، و بین گروه

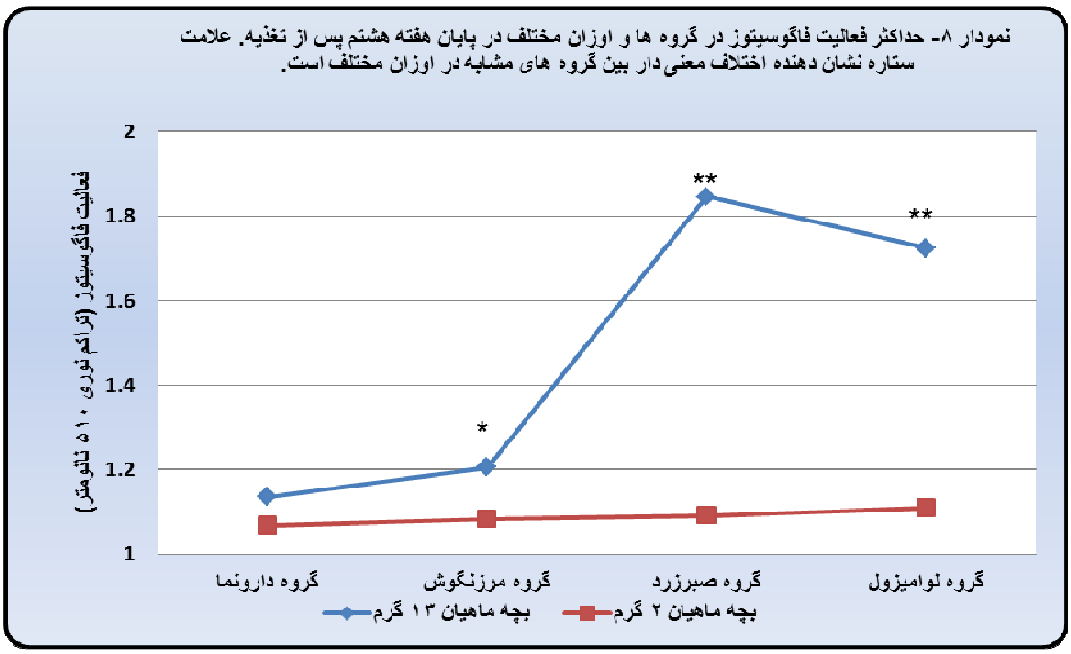
های مرزنگوش و دارونما در هفته یکسان ۴ و ۶ افزایش نشان دادند ($p<0.05$؛ نمودار ۶). حداکثر فعالیت لیزوزیم سرم در گروه لوامیزول در پایان هفته ۲ پس از تغذیه بود ($p<0.05$؛ نمودار ۶).

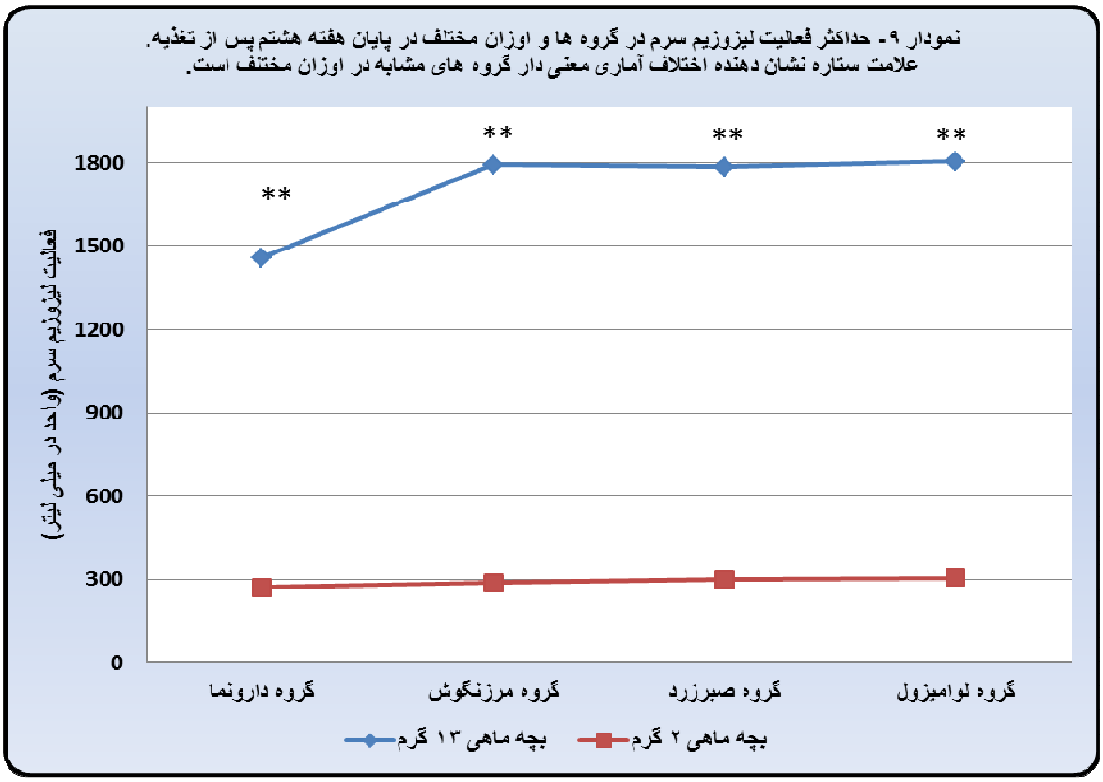




در مقایسه بین تغییرات شاخص های ایمونولوژیک ماهیان ۱۳ گرمی با ماهیان ۲ گرمی در پایان هفته هشتم پس از تغذیه نشان داد که این تغییرات از نظر آماری در ماهیان ۱۳ گرمی بیش از ماهیان ۲ گرمی بودند. در بچه ماهیان ۱۳ گرمی حداکثر فعالیت انفجار تنفسی در گروه های مرزنگوش، صبرزرد و لوامیزول در پایان هفته هشتم بیش از بچه ماهیان ۲ گرمی بود که از نظر آماری معنی دار بود ($p<0.05$، شکل ۷). همچنین حداکثر فعالیت های فاگوسیتوز و لیزوزیم در همین دوره در بچه ماهیان ۱۳ گرم بیش از ماهیان ۲ گرمی بودند که از نظر آماری معنی دار بودند ($p<0.05$، اشکال ۸ و ۹).







٤- بحث و نتیجه گیری

تقویت سیستم ایمنی ماهی مانع از ابتلاء ماهی به انواع بیماری ها شده و میزان بازماندگی را افزایش می دهد. وقتی ماهی تحت تأثیر محرک های ایمنی قرار گیرد تغییرات رایجی چون افزایش سلول های فاگوسیتوز، افزایش فعالیت لنفوسیت ها و ماکروفاژها، مشاهده می شود. این اجزاء در سیستم دفاع ایمنی غیر اختصاصی ماهی مهم هستند (MacArthur and Fletcher, 1985).

در تحقیق حاضر، اثرات عصاره های دو گیاه مرزنگوش و صبر زرد به میزان ۱٪ وزن غذا و لوامیزول به میزان ۰/۱٪ به عنوان شاهد مثبت بر روی برخی از فاکتورهای خون شناسی، بیوشیمیایی و ایمونولوژیکی بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان به ترتیب با میانگین وزن اولیه ۱۳ و ۲ گرم مورد بررسی قرار گرفت.

شاخص های خون شناسی

نتایج بررسی ها در هر دو مرحله از آزمایشات (هم در بچه ماهیان ۱۳ گرمی و هم در بچه ماهیان۲ گرمی) نشان دادند که پودر عصاره خشک این گیاهان و لوامیزول تأثیر آماری معنی دار بر روی پارامترهای خون شناسی شامل تعداد گلبول های قرمز خون (RBC)، هموگلوبین (Hb)، هماتوکریت (Hct) و اندیس های گلبولی شامل متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCH)، متوسط حجم گلبول قرمز (MCV) و متوسط غلظت هموگلوبین در حجم معینی از گلبول قرمز (MCHC) در مقایسه با گروه دارونما در پایان هفته های یکسان (۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰هفته

پس از تغذیه) نداشتند. از آنجا که تاکنون اثبات نشده است که الزاماً محرک های ایمنی موجب تغییر در شاخص های خون شناسی در ماهی شوند، لذا در تحقیق حاضر نیز تغییرات آماری معنی دار در شاخص های خون شناسی ایجاد نگردید. برخی از تحقیقات انجام شده نشان داده اند که محرک های ایمنی به ویژه محرک های ایمنی گیاهی تأثیر آماری معنی داری بر روی شمارش گلبول های قرمز خون نداشتند (Shalaby *et al*., 2006; Sahu *et al*., 2006, 2007; Kumar Jha *et al*., 2007; Harikrishnan *et al*., 2010). در این ارتباط تنگستانی و همکاران (۱۳۹۰) نشان دادند که اسانس سیر تغییر معنی داری بر تعداد گلبول های قرمز خون فیل ماهی جوان نداشت. تاکنون مشخص شده است که تغییرات سلول های قرمز خون ماهی به عوامل مختلفی از جمله گونه ماهی، نژاد، سن، جنس، تغییرات فصلی، شرایط اقلیمی و جغرافیایی، عوامل محیطی تنش زا، آلودگی ها و شرایط سیکل جنسی و موارد فیزیولوژیک دیگر (Witeska, 1998;Roberts and Hutson, 1998; Krajnovic-Ozretic, 1991; Mercaldo-Allen *et al*., 2003; Swain *et al*., 2007; Vinodhini and Narayanan, 2009) بستگی دارد.

همچنین، نتایج تحقیقات ما نشان داد که عصاره گیاهان مرزنگوش و صبر زرد به میزان ۱٪ وزن غذا و نیز لوامیزول به میزان ۰/۱٪ وزن غذا، تأثیر معنی داری بر روی میزان هموگلوبین و هماتوکریت خون گروه های آزمایش با گروه دارونما نداشتند. از آنجا که میزان هموگلوبین و هماتوکریت تابع تغییرات گلبول های قرمز خون می باشد، لذا در تحقیق حاضر که تغییرات معنی دار در میزان هموگلوبین و هماتوکریت ایجاد نشد، منطقی می باشد. در همین ارتباط علیشاهی و همکاران (۱۳۹۱) نشان دادند که لوامیزول، ارگوسان و سه عصاره گیاهی شامل آویشن، کندر و اکیناسه تغییری بر تعداد گلبول های قرمز خون، میزان هماتوکریت و هموگلوبین و اندیس های گلبولی ایجاد نکردند. ولی تحقیقاتی هستند که با نتایج تحقیقات ما مطابقت ندارند (Iwama and Nakanishi, 1996; Shalaby *et al*., 2006; Nya and Austin, 2009a) و نشان دادند که تعداد گلبول های قرمز خون، میزان هماتوکریت و هموگلوبین افزایش داشتند. همچنین، Hajibeglou and Sudagar (2010) گزارش دادند که تعداد سلول های قرمز خون و میزان هموگلوبین ماهی کپور معمولی تغذیه شده با مکمل غذایی محرک های ایمنی گیاهی افزایش داشتند. در تحقیق دیگر نیز میزان هماتوکریت و هموگلوبین خون ماهی تیلاپیا تغذیه شده با غذاهای حاوی، آویشن (Thyme)، رزماری و شنبلیله افزایش داشتند (Yilmaz *et al*., 2011).

از دیگر نتایج تحقیق حاضر، در تعداد گلبول های سفید و شمارس سلول های افتراقی خون (مونوسیت، لنفوسیت و نوتروفیل) بچه ماهی های قزل آلا رنگین کمان (۱۳ و ۲ گرمی) در تغذیه با عصاره های مرزنگوش و صبر زرد به میزان ۱٪ وزن غذا یا لوامیزول به میزان ۰/۱٪ وزن غذا با گروه دارونما در پایان هفته های یکسان(۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ هفته پس از تغذیه) تفاوت آماری معنی دار مشاهده نگردید. نتایج تحقیقات ما مخالف با نتایج تحقیقات انجام شده توسط Hajibeglou and Sudagar (2010) می باشد. آنها نشان دادند که تعداد سلول های سفید خون ماهی کپور معمولی تغذیه شده با مکمل غذایی محرک های ایمنی گیاهی افزایش داشتند. همچنین در تحقیق دیگری افزایش تعداد سلول های سفید خون در ماهی جوان *Labeo rohita* که با محرک های

ایمنی لوامیزول و اسید آسکوربیک تیمار شده بودند گزارش شـده اسـت (Choudhury *et al*., 2005). بـا توجـه بـه نتایج تحقیق حاضر، می توان نتیجه گرفت که پودر عصاره خشک گیاهان مرزنگوش و صبر زرد و نیز لـوامیزول تأثیری بر بهبود وضعیت شاخص های خون شناسی ماهی نداشتند. معمولاً تعداد سلول های لکوسـیت در ماهیـان سالم کمتر از ماهیان بیمار است که به عنوان یک شاخص معنی دار در بیماری هـای عفـونی اسـتفاده مـی شـود. لکوسیت ها، سلول های خونی هستند که نقش اساسی در دفاع از میزبان بر علیه عامل عفونی ایجاد شـده توسـط عوامل میکروبی و شیمیایی دارند (Harikrishnan *et al*., 2003)، و نیز دارای اثرات فاگوسیتی بـر روی سـلول هـای مخمر هستند (Solomkin *et al*., 1978;Rubin-Bejerano *et al*., 2003). گزارش شده است که مقدار کمی از گلوکان موجب افزایش میزان فعالیت لکوسیت ها علیه باکتری ها، ویروس ها، قارچ ها و انگل هایی کـه وارد ارگانیسـم ها شده اند، می گردد (Keles *et al*., 2001, 2002).

شاخص های بیوشیمیایی خون

پروتئین های آلبومین و گلوبولین برای حفـظ سـلامت سیسـتم ایمنـی اهمیـت دارنـد (Jha *et al*., 2007). آلبـومین گروهی از پروتئین های کوچک خون هستند که قسمت اعظم پروتئین هـای پلاسـما را تشـکیل مـی دهنـد و بـه وسیله کبد ساخته می شود و مهمترین مسئولیت آن حفظ فشار اسمزی خون برای توزیع معمـولی مایعـات خـون است و به عنوان حامل پلاسما و لیگاند غیر اختصاصی، با بسیاری از زمینه های اتصالی عمل می کند (Shenkin *et al.,* 1996). همچنین، در انتقال اسیدهای چرب آزاد خون نقش عمده ای دارد. گلبـولین هـا گروهـی از پـروتئین های خون هستند که از نظر مولکولی به سه دسته آلفا ، بتا و گاما گلوبولین ها تقسیم می شوند. گاما گلوبولین ها از مهمترین گلوبولین ها است که به آنتی بادی ها یا ایمونوگلوبولین ها مشهورند. ادعا شـده کـه گامـا گلوبـولین منبع تمام پروتئین های ایمنی در خون است. افزایش پروتئین تام سرم، آلبومین و گلوبولین نشانه ایمنی ذاتی قوی در ماهی است (Wiegertjes *et al*., 1996).

در تحقیق حاضر، پروتئین تام سرم، آلبومین و گلوبولین در گروه های تیمار در مقایسه با گروه دارو نما در پایان هفته های یکسان (۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ هفته پس از تغذیه) افزایش نشان دادند. این نتـایج موافـق بـا نتـایج حاصـل از تعدادی از تحقیقات بر روی ماهی قزل آلا رنگین کمان تغذیه شده بـا سـیر، زنجبیـل و لیپـوپلی سـاکارید (Nya, 2009; Nya and Austin, 2009a; 2009b) و نیز نتایج تحقیقـات Belin و همکـاران (2010; 2011) در مـاهی قـزل آلا رنگین کمان تغذیه شـده بـا *Laurus nobilis* و *Coggyria coggyria* مـی باشـد. همچنـین موافـق بـا نتـایج تحقیقـات Hajibeglou and Sudagar (2010) بر روی ماهی کپور معمولی تغذیه شده با تعدادی از محرک هـای ایمنـی، Sahu و همکاران (2006) درماهیان انگشت قد *Labeo rohita* تغذیـه شـده بـا mango kernel، Rao و همکـاران (2006) در ماهی *Labeo rohita* تغذیه شده با *Achyranthes aspera* و نیز Wiegertjes و همکاران (1996) می باشـد. ولـی نتـایج تحقیق Selvaraj و همکاران (2004) بر روی ماهی کپور حکایـت از کـاهش میـزان پـروتئین تـام سـرم داشـت. در

تحقیق دیگری که نتایج آن همراه با کاهش میزان پروتئین تام سرم بود، دلیل کاهش را تزریق و استرس ناشی از حمل ماهی عنوان کردند (Alexander and Ingram, 1980). همچنین در تحقیق حاضر نشان داده شد که نسبت آلبومین/گلوبولین در گروه های تیمار در مقایسه با گروه دارو نما در پایان هفته های یکسان (۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ هفته پس از تغذیه) اختلاف آماری معنی دار وجود نداشتند و این نشان دهنده آن است که عصاره های گیاهی مرزنگوش و صبر زرد تأثیری بر نسبت آلبومین/ گلوبولین ندارند. نسبت آلبومین به گلوبولین کمتر از واحد بود که این نشان می دهد بیشتر پروتئین تام پلاسما را گلوبولین ها تشکیل داده اند. همچنین مقدار گاما گلوبولین بیشتر از سایر گلوبولین ها بود که این نیز نشانه اثرات تحریکی عصاره گیاهان مرزنگوش و صبر زرد بر شاخص های بیوشیمیایی خون و در نتیجه پاسخ های ایمنی است. بر عکس، گزارش شده است که نسبت آلبومین به گلوبولین در ماهی انگشت قد *Labeo rohita* تیمار شده با گیاه *Magnifera indica* Kernel افزایش داشت (Sahu *et al*., 1007).

شاخص های ایمونولوژی خون

فعالیت انفجار تنفسی

فاگوسیت های ماهی پس از فعال شدن در طی یک دوره مصرف شدید اکسیژن که به انفجار تنفسی معروف است، قادر به تولید سوپراکسید آنیون (O_2^-) و مشتقات واکنشی اش یعنی پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال های هیدروکسیل (OH) هستند (Secombes and Fletcher, 1992; Secombes, 1996; Gultvik *et al*., 2002; Nayak *et al*., 2008). این گونه اکسیژن های واکنشگر اندیکاتور مهم ایمنی ذاتی در ماهی هستند (Jeney and Anderson, 1993; Miyazaki, 1998) که برای پاتوژن های ماهی سمی می باشند (Haride *et al*., 1996; Itou *et al*., 1996). رادیکال های آزاد اکسیژن به لیپیدها و پلی پپتیدهای سلولی هجوم می برند و منجر به آسیب سلولی می شوند. از آنجا که سوپراکسید آنیون نخستین محصول آزاد شده از فعالیت انفجار تنفسی است، لذا به عنوان یک شاخص دقیق جهت اندازه گیری فعالیت انفجار تنفسی پذیرفته شده است (Secombes, 1990; Secombes and Oliver, 1997; Roch, 1999). افزایش فعالیت انفجار تنفسی با افزایش فعالیت باکتری کشی فاگوسیت ها مرتبط است (Sharp and Secombes, 1993). تحقیقات رو به افزایش نشان می دهند که انواعی از مواد قادر به تحریک فاگوسیت ها می باشند که این مواد شامل باکتری ها و محصولات باکتریایی (Lamasand Ellis, 1994; Solem *et al*., 1995)، لوامیزول (Siwicki, 1987, 1989; Siwicki *et al*.,1990; Misra, 2004; Ispir and Yonar, 2007)، گلوکان (Robertson *et al*., 1990; Secombes, 1996; Misra *et al*., 2006)، کیتین(Sakai *et al*., 1992) و تعداد زیادی از گیاهان دارویی می باشند (Sahu, 2004; Sahu, *et al*., 2006; Divyagnaneswari *et al*., 2008; Haghighi and Sharifrohani, 2013).

در تحقیق حاضر، فعالیت انفجار تنفسی فاگوسیت ها در دو مرحله از آزمایشات با گروه های با میانگین وزنی اولیه ۱۳ گرم و۲ گرم در بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان از طریق احیاء فری سیتوکروم سی جهت تعیین

سوپراکساید آنیون تولید شده از لکوسیت ها به روش اسپکتروفتومتر تعیین شد. نتایج این کارآزمایی بر روی بچه ماهیان با میانگین وزنی ۱۳ گرم نشان داد که میزان فعالیت انفجار تنفسی در گروه های آزمایشی نسبت به گروه دارونما در پایان تمامی دوره های یکسان (۲، ۴، ۶ و ۸ هفته) افزایش داشتند؛ در حالی که این افزایش در بچه ماهیان با میانگین وزنی ۲ گرم در پایان هفته های ۶ و ۸ پس از تغذیه و بین گروه های آزمایشی صبر زرد و لوامیزول با گروه دارو نما مشاهده شد. این نتایج موافق با نتایج بسیاری از تحقیقات دیگر است که گزارش نموده اند مصرف محرک های ایمنی در ماهی موجب افزایش فعالیت انفجار تنفسی می شوند (Siwicki *et* al., 1994; Sakai,1999; Dügency *et al*., 2003; Sahu *et al*., 2007; Harikrishnan *et al*., 2010; Bilen *et al*., 2011; Haghighi and Sharifrohani, 2013). فعالیت خارج سلولی سلول های فاگوسیتیک خون در ماهی قزل آلای تغذیه شده با عصاره زنجبیل به طور معنی داری بالاتر بود (Dügency *et al*., 2003). در تحقیق حاضر، تفاوت در فعالیت انفجار تنفسی در بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان که با پودر عصاره خشک مرزنگوش و صبر زرد تغذیه شده بودند مشاهده گردید. ولی چنین تفاوتی در فعالیت انفجار تنفسی ماهیان قزل آلای تغذیه شده با عصاره گیاهان گون *Astragalus*و قاشقک *Scutellaria* مشاهده نگردید (Yin *et al*., 2006). همچنین تحقیق دیگری نشان داد که میزان تولید سوپر اکسید آنیون در ماهیان قزل آلای تغذیه شده با عصاره گیاهان گزنه دوپایه nettle و داروا‌ش mistletoe تفاوتی با گروه کنترل نداشتند (Dügency *et al*., 2003). تحقیقات دیگر نیز کم اثر بودن ویتامین های A، E و C را بر روی فعالیت انفجار تنفسی سلول های فاگوسیت کننده یا ماکروفاژ نشان دادند (Hardie *et al*., 1990, 1991; Jeney and Jeney, 2002). جهت تنظیم فعالیت انفجار تنفسی ماکروفاژها، در آزمایشی به روش *in vitro* نشان داده شد که پروستاگلاندین اثر مهاری روی فعالیت انفجار تنفسی ماکروفاژها دارد (Novoa *et al*., 1996).

فاگوسیتوز

عمل فاگوسیتوز لکوسیت ها به عنوان یک عنصر مهم در دفاع ایمنی ماهی بر ضد میکروارگانیسم ها مهاجم شناخته شده است (MacArthur and Fletcher, 1985; Oliver *et al*., 1986). ماهی دارای انواعی از لکوسیت های فاگوسیت کننده هستندکه این لکوسیت ها در خون، محوطه صفاقی و محل های بافتی مختلف وجود دارند. فاگوسیتوز و تولید رادیکال های آزاد اکسیژن از طریق انفجار تنفسی حوادث مهم مسیرهای باکتری کشی در ماهی است ولی هنوز مکانیسم های آن به خوبی شناخته نشده است (Sharp and Secombes, 1992, 1993; Secombes, 1996). فاگوسیت ها دارای آنزیم غشایی یکسان به نام NADPH– اکسیداز است که در طی مرحله انفجار تنفسی قادر به احیاء یک الکترون از اکسیژن مولکولی به سوپر اکسید آنیون است. معمولاً عمل فاگوسیتوز در ماهیانی که تحت تأثیر محرک های ایمنی قرار می گیرند، افزایش می یابد (Sakai *et al*., 1992; Ainsworth *et al*., 1994; Jeney *et al*., 1997; Dügency *et al*., 2003; Chen *et al*., 2003). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که فعالیت فاگوسیت کننده لکوسیت های خون هم در بچه ماهیان قزل آلا رنگین کمان با میانگین وزن اولیه ۱۳ گرم و هم در بچه ماهیان ۲ گرم تغذیه شده با ۱٪ پودر عصاره خشک گیاهان مرزنگوش و صبرزرد در هفته

های یکسان (۲، ۴، ۶ و ۸ هفته پس از تغذیه) نسبت به گروه دارونما افزایش داشتند. در تأیید آن، تاکنون نتایج مشابه ای نیز در ماهی قزل آلا رنگین کمان تغذیه شده با انواعی از عصاره های گیاهی گزارش شده اند (Dügency *et al*.,2003; Nya and Austin, 2009b; Bilen *et* al., 2011; Haghighi and Sharifrohani, 2013).

فعالیت آنزیم لیزوزیم

لیزوزیم یک عامل هومورال مهم در سیستم ایمنی ذاتی ماهی است که در سرم، موکوس و تخم ماهی وجود دارد (Yano, 1996; Ellis, 1999) و دارای اثر باکتری کشی هم از طریق هجوم به دیواره سلولی و تخریب آن و هم از طریق تحریک عمل فاگوسیتوز باکتری ها است. آنزیم لیزوزیم توسط نوتروفیل ها و ماکروفاژها تولید می شوند. لیزوزیم نخستین خط دفاعی در ممانعت از چسبندگی و موضعی شدن پاتوژن های باکتریایی است و بنابراین منجر به کاهش بیماری می شود (Misra *et al*., 2004, 2006). لیزوزیم سرم از طریق قطع پیوند های گلیکوزیدی بتا-۱، ۴ بین اسیدN- استیل مورامیک و N- استیل گلوکوزامید پپتیدوگلیکان دیواره سلول باکتری، از رشد میکروارگانیسم ها جلوگیری می کند (Secombes, 1996 ;Choi *et al*., 2008). تحقیقات نشان داده اند که مواد محرک ایمنی و میکروارگانیسم های پاتوژن سبب تعدیل غلظت لیزوزیم در سرم می شوند (Siwicki and Studnicka, 1987; Panigrahi *et al*., 2004). تا کنون آزمایشات متعددی با انواع محرک های ایمنی و با گونه های مختلف ماهی انجام شده است که نشان می دهند میزان فعالیت لیزوزیم سرم افزایش می یابد. گزارش شده است که فعالیت لیزوزیم سرم ماهی قزل آلای رنگین کمان تحت تأثیر تغذیه با بتا گلوکان به مدت ۲۸ روز افزایش قابل توجه ای داشته است (Lapatra *et al*., 1998). همچنین افزایش فعالیت لیزوزیم سرم، در ماهی تیلاپیا تغذیه شده با عصاره برگ گیاه دارویی *Eclipta alba* پس از گذشت ۱، ۲ و ۳ هفته از تغذیه (Christybapita *et al*., 2007) و نیز در ماهی سالمون تحت تأثیر محرک های ایمنی (Paulsen *et al*., 2003) گزارش شده اند.

در تحقیق حاضر، ما شاهد فعالیت بیشتر لیزوزیم سرم گروه های آزمایشی در مقایسه با گروه دارونما بودیم. نتایج این کارآزمایی در بچه ماهیان قزل آلا رنگین کمان با میانگین وزن های اولیه ۱۳ گرم و ۲ گرم تغذیه شده با غذای حاوی ۱٪ عصاره خشک آلوئه ورا یا مرزنگوش و یا ۰/۱٪ لوامیزول برای مدت ۸ هفته موجب تحریک پارامترهای غیراختصاصی نوتروفیل ها شدند. این نتایج موافق با نتایج تحقیقی است که نشان داد مرزنگوش خوراکی بر روی سلول های ایمنی خوک، اثرات تحریک ایمنی غیر اختصاصی داشت (and Bilkei, Walter 2004). همچنین موافق با نتایج Alishahi و همکاران (2010) می باشدکه نشان دادند تجویز خوراکی صبر زرد به میزان ۰/۵٪ وزن غذا موجب افزایش فعالیت لیزوزیم سرم ماهی کپور معمولی شد. نتیجه مشابهی در ماهی قزل آلا رنگین کمان تغذیه شده با گیاه *Cotinus coggyria* گزارش شده است (Bilen *et al*., 2011). همچنین گزارشات متعددی نشان داده اند که محرک های ایمنی گیاهی مختلف موجب افزایش سطح لیزوزیم در انواعی از ماهیان

شده اند که نتایج تحقیق حاضر نیز این نتایج را تقویت می کند (Chen *et* al., 2003; Rao *et al*., 2006; Choi *et al*., 2008; Alishahi *et al*., 2010).

همچنین، نتایج این تحقیق نشان داد که حداکثر فعالیت انفجار تنفسی گروه های آزمایشی در پایان هفته هشتم پس از تغذیه در ماهیان ۱۳ گرمی به طور معنی داری بیشتر از ماهیان ۲ گرمی بود. همچنین، در پایان هفته هشتم پس از تغذیه، حداکثر فعالیت فاگوسیتوز و لیزوزیم سرم در ماهیان ۱۳ گرمی بیش از ماهیان ۲ گرمی بودند. این نتاج موافق با نتایج دیگر تحقیقات انجام شده است (Hrubec *et al*., 2004). آنها نشان دادند که میزان سطح آنتی بادی در پاسخ به واکسن ویبریو تجاری در گروه بچه ماهیانی که سن کمتری داشتند کمتر بود. دیگر محققین نیز نتایج مشابهی را در ارتباط با پاسخ سیستم ایمنی و سن ماهی بیان نموده اند که با نتایج تحقیق ما موافقت دارند. گزارش شده است که غلظت ایمونوگلوبولین سرم ماهی سالمون (*Oncorhynchus masou*) از سن ۳ ماهگی تا بلوغ به طور ثابتی افزایش یافته است (Fuda *et al*., 1991). همچنین میزان سطح ایمونوگلوبولین سرم در ماهیان هرینگ پاسفیک (*Clupea pallasi*) بزرگتر بیش تر از ماهیان کوچکتر مشاهد شد (Davis *et al*., 1999). تحقیقات دیگری نشان دادند که میزان مصونیت در سالمونیدهای قرار گرفته در معرض باکتری از بچگی تا نوجوانی (کمتر از ۷ ماه) افزایش داشته اند (Johnson et al., 1982; Tatner and Horne, 1983). همچنین نشان داده شده است که سیستم ایمنی ماهیان کم سن تر نسبت به بعضی آلاینده های آبی مثل بی فنیل های پلی کلرینه، polychlorinated biphenyls (PCBs)، حساس تر از سیستم ایمنی ماهیان مسن تر بوده و آسیب سیستم ایمنی در ماهیان جوان تر سریع تر از ماهیان مسن تر رخ می دهد (Duffy *et al*., 2002; 2003). این نتایج نشان می دهد که سن بر پاسخ سیستم ایمنی ماهی به محرک های ایمنی مؤثر می باشد. یکی از دلایل افزایش پاسخ سیستم ایمنی ماهیان ۱۳ گرمی به محرک های گیاهی در تحقیق حاضر نسبت به ماهیان ۲ گرمی، افزایش تکامل رو به رشد ماهی است. یکی از علل بالا بودن میزان مرگ و میر لارو ماهی و بچه ماهیان در سنین پایین نسبت به سنین بالاتر، عدم توسعه یافتگی کامل سیستم ایمنی در لاروها و بچه ماهیان با سن کمتر است.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که پودر عصاره خشک گیاهان مرزنگوش و صبر زرد به میزان ۱٪ وزن غذا موجب افزایش ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی بچه ماهیان قزل آلا رنگین کمان با میانگین وزن های ۱۳ و ۲ گرم در هفته های یکسان (۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ هفته) شده است. محرک های ایمنی انتخابی که موجب فعال نمودن مکانیسم های دفاع ذاتی و افزایش مقاومت نسبت به بیماری ها می شوند، بدون آنکه عوارض جانبی نامطلوب داشته باشند، می توانند در آبزی پروری کاربردهای عملی داشته باشند. محرک های ایمنی به عنوان مکمل های غذایی، به ویژه در صورت غیر مغذی بودن، می توانند انتخاب خوبی برای افزایش مقاومت نسبت به بیماری ها و پاتوژن های شایع در تأسیسات پرورش ماهیان دریایی باشد. در همین راستا، به نظر می رسد که محرک های

ایمنی با منشاء گیاهی، به دلیل مزایایی نظیر دسترسی آسان، ارزان بودن، زیست تجزیه پذیری، مؤثر بودن بر طیف وسیعی از پاتوژن ها و نیز استفاده خوراکی، جایگزین مناسبی برای واکسن های خاص که تولیدشان در مقیاس تجاری گران است، و نیز آنتی بیوتیک ها و یا مواد شیمیایی در پیشگیری از بروز بسیاری از بیماری های شایع آبزیان در صنعت پرورش ماهی باشند. با توجه به این که اثر محرک های ایمنی وابسته به مقدار است، بنابراین تعیین مقدار مصرف مناسب توصیه می شود و نیز با توجه به مشاهده تغییرات زیاد در نتایج تجویز محرک های ایمنی به منظور پیشگیری یا درمان ماهیان پرورشی نسبت به پاتوژن های خاص و قابل پیش بینی، تأکید می شود که تجویز این مواد با شرایط محیطی شناخته شده وفق داده شوند.

پیشنهاد ها

۱- انجام آزمایش جهت تعیین دوز مناسب

۲- انجام آزمایش با اشکال مختلف فرآورده های این گیاهان شامل اسانس روغنی، عصاره آبی و سایر عصاره های الکلی

۳- انجام آزمایش با روش های مختلف تجویز

۴- انجام آزمایش با روش های مختلف درمانی

۵- انجام آزمایش جهت تعیین مکانیسم (های) اثر محرک ایمنی عصاره گیاهان مرزنگوش و صبرزرد

۶- انجام آزمایش با ماهی تحت تأثیر قرار داده شده با میکروارگانیسم های پاتوژن یا بیماری زا مانند آئروموناس هیدروفیلا و عوامل استرپوکوکوزیس و غیره جهت تعیین میزان افزایش مقاومت ماهی نسبت به این میکروارگانیسم ها

بخش دوم:

اثر دو گیاه سرخارگل و گون بر تقویت سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلا و مقاومت آن در برابر استرپتوکوکوزیس

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۸۲
۱- مقدمه ۸۳
۲- مواد و روش ها ۱۰۶
۳-نتایج ۱۱۳
۴- بحث ۱۴۶
۵- نتیجه گیری ۱۵۱
پیشنهادها ۱۵۲

چکیده

امروزه در صنعت آبزی پروری از عصاره و یا اسانس گیاهان مختلف به منظور تقویت شاخصهای رشد، سیستم ایمنی و مقاومت در برابر عوامل بیماریزای میکروبی استفاده می شود. در این تحقیق از عصاره دو گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea*)و گون (*Astragalus sp.*) به منظور ارزیابی برخی از پارامترهای ایمونولوژی، بیوشیمیایی و هماتولوژی در بچه ماهیان قزل آلا (۱۶باوزن متوسط گرم و در دمای ۲۰-۱۴ درجه سانتی گراد) استفاده شد و مقاومت آنها در برابر استرپتوکوکوس اینیایی (*Streptococcus iniae*) مورد ارزیابی قرار گرفت. سه غلظت از عصاره سرخارگل (۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم بر کیلوگرم غذا) و سه غلظت از عصاره گون(۲، ۳ و ۵ گرم بر کیلوگرم غذا) به همراه نمونه کنترل در قالب ۲۱ تیمار به مدت ۶۰ روز مورد ارزیابی قرار گرفتند. پارامترهای مورد بررسی شامل تغییرات C_4,C_3,IgM، رادیکال آزاد اکسیژن، لیزوزیم، آلبومین، پروتئین کل، گلوکز، لنفوسیت، مونوسیت و نوتروفیل بوده و در انتهای کار نیز مواجهه سازی با باکتری استرپتوکوکوس اینیایی انجام و درصد بقاء و ماندگاری ماهیان مورد آزمایش، ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که مقادیر C_3، لیزوزیم و رادیکال آزاد اکسیزن پس از ۶۰ روز افزایش معنی داری در تیمارهای حاوی گون و سرخارگل نسبت به تیمار کنترل داشته و غلظتهای بالاتر عصاره های مورد استفاده نیز نتایج بهتری به همراه داشته است. روند افزایشی C_4 و IgM چشمگیر نبوده و در واقع دارای اختلاف معنی دار نبوده اند($P>0/05$). میزان آلبومین، پروتئین کل و گلوکز در انتهای آزمایش باکاهش نسبی همراه بوده است. در ارزیابی نتایج مربوط به شمارش فاگوسیتها مشخص گردید که تعداد نوتروفیل هابعد از ۶۰ روز به طور معنی دار افزایش داشته ولی افزایش نسبی سایر پارامترها، معنی دار نبوده است ($P>0/05$). در مواجهه سازی ماهیان مورد آزمایش با باکتری فوق الذکر، مشخص شد که ماهیان دریافت کننده عصاره های گیاهان گون و سرخارگل(بالاترین غلظت مورد آزمایش) به ترتیب دارای ماندگاری ۹۳/۳۳ و ۹۱/۱۱ درصد بوده اند، در صورتی که در تیمار کنترل این تعداد ۴۴/۴۴ درصد بوده است.

نتیجه گیری کلی آنکه اولاً گیاهان مورد استفاده دارای اثرات تقویت کننده بر سیستم ایمنی ذاتی بوده و غلظتهای بالاتر نتایج بهتری به همراه داشته است. از طرف دیگر استفاده از عصاره های گیاهی باعث افزایش مقاومت بچه ماهیان قزل آلا در برابر استرپتوکوکوزیس شده و بنظر می رسد می توان از آن به عنوان محرک ایمنی در جیره غذایی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: سرخارگل، گون، ماهی قزل آلا، استرپتوکوکوس اینیایی، سیستم ایمنی

۱- مقدمه

افزایش تقاضای ماهی در ابتدا به دلیل رشد سریع جمعیت، درآمد ناشی از این فعالیت و هم‌چنین ارجحیت ماهی بر سایر پروتئین‌های حیوانی و نیز دلایل فرهنگی و بهداشتی (سلامتی) رشد این صنعت را تسریع کرده است. برای آینده نیاز به توسعه فعالیت‌های آبزی پروری و افزایش تولید قابل پیش‌بینی خواهد بود. صنعت آبزی‌پروری باید موثر و سودآور و دارای حداقل اثرات زیست محیطی باشد. غذاها، عملیات غذادهی و تامین عناصر اساسی در پایداری، سودآوری و مناسب بودن آبزی‌پروری مدرن تعیین کننده هستند، زیرا هزینه‌های غذا ۳۰٪ تا ۷۰٪ از کل هزینه‌های عملیاتی را شامل می‌شوند. علاوه بر آن، مشخص شده است که تغذیه نقش مهمی را در عملکرد سیستم ایمنی و مقاومت در برابر بیماری‌ها ایفا می‌کند. در نتیجه، کیفیت غذا و مدیریت تغذیه بسیار حساس و حائز اهمیت است (ابراهیمی، ۱۳۸۵).

در صنعت آبزی‌پروری عوامل بیماری‌زا از عوامل کاهش دهنده تولید می‌باشند. برای حل این مشکل امروزه از محرک‌های سیستم ایمنی استفاده شده و از آنجایی که برخی از گیاهان دارویی دارای خواص مفید از جمله تحریک و تقویت سیستم ایمنی هستند به همین علت استفاده از آنها در مزارع پرورش ماهی سبب بهبود تولید می‌گردد(Ghasemi *et al*., 2011).

سیاست داروسازی نوین در طی دو دهه اخیر به شکل قابل توجهی به سوی گیاهان دارویی و درمان با دوزهای گیاهی و طبیعی پیش رفته است. آمار جهانی نشان می‌دهد که مصرف سالانه گیاهان دارویی به دلیل افزایش مقاومت عوامل بیماری‌زا به داروهای مصنوعی در کشورهای اروپایی و نیز کشورهای در حال توسعه در سال‌های اخیر پیشرفت چشمگیری داشته است (قاسمی، ۱۳۸۸).

در حال حاضر برخی از جوامع بومی و سنتی کشورهای در حال توسعه با توجه به تجربیات و دانش بومی انتقال یافته از نسل‌های قبلی به آنها از گیاهان دارویی و برخی منابع جانوری یا معدنی برای درمان و سلامت دام‌ها و آبزیان استفاده می‌کنند. به طور نمونه در این روش درمان، کشاورزان و دامداران از انواع تازه، دم کرده، جوشانده، روغن، شیره، صمغ و مرهم برخی از گونه‌های دارویی در جنگل، مراتع یا مزارع بدون پرداخت هزینه بهره‌برداری می‌کنند. اگرچه درمان دام با گیاهان دارویی به صورت سنتی سریع نمی‌باشد و ممکن است برای بیماری‌های واگیردار چندان مناسب نباشد، اما با این حال داروهای گیاهی و طبیعی به دلیل عواملی همچون ارزش اقتصادی و کم هزینه بودن تولید آنها، نداشتن اثرات تخریبی بر محیط زیست (داروهای ارگانیک)، کم بودن عوارض جانبی در مقایسه با داروهای شیمیایی، عدم ایجاد مقاومت نسبی عوامل بیماری‌زا به داروهای گیاهی، انحصاری بودن درمان برخی بیماری‌ها با گیاهان دارویی و وجود تجربیات مختلف بالینی در رابطه با گیاهان دارویی منجر شده تا این منابع ارزشمند دارویی از ارزش و جایگاه خاصی در درمان برخوردار باشند (قاسمی، ۱۳۸۸).

واکسیناسیون متداولترین روش جهت کنترل بیماری‌های ماهی بوده که باعث افزایش پاسخ ایمنی اختصاصی ماهی می‌شود. ولی با این وجود برخی از باکتری‌ها مثل آئروموناس هیدروفیلا بواسطه داشتن سویه‌های مختلف نسبت به واکسن‌های رایج مقاومت نشان می‌دهند (Galina *et al*., 2009).علاوه براین، برخی از واکسن‌ها فقط علیه باکتری‌های خاصی پاسخ نشان داده و از طرفی واکسن‌های مورد استفاده در ماهیان جوان تر کمتر پاسخ مثبت نشان می‌دهند(Galina *et al*., 2009). در کنار استفاده از واکسن‌ها، پرورش دهندگان ماهی به منظور کنترل بیماری‌های قارچی، باکتریایی و انگلی از مواد شیمیایی و یا آنتی‌بیوتیک‌های رایج استفاده می‌کنند. ولی با این وجود در سال‌های اخیر استفاده از این گروه از مواد محدود شده است زیرا استفاده از مواد مذکور باعث بروز مقاومت میکروبی، سمیت و تجمع در بافت ماهی و محیط زیست می‌شوند. امروزه استفاده از مواد تحریک کننده ایمنی بعنوان یک روش مفید نسبت به واکسیناسیون و مواد شیمیایی جهت کنترل بیماری‌های ماهی مورد توجه قرار گرفته است. این مواد باعث افزایش پاسخ ایمنی غیراختصاصی می‌شوند. از مهم‌ترین اجزاء سیستم ایمنی می‌توان به مونوسیت ها، گرانولوسیت ها، نوتروفیل ها، ماکروفاژها و عناصر هومورال مانند لیزوزیم و پروتئین‌های دارای پیوند متیل اشاره نمود. در آبزی‌پروری مطالعات مختلفی درخصوص مواد صناعی(Synthetic)، باکتریایی، حیوانی و گیاهی بعنوان مواد تحریک کننده سیستم ایمنی غیراختصاصی در گونه‌های مختلف ماهیان پرورشی انجام شده است. بعضی از گیاهان غنی از ترکیباتی نظیر روغن‌های فرار، ساپونین‌ها، فنولیک ها، تانین‌ها، آلکالوئیدها، پلی‌ساکاریدها و پلی‌پپتید می‌باشند. محصولات گیاهی دارای اثرات مختلفی نظیر ضد استرس، ضد میکروبی و تحریک کننده سیستم ایمنی می‌باشند. مکانیسم تاثیر گیاهان ممکن است به طور مستقیم بوده و اثرات ضد میکروبی به طور مستقیم اعمال گردد یا آن که با تقویت سیستم دفاعی بدن و سیستم ایمنی این عمل را انجام دهند. گیاه سرخارگل دارای اثرات ضدالتهابی و تقویت کننده سیستم ایمنی می باشد(Galina *et al*., 2009).

۱-۱ گیاه سرخارگل

جنس اکیناسه‌آ به خانواده آستراسه‌آ و زیر خانواده آسترویده‌آ تعلق دارد. جنس اکیناسه‌آ اخیرا به ۴ گونه و ۸ واریته تقسیم‌بندی شده است که سه گونه‌ی *E. Pallida, E.* purpurea و *E. Angustifolia* دارای خواص درمانی هستند. *E. purpurea* گیاهی علفی، چند ساله و با ارتفاع ۱۵۰-۶۰ سانتیمتراست ساقه‌ها به رنگ سبز یا قرمز، بصورت عمود و قدری شاخه‌دار هستند. برگ‌ها بیضی شکل و یا در انتها نوک تیز با دندانه‌های متفاوت در لبه‌ها بوده و گل‌ها به صورت منفرد و در انتهای ساقه رشد می‌کنند(Soudi *et al*., 2007).

سرخارگل (Ehinacea) یکی از گیاهان دارویی پرمصرف بوده و بومی آمریکای شمالی می‌باشد اما امروزه به اروپا، جنوب آمریکا، استرالیا و دیگر مناطق جهان انتشار یافته است. در سال ۲۰۰۱ مناطق زیر کشت این گیاه در کل جهان چندین هزار هکتار گزارش شده‌است. هندی‌های آمریکایی تبار اولین کسانی بودند که از گونه‌های سرخارگل برای درمان بیماری‌ها استفاده کردند. ساقه‌های زیرزمینی و اندام‌های هوایی این گیاه به عنوان اندام‌های مورد استفاده مطرح هستند. تنتور یا عصاره الکلی از شکل‌های قوی مورد استفاده هستند. در آلمان استفاده از عصاره تثبیت شده در الکل بسیار رایج است(Soudi *et al*., 2007).

فرآورده‌های سرخارگل برای مصرف داخل بدنی و استفاده در خارج از بدن مطرح می باشند. امروزه از سرخارگل بعنوان پیشگیری از عفونت تکراری قسمت بالای لوله تنفسی و لوله ادراری استفاده می شود. از این گیاه بعنوان ترمیم دهنده زخم های سطحی نیز استفاده میشود(Melchart *et al*., 1998) .

سرخارگل بهترین گیاه شناخته شده برای تحریک سیستم ایمنی است. این گیاه فعالیت سیستم ایمنی غیراختصاصی را افزایش داده و سیستم ایمنی را در برابر بیماریهای باکتریایی و ویروسی تقویت می کند. سرخارگل اثرات مفیدی بر گلبول‌های سفید خون نشان می دهد. ترکیباتی نظیر پلی ساکاریدها، آلکامیدها و سیچوریک اسید باعث افزایش فعالیت ماکروفاژها می شوند. سه ترکیب ذکر شده اثر همدیگر را تقویت می کنند. سرخارگل اثرات کشندگی سلول‌های کشنده طبیعی را بطور معنی داری افزایش می دهد. مطالعات نشان داده که گیاه سرخارگل اثراتی شبیه به اینترفرون داشته و باعث فعالیت ماکروفاژها، لنفوسیتهای T و همچنین تولید سیتوکین ها می شود. غلظت پائین عصاره های سرخارگل باعث القاء سطوح بالاتر سیتوکینهایی نظیر اینتروفرون آلفا، اینترلوکین -۱ ، اینترلوکین-۶ ، اینترلوکین-۱۰ شده که این امر باعث تقویت اثرات ضدویروسی می شود (Dahui *et al*., 2011; Melchart *et al*., 1998) .

ترکیبات موجود در گیاه: آلکامیدهای لیپوفیلیک، مشتقات هیدروفیلیک کافییک اسید از جمله اکیناکوزید و سینارین، پلی‌ساکارید و گلیکوپروتئین به عنوان اجزاء فعال این گیاه مطرح می باشند. تاکنون ترکیبات زیادی از جمله پلی استیلنس، فلاوونویید، روغن‌های ضروری و پیرولیزیدین آلکالویید از این گیاه استخراج شده اند.

تغییراتی که در نوع و محتوای ترکیبات وجود دارد بستگی به واریته، مرحله کشت، منطقه کشت، قسمت مورد استفاده از گیاه و پردازش محصولات دارد. به عنوان مثال پلی‌ساکاریدهای موجود در عصاره مایع که موجب تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی می‌شوند، در عصاره الکلی وجود ندارند. همچنین ترکیبات ریشه گیاه در مقایسه با قسمت‌های هوایی آن بسیار متفاوت است به طوری که ریشه دارای روغن‌های فرار و آلکالوئیدهای پیرولیزیدین بیشتری نسبت به قسمت‌های هوایی گیاه است. اجزا فعال اندام هوایی شامل مشتقات کافییک اسید فرولیک و پلی‌ساکاریدها است. در جداول ۱-۱ ترکیبات چربی دوست ریشه گیاه سرخارگل گونه purpurea و در جدول ۱-۲ ترکیبات موثر گونه angustifolia که با استفاده از دستگاه GC-MS اندازه گیری شده نشان داده شده است. بیشترین ترکیبات چربی دوست در گونه purpurea مربوط به آلکامید در نواحی ۹ ، ۲ و ۶ دیاگرام و بیشترین مقدار ترکیبات موثر در گونه angustifolia مربوط به tetradecanone، trans-9-teradecenyl، 4-hexadecenal 6-yne- و 6-hexadecenal بوده است(Morrazoni *et al*., 2005; Dahui et al., 2011) .

جدول ۱-۱: آنالیز کمی و کیفی برخی از ترکیبات چربی دوست ریشه گیاه سرخارگل گونه *Echinacea purpurea* با استفاده از دستگاه(GC-MS Xu *et al* 2008)

شماره پیک	زمان بازداری	ترکیبات موثره	میانگین(٪)*(±S.D)
۱	۶/۷۰	B-caryophyllene	۱/۵۷ (۰/۱۳)
۲	۷/۰۵	1,8-Pentadecadiene	۰/۴۶ (۰/۰۳)
۳	۷/۲۰	1,8,11- Pentadecadiene	۰/۲۲(۰/۰۲)
۴	۷/۴۰	Germacrene D	۹/۶۳(۰/۷۰)
۵	۹/۸۲	Germacrene-4-01	۲/۰۳(۰/۰۵)
۶	۱۵/۱۹	Alkamide 2	۱۹/۴۳(۰/۸۹)
۷	۱۶/۲۴	Alkamide 1	۲/۱۴(۰/۱۸)
۸	۱۶/۶۶	Alkamide 10	۰/۷۰(۰/۰۶)
۹	۱۶/۸۶	Alkamide 11	۰/۶۶(۰/۰۵)
۱۰	۱۷/۲۰	Alkamide 5	۱/۳۳(۰/۰۸)
۱۱	۱۷/۸۲	Alkamide 9	۲۹/۳۷(۰/۱۳)
۱۲	۱۸/۱۲	Alkamide 8/9 derivative	۲/۳۶(۰/۱۲)
۱۳	۱۸/۳۲	Alkamide 8	۱۵/۰۷(۰/۴۰)
۱۴	۱۹/۴۲	Alkamide 6	۰/۴۰(۰/۰۲)
۱۵	۱۹/۶۷	Alkamide 4	۳/۴۸(۰/۱۷)
۱۶	۲۰/۶۷	Alkamide 3	۶/۷۷(۰/۲۵)
۱۷	۲۳/۲۷	Alkamide 7	۴/۶۸(۰/۳۰)
۱۸	۸/۸۸	Propylparaben (internal standard)	

* میانگین و انحراف معیار (تعداد نمونه = ۵ عدد)

جدول ۱-۲ : مقایسه ترکیبات موثر ریشه گیاه سرخارگل گونه *Echinacea angustifolia*

شماره پیک	زمان بازداری	ترکیبات موثره	میانگین(٪)*(±S.D)
۱	۹/۷۵	(R)6-undecanone	۱/۲۱ (۰/۲۳)
۲	۱۱/۸۷	(R)2-undecanone	۱/۱۴ (۰/۱۷)
۳	۱۳/۴۹	(M)8-oxo-2-nonenal	۳/۱۷(۰/۰۹)
۴	۱۴/۱۹	(M)trans-5-dodecenal	۲/۳۴(۰/۱۸)
۵	۱۵/۷۴	(M)trans-9-teradecenyl	۶/۱۱(۱/۵۵)
۶	۱۶/۱۶	(R)1-pentadecenal	۳/۲۵(۰/۶۱)
۷	۱۶/۳۱	(M)2-tridecanone	۱/۲۳(۰/۵۹)
۸	۱۷/۱۳	(M)2,4-dodececadienal	۳/۱۴(۰/۰۶)
۹	۱۷/۶۱	(M)2,4-dodecadienal	۴/۲۳(۰/۲۴)
۱۰	۱۸/۷۸	A-methyl phenyl ethyl carbonyl acetate	۳/۱۷(۰/۲۶)
۱۱	۲۰/۹۹	(M)2-tetradecanone	۷۹/۱۲(۶/۱۲)
۱۲	۲۱/۵۱	(R)cyclopentadecanone	۸/۱۳(۲/۳۴)
۱۳	۲۲/۵۱	(Z)-4-hexadecenal -6-yne	۴/۵۲(۰/۶۳)
۱۴	۲۲/۸۸	(E)-6-hexadecenal	۴/۱۸(۰/۱۲)
۱۵	۲۴/۹۹	(E)-cyclodododecenal	۵/۲۱(۰/۲۳)
۱۶	۲۶/۵۶	Methyl-cis-15-tetracosenoate	۶/۷۷(۰/۵۸)

مطالعات انجام گرفته در خصوص فعالیت ضد میکروبی حاکی از آن است که بسته به ترکیبات تولید شده از قسمتهای مختلف گیاه، اثرات ضدمیکروبی آن نیز متفاوت می باشد. ترکیباتی نظیر اکیناکوزید و مشتقات Polyacetylenic اثرات ضد میکروبی ضعیفی در شرایط آزمایشگاه نشان دادند. عصاره الکلی ریشه سرخارگل دارای اثرات ضد قارچی بر علیه کاندیدا آلبیکنس و ساکارومیسس بوده است. این اثر عمدتا ناشی از Ketoalkenes و Ketoalkynes می‌باشد. عصاره هیدروفیلیک ریشه، فعالیت ضد ویروس بسیار قوی در شرایط آزمایشگاه داشته است (Morrazoni *et al*., 2005; Dahui *et al*., 2011).

۲-۱-گیاه گون

گون با نام علمی Astragalus gummifer از خانواده Leguminosae خانواده نخود است. گیاهی است چند ساله، بوته مانند و دارای ساقه ی چوبی با برگ هایی مرکب از برگچه های متعدد که این برگ ها اکثرا فرد می باشند.

گونه های مختلف گون که کتیرا از آن ها تولید می شود دارای گل هایی به رنگ های صورتی، قرمز، آبی، بنفش، زرد و یا سفید هستند. گلها به صورت مجتمع، خوشه یا سنبله مانند بوده و گاهی در محور ساقه قرار دارند.

در نقاط مختلف ایران گونه های زیادی از گون وجود دارد که از بعضی آنها کتیرا به دست می آید. مهم ترین گونه های مولد کتیرا شامل *Astragalus adscendens* است که در نواحی کوهستانی جنوب غربی ایران، خوزستان و لرستان می روید؛ هم چنین گونه *Astragalus brachycalyx* را می توان نام برد که در نواحی کردستان وجود دارد؛ گونه های *Astragalus brachycalyx* ، Astragalus *microcephalus*، *Astragalus kurdicus* ، *Astragalus virus* و *Astragalus gymnocladus* از دیگر گونه های گون مولد کتیرا در ایران هستند مطالعات توسط Block و Mead (۲۰۰۳) نشان داد که عصاره گیاه گون دارای اثرات مفید بر وضعیت سیستم ایمنی انسان داشته که می توان به موارد ذیل اشاره نمود:

۱- تحریک سلولهای سفید خونی

عصاره گون باعث تحریک تکثیر سلولهای سفید خونی (WBC) شده و در نتیجه شرایط بهتری در برابر عفونتهای میکروبی فراهم شده و بدن مقاومت بیشتری در برابر این گروه از عفونتها نشان می دهد. APS موجود در عصاره گیاه گون باعث تحریک گلبولهای سفیدو همچنین افزایش فعالیت لنفوسیتهای گروه T می شوند. مطالعات نشان داد که به دنبال مصرف عصاره گون سیستم ایمنی تا ۳ روز در بهترین شرایط خود قرار داشته و این وضعیت برای بیمارانی که تحت شیمی درمانی قرار می گیرند حائز اهمیت می باشد.

۲- افزایش سلولهای پایه مغز استخوان و بافت لنفاوی

از اثرات سودمند عصاره گون می توان به افزایش سلولهای پایه مغز استخوان و بافت لنفاوی اشاره نمود. سلولهای پایه توانایی تغییر به انواع سلولهای دفاعی بدن را دارا می باشند. با مصرف منظم عصاره گون تعداد این

سلولها افزایش یافته در نتیجه تنوع سلولهای دفاعی بدن بیشتر می شود. سلولهای ریشه ای بعد از تحریک توسط عصاره های گون تکثیر یافته و بعد از بلوغ به انواع سلولهای ایمنی تبدیل شده و در نتیجه سیستم ایمنی را قوی و فعال نگه می دارند.

۳-کمک به تحریک طحال

عصاره گون باعث افزایش فعالیت طحال می شود.

٤-افزایش تولید مولکولهای پیام بر برای هورمونها

مولکولهای پیام بر جزء اجزای کلیدی بدن بوده و با ارسال پیام های مختلف به سیستم ایمنی به آنها اخطار ورود یک باکتری یا ویروس را داده تا عملیات لازم به منظور حذف آن میکروب بهتر فراهم گردد. با مصرف عصاره گون ثابت شده که مولکولهای پیام بر با کارآیی بالاتری عمل کرده و با ترشح بیشتر به تقویت سیستم ایمنی کمک می نمایند. مطالعه Hudson و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در خصوص اثرات ضد ویروسی ریشه ۳ گونه از گیاه گون خصوصا گونه *membranaceus* به عنوان یک داروی گیاهی جهت تقویت سیستم ایمنی انسان حدود ۲۰۰۰ سال در کشور چین مورد استفاده قرار می گیرد. آنالیز ریشه گون حاکی از آن است که این گیاه دارای پلی ساکاریدها، مونوساکاریدها، فلاوونوئید، آلکالوئید، کولین، بتائین ، فولیک اسید، اسیدهای آمینه مختلف ، موکوتین، صمغ، سلولز و عناصر کمیاب مثل سلنیوم، روی وآهن می باشد. برخی از مواد مذکور نظیر پلی ساکاریدها، اسیدهای آلی، آلکالوئیدها، گلوکوزیدها و روغنهای فرار باعث افزایش عملکرد سیستم ایمنی می شوند. پلی ساکاریدهای ریشه گون (APS) از اجزاء فعال ریشه گیاه می باشند. نقش این گروه از مواد در تقویت سیستم ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی توسط Shan و همکارانش (۲۰۰۰) مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته و به خوبی ثابت شده که این گروه از مواد جزء مواد تحریک کننده سیستم ایمنی بوده و باعث تقویت عملکرد سلولهایی نظیر سلولهای T , B و NK و همچنین ماکروفاژها می شوند. در سلولهای ماکروفاژی موش، APS باعث افزایش بیان ژن سیتوکینهایی نظیر اینترکولین ۱، ۶ و TNFa شده و تولید اکسید نیتریک از سلولهای ماکروفاژی باعث بیان ژن اکسیدنیتریک سنتتاز می شود. مطالعات انجام شده توسط Matkowski و همکارانش در سال ۲۰۰۳ نشان داد که ترکیبات مختلف ایزوفلاونوئیدی و فنلی در ریشه گیاه گون گونه membranaceus وجود داشته که از مهمترین آنها میتوان به کالیکوزین گلیکوزید (7-O- β -D glucoside) ، 7-O-β-D-glucoside6- O- malonate ، ononoin ، 3 Hydroxy- 9-10-dimethyle petrocapane ، 3-D-β-glucoside ، کالیکون ، فرمانونتین ، فومانونتین اشاره نمود. ماکزیمم مقدار ۳/۰۴ میلی گرم / گرم بوده است. بیشتر ماده در اندامهای هوایی گیاه گون مربوط به ترکیبات فلاوونوئیدی با غلظت ۳/۵۴ میلی گرم در گرم وزن خشک بوده در حالیکه مقدار این ترکیبات در ریشه ۰/۴۹ میلی گرم / گرم بوده است. آنالیز اندامهای هوایی گیاه گون نشان داد که ترکیباتی نظیر فلاوونول

آگلی کون، کورستین، ایزورامنتین و کامفرول بیشترین مقدار را دارا می باشند جداول ۱-۳ و ۱-۴) Matkowski (.*et al*., 2003; Li *et al*., 2009)

جدول ۱-۳: برخی از ترکیبات فرار در مرحله رشد و نمو برگ در چهار گونه از گون

Compound	*A. glycyphyllos*	*A. hamosus*	*A. cicer*	*A. spruneri*
Alcohols (total)	۳/۴	۰	۱۳/۴	۵
1-Butanol	–	–	۲/۱	–
2,3-Butanediol	–	–	۰/۱	–
1,3-Butanediol	–	–	۱/۸	–
3-Hexen-1-o1	۱/۱	–	۲/۶	۳/۵
2-Hexen-1-o1	–	–	۳/۰	–
1-Hexanol	۰/۱	–	۰/۱	–
1-Octen-3-o1	۰/۱	–	۳/۶	–
3- Ethyl-4-methylpentan-1-o1	۰/۱	–	–	–
Benzyl alcohol	۰/۷	–	–	–
Eugenol	–	–	۰/۱	–
2-Methoxy-4-vinyl phenol	۱/۳	–	–	۱/۵
Aldehydes	۰/۲	۰	۰	۰
Nonanal	۰/۱	–	–	–
Decanal	۰/۱	–	–	–
Ketones	۰/۷	۰	۰	۰
3- Methyl-2(2-pentenyl)-2-cyclopenten-1-one	۰/۷	–	–	–
Acids	۱	۰/۳	۰	۰
Nonanoic acid	–	۰/۱	–	–
Tetradecanoic acid	۰/۶	۰/۱	–	–
Pentadecanoic acid	۰/۳	–	–	–
Hexadecanoic acid	۰/۱	۰/۱	–	–
Esters	۳/۹	۲/۱	۰/۱	۰/۳
3-Hexen-1-o1 acetate	۱/۱	–	–	۰/۱
2,3-Butanediol diacetate	–	–	۰/۱	–
Hexadecanoic acid methyl ester	۰/۱	–	–	۰/۱
(18:1)-Methyl ester	۲/۷	–	–	۰/۱
Glycerol tricaprylate	–	۲/۱	–	–

Ethers	۰	۰	۴/۳	۹/۴
2- Ethoxybutane	–	–	۴/۱	۱/۶
1- Ethoxybutane	–	–	۰/۱	–
1,1- Diethoxyethane	–	–		۷/۷
Hydrocarbons	۲۵/۹	۱۴/۹	۱/۲	۰
Heptane	–	۰/۱	–	–
Heptadecane	۰/۱	–	–	–
Octadecane	۰/۱	–	–	–
Nonadecane	۰/۳	۰/۱	–	–
Eicosane	۰/۷	–	–	–
Docosane	۱/۲	–	–	–
Pentacosane	۲/۹	–	۰/۱	–
Hexacosane	۲/۶	۲/۱	–	–
Heptacosane	۲/۹	۳/۹	۱/۱	–
Octacosane	۲/۶	۲/۱	–	–
Nonacosane	۳/۳	۳/۲	–	–
Triacontane	۱/۷	–	–	–
Dotriacontane	۱/۱	–	–	–
Hentriacontane	۱/۶	–	–	–
Docosene	–	۳/۴	–	–
Squalene	۳/۹	–	–	–
Aromatic hydrocarbons	۰/۱	۰	۰	۰
Phenanthrene	۰/۱	–	–	–
Terpenes	۱۲/۱	۱۰/۱	۰/۱	۰/۹
Linalool	۰/۳	–	–	–
2-Terpineol	۰/۱	–	–	–
Geraniol (Nerol)	۲/۷	–	–	–
Hexahydrofamesyl acetone	۰/۵	۰/۱	–	–
Phytol	۸/۵	۱۰/۰	۰/۱	۰/۹
Others	۰/۱	۰	۰	۱/۴
Isobutyl-isothiocyanate	–	–	–	۱/۳
2,3-Dihydro benzofurane	۰/۱	–	–	۰/۱

جدول ۱-٤: برخی از ترکیبات فرار در مرحله گل دهی در چهار گونه از گون

Compound	*A. glycyphyllos*	*A. hamosus*	*A. cicer*	*A. spruneri*
Alcohols (total)	0	1/5	0/7	0/1
l)-Butanediol	–	1	-	-
2)-Butanediol	–	0/2	–	-
2- Hydroxy-6.10-dimethyl-5.9-undecadien	–	–	0/1	-
2-Methoxy-3-(2-propenyl) phenol	–	–	0/6	-
2-Phenyl phenol	–	0/3	–	0/1
Aldehydes	0/2	0/7	0/2	0/1
Hexanal	–	0/2	-	
Heptanal	–	–	-	0/1
Nonanal	0/1	0/3	0/1	-
Decanal	0/1	0/2	0/1	-
Acids	0	18/1	0	6/2
Octanoic acid	–	0/3	-	-
Butanedioic acid	–	0/2	-	-
Nonanoic acid	–	0/3	-	0/1
Decanoic acid	–	0/2	-	0/1
Dodecanoic acid	–	0/8	-	0/1
Tetradecanoic acid	–	–	-	0/1
Hexadecanoic acid	–	16/3	-	5/8
Ethers	0	0/1	0	0
2-Ethoxybutane	–	0/1	-	-
Esters	3/7	0/2	0/4	0
Hexanedioic acid ethylhexyl diester	3/7	0/1	-	-
Hexadecanoic acid hexadecyl ester	–	0/1	-	-
Isopropyl myristate	–	–	0/2	-
Hexadecanoic acid methyl ester	–	–	0/2	-
Amines	0/1	0	0/1	0
N-Butyl-1-butanamine	0/1	–	0/1	-
Amides	0	0/4	0/1	0
N.N-Dibutyl-formamide	–	0/4	0/1	-
Halogenated compounds	0	0	0/1	0/7
1)- Dichloro- 2- propanone	–	–	-	0/1

1)- Dichloro- 2- propanol	–	–	0/1	0/6
Hydrocarbons	21/1	26/1	44/6	22
Heptane	–	0/3	-	-
Cyclotetradecane	1/1	–	-	-
Pentadecane	–	0/3	-	0/1
Hexadecane	0/1	–	0/2	-
Heptadecane	–	–	0/2	-
4.11-Dimethyl pentadecane	–	–	-	0/4
Octadecane	1/2	–	0/3	0/1
Nonadecane	1/4	0/1	0/7	0/7
Eicosane	1/3	1/7	0/1	1/4
Heneicosane	3/1	–	2/1	-
2-Methyl eicosane	–	–	-	0/1
Docosane	3/2	–	2/6	-
Tricosane	–	–	5/8	-
Tetracosane	–	1/9	0/6	-
Pentacosane	4/1	4/2	7/3	0/2
Hexacosane	1/9	۰/۲	0/5	1/6
Heptacosane	3/8	5/3	6/6	5/5
Octacosane	–	2/2	-	1/8
Nonacosane	–	0/8	-	7/2
Triacontane	–	0/1	-	0/1
Hentriacontane	–	–	-	0/1
Dotriacontane	–	–	3/4	-
Squalene	–	–	4/3	-
Terpenes	26/1	6/3	3/2	1/4
Linalool	0/1	–	0/1	-
Hexahydrofarnesyl acetone	–	3/2	0/5	1/4
Phytane	–	–	0/3	-
Phytol	0/26	3/1	2/3	-

۳-۱- سیستم ایمنی در ماهیان

در بین گروههای مختلف ماهیان، مطالعه بر روی ایمونولوژی ماهیان استخوانی به دلیل اهمیت اقتصادی و منبع غذایی بودن آنها از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد (Scapigliati *et al*., 2002).

ایمنی در ماهیان همانند سایر مهره داران به دوصورت ایمنی ذاتی (غیر اختصاصی) و ایمنی اختصاصی ظاهر می‌شود.

سیستم ایمنی اختصاصی شامل لنفوسیت‌ها و فراورده‌های آنها مانند پادتن می‌باشد. پاسخ‌های ایمنی اختصاصی بر اساس اجزاء شرکت‌کننده در پاسخ به دو گروه زیر تقسیم بندی می‌شوند.

۱) پاسخ‌های ایمنی هومورال که با واسطه مولکول‌هایی درخون شکل می‌گیرند که مسئول شناسائی اختصاصی پادگن ها و انهدام آنها می‌باشند و پادتن نام دارند که بروزشان با واسطه لنفوسیت B انجام می‌گیرد.

۲) پاسخ‌های ایمنی سلولار یا با واسطه سلولی که با واسطه لنفوسیتهای T ایجاد می‌شود.

ایمنی ذاتی دارای دو خصوصیت مهم می‌باشد که شامل توانایی محدود آن در تمیز میکروبهای مختلف و دیگر ماهیت تکراری و بدون تنوع آن می‌باشد. بدین معنی که در برابر اکثر عوامل عفونی به شکل واحد و یکنواختی رفتار می‌کند(Abbas *et al*., 2000).

اجزاء اصلی سیستم ایمنی ذاتی در ماهیان شامل سدهای فیزیکی و شیمیایی، پروتئینهای خون (سیستم کمپلمان) و ماکروفاژها می‌باشند.

۱-۳-۱-سیستم کمپلمان

سیستم کمپلمان یک سیستم بیوشیمیایی پیچیده و چند جزئی است که پروتئین‌های اختصاصی را به سطح میکروبی متصل می‌کند. این پروتئینها می‌توانند ارگانیسم‌های مهاجم را منهدم کنند. این سیستم نیز نقش ایمنی ذاتی را به عهده دارد. سیستم کمپلمان یا با حضور پادتن روی سطح ارگانیسم و یا توسط ساختمان‌های کربوهیدراتی روی سطح ارگانیسم‌ها فعال می‌شود. سیستم کمپلمان جزء اساسی دفاع بدن است. پروتئین‌هایی که سیستم کمپلمان را تشکیل می‌دهند، با عدد و پیشوند C مشخص می شوند البته بعضی از اجزاء را با حروف الفبا نامگذاری می کنند. سیستم کمپلمان دست کم ۱۹ جزء دارد که همگی پروتئین های سرمی هستند. اجزاء کمپلمان در سراسر بدن در اندام های مختلف ساخته می‌شوند.

از بین اجزای سیستم کمپلمان C_3 و C_4 از بقیه مهمترند. فعال‌شدن C_3 یا C_4 نه تنها باعث جداشدن پپتید از این پادتن می‌شود، بلکه پیوند استری بین سیستئین و گلوتامین را می‌شکند. این امر موجب اتصال پادتن به سطح سلول هدف می‌گردد. C_3 توسط سلولهای کبدی و ماکروفاژها ساخته شده و بیشترین غلظت سرمی را در میان اجزای کمپلمان دارد. برای پیشرفت آبشار کمپلمان فعال‌شدن C_3 ضروری است.

C_4 نیز توسط ماکروفاژها ساخته می‌شود و دومین میزان غلظت مربوط به این جزء، از سیستم کمپلمان می‌باشد (تیرزاد، ۱۳۸۳).

IgM-۱-۳-۲

IgM توسط طحال، عقده های لنفاوی و مغز استخوان ساخته و ترشح می‌شود و ایمونوگلوبولین غالب در پاسخ ایمنی اولیه می‌باشد. مولکولهای IgM جزء ایمنی اختصاصی محسوب می‌شوند و به دلیل اندازه بزرگشان معمولاً در جریان خون محصورند(تیرزاد، ۱۳۸۳).

در سالهای اخیر با توجه به شدت بروز پاسخ ماهیان نسبت به عوامل استرس‌زا اقدام به بهگزینی ماهیان به منظور اهلی سازی و استفاده از انواع محرک‌های سیستم ایمنی و پروبیوتیکهای طبیعی می‌شود.

٤-۱-استرپتوکوکوزیس

۱-٤-۱- پراکنش جهانی استرپتوکوکوزیس

آلودگی استرپتو کوکی در سطح وسیعی از جهان گزارش شده است و به عنوان یکی از مهمترین بیماریها در آبزی پروری در آفریقای جنوبی وایتالیا (Elder,1999)است که سبب مرگ و میر بالا (حتی بیش از ۷۵٪)می شود(Elder،1999). همچنین گزارشهایی از بروز این بیماری در کشورهای ژاپن، تایوان، کانادا، بحرین، استرالیا و چین نیز وجود دارد(Agnew and Barnes, 2007).

استرپتوکوکوزیس در ابتدا در تعداد زیادی از مزارع پروش قزل آلای رنگین کمان در ژاپن گزارش شد. سپس این بیماری گسترش یافت و در Yellow tail ها بروز پیدا کرد و در آزاد ماهی کوهو،Jacopever(Sebastes schlegeli)، مار ماهی ژاپنی، ماهی آیو و تیلاپیا نیز شناسایی شد (Austin and Austin،1987).

این بیماری همچنین با نام چشم برآمده (pop-eye) در مزارع پرورش قزل آلای رنگین کمان در استرالیا،ایتالیا و آفریقای جنوبی دیده شده است(Austin and Austin،1993).

یک همه گیری از این بیماری در کشور کویت در بین ماهیان Red Sea bream و کفال گزارش شده(Evans *et al*،2000) و نیز در خلیج چیساپیک(Baya *et al*، 1990) در ایالت متحده امریکا اتفاق افتاده است. در ایران نیز این بیماری در ماهیان قزل آلای رنگین کمان در استان مازندران (Ghiasi, و همکاران , 2000)، در استان فارس (اخلاقی و همکاران، ۱۳۸۱)و ماهی هامور در استان خوزستان(مظلومی ،۱۳۸۲) بروز یافته است.

۲-٤-۱- ماهیان حساس به استرپتوکوکوزیس

استرپتوکوکوزیس در بسیاری از گونه های ماهیان دریایی (Colorni *et al*., 2002; Elder, 1999) و ماهیان آب شیرین (Floyd *et al*., 2002)، ماهیان پرورشی و ماهیان وحشی (Baya *et al*., 1990; Colorni *et al*., 2002) گزارش شده است. اسامی این ماهیان در جدول ۱-۵ آمده است.

جدول ۱-۵- ماهیان حساس به استرپتوکوکوزیس

نام ماهی	نام علمی ماهی	باکتری	منبع
Sea bream	*Sparus auratus*	*Streptococcus agalactia*	Evans *et al.*,2000
Rainbow shark	*Epalzeorhynchos erythrurus*	*Streptococcus iniae*	Russo *et al.*,2006
سیچلیدهای آفریقایی	*Ninbochromis sp*	*Streptococcus iniae*	2002 Yanong and floyd,
Yellow tail	*Seriola quinqueradiata*	*Streptococcus dysgalactiae*	Kusuda *et al.*,1976
کروکر آتلانتیک	*Micropogon undulates*	*Streptococcus SP.*	Baya *et al.*,1990
Blue fish	*Pomatomus saltatrix*	*Streptococcus SP.*	Baya *et al.*,1990
Golden shiner	*Notemigonous chrysoleuca*	*Streptococcus SP.*	Baya *et al.*,1990
گربه ماهی دریایی	*Arius felis*	*Streptococcus SP.*	Baya *et al.*,1990
منهادن	*Brevoortia patronus*	*Streptococcus SP.*	Baya *et al.*,1990
Pin fish	*Lagodon rhomboids*	*Streptococcus SP.*	Baya *et al.*,1990
Stingray	*Dasyatis sp*	*Streptococcus SP.*	Baya *et al.*,1990
باس راه راه	*Moron saxatilis*	*Streptococcus SP.*	Baya *et al.*,1990
Spot	*Leiostomus xanthurus*	*Streptococcus SP.*	Baya *et al.*,1990
قزل آلای دریایی	*Cynoscion regalis*	*Streptococcus SP.*	Baya *et al.*,1990
قزل آلای نقره ای	*Cynoscion nothus*	*Streptococcus SP.*	Baya *et al.*,1990
کفال مخطط یا خاکستری	*Mugil cephalus*	*Streptococcus SP.*	Baya *et al.*,1990
ماهی آیو	*Plecoglossus altivelis*	*Streptococcus iniae*	Agnew and Barnes,2007
ماهی آزاد آماگو	*Oncorhynchus rhodurus*	*Streptococcus iniae*	Agnew and Barnes, 2007
Barramundi	*Lates calcarifer*	*Streptococcus iniae*	Agnew and Barnes, 2007
Black marget	*Anisotrenus sp*	*Streptococcus iniae*	Agnew and Barnes, 2007
Puffer fish	*Arothron hispidus*	*Streptococcus iniae*	Agnew and Barnes,2007
Snapper	*Ocyunus chrysurs*	*Streptococcus iniae*	Agnew and Barnes, 2007
Parrot fish	*Sparisoma aurofrenatum S.viridae*	*Streptococcus iniae*	Agnew and Barnes, 2007
کفشک ژاپنی	*Paralichthys olivaceus*	*Streptococcus iniae*	Agnew and Barnes, 2007
Pearl danio	*Danio albolineatus*	*Streptococcus SP.*	Russo *et al.*,2006
دلقک ماهی	*Botia macracanthus*	*Streptococcus SP.*	Russo *et al.*,2006
Rosy barb	*Barbus conchonius*	*Streptococcus SP.*	Russo *et al.*,2006
Brramundi cod	*Cromileptes altivelis*	*Streptococcus iniae*	Agnew and Barnes, 2007
Gold spot cod	*Epinephalis tauvina*	*Streptococcus iniae*	Agnew and Barnes, 2007
Rabbit fish	*Siganus sp*	*Streptococcus iniae*	Agnew and Barnes, 2007
قزل آلای رنگین کمان	*Oncorhynchus mykiss*	*Streptococcus SP.*	Agnew and Barnes, 2007

۳-٤-۱- عوامل باکتریایی استرپتوکوکوزیس در ماهیان :

گونه های مختلف باکتریها از جنس های *Vagococcus Lactococcus , Entrococcus* و *Streptococcus* می توانند عامل بروز استرپتوکوکوزیس باشند(جدول ۱-۶) (Floyd *et al*., 2002).

جدول ۱-٦: باکتریهای عامل استرپتوکوکوزیس در آبزی پروری

-Enterococcus faecalis	(Austin and Austin ,1987)
-Enterococcus faecium	(Austin and Austin ,1987)
–Streptococcus dysgalactia	(Austin and Austin ,1987)
Streptococcus equisimilis	(Austin and Austin ,1999)
Streptococcus pyogenes	(Austin and Austin ,1999)
Streptococcus zooepidermicus	(Austin and Austin ,1999)
Lactococcus garvieae=Enterococcus seriolicida	(Austin and Austin ,1999)
–Streptococcus milleri	(Austin and Austin ,1999)
–Streptococcus parauberis	(Austin and Austin ,1999)
–Streptococcus difficilis	(Austin and Austin ,1999)
–Vagiciccus salmoninarum	(Yanong and Floyd,2002)

٤-٤-۱- استرپتوکوکوس (*Streptococcus*)

باکتریهای کروی یا تخم مرغی شکل گرم مثبت که به صورت جفت یا زنجیره ای دیده می شوند. قطر آنها ۰/۵ تا ۲ میکرو متر بوده و بدون تحرک، بدون تشکیل اسپور ،اکسیداز و کاتالاز منفی، هوازی اختیاری، شیمیوارگانو تروف و نیازمند به محیط غذایی غنی جهت رشد و گاه ۵٪CO2 هستند. متابولیسم تخمیر کننده دارند و لاکتوز تولید می کنند اما گاز تولید نمی کنند. معمولا به گلبولهای قرمز حمله میکنند و هر دو همولیز αوβدر آنها دیده می شود. در دمای ۲۵-۴۵ درجه سانتی گراد رشد کرده اما حرارت بهینه ۳۷ درجه سانتی گراد است.از لحاظ F,O/F/glucose (Fermentative) هستند و از لحاظ تبدیل و کاهش نیترات، منفی هستند.

این ارگانیسم ها غیر اسید– فست اند و درصد سیتوزین + گوانین در DNA آنها برابر ۴۶- ۳۴ مول می باشد(سلطانی ۱۳۸۰).

برخی گونه های استرپتوکوک محتوی آنتی ژنهای پلی ساکارید ویژه ای هستند که به گروه های مشخص (گروه های لانسفلید)، بر اساس حضور این گروه های آنتی ژنی مخصوص (گروه های O,A ,B ,C ,D ,E ,F ,G ,H ,K ,L ,M ,N) طبقه بندی می شوند. کد گروهی های B و D لانسفیلد در ماهیان بیمار گزارش شده است. گروه استرپتوکوکوس D، کلنی هایی شبیه استافیلوکوکس تولید می کنند (Austin and Austin , 1999).

بهترین مشخصه برای تشخیص استرپتوکوکس فعالیت تجزیه گلبولهای قرمز خون (Hemolytic) است. بطوریکه سویه های مختلف می تواند β- hemolytic , α- hemolytic و یا غیر همولیز باشند این اطلاعات نیز اشاره به یکسان نبودن عوامل بیماریزا می کند . اگر چه برخی مانند *streptococcu agalactiae* می تواند هم سویه β- hemolytic , a- hemolitic را داشته باشند. و با این حال مشخصه های زیادی در اکثر عوامل بیماریزای ماهی به صورت یکسان است اگر چه تفاوتهایی نیز در گروه های مختلف وجود دارد(Austin and Astin,1999).

گونه های زیادی از استرپتوکوکوس می توانند در ماهی بیماریزا باشند اما اطلاعات کافی برای تعیین اینکه کدامیک از گونه های استرپتوکوکوس دارای بیماریزایی بیشتری است وجود ندارد(Floyd *et al*., 2002).

در زمان های مختلف، استرپتوکوکوس عامل بیماریزای ماهی میتواند متفاوت باشد پس می توان فرض کرد که استرپتوکوکوزیس سندرمی است که به وسیله بیش از یک گونه باکتری بوجود می آید. البته تفاوتهای جغرافیایی نیز در آن موثرند که در نقاط مختلف جهان گونه های متفاوتی عامل ایجاد بیماری هستند (Eldar , 1999).

-علائم کلینیکی و آسیب شناسی ناشی از استرپتوکوکوزیس

ماهیان مبتلا ممکن است یک یا بیشتر از یک علامت را نشان دهند، با توجه به گونه ماهی این علائم شامل: شنای نامنظم (چرخش یا مارپیچی) از دست دادن تعادل، بیحالی، تیرگی پوست، بیرون زگی یا دو طرفه چشم، کدورت قرنیه، خون ریزی داخل یا اطراف چشم ها، صفحه آبششی، پایه باله های شکمی و مخرجی، بالای سر و یا جاهای دیگر بدن، آب آوردگی شکم و زخم، در برخی موارد ممکن است که ماهی قبل از مرگ علائم آشکاری را نشان ندهد (Floyd *et al*., 2002; Sako 1998; Shoemaker *et al*., 2001).

معمولاً جراحات همراه خونریزی به تدریج بزرگ و زخمی شده و مواد نکروتیک ترشح می نمایند. این نوع جراحات دارای یک ناحیه تیره در اطراف خود می باشند این گونه جراحات در مقایسه با جراحات ناشی از فرونکلوزیس و ویبرویوزیس سطحی تر هستند (سلطانی ، ۱۳۸۰).

ناحیه قدامی ساقه دمی در قسمت پشتی، سرپوش آبشش، اطراف دهان و نواحی زیر سرپوش آبشش از جمله مناطقی است که به طور متداول مبتلا به زخم های مذکور می شوند. بعلاوه جراحات ناحیه مخرجی نیز متداول است که باله مخرجی را نیز در بر می گیرد.

در بسیاری از گونه های ماهی، چشم ها به میزان زیادی مبتلا می شوند. و جراحات اولیه چشم محدود به اگزوفتالمی است که ناشی از پر خونی در پشت کره چشم و ادم ناحیه است و این وضعیت معمولاً منجر به آماس همراه با نفوذ سلولی و نکروز مشخص شده و عصب بینایی و مشیمیه را نیز در بر گرفته و به داخل حدقه چشم نیز گسترش می یابد. بتدریج پرخونی و خونریزی عروق شبکه ای اتفاق افتاده، نکروز عدسی چشم و حتی خروج مواد نکروتیک بواسطه زخم قرنیه ادامه می یابد (فولر، ۱۳۸۰).

آبشش ها دچار خونریزی همراه با نفوذ ماکروفاژ ها، نکروز بافت آبششی و خونریزی وسیع شده که منجر به مرگ می شود (سلطانی ، ۱۳۸۰).

علائم داخلی ممکن است حضور مایع خونی کم رنگی را در محوطه شکمی نشان دهد، بزرگ و قرمز شدن طحال، رنگ پریدگی کبد و تا اندازه ای التهاب در اطراف قلب و کلیه از دیگر علائم داخلی است. بسیاری از استرپتوکوکها، مغز و سیستم عصبی ماهی را نیز آلوده می کند به این صورت که شنای نامنظم مکرر در ماهی های آلوده به استرپتوکوکوس مشاهده می شوند (Floyd *et al*., 2002).

دستگاه گوارش نیز ممکن است پر خون شده و همراه با کنده شدن میزان قابل توجهی از بافت مخاطی باشد. اندامهای اصلی احشایی مبتلا به ترتیب عبارتند از طحال و کبد و با درجه کمتر قلب و کلیه، کبد معمولاً کمرنگ و حاوی مناطق فراوانی از نکروز کانونی است در حالی که طحال بزرگ و دارای لبه های گرد و به رنگ قرمز گیلاسی می باشد. بیشترین قسمت بافت خونساز طحالی منهدم شده و دیوارهای مویرگی طحال (Ellipsoids) کاملاً مشخص، متورم و معمولاً حاوی تعدادی سلولهای باکتریایی است. اغلب قلب پریکاردیت واضحی را نشان می دهد. حفره صفاقی قلب متسع همراه با اکسودای سروزی خونی کم رنگ بوده که به ندرت دارای ترکیبات فیبرینی و در نتیجه چسبندگی هایی می باشند (سلطانی، ۱۳۸۰).

در کوسه سیاه دم قرمز مبتلا به این بیماری علائمی نظیر سیاه شدن پوست و بی حالی و سستی جزء اولین علائم بیماری است. خونریزی در پهلوی های شکمی بدن، روی سر و پا باله سینه ای و شکمی مشاهده می شود. بیرون زدگی چشم در تعداد کمی از این نوع کوسه ها (در حدود ۱۰٪) مشاهده می شود. کوسه های در حال مرگ حالت شنای چرخشی را نشان می دهند. مشاهدات بافت شناسی در این ماهی، نفوذ گلبولهای سفید به منطقه روده ای، طحال و قسمتهای ابتدایی کلیه و مغز را نشان می دهد. انعقاد و نکروز بافتها در همان اندامها و نیز تخریب لوله های کلیه ای نیز مشاهده می شود (Russo *et al*., 2006).

Russo و همکاران (2006)، تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) و گربه ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*) را در شرایطی آزمایشگاهی به صورت غوطه وری به *streptococcus*آلوده می کردند و برای افزایش آلودگی، سطح جانبی بدن ماهیان را از قبل برای اینکه در معرض باکتری قرار بگیرند ، پاره کردند که کدورت چشم و خونریزی چشم را در برخی تیلاپیا ها دیده شد.

بافت شناسی این ماهیان، منتژیت، التهاب قلب، کبد، طحال، تخمدان وکلیه را نشان می دهد. و گرانولوم کمی در طحال، کلیه و تخمدان برخی از تیلاپیا ها دیده شد.

در گربه ماهی کانالی آلوده همان مشکلات چشم تیلاپیا دیده شد. مشکلات بافت شناسی ایجاد شده در گربه ماهی کانالی شاملMeningoencophalitis، تورم کم قلب، تورم طحال و تورم تخمدانها بوده اما خیلی سخت و طاقت فرسا نبودند.

در Red drum مبتلا به استرپتو کوکوزیس بی حالی، بیرون زدگی چشم،آسیب دیدگی پوست ونکروز تارهای عضلانی، مشخص ترین علائم ابتلا به این بیماری بوده است (Elder, 1999).

Yellow tailها نیز جراحاتی در کبد ، کلیه، طحال، روده و نیز تجمع مایعات شکمی در حفره صفاقی را نشان می دهند.

-تلفات و ضرر اقتصادی ناشی ازاسترپتوکوکوزیس

عفونتهای استرپتوکوکی می تواند سبب مرگ و میر بالایی (بیش از ۵۰٪)طی یک دوره ۳ تا ۷ روزه (Floyd *et al.*, 2002)، و گاه حتی بیش از ۷۵ ٪ شود (Elder،1999).

ضرر اقتصادی حاصله از تنها گونه *Streptococcus iniae* در آبزی پروری بیش از ۱۰۰ میلیون دلار در سال تخمین زده شده است (Xu et al., 2008) .

۵-۱- مروری بر مطالعات انجام شده

در مطالعه دیگری که توسط علیشاهی و همکاران (۱۳۸۸) انجام گرفت مشخص شد که عصاره گیاه درواش دارای اثرات تحریک ایمنی می‌باشد که باعث تقویت تولید پادتن در ماهی واکسینه شده می‌گردد و تولید پادتن‌های سرمی را در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) تحریک می‌کند. لذا استفاده از آن قبل و بعد از واکسیناسیون ماهی‌ها و در مواقع شیوع بیماری در مزارع پرورش ماهی توصیه می‌گردد.

شجیعی و همکاران (۱۳۸۸) در بررسی اثر گیاه سیر بر برخی از صفات خونی (گلبول سفید و انواع آن) در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با دوزهای ۰/۳، ۰/۴۵و ۰/۶ گرم پودر گیاه سیر به ازای غذای مصرفی روزانه در دو دوره زمانی ۱۵ روزه منقطع در شرایط تنش به این نتیجه رسیدند که بین تعداد گلبول‌های سفید، لنفوسیت‌ها و نوتروفیل‌های گروه شاهد افزایش معنی‌دار مشاهده شد.

وهاب‌زاده رودسری و همکاران (۱۳۸۸) در بررسی تاثیر پری بیوتیک واناگن بر شاخص‌های رشد قزل‌آلای رنگین کمان نتیجه‌گیری کردند که اضافه کردن آن به جیره بچه ماهیان سبب تحریک سیستم ایمنی، مقاومت بیشتر در برابر عفونت‌های ویروسی، باکتریایی و حتی انگلی شده و نیز مقاومت در برابر تنش را افزایش داده و کارآیی واکسیناسیون را بهبود می‌بخشد که نهایتاً افزایش رشد، بقاء، افزایش وزن و ضریب تبدیل غذایی را سبب می‌گردد.

Dugenci و همکاران در سال ۲۰۰۳ در بررسی اثرات چند گونه گیاه دارویی بر سطح ایمنی ماهی قزل‌آلا به این نتیجه رسیدند که عصاره گیاهانی نظیر درواش (*Viscum album*)، گزنه (*Urtica dioica*) و زنجبیل (*Zingiber officinale*) سبب افزایش سطح ایمنی در بدن ماهی می‌گردد. اثر عصاره این گیاهان بر صفات مختلفی نظیر فاگوسیتوز در لکوسیت‌های خون، فعالیت‌های تنفس بین سولی و درون سلولی، سطح پروتئین پلاسمای خون و

سرعت رشد ویژه (SGR) بین گروه‌های آزمایشی و شاهد مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. در گروه ماهی قزل‌آلای تغذیه شده با پودر عصاره آبی زنجبیل، صفات ایمنولوژی مورد بررسی در مقایسه با شاهد افزایش یافت و بیشترین سطح پروتئین‌های پلاسما از گروه تغذیه ماهی با عصاره ۱ درصد زنجبیل به دست آمد.

نتایج تحقیقات Morazzoni و همکاران (۲۰۰۵) نشان داد که عصاره هیدرواتانولی گیاه سرخارگل حاوی دو ماده اکیناکوزید (وزن مولکولی بالاتر با بیشتر از ۴٪) و ایزوبوتیل آمید با غلظت کمتر از ۰/۱٪ بوده و به دنبال استفاده از عصاره های مذکور، سیستم ایمنی در موش آزمایشگاهی افزایش یافته که این مکانیسم در ارتباط مستقیم با تولید اینترفرون گاما می باشد. ازطرف دیگر عصاره گیاه سرخارگل باعث کاهش مرگ و میر ناشی از کاندیدا آلبیکنس در موش آزمایشگاهی نیز می شود.

در مطالعه انجام شده توسط Melchart و همکاران در سال ۱۹۹۸ نشان داد که استفاده از عصاره اتانولی ریشه گیاه سرخارگل گونه *angustifolia* باعث کاهش ۱۰ تا ۲۰ درصد عفونت قسمت فوقانی مجاری تنفسی می شود.

مطالعه Chaves و همکارانش در سال ۲۰۰۷ نشان داد که عصاره آبی گیاه سرخارگل گون پورپوره آ باعث افزایش تولید پادتن در موش آزمایشگاهی و همچنین افزایش فعالیت مقاومت آن نسبت به سم مار میشود.

آنها نشان دادند که گونه های *purpurea, pallida, angustifolia* سرخارگل باعث مهار ویروس های عامل آنفلوآنزا و هرپس شده و عمده تاثیر آن مربوط به متابولیت هایی نظیر آلکامیدها و مشتقات کافئیک اسید می باشد. عصاره آبی این گیاه دارای فعالیت ضد میکروبی بسیار بالایی بوده است. عصاره الکلی گونه های مور استفاده دارای اثرات مهارکننده بر ویروس هایی نظیر رینوویروس، آنفلوآنزا و هرپس ویروس می باشد.

مطالعه Soudi و همکاران در سال ۲۰۰۷ در خصوص اثرات ضد لیشمانیایی سرخارگل گونه پورپوره آ نشان داد که عصاره الکلی ریشه سرخارگل در غلظت های ۰/۵ تا ۱۲۵ میلی گرم در میلی لیتر به مدت ۳۰ دقیقه باعث از بین بردن لیشمانیا میشود. بهترین غلظت مورد استفاده برای از بین بردن این انگل، ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر بوده است.

Guanghoug و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که عصاره ترکیبی چند گیاه دارویی سنتی چینی (Qompye) فعالیت فاگوسیتوز ماکروفاژها، محتوای پروتئین پلاسمای خون، گلوبولین و لیزوزیم سرم را افزایش می‌دهد که منجر به افزایش سطح ایمنی ماهی کپور می‌شود.

نتایج آزمایشات انجام گرفته در خصوص استفاده از عصاره‌های گیاهان مختلف نشان داد که آنها قادر به کنترل بیماریهای باکتریایی و ویروسی می‌باشند. تاثیر ۱۴ گیاه بر عفونت ناشی از آئروموناس هیدروفیلا در ماهی تیلاپیا مورد ارزیابی قرار گرفته و نتایج نشان داد که عصاره الکلی *Psidium guajava* دارای بیشترین فعالیت ضد میکروبی بوده است.

در مطالعه انجام شده توسط Peddie and Secombes در سال ۲۰۰۳ از عصاره Chevimmun که ترکیبی از سه گیاه *Baptista tinctoria,Eupatorium perfoliatum,Echinacea anguistifola* بود به منظور تقویت سیستم ایمنی ماهی قزل

آلا استفاده گردید. نتایج نشان داد که عصاره سرخارگل در ترکیب با دو گیاه مورد استفاده باعث افزایش مهاجرت لوکوسیتهای محیطی، فاگوسیتوز و فعالیت انفجار تنفسی می شود.

در مطالعه انجام شده توسط Lee و همکارانش Jeon در سال ۲۰۰۵ مشخص گردید که پلی ساکاریدهای جدا شده از ریشه گیاه گون گونه *membranceus* باعث القاء تولید اکسید نیتریک (No) و نسخه برداری No سنتتاز شده و این عمل را از طریق فاکتور NF-KB/Rel انجام می دهد. تزریق APS به موش باعث تولید No از طریق ماکروفاژهای محیطی B6C3F1 می شود. APS همچنین باعث القاء تولید No در ماکروفاژهای محیطی جدا شده از موش و همچنین ماکروفاژ RAW 264-1 می شود. علاوه بر این APS باعث القاء پروتئین No سنتتاز و نسخه برداری در ماکروفاژهای RAW264-7 می شود.

در مطالعه انجام شده توسط Niu و همکارانش آنالیز ساختمانی و فعالیت پلی ساکاریدهای (APS) گیاه گون مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که APS استخراج شده از گیاه گون دارای زنجیره D گلوکزی با وزن مولکولی $۲/۰۷\times۱۰^{۴}$ دالتون می باشند. آزمایشات NMR اسپکتروسکوپی انجام شده نشان داد که APS از پیوندهای ۴-۱ ^{o} گلوکوزیدی در زنجیره اصلی و پیوند ۶-۱ ^{o} گلوکوزیدی در شاخه های فرعی (۱۰ پیوند) تشکیل شده است. APS دارای خواص آنتی اکسیدانی در برابر رادیکال های هیدروکسی و پراکسید هیدروژن و همچنین خواص غیرفعال کنندگی یونهای فریک را دارا می باشد. علاوه بر این، APS قادر به پیوند با کنو دی اکسی کولیک اسید در شرایط in-vitro می باشد. APS قادر به تحریک سلولهای β موش آزمایشگاهی بدون تحریک تکثیر سلولهای T نیز می باشد.

نتایج مطالعات Citarasu و همکاران در سال ۲۰۰۶ درخصوص بازماندگی و مقاومت میگوی ببری سیاه به بیماری لکه سفید نشان داد که بدنبال استفاده از مواد گیاهی تحریک کننده سیستم ایمنی در جیره غذایی میگو، درصد بازماندگی و همچنین مقاومت میگو نسبت به بیماری لکه سفید افزایش می‌یابد.

Rao و همکاران در سال ۲۰۰۶ از گیاه *Achyranthes aspera* در جیره غذایی ماهی *Labeo rohita* استفاده کردند که نتایج داد که این گیاه باعث افزایش مقاومت به عفونت ناشی از آئروموناس هیدروفیلا می‌شود. نتایج مشابه در مورد ماهی تیلاپیا تغذیه شده با *Psidium guajava* (عصاره الکلی) نیز گزارش شده است.

Rao و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که تولید آنیون سوپراکسید توسط لوکوسیت‌های خونی بعد از تغذیه ماهی *Labeo rahita* با *Achyranthes aspera* افزایش می‌یابد. Ardo و همکاران در سال ۲۰۰۸ گزارش کردند که تغذیه تیلاپیا با دو عصاره گیاهی گون *Astragalus membranceus* و *Lonicera japonica* و یا ترکیب دو عصاره بطور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت فاگوسیتی و انفجار تنفسی سلول فاگوسیت خون می شوند. عصاره گیاهی همچنین باعث افزایش لیزوزیم خون نیز می‌شوند. Chen و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که لیزوزیم پلاسما در کپور تغذیه با ۴ عصاره گیاه چینی بطور معنی‌داری افزایش می‌یابد. سطح لیزوزیم پلاسما در ماهی *Labeo rahita* تغذیه شده با *Achyranthes aspera* نیز افزایش می‌یابد. مطالعات Sivaram و همکاران در سال ۲۰۰۴ حاکی

از آن است که فعالیت ضد باکتریایی سرم ماهی *Epinphelus tauvina* تغذیه شده با جیره حاوی *Ocimum sanctum* و *Withania somnifra* افزایش می‌یابد. نتایج همچنین حاکی از آنست که تحریک کننده‌های ماهی باعث افزایش عناصر هومورال در سرم می شود. مطالعات مشابه توسط Rao و همکاران ۲۰۰۶ در ماهی *Labeo rohita* تغذیه شده با جیره *Magnifera indica* باعث افزایش پارامترهای مذکور نسبت به نمونه کنترل می‌شود. از آنجائیکه پروتئین‌های سرم شامل عناصر مختلف هومورال سیستم ایمنی غیراختصاصی می‌باشد، غلظت‌های بالای پروتئین سرم، آلبومین و گلوبولین ممکن است ناشی از افزایش پاسخ ایمنی غیراختصاصی ماهی باشد.

Yuan و همکارانش در سال ۲۰۰۸، تاثیر APS بر بیان ژن های پاسخ ایمنی در ارگان هایی نظیر کبد، آبشش و طحال در ماهی کپور معمولی را مورد بررسی قرار دادند. به دنبال تزریق APS سطح mRNA اینترکولین IB در کبد افزایش داشته در حالیکه تغییرات معنی داری در آبشش و طحال مشاهده نشد.

در مطالعه دیگر ثابت شده که عصاره گون دارای تاثیرات مثبت بر سیستم ایمنی بوده و به عنوان تحریک کننده سیستم ایمنی می باشد (Yin etal 2004,Cao etal 2008).

عصاره گون به طور معنی دار باعث افزایش فعالیت فاگوسیتوزی لوکوسیتهای جدا شده از تیلاپیا در عرض ۱ هفته شده و این فعالیت در طول دوره افزایش داشته است (Yin etal 2006,Ardo etal 2008).

ماهی کپور تغذیه شده با عصاره گون دارای ماندگاری بیشتری در مقایسه با تیمارهای کنترل در برابر آئروموناس هیدروفیلا بوده است(Yin etal 2009)

تاثیر عصاره دو گیاه گون گونه *radix* و گیاه *Ganoderma lucidum* بر وضعیت سیستم ایمنی ماهی کپور و مقاومت آن در برابر باکتری آئروموناس هیدروفیلا مورد مطالعه قرار گرفته است. غلظت مورد استفاده گیاه مذکور به صورت منفرد ۰/۵٪ و به صورت ترکیبی نیز ۰/۵٪ از هر یک از عصاره های مورد استفاده بود (Yin etal., 2009).

مطالعه انجام شده توسط Yin و همکارانش در سال ۲۰۰۶ در خصوص اثر گیاه گون زیر گونه *radix* و *Scutellaria radix* بر سیستم ایمنی غیر اختصاصی ماهی تیلاپیا بوده است. نتایج نشان داد که غلظتهای بالاتر باعث تقویت سیستم ایمنی میشوند.

در مطالعه انجام شده توسط Ardo و همکارانش در سال ۲۰۰۸ در خصوص تاثیر عصاره دو گیاه گون گونه *membranaceus* و گیاه *Lonicera japonica* به صورت منفرد و ترکیبی با فلز بور بر تغییرات سیستم ایمنی ماهی تیلاپیا و مقاومت آن در برابر آئروموناس هیدروفیلا مشخص گردید که استفاده از عصاره های گیاهی به صورت منفرد (۰/۵٪) و یا ترکیبی با فلز بور (۰/۰۵٪) باعث فعالیت برخی از پارامترهای سیستم دفاع غیراختصاصی میشود.

نتایج مطالعات بیگلو و سوداگر نشان داد که عصاره‌های مورد استفاده باعث کاهش گلوکز پلاسما می‌شود. این فرآیند، احتمالاً ناشی توانایی عصاره‌های گیاهی مذکور جهت کاهش اثرات مواد استرس‌زا باشد. نتایج مطالعات

Sahu و همکاران ۲۰۰۷ و Citarasu و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داد که میزان گلوکز بعد از تغذیه با تحریک کننده‌های گیاهی کاهش می یابد.

مطالعات بیگلو و سوداگر نشان داد که تغذیه با عصاره‌های گیاهی باعث افزایش میزان هموگلوبین، تعداد گلبولهای قرمز و سفید می شود. نتایج مطالعات Sahu و همکاران نیز حاکی از افزایش WBC و RBC می باشد. مطالعه Arul و Gopulakannan در سال ۲۰۰۶ نشان داد که میزان WBC بعد از تغذیه ماهی کپور با تحریک کننده‌های گیاهی مانند کیتین بطور معنی‌داری افزایش می یابد.

نتایج مطالعات بیگلو و سوداگر نشان داد که تغذیه با عصاره‌های گیاهی مورد استفاده باعث افزایش مقاومت ماهی کپور به آئروموناس هیدروفیلا می‌شود. این امر ناشی از افزایش سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهی می باشد. نتایج مطالعات Sahu و همچنین Ardo در رویارویی با هیدروفیلا نتایج مشابه به همراه داشته است. مطالعه Pachanawan و همکاران نشان داد که عصاره الکلی برگ *Psidium guajava* باعث افزایش مقاومت ماهی تیلاپیا در برابر آئروموناس هیدروفیلا میشود.

در تحقیق انجام شده توسط علیشاهی و همکاران(۱۳۸۸) اثر چهار عصاره گیاهی که خواص ضد باکتریایی آنها در برخی عوامل بیماریزای انسانی نشان داده شده بود، بر استرپتوکوکوس اینیایی که عامل مهمترین بیماری باکتریایی صنعت آبزی پروری کشور است مورد بررسی قرار گرفت. عصاره هیدروالکلی ، اندام های هوایی گیاه اکیناسه (*Echinacea purpurea*)، دانه گیاه سیاه دانه (*Nigella sativa*) ،اندام های هوایی گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiXora*)، و خار مریم (*Silybum marianum*) تهیه گردیده و بعد از مشخص نمودن میزان ماده خشک هر عصاره، رقت های متوالی بر مبنای ۲ (از ۱۶ تا ۰/۰۳۲ میلی گرم در میلی لیتر) از آنها برای انجام آزمایشات حداقل غلظت مهار رشد(MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی(MBC) آنها در برابر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی به روش روش رقیق سازی در لوله و کشت، مشخص گردید. سپس غلظت بدست آمده برای MIC تهیه و روی دیسکهای شاهد بازگذاری گردید و به روش انتشار دیسک (DD) هاله عدم رشد نیز اندازه گیری و مقایسه شد. MIC عصاره های اکیناسه ، سیاه دانه، آویشن شیرازی و خار مریم در برابر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی به ترتیب برابر۴، ۰/۵، ۰/۱۲۵ و ۴ بود، در صورتیکه MBC این عصاره ها به تریتب برابر ۱۶<، ۱، ۰/۲۵و ۱۶< مشخص گردید. قطر هاله مهار رشد باکتری در روش DD در مورد عصاره آویشن شیرازی ۱۹ میلی متر، سیاه دانه ۱۳ میلی متر و در مورد اکیناسه ۷ و خارمریم ۹ میلی متر بود.عصاره های سیاه دانه و آویشن شیرازی دارای اثرات ضد باکتریایی در برابر این باکتری بودند ولی دو عصاره دیگر اثر ممانعت کننده رشد وباکتری کشی چندانی در برابر این باکتری نداشتند.

در تحقیق انجام شده توسط علیشاهی و همکاران(۱۳۸۹) اثر دو ماده ارگوسان و عصاره گیاه گون بر بازماندگی و فاکتورهای رشد ماهی اسکار (*Astronorus ocellatus*) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ۱۳۵ ماهی اسکار با وزن متوسط۰/۵۴±۶/۷ گرم به سه تیمار مساوی در سه تکرار (در آکواریوم های جداگانه ۵۰ لیتری) تقسیم

گردیدند(تیمار ارگوسان، تیمار گون و تیمار کنترل). خوراک بیومار مخصوص ماهیان گوشتخوار به میزان ۰/۵٪ با ماده مورد بررسی بصورت همگن مخلوط گردید. تیمار شاهد با خوراک فاقد افزودنی تغذیه گردید. تمام تیمارها به مدت ۷ هفته با خوراک های تهیه شده تغذیه گردیدند. در طول دوره تعداد تلفات تیمارهای مختلف ثبت گردید. پس از پایان تیمار ماهی های هر تیمار وزن شده و با توجه به وزن اولیه، وزن نهایی، میزان خوراک مصرف شده در هر تیمار، فاکتورهای: درصد تلفات طول دوره، درصد افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، و ضریب تبدیل غذایی در مورد هر تیمار محاسبه و مقایسه گردید. نتایج نشان داد تجویز ارگوسان باعث بهبود برخی فاکتورهای رشد در تیمار ارگوسان گردید، بطوریکه ضریب تبدیل غذایی، نرخ رشد ویژه و درصد افزایش وزن افزایش معنی داری هم نسبت به تیمار کنترل و هم نسبت به تیمار گون نشان داد. ولی درصد تلفات طول دوره (میزان بازماندگی) تفاوت معنی داری بین سه تیمار نشان نداد. در تیمارهای تغذیه شده با خوراک حاوی عصاره گون، با وجود بهبود ظاهری برخی فاکتورهای رشد، از نظر آماری تفاوت معنی داری بین هیچکدام از فاکتورهای مورد بررسی با تیمار کنترل مشاهده نگردید. لذا می توان نتیجه گرفت که تجویز خوراکی ارگوسان در ماهی اسکار بهبود نسبی فاکتورهای رشد را باعث می گردد، ولی تجویز عصاره گون برخلاف اثر تحریک رشد و ایمنی که در حیوانات خونگرم گزارش شده است، فاقد اثرات بهبود فاکتورهای رشد و افزایش مقاومت در ماهی اسکار می باشد.

در تحقیق انجام شده توسط علیشاهی و همکاران(۱۳۸۹) اثرات ضد باکتریایی عصاره های هیدروالکلی ۹ گیاه دارویی(آویشن، آلوئه ورا، اکیناسه پورپورآ، سیاه دانه، اسکوتلاریا، خارمریم، کلپوره، زیتون و پوست انار)، بر سه باکتری بیماریزای مهم ماهی (آئروموناس هیدروفیلا، یرسینیا روکری و استرپتوکوکوس اینیایی) مورد بررسی قرار گرفت. همه این عصاره ها دارای اثرات ضد باکتریایی بر برخی باکتریهای بیماریزای انسان و حیوانات خونگرم بودند. برای تعیین قدرت ضد باکتریایی عصاره ها از روش های استاندارد میکرو دایلوشن(رقیق سازی در محیط مایع)، حداقل غلظت باکتری کشی(MBC) و حداقل غلظت مهار رشد (MIC) استفاده گردید. سپس غلظت MIC هر عصاره با روش ایجاد چاهک در محیط مولر- هینتون آگار مورد استفاده قرار گرفته و قطر هاله مهار رشد هر باکتری مقایسه گردید. نتایج مشخص نمود که در بین عصاره های استفاده شده عصاره آویشن، پوست انار با میزان MIC برابر ۰/۱۲۵ میلی گرم در میلی لیتر بیشترین خاصیت ضد باکتریایی را روی باکتریهای مورد بررسی داشته ا ند، عصاره سیاه دانه، اسکوتلاریا و زیتون میزانMIC و MBC کمتر از ۲ میلی گرم در میلی لیتر در مورد سه باکتری مورد بررسی داشته، ولی بقیه عصاره ها تاثیر ضد باکتریایی چندانی در برابر این باکتریهای بیماریزای ماهی نشان ندادند. قطر هاله عدم رشد باکتری های مورد بررسی در اطراف چاهکهای حاوی هر عصاره نیز این نتایج را تایید نمود. بطور کلی می توان نتیجه گرفت که اولا حساسیت سه باکتری بیماریزای مورد مطالعه به ۹ عصاره گیاهی مورد مطالعه بسیار متفاوت می باشد و ثانیاً با توجه به اثر

مناسب عصاره آویشن و پوست انار روی این سه عامل بیماریزای ماهی، لازم است امکان استفاده از آنها در درمان و پیشگیری از بیماریهای باکتریایی ماهی ارزیابی گردد.

نتایج مطالعه انجام شده توسط Yin و همکاران در ۲۰۰۸ در خصوص استفاده از عصاره گون گونه *radix* و گیاه *Ganoderma lucidum* بصورت منفرد و ترکیبی در دوز ۰/۵ درصد در جیره غذایی ماهی کپور معمولی و واکسینه شده با آئروموناس سالمونیسیدا و آئروموناس هیدروفیلا نشان داد که فعالیت انفجار تنفسی و ماکروفاژها هم در تیمارهای واکسینه شده و هم در تیمارهای واکسینه نشده بطور معنی داری افزایش می یابد در صورتیکه میزان لیزوزیم و تیتر آنتی بادی فقط در تیمارهای واکسینه شده افزایش نشان داد.

نتایج مطالعه Turker و همکاران در سال ۲۰۰۹ در ارتباط با اثرات ضدمیکروبی عصاره اتانولی و آبی ۲۲ گیاه از جمله *Filipendula Nuphar lutea*, *Nymphaea alba*, *Stachys annua*, *Genista lydia*, *Vinca minor*, *Fragaria vesca*, *ulmaria*, *Helichrysum plicatum* علیه باکتریهایی نظیر آئروموناس هیدروفیلا، پرسینیا روکری، لاکتوکوکوس گراویه، انتروکوکوس فکالیس و استرپتوکوکوس اگالاکتیه نشان داد که بیشترین اثر ضدمیکروبی مربوط به عصاره اتانولی *Vinca minor* و عصاره آبی و اتانولی *Nuphar lutea* بوده است.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- زمان و مکان انجام تحقیق

این تحقیق از اوایل فروردین تا اواخر اردیبهشت سال ۱۳۹۱ در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر واقع در ساری انجام شد. جهت انجام کار از ۲۱ ونیرو به ابعاد ۲×۲×۰/۵ متر استفاده گردید. تعداد و میانگین وزنی ماهیان مورد استفاده به ترتیب ۴۲۰ قطعه و ۱۶ گرم (دمای آب ۴۰-۲۰ درجه سانتی گراد)و تعداد ماهی در هر ونیرو ۲۰ قطعه بوده است.

۲-۲- مواد

۲-۲-۱- مواد مصرفی و غیر مصرفی

غذای ماهی، باکتری استرپتوکوکوس اینیایی، محیط کشت های بلاد آگار، محیط کشت تریپتیک سوی براث و آگار، بافر فسفات، محلول تترامتیل پارافنیلن دآمین هیدروکلراید، آب مقطر، اسید سولفوریک، سرم بیوشیمیایی، لام هموسیتومتر،لامل، کریستال ویوله، محلول ید، استون، محلول هپارین، اتانول، رنگ گیمسا، روغن امرسیون، سرنگ ۵ میلی لیتر، کیت آلبومین، هگزان، اتانول، عصاره‌های دو گیاه سرخارگل و گون

۲-۲-۲- وسایل و دستگاهها:

فریز درایر، روتاری ، انکوباتور یخچال دار، آون، لومینومتر، اتوآنالایزر، حوضچه فایبرگلاس، پمپ هوا، ساچوک، دستکش، ارلن، پیپت، قیچی، پنس، اسکالپل، اتوکلاو، انکوباتور معمولی، فور، سانتریفوژ، یخچال

۳-۲- غذا دهی

به منظور تغذیه ماهی قزل آلا از غذای کنسانتره تجاری استفاده شده که در این تحقیق از خوراک اکسترود قزل آلای پرواری استفاده گردید که آنالیز این خوراک در جدول زیر آمده است :

جدول۲-۱- آنالیز خوراک اکسترود قزل آلا ی پرواری

خوراک اکسترود قزل آلای ۲ 150-300gr	FFT1 trout
تاریخ تولید	۱۳۹۰/۹/۲۱
بهترین تاریخ مصرف	۶ ماه پس از تولید
پروتئین درصد)	۴۰±۱
انرژی قابل هضم(کیلو کالری بر کیلوگرم)	۴۳۰۰
فیبر خام	۳>
رطوبت(درصد)	<۱۰
خاکستر	۱۲ >

این غذا حاوی پودر ماهی، کنجاله سویا، گندم، روغن ماهی، روغن گیاهی، گلوتن گندم، پرمیکس ویتامین، پرمیکس مواد معدنی و مکمل ها می باشد.

میزان غذادهی با توجه به دمای آب و وزن ماهی ۲-۱/۵ درصد وزن ماهی بوده و میزان غذادهی براساس فاکتورهای ذکر شده، از روی جدول زیر تعیین گردید.

جدول ۲-۲- میزان غذادهی با توجه به دمای آب و وزن ماهی

وزن ماهی	زیر۰.۱۸	۰.۱۸	۱.۰	۵	۱۲	۲۳	۴۰	۶۲	۹۱	۱۴۳	بیش از
		تا۱.۰	تا۵	تا ۱۲	تا ۲۳	تا ۴۰	تا ۶۲	تا ۹۱	تا ۱۴۳	تا ۲۰۰	۲۰۰گرم
دمای آب سانتی گراد	زیر ۲.۰ cm	۲.۰-۵	۵-۷.۰	۷.۰-۱۰	۱۰-۱۲.۰	۱۲.۰-۱۵	۱۵-۱۷.۰	۱۷.۰-۲۰	۲۰-۲۲.۰	۲۲.۰-۲۵	۲۵ cm
۵	۳.۳	۲.۸	۲.۲	۱.۸	۱.۴	۱.۱	۰.۹	۰.۸	۰.۷	۰.۶	۰.۵
۵.۵۵	۳.۵	۲.۸	۲.۴	۱.۸	۱.۴	۱.۲	۰.۹	۰.۸	۰.۷	۰.۶	۰.۵
۶.۱۱	۳.۶	۳	۲.۵	۱.۹	۱.۴	۱.۲	۱	۰.۹	۰.۸	۰.۷	۰.۶
۶.۶۶	۳.۸	۳.۱	۲.۵	۲	۱.۵	۱.۳	۱	۰.۹	۰.۸	۰.۸	۰.۶
۷.۲۲	۴	۳.۳	۲.۷	۲.۱	۱.۶	۱.۳	۱.۱	۱	۰.۹	۰.۸	۰.۷
۷.۷۷	۴.۱	۳.۴	۲.۸	۲.۲	۱.۷	۱.۴	۱.۲	۱	۰.۹	۰.۸	۰.۷
۸.۳۳	۴.۳	۳.۶	۳	۲.۳	۱.۷	۱.۴	۱.۲	۱	۰.۹	۰.۸	۰.۷
۸.۸۸	۴.۵	۳.۸	۳	۲.۴	۱.۸	۱.۵	۱.۳	۱.۱	۱	۰.۹	۰.۸
۹.۴۴	۴.۷	۳.۹	۳.۲	۲.۵	۱.۹	۱.۵	۱.۳	۱.۱	۱	۰.۹	۰.۸
۱۰	۵.۲	۴.۳	۳.۴	۲.۷	۲	۱.۷	۱.۴	۱.۲	۱.۱	۱	۰.۹
۱۰.۵۵	۵.۴	۴.۵	۳.۵	۲.۸	۲.۱	۱.۷	۱.۵	۱.۳	۱.۱	۱	۰.۹
۱۱.۱۱	۵.۴	۴.۵	۳.۶	۲.۸	۲.۱	۱.۷	۱.۵	۱.۳	۱.۱	۱	۰.۹
۱۱.۶۶	۵.۶	۴.۷	۳.۸	۲.۹	۲.۲	۱.۸	۱.۵	۱.۳	۱.۱	۱.۱	۱
۱۲.۲۲	۵.۸	۴.۹	۳.۹	۳	۲.۳	۱.۹	۱.۶	۱.۴	۱.۳	۱.۱	۱
۱۲.۷۷	۶.۱	۵.۱	۴.۲	۳.۲	۲.۴	۲	۱.۶	۱.۴	۱.۳	۱.۱	۱
۱۳.۲۲	۶.۳	۵.۳	۴.۳	۳.۳	۲.۵	۲	۱.۷	۱.۵	۱.۳	۱.۲	۱
۱۳.۸۸	۶.۷	۵.۵	۴.۵	۳.۵	۲.۶	۲.۱	۱.۸	۱.۵	۱.۴	۱.۲	۱.۱
۱۴.۴۴	۷	۵.۸	۴.۸	۳.۶	۲.۷	۲.۲	۱.۹	۱.۶	۱.۴	۱.۳	۱.۲
۱۵	۷.۳	۶	۵	۳.۷	۲.۸	۲.۳	۱.۹	۱.۷	۱.۵	۱.۳	۱.۲
۱۵.۵۵	۷.۵	۶.۳	۵.۱	۳.۹	۳	۲.۴	۲	۱.۷	۱.۵	۱.۴	۱.۳
۱۶.۱۱	۷.۸	۶.۵	۵.۳	۴.۱	۳.۱	۲.۵	۲	۱.۸	۱.۶	۱.۴	۱.۳
۱۶.۶۶	۸.۱	۶.۷	۵.۵	۴.۳	۳.۲	۲.۶	۲.۱	۱.۸	۱.۶	۱.۵	۱.۴
۱۷.۳۲	۸.۴	۷	۵.۷	۴.۵	۳.۴	۲.۷	۲.۱	۱.۹	۱.۷	۱.۵	۱.۴
۱۷.۷۷	۸.۷	۷.۲	۵.۹	۴.۷	۳.۵	۲.۸	۲.۲	۱.۹	۱.۷	۱.۶	۱.۵
۱۸.۳۳	۹	۷.۵	۶.۱	۴.۹	۳.۶	۲.۹	۲.۲	۲	۱.۸	۱.۶	۱.۵
۱۸.۸۸	۹.۳	۷.۸	۶.۳	۵.۱	۳.۸	۳	۲.۳	۲	۱.۸	۱.۶	۱.۶

٤-۲- آماده سازی عصاره دو گیاه سرخارگل و گون

گیاهان مورد استفاده در این تحقیق عصاره گیاه سرخارگل *(Echinacea purpurea)* و عصاره گیاه گون (*Astragalus sp*) بوده است.

۱-٤-۲- روش کار استخراج پلی ساکاریدهای گیاه گون (APS) (*Astragalus sp.*)

APS گیاه گون از ریشه با استفاده از آب داغ (۱۰۰ گرم ریشه + ۶۰۰ میلی لیتر آب داغ) با قرار دادن در بن ماری ۸۰ درجه به مدت ۲ ساعت جدا شد. مایع رویی با استفاده از روتاری تحت فشار پایین و در دمای ۵۰ درجه تغلیظ و فیلتر شد. پروتئینهای فیلتر شده با استفاده از معرف sevag جدا شده و عمل شستشو با معرف مذکور ۳ بار انجام شد. بعد از خارج نمودن معرف sevag ، عصاره به دست آمده با ۳ برابر حجم اتانل ۹۵٪ در ۴ درجه به مدت ۸ ساعت مخلوط شده و بعد از آن عمل سانتریفوژ در دور ۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. پلی ساکارید خام به دست آمده در آب مقطر حل شده و در نهایت در شرایط خلا و انجماد خشک (Freeze Drying) شده و پودر آن در غلظتهای مشخص به منظور غنی سازی غذای ماهی استفاده شد(Niu *et al* ., 2011).

برای تهیه معرف sevage از n-butanul: chloroform به نسبت ۱:۴ استفاده گردید.

۲-٤-۲- استخراج عصاره الکلی سرخارگل (*Echinacea purpurea*)

به پودر آسیاب شده گیاه سرخارگل مقداری الکل ۷۵ درصد اضافه شده و سپس در دکانتور ریخته شد. مدت نگهداری در دکانتور ۲ تا ۳ روز در نظر گرفته شد. سپس عمل فیلتر کردن با باز کردن شیر دکانتور انجام شده و با افزودن الکل ۷۵ درصد به دکانتور عمل فیلتر کردن ادامه یافته تا استخراج بطور کامل انجام گیرد. عصاره نهایی در حمام بخار قرار داده شده تا فرآیند تغلیظ به تدریج صورت گرفته و حجم به ۱/۳ حجم اولیه برسد. در نهایت عصاره بدست آمده در شرایط خلا و انجماد خشک شد(Morrazoni *et al*., 2005).

۲-۵-اضافه کردن نمونه عصاره گیاهان سرخارگل و گون به جیره :

در این مطالعه از عصاره دو گیاه سرخارگل و گون، ۳ غلظت از هر گیاه و با ۳ تکرار استفاده شده که با در نظر گرفتن نمونه شاهد، در مجموع ۲۱ تیمار مورد بررسی قرار گرفت.

عصاره گیاهان سرخارگل و گون به ترتیب با سه غلظت ۰/۵، ۱ و ۱/۵ و ۲ ، ۳ و ۵ گرم بر کیلوگرم به غذای مورد نظر اضافه گردید. پس از اضافه نمودن عصاره ها، به مخلوط حاصله مقداری روغن گیاهی اضافه شده و کاملا مخلوط گردید. طول دوره آزمایش ۶۰ روز بوده و آزمایشات ایمونولوژی و هماتولوژی در ماههای اول و دوم انجام شده و از هر تیمار، ۳ ماهی (برای هر غلظت ۹ ماهی) مورد آزمایش قرار گرفت.

٦-۲- ارزیابی شاخص های ایمنی شناسی و بیوشیمیایی

در این بررسی شاخص های ایمنی شناسی شامل اجزاء کمپلمان (C3 و C4)، انفجار تنفسی (تولید رادیکال آزاد اکسیژن) و فعالیت لیزوزیم سرم و نیز شاخص های بیوشیمیایی خون شامل پروتئین تام سرم، گلوکز و آلبومین مورد ارزیابی قرار گرفت.

– ارزیابی IgM تام و اجزا کمپلمان (C3 وC4)

ارزیابی این عوامل با استفاده از کیت تجاری (شرکت پارس آزمون، ایران) و دستگاه اتوآنالایزرانجام گردید (1999وهمکاران Johnson ; Shahsavani و همکاران2010).

– ارزیابی فعالیت لیزوزیم سرم

اندازه گیری لایزوزیم سرم از طریق جذب نوری و با استفاده از دستگاه بیوفتومتر (Germanyحذف انجام پذیرفت. برای انجام این کار ابتدا لازم بود دستگاه در OD600 تنظیم شود. برای تنظیم کردن دستگاه ابتدا دکمه OD600 را فشار می دهیم. داخل کووت بافر PBS ریخته و در داخل دستگاه قرار می دهیم و دکمه Blank را فشار می دهیم. صفحه نمایش باید عدد 00.00 را نشان دهد. سپس ۰/۳۷۵ گرم از باکتری *Micrococcus lysodeikticus* را در یک میلی لیتر بافر PBS حل می کنیم. از این سوسپانسیون داخل چاهک ریخته و در OD600 دستگاه باید 0.900 را نشان دهد. ۱۷۵ میکرو لیتر از محلول باکتری را با ۲۵ میکرولیتر از سرم مخلوط و در OD600 بعد از ۱۵ و ۱۸۰ ثانیه قرائت گردید و بعد از آن OD در طول موج ۶۰۰ در مقابل شاهد PBS قرائت گردید. جهت بدست آوردن مقدار لیزوزیم نیاز به نمونه استاندارد و رسم منحنی استاندارد بود که به این منظور غلظتهای ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶میکرو گرم در میلی لیتر لایزوزیم سفیده تخم مرغ (Sigma) در بافر PBS تهیه و از هر رقت ۲۵ میکرولیتر با ۱۷۵ میکرو لیتر سوسپانسیون باکتری مخلوط و در OD ۶۰۰ بعد از ۱۵ و ۱۸۰ ثانیه میزان جذب قرائت گردید(Ellis ۱۹۹۰).

– ارزیابی انفجار تنفسی(اندازه گیری میزان رادیکال آزاد اکسیژن)

برای سنجش رادیکال های آزاد اکسیژن مراحل به شرح ذیل بود:

الف – آماده سازی نمونه

۱ – ۰/۵ میلی لیتر از خون هپارینه با محلول هنکس تا ۰/۱ حجم اولیه رقیق گردید

I – تهیه محلول هنکس

(Merck, Germany) Nacl	۸۰ گرم/لیتر
(Merck, Germany) Kcl	۴ گرم/لیتر

(Merck, Germany) Glucose	۱۰ گرم/لیتر
(Merck, Germany) KH_2PO_4	۶۰۰ میلی گرم/لیتر
(Merck, Germany) $Na_2HPO_4 . H_2O$	۹۰۰ میلی گرم/ لیتر

بعد از تهیه محلول، pH محلول با استفاده از محلول هیدرواکسید سدیم (NaOH) ۰/۱ نرمال در ۷/۶ تنظیم شد. محلول فوق بعنوان نمونه اولیه بوده و در زمان استفاده با آب مقطر استریل به میزان ۰/۱ رقیق شد.

II – تهیه محلول لومینول با فرمول زیر

(Germany ,Merck) KOH	۰/۷۸ گرم
(Germany ,Merck) Boric acid	۰/۶۱۸ گرم
(Sigma,USA) (5-amino-2, 3-dihydro-1, 4-pathalazinedione) Luminol	۱۴ میلی گرم
آب مقطر	۱۰ میلی لیتر

III – تهیه محلول ردامین با غلظت 10^{-4} مول با فرمول زیر

(Germany ,Merck)(C28H31ClN2O3) Rhodamin	۰/۰۰۴۷ گرم
آب مقطر	۱۰۰ میلی لیتر

ب - انجام آزمایش

هر چاهک میکرو پلیت مورد استفاده برای هر نمونه در آزمایش حاوی ۲۰۰ µ L خون رقیق شده، ۱۰۰ µL محلول لومینول و ۱۰۰ µL محلول ردامین بود. پس از قرار دادن نمونه ها در چاهک میکروپلیت بلافاصله در محل خود در دستگاه Luminoscan Ascent (Thermo, Finland) قرار گرفته و دستگاه روشن گردید. مدت زمان آزمایش هر مرحله برای ۶۳ نمونه های قزل آلا ۶۴/۲۶ دقیقه بود(Mathews, 1990).

–ارزیابی فاکتورهای بیوشیمیایی

ارزیابی شاخص های بیوشیمیایی خون شامل پروتئین تام سرم، گلوکز و آلبومین با استفاده از کیت تجاری (کیت تجاری شرکت پارس آزمون، ایران) و دستگاه اتوآنالایزر(اتریش، Eurolyser)انجام گردید(Whicher, Shahsavani ; 1996 و همکاران ۲۰۱۰)

۷-۲- شمارش افتراقی گلبول های سفید Differential cell count :

برای شمارش انواع گلبول های سفید، پس از تهیه گسترش از خون با روش گیمسا گستره تهیه شده از خون پس از فیکس کردن با متانل رنگ آمیزی گردید(رنگ گیمسا با رقت ۱/۱۰ تهیه شده از نمونه اولیه بمدت ۱۵ دقیقه) و پس از خشک کردن، یک قطره روغن سدر روی گستره قرار داده شده و با عدسی ۱۰۰، صد عدد گلبول سفید به تفکیک، شمارش و بر حسب درصد گزارش گردید(طبرستانی،۱۳۹۰).

۸-۲- مواجهه سازی

پس از انجام آزمایشات میکروبی و اطمینان از عدم آلودگی ماهیان مورد بررسی به باکتری استرپتوکوکوس اینیایی، جهت انجام این فرآیند ابتدا از نمونه اولیه و خالص باکتری استرپتوکوک سوسپانسیون اولیه تهیه و پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه و رساندن باکتری به رشد لگاریتمی، با لوله ۳ مک فارلند مورد مقایسه قرار گرفت. برای این کار PBS (بافر فسفات) استفاده گردید تا رقت های مورد نیاز تهیه و با لوله ۳ مک فارلند مورد مقایسه قرار گیرد (Rodas *et al*.,2002). پس از یکسان شدن کدورت دو لوله مک فارلند و سوسپانسیون میکروبی، رقت ۰/۱ از آن تهیه و تزریق به ماهیان قزل آلای رنگین کمان ۰/۱ میلی لیتر به صورت داخل صفاقی انجام شد و ماهیان مورد آزمایش به مدت ۱۴ روز مورد بررسی قرار گرفتند. غلظت باکتری جهت تزریق به ماهیان، لگاریتم ۶ در نظر گرفته شد.

غذادهی ۲۴ ساعت قبل از تزریق باکتری قطع شده و پس از آن باکتری مورد نظر در لگاریتم مشخص تزریق گردید. پس از بروز علائم بیماری بین ۱۰-۷ روز، از ارگانهای مختلف نظیر کبد، کلیه و قلب با استفاده از روش Austin(۱۹۸۷) نمونه گیری شده و کشت در محیطهای تخصصی انجام و پس از انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه به مدت ۴۸ ساعت، وجود یا عدم وجود کلنی های مشکوک استرپتوکوکوس اینیایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای تعیین میزان بازماندگی ماهیان در مواجهه با باکتری بیماریزای استرپتوکوک از فرمول زیر استفاده گردید:

بازماندگی = تعداد ماهیان باقیمانده / تعداد کل ماهیان اولیه × ۱۰۰

۹-۲- تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده ها ابتدا از آزمون شاپیرو ویک Shapirowilk به منظور آزمون نرمال بودن داده ها استفاده شده و در صورت نرمال بودن داده ها، از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه Anova جهت ارتباط معنی داری ما بین داده های هر گروه و از آزمون Duncan جهت تائید نهایی تست آنالیز واریانس استفاده گردید. وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار با ضریب اطمینان ۹۵ و ۹۹ درصد و ارزش P در محدوده ۰/۰۵ و ۰/۰۱ تعیین گردید.

۳-نتایج

۱-۳- نتایج آزمایشات ایمونولوژی و بیوشیمیایی

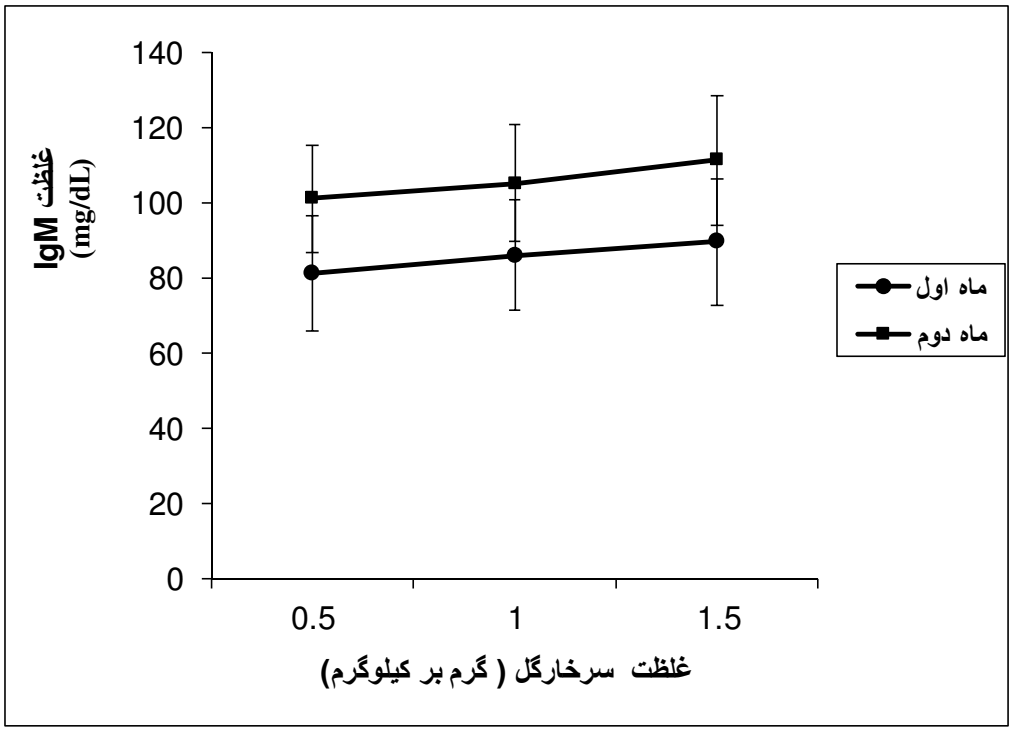
الف – سرخارگل: نتایج آزمایشات ایمونولوژی (آنتی بادی IgM، اجزاء کمپلمان C3و C4، رادیکال اکسیژن آزاد و لیزوزیم) و بیوشیمیایی (پروتئین کل، گلوکز و آلبومین) در جیره غذایی حاوی عصاره های گیاه سرخارگل در ۳۰ روز اول و دوم در جدول ۳-۱ و نمودارهای ۳-۱ تا ۳-۸ نشان داده شده است.

جدول ۳-۱: نتایج تغییرات برخی از پارامترهای ایمونولوژی و بیوشیمیایی ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه سرخارگل در ماههای اول و دوم(میانگین ± SD)

نوع فاکتور دز عصاره		IgM (mg/dL)	C3 (mg/dL)	C4 (mg/dL)	رادیکال آزاداکسیژن ($RLUs^{-1}$)	لیزوزیم (µg/mL)	گلوکز (g/dL)	پروتئین کل (g/dL)	آلبومین (g/dL)
۰/۵	ماه اول	۸۱/۳۲±۱۵/۲۳	۲۹/۶±۶/۵۲	۸/۰۴±۲/۴۷	۵۸۶/۳۶±۶۵/۲۵	۴/۳۶±۰/۳۶	۹۲/۳۴±۸/۵۵	۴/۲۴±۰/۵۶	۲/۲۷±۰/۴۱
۱		۸۶/۰۶±۱۴/۶۷	۳۳/۳۳±۵/۲۳	۸/۱۱±۲/۷۵	۵۸۵/۱۹±۵۶/۸۵	۴/۴۶±۰/۴۴	۹۵/۴۴±۷/۲۱	۴/۵±۰/۴۸	۲/۳۲±۰/۲۵
۱/۵		۸۹/۶۲±۱۶/۷۸	۳۵/۲۱±۴/۶۳	۸/۲۱±۲/۶۱	۵۹۷/۴۳±۴۵/۱۱	۴/۸۶±۰/۳۴	۹۶/۲۶±۸/۴۱	۴/۸۱±۰/۳۳	۲/۳۵±۰/۳۲
۰/۵	ماه دوم	۱۰۱/۲±۱۴/۳۵	۳۲/۵±۷/۱۱	۸/۲۹±۳/۵	۱۱۰۰/۳۸±۱۲۱/۲۵	۵/۲۴±۰/۴۴	۶۵/۲۴±۷/۴۵	۴/۱۱±۰/۵۴	۲/۱۲±۰/۳۵
۱		۱۰۵/۳۲±۱۵/۶۵	۳۴/۴۳±۶/۱۱	۸/۵۶±۲/۴۱	۱۲۱۳/۵۳±۱۵۶/۳۵	۵/۳۹±۰/۶۵	۷۴/۶۴±۸/۱۵	۴/۲۱±۰/۴۵	۲/۱۴±۰/۲۶
۱/۵		۱۱۱/۳۶±۱۷/۴۱	۳۶/۵۷±۵/۶۴	۸/۷۶±۲/۳۶	۱۳۱۵/۲۶±۲۱۴/۲	۵/۶۷±۰/۴۷	۷۵/۵۶±۹/۳۱	۴/۵۱±۰/۳۸	۲/۲۱±۰/۳۱

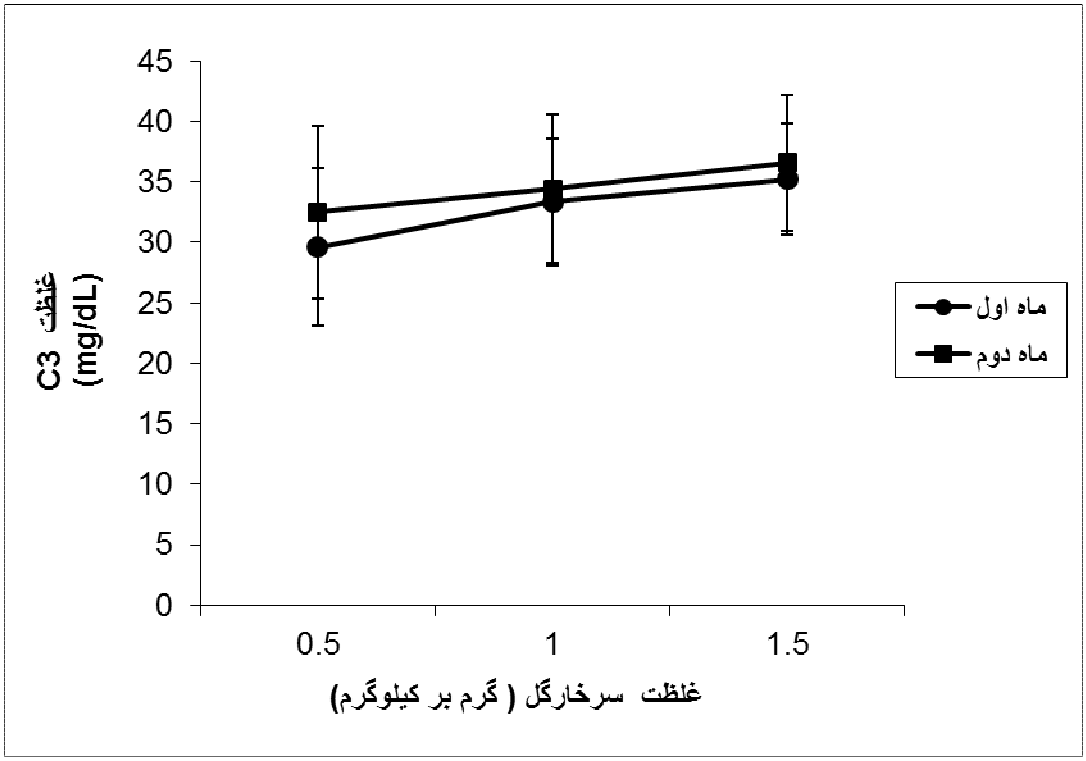
تعداد نمونه مورد بررسی برای هر تیمار= ۹ نمونه

نتایج جدول ۳-۱ و نمودار ۳-۱ نشان میدهد که که میزان آنتی بادی IgM در ماه اول بین ۸۱/۳۲ تا ۸۹/۶۲ میلی گرم در دسی لیتر در نوسان بوده که این میزان در ماه دوم بین ۱۰۱/۲ تا ۱۱۱/۳۶ بوده است. بیشترین میزان پادتن در غلظت ۱/۵ گرم بر کیلوگرم جیره مشاهده شده و بعد از آن غلظت ۱ و ۰/۵ قرار داشته اند. نتایج آنالیز آماری حاکی از عدم اختلاف معنی دار ما بین تغییرات مشاهده شده در ماه اول و دوم بوده است. همچنین آنالیز آماری نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار ما بین غلظت ۱/۵ با دو غلظت دیگر بوده است (P>0/05).



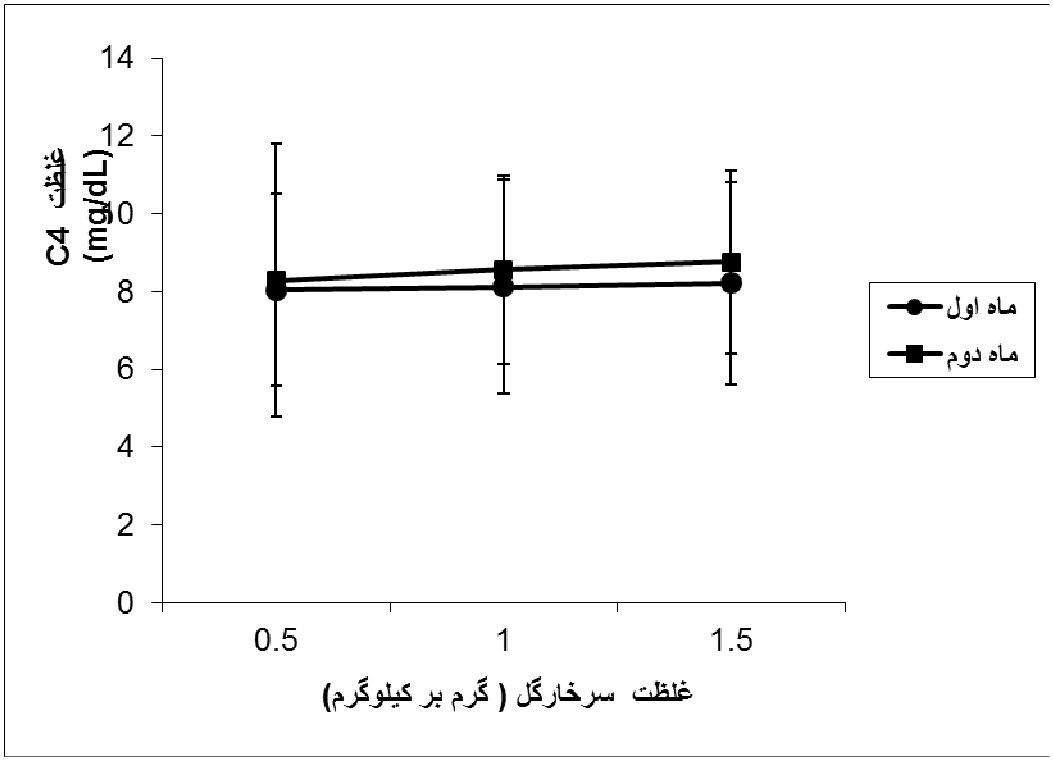
نمودار ۳-۱: نتایج تغییرات آنتی بادی IgM در ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه سرخارگل در ماههای اول و دوم

غلظت جزء C3 کمپلمان در ماه اول بین ۲۹/۶ تا ۳۵/۲۱ میلی گرم در دسی لیتر در نوسان بوده که این میزان در ماه دوم بین ۳۲/۵ تا ۳۶/۵۷ بوده است(جدول ۳-۱ و نمودار ۳-۲). بیشترین میزان C3 در غلظت ۱/۵ گرم بر کیلوگرم جیره مشاهده شده و بعد از آن غلظت ۱ و ۰/۵ قرار داشته اند. نتایج آنالیز آماری حاکی از عدم اختلاف معنی دار ما بین تغییرات مشاهده شده در ماه اول و دوم بوده است. همچنین آنالیز آماری نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار ما بین غلظت های مورد استفاده بوده است.



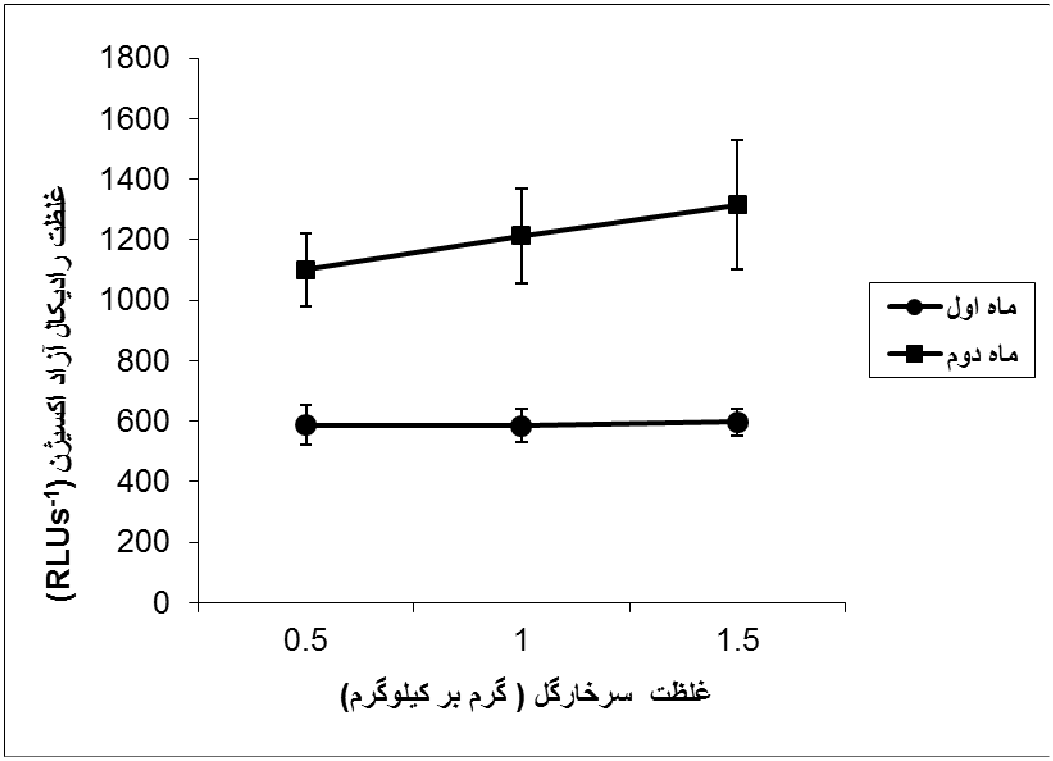
نمودار ۳-۲: نتایج تغییرات کمپلمان C3 در ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه سرخارگل در ماههای اول و دوم

مقدار جزء C4 کمپلمان در ماه اول بین ۸/۰۴ تا ۸/۲۱ میلی گرم در دسی لیتر متغیر بوده که این میزان در ماه دوم بین ۸/۲۹ تا ۸/۷۶ بوده است(جدول ۳-۱ و نمودار ۳-۳). بیشترین میزان C4 در غلظت ۱/۵ گرم بر کیلوگرم جیره مشاهده شده و بعد از آن غلظت ۱ و ۰/۵ قرار داشته اند. نتایج آنالیز آماری حاکی از عدم اختلاف معنی دار ما بین تغییرات مشاهده شده در ماه اول و دوم بوده است. همچنین آنالیز آماری نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار ما بین غلظت های مورد استفاده بوده است (P>0/05).



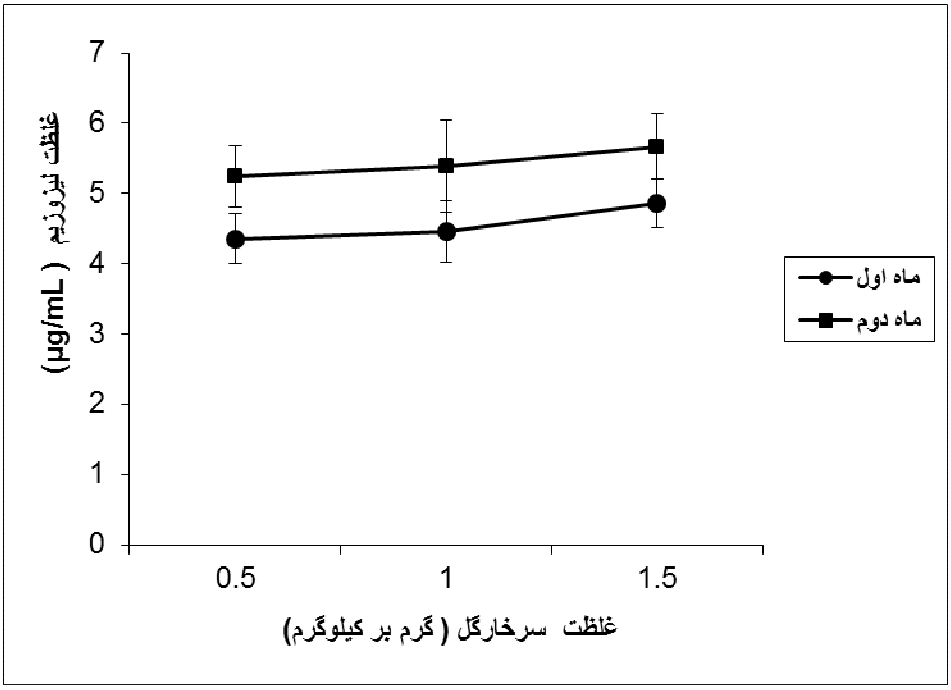
نمودار ۳-۳: نتایج تغییرات کمپلمان C4 در ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه سرخارگل در ماههای اول و دوم

نتایج جدول ۳-۱ و نمودار ۳-۴ نشان میدهد که که میزان رادیکال آزاد اکسیژن در ماه اول بین ۵۸۶/۳۶ تا ۵۹۷/۴۳ میلی گرم در دسی لیتر متغیر بوده که این میزان در ماه دوم بین ۱۱۰۰/۳۸ تا ۱۳۱۵/۲۶ بوده است. بیشترین میزان رادیکال آزاد در غلظت ۱/۵ گرم بر کیلوگرم جیره مشاهده شده و بعد از آن غلظت ۱ و ۰/۵ قرار داشته اند. نتایج آنالیز آماری حاکی از اختلاف معنی دار ما بین تغییرات مشاهده شده در ماه اول و دوم بوده است ($p<0.05$). همچنین آنالیز آماری نشان دهنده اختلاف معنی دار ما بین غلظت های مورد استفاده بوده است ($p<0.05$).



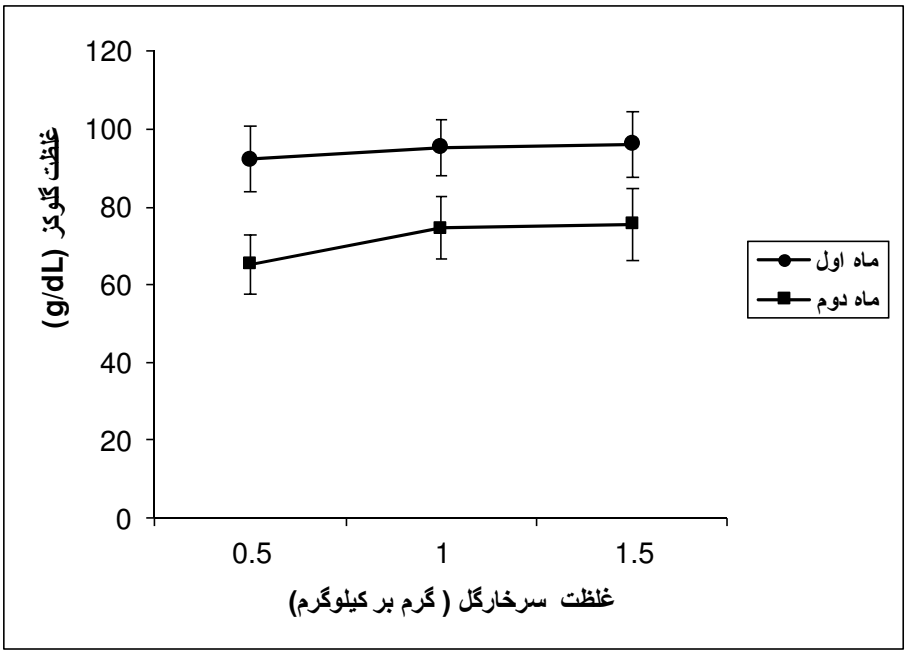
نمودار ۳-٤: نتایج تغییرات رادیکال آزاد اکسیژن در ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه سرخارگل در ماههای اول و دوم

مقدار لیزوزیم در ماه اول بین ۴/۳۶ تا ۴/۸۶ میکروگرم بر میلی لیتر متغیر بوده که این میزان در ماه دوم بین ۵/۲۴ تا ۵/۶۷ بوده است(جدول ۳-۱ و نمودار ۳-۵). بیشترین میزان لیزوزیم در غلظت ۱/۵ گرم بر کیلوگرم جیره مشاهده شده و بعد از آن غلظت ۱ و ۰/۵ قرار داشته اند. نتایج آنالیز آماری حاکی از عدم اختلاف معنی دار ما بین تغییرات مشاهده شده در ماه اول و دوم بوده است. همچنین آنالیز آماری نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار ما بین غلظت های مورد استفاده بوده است.



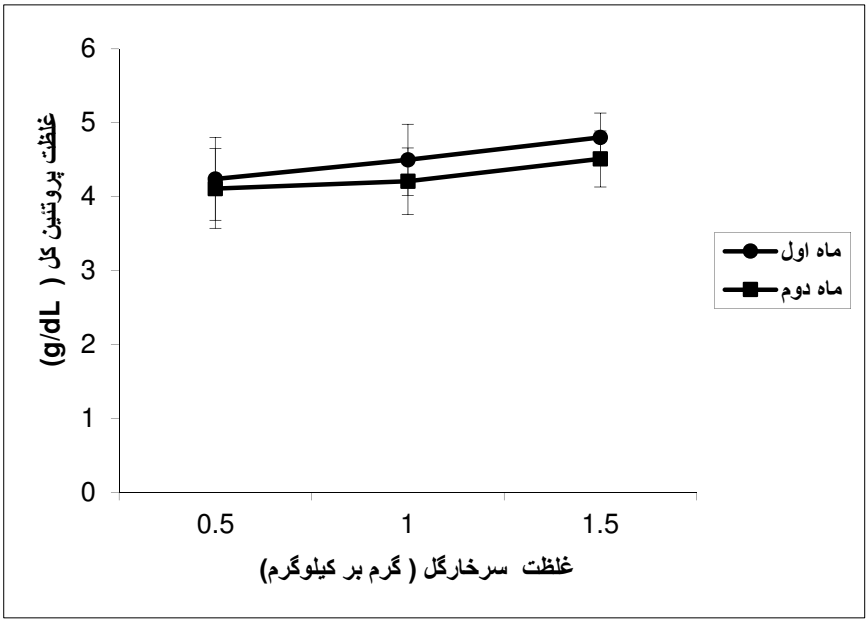
نمودار ۳-۵: نتایج تغییرات آنزیم لیزوزیم در ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه سرخارگل در ماههای اول و دوم

غلظت قند گلوکز در ماه اول بین ۹۲/۳۴ تا ۹۶/۲۶ میلی گرم بر دسی لیتر متغیر بوده که این میزان در ماه دوم بین ۶۵/۲۴ تا ۷۵/۵۶ بوده است(جدول ۳-۱ و نمودار ۳-۶). غلظت تغییرات گلوکز در ماه دوم نسبت به ماه اول کاهش داشته است . بیشترین غلظت گلوکز در غلظت ۱/۵ گرم بر کیلوگرم جیره مشاهده شده و بعد از آن غلظت ۱ و ۰/۵ قرار داشته اند. هیچگونه اختلاف معنی داری ما بین تغییرات مشاهده شده در ماه اول و دوم و همچنین غلظت های مورد استفاده وجود نداشته است($P>0/05$) .



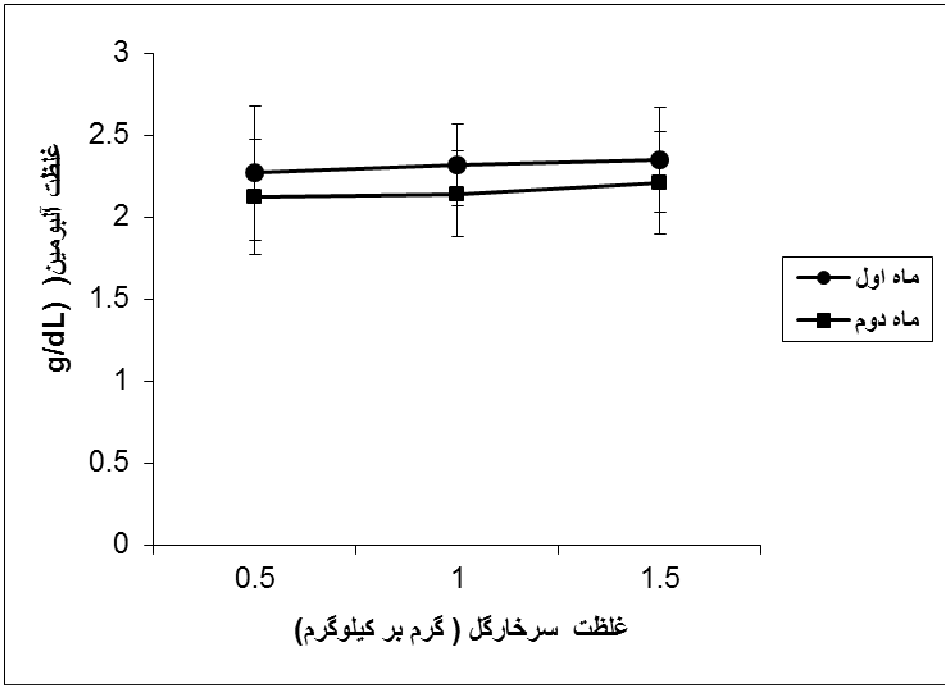
نمودار ۳-٦: نتایج تغییرات قند گلوکز در ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه سرخارگل در ماههای اول و دوم

غلظت پروتئین کل در ماه اول بین ۴/۲۴ تا ۴/۸ گرم بر دسی لیتر متغیر بوده که این میزان در ماه دوم بین ۴/۱۱ تا ۴/۵۱ بوده است(جدول ۳-۱ و نمودار ۳-۷). میزان تغییرات پروتئین کل در ماه دوم نسبت به ماه اول بطور نسبی کاهش داشته است . بیشترین میزان پروتئین کل در غلظت ۱/۵ گرم بر کیلوگرم جیره مشاهده شده و بعد از آن غلظت ۱ و ۰/۵ قرار داشته اند. هیچگونه اختلاف معنی داری ما بین تغییرات مشاهده شده در ماه اول و دوم و همچنین تغییرات در غلظت ۱/۵ با دو غلظت مشاهده نشده است (P>0/05).



نمودار ۳-۷: نتایج تغییرات پروتئین کل در ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه سرخارگل در ماههای اول و دوم

غلظت پروتئین آلبومین در ماه اول بین ۲/۲۷ تا ۲/۳۵ گرم بر دسی لیتر متغیر بوده که این میزان در ماه دوم بین ۲/۱۲ تا ۲/۲۱ بوده است(جدول ۳-۱ و نمودار ۳-۸). غلظت تغییرات آلبومین در ماه دوم نسبت به ماه اول اندکی کاهش داشته است . بیشترین غلظت آلبومین در غلظت ۱/۵ گرم بر کیلوگرم جیره مشاهده شده و بعد از آن غلظت ۱ و ۰/۵ قرار داشته اند. هیچگونه اختلاف معنی داری ما بین تغییرات مشاهده شده در ماه اول و دوم و همچنین تغییرات در غلظت ۱/۵ با دو غلظت مشاهده نشده است.



نمودار ۳-۸: نتایج تغییرات پروتئین آلبومین در ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه سرخارگل در ماههای اول و دوم

ب – گون: نتایج آزمایشات ایمونولوژی (آنتی بادی IgM، اجزاء کمپلمان C3و C4، رادیکال اکسیژن آزاد و لیزوزیم)و بیوشیمیایی (پروتئین کل، گلوکز و آلبومین) در جیره غذایی حاوی عصاره های گیاه گون در ۳۰ روز اول و دوم در جدول ۳-۲ و نمودارهای ۳-۹ تا ۳-۱۶ نشان داده شده است.

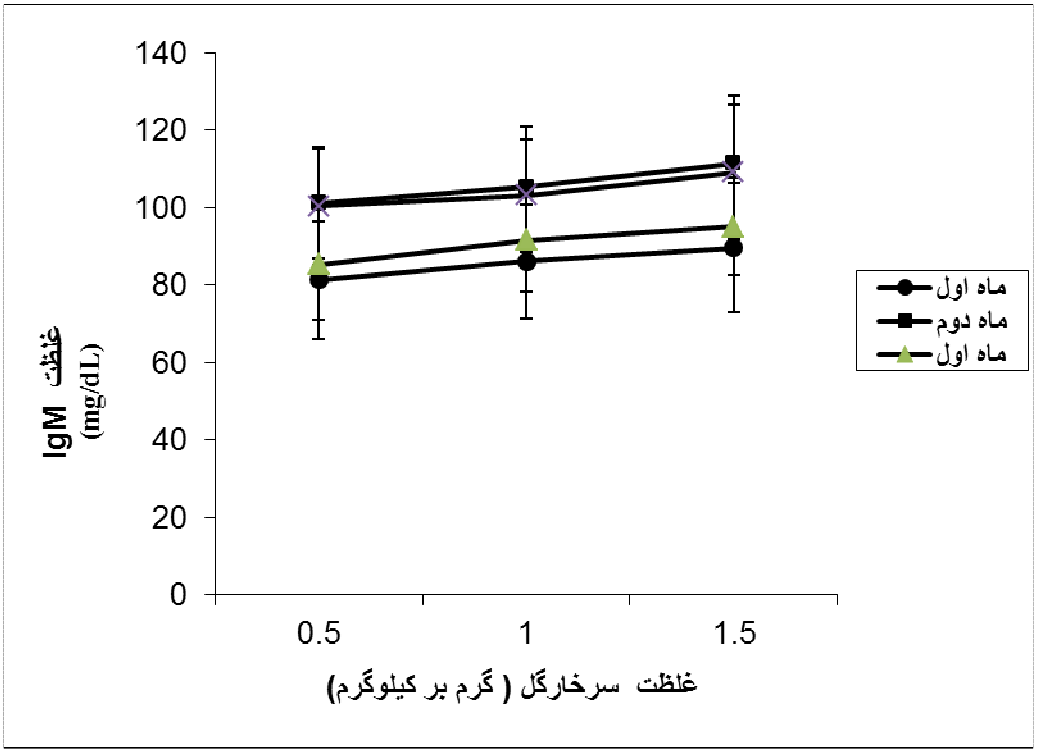
جدول ۳-۲: نتایج تغییرات برخی از پارامترهای ایمونولوژی و بیوشیمیایی ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه گون در ماههای اول و دوم (میانگین ± SD)

نوع فاکتور در عصاره		IgM (mg/dL)	C3 (mg/dL)	C4 (mg/dL)	رادیکال آزاداکسیژن ($RLUs^{-1}$)	لیزوزیم (µg/mL)	لیزوزیم (µg/mL)	پروتئین کل (g/dL)	آلبومین (g/dL)
۰/۵	ماه اول	۸۵/۲۳±۱۴/۲۵	۳۲/۱۶±۵/۲۱	۹/۰۰±۲/۳	۶۷۸/۰۱±۸۱/۲۳	۳/۳۵±۰/۵۷	۱۱۱/۳۱±۷/۶۲	۴/۵۶±۰/۵۲	۲/۳۱±۰/۴۵
۱		۹۱/۵۶±۱۳/۲۵	۳۳/۶۴±۴/۵۲	۱۱/۲۵±۲/۵۶	۶۵۳/۱۷±۷۸/۶۲	۳/۵۲±۰/۹۵	۱۱۴/۰۸±۷/۳۵	۴/۷۱±۰/۴۶	۲/۴۵±۰/۲۸
۱/۰		۹۵/۱۱±۱۲/۴۵	۳۶/۴۹±۵/۱۷	۱۲/۸۹±۲/۴۲	۷۷۹/۲۷±۹۱/۲۴	۳/۷۶±۰/۶۹	۱۲۱/۰۱±۸/۹۵	۴/۹۴±۰/۳۸	۲/۶۲±۰/۳۵
۰/۵	ماه دوم	۱۰۰/۳۲±۱۵/۱۱	۳۳/۶۲±۷/۲۵	۹/۸۱±۲/۵۴	۱۰۴۵/۲۱±۱۱۱/۳۵	۴/۳۶±۰/۸۴	۷۱/۳۸±۷/۵۶	۳/۳۱±۰/۵۱	۲/۱۱±۰/۳۱
۱		۱۰۳/۲۱±۱۴/۵۴	۳۵/۵۶±۶/۴۸	۱۲/۰۵±۲/۷۴	۱۱۶۴/۳۸±۱۳۵/۳۶	۴/۴۶±۰/۶۵	۷۸/۹±۸/۲۵	۳/۴۴±۰/۵۱	۲/۲۱±۰/۲۸
۱/۰		۱۰۹/۱۱±۱۷/۳۲	۳۷/۴۵±۶/۱۲	۱۳/۲۱±۲/۴۶	۱۲۳۸/۴۷±۱۷۴/۲	۴/۶۹±۰/۷۴	۸۶/۰۶±۹/۱۲	۳/۵۶±۰/۳۵	۲/۳۴±۰/۳۵

تعداد نمونه مورد بررسی برای هر تیمار= ۹ نمونه

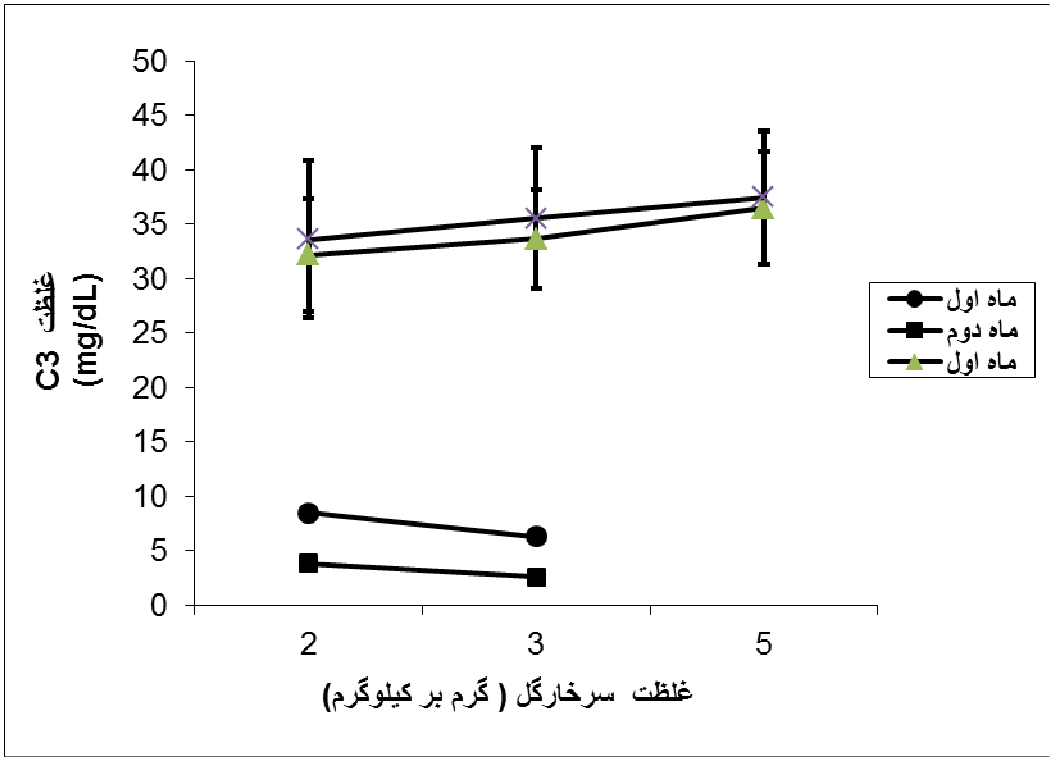
نتایج جدول ۳-۲ و نمودار ۳-۹ نشان میدهد که که میزان آنتی بادی IgM در ماه اول بین ۸۵/۲۳ تا ۹۵/۱۱ میلی گرم در دسی لیتر در نوسان بوده که این میزان در ماه دوم بین ۱۰۰/۳۲ تا ۱۰۹/۱۱ بوده است. بیشترین میزان

پادتن در غلظت ۵ گرم بر کیلوگرم جیره مشاهده شده و بعد از آن غلظت های ۳ و ۲ قرار داشته اند. نتایج آنالیز آماری حاکی از عدم اختلاف معنی دار ما بین تغییرات مشاهده شده در ماه اول و دوم بوده است. همچنین آنالیز آماری نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار ما بین سه غلظت مورد استفاده بوده است.



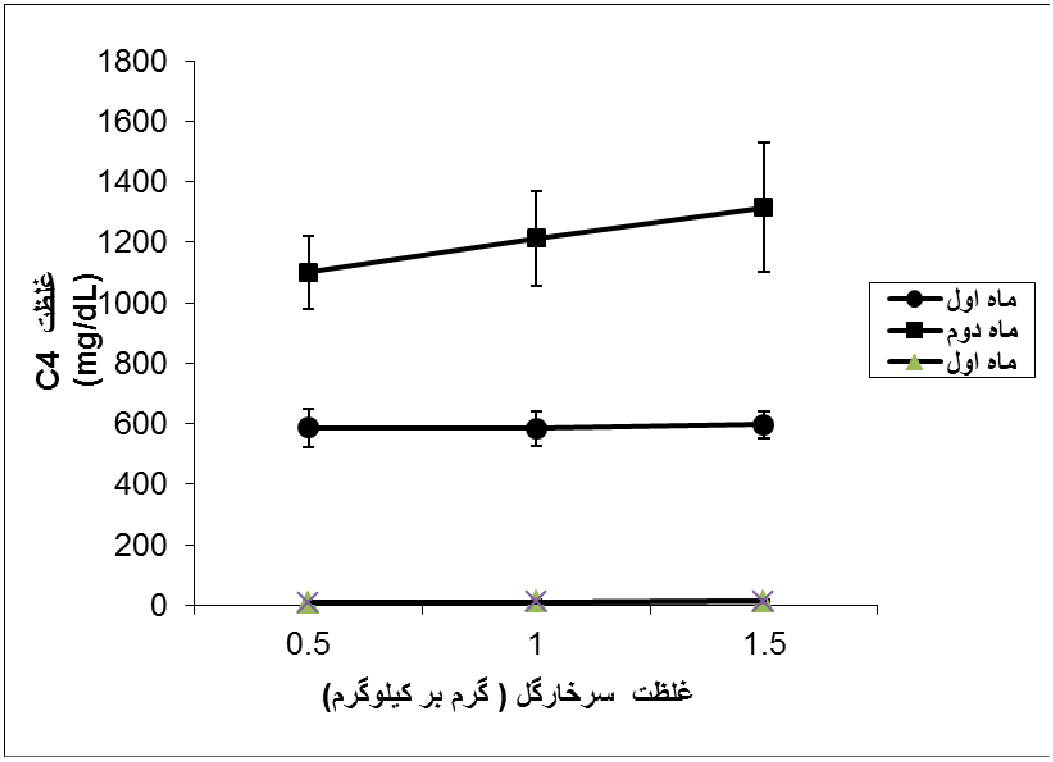
نمودار ۳-۹: نتایج تغییرات پادتنIgM در ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه گون در ماههای اول و دوم

غلظت جزء C3 کمپلمان در ماه اول بین ۳۲/۱۶ تا ۳۶/۴۹ میلی گرم در دسی لیتر در نوسان بوده که این میزان در ماه دوم بین ۳۳/۶۲ تا ۳۷/۴۵ بوده است(جدول ۳-۲ و نمودار ۳-۱۰). بیشترین میزان C3 در غلظت ۵ گرم بر کیلوگرم جیره مشاهده شده و بعد از آن غلظت های ۳ و ۲ قرار داشته اند. نتایج آنالیز آماری حاکی از عدم اختلاف معنی دار ما بین تغییرات مشاهده شده در ماه اول و دوم بوده است. همچنین آنالیز آماری نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار ما بین غلظت های مورد استفاده بوده است.



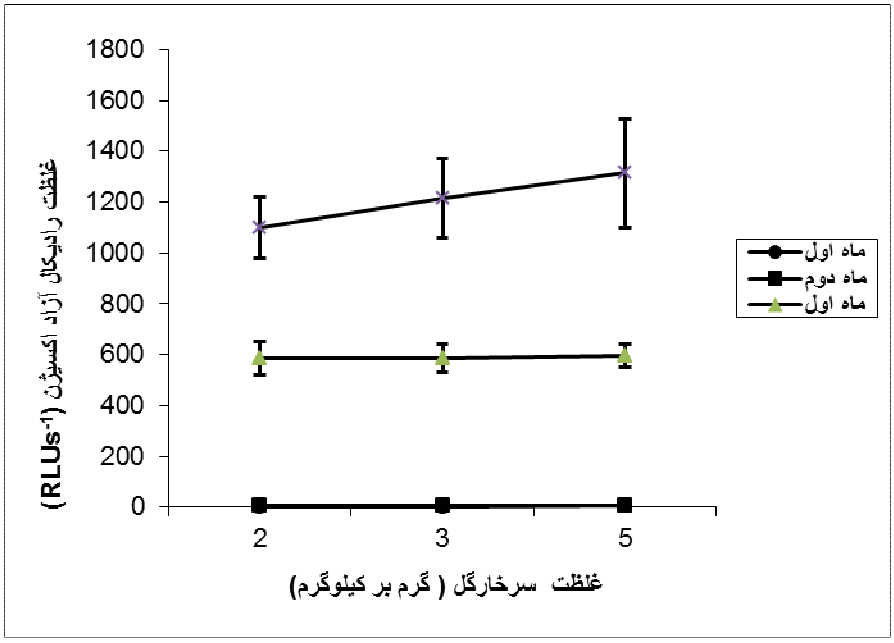
نمودار ۳-۱۰: نتایج تغییرات کمپلمان C3 در ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه گون در ماههای اول و دوم

مقدار جزء C4 کمپلمان در ماه اول بین ۹/۵۰ تا ۱۲/۸۹ میلی گرم در دسی لیتر متغیر بوده که این میزان در ماه دوم بین ۹/۸۱ تا ۱۳/۲۱ بوده است(جدول ۳-۲ و نمودار ۳-۱۱). بیشترین میزان C4 در غلظت ۵ گرم بر کیلوگرم جیره مشاهده شده و بعد از آن غلظت های ۳ و ۲ قرار داشته اند. نتایج آنالیز آماری حاکی از عدم اختلاف معنی دار ما بین تغییرات مشاهده شده در ماه اول و دوم بوده است. همچنین آنالیز آماری نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار ما بین غلظت های مورد استفاده بوده است.



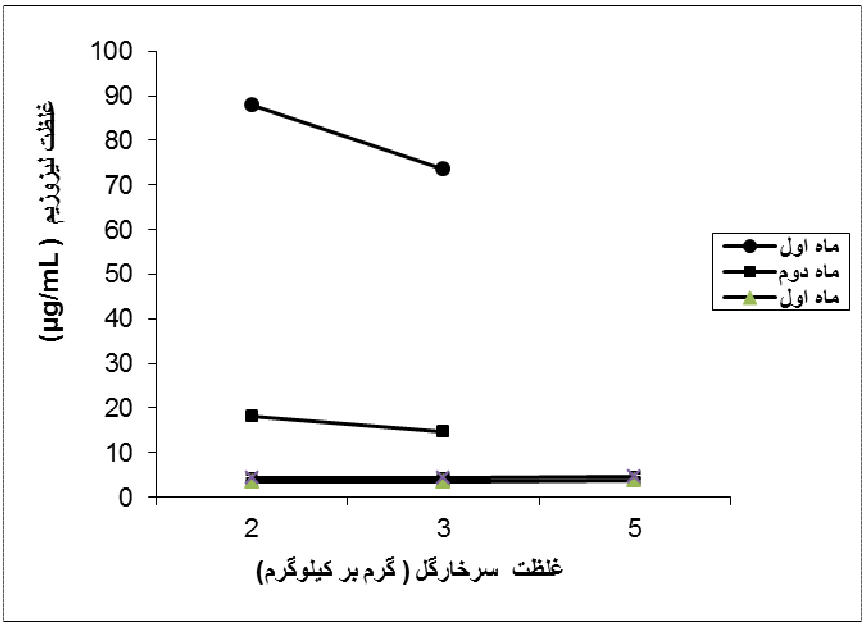
نمودار ۳-۱۱: نتایج تغییرات کمپلمان C4 در ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه گون در ماههای اول و دوم

نتایج جدول ۳-۲ و نمودار ۳-۱۲ نشان میدهد که که میزان رادیکال آزاد اکسیژن در ماه اول بین ۵۷۸/۰۱ تا ۷۷۹/۲۷ میلی گرم در دسی لیتر متغیر بوده که این میزان در ماه دوم بین ۱۰۴۵/۲۱ تا ۱۲۳۸/۴۷ بوده است. بیشترین میزان رادیکال آزاد در غلظت ۵ گرم بر کیلوگرم جیره مشاهده شده و بعد از آن غلظت ۳ و ۲ قرار داشته اند. نتایج آنالیز آماری حاکی از اختلاف معنی دار ما بین تغییرات مشاهده شده در ماه اول و دوم بوده است ($p<0.05$). همچنین آنالیز آماری نشان دهنده اختلاف معنی دار ما بین غلظت ۲ با دو غلظت دیگر بوده است ($p<0.05$).



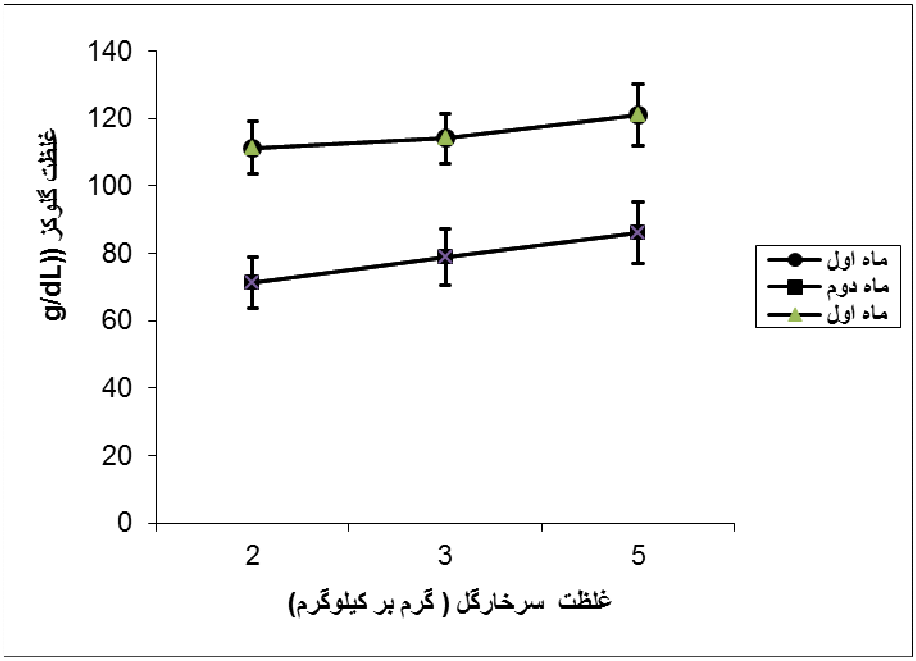
نمودار ۳-۱۲: نتایج تغییرات رادیکال آزاد اکسیژن در ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه گون در ماههای اول و دوم

مقدار آنزیم لیزوزیم در ماه اول بین ۳/۳۵ تا ۳/۷۶ میکروگرم بر میلی لیتر متغیر بوده که این میزان در ماه دوم بین ۴/۳۶ تا ۴/۶۹ بوده است(جدول ۳-۲ و نمودار ۳-۱۳). بیشترین میزان لیزوزیم در غلظت ۵ گرم بر کیلوگرم جیره مشاهده شده و بعد از آن غلظت های ۳ و ۲ قرار داشته اند. نتایج آنالیز آماری حاکی از عدم اختلاف معنی دار ما بین تغییرات مشاهده شده در ماه اول و دوم بوده است. همچنین آنالیز آماری نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار ما بین غلظت های مورد استفاده بوده است.



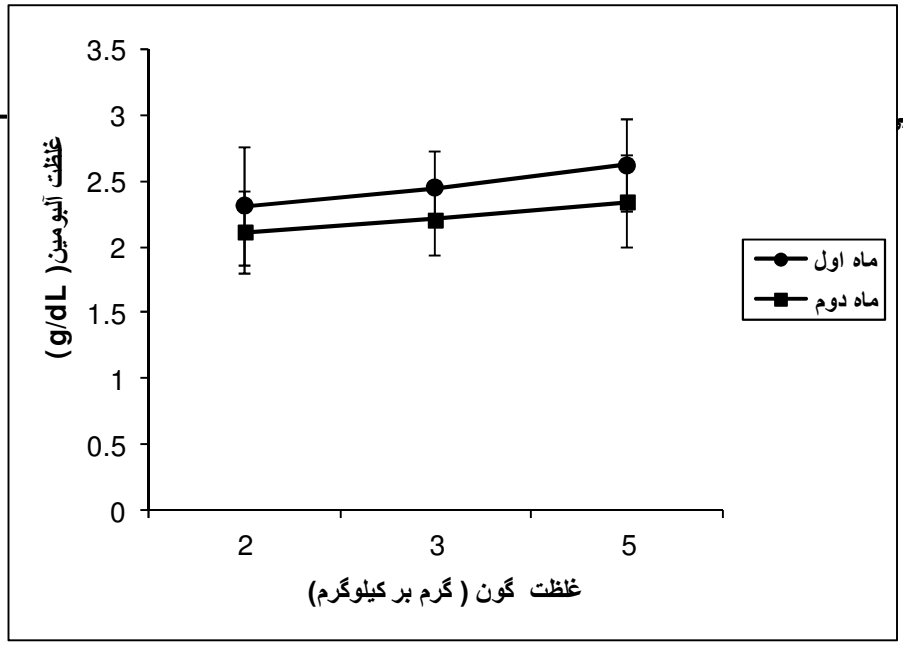
نمودار ۳-۱۳: نتایج تغییرات آنزیم لیزوزیم در ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه گون در ماههای اول و دوم

غلظت قند گلوکز در ماه اول بین ۱۱۱/۳۱ تا ۱۲۱/۰۱ میلی گرم بر دسی لیتر متغیر بوده که این میزان در ماه دوم بین ۷۱/۳۸ تا ۸۶/۰۶ بوده است(جدول ۳-۲ و نمودار ۳-۱۴). غلظت تغییرات گلوکز در ماه دوم نسبت به ماه اول کاهش داشته است . بیشترین غلظت گلوکز در غلظت ۵ گرم بر کیلوگرم جیره مشاهده شده و بعد از آن غلظت های ۳ و ۲ قرار داشته اند. هیچگونه اختلاف معنی داری ما بین تغییرات مشاهده شده در ماه اول و دوم و همچنین غلظت های مورد استفاده وجود نداشته است (P>0/05).



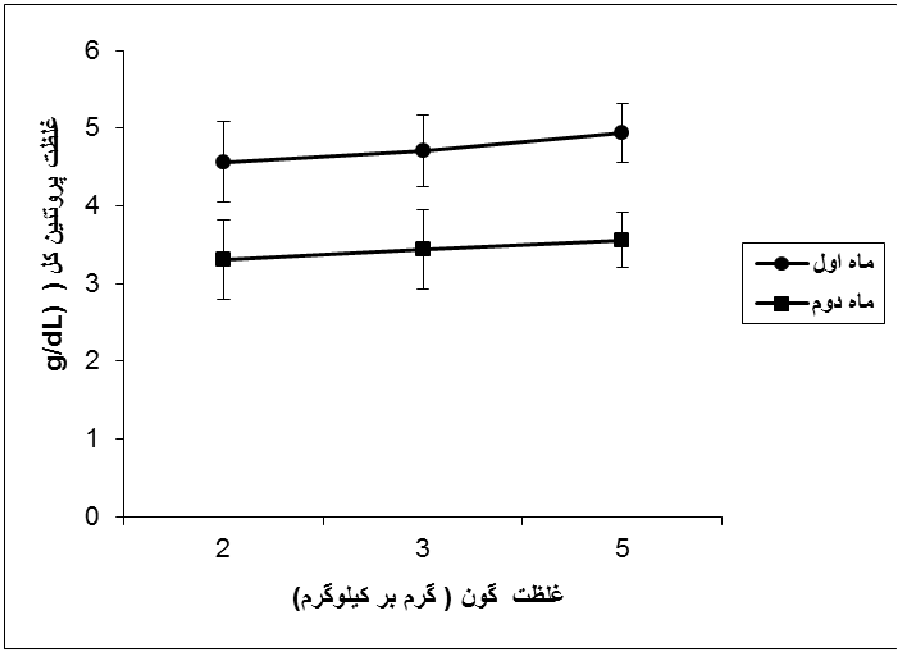
نمودار ۳-۱٤: نتایج تغییرات قند گلوکز در ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه گون در ماههای اول و دوم

غلظت پروتئین کل در ماه اول بین ۴/۵۶ تا ۴/۹۶ گرم بر دسی لیتر متغیر بوده که این میزان در ماه دوم بین ۳/۳۱ تا ۳/۵۶ بوده است(جدول ۳-۲ و نمودار ۳-۱۵). میزان تغییرات پروتئین کل در ماه دوم نسبت به ماه اول بطور نسبی کاهش داشته است . بیشترین میزان پروتئین کل در غلظت ۵ گرم بر کیلوگرم جیره مشاهده شده و بعد از آن غلظت های ۳ و ۲ قرار داشته اند. هیچگونه اختلاف معنی داری ما بین تغییرات مشاهده شده در ماه اول و دوم و همچنین غلظت های مورد استفاده وجود نداشته است.



نمودار ۳-۱۵: نتایج تغییرات پروتئین کل در ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه گون در ماههای اول و دوم

غلظت پروتئین آلبومین در ماه اول بین ۲/۳۱ تا ۲/۶۲ گرم بر دسی لیتر متغیر بوده که این میزان در ماه دوم بین ۲/۱۱ تا ۲/۳۴ بوده است(جدول ۳-۲ و نمودار ۳-۱۶). غلظت تغییرات آلبومین در ماه دوم نسبت به ماه اول اندکی کاهش داشته است. بیشترین غلظت آلبومین در غلظت ۵ گرم بر کیلوگرم جیره مشاهده شده و بعد از آن غلظت های ۳ و ۲ قرار داشته اند. هیچگونه اختلاف معنی داری ما بین تغییرات مشاهده شده در ماه اول و دوم و همچنین غلظت های مورد استفاده وجود نداشته است.



نمودار ۳-۱۶: نتایج تغییرات پروتئین آلبومین در ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه گون در ماههای اول و دوم

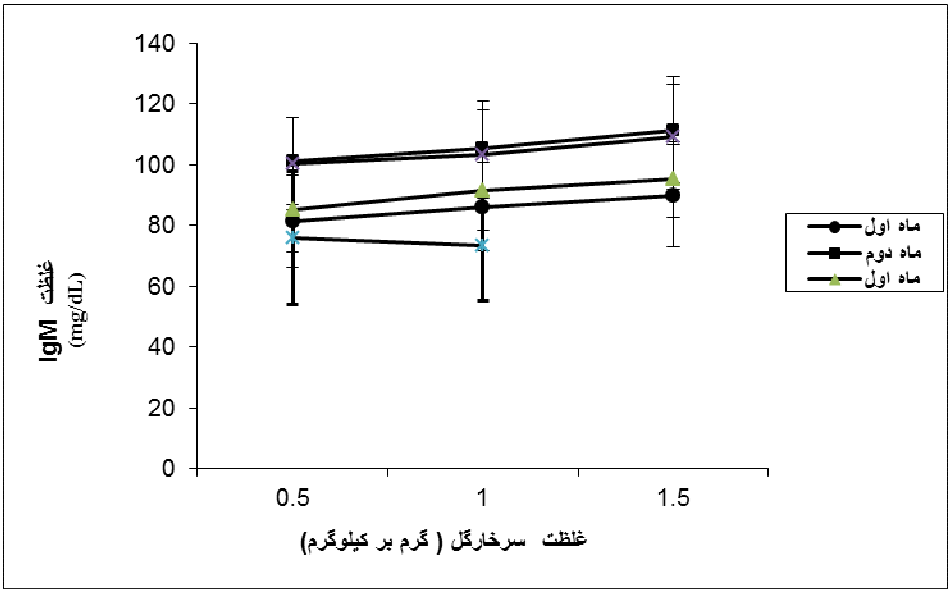
ج – نمونه کنترل: نتایج آزمایشات ایمونولوژی (پادتن IgM ، اجزاء کمپلمان C3و C4 ، رادیکال اکسیژن آزاد و لیزوزیم)و بیوشیمیایی (پروتئین کل، گلوکز و آلبومین) در نمونه کنترل (فاقد عصاره های گیاهان سرخارگل و گون) در ۳۰ روز اول و دوم در جدول ۳-۳ و نمودارهای ۳-۱۷ تا ۳-۲۴ نشان داده شده است.

جدول ۳-۳: نتایج تغییرات برخی از پارامترهای ایمونولوژی و بیوشیمیایی ماهی قزل آلا در جیره کنترل (فاقد عصاره های گیاهان سرخارگل و گون) در ماههای اول و دوم (میانگین ± SD)

نوع فاکتور	IgM (mg/dL)	C3 (mg/dL)	C4 (mg/dL)	رادیکال آزاد اکسیژن ($RLUs^{-1}$)	لیزوزیم (µg/mL)	گلوکز (g/dL)	پروتئین کل (g/dL)	آلبومین (g/dL)
ماه اول	۷۵/۸۳±۲۱/۸۳	۲۵/۵۳±۷/۲۱	۸/۴۹±۳/۸۵	۴۵۳/۵۹±۶۱/۳۲	۲/۳۲±۰/۶۷	۸۷/۸۸±۱۷/۹۶	۴/۱۱±۰/۶۷	۲/۲۳±۰/۸۵
ماه دوم	۷۳/۲۳±۱۸/۲۵	۲۱/۲۵±۶/۲۵	۶/۳±۲/۶۲	۴۸۶/۲۳±۵۶/۳۲	۲/۴۲±۰/۵۶	۷۳/۶۲±۱۴/۵۴	۳/۲±۰/۵۶	۲/۰۸±۰/۵۶

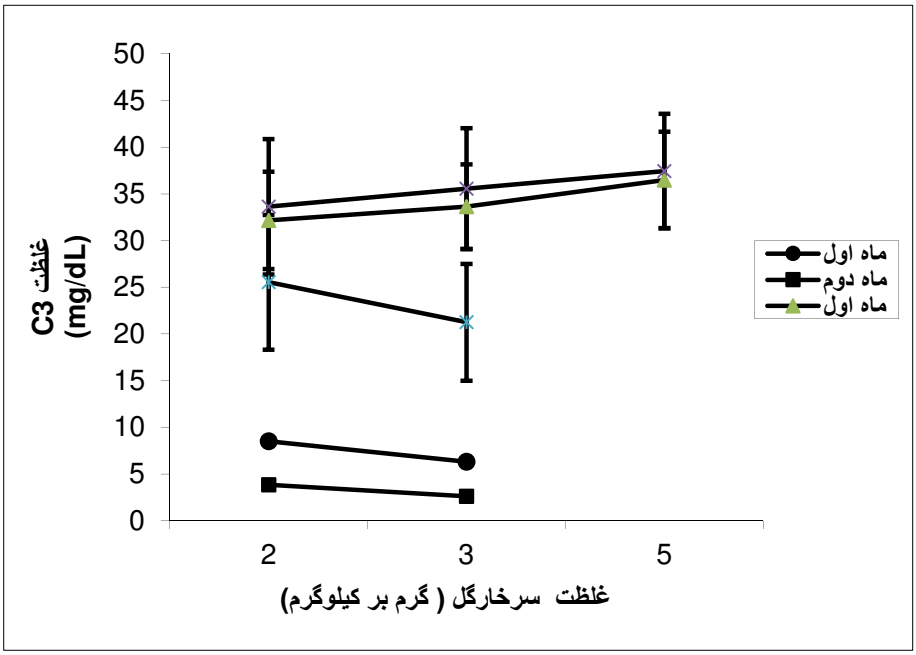
تعداد نمونه مورد بررسی برای هر تیمار= ۹ نمونه

نتایج جدول ۳-۳ و نمودار ۳-۱۷ نشان میدهد که که میزان پادتن IgM در ماه اول ۷۵/۸۳ میلی گرم در دسی لیتر بوده که با اندکی کاهش به ۷۳/۲۳ در ماه دوم رسیده است. تغییرات این پادتن در تیمارهای حاوی عصاره های سرخارگل و گون نسبت به تیمار شاهد بیشتر بوده و با این وجود تغییرات مذکور معنی دار نبوده است.آنالیز آماری نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار ما بین تغییرات IgM در ماههای اول و دوم بوده است.



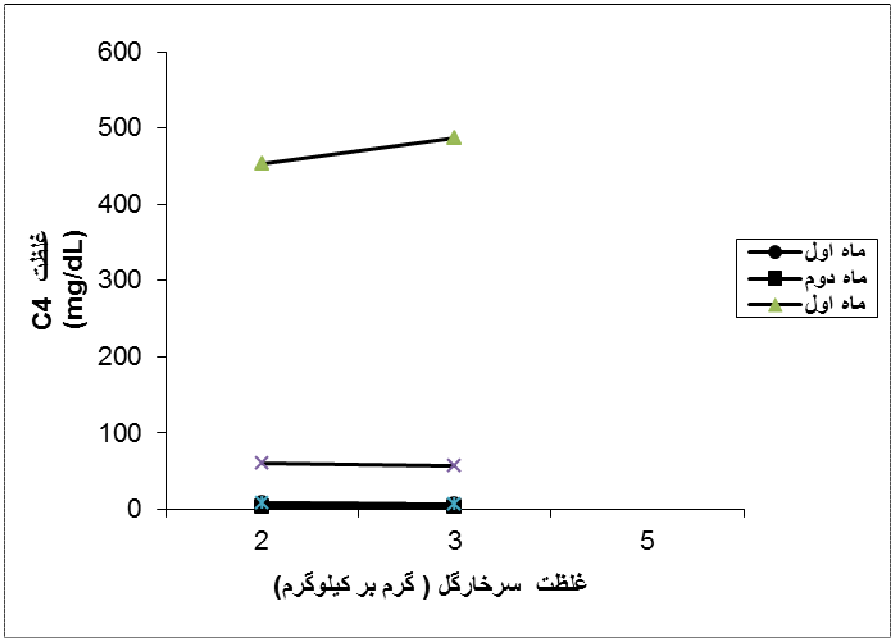
نمودار ۳-۱۷: نتایج تغییرات پادتنIgM ماهی قزل آلا در جیره کنترل (فاقد عصاره های گیاهان سرخارگل و گون) در ماههای اول و دوم

غلظت جزء C3 کمپلمان در ماه اول ۲۵/۵۳ میلی گرم در دسی لیتر بوده که این میزان در ماه دوم به ۲۱/۲۵ کاهش یافته است (جدول ۳-۳ و نمودار ۳-۱۸). نتایج تغییرات جزء C3 در عصاره های حاوی سرخارگل و گون بیشتر از نمونه کنترل بوده و تغییرات حاصله نیز معنی دار بوده است ($p<0.05$). روند تغییرات در تیمارهای حاوی عصاره افزایشی بوده ولی در تیمار کنترل این روند کاهشی بوده است. آنالیز آماری نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار ما بین تغییرات جزء C3 در تیمار کنترل در ماههای اول و دوم بوده است.



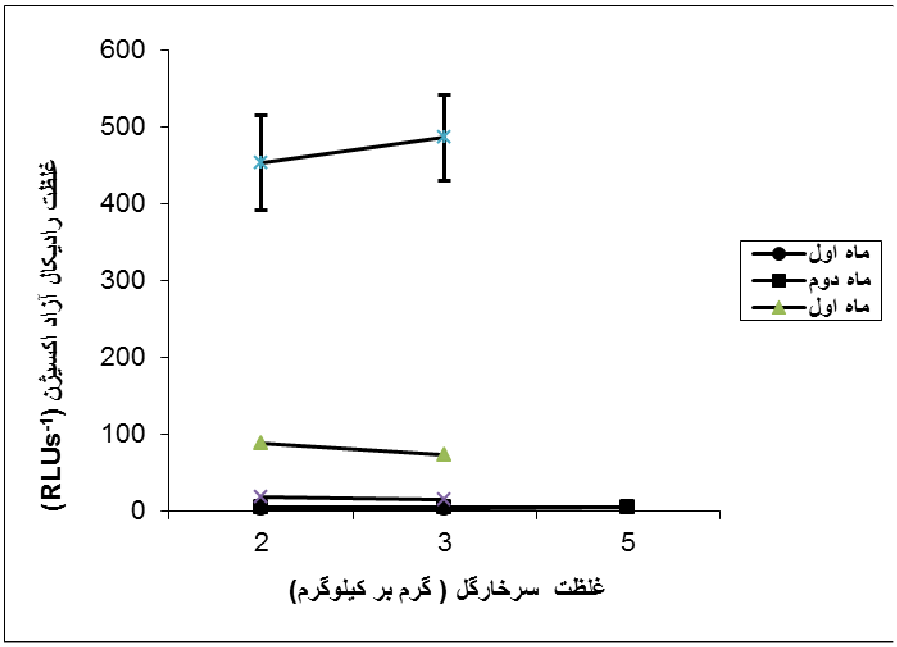
نمودار ۳-۱۸: نتایج تغییرات کمپلمان C3 در ماهی قزل آلا در جیره کنترل (فاقد عصاره های گیاهان سرخارگل و گون) در ماههای اول و دوم

غلظت جزء C4 کمپلمان در ماه اول ۸/۴۹ میلی گرم در دسی لیتر بوده که این میزان در ماه دوم به ۶/۳ کاهش یافته است(جدول ۳-۳ و نمودار ۳-۱۹). نتایج تغییرات جزء C4 در عصاره های حاوی سرخارگل و گون اندکی بیشتر از نمونه کنترل بوده و تغییرات حاصله در تیمارهای مذکور در ماه دوم نسبت به ماه اول روند افزایشی داشته ولی با این وجود تغییرات ما بین نمونه کنترل و تیمارهای حاوی عصاره ها معنی دار نبوده است.آنالیز آماری نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار ما بین تغییرات جزء C4 در تیمار کنترل در ماههای اول و دوم بوده است.



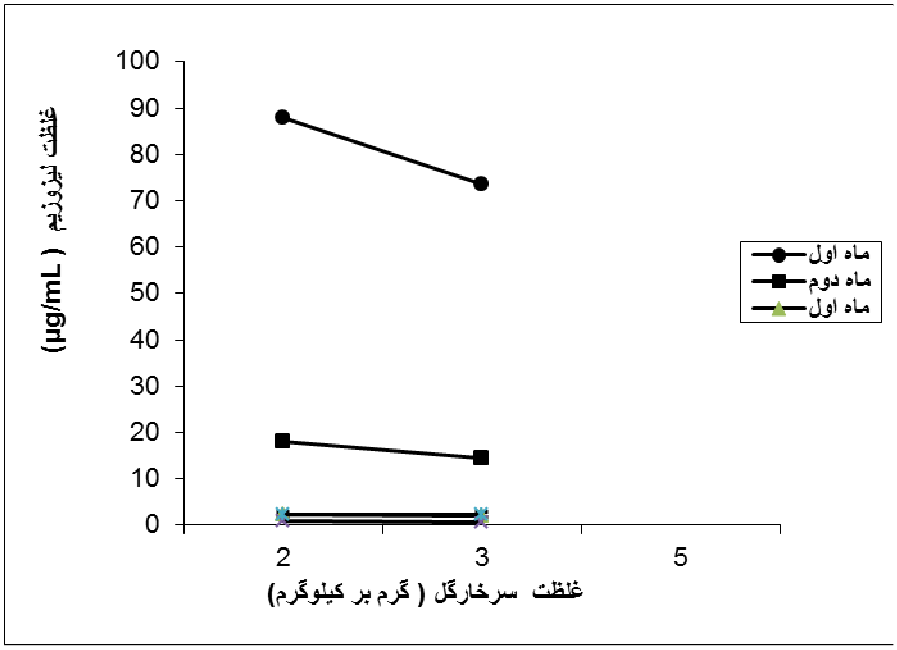
نمودار ۳-۱۹: نتایج تغییرات کمپلمان C4 در ماهی قزل آلا در جیره کنترل (فاقد عصاره های گیاهان سرخارگل و گون) در ماههای اول و دوم

غلظت رادیکال آزاد اکسیژن در ماه اول ۴۵۳/۵۹ بوده که این میزان در ماه دوم به ۴۸۶/۲۳ افزایش یافته است (جدول ۳-۳ و نمودار ۳-۲۰). نتایج تغییرات رادیکال آزاد اکسیژن در عصاره های حاوی سرخارگل و گون به مراتب بیشتر از نمونه کنترل بوده و تغییرات حاصله نیز معنی دار بوده است ($p<0.05$).آنالیز آماری نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار ما بین تغییرات جزء رادیکال آزاد اکسیژن در تیمار کنترل در ماههای اول و دوم بوده هر چند که افزایش نسبی در این پارامتر مشاهده شده است.



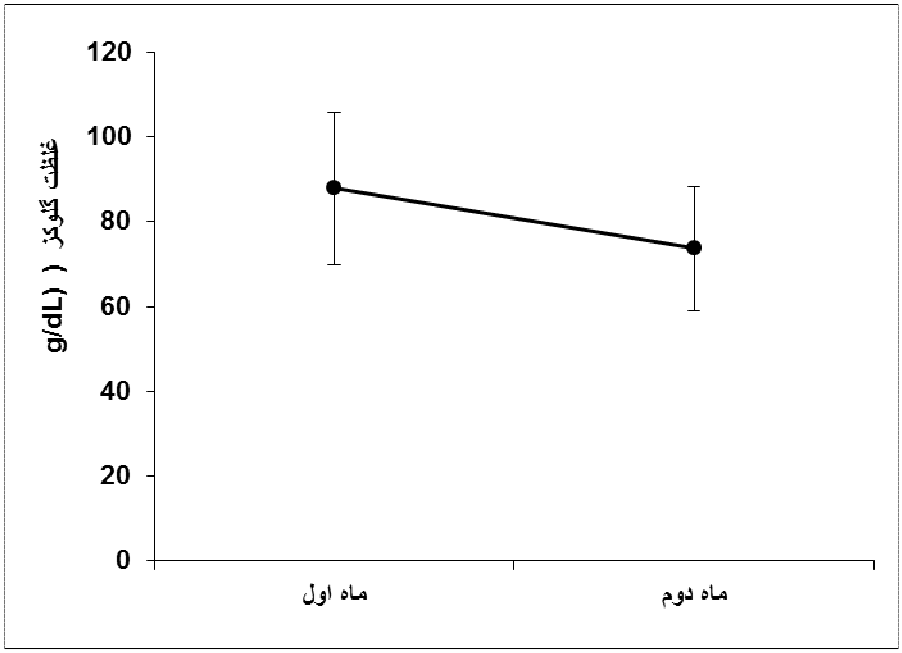
نمودار ۳-۲۰: نتایج تغییرات رادیکال اکسیژن آزاد در ماهی قزل آلا در جیره کنترل (فاقد عصاره های گیاهان سرخارگل و گون) در ماههای اول و دوم

غلظت آنزیم لیزوزیم در ماه اول ۲/۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر بوده که این میزان در ماه دوم به ۲/۴۲ افزایش یافته است(جدول ۳-۳ و نمودار ۳-۲۱). نتایج تغییرات لیزوزیم در عصاره های حاوی سرخارگل و گون بیشتر از نمونه کنترل بوده و تغییرات حاصله نیز معنی دار بوده است ($p<0.05$).آنالیز آماری نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار ما بین تغییرات این آنزیم در تیمار کنترل در ماههای اول و دوم بوده است.



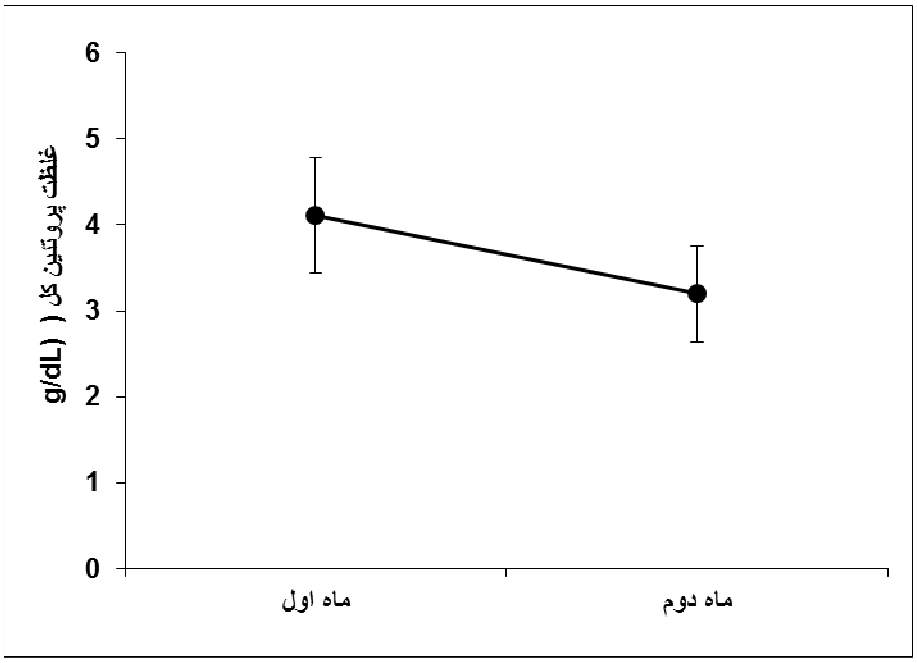
نمودار ۳-۲۱: نتایج تغییرات آنزیم لیزوزیم در ماهی قزل آلا در جیره کنترل (فاقد عصاره های گیاهان سرخارگل و گون) در ماههای اول و دوم

غلظت گلوکز در ماه اول ۸۷/۸۸ میلی گرم بر دسی لیتر بوده که این میزان در ماه دوم به ۷۳/۶۲ کاهش یافته است(جدول ۳-۳ و نمودار ۳-۲۲). نتایج تغییرات قند گلوکز در تیمارهای حاوی سرخارگل و گون بیشتر از نمونه کنترل بوده ولی تغییرات حاصله در تیمار حاوی گون در مقایسه با نمونه کنترل معنی دار بوده است ($p<0.05$). روند کاهش قند در هر سه تیمار کنترل، گون و سرخارگل مشاهده شده و میزان گلوکز در ماه دوم کاهش می یابد ولی با این وجود، غلظتهای اولیه قند در تیمارهای حاوی عصاره بیشتر از کنترل می باشد. آنالیز آماری نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار ما بین تغییرات این قند در تیمار کنترل در ماههای اول و دوم بوده است ($P>0/05$).



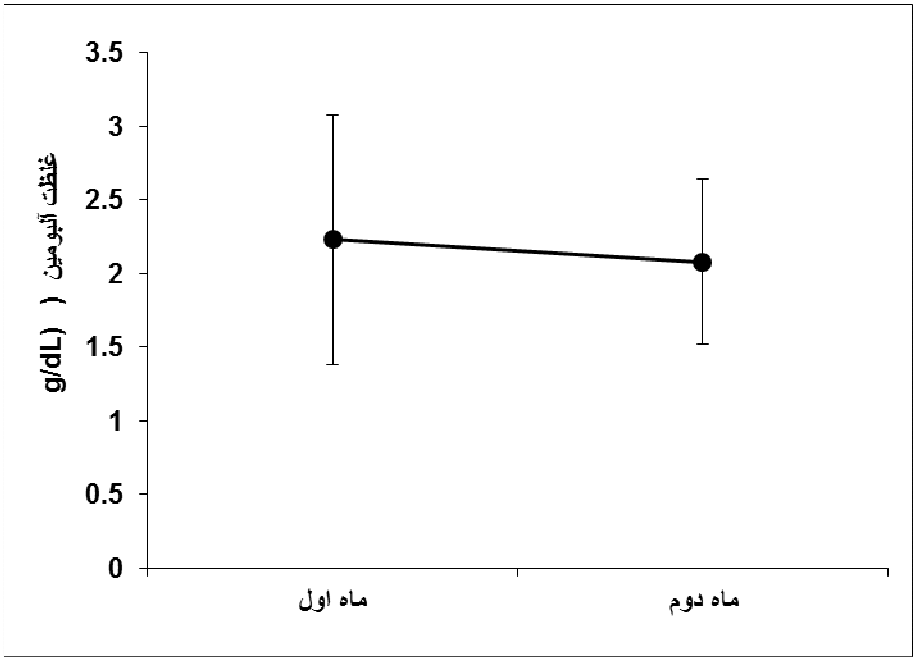
نمودار ۳-۲۲: نتایج تغییرات قند گلوکز در ماهی قزل آلا در جیره کنترل (فاقد عصاره های گیاهان سرخارگل و گون) در ماههای اول و دوم

مقدار پروتئین کل در ماه اول ۴/۱۱ گرم بر دسی لیتر بوده که این میزان در ماه دوم به ۳/۲ کاهش یافته است(جدول ۳-۳ و نمودار ۳-۲۳). نتایج تغییرات پروتئین در تیمارهای حاوی سرخارگل و گون فاقد اختلاف معنی دار با تیمار کنترل بوده و روند کاهشی در هر سه تیمار اصلی مشاهده شده است. آنالیز آماری نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار ما بین تغییرات پروتئین کل در تیمار کنترل در ماههای اول و دوم بوده است.



نمودار ۳-۲۳: نتایج تغییرات پروتئین کل در ماهی قزل آلا در جیره کنترل (فاقد عصاره های گیاهان سرخارگل و گون) در ماههای اول و دوم

مقدار پروتئین آلبومین در ماه اول ۲/۲۳ گرم بر دسی لیتر بوده که این میزان در ماه دوم به ۲/۰۸ کاهش یافته است(جدول ۳-۳ و نمودار ۳-۲۴). نتایج تغییرات آلبومین در تیمارهای حاوی سرخارگل و گون فاقد اختلاف معنی دار با تیمار کنترل بوده و روند کاهشی در هر سه تیمار اصلی مشاهده شده است. آنالیز آماری نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار ما بین تغییرات پروتئین آلبومین در تیمار کنترل در ماههای اول و دوم بوده است.



نمودار ۳-۲٤: نتایج تغییرات پروتئین آلبومین در ماهی قزل آلا در جیره کنترل (فاقد عصاره های گیاهان سرخارگل و گون) در ماههای اول و دوم

۲-۳- نتایج آزمایشات هماتولوژی

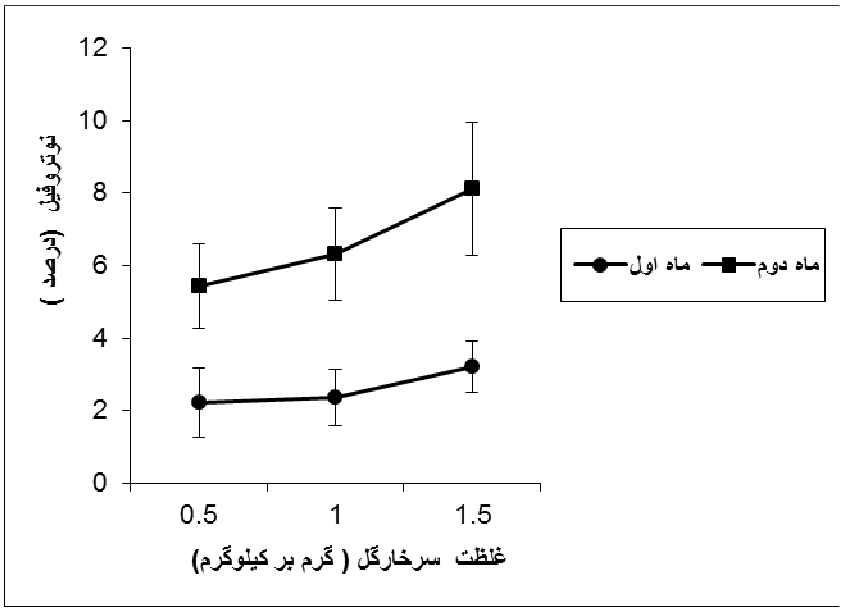
تغییرات فاکتورهای هماتولوژی شامل نوتروفیل، مونوسیت و لمفوسیت بوده که در طول دوره و در ماههای اول و دوم مورد بررسی قرار گرفت.

الف – سرخارگل: نتایج آزمایشات هماتولوژی (نوتروفیل، مونوسیت و لمفوسیت) در جیره غذایی حاوی عصاره های گیاه سرخارگل که در دو زمان ۳۰ و ۶۰ روز مورد بررسی قرار گرفت در جدول ۳-۴ و نمودارهای ۳-۲۵ تا ۳-۲۷ نشان داده شده است.

جدول ۳-٤: نتایج تغییرات برخی از پارامترهای هماتولوژی ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه سرخارگل در زمانهای ۳۰ و ٦۰ روز (میانگین ± SD)

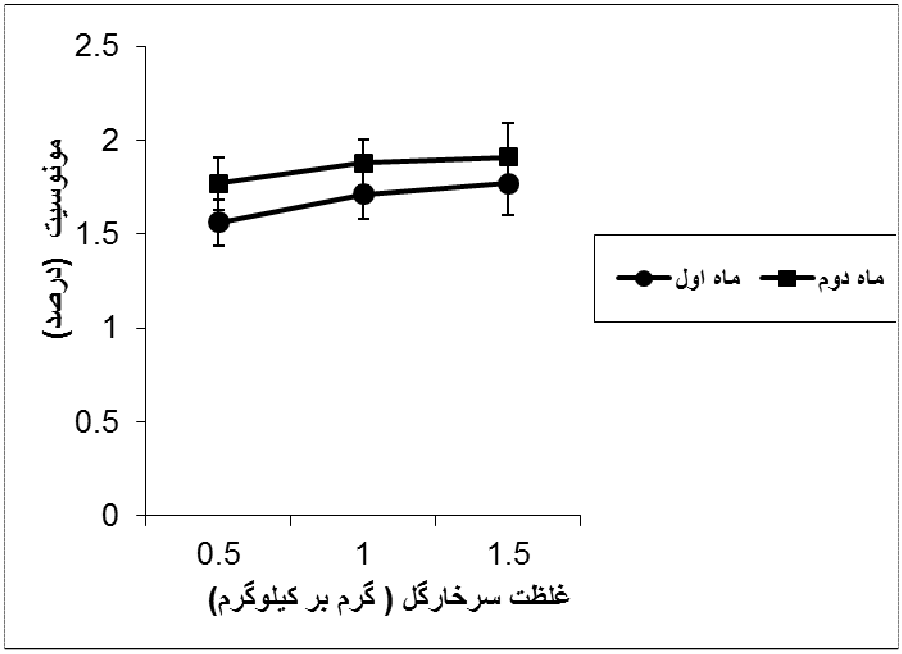
نوع فاکتور دز مورد استفاده		نوتروفیل (درصد)	مونوسیت (درصد)	لمفوسیت (درصد)
۳۰ روز	۰/۵	۲/۲۲±۰/۹۷	۱/۵۶±۰/۱۲	۸۸/۶۶±۲/۱۱
	۱	۲/۳۵±۰/۷۸	۱/۷۱±۰/۱۳	۹۳/۴۵±۲/۸۶
	۱/۵	۳/۲۱±۰/۷	۱/۷۷±۰/۱۷	۹۸/۵۵±۲/۳۳
۶۰ روز	۰/۵	۵/۴۳±۱/۱۶	۱/۷۷±۰/۱۴	۹۳/۸۸±۳/۴
	۱	۶/۳۳±۱/۲۷	۱/۸۸±۰/۱۲	۹۷/۷۷±۴/۹۶
	۱/۵	۸/۱۱±۱/۸۳	۱/۹۱±۰/۱۸	۹۸/۲۱±۲/۱۶
۳۰ روز	کنترل	۱/۴۴±۰/۵۳	۰/۶۷±۰/۱۵	۸۵/۲۵±۱/۰۵
۶۰ روز	کنترل	۲/۱۱±۰/۳۲	۱/۱۱±۰/۱۲	۸۸/۳۲±۲/۰۶

نتایج جدول ۳-۴ و نمودار ۳-۲۵ نشان میدهد که تعداد نوتروفیل در روز ۳۰ بین ۲/۲۲ تا ۳/۲۱ درصد بوده که این میزان در روز ۶۰ بین ۵/۴۳ تا ۸/۱۱ درصد بوده است. بیشترین تعداد نوتروفیل در غلظت ۱/۵ گرم بر کیلوگرم جیره مشاهده شده و بعد از آن غلظت های ۱ و ۰/۵ قرار داشته اند. نتایج آنالیز آماری حاکی از اختلاف معنی دار ما بین تغییرات مشاهده شده در روزهای ۳۰ و ۶۰ بوده ($p<0/05$) ولی با این وجود اختلاف معنی دار ما بین غلظت های مورد استفاده وجود نداشته است.



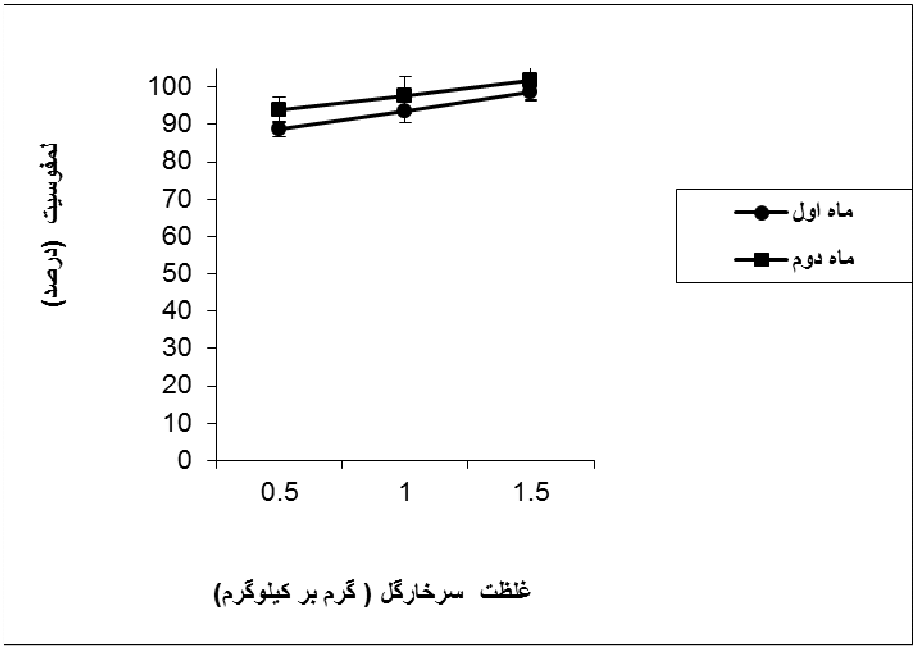
نمودار ۳-۲۵: نتایج تغییرات تعداد نوترفیل ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه سرخارگل در ماههای اول و دوم

نتایج جدول ۳-۴ و نمودار ۳-۲۶ نشان میدهد که تعداد مونوسیت در روز ۳۰ بین ۱/۵۶ تا ۱/۷۷ درصد بوده که این میزان در روز ۶۰ بین ۱/۷۷ تا ۱/۹۱ درصد بوده است. بیشترین تعداد مونوسیت در غلظت ۱/۵ گرم بر کیلوگرم جیره مشاهده شده و بعد از آن غلظت های ۱ و ۰/۵ قرار داشته اند. نتایج آنالیز آماری حاکی از عدم اختلاف معنی دار ما بین تغییرات مشاهده شده در زمانهای ۳۰ و ۶۰ روز و همچنین غلظت های مورد استفاده بوده است.



نمودار ۳-۲۶: نتایج تغییرات تعداد مونوسیت ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه سرخارگل در ماههای اول و دوم

نتایج جدول ۳-۴ و نمودار ۳-۲۷ نشان میدهد که تعداد لمفوسیت در روز ۳۰ بین ۸۸/۶۶ تا ۹۸/۵۵ درصد بوده که این میزان در روز ۶۰ بین ۹۳/۸۸ تا ۹۸/۲۱ درصد بوده است. بیشترین تعداد لمفوسیت در غلظت ۱/۵ گرم بر کیلوگرم جیره مشاهده شده و بعد از آن غلظت های ۱ و ۰/۵ قرار داشته اند. نتایج آنالیز آماری حاکی از عدم اختلاف معنی دار ما بین تغییرات مشاهده شده در روزهای ۳۰ و ۶۰ بوده ولی با این وجود بین غلظت های مورد استفاده اختلاف معنی دار وجود داشته است ($p<0/05$).



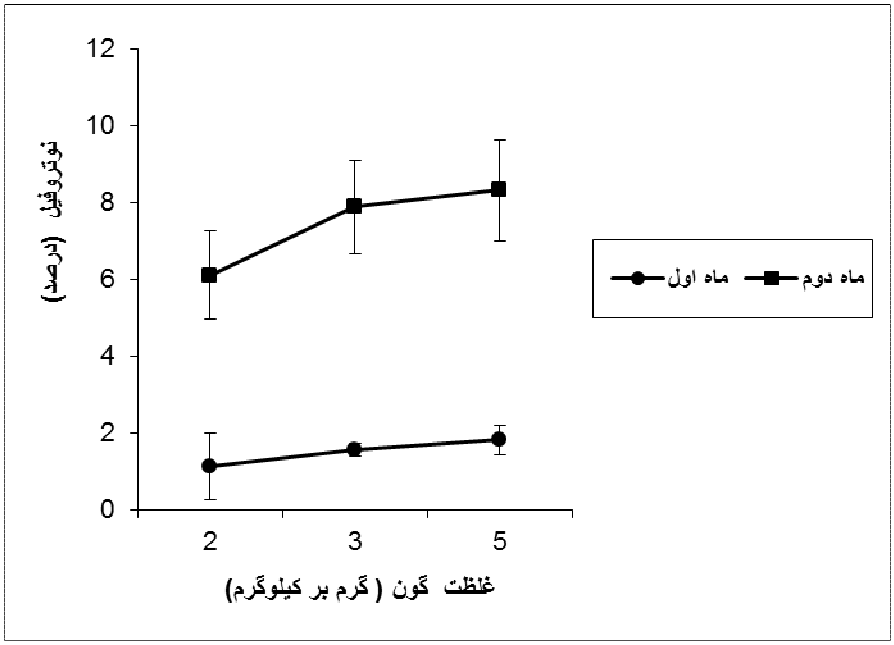
نمودار ۳-۲۷: نتایج تغییرات تعداد لمفوسیت ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه سرخارگل در ماههای اول و دوم

ب – گون: نتایج آزمایشات هماتولوژی (نوتروفیل، مونوسیت و لمفوسیت) در جیره غذایی حاوی عصاره های گیاه گون که در دو زمان ۳۰ و ۶۰ روز انجام گرفت در جدول ۳-۵ و نمودارهای ۳-۲۸ تا ۳-۳۰ نشان داده شده است.

جدول ۳ - ۵: نتایج تغییرات برخی از پارامترهای هماتولوژی ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره گیاه گون در ماههای اول و دوم

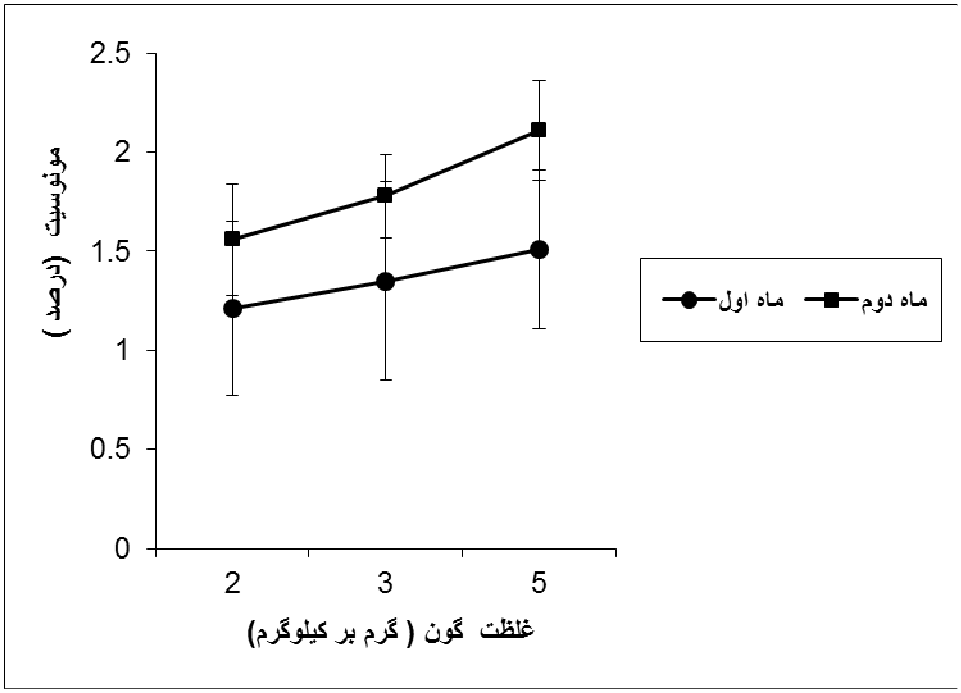
نوع فاکتور دز مورد استفاده		نوتروفیل	مونوسیت	لمفوسیت
ماه اول	۲	۱/۱۳±۰/۸۷	۱/۲۱±۰/۴۴	۹۰/۱۱±۱/۲
	۳	۱/۵۶±۰/۱۷	۱/۳۵±۰/۵	۹۲/۲۱±۱/۰۵
	۵	۱/۸۱±۰/۳۹	۱/۵۱±۰/۴	۹۴/۳۵±۱/۵۸
ماه دوم	۲	۶/۱۱±۱/۱۵	۱/۵۶±۰/۲۸	۹۲/۱۹±۲/۶۷
	۳	۷/۸۹±۱/۲۱	۱/۷۸±۰/۲۱	۹۵/۲۹±۲/۶۳
	۵	۸/۳۳±۱/۳۲	۲/۱۱±۰/۲۵	۹۸/۴۷±۲/۲۸
ماه اول	کنترل	۱/۴۴±۰/۵۳	۰/۶۷±۰/۱۵	۸۵/۲۵±۱/۰۵
ماه دوم	کنترل	۲/۱۱±۰/۳۲	۱/۱۱±۰/۱۲	۸۸/۳۲±۲/۰۶

نتایج جدول ۳-۵ و نمودار ۳-۲۸ نشان میدهد که تعداد نوتروفیل در روز ۳۰ بین ۱/۱۳ تا ۱/۸۱ درصد بوده که این میزان در مرحله در روز ۶۰ بین ۶/۱۱ تا ۸/۳۳ درصد بوده است. بیشترین تعداد نوتروفیل در غلظت ۱/۵ گرم بر کیلوگرم جیره مشاهده شده و بعد از آن غلظت های ۱ و ۰/۵ قرار داشته اند. هیچگونه اختلاف معنی داری مابین تغییرات نوتروفیل در تیمارهای حاوی گون و سرخارگل وجود نداشته است. آنالیز آماری حاکی از اختلاف معنی دار ما بین تغییرات مشاهده شده در روزهای ۳۰ و ۶۰ بوده ($p<0/05$) ولی با این وجود اختلاف معنی دار ما بین غلظت های مورد استفاده وجود نداشته است.



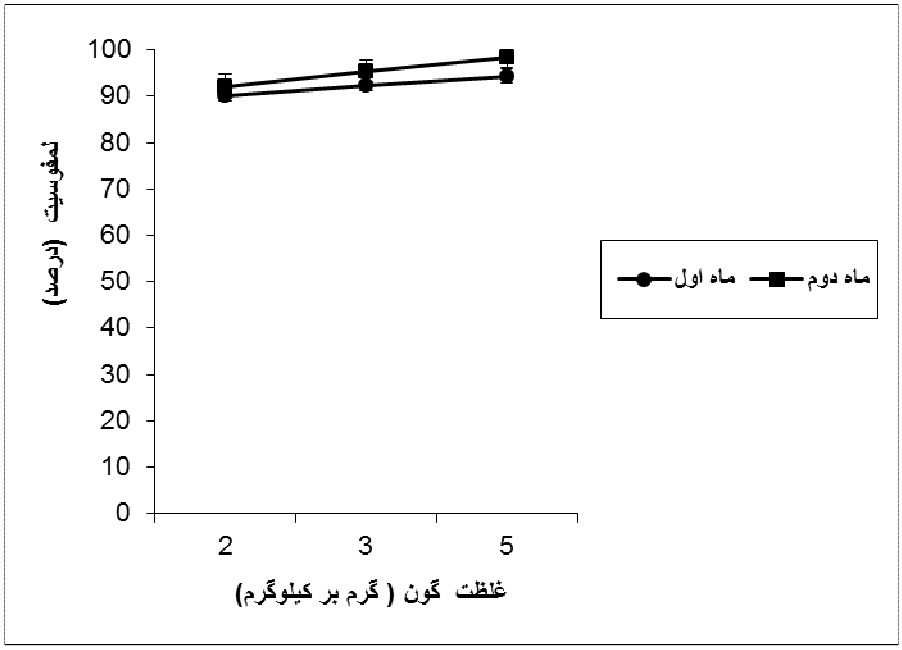
نمودار ۳-۲۸: نتایج تغییرات تعداد نوترفیل ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه گون در ماههای اول و دوم

نتایج جدول ۳-۵ و نمودار ۳-۲۹ نشان میدهد که تعداد مونوسیت در روز ۳۰ بین ۱/۲۱ تا ۱/۵۱ درصد بوده که این میزان در روز ۶۰ بین ۱/۵۶ تا ۲/۱۱ درصد بوده است. بیشترین تعداد مونوسیت در غلظت ۱/۵ گرم بر کیلوگرم جیره مشاهده شده و بعد از آن غلظت های ۱ و ۰/۵ قرار داشته اند. هیچگونه اختلاف معنی داری مابین تغییرات مونوسیت در تیمارهای حاوی گون و سرخارگل وجود نداشته است. آنالیز آماری حاکی از عدم اختلاف معنی دار ما بین تغییرات مشاهده شده در ماههای اول و دوم و همچنین غلظت های مورد استفاده بوده است.



نمودار ۳-۲۹: نتایج تغییرات تعداد مونوسیت ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه گون در ماههای اول و دوم

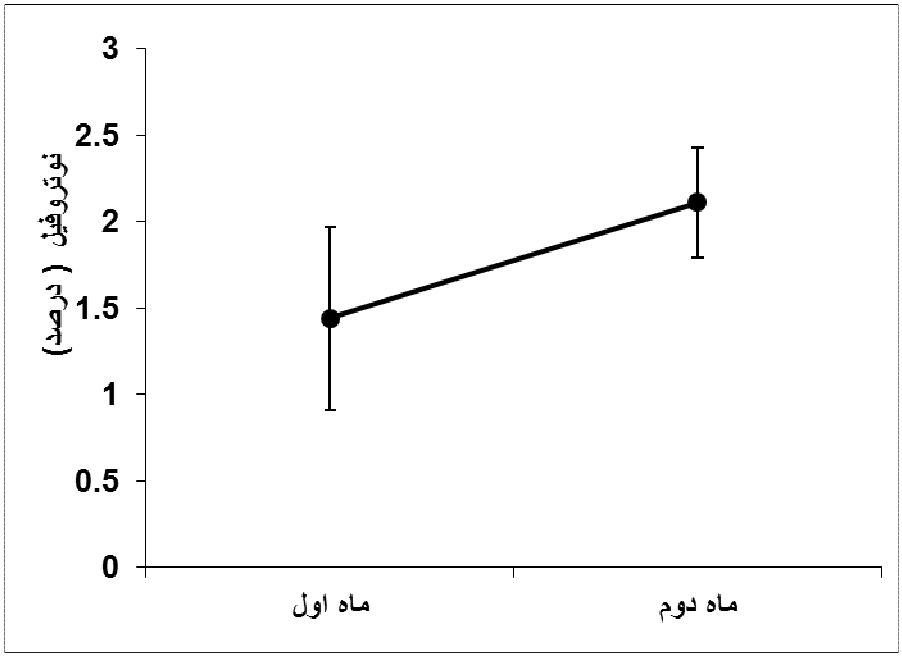
نتایج جدول ۳-۵ و نمودار ۳-۳۰ نشان میدهد که تعداد لمفوسیت در زمان ۳۰ روز بین ۹۰/۱۱ تا ۹۴/۳۵ درصد بوده که این میزان در زمان ۶۰ روز بین ۹۲/۱۹ تا ۹۸/۴۷ درصد بوده است. بیشترین تعداد لمفوسیت در غلظت ۱/۵ گرم بر کیلوگرم عصاره گون جیره مشاهده شده و بعد از آن غلظت های ۱ و ۰/۵ قرار داشته اند. هیچگونه اختلاف معنی داری مابین تغییرات لمفوسیت در تیمارهای حاوی گون و سرخارگل وجود نداشته است. آنالیز آماری حاکی از عدم اختلاف معنی دار ما بین تغییرات مشاهده شده در زمانهای ۳۰ و ۶۰ روز بوده ولی با این وجود بین غلظت های مورد استفاده اختلاف معنی دار وجود داشته است ($p<0/05$).



نمودار ۳-۳۰: نتایج تغییرات تعداد لمفوسیت ماهی قزل آلا در جیره حاوی عصاره های گیاه گون در ماههای اول و دوم

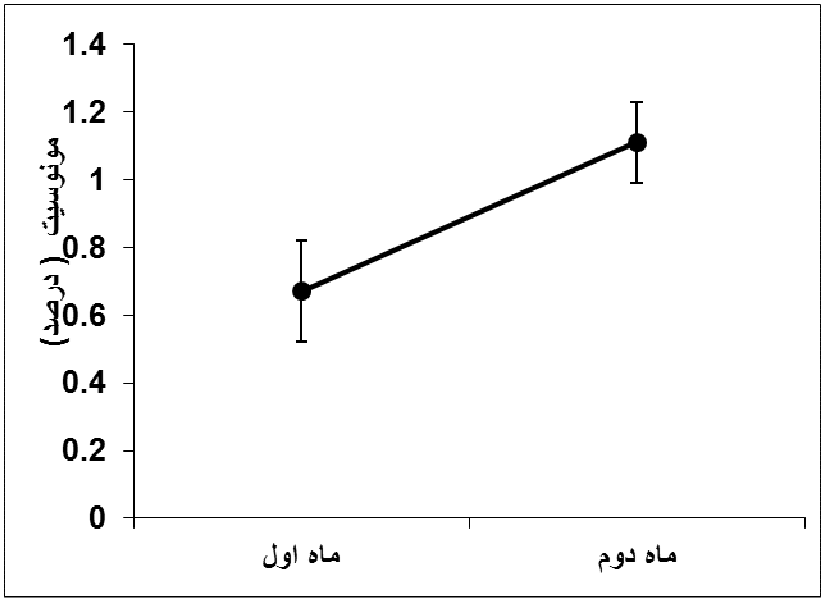
ج – کنترل: نتایج آزمایشات هماتولوژی (نوتروفیل، مونوسیت و لمفوسیت) در جیره غذایی فاقد دو عصاره سرخارگل و گون که در دو زمان ۳۰ و ۶۰ روز انجام گرفت در جدول ۳-۵ و نمودارهای۳-۳۱ تا ۳-۳۳ نشان داده شده است.

نتایج جدول ۳-۵ و نمودار ۳-۳۱ نشان میدهد که تعداد نوتروفیل در زمان ۳۰ روز ۱/۴۴ درصد بوده که بعد از ۶۰ روز به ۲/۱۱ درصد افزایش داشته است. هیچگونه اختلاف معنی داری ما بین تعداد نوتروفیل در روزهای ۳۰ و ۶۰ روز وجود نداشته است. نتایج آنالیز آماری حاکی از وجود اختلاف معنی دار ما بین تعداد نوتروفیل در جیره حاوی عصاره های سرخارگل و گون با نمونه کنترل بوده است ($p<0.05$).



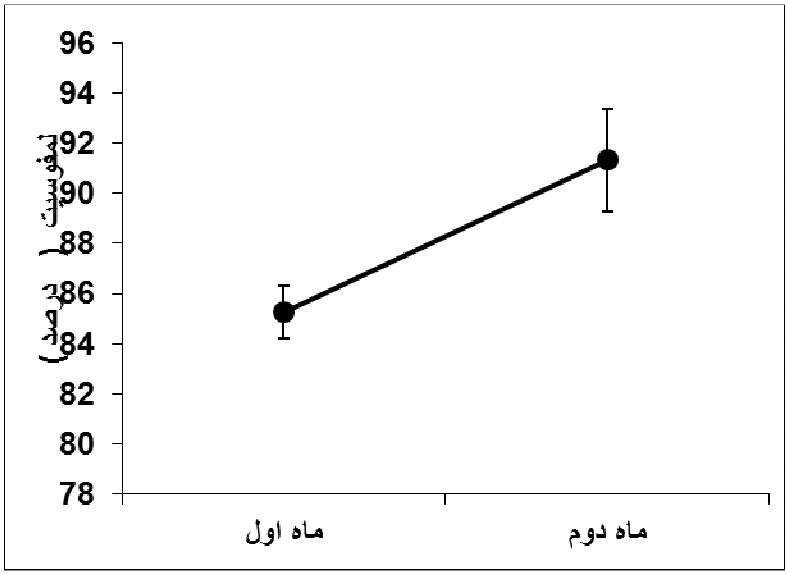
نمودار ۳-۳۱: نتایج تغییرات تعداد نوترفیل ماهی قزل آلا در جیره فاقد عصاره های دو گیاه گون و سرخارگل در ماههای اول و دوم

نتایج جدول ۳-۵ و نمودار ۳-۳۲ نشان میدهد که تعداد مونوسیت در زمان ۳۰ روز ۰/۶۷ درصد بوده که بعد از ۶۰ روز به ۱/۱۱ درصد افزایش داشته است. هیچگونه اختلاف معنی داری ما بین تعداد مونوسیت در ماههای اول و دوم وجود نداشته است. روند تغییرات مونوسیت در نمونه کنترل نسبت به تیمارهای حاوی عصاره های گیاهی کمتر بوده ولی با این وجود هیچگونه اختلاف معنی دار ما بین تعداد مونوسیت در جیره حاوی عصاره های سرخارگل و گون با نمونه کنترل وجود نداشته است.



نمودار ۳-۳۲: نتایج تغییرات تعداد مونوسیت ماهی قزل آلا در جیره فاقد عصاره های دو گیاه گون و سرخارگل در ماههای اول و دوم

نتایج جدول ۳-۵ و نمودار ۳-۳۳ نشان میدهد که تعداد لمفوسیت در زمان ۳۰ روز ۸۵/۲۵ درصد بوده که بعد از ۶۰ روز به ۸۸/۳۲ درصد افزایش داشته است. هیچگونه اختلاف معنی داری ما بین تعداد لمفوسیت در ماههی اول و دوم وجود نداشته است. روند تغییرات لمفوسیت در نمونه کنترل نسبت به تیمارهای حاوی عصاره های گیاهی کمتر بوده و اختلاف آنها نیز معنی دار بوده است (P<0.05).



نمودار ۳-۳۳: نتایج تغییرات تعداد لمفوسیت ماهی قزل آلا در جیره فاقد عصاره های دو گیاه گون و سرخارگل در ماههای اول و دوم

۳-۳- مواجهه سازی (Challenge)

نتایج مواجهه سازی ماهی پس از پایان دوره (پس از ۶۰ روز) با باکتری بیماریزا استرپتوکوکوزیس اینیایی نشان داد که از تعداد ۴۵ قطعه ماهی مورد بررسی برای هر تیمار ، میزان بقاء برای تیمارهای دریافت کننده عصاره ۰/۵ ، ۱ و ۱/۵ گرم بر کیلوگرم سرخارگل به ترتیب ۸۴/۴۴ ، ۸۶/۶۶ و ۹۱/۱۱ درصد ، برای سه غلظت ۲ ، ۳ و ۵ گرم بر کیلوگرم گون ۸۶/۶۶ ، ۹۱/۱۱ و ۹۳/۳۳ درصد و برای نمونه کنترل نیز ۴۴/۴۴ درصد بوده است(جدول ۳-۶). بیشترین درصد بقاء مربوط به درصدهای بالای دو گیاه گون و سرخارگل بوده و آنالیز آماری حاکی از اختلاف معنی دار مابین نتایج عصاره ها با نمونه کنترل بوده است (P<0.05).

جدول ۳-٦: میانگین درصد بقاء در تیمارهای مختلف کنترل و جیره حاوی عصار ه های سرخارگل و گون در بچه ماهی قزل آلا بعد از رویارویی با استرپتوکوکوس اینیایی (میانگین ± SD)

تیمار	تعداد تلف شده	تعداد باقیمانده	درصد بقاء
شاهد	۲۵	۲۰	۴۴/۴۴±۶/۱۱
سرخارگل ۰/۵	۷	۳۸	۸۴/۴۴±۳/۳۹
سرخارگل ۱	۶	۳۹	۸۶/۶۶±۳/۱۷
سرخارگل ۱/۵	۴	۴۱	۹۱/۱۱±۲/۲۳
گون۲	۶	۳۹	۸۶/۶۶±۳/۲۳
گون ۳	۴	۴۱	۹۱/۱۱±۲/۲۵
گون ۵	۳	۴۲	۹۳/۳۳±۱/۱۹

٤- بحث

مطالعات مختلفی در خصوص تاثیر اسانس و یا عصاره های گیاهی بر تقویت پارامترهای خونی و سلولهای سیستم دفاعی بدن و مقاومت در برابر بیماریهای شایع مثل آئروموناس، در گونه های مختلف ماهی انجام شده است. در همین راستا چند مطالعه در خصوص عصاره های دو گیاه گون و سرخارگل انجام شده که میتوان به آنالیز کمی و کیفی مواد و ترکیبات موثر در عصاره خصوصا گون با استفاده از روشهای مختلف مثل TLC ، HPLC، GC-MS اشاره نمود. محققین چینی و برخی از کشورها چندین مطالعه در خصوص تاثیر عصاره های گون بر انفجار تنفسی نوتروفیل، تغییرات پروتئین پلاسما، لیزوزیم، تغییرات سلولهای فاگوسیتی و ... انجام داده اند. در مطالعه حاضر تاثیر سه غلظت از عصاره دو گیاه سرخارگل و گون بر برخی از تغییرات ایمونولوژی (آنتی بادی IgM، اجزاء کمپلمان C3 و C4، رادیکال اکسیژن آزاد و لیزوزیم)و بیوشیمیایی (پروتئین کل، گلوکز و آلبومین) و هماتولوژی (نوتروفیل، مونوسیت و لمفوسیت) و همچنین مقاومت به استرپتوکوکوس اینیایی در بچه ماهی قزل آلا مورد ارزیابی قرار گرفته است.

٤-١- پارامترهای ایمونولوژی

دامنه تغییرات آنتی بادی IgM در تیمارهای حاوی غلظتهای مختلف عصاره های گون و سرخارگل بیشتر از تیمار شاهد بوده است. تغییرات میزان پادتن در سرخارگل اندکی بیشتر از گون بوده ولی اختلاف معنی داری ما بین تغییرات مذکور وجود نداشته است. بیشترین اختلاف مربوط به غلظت ۱/۵ گرم بر کیلوگرم سرخارگل و ۵ گرم بر کیلوگرم گون بوده و نشاندهنده آن است که با افزایش غلظت عصاره، تغییرات تیتر آنتی بادی میزان پادتن نیز مشهودتر بوده است. مطالعات نشان داده که عصاره گیاه گون دارای اثرات مثبت بر سیستم ایمنی ماهی دارد (Yin *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2008). برخی از محققین از غلظتهای بالاتر عصاره گون استفاده نموده اند که

میتوان به مطالعه Yin و همکارانش در سال ۲۰۰۹ اشاره نمود که از غلظت ۰/۵ درصد در جیره غذایی ماهی کپور معمولی استفاده نمود. بنابراین میتوان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت عصاره میتوان به نتایج بهتر دست یافت.البته گونه های مورد استفاده گیاه در نتیجه گیری نهایی نیز موثر خواهند بود. در مطالعه حاضر از گونه *glycyphyllos* گون استفاده شده ولی Yin و همکارانش از گونه *radix* استفاده نمودند. نتایج میزان پادتن در مطالعه Yin حاکی از افزایش معنی دار آن بعد از ۵ هفته بوده و دارای اختلاف معنی دار با نمونه کنترل بوده است. نتایج مطالعه مذکور نیز با مطالعه Yin و همکارانش مطابقت داشته ولی اختلاف معنی دار نبوده است. در مطالعه انجام شده توسط Ardo و همکارانش در سال ۲۰۰۸ مشخص گردید که عصاره گونه *membranaceus* گیاه گون فاقد اثرات معنی داری بر میزان پادتن در ماهی تیلاپیا بوده که با نتیجه مطالعه حاضر مغایرت داشته است. بنابراین غلظت مورد استفاده، گونه مورد استفاده و گونه ماهی مورد آزمایش در نتیجه نهایی تاثیرگذار خواهند بود. در مطالعه انجام شده توسط علیشاهی و همکاران (۱۳۸۸) مشخص گردید که عصاره گیاه دارواش تاثیر معنی دار بر تیتر آنتی بادی ماهی کپور معمولی داشته است.

میزان تغییرات اجزاء کمپلمان(C3 و C4) در تیمارهای حاوی عصاره های گون و سرخارگل در انتهای آزمایش، کمی افزایش داشته که فاقد اختلاف معنی داری با ۳۰ روز اول بوده ولی با این وجود تغییرات حاصله در جزء C3 کمپلمان در تیمارهای حاوی عصاره های گیاهی و کنترل دارای اختلاف معنی دار بوده است. به نظر می رسد که عصاره های مورد استفاده تاثیر چندانی بر اجزاء کمپلمان در غلظتهای مورد استفاده نداشته باشند و ارزیابی تغییرات اجزاء کمپلمان در غلظتهای بالاتر ضروری به نظر می رسد تا بتوان تحلیل درستی از بروز تغییرات احتمالی را مورد بررسی قرار داد. مطالعات مختلفی در خصوص تاثیر گیاه گون بر روند تغییرات سیستم ایمنی غیر اختصاصی ماهی انجام شده ولی تاکنون مطالعه ای در خصوص تاثیر عصاره های گیاه گون و سرخارگل بر اجزاء کمپلمان در ماهی انجام نشده و این مطالعه بعنوان اولین گزارش تلقی میگردد.

فرآیند فاگوسیتوز و فعالیت کشندگی توسط سلول‌های فاگوسیت یکی از مهمترین مکانیسم‌های دفاعی در برابر باکتری‌های بیماریزا می‌باشد. فاگوسیتهای ماهی قادر به تولید سوپر اکسید (O_2^-) در طی فرآیندی تحت عنوان انفجار تنفسی می‌باشند. فرم مذکور برای باکتریهای بیماریزا فوق‌العاده سمی می‌باشد. انفجار تنفسی با استفاده از نیتروبلو ترازولیوم تعیین مقدار شده که نشان دهنده رادیکالهای سوپراکسید درون سلولی است که توسط لوکوسیت‌ها تولید می‌شود، می‌باشند. تحریک کننده‌های گیاهی باعث افزایش فعالیت انفجار تنفسی فاگوسیت‌های ماهی می‌شوند. رادیکال آزاد اکسیژن یکی از فاکتورهای اختصاصی در انفجار تنفسی بوده که توسط برخی از سلولهای فاگوسیتوزی مثل نوتروفیل ترشح میگردد. نتایج این مطالعه نشان داد که تغییرات رادیکال آزاد اکسیژن در تیمارهای حاوی گون و سرخارگل در انتهای آزمایش دارای افزایش معنی دار بوده و در غلظتهای بالاتر نتایج نیز بهتر بوده است. در مقایسه نتایج تیمارها و کنترل مشخص گردید که تغییرات حاصله معنی دار بوده و با اضافه نمودن عصاره های دو گیاه سرخارگل و گون به جیره غذایی ماهی قزل آلا تغییرات

معنی داری در مقادیر تولید رادیکال آزاد حاصل میشود. در مطالعه انجام شده توسط Yin و همکـارنش ذر سـال ۲۰۰۹ مشخص گردید که بدنبال استفاده منفرد ۰/۵ درصد گونه *radix* گیاه گون و همچنین استفاده ترکیبـی ایـن گونه و عصاره گیاه *Ganoderma lucidum* ، فعالیت انفجار تنفسی و متعاقب آن تولید رادیکـال آزاد افـزایش مـی یابد. نتایج مطالعه Yin و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نشان داد که بدنبال استفاده از عصـاره گونـه *Scutellaria radix* بصورت منفرد و ترکیبی در غلظتهای صفر، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد، تغییرات معنی داری در انفجار تنفسی در ماهی تیلاپیا بوجود نیامده که با مطالعه حاضر مغایرت دارد. نتایج مطالعه Ardo و همکـارانش در سـال ۲۰۰۸ نشـان داد کـه بـدنبال اسـتفاده از غلظـت ۰/۵ درصـد دو عصـاره گـون گونـه *membranaceus* و عصـاره *Lonicera japonica* بصورت ترکیبی و منفرد و همراه با فلز بور، افزایش معنی داری در فعالیت انفجار تنفسی و رادیکال آزاد اکسیژن بوجود می آید. نتایج مطالعـه Ardo و همکـارانش بـا مطالعـه حاضـر مطابقـت دارد. نتـایج مطالعـات Peddie and Secombes در سال ۲۰۰۳ نشان داد که عصاره سرخارگل گونه *anguistifola* بهمراه دو عصاره گیاهی *Eupatorium perfoliatum* و *Baptista tinctoria* باعث افزایش فعالیت انفجار تنفسی و متعاقب آن رادیکـال آزاد در مـاهی قـزل آلا میشود. نتایج این مطالعه نیز با نتایج دو محقق ذکر شده مطابقت دارد.

لیزوزیم یکی از اجزای سیستم دفاع غیراختصاصی بدن بود که بر دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت تاثیر گذاشته و پیوند ۴-۱ گلیکوزیدی مابین پپتیدوگلیکان را از بین می‌برد. نتایج تغییرات آنزیم لیزوزیم در تیمارهای حاوی سرخارگل و گون نشان داد که در انتهای آزمایش میزان فعالیت لیزوزیم افزایش داشته است ولی این میزان معنی دار نبوده است. با افزایش غلظت عصاره، فعالیت لیزوزیم نیز افزایش بیشتری داشته است. به نظر می‌رسد با افزایش غلظت عصاره مورد استفاده، فعالیت لیزوزیم نیز افزایش معنی‌دار نشان دهد. میزان تغییرات لیزوزیم در تیمارهای حاوی سرخارگل و گون نسبت به تیمار کنترل دارای اختلاف معنی دار بوده است. بنابراین می‌توان پیش‌بینی نمود که با افزایش غلظت عصاره فعالیت لیزوزیم افزایش خواهد داشت. مطالعات انجام شده توسط محققین نشان داد که بدنبال استفاده از عصاره‌های گیاهی در جیره غذایی ماهی، میزان لیزوزیم افزایش یافته که این افزایش در برخی از مواقع نیز معنی‌دار بوده که بسته به گونه ماهی، غلظت عصاره گیاهی و نوع عصاره مورد استفاده متفاوت بوده است (Yin *et al*., 2009). در مطالعه انجام شده توسط Yin و همکاران در سال ۲۰۰۹ مشخص گردید که بهنگام استفاده ترکیبی از عصاره گیاه گونه *Radix* و عصاره گیاه *Ganoderma lucidum*، فعالیت لیزوزیم بعد از ۵ هفته افزایش داشته است. از آنجائیکه غلظت مورد استفاده عصاره در مطالعه Yin ۰/۵٪ بوده به نظر می‌رسد که با افزایش غلظت عصاره، تغییرات مشهودتر باشد. بیشترین غلظت سرخارگل در مطالعه حاضر ۱/۵ گرم بر کیلوگرم و گون نیز ۵ گرم بر کیلوگرم بوده است. مطالعات انجام شده توسط Yin و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نشان داد که استفاده از عصاره گونه *radix* و عصاره گیاه گونه *Scutellaria radix* در دو غلظت ۰/۱ و ۰/۵ درصد باعث افزایش فعالیت لیزوزیم پس از یک هفته می‌شود. این افزایش در گون بیشتر بوده و دارای اختلاف معنی‌دار بوده در صورتیکه در ارتباط با عصاره *Scutellaria* فاقد اختلاف معنی‌دار بوده است. در

مطالعه حاضر افزایش فعالیت لیزوزیم پس از ۶۰ روز مشاهده شده در صورتیکه در مطالعه Yin پس از ۷ روز بوده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت ارتباط مستقیمی مابین غلظت عصاره مورد استفاده و فعالیت لیزوزیم وجود دارد. مطالعه Ardo و همکاران ۲۰۰۸ نیز مطالعه حاضر را تائید می‌کند. وی نشان داد که استفاده منفرد و ترکیبی گون گونه *membranaceus* و گیاه *Lonicera japonica* باعث افزایش فعالیت لیزوزیم می‌شود.

۲-٤- پارامترهای فیزیولوژی

غلظت قند گلوکز در تیمارهای حاوی گون، سرخارگل و کنترل روند کاهشی داشته ولی غلظت اولیه و نهایی در تیمار گون بیشتر از سرخارگل و کنترل بوده است. تغییرات گلوکز در تیمار حاوی عصاره‌های گون در مقایسه با تیمار کنترل معنی‌دار بوده ولی هیچ گونه اختلاف معنی‌دار مابین غلظت گلوکز در تیمار سرخارگل و گون وجود نداشته است. Ardo در مطالعه خود نشان داد که استفاده از عصاره گیاهان گون بصورت منفرد و یا ترکیبی با عصاره گیاهی دیگر و همچنین فلز بور تغییرات معنی‌داری بر قند گلوکز در ماهی تیلاپیا وجود نداشته است. مطالعه نامبرده با مطالعه مذکور همخوانی داشته است. مطالعات انجام شده با عصاره‌های مختلف گیاهی نشان می‌دهد که اکثر عصاره‌های مورد استفاده باعث کاهش غلظت قند گلوکز در خون می‌شوند. نتایج مطالعات بیگلو و سوداگر، Sahu و همکاران ۲۰۰۷ و همچنین Citarasu و همکاران ۲۰۰۶ نشان داد که عصاره های گیاهی باعث کاهش گلوکز خون می شوند. این غلظت احتمالاً ناشی از کاهش اثرات مواد استرس‌زا در سرم باشد.

غلظت پروتئین کل سرم ماهی در هر سه تیمار گون، سرخارگل و کنترل در پایان دوره آزمایش، کاهش نسبی داشته و هیچگونه اختلاف معنی‌داری مابین سه تیمار مشاهده نشده است. میزان غلظت پروتئین در تیمار حاوی عصاره سرخارگل بیشتر از دو تیمار دیگر بوده ولی با این وجود اختلاف معنی‌داری ما بین آنها وجود نداشته است. در مطالعات انجام شده توسط محققین، نتایج ضد و نقیضی گزارش شده است. در مطالعه انجام شده توسط Ardo و همکارانش در سال ۲۰۰۸ مشخص گردید که عصاره گون گونه *membranaceus* بصورت منفرد و ترکیب با عصاره گیاهی دیگر و یا فلز بور در ماهی تیلاپیا در غلظت ۰/۵ درصد، هیچگونه تاثیر مثبتی بر کل سرم نداشته است. مطالعه Guanghong و همکارانش در سال ۲۰۰۷ نشان داد که عصاره گیاهان سنتی چینی باعث افزایش پروتئین پلاسما در ماهی کپور می‌شود. در مطالعه انجام شده توسط Dugenci و همکاران در سال ۲۰۰۳ مشخص گردید که برخی از عصاره‌های گیاهی نظیر دارواش، گزنه، زنجبیل باعث افزایش پارامترهای مختلف هماتولوژی و فیزیولوژی نظیر پروتئین کل در ماهی قزل آلا می‌شوند. نتایج مطالعات مذکور، مطابقتی با مطالعه حاضر نداشته است.

غلظت آلبومین نیز مشابه پروتئین کل در پایان دوره ۶۰ روزه، روند کاهشی داشته و هیچگونه اختلاف معنی‌داری مابین سه تیمار مورد بررسی وجود نداشته است. هرچند که میزان تغییرات پروتئین آلبومین در دو

تیمار حاوی گون و سرخارگل وجود داشته ولی فاقد اختلاف معنی‌دار با تیمار کنترل بوده است. نتایج مطالعات بیگلو و سوداگر نشان داد که عصاره‌های ریحان، دارچین و نعناع باعث افزایش پروتئین‌های کل از جمله آلبومین و گلوبولین در ماهی می‌شود. همچنین نتایج مطالعه Rao و همکاران در سال ۲۰۰۶ در ماهی *Labeo rohita* تغذیه شده با *Magnifera indica* باعث افزایش آلبومین و سایر پروتئین سرم می‌شود. نتایج مطالعه اشاره شده با مطالعه حاضر مغایرت دارد.

۳-٤ - پارامترهای هماتولوژی

در بررسی پارامترهای هماتولوژی برخی از گلبول‌های سفید نظیر نوتروفیل، مونوسیت و لمفوسیت در روزهای ۳۰ و ۶۰ مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که اولاً بیشترین افزایش مربوط به نوتروفیل بوده و تغییرات آن نیز معنی‌دار بوده ثانیاً بیشترین تغییرات مربوط به غلظتهای بالای عصاره‌های مورد آزمایش بوده است و ثالثاً تغییرات مابین نوتروفیل در تیمارهای حاوی عصاره و کنترل معنی‌دار بوده است. نوتروفیل‌ها از جمله سلولهای دفاعی بدن بوده که در دفاع غیر اختصاصی بدن دخالت مستقیم داشته و از جمله مهمترین سلول‌های تولید کننده رادیکال آزاد اکسیژن بوده و از اینرو از سلول‌های اصلی دخیل در فعالیت انفجار تنفسی می‌باشند. این سلول‌ها در فاگوسیتوز انواع ذرات بیگانه از جمله باکتریها و ویروسها دخالت مستقیم دارند.

مطالعات Peddie and Secombes در سال ۲۰۰۳ درخصوص عصاره گیاه سرخارگل بهمراه دو عصاره گیاهی دیگر نشان داد که عصاره‌های مورد استفاده باعث افزایش مهاجرت لوکوسیت های محیطی و همچنین افزایش فرآیند فاگوسیتوز در ماهی قزل‌آلا می‌شوند. فرآیندهای مذکور درارتباط با سلول‌هایی نظیر نوتروفیل، مونوسیت و لمفوسیت می‌باشد. نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها بواسطه تولید متابولیت‌های سلولی با سلول‌های NK ارتباط برقرار کرده و باعث ازبین بردن ذرات خارجی می‌شوند ولی سلول‌های لمفوسیت بیشتر در ایمنی سلولی هومورال دخالت داشته و لمفوسیت B و T در تولید متابولیت‌های ایمنی هومورال از جمله پادتن نقش اساسی دارند. اینترکولین‌ها از جمله متابولیت‌هایی هستند که در واکنش‌های مختلف ایمونولوژی نقش واسطه‌ای داشته و بعنوان کاتالیزور عمل می‌کنند. نتایج مطالعه Yin و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نشان داد که عصاره گیاه گون باعث افزایش فعالیت فاگوسیتوزی لوکوسیت‌های جدا شده از تیلاپیا در عرض یک هفته شده و این فعالیت نیز پایدار می‌باشد. مطالعه مذکور با مطالعه حاضر مطابقت داشته بطور تمامی لکوسیت‌های مورد بررسی افزایش نسبی داشته‌اند. نتایج مطالعه Yin و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نشان داد که غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ درصد عصاره گون باعث افزایش فعالیت فاگوسیتوزی سلول‌های فاگوسیت نظیر نوتروفیل و مونوسیت در ماهی تیلاپیا پس از ۳ هفته می‌شود. مطالعه Yin با مطالعه حاضر مطابقت داشته با این تفاوت که این افزایش پس از ۶۰ روز مشهودتر بوده است. در مطالعه Ardo و همکارانش در سال ۲۰۰۸ نیز افزایش فعالیت سلول‌های فاگوسیتی در ماهی تیلاپیا بدنبال استفاده از عصاره‌های گون و عصاره *Lonicera* بصورت منفرد و یا ترکیبی با یکدیگر و فلز بور مشاهده

شده است. Rao و همکارانش در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که بدنبال تغذیه ماهی *Leba rahita* با عصاره گیاه *Achyranthes aspera*، تعداد لوکوسیت‌های خونی از جمله نوتروفیل افزایش یافته و متعاقب آن نیز تولید آنیون سوپراکسید نیز افزایش نشان می‌دهد. مطالعه Rao با نتایج این حاضر که افزایش رادیکال آزاد اکسیژن و همچنین نوتروفیل بوده مطابقت دارد. در مطالعه انجام شده قاسمی پیربلوطی و همکاران (۱۳۹۰) مشخص گردید که اسانس گیاهانی نظیر مرزه بختیاری، آویشن دنایی ، مرزه خوزستانی، زرین گیاه و پونه کوهی تاثیر معنی داری بر هموگلوبین، هماتوکریت، مونوسیت و ائوزینوفیل نداشته است.

٤-٤- مواجهه سازی با باکتری استرپتوکوکوس اینیایی

نتایج آزمایشات مواجهه سازی ماهی در برابر استرپتوکوکوس اینیایی نشان داد که میزان بقاء در تیمارهای دریافت کننده عصار ه های گون و سرخارگل نسبت به تیمار کنترل به مراتب بیشتر بوده و غلظتهای بالاتر عصاره نتایج بهتری را بهمراه داشته اند (۹۱/۱۱ درصد برای سرخارگل، ۹۳/۳ درصد برای گون و کنترل ۴۴/۴۴ درصد). به نظر می رسد که استفاده از عصاره های گیاهان ذکر شده باعث تقویت سیستم ایمنی ماهی شده و مقاومت آن را در برابر استرپتوکوکوزیس افزایش می دهد. از آنجائیکه بیشترین تلفات این بیماری در ماهیانی با وزن ۱۰۰ گرم رخ می دهد سعی شده که انتخاب اولیه ماهی بصورتی باشد که پس از انتهای آزمایش به وزن مورد نظر رسیده تا آزمایشات مواجهه سازی با باکتری با دقت بیشتری انجام شود. مطالعات Yin و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان داد که بدنبال استفاده از عصاره گون و گیاه *Ganoderma lucidum* در جیره ماهی کپور، مقاومت آن در برابر آئرومونواس هیدروفیلا افزایش یافته که حاکی از اثرات مثبت عصاره گون بر سیستم ایمنی ماهیان گرمابی و سردآبی دارد. میزان بقاء ماهی کپور در تیمارهای ترکیبی و کنترل به ترتیب ۶۰ و ۱۰درصد بوده است. مطالعه Yin با مطالعه حاضر مطابقت دارد. نتایج مطالعات Ardo و همکارانش در سال ۲۰۰۸ نشان داد که بدنبال استفاده از تیمار ترکیب گون گونه *membranaceus* و *Lonicera japonica* بهمراه فلز بور، کمترین میزان مرگ و میر در ماهی تیلاپیا دریافت کننده آئرومونواس هیدروفیلا مشاهده شده است. در مطاعه حاضر از تیمار ترکیبی استفاده نشده و تیمارهای منفرد نیز نتایج خوبی را بهمراه داشته اند.

٥- نتیجه گیری

نتیجه گیری کلی حاصل از این مطالعه آنست که عصاره گیاهان سرخارگل و گون باعث تقویت سیستم ایمنی بویژه سیستم ایمنی غیر اختصاصی (لیزوزیم و رادیکال آزاد اکسیژن) و همچنین برخی از لوکوسیتهای خونی از جمله نوتروفیل شده و دارای اختلاف معنی داری با تیمار کنترل بوده اند. بیشترین نتایج مطلوب بدنبال استفاده از غلظتهای بالاتر عصاره ها رخ داده و به نظر می رسداحتمالا با افزایش غلظت بتوان به نتایج مطلوب تری دست یافت. در هر حال نیاز به بررسی بیشتری دارد. از طرف دیگر استفاده از عصاره های گون و سرخارگل باعث افزایش مقاومت بچه ماهیان قزل آلا در برابر استرپتوکوکوزیس می شود.

پیشنهادها

- با توجه به دستاوردهای این بررسی پیشنهاد می شود رژیم غذایی حاوی عصاره های موردآزمایش در سایر ماهیان نیز مورد بررسی قرار گیرد.

- با توجه به نقش عصاره های مورد استفاده در کنترل بیماری حاصل از باکتری استرپتوکوک پیشنهاد می شود اثر آن در برابر سایر گونه های استرپتوکوک و همچنین بیماریهای شایع میکروبی مورد بررسی قرار گیرد.

- پیشنهاد میگردد که عصاره های مورد استفاده بصورت ترکیبی با یکدیگر و با غلظتهای بالاتر مورد مقایسه قرار گرفته و نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد.

بخش سوم:
بررسی تاثیر عصاره های سیر(*Allium sativum*) و آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر روی انگل

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱۵۵
۱- مقدمه ۱۵۷
۲- مواد و روشها ۱۶۱
۳- نتایج ۱۷۹
۴- بحث ۲۶۲
پیشنهادها ۲۶۸

چکیده

امروزه همگام با توسعه پرورش ماهیان خاویاری در کشور، لزوم توجه به سلامت آبزیان و استفاده از موادی با منشاء طبیعی در مبارزه با عوامل بیماریزای این ماهیان امری ضروری محسوب می گردد. در این راستا کاربرد گیاهان دارویی بجای مواد شیمیایی در کنترل عوامل ایجاد کننده بیماری از جمله انگلها حائز اهمیت می باشد. از آنجائیکه انگلهای تک یاخته ای خارجی از مهمترین عوامل انگلی خارجی تهدید کننده ماهیان خاویاری محسوب می شوند. لذا این تحقیق با اهداف تعیین غلظتهای کشنده عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهی ایرانی، بررسی اثر بخشی و تعیین دوزهای تأثیرگذار عصاره های مذکور در کنترل انگل تک یاخته ای تریکودینا انجام پذیرفت.

مطالعات تعیین غلظتهای نیمه کشنده (LC_{50}) عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهی ایرانی نشان داد که این مقدار طی ۹۶ ساعت معادل ۷۶۶/۶۵ میلی گرم در لیتر و در مدت زمان یکساعت به میزان ۹۹۳۳/۴۴ میلی گرم در لیتر بوده است. همچنین بررسی غلظتهای نیمه کشنده (LC_{50}) عصاره هیدروالکلی سیر طی مدت ۹۶ ساعت معادل ۱۲۷۹/۹۷ میلی گرم در لیترو در مدت زمان یکساعت ۱۲۶۲۴/۰۸میلی گرم در لیتر تعیین گردید. طی انجام آزمایشات، کلیه فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب نظیر درجه حرارت، اکسیژن محلول، pH، نیتریت، نیترات، آمونیوم، هدایت الکتریکی و سختی در تیمارهای مختلف اندازه گیری شدند. بررسی تصاویر تهیه شده از مقاطع بافتی آبشش، کبد و پوست بچه تاسماهیان ایرانی که تحت تأثیر غلظتهای مختلف عصاره هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی در آزمایش مربوط به تعیین غلظتهای کشنده قرار داشتند، برخی از آسیب های میکروسکوپیک نظیر پرخونی، چسبندگی در رشته های آبششی، نکروز سلولی، وجود رنگدانه های ملانین رشته های اولیه در آبشش، عوارضی نظیر تورم ابری در هپاتوسیتها ، نکروزسلولی، پرخونی، افزایش رنگدانه های ملانین و مراکز ملانو ماکروفاژها در کبد و نیز تغییراتی نظیر پرخونی، افزایش ملانوفور و رنگدانه ملانین، افزایش سلول های موکوسی، افزایش حضور لنفوسیت، نکروز در لایه اپیدرم را در پوست نشان دادند. در بررسی گلبولهای سفید خون، اختلاف معنی دار آماری در میزان لنفوسیت و نیز نوتروفیل در تیمارهای مختلف مشاهده گردید($P<0.05$). ولی میزان مونوسیت و نیز ائوزینوفیل بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی دار آماری نشان نداد ($P>0.05$). طی انجام مطالعات تعیین غلظتهای نیمه کشنده عصاره های سیر و آویشن شیرازی، رفتارهای غیرطبیعی در بچه تاسماهیان ایرانی شامل افزایش تحریک پذیری، عدم تعادل، انقباض شدید عضلات و انحنای ستون فقرات در غلظتهای زیاد (تیمارهای ۴ تا ۷) این عصاره ها کاملاً مشهود بود .

پس از انجام مطالعات تعیین غلظتهای نیمه کشنده عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی و با توجه به نتایج بدست آمده نسبت به انجام مطالعات تعیین غلظتهای تأثیرگذار (EC_{50}) عصاره های مذکور در مبارزه با انگل تک یاخته ای تریکودینا اقدام گردید. در این بررسی محدوده غلظت ۲۰۰ تا ۶۰۰ میلی گرم در لیتر عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی برای انجام آزمایشات نهایی تعیین گردید. بر این اساس ضمن اینکه برای اولین بار

مشخص گردید که عصاره آویشن شیرازی می تواند در مبارزه با انگل تک یاخته ای تریکودینا مؤثر باشد، میزان EC_{50} این عصاره طی مدت یکساعت حمام برابر ۴۳۷/۶۲ میلی گرم در لیتر تعیین گردید. بمنظور تعیین غلظت مؤثره عصاره هیدروالکلی سیر بر روی انگل مذکور در بچه تاسماهیان ایرانی محدوده غلظت ۵۰ تا ۴۰۰ میلی گرم در لیتر تعیین و میزان EC_{50} این عصاره طی مدت یکساعت حمام برابر ۱۷۲/۵۸ میلی گرم در لیتر محاسبه شد. نتیجه شمارش افتراقی گلبولهای سفید خون در مطالعات تعیین EC_{50} عصاره ها، نشاندهنده اختلاف معنی دار آماری در میزان لنفوسیت، مونوسیت ونیز نوتروفیل در تیمارهای مختلف نبود($P>0.05$). در این بررسی میزان ائوزینوفیل در تیمارهای مختلف اختلاف معنی دار آماری را نشان دادند ($P<0.05$). طی انجام مطالعات تعیین غلظتهای مؤثره (EC_{50}) عصاره های سیر و آویشن شیرازی هیچگونه رفتار غیرطبیعی در بچه تاسماهیان ایرانی مشاهده نگردید که خود حاکی از عدم وجود شرایط استرس زا از قبیل تحریکات عصاره ها طی انجام آزمایش مذکور بوده است.

بررسی مدت زمان اثربخشی نهایی عصاره ها بمنظور حذف کامل انگل تریکودینا در تیمارهای مختلف نشان داد که دوز محاسبه شده (EC_{50}) عصاره هیدروالکلی سیر (۱۷۲/۵۸ میلی گرم در لیتر) و عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی (۴۳۷/۶۲ میلی گرم در لیتر) بترتیب حداکثر طی مدت زمان ۳ و ۵ ساعت توانایی حذف کامل انگل مذکور را دارند. این نتایج نشان داد که انگل مذکور از سطح آبشش و پوست بچه تاسماهیان ایرانی در تمامی تیمارهای عصاره هیدروالکلی سیر در مدت زمان ۹ ساعت بطور کامل حذف گردید. این زمان برای عصاره هیدرو الکلی آویشن شیرازی ۱۲ ساعت تعیین شد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی بترتیب با EC_{50} ، ۱۷۲/۵۸و ۴۳۷/۶۲ میلی گرم در لیتر در دسته مواد با سمیت کم طبقه بندی شده و جهت جایگزینی با مواد شیمیایی مناسب می باشند. این مطالعه نشان داد که شاخص درمانی عصاره هیدرو الکلی سیر معادل ۷۳/۱۵ بوده که نسبت به عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی با میزان ۲۲/۶۹ از مقدار بیشتری برخوردار بوده و بالطبع با توجه به تعریف این شاخص، از سلامتی بیشتری برخوردار است. با توجه به نتایج بدست آمده می توان به سلامتی عصاره های گیاهی مورد استفاده در این تحقیق و امکان جایگزینی این گیاهان دارویی با مواد شیمیایی تأکید نمود.

کلمات کلیدی: بچه تاسماهی ایرانی، عصاره هیدروالکلی سیر، عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی، انگل تریکودینا، LC_{50} ، EC_{50}

۱- مقدمه

نظر به توسعه تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری در کشور، لزوم توجه به عوامل بیماریزا و نیز پیشگیری و کنترل آنها امری ضروری محسوب می گردد. در میان عوامل بیماریزای تهدید کننده تاسماهیان، عوامل انگلی خارجی از اهمیت ویژه ای برخوردارند بطوریکه بر اساس بررسیهای جامع صورت گرفته (پروژه های بررسی کمی و کیفی بچه ماهیان خاویاری از مرحله تکثیر تا رهاکرد طی سالهای ۱۳۷۹الی ۱۳۸۲ و نیز طرح ملی بررسی وضعیت بهداشتی کارگاههای تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری طی سالهای ۱۳۸۴الی ۱۳۸۸) از جمله مهمترین عوامل تهدید کننده بچه تاسماهیان در محیطهای پرورشی، آلودگی آنها به انواع انگلهای تک یاخته ای خارجی می باشد. انگلهای تک یاخته ای خارجی می توانند سبب ایجاد بیماری و بروز تلفات در بچه ماهیان انگشت قد گردند (Hassan,1999). در این بین مهمترین تک یاخته ای خارجی شایع در بچه ماهیان خاویاری انگل *Trichodina* sp. بوده که این تک یاخته ای علاوه بر ایجاد جراحات پوستی، می تواند در آلودگی بچه ماهیان به انواع عوامل بیماریزای باکتریایی و قارچی نیز مؤثر باشد(Abd El-Galil ,2012). انگل تریکودینا بر روی آبشش و پوست ماهی زندگی نموده و بزرگترین گروه انگل تک یاخته ای ماهی بوده و از دیدگاه آسیب شناسی بسیار حائز اهمیت می باشند (Lyholt and Buchmann, 1995). تریکودینازیس (Trichodinasis) ضمن ایجاد اثرات مخرب پاتولوژیک، می تواند در مرگ و میر بچه ماهیان نیز بسیارتأثیرگذار باشد (Akoll, 2005). وقتی تعداد تریکودینا از ۲۵ عدد فراتر رود، تاثیرات بیشتری درامکان ایجاد تلفات در بچه ماهیان به همراه خواهد داشت (Eissa, 2004). ماهیان آلوده به انگلهای خارجی عموماً ماهیانی ضعیف با میزان بازماندگی کم بوده و در رقابت با شرایط سخت محیط های طبیعی از شانس بقاء کمتری برخوردار می باشند. با توجه به موارد مذکور، لزوم کنترل و حذف انگلهای تک یاخته ای خارجی ماهیان خاویاری ضروری بنظر می رسد (آذری تاکامی، ۱۳۷۶). لذا بمنظور حذف انگلهای مذکور استفاده از مواد شیمیایی مختلفی از جمله فرمالین و ترکیبات کلردار معرفی گردیده اند (Madsen *etal*, 2000). همچنین Eissa در سال ۲۰۰۴ به استفاده از پرمنگنات پتاسیم در آلودگی به تریکودینا اشاره نموده است. امروزه استفاده از مواد ضدعفونی کننده شیمیایی به منظور کنترل و حذف عوامل بیماریزا در آبزیان با توجه به دلایل مختلفی همچون ایجاد آلودگی های زیست محیطی، امکان بروز تلفات گسترده در ماهیان تحت درمان، وسعت زیاد استخرهای ماهیان پرورشی، لزوم خروج ارز از کشور به منظور واردات این مواد و در نهایت تاثیرات سوء بر مصرف کنندگان (تجمع باقیمانده های مواد شیمیایی و فلزات سنگین و...) با مسائل ومشکلات جدی روبرو می باشد. با توجه به ماهیت طبیعی و تأثیرات گیاهان دارویی در کنترل عوامل بیماریزا که از سالیان دور شناخته شده و در طب سنتی مورد استفاده قرار می گرفت، امروزه گرایش به استفاده از گیاهان دارویی در پزشکی و دامپزشکی از جمله در بهداشت و بیماریهای آبزیان بیش از پیش مورد توجه قرارگرفته است. با توجه به غنا و تنوع گیاهان دارویی کشور و لزوم جایگزینی مواد شیمیایی مورد استفاده در مبارزه با عوامل بیماریزا، ضرورت ارزیابی برخی از گیاهان دارویی بومی ایران بمنظور کنترل و

درمان بیماریهای ماهیان از جمله ماهیان خاویاری احساس می گردد. در این بین گیاهانی نظیر سیر و آویشن شیرازی از جمله گیاهان دارویی در این راستا محسوب می شوند.

خواص درمانی گیاهان دارویی از دیرباز مورد توجه بشر قرار گرفته است. از بین گیاهان دارویی، سیر با دارا بودن طیف وسیعی از خواص مفید از جایگاه ویژه ای در بین ملل مختلف برخوردار است. از آنجایی که در گیاهان دارویی بدلیل وجود مواد موثره در کنار سایر ترکیبات جانبی، شاهد عوارضی نظیر مواد شیمیایی نخواهیم بود این در حالیست که وجود ترکیبات جانبی علاوه بر کاستن از سمیت و اثرات ناخواسته مواد مؤثره، در متعادل نمودن اثرات درمانی نیز موثرخواهد بود (قلعه گلاب، ۱۳۷۸).

سیر با نام علمی *Allium sativum* و نام لاتین Garlic، گیاهی است دو ساله با پیازی مرکب که از قدیم الایام تا کنون به عنوان یکی از گیاهان مهم دارویی و چاشنی غذایی به کار برده می شود. تا سال ۲۰۰۶، حداقل ۲۶۴۰ مورد مطالعه علمی از جنبه های مختلف شیمیایی، فارماکولوژی، بالینی و اپیدمیولوژیکی بر روی سیر انجام شده است. مطالعات فارماکولوژی و بالینی بر روی سیر در زمینه اثرات ضد میکروبی، اثرات ضد سرطان، کاهش میزان قند خون، تحریک سیستم ایمنی، اثرات ضد التهابی و آنتی اکسیدانی آن انجام شده اند. مهمترین ترکیب سیر که خاصیت آنتی بیوتیکی دارد آلیسین است. آلیسین همان جزئی از سیر است که سبب تندی و طعم گزنده و خاصیت آنتی بیوتیکی سیر می شود. آلیسین یک ماده دارویی قدرتمند است که در برابر باکتریها، ویروسها، کپکها، مخمرها و ارگانیسم های دیگر مقاومت می کند. آلیسین ماده شکننده ای است و در درجه حرارت اتاق در مدت ۲۴ ساعت ترکیبهای دیگری می سازد. در یک مطالعه، سیر بعنوان یک ماده محرک رشد و بهبود دهنده تغذیه و کارایی غذا در ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) مورد استفاده قرار گرفته است. (Diab *etal* , 2002: Shalaby *etal*, 2006). مطالعات متعددی مبنی بر خواص ضد میکروبی سیر تازه یا عصاره فریز شده و خشک شده سیر بصورت پودر بر ضد باکتری های بیماریزای مختلف و نیز اثر آن بر بیماریهای قارچی (Adetumbi *etal*, 1986) و ویروس های بیماریزا انجام شده است (Weber *etal*, 1992). Han و همکاران در سال ۱۹۹۵ اعلام کردند که خواص آنتی بیوتیکی یک میلی گرم آلیسین، معادل IU ۱۵ پنی سیلین می باشد. به نظر می رسد سیر خرد یا له شده همراه سایر عصاره های گیاهی آثار پیشگیری کننده مناسبی بر علیه عوامل بیماریزای ماهی نظیر باکتری و قارچ داشته باشد و در بهبود ایمنی ماهی نیز مؤثر باشد (Adetumbi *etal*, 1986; Corzo-Martinez *etal*, 2007; Ress *etal*, 1993). در مطالعات انسانی نقش سیر در کاهش کلسترول کل، لیپوپروتئین کم چگال خون (LDL-C) و نیز کاهش فشار خون اثبات گردیده است (Adler, A.J. and Holub, B.J., 1997). همچنین تأثیر مصرف پودر سیر بر کاهش تجمع چربی ها در کبد، افزایش میزان اسیدهای صفراوی دفعی و نیز افزایش میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی، بهبود رشد، تغذیه، بقاء و افزایش پاسخ های ایمنی در همستر، ماهی و خوک (در مدلهای حیوانی) مورد بررسی قرار گرفته است (Diab *etal*, 2002; Dudek *etal*, 2006; Yaoling *etal*, 1998). در ارتباط با سیستم ایمنی محققین نشان دادند که ترکیب S-allyl

cystein موجود در سیر خرد شده، از متابولیسم سلولهای سرطانی جلوگیری کرده و باعث بهبود پاسخهای ایمنی می شود (Sumiyoshi, 1997). در یک مطالعه اثر اسانس سیر به عنوان یک ماده محرک سیستم ایمنی، بر شاخصهای هماتولوژی و ایمنی سلولی در فیل ماهی جوان پرورشی مورد بررسی قرار گرفت (تنگستانی و همکاران، ۱۳۹۰). همچنین در ارتباط با تأثیرات ضد انگلی سیر در آبزیان میتوان به مطالعات Madsen و همکاران در سال ۲۰۰۰ در ارتباط با تأثیر سیر در کنترل آلودگی مارماهی (*Anguilla anguilla*) به انگل تریکودینا اشاره نمود. ضمناً Chiamanat و همکاران در سال ۲۰۰۵ در تحقیقی کوتاه اثر سیر خام را بمنظور حذف انگل تک یاخته ای تریکودینا در بچه ماهیان تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) بررسی نمودند. در سال ۲۰۰۳، Buchmann و همکاران مطالعه ای در خصوص مقایسه اثربخشی پرکربنات سدیم و عصاره سیر بمنظور از بین بردن ترونت و توموسیست انگل ایک انجام دادند. Soko وBarker نیز در سال ۲۰۰۵ طی تحقیقی، اثر بخشی سیر له شده را بمنظور درمان ایک (*Ichthyophthirius multifiliis*) در ماهیان جوان تیلاپیا مورد مطالعه قراردادند. همچنین *Bartolome* و همکاران در سال ۲۰۰۷ در مطالعه ای اثرات افزودن عصاره الکلی سیر خام به غذای مولی سیاه (Black Molly) بمنظور پیشگیری از بیماری ایکتیوفتریازیس را بررسی نمودند.

آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora* یکی از شناخته شده ترین گیاهان دارویی در طب سنتی ایران و اروپا می باشد. این گیاه علفی معطر که طول آن حدود ۴۰ سانتی متر است دارای خواص دارویی بسیاری است. روغن سفید آویشن، تنتور و عصاره مایع آن بعنوان ترکیبات معطر در فراورده های غذایی کاربرد دارد. قسمت های درمانی این گیاه، سرشاخه ها و برگهای خشک شده آن می باشند. در طب سنتی از این گیاه بعنوان ضد اسپاسم، درمان سیاه سرفه، برونشیت، عفونت ریه، سرماخوردگی، آنفولانزا و ضد نفخ استفاده شده است. دم کرده آن نیز برای درمان عفونت گوش میانی، نفخ و تهوع استفاده می شود. عصاره آویشن بنام «تیمول» برای درمان آسم کاربرد دارد. ضماد آویشن برای نیش و گزیدگی حشرات مؤثر است. روغن آن سمی است و مصرف خوراکی ندارد. این گیاه برای درمان آفت و عفونت های قارچی حلق و دهان نیز استفاده می شود. فرآورده های دارویی مختلفی از گیاه آویشن ساخته شده و بطور گسترده مورد مصرف بیماران واقع می شود. شربت توسیان، قطره توسیگل، قطره توسیوین، قطره تیم آرتا و شربت تیمکس از اشکال دارویی آویشن می باشد که عمدتاً بعنوان ضد سرفه و خلط آور مصرف می شوند. محسن زاده وهمکاران در سال ۱۳۸۲ طی بررسی خواص ضد باکتریایی غلظتهای مختلف اسانس تعدادی از گیاهان دارویی کشور، بیان نمودند که اسانس آویشن بیشترین اثر ضد باکتریایی با روشMIC روی باکتریهایی اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و سود ومونواس ائروژینوزا را داشته است. نتایج حاصل از آزمایشات فیتوشیمی نشان دهنده وجود الکالوئید، ساپونین، فلاونوئید و تانن در آویشن می باشد. در خصوص اثرات ضد انگلی آویشن شیرازی مطالعه بسیار کمی صورت گرفته است. شیرانی بیدآبادی در سال ۱۳۸۷، تحقیقی تحت عنوان تأثیر مخلوط عصاره های هیدروالکلی آویشن شیرازی و بومادران و بره موم در درمان انگل لیشمانیوز جلدی روستایی را بر

روی مدل حیوانی اجرا نموده است. در سال ۱۹۸۵ مقایسه ای بین اثر ضد قارچی اسانس آویشن و نیستاتین صورت پذیرفت و نتیجه حاکی از اثرات قوی ترآویشن نسبت به نیستاتین بر روی قارچهای کاندیدا البیکنس، آسپرژیلوس فلاووس و تریکوفایتون منتاگریفایتیس می باشد. در سال ۱۹۸۰ در گونه دیگری از آویشن که دارای مواد مؤثره تیمول، کارواکرول و پارایتیس بوده است اثرات قویتری نسبت به نیستاتین روی آسپرژیلوس فومیگاتوس مشاهده شده است (جعفرزاده خسروی ، ۱۳۶۶).

تاکنون در ارتباط با کاربرد آویشن در آبزیان در خارج از کشور تحقیقی صورت نگرفته است (معصوم زاده و همکاران، ۱۳۸۹). سوابق تحقیق در زمینه تأثیر اسانس آویشن در آبزیان در داخل کشور منحصر به چندین تحقیق می باشد که از آن جمله می توان به پروژه پایان نامه دکترای تخصصی شریف روحانی در سال۱۳۸۳، با عنوان بررسی کاربرد اسانسهای گیاهی در کنترل آلودگیهای قارچی تخم قزل آلا اشاره نمود در این تحقیق چندین اسانس گیاهی از جمله آویشن در بررسی آزمایشگاهی (in vitro) با تکنیک حداقل غلظت مهار کنندگی MIC و کارگاهی (in vivo) مورد بررسی تجربی قرار گرفتند. از دیگر تحقیقات صورت گرفته در ارتباط با تأثیر آویشن شیرازی در آبزیان در ایران می توان به مطالعات انجام شده توسط آهنگرزاده و همکاران در سال ۱۳۸۶ تحت عنوان بررسی اثر آویشن شیرازی برروی تعداد کل باکتری و قارچ در مرحله انکوباسیون تخم ماهی کپور، علیشاهی و همکاران در سال ۱۳۸۷ با عنوان بررسی اثر ضد باکتریایی برخی عصاره های گیاهی بر باکتری آئروموناس هیدروفیلا عامل سپتی سمی در ماهی ، سلطانی و همکاران در سال ۱۳۸۸ تحت عنوان ارزیابی اثرات اسانس آویشن شیرازی بر میزان تفریخ تخم قزل آلای رنگین کمان و درصد بقای لارو آن در مقایسه با آب اکسیژنه و مالاشیت گرین، شریف روحانی و همکاران در سال ۲۰۱۲ تحت عنوان بررسی تأثیر خوراکی مقادیر مختلف اسانس آویشن شیرازی بر روی برخی از فاکتورهای خونی و سرمی تاسماهی ایرانی اشاره نمود. ولی هیچگونه مطالعه ای بر روی تأثیرات ضد انگلی این گیاه در آبزیان انجام نگرفته و این تحقیق اولین مورد می باشد.

در این راستا تحقیق حاضر با اهداف تعیین غلظتهای کشنده عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهی ایرانی، بررسی اثر بخشی و تعیین دوز های تأثیر گذار عصاره های مذکور در کنترل انگل تک یاخته ای تریکودینا انجام پذیرفت.

۲- مواد و روش ها

این تحقیق طی دو مرحله در انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان انجام گردید. درمرحله اول (سال ۱۳۹۰) تعیین غلظتهای کشنده (LC_{50}) عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی در زمانهای ۹۶ ساعت و یک ساعت و نیز مطالعات هماتولوژی، هیستوپاتولوژی و تعیین فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب انجام گردید.

در مرحله دوم (سال ۱۳۹۱) پس از مشخص شدن نتایج سال اول، اقدام به تعیین غلظتهای مؤثره (EC_{50}) عصاره های مذکور در کنترل انگل تک یاخته خارجی (تریکودینا) طی مدت یکساعت و نیز مطالعات هماتولوژی، هیستوپاتولوژی، تعیین فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب و نیز مطالعات آماری اجرا گردید.

۲-۱- مواد مورد استفاده:

۲-۱- الف- مواد مصرفی :

مواد مصرفی در این پروژه عبارتند از:

بچه تاسماهی ایرانی، عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی، لام ، لامل، تیغ اسکالپل، پنبه، فرمالین، پارافین، بوئن، گزیلل، هماتوکسیلین، ائوزین، ۱- بوتانول، اتانول ، اسیداستیک، اسید پیکریک، پارچه تنظیف، آب مقطر، سرم فیزیولوژی، هپارین، محلول رنگ آمیزی سلول‌های خونی گیمسا

۲-۱- ب- مواد غیر مصرفی :

وسایل و تجهیزات بکار رفته در این پروژه عبارتند از:

ترازوی دیجیتال با دقت۰/۰۱ گرم ، میکروسکوپ نیکون 50i، لوپ آزمایشگاهی ، وان نیم تنی، وان دو تنی، تشتک های پلاستیکی، آکواریوم و متعلقات مربوطه، ساچوک، ظروف پتری، اکسیژن متر دیجیتال ، pH متر دیجیتال ، ترمومتر دیجیتال، سطل پلاستیکی، سمپلر، بشر مدرج، استوانه مدرج، پوآر، پیپت مدرج، ظروف نمونه برداری ، ساعت آزمایشگاهی

تهیه نمونه عصاره های سیر و آویشن شیرازی بمنظور بررسی کیفیت :

بمنظور تهیه عصاره های سیر و آویشن شیرازی تماس‌ها و مکاتبات متعددی با شرکتهای فعال در این زمینه انجام پذیرفت. بطوریکه پس از اخذ نمونه هایی از شرکت های مورد نظر، کیفیت و میزان حلالیت عصاره ها در آب مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج بررسیها و نیز نظر به علمی بودن شرکت کشت و صنعت و فرآوری گیاهان دارویی سها جیسا و همچنین دارا بودن استانداردهای بین المللی ISO 9001 ، ISO 14001 ، HACCP و IQnet (سازمان جهانی کیفیت)، این شرکت بعنوان تأمین کننده عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی انتخاب گردید.

۲-۲- روش عصاره گیری و آزمایشات کمی و کیفی عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی:

روش عصاره گیری و آزمایشات انجام شده در شرکت تولید کننده عصاره های مورد استفاده در این مطالعه بشرح ذیل می باشد:

الف- روش عصاره گیری :

عصاره گیری به روش پرکولاسیون، با استفاده از اتانول ۵۵ درجه و در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد انجام گرفت. نسبت گیاه به حلال ۷ : ۱ تا ۱۰ : ۱ متغیر بوده که در این حالت از نسبت ۹ : ۱ استفاده شد. عصاره گیری به مدت ۴ تا ۵ ساعت انجام گرفت و پس از خاتمه عصاره گیری و فیلتراسیون، عصاره حاصله پاستوریزه گردید.

ب- روش و نتیجه آزمایشات کنترل کیفی :

۱-ب- آماده سازی محلول نمونه: ۲۰ میکرولیتر از عصاره، مستقیماً بر روی پلیت لکه گذاری گردید.

۲- ب- آماده سازی استاندارد: استاندارد تیمول با غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد (حجم مورد استفاده برای لکه گذاری ۲۰ میکرولیتر می باشد).

مشخصات **TLC** : TLC plastic sheets silica gel 60 F254

فاز متحرک : Ethyl acetate : Toluene (7 : 93)

تهیه معرف وانیلین :

۱- وانیلین یک درصد اتانولی

۲- اسید سولفوریک ۵ درصد اتانولی

معرف فوق به دو صورت استفاده می شود، یا ابتدا محلول شماره یک اسپری می شود که پس از خشک شدن ،محلول شماره دو اسپری می گردد یا اینکه محلول یک و دو ابتدا مخلوط شده و سپس بر روی صفحه اسپری می گردد. نکته قابل توجه در این فرایند این است که معرف باید بصورت تازه مصرف گردد و آب نیز نداشته باشد.

روش کار:

پلیت را داخل تانک اشباع قرار داده پس از پیشروی حلال به اندازه مناسب، پلیت را خشک نموده، در حرارت ۱۰۰ درجه سانتیگراد یا در جریان هوای گرم، معرف وانیلین بر روی آن اسپری می شود. پس از این فرایند، مطابقت بین لکه ها در ناحیه مرئی قابل ملاحظه می باشد.

جدول ۱- آنالیز عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی تولید شده

SOHA JISSA Co. Plentation Industries & Processing of Medicinal Plants			
Doc.No.F.0439	Certificate of Analysis: ***Zataria multiflora***		Batch No.025
Test	**Method**	**Standard**	**Result**
Color	Organoleptic	Ligth brown-Dark brown	Brown
Odor	Organoleptic	Natural odor	Natural odor
Dry residue (100-105°c/2h)	BP2009	1.5% - 4%	2.95%
Density	BP2009	0.96 – 0.99	0.97
pH	BP2009	4.5 – 6.5	5.34
Alcohol contents	In house	10% - 20%	19%
Identification	TLC	Conform	Conform
Assay (Total phenolic as thymol)	DAB10	85 – 120 mg/100cc	111.1 mg/100cc
Total bacterial count	USP32	Max. 10^2 per ml	Max. 10^2 per ml
Total mould and yeasts	USP32	0	0
Staphylococcus aureus	USP32	Absent	Absent
Pseudomonas aeroginosa	USP32	Absent	Absent
Salmonella	USP32	Absent	Absent
E. coli	USP32	Absent	Absent

۳-۲- روش عصاره گیری و آزمایشات کیفی عصاره هیدروالکلی سیر

الف- روش عصاره گیری:

عصاره گیری به روش پرکولاسیون، در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد با محلول آب/ اتانول (۴۵/۵۵) انجام گرفت. نسبت گیاه به حلال ۵ : ۱ تا ۹ : ۱ متغیر بوده که در این حالت از نسبت ۸ : ۱ استفاده شد. عصاره گیری به مدت ۸ تا ۱۰ ساعت انجام گرفت و پس از خاتمه عصاره گیری، عملیات پاستوریزاسیون و فیلتراسیون انجام گردید.

ب- روش و نتیجه آزمایشات کنترل کیفی:

۱-ب- آماده سازی محلول نمونه: ۲۰ میکرولیتر از عصاره، مستقیماً بر روی پلیت لکه گذاری گردید.

۲- ب- آماده سازی استاندارد: استاندارد آلیسین با غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد.

مشخصات **TLC** : TLC aluminium sheets silica gel 60 F254

فاز متحرک : Ethyl acetate : Toluene (30 : 100)

تست **TLC** : مقدار ۲۰ میلی لیتر عصاره را با ۵ تا ۲۰ میلی لیتر دی کلرومتان استخراج نموده و پس از عبور از محلول سولفات سدیم، در ظرف مناسب جمع آوری گردید. نمونه استخراج شده را بر روی بن ماری با دمای حداکثر ۴۰ درجه سانتیگراد تغلیظ نموده، تا نمونه کاملاً خشک شود. نمونه حاصله را در ۱ تا ۲ میلی لیتر متانول حل نموده و از این محلول برای لکه گذاری استفاده گردید. حجم مورد استفاده بمنظور لکه گذاری ۲۰ میکرولیتر می باشد.

آماده سازی معرف وانیلین: ۰/۸ گرم وانیلین را در ۴۰ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال نموده و پس از افزودن ۲ میلی لیتر اسید سولفوریک، کاملاً مخلوط شد.

روش کار:

پلیت لکه گذاری شده را داخل تانک اشباع قرار داده، پس از پیشروی حلال به اندازه مناسب، صفحه TLC خارج شد و سپس خشک گردید. بر روی پلیت گرم، معرف وانیلین را اسپری نموده و سپس به مدت ۳ تا ۵ دقیقه در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. در این حالت آلیسین موجود در نمونه (نزدیک به جبهه حلال) قرار خواهد گرفت. پس از این فرایند، تطابق بین لکه ها در ناحیه مرئی قابل مشاهده بود.

جدول ۲- آنالیز عصاره هیدروالکلی سیر تولید شده

SOHA JISSA Co. Plentation Industries & Processing of Medicinal Plants			
Doc.No.F.0438	Certificate of Analysis: ***Allium sativum***		Batch No.025
Test	**Method**	**Standard**	**Result**
Color	Organoleptic	Ligth brown-Dark brown	Brown
Odor	Organoleptic	Natural odor	Natural odor
Dry residue (100-105°c/2h)	BP2009	2% - 4%	3.03%
Density	BP2009	0.85 – 1	0.98
pH	BP2009	5 – 7	6.36
Alcohol contents	In house	10% - 20%	19%
Identification	TLC	Conform	Conform
Assay	DAB10	85 – 120 mg/100cc	108.2 mg/100cc
Total bacterial count	USP32	Max. 10^2 per ml	Max. 10^2 per ml
Total mould and yeasts	USP32	0	0
Staphylococcus aureus	USP32	Absent	Absent
Pseudomonas aeroginosa	USP32	Absent	Absent
Salmonella	USP32	Absent	Absent
E. coli	USP32	Absent	Absent

بمنظور اجرای این پروژه تحقیقاتی و در راستای دستیابی به اهداف این تحقیق، آزمایشات مختلفی به شرح ذیل پیش بینی و اجرا گردید. لذا با توجه به حجم عملیات و ماهیت اجرای این پروژه، مراحل اجرایی در دو سال بشرح ذیل صورت پذیرفت:

٤-۲- انتقال بچه تاسماهیان ایرانی و انجام مراحل عادت دهی

به منظور انجام آزمایشات تعیین غلظتهای کشنده عصاره ها، نسبت به انتقال بچه تاسماهیان ایرانی از استخرهای پرورشی مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر شهید دکتر بهشتی به وانهای نیم تنی فایبرگلاس در انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری و عادت دهی این ماهیان طی مدت ۴ هفته بمنظور شروع آزمایشات اقدام گردید.

تصویر ۱ – عادت دهی بچه تاسماهیان ایرانی قبل از اجرای آزمایشات LC_{50}

۵-۲-آزمونهای سنجش سمیت عصاره های سیر و آویشن شیرازی در بچه تاسماهی ایرانی:

در این تحقیق، آزمون سنجش سمیت بصورت ایستا (Static tests) انجام گردید. بطوریکه درطول اجرای این آزمایشات، آبزی در محیط ثابت آبی قرار داشته و هیچ تعویض آبی صورت نگرفت. با اجرای این آزمایشات میزان سمیت حاد عصاره های سیر و آویشن شیرازی در زمانهای مختلف تعیین گردید.

۱-۵-۲- تعیین غلظت نیمه کشنده (LC_{50})

یعنی غلظتی از ماده مورد بررسی که منجربه تلف شدن نیمی از جمعیت تحت آزمایش شود (James, 1986). میزان مرگ و میر در اثر تجویز ماده مورد نظر، یک پاسخ همه یا هیچ است، بدین معنی که آبزی تحت تأثیر سم یا می میرد و یا زنده می ماند.

لازم بذکر است میزان LC_{50} هیچگاه یک مقدار ثابت مطلق نبوده زیرا فاکتورهای زیادی نظیر اختلافات فردی، سنی، جنسی، وزنی، عوامل محیطی، ویژگیهای آب، نحوه تجویز و سایر فاکتورهای دیگر در تعیین LC_{50} مؤثر هستند (میرستاری، ۱۳۸۱).

LC_{50} را می توان با روش رسم منحنی دوز- پاسخ و با استفاده از روش آماری Probit Analysis بدست آورد. در این روش، منحنی را بر حسب میزان مرگ و میر به دوز یا غلظت های تجویز شده رسم می نمایند و از نقطه تلفات ۵۰ درصد روی محور عمودی، خطی افقی رسم می شود تا منحنی را قطع کند و از آنجا به محور افقی عمود می گردد و محل برخورد این دو، میزان دوز یا LC_{50} می باشد.

۲-۵-۲- اجرای آزمایشات تعیین غلظتهای کشنده (Lethal Concentration) :

بمنظور انجام آزمایشات تعیین غلظتهای کشنده عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی، بعد از طی مراحل آداپتاسیون، بچه تاسماهیان ایرانی به تشتکهای ۳۰ لیتری مجهز به سیستم هوادهی منتقل شدند. سپس آزمایشات بر اساس O.E.C.D(TRC,1984)[1] صورت گرفت. در این روش(O.E.C.D) بررسی ها بصورت استاتیک (ثابت) انجام گرفت. بدین معنی که محلول آزمایش در طی تست تغییر نکرده و میزان مرگ و میر ماهی برای آزمایشات تعیین غلظتهای کشنده طی ۴ روز و نیز یک ساعت ثبت گردید.

پس از ثبت میزان تلفات در رکوردگیری‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت (در آزمایشات ۹۶ ساعته) و نیز ۳۰ ، ۴۵ و ۶۰ دقیقه (در مطالعات یک ساعته) درصد تغییرات نسبت به شاهد تعیین و عدد پروبیت (Probit Value) آنها از جدول مخصوص (ANOVA) برداشت گردید و به همراه لگاریتم غلظت‌های بکار رفته به روش Probit analysis (Finney , 1971) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و با تحصیل ضرایب a (عدد ثابت) و b (شیب خط) معادله رگرسیون (y = a + bx) تشکیل گردید. سپس برای حل معادله و تعیین غلظت‌های کشنده (LC_{90} , LC_{50} , LC_{10}) عدد پروبیت آن از جدول ANOVA برداشته شده و به جای y در معادله قرار گرفت (Probit Value = a + b LogC) و با حل معادله و گرفتن Anti Log از LogC در معادله، مقایسه غلظت‌های کشنده LC_{90} , LC_{50} , LC_{10} برای زمان‌های مد نظر بدست می آید.

تصویر۲ – نمایی از تشتک های مورد استفاده در ازمایشات تعیین LC_{50}

1-Organization Economic Cooperation Development

- غلظت های نیمه کشنده ۹۶ ساعته عصاره های هیدرو الکلی سیر و آویشن شیرازی :

پس از سپری شدن مراحل آداپتاسیون بچه تاسماهیان ایرانی در وان های فایبر گلاس و نیز عدم مشاهده تلفات در این ماهیان، نسبت به آغاز انجام مراحل تعیین غلظت نیمه کشنده (LC_{50}) عصاره های سیر و آویشن شیرازی اقدام گردید. با توجه به عدم وجود منابع اطلاعاتی در خصوص تعیین محدوده دامنه دوزهای قابل استفاده در آزمایشات LC_{50} این دو عصاره در ماهیان، نیاز به انجام آزمایش مقدماتی تعیین دامنه ای از دوزهای مناسب ($Pre\text{-}LC_{50}$) بود که این کار طی دو مرحله و در هر مرحله با ۷ تیمار (هر تیمار با ۳ تکرار) که به روش لگاریتمی تعیین گردیده بودند اجرا گردید. در نهایت پس از تعیین دامنه دوزها، آزمایش اصلی LC_{50} با انتخاب ۷ تیمار (هر تیمار با ۳ تکرار) برای هریک از عصاره های هیدرو الکلی سیر و آویشن شیرازی به اجرا درآمد و نتایج کلیه مراحل جهت تجزیه و تحلیل ثبت گردید.

- غلظتهای کشنده یک ساعته عصاره های هیدرو الکلی سیر و آویشن شیرازی :

با توجه به اینکه در نظر است دوز ها و غلظتهای مؤثر این عصاره ها طی مدت یک ساعت تعیین گردد، بدین منظور لزوم تعیین اثرات غلظت های کشنده این عصاره ها طی مدت یک ساعت وجود داشت. لذا این امر با اجرای یک مرحله آزمایش مقدماتی تعیین دامنه ای از دوزهای مناسب ($Pre\text{-}LC_{50}$) انجام گردید. پس از مشخص شدن نتایج در این مرحله ، آزمایش اصلی LC_{50} با انتخاب ۷ تیمار (هر تیمار با ۳ تکرار) که بروش لگاریتمی تعیین گردیده بودند برای هریک از عصاره های سیر و آویشن شیرازی به اجرا درآمد و اطلاعات کلیه مراحل جهت تجزیه و تحلیل نهایی ثبت گردید. برای انجام این مطالعات از تشتکهای ۳۰ لیتری که مجهز به سیستم هوادهی بودند استفاده گردید. سپس بچه ماهیان مورد آزمایش که جهت آداپتاسیون در وانهای فایبرگلاس نگهداری می شدند،۲۴ ساعت قبل از آزمایش غذادهی آنها قطع گردید و سپس به تشتکها منتقل شدند. بطوریکه در هر تشتک ۱۰ عدد بچه تاسماهی ایرانی وارد گردید.

تصویر۳- افزودن عصاره ها به تیمارها

٦-۲- اجرای آزمایشات تعیین EC_{50} (Effective Concentration)

در این آزمایش دستیابی به غلظتی از عصاره های هیدروالکلی سیرو آویشن شیرازی مد نظر است که بتواند منجربه از بین رفتن نیمی از جمعیت انگل تریکودینا در بچه تاسماهیان ایرانی تحت آزمایش شود. بدین منظور پس ازجمع آوری تصادفی بچه تاسماهیان ایرانی از استخرهای خاکی پرورشی، بچه ماهیان مذکور همراه با آب استخر به وانهای نیم تنی در انستیتو منتقل شده و سپس نسبت به تعیین درصد شیوع و میانگین شدت انگل تریکودینا مبادرت گردید. پس از این مرحله، بچه تاسماهیان ایرانی به آکواریوم هایی که به منظور اجرای مراحل مختلف آزمایش تعیین نیمه غلظتهای مؤثره آماده شده بودند، منتقل و نسبت به تیماربندی بر اساس دوزهای تعیین شده که بصورت لگاریتمی محاسبه شده بودند، اقدام گردید.

EC_{50} را می توان با روش رسم منحنی دوز- پاسخ و با استفاده از روش آماری Probit Analysis بدست آورد. در این روش، منحنی را بر حسب میزان مرگ و میر به دوز یا غلظت های تجویز شده رسم می نمایند و از نقطه تلفات ۵۰ درصد روی محور عمودی، خطی افقی رسم می شود تا منحنی را قطع کند و از آنجا به محور افقی عمود می گردد و محل برخورد این دو، میزان دوز یا EC_{50} می باشد.

۷-۲-تعیین فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب

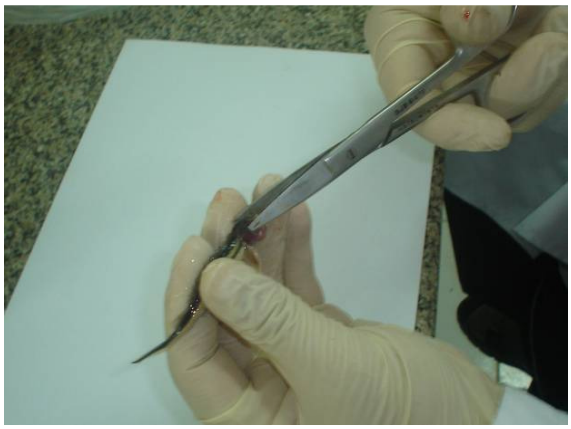
در این بررسی که به روش عیارسنجی ساکن بدون تعویض آب (Static Non Renewal Tests) انجام شد، پارامترهای فیزیکو شیمیایی آب همچون اکسیژن محلول (DO) ، دمای آب، pH بطور روزانه با استفاده از دستگاه های اندازه گیری صحرائی شرکت WTW و هدایت الکتریکی با استفاده از دستگاه هدایت سنج مدل EDT BA 380، سختی (سختی کربنات کلسیم) با استفاده از روش تیتراسیون، نیتریت، نیترات و آمونیاک نیز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر HACH مدل DR2800 به ترتیب با روش های 8507، 8192 ،8038 اندازه گیری شد.

تصویر ٤ - اندازه گیری اکسیژن محلول، دما و pH آب تشتک های حاوی ماهی

تصویر ۵ - اندازه گیری نیتریت، نیترات، آمونیوم

۸-۲- مطالعات هیستوپاتولوژی

به منظور ارزیابی اثرات هیستوپاتوژیک عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی در پایان مراحل تعیین LC_{50} (۹۶ ساعته و یکساعته) و نیز EC_{50} در خاتمه یکساعت از هر تیمار سه عدد ماهی بطور تصادفی انتخاب و از آبشش، پوست و کبد در مطالعات LC_{50} (۹۶ ساعته و یکساعته) و از آبشش و پوست در مطالعات EC_{50} جهت تهیه لامهای هیستوپاتولوژی نمونه برداری صورت گرفت. نمونه بافت های جمع آوری شده در داخل محلول تثبیت کننده بوئن قرار گرفت و برای این کار از ظروف ویژه نگهداری نمونه ها استفاده گردید و روی هر شیشه برچسب زده شد و نام و غلظت ماده مورد نظر ثبت گردید (رجحان،۱۳۷۶؛Happaranta *et al*.,1997).



تصویر ۷- نمونه برداری از پوست

تصویر۸ - نمای کلی آزمایشگاه محل تحقیق

به منظور تهیه اسلایدهای بافتی، مراحل آبگیری، شفاف سازی، پارافینه، قالبگیری، برش، رنگ آمیزی و مونته کردن بر روی بافتهای تثبیت شده انجام گردید(رجحان،۱۳۷۶؛Happaranta *et al*.,1997).

الف) مرحله آب زدایی (گرفتن آب از بافت و جایگزینی الکل به جای آب) :

پس از شستشوی بافت تثبیت شده(به منظور از بین بردن بو و رنگ فیکساتیو) ، اقدام به آبگیری (خروج آب از درون بافت) با استفاده از الکل های ۹۶، ۸۰، ۷۰، ۵۰ درجه و الکل ۱- بوتانول به شرح ذیل گردید (استفاده از الکل با درجات بالا در ابتدای کار سبب چروکیدگی و پارگی ناگهانی بافت می شود در نتیجه برای آبگیری به تدریج درجه الکل افزایش می یابد).

خلاصه مراحل فوق در مرحله آب زدایی به شرح ذیل می باشد:

- عبورنمونه بافت از الکل ۵۰ درجه به مدت نیم ساعت
- عبورنمونه بافت از الکل ۷۰ درجه به مدت نیم ساعت
- عبورنمونه بافت از الکل ۸۰ درجه به مدت نیم ساعت
- عبورنمونه بافت از الکل ۹۶ درجه به مدت نیم ساعت
- عبورمجدد نمونه بافت از الکل ۹۶ درجه به مدت نیم ساعت
- عبورنمونه بافت از الکل ۱- بوتانول به مدت یک ساعت
- عبورمجدد نمونه بافت از الکل ۱- بوتانول به مدت یک ساعت

ب) مرحله شفاف سازی(جایگزینی کلروفرم یا بنزن و یا گزیلول به جای الکل و جذب چربی بافت)

- عبورنمونه بافت از کلروفرم به مدت نیم ساعت
- عبورمجدد نمونه بافت از کلروفرم به مدت نیم ساعت

ج) مرحله پارافینه کردن بافت

برای نرم کردن نمونه ها، بافت های مورد نظر در مخلوط کلروفرم و پارافین خالص به شرح ذیل قرار گرفت:

- قرار دادن نمونه بافت در مخلوط کلروفرم و پارافین خالص نرم به نسبت یک به یک در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد
- قرار دادن نمونه بافتها در پارافین خالص نرم و تمیز در انکوباتور ۵۶ درجه سانتی گراد در دو مرحله و هر مرحله به مدت یک ساعت

د) مرحله قالبگیری

در این مرحله نمونه بافتها در داخل قالبهای ویژه قرار گرفته و با استفاده از پارافین مذاب پوشانده شدند. پس از سرد شدن قالبهای پارافین حاوی نمونه، بافت جهت تهیه برشهای بافتی آماده گردید.

هـ) مرحله تهیه برش

در این مرحله با استفاده از میکروتوم دوار برش های بافتی به ضخامت ۵ الی ۷ میکرون تهیه گردید. سریالهای بافتی پس از رفع چین و چروک ایجاد شده با استفاده از آب گرم ۳۷ درجه سانتی گراد(با استفاده از بن ماری)،روی لام های آزمایشگاهی قرار داده شدند. لامها قبل از استفاده کاملاً تمیز شده، به لایه ای نازک از ژلاتین جهت نگهداری بافتها، آغشته گردیده و سپس برای ورود به مرحله بعد حداقل به مدت ۴۸ ساعت درانکوباتورقرار داده شدند(Akahundov&Fedorovo,1995).

تصویر۹- آغشته کردن لامها به ژلاتین

تصویر۱۰- برش دادن بافت با استفاده از میکروتوم

رنگ آمیزی:

رنگ آمیزی اسلایدهای بافتی جهت مطالعات بافت شناسی امری ضروری است. لذا اسلایدهای بافتی با استفاده از روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین(H&E) رنگ آمیزی شدند (Hung *et al.*,1990). در رنگ آمیزی به روش فوق نمونه بافت ها از مراحل ذیل عبور می کنند:

۱- عبور لام حاوی نمونه بافت از گزیلول در دو مرحله و هر مرحله به مدت ۵-۳ دقیقه(جهت پارافین گیری)

۲- عبور لام حاوی نمونه بافت از الکل ۱۰۰ درجه به مدت ۱۰ ثانیه

۳- عبور لام حاوی نمونه بافت از الکل ۱۰۰ درجه به مدت۵-۳ دقیقه

۴- عبور لام حاوی نمونه بافت از الکل ۹۶ درجه به مدت ۱۰ ثانیه

۵-عبور لام حاوی نمونه بافت از الکل ۸۰ درجه به مدت ۱۰ ثانیه

۶-عبور لام حاوی نمونه بافت از الکل ۷۰ درجه به مدت ۱۰ ثانیه

۷-شستشوی لام حاوی نمونه بافت با آب جاری به مدت ۲-۱ دقیقه

۸-عبور لام حاوی نمونه بافت از رنگ هماتوکسیلین به مدت ۷-۵ دقیقه

۹- شستشوی لام حاوی نمونه بافت با آب جاری به مدت ۲-۱ دقیقه

۱۰-عبور لام حاوی نمونه بافت از اسیدکلریدریک۱٪ به مدت ۱ثانیه(گرفتن رنگ اضافی)

۱۱- شستشوی لام حاوی نمونه بافت با آب جاری به مدت ۲-۱ دقیقه

۱۲- عبور لام حاوی نمونه بافت کربنات لیتیم به مدت ۴-۳ثانیه(ثابت کردن رنگ)

۱۳- شستشوی لام حاوی نمونه بافت با آب جاری به مدت ۲-۱ دقیقه

۱۴- عبور لام حاوی نمونه بافت از رنگ ائوزین به مدت ۱۰ثانیه

۱۵- عبور لام حاوی نمونه بافت از الکل ۷۰ درجه به مدت ۱۰ ثانیه

۱۶- عبور لام حاوی نمونه بافت از الکل ۸۰ درجه به مدت ۱۰ ثانیه

۱۷- عبور لام حاوی نمونه بافت از الکل ۹۶ درجه به مدت ۱۰ ثانیه

۱۸- عبور لام حاوی نمونه بافت از الکل ۱۰۰ درجه به مدت۱۰ ثانیه

۱۹- عبور لام حاوی نمونه بافت از گزیلول به مدت ۱ دقیقه (شفاف شدن بافتها)

۲۰- عبور لام حاوی نمونه بافت از گزیلول به مدت ۵ دقیقه

تصویر ۱۱- رنگ آمیزی اسلایدهای بافت آبشش

پس از طی مراحل فوق و خشک شدن بافت در هوای آزاد، کاملاً تمیز شده وتوسط چسب کانـدابالزام لامـل روی لام چسبانده شد.

تصویر۱۲- چسباندن لامل بر روی لام با استفاده از چسب کاندابالزام

پس از رنگ آمیزی لام های حاوی نمونه بافت، اسلایدهای بافتی به کمک میکروسکوپ نوری مجهز به مانیتور و دوربین عکاسی تصویربرداری گردیده و مورد مطالعه قرار گرفتند.

۹-۲- مطالعات هماتولوژی

بمنظور ارزیابی تأثیر عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی بر روی فاکتورهای خونی در آزمایشات LC_{50} و EC_{50} ، این مطالعه انجام پذیرفت. در این تحقیق با توجه به کوچک بودن سایز بچه تاسماهیان ایرانی مورد مطالعه (حدود ۳ گرم)، امکان خونگیری توسط سرنگ از طریق سیاهرگ دمی (caudal vein) امکانپذیر نبود لذا عملیات خونگیری از طریق قطع ساقه دمی انجام شد. با توجه به مقدار خون بسیار کم جمع آوری شده از هر ماهی، امکان انجام مطالعات سرولوژیک مهیا نگردید و فقط به شمارش افتراقی گلبولهای سفید (عامری مهابادی، ۱۳۷۸) بسنده شد.

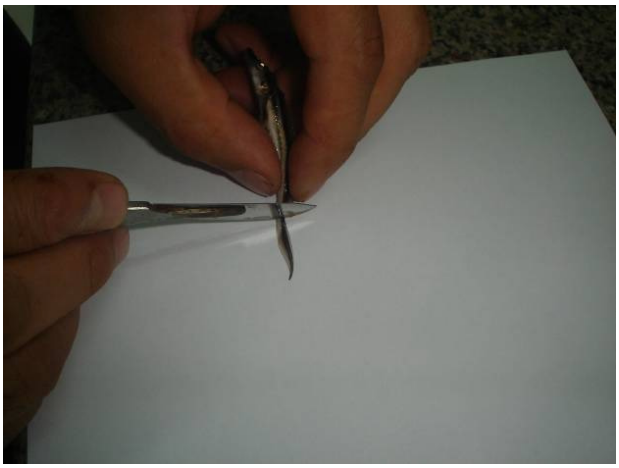
شمارش افتراقی گلبول های سفید Differential leucocyte count (leucogramme)

به منظور محاسبه و تعیین میزان فراوانی هر گروه از لکوسیت ها، لایه مناسبی از یاخته های خونی روی اسلایدهای میکروسکوپی به روش دولامی (یک لام به عنوان گسترش دهنده و لام دیگر که قطره خون روی آن قرار می گرفت به نام لام گسترش) تهیه شد. دو سر لام گسترش بین دو انگشت قرار داده شد، سپس یک قطره خون روی لام قرار گرفت و با دست دیگر لام گسترش دهنده با زاویه ۴۵درجه، قطره خون به عقب کشیده و وقتی خون به لبه رسید لام گسترش دهنده به جلو رانده شد و گسترشی یکنواخت و پیوسته به وجود آمد. جهت جلوگیری از تغییر شکل یاخته ها و تأثیر منفی میکروارگانیسم ها پس از خشک شدن اسمیرها، بلافاصله

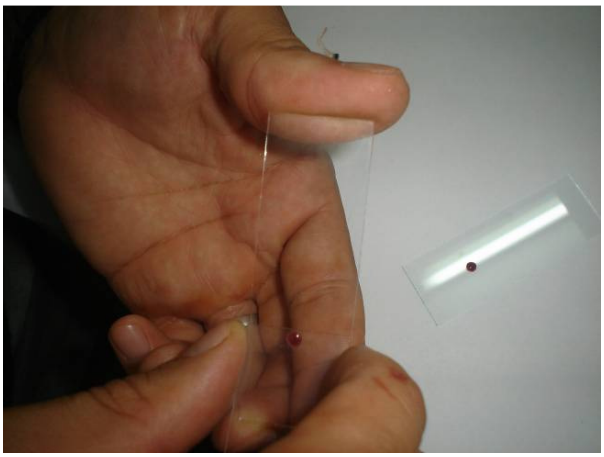
اقدام به تثبیت آنها به وسیله متانول شد. در نهایت با استفاده از محلول رقیق ۱۰ درصد گیمسا (گیمسا به آب مقطر ۱ به ۹) لام ها به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه رنگ آمیزی شدند و پس از خشک شدن در هوای آزاد مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند (Klontz, G.W., 1994).

نحوه شمارش افتراقی لکوسیت ها:

به کمک عدسی ۴۰ میکروسکوپ نوری نیکون E600 شمارش افتراقی گسترش یاخته های سفید خون صورت گرفت. یاخته های سفید بر اساس شکل، رنگ و اندازه هسته و سیتوپلاسم شناسایی و شمارش توسط دستگاه شمارنده صورت گرفت. برای تعیین افتراقی یاخته های سفید از هر نمونه سه اسلاید، ۳۰ میدان و ۳۰۰ یاخته مورد شمارش قرار گرفت.



تصویر ۱۳– قطع ساقه دمی بچه تاسماهی بمنظور تهیه گسترش خونی



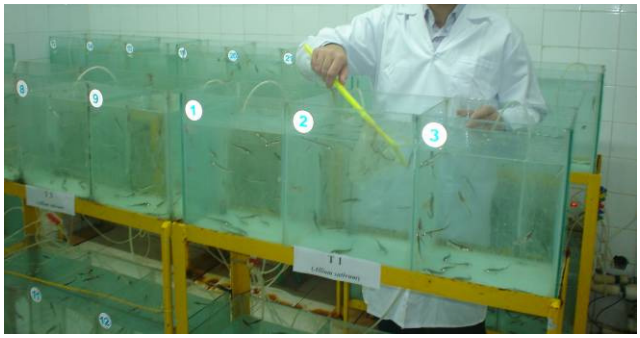
تصویر۱٤ – تهیه گسترش خونی

۱۰-۲-مطالعات انگل شناسی

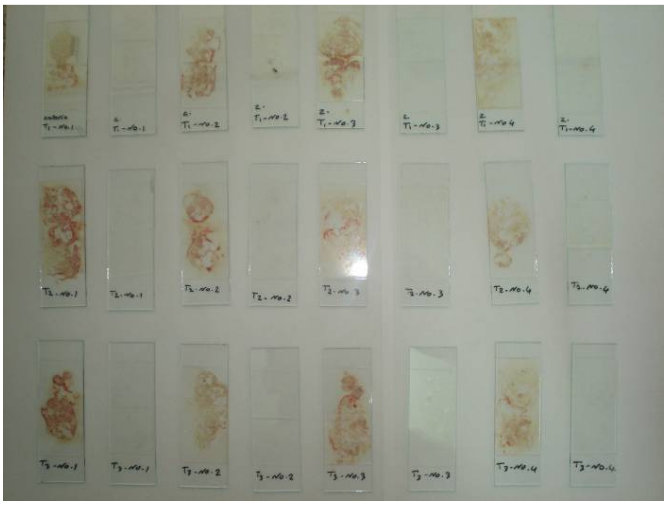
پس از انتقال بچه تاسماهیان ایرانی از استخرهای پرورشی خاکی، تخلیه بچه تاسماهیان همراه با آب استخرهای محل پرورش آنها در وانهای نیم تنیصورت پذیرفت. به منظور اجرای آزمایشات تعیین EC_{50} عصاره ها، برای هر یک از عصاره های سیر و آویشن شیرازی (قبل از انتقال بچه ماهیان به آکواریوم ها به منظور تیماربندی دوزهای مورد مطالعه)، نسبت به نمونه برداری از تعداد ۵۰ عدد بچه تاسماهیان ایرانی اقدام گردید. بدین منظور نسبت به تهیه لامهای مرطوب از پوست و آبشش با استفاده از روشهای رایج (Fernando *et al*., 1972 و Stoskope,1993) و مطالعه توسط میکروسکوپ نیکون 50i بهمراه مانیتور متصل به آن برای هریک از بچه ماهیان اقدام شد. پس از شمارش تعداد انگلهای تریکودینا در لامهای مرطوب تهیه شده از پوست و آبشش، نسبت به ثبت تعداد انگلهای شمارش شده هر ماهی در جداول ویژه ای اقدام گردید. سپس بمنظور تعیین درصد شیوع و میانگین شدت انگل تریکودینا (بر اساس فرمولهای ذیل) اقدام شد.

درصد شیوع = (تعداد ماهی آلوده به انگل ÷ تعداد کل ماهیان نمونه برداری شده) ×۱۰۰

میانگین شدت = تعداد انگل شمارش شده ÷ تعداد بچه ماهی دارای انگل



تصویر ۱۶- نمونه برداری از تیمارها بمنظور مطالعات انگل شناسی



تصویر۱۷ – لامهای آماده شده جهت مطالعات انگل شناسی

۱۱-۲- تأثیر گذاری ضد انگلی عصاره ها

بمنظور ارزیابی میزان تأثیرات دوزهای مختلف عصاره ها در تیمارها و تعیین درجه تأثیرگذاری ضد انگلی (Antiparasitic efficacy test) عصاره ها در هریک از تیمارهای مورد مطالعه، از رابطه زیر استفاده گردید (Yao *etal*, 2011).

$$E = (C - T) \times 100/C$$

E = درجه تأثیر ضد انگلی

C = میانگین شدت انگل تریکودینا در شاهد

T = میانگین شدت انگل تریکودینا در هر دوز مورد استفاده (هر تیمار)

هر چقدر مقدار E در بین تیمارهای مختلف بیشتر باشد میزان تأثیر گذاری آن دوز بیشتر خواهد بود.

۱۲-۲- تعیین شاخص درمانی (Therapeutic index):

بمنظور تعیین میزان ایمن بودن (Safety Factor) عصاره های مورد استفاده، این شاخص تعیین گردید. بزرگی شاخص درمانی مبین خطرات و سمیت کمتر عصاره می باشد. این شاخص طبق فرمول زیر از نسبت LC_{50} به EC_{50} در مدت زمان مورد نظر بدست می آید (ابطحی و همکاران، ۱۳۸۴) :

$$T.\ index = LC_{50} / EC_{50}$$

۱۳-۲- جمع آوری داده ها و تجزیه و تحلیل آماری

پس از خاتمه هر مرحله از آزمایشات و پس از جمع آوری داده ها، بمنظور تجزیه و تحلیل آماری و رسم نمودارهای مربوطه از نرم افزارهای SPSS ver 17.0 و Excel 2007 و به منظور بررسی توزیع نرمال

داده ها در گروه ها و تکرار ها جهت تشکیل تیمار ها از آزمون Kolmogorov-smirnov استفاده شد. در این مطالعه از آزمونهای One Way Anova، آزمون دانکن، آزمون و ضریب همبستگی پیرسون استفاده گردید. بمنظورانجام محاسبات LC_{50} و EC_{50} نیز از روش Probit analysis (Finney , 1971) استفاده شد.

۳- نتایج

۱-۳- مطالعه اثرات عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی

بمنظور بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهی ایرانی، نسبت به انجام مطالعات تعیین غلظتهای کشنده عصاره مذکور، تعیین فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب، مطالعات هماتولوژی و هیستوپاتولوژی اقدام گردید که نتایج آن بشرح ذیل می باشد :

۱-۱-۳- تعیین غلظتهای نیمه کشنده عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهی ایرانی

بمنظور تعیین غلظتهای کشنده عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهیان ایرانی با میانگین وزنی ۰/۵۱ ± ۳/۲۲ گرم و میانگین طولی ۰/۶۵ ± ۹/۱۷ سانتیمتر طی دو زمان ۹۶ ساعت و یک ساعت، ضمن انجام آزمایشات مربوطه، نمونه برداریهای لازم هم صورت پذیرفت.

- مطالعه غلظتهای نیمه کشنده طی ۹۶ ساعت (LC_{50}- 96 h):

در این تحقیق به منظور یافتن محدوده غلظت عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی، آزمایشات ابتدایی ($pre\text{-}LC_{50}$) بر روی بچه تاسماهیان ایرانی انجام پذیرفت. با توجه به عدم وجود منابع اطلاعاتی در خصوص غلظتهای نیمه کشنده این عصاره در ماهیان خاویاری، لزوم انجام آزمایشات مقدماتی تعیین دامنه ای از دوزهای مناسب ($pre\text{-}LC_{50}$) وجود داشت لذا این کار طی دو مرحله و در هر مرحله با ۷ تیمار (هر تیمار با ۳ تکرار) اجرا گردید و سرانجام محدوده غلظت ۵۰۰ تا ۱۴۰۰ میلی گرم در لیتر برای انجام آزمایشات نهایی در نظرگرفته شد. بر اساس محاسبات لگاریتمی ۷ تیمار (۵۰۰، ۵۸۳، ۶۹۴، ۸۲۸، ۹۸۶، ۱۱۷۴ و ۱۴۰۰ میلی گرم لیتر) در نظر گرفته شد و نسبت به گروه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۳). همچنین میزان LC_{10} ، LC_{50} و LC_{90} عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی طی مدت زمان ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت محاسبه گردید (جدول۴). بر این اساس میزان LC_{50} این عصاره طی مدت ۴ روز معادل ۷۶۶/۶۵ میلی گرم در لیتر تعیین شد. معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی (R^2) حاکی از وجود ارتباط مستقیم (همبستگی قوی و مثبت) بین غلظتهای مورد بررسی با میزان تلفات بچه تاسماهیان ایرانی می باشد (نمودارهای ۱ الی ۴). ازلحاظ رفتاری علائمی از قبیل افزایش ترشح موکوس، تحریک پذیری، عدم تعادل، انقباض شدید عضلات و انحنای ستون فقرات عمدتاً در غلظتهای زیاد

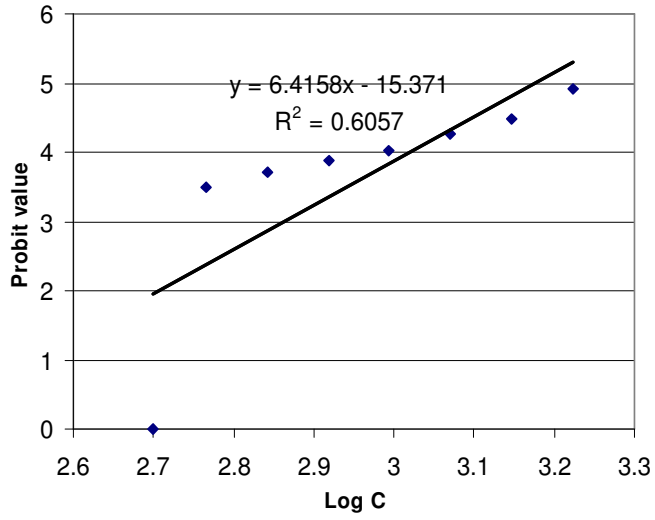
مشاهده شد. نتایج نشان داد که طی زمانهای ۲۴ الی ۹۶ ساعت، مقادیر LC_{10}، LC_{50} و LC_{90} کاهش می یابد. بدین معنی که مقاومت ماهیها در مدت زمان کوتاه بیشتر بوده و ماهیها توانایی تحمل غلظت بالاتری از عصاره را دارا می باشند ولی با گذشت زمان مقاومت بچه تاسماهیان ایرانی کاهش می یابد.

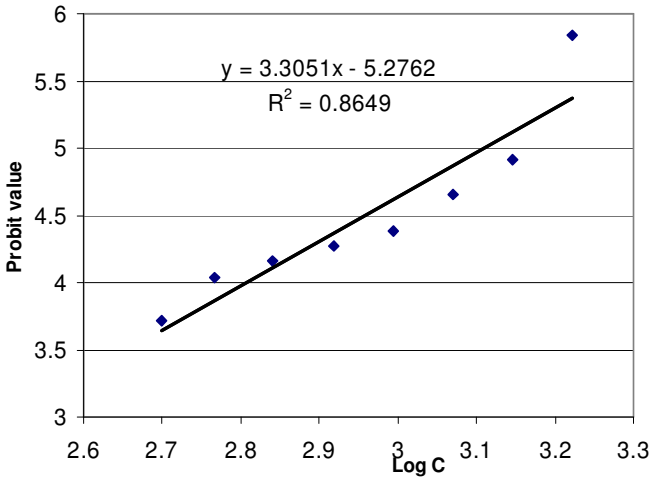
جدول ۳ ـ مقایسه اثر تیمارهای مختلف آویشن شیرازی روی مرگ و میر بچه ماهیان ۵ ـ ۳ گرمی تاسماهی ایرانی (میانگین ۳ تکرار) طی ۹۶ ساعت

تیمار	غلظت آویشن شیرازی (ppm)	۲۴ ساعت		۴۸ ساعت		۷۲ ساعت		۹۶ ساعت		تغییرات نسبت به شاهد				لگاریتم غلظت آویشن شیرازی	Probit value			
		مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
شاهد	۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
I	۵۰۰	۰	۱۰	۱	۹	۲	۸	۲/۳۳	۷/۶۷	۰	-۱۰	-۲۰	-۲۳/۳	۲/۶۹۹۰	۰	۳/۷۱۸۴	۴/۱۵۸۴	۴/۲۷۱۰
II	۵۸۳	۰/۶۷	۹/۳۳	۱/۶۷	۸/۳۳	۲/۳۳	۷/۶۷	۳/۳۳	۶/۶۷	-۶/۷	-۱۶/۷	-۲۳/۳	-۳۳/۳	۲/۷۶۵۷	۳/۵۰۱۵	۴/۰۳۳۹	۴/۲۷۱۰	۴/۵۶۸۴
III	۶۹۴	۱	۹	۲	۸	۲/۶۷	۷/۳۳	۳/۶۷	۶/۳۳	-۱۰	-۲۰	-۲۶/۷	-۳۶/۷	۲/۸۴۱۴	۳/۷۱۸۴	۴/۱۵۸۴	۴/۳۷۸۱	۴/۶۶۰۲
IV	۸۲۸	۱/۳۳	۸/۶۷	۲/۳۳	۷/۶۷	۳/۶۷	۶/۳۳	۵	۵	-۱۳/۳	-۳۳/۳	-۳۶/۷	-۵۰	۲/۹۱۸۰	۳/۸۸۷۷	۴/۲۷۱۰	۴/۶۶۰۲	۵/۰۰۰۰
V	۹۸۶	۱/۶۷	۸/۳۳	۲/۶۷	۷/۳۳	۴/۳۳	۵/۶۷	۵/۶۷	۴/۳۳	-۱۶/۷	-۲۶/۷	-۴۳/۳	-۵۶/۷	۲/۹۹۳۹	۴/۰۳۳۹	۴/۳۷۸۱	۴/۸۳۱۳	۵/۱۶۸۷
VI	۱۱۷۴	۲/۳۳	۷/۶۷	۳/۶۷	۶/۳۳	۵/۳۳	۴/۶۷	۷/۳۳	۲/۶۷	-۲۳/۳	-۳۶/۷	-۵۳/۳	-۷۳/۳	۳/۰۶۹۷	۴/۲۷۱۰	۴/۶۶۰۲	۵/۰۸۲۸	۵/۶۲۱۹

جدول ٤ ـ غلظتهای کشنده آویشن شیرازی طی ٤ روز روی بچه تاسماهی ایرانی

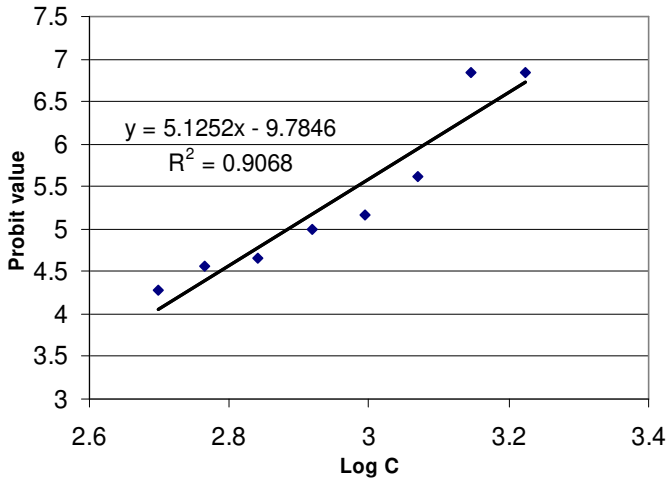
نام ماده	مقدار LC	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
آویشن شیرازی	LC_{10}	۹۴۴/۷۱	۵۲۶/۵	۴۶۶/۰۱	۴۳۱/۱۲
	LC_{50}	۱۴۹۶/۶۸	۱۲۸۵/۵۸	۹۲۱/۲۹	۷۶۶/۶۵
	LC_{90}	۲۳۷۰/۲۸	۲۰۳۹/۷۸	۱۸۱۹/۷	۱۳۶۳/۶۴



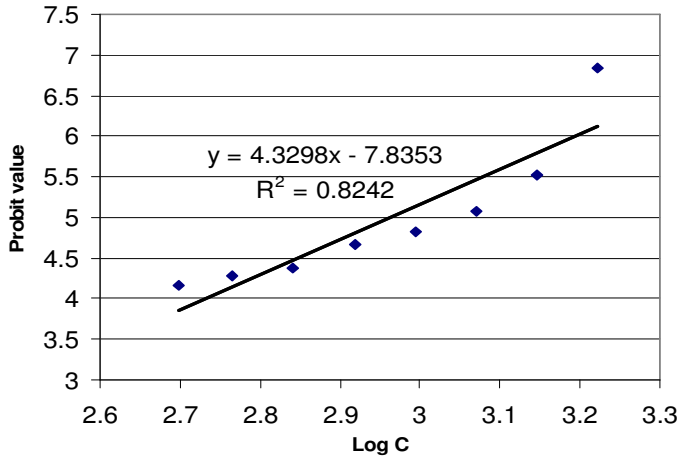


نمودار ۱:معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی probit value با لگاریتم غلظت آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ۲٤ ساعت

نمودار ۲:معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی probit value با لگاریتم غلظت آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ٤۸ ساعت



نمودار ۳:معادله خط رگرسیون آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ۷۲ ساعت



نمودار ٤:معادله خط رگرسیون آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ۹٦ ساعت

- مطالعه غلظتهای نیمه کشنده طی یک ساعت (LC_{50}- 1 h) :

بمنظور یافتن محدوده غلظت عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی، آزمایشات ابتدایی ($pre\text{-}LC_{50}$) بر روی بچه تاسماهیان ایرانی انجام گرفت و سرانجام محدوده غلظت ۸۵۰۰ تا ۱۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر برای انجام آزمایشات نهایی تعیین گردید. بر اساس محاسبات لگاریتمی ۷ تیمار (۸۵۰۰، ۸۸۷۰، ۹۲۶۰، ۹۶۶۰، ۱۰۱۰۰، ۱۰۵۵۰ و ۱۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر) در نظر گرفته شد و نسبت به گروه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۵). همچنین میزان LC_{10} ، LC_{50} و LC_{90} عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی طی مدت زمان ۳۰، ۴۵، ۶۰ دقیقه محاسبه گردید (جدول ۶). بر این اساس میزان LC_{50} این عصاره طی مدت یکساعت معادل ۹۹۳۳/۴۴ میلی گرم در لیتر تعیین شد. همچنین معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی (R^2) حاکی از وجود ارتباط مستقیم (همبستگی قوی و مثبت) بین غلظتهای مورد بررسی با میزان تلفات بچه تاسماهیان ایرانی می باشد (نمودارهای ۵ الی ۷).

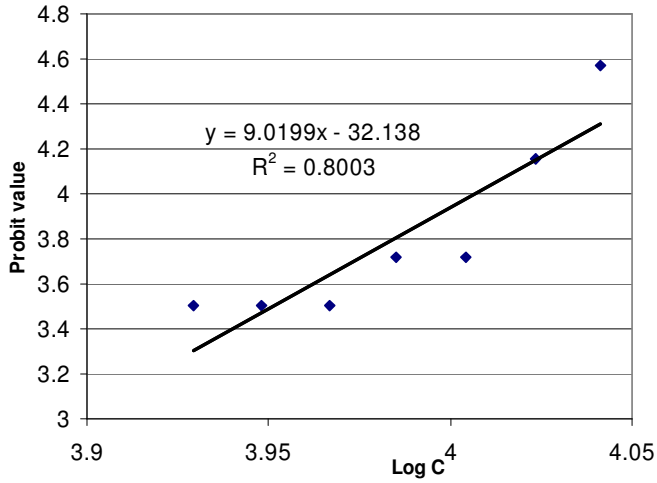
ازلحاظ رفتاری علائمی از قبیل افزایش ترشح موکوس در مراحل اولیه آزمایش، تحریک پذیری، تعادل کم، انقباض شدید عضلات و انحنای ستون فقرات عمدتاً در غلظتهای زیاد مشاهده شد. نتایج نشان داد که طی زمانهای کمتر از ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه ، مقادیر LC_{10} ، LC_{50} و LC_{90} کاهش می یابد. بدین معنی که مقاومت ماهیها در مدت زمان کوتاه بیشتر بوده و ماهیها توانایی تحمل غلظت بالاتری از عصاره را دارا می باشند ولی با گذشت زمان مقاومت بچه تاسماهیان ایرانی کاهش می یابد.

جدول ۵ ـ مقایسه اثر تیمارهای مختلف آویشن شیرازی روی مرگ و میر بچه ماهیان ۵ ـ ۳ گرمی تاسماهی ایرانی (میانگین ۳ تکرار) طی یک ساعت

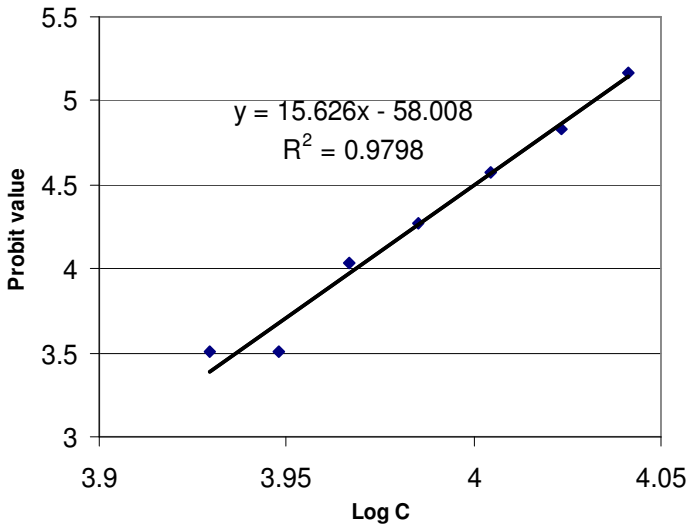
تیمار	غلظت آویشن شیرازی (ppm)	۳۰ دقیقه		۴۵ دقیقه		۶۰ دقیقه		تغییرات نسبت به شاهد			لگاریتم غلظت آویشن شیرازی	Probit value		
		مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	۳۰ دقیقه	۴۵ دقیقه	۶۰ دقیقه		۳۰ دقیقه	۴۵ دقیقه	۶۰ دقیقه
شاهد	۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
I	۸۵۰۰	۰/۶۷	۹/۳۳	۰/۶۷	۹/۳۳	۱/۳۳	۸/۶۷	-۶/۷	-۶/۷	-۱۳/۳	۳/۹۲۹۴	۳/۵۰۱۵	۳/۵۰۱۵	۳/۸۸۷۷
II	۸۸۷۰	۰/۶۷	۹/۳۳	۰/۶۷	۹/۳۳	۱/۶۷	۸/۳۳	-۶/۷	-۶/۷	-۱۶/۷	۳/۹۴۷۹	۳/۵۰۱۵	۳/۵۰۱۵	۴/۰۳۳۹
III	۹۲۶۰	۰/۶۷	۹/۳۳	۱/۶۷	۸/۳۳	۲/۶۷	۷/۳۳	-۶/۷	-۱۶/۷	-۲۶/۷	۳/۹۶۶۶	۳/۵۰۱۵	۴/۰۳۳۹	۴/۳۷۸۱
IV	۹۶۶۰	۱	۹	۲/۳۳	۷/۶۷	۳/۳۳	۶/۶۷	-۱۰	-۲۳/۳	-۳۳/۳	۳/۹۸۵۰	۳/۷۱۸۴	۴/۲۷۱۰	۴/۵۶۸۴
V	۱۰۱۰۰	۱	۹	۳/۳۳	۶/۶۷	۵	۵	-۱۰	-۳۳/۳	-۵۰	۴/۰۰۴۳	۳/۷۱۸۴	۴/۵۶۸۴	۵/۰۰۰۰
VI	۱۰۵۵۰	۲	۸	۴/۳۳	۵/۶۷	۶/۶۷	۳/۳۳	-۲۰	-۴۳/۳	-۶۶/۷	۴/۰۲۳۳	۴/۱۵۸۴	۴/۸۳۱۳	۵/۴۳۱۶
VII	۱۱۰۰۰	۳/۳۳	۶/۶۷	۵/۶۷	۴/۳۳	۸/۶۷	۱/۳۳	-۳۳/۳	-۵۶/۷	-۸۶/۷	۴/۰۴۱۴	۴/۵۶۸۴	۵/۱۶۸۷	۶/۱۱۲۳

جدول ٦ ـ غلظتهای کشنده آویشن شیرازی طی یک ساعت روی بچه تاسماهی ایرانی

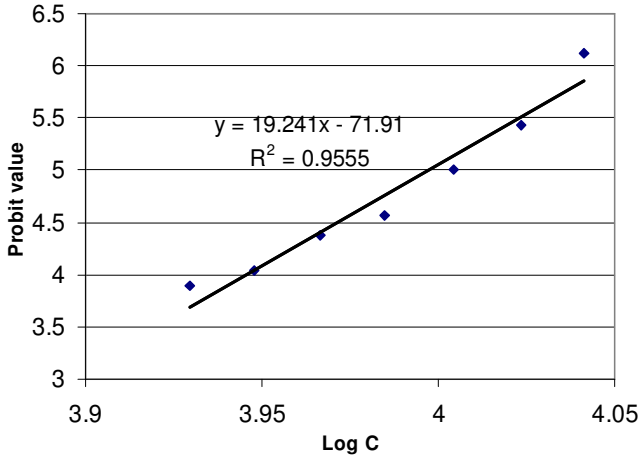
نام ماده	مقدار LC	۳۰ دقیقه	۴۵ دقیقه	۶۰ دقیقه
آویشن شیرازی	LC_{10}	۹۴۴۴/۹۵	۸۹۱۶/۶۱	۸۵۲۱/۱۸
	LC_{50}	۱۳۱۰۰/۸۶	۱۰۷۶۹/۶۱	۹۹۳۳/۴۴
	LC_{90}	۱۸۱۷۱/۸۸	۱۳۰۰۷/۶۸	۱۱۵۸۲/۴۳



نمودار۵: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی probit value با لگاریتم غلظت آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ۳۰ دقیقه



نمودار ٦ : معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی probit value با لگاریتم غلظت آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ٤٥ دقیقه



نمودار۷: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی probit value با لگاریتم غلظت آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ٦٠ دقیقه

- فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب در مطالعه تعیین LC_{50} (۹۶ ساعته و یکساعته) عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی:

محدوده غلظت پارامترهای فیزیکو شیمیایی آب که در غلظت های مختلف عصاره هیدرو الکلی آویشن شیرازی و کنترل در آزمایشات عیار سنجی زیستی (LC_{50}) تا ۹۶ ساعت اندازه گیری شد. که به ترتیب دما بین ۲۲/۹-۲۱/۳ درجه سانتیگراد، pH ۸/۳-۷/۴، هدایت الکتریکی (EC) ۸۸۹- ۷۲۵ (µs/cm)، اکسیژن محلول(DO) ۸/۵۵-۶ میلی گرم در لیتر، سختی کل ۲۰۰-۱۴۰ میلی گرم در لیتر، نیتریت ۰/۰۳۴-۰/۰۰۴ میلی گرم در لیتر، نیترات ۰/۰۵ -۰/۰۰۲ میلی گرم در لیتر و آمونیاک ۰/۵۰۷-۰/۱۱۴ میلی گرم در لیتر تعیین گردید.

جدول ۷- فاکتورهای فیزیکو شیمیایی آب در آزمایش LC_{50},1h – آویشن شیرازی

غلظت (ppm)	دمای آب	**pH**	**DO**(ppm)	EC(µs/cm)	Tot.hardness(ppm)	$N\text{-}NH_3$ (ppm)	$N\text{-}NO_2^-$ (ppm)	$N\text{-}NO_3^-$ (ppm)
۸۵۰۰	۲۱/۵	۷/۷۶	۶/۲	۷۲۵	*	*	*	*
۸۸۷۰	۲۱/۳	۷/۷۲	۶/۲	۷۸۶	*	*	*	*
۹۲۶۰	۲۱/۴	۷/۷۸	۶/۳	۷۴۲	*	*	*	*
۹۶۶۰	۲۱/۵	۷/۷۱	۶/۳	۷۵۳	*	*	*	*
۱۰۱۰۰	۲۱/۳	۷/۷۵	۶/۲	۷۸۵	*	*	*	*
۱۰۵۵۰	۲۱/۳	۷/۶۳	۶	۷۶۸	*	*	*	*
۱۱۰۰۰	۲۱/۳	۷/۶	۶	۷۴۹	*	*	*	*
شاهد	۲۱/۲	۸	۶/۶	۸۳۳	۲۰۰	۰/۱۹۳	۰/۰۰۹	۰/۱۳۲

* نمونه ها کدر و غیر قابل صاف کردن جهت اندازه گیری پارامترها بودند.

جدول۸- فاکتورهای فیزیکو شیمیایی آب در آزمایش LC_{50},24h – آویشن شیرازی

غلظت (ppm)	دمای آب	**pH**	**DO**(ppm)	EC(µs/cm)	Tot.hardness(ppm)	$N\text{-}NH_3$ (ppm)	$N\text{-}NO_2^-$ (ppm)	$N\text{-}NO_3^-$ (ppm)
۵۰۰	۲۲/۸	۷/۸۷	۸/۳۸	۸۴۲	۱۶۰	۰/۱۲۳	۰/۰۰۸	۰/۱
۵۸۳	۲۲/۲	۷/۷	۸/۲۹	۸۳۰	۱۷۰	۰/۱۶۹	۰/۰۰۹	۰/۰۳۱
۶۹۴	۲۲	۷/۶۸	۸/۲	۸۲۱	۱۵۰	۰/۲۳۱	۰/۰۰۹	۰/۰۷۶
۸۲۸	۲۲	۷/۶	۸/۲	۸۷۴	۱۸۰	۰/۳۰۷	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲
۹۸۶	۲۲	۷/۶	۸/۱	۷۸۷	۱۸۰	۰/۱۲۷	۰/۰۰۴	۰/۰۰۲
۱۱۷۴	۲۲	۷/۴۳	۸/۱	۸۰۴	۱۶۰	۰/۱۷۹	۰/۰۰۷	۰/۰۳۸
۱۴۰۰	۲۱/۸	۷/۴	۸/۱	۸۰۸	۱۶۰	۰/۱۷۵	۰/۰۱۳	۰/۰۵۳
شاهد	۲۲/۴	۸/۱	۸/۵۵	۸۱۶	۱۶۰	۰/۲۶۴	۰/۰۰۲	۰/۰۷۹

جدول ۹- فاکتورهای فیزیکو شیمیایی آب در آزمایش LC_{50}, 48 h – آویشن شیرازی

غلظت (ppm)	دمای آب	**pH**	**DO**(ppm)	EC(µs/cm)	Tot.hardness(ppm)	$N\text{-}NH_3$ (ppm)	$N\text{-}NO_2^-$ (ppm)	$N\text{-}NO_3^-$ (ppm)
۵۰۰	۲۲/۹	۷/۹	۸/۰۸	۸۰۵	۱۶۰	۰/۱۵	۰/۰۰۵	<۰/۳
۵۸۳	۲۲/۶	۷/۷	۷/۹۷	۸۴۱	۱۶۴	۰/۴۴۲	۰/۰۰۴	<۰/۳
۶۹۴	۲۲/۱	۷/۷	۷/۶۳	۸۶۴	۱۷۰	۰/۱۸۷	۰/۰۰۳	<۰/۳
۸۲۸	۲۲/۳	۷/۶۵	۷/۶	۸۲۱	۱۶۰	۰/۲۳۷	۰/۰۰۷	<۰/۳
۹۸۶	۲۲/۴	۷/۶	۷/۶۱	۸۲۵	۱۷۰	۰/۳۰۷	۰/۰۳۴	<۰/۳
۱۱۷۴	۲۲/۲	۷/۴۵	۷/۵	۸۵۰	۱۷۲	۰/۴۵۳	۰/۰۰۶	<۰/۳
۱۴۰۰	۲۲	۷/۴۵	۷/۴۸	۷۹۵	۱۶۶	۰/۳۷۲	۰/۰۰۶	<۰/۳
شاهد	۲۲/۵	۸/۲	۸/۲	۸۲۳	۱۷۰	۰/۳۸۶	۰/۰۰۵	۰/۰۸۶

جدول ۱۰ - فاکتورهای فیزیکو شیمیایی آب در آزمایش LC_{50}, 72 h – آویشن شیرازی

غلظت **(ppm)**	دمای آب	**pH**	**DO**(ppm)	EC(µs/cm)	Tot.hardness(ppm)	$N\text{-}NH_3$ (ppm)	$N\text{-}NO_2^-$ (ppm)	$N\text{-}NO_3^-$ (ppm)
۵۰۰	۲۲/۸	۷/۹۵	۷/۹	۸۰۶	۱۴۰	۰/۱۸۱	۰/۰۰۶	۰/۰۳۷
۵۸۳	۲۲/۶	۷/۸	۷/۷۵	۸۸۹	۱۶۰	۰/۱۲۹	۰/۰۰۶	۰/۰۳۷
۶۹۴	۲۲	۷/۸	۷/۵۵	۸۵۳	۱۶۴	۰/۱۱۴	۰/۰۰۵	۰/۰۳۴
۸۲۸	۲۲	۷/۷	۷/۵	۸۲۴	۱۵۰	۰/۱۶۰	۰/۰۰۹	۰/۰۲۸
۹۸۶	۲۲/۱	۷/۷	۷/۳	۸۳۱	۱۴۰	۰/۱۸۵	۰/۰۰۶	۰/۰۲۸
۱۱۷۴	۲۲/۲	۷/۵	۷/۲۲	۸۶۴	۱۵۸	۰/۱۶۹	۰/۰۱۲	۰/۰۲۸
۱۴۰۰	۲۲/۱	۷/۵۵	۷/۲	۸۷۴	۱۶۵	۰/۱۷۵	۰/۰۱۴	۰/۰۲۹
شاهد	۲۲/۵	۸/۲	۸	۸۵۴	۱۸۰	۰/۴۳۲	۰/۰۰۸	۰/۰۶۶

جدول ۱۱- فاکتورهای فیزیکو شیمیایی آب در آزمایش LC_{50}, 96 h– آویشن شیرازی

غلظت (ppm)	دمای آب	pH	DO(ppm)	EC(µs/cm)	Tot.hardness(ppm)	$N\text{-}NH_3$ (ppm)	$N\text{-}NO_2^-$ (ppm)	$N\text{-}NO_3^-$ (ppm)
۵۰۰	۲۲/۹	۸/۱	۷/۹۵	۸۷۰	۱۸۰	۰/۳۲۶	۰/۰۰۶	۰/۰۵۰
۵۸۳	۲۲/۷	۸	۷/۸	۸۷۳	۱۹۰	۰/۳۴۱	۰/۰۰۶	۰/۰۲۸
۶۹۴	۲۲/۲	۸	۷/۶	۸۷۰	۱۸۸	۰/۳۳۰	۰/۰۰۴	۰/۰۱۳
۸۲۸	۲۲/۳	۷/۸	۷/۵	۸۷۳	۲۰۰	۰/۲۱۸	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵
۹۸۶	۲۲/۳	۷/۸۵	۷/۴	۸۸۰	۱۷۸	۰/۲۰۷	۰/۰۰۶	۰/۰۱۳
۱۱۷۴	۲۲/۳	۷/۷	۷/۷	۸۸۰	۱۸۵	۰/۲۰۲	۰/۰۰۶	۰/۰۹
۱۴۰۰	۲۲/۴	۷/۷۵	۷/۵	۸۸۰	۱۸۸	۰/۲۱۱	۰/۰۰۶	۰/۰۱۱
شاهد	۲۲/۶	۸/۳	۷/۸	۸۷۰	۱۸۰	۰/۵۰۷	۰/۰۰۶	۰/۰۸۳

جدول ۱۲- غلظت اکسیژن محلول (mg/l) و درصد تغییرات آن در آب محیط عیار سنجی زیستی – ۹۶سا عته

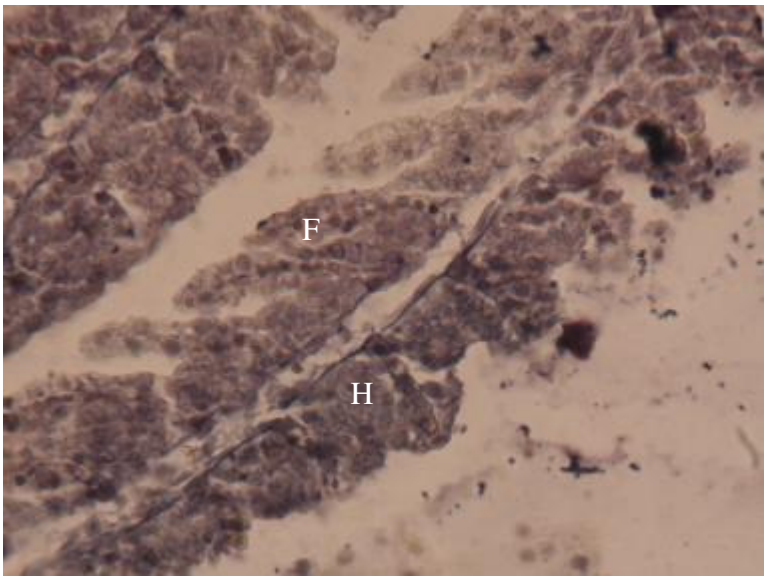
غلظت (mg/l)	24 h	48 h	72 h	96 h	درصد تغییرات اکسیژن محلول پس از ۹۶ ساعت
۵۰۰	۸/۳۸	۸/۰۸	۷/۹	۷/۹۵	۵/۱
۵۸۳	۸/۲۹	۷/۹۷	۷/۷۵	۷/۸	۵/۹
۶۹۴	۸/۲	۷/۶۳	۷/۵۵	۷/۶	۷/۳
۸۲۸	۸/۲	۷/۶	۷/۵	۷/۵	۸/۵
۹۸۶	۸/۱	۷/۶۱	۷/۳	۷/۴	۸/۶
۱۱۷۴	۸/۱	۷/۵	۷/۲۲	۷/۷	۴/۹
۱۴۰۰	۸/۱	۷/۴۸	۷/۲	۷/۵	۷/۴
شاهد	۸/۵۵	۸/۲	۸/۸	۷/۶	۱۱/۱

در این مطالعه، میزان کاهش اکسیژن محلول در غلظت های مختلف برای عصاره آویشن شیرازی بین ۵/۱ تا ۷/۴ درصد بوده است. این مقدار کاهش اکسیژن ناچیز بوده و نمی تواند تأثیر چشمگیری بر روی بچه ماهیان در طی مدت آزمایش داشته باشد. دما و pH در آزمایشات فوق در محدوده ای مناسب قرارداشته و نوع آمونیاک آب محیط آزمایش بیشر به شکل آمونیم غیر سمی بوده که در محدوده مناسب استاندارد قرار داشت لذا تداخلی در محیط آزمایش ایجاد ننمود.

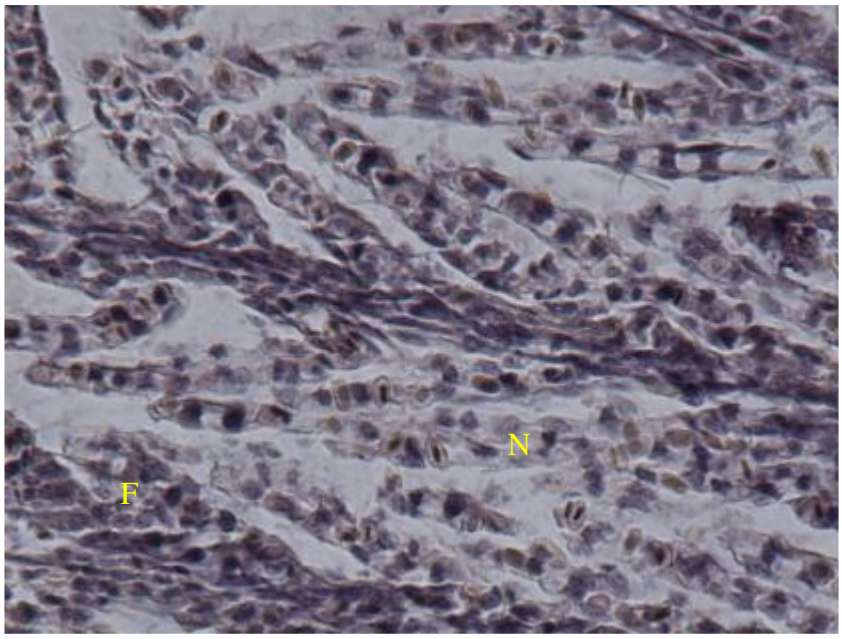
- اثرات هیستوپاتولوژیک غلظتهای مختلف عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی برباقتهای آبشش، کبد و پوست در مطالعه تعیین LC_{50} – ۹۶ ساعته

بررسی مقاطع بافتی تهیه شده از آبشش، کبد و پوست بچه تاسماهیان ایرانی که تحت تأثیر غلظتهای مختلف عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی در آزمایش مربوط به تعیین غلظتهای کشنده قرار داشتند از بروز برخی از آسیب های میکروسکوپیک حکایت دارند. نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی بافت آبشش حاکی از ضایعات هیستوپاتولوژیک نظیر هیپرپلازی، چسبندگی لاملای ثانویه، نکروز سلولی موضعی، وجود رنگدانه های ملانین در رشته های اولیه آبششی می باشد. بررسی مقاطع بافتی کبد در تیمارهای مختلف عوارضی نظیر تورم ابری در هپاتوسیتها ، نکروزسلولی، مشاهده پرخونی سینوزوئیدها، افزایش رنگدانه های ملانین و مراکز ملانو ماکروفاژها بوده است. در بررسی بافت پوست بچه تاسماهیان ایرانی تغییراتی نظیر پرخونی، افزایش ملانوفور و رنگدانه ملانین، افزایش سلول های موکوسی، افزایش حضور لنفوسیت، نکروز در لایه اپیدرم در تیمار های آویشن شیرازی مشاهده گردید.

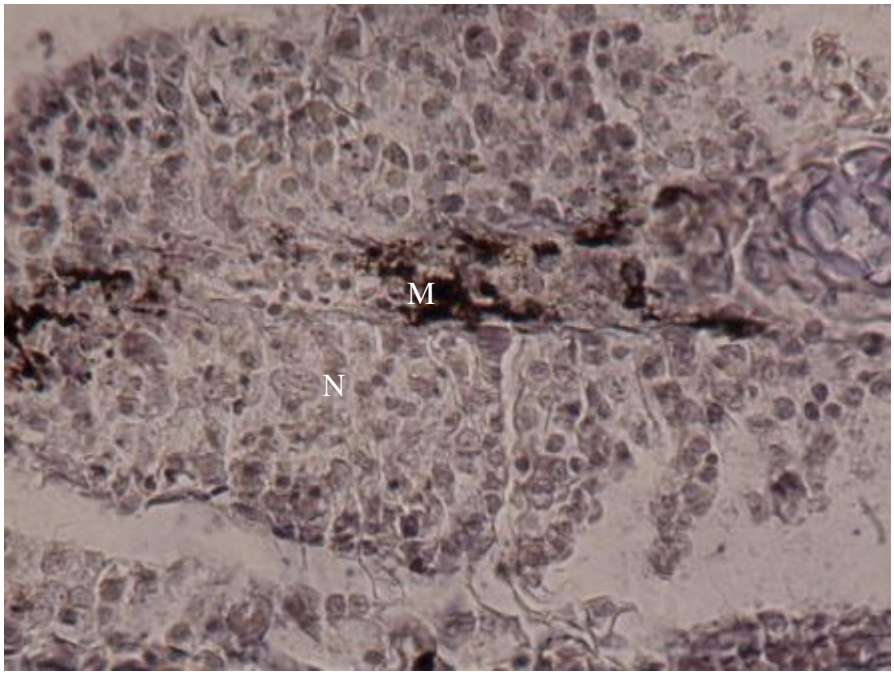
- **اثرات عصاره آویشن شیرازی (LC_{50}) بر بافت آبشش بچه تاسماهی ایرانی:**



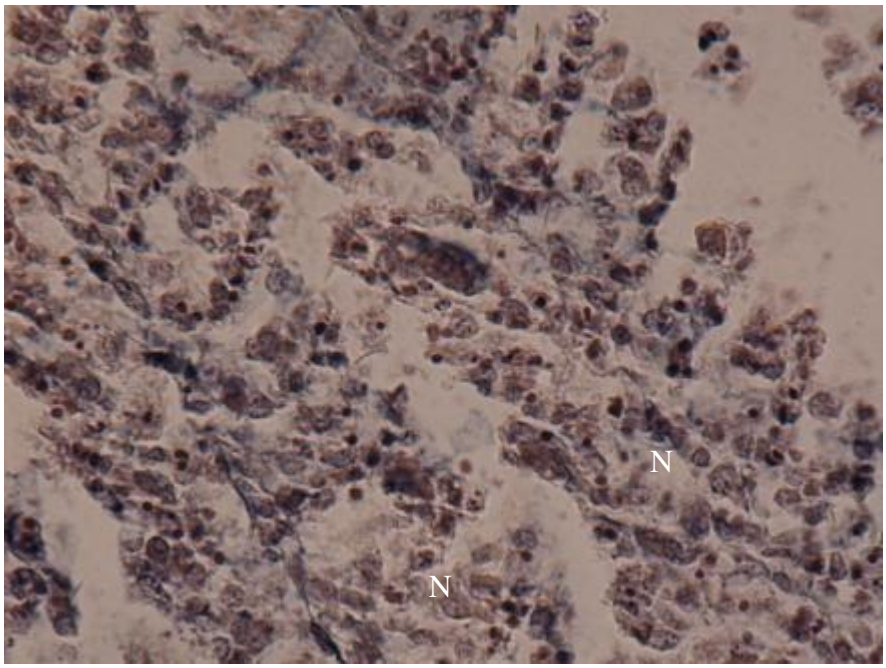
تصویر ۱۸- مشاهده چسبندگی (F) و هیپرپلازی (H) در رشته های آبششی ثانویه – تیمار۱ (H&E ،x٤٠)



تصویر ۱۹- مشاهده نکروز موضعی (N) و چسبندگی (F) در رشته های ثانویه آبشش- تیمار ۳ (٤٠x، H&E)

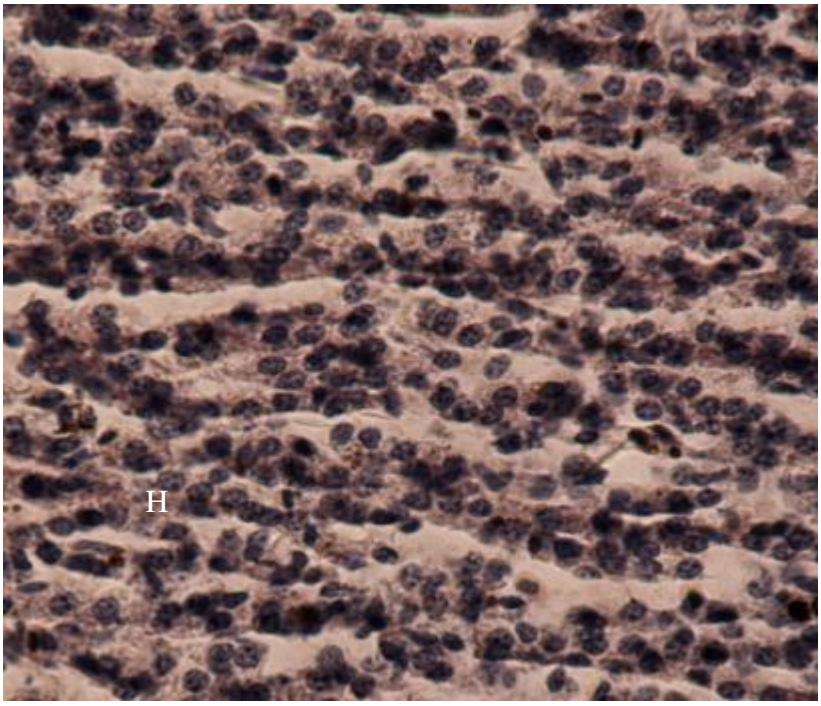


تصویر ۲۰- مشاهده نکروز رشته های آبششی (N) و وجود رنگدانه های ملانین در رشته اولیه آبششی (M)- تیمار٤ (٤٠x، H&E)

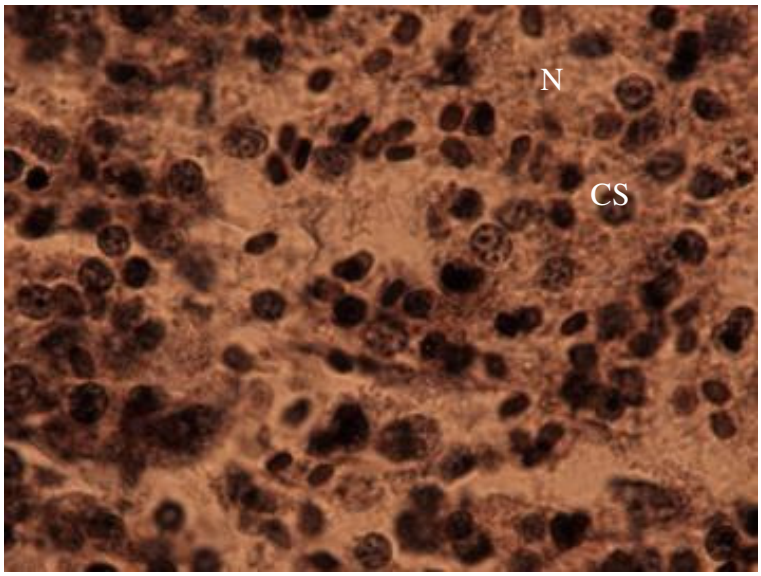


تصویر ۲۱- مشاهده نکروز (N) در رشته های آبشش – تیمار٦(x٤٠ ،H&E)

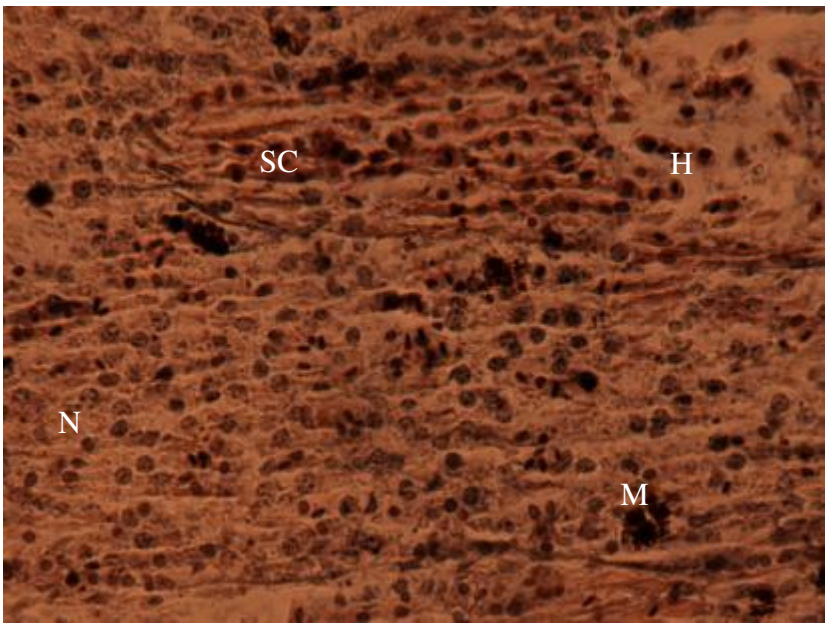
- **اثرات عصاره آویشن شیرازی (LC_{50}) بر بافت کبد بچه تاسماهی ایرانی:**



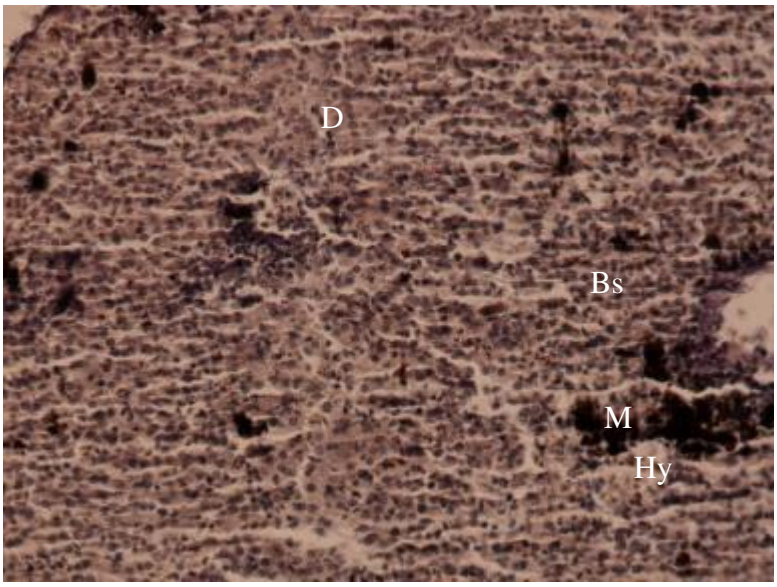
تصویر ۲۲ (شاهد)- مشاهده سلول های کبدی(H)(x٤٠ ،H&E)



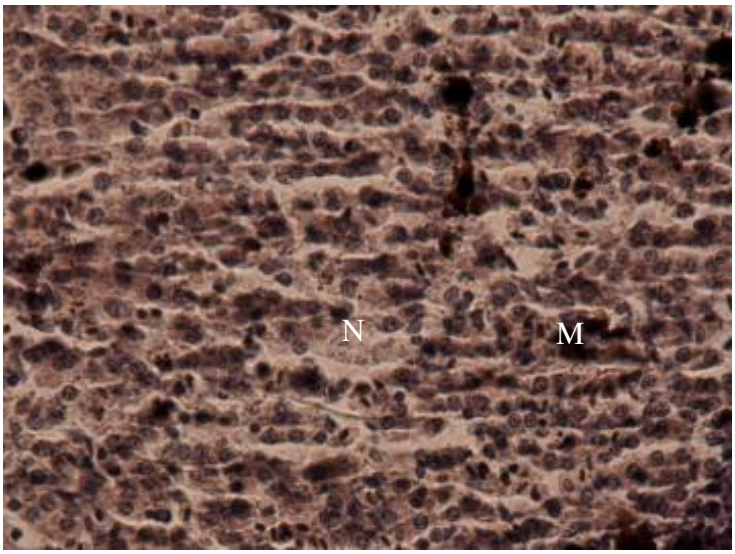
تصویر ۲۳- مشاهده تورم ابری(CS) و نکروزسلولی(N) در کبد – تیمار ۱(H&E ،x۱۰۰)



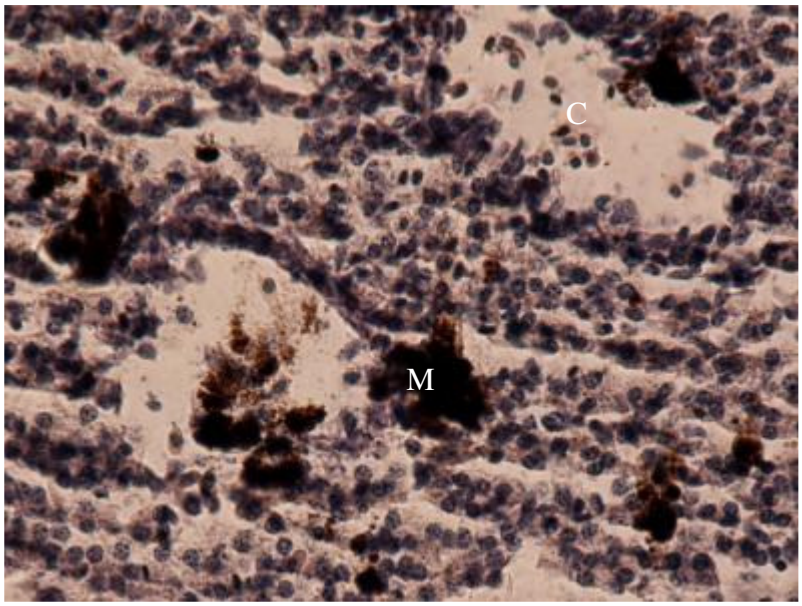
تصویر ۲٤- مشاهده پرخونی سینوزوئیدها (SC)خونریزی (H)، مراکز ملانوماکروفاژها(M) و نکروز سلولی – تیمار۲ (H&E ،x٤۰)



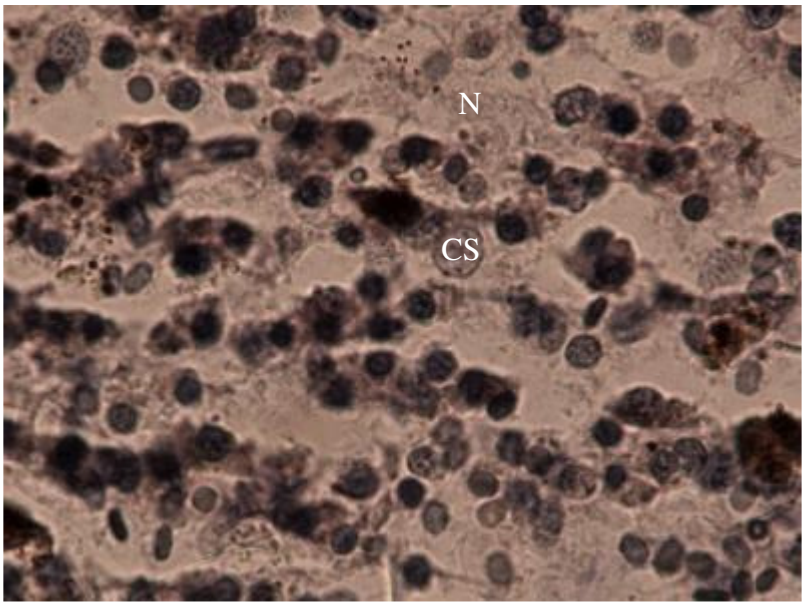
تصویر ۲۵- مشاهده افزایش رنگدانه های ملانین(M) و دژنراسیون و نکروز سلولی (D) در کبد – تیمار ٤ (H&E ،x۲۰)



تصویر۲٦- مشاهده افزایش رنگدانه های ملانین(M) و دژنراسیون و نکروز سلولی (N) در کبد ، تیمار ٥ (H&E ،x٤٠)



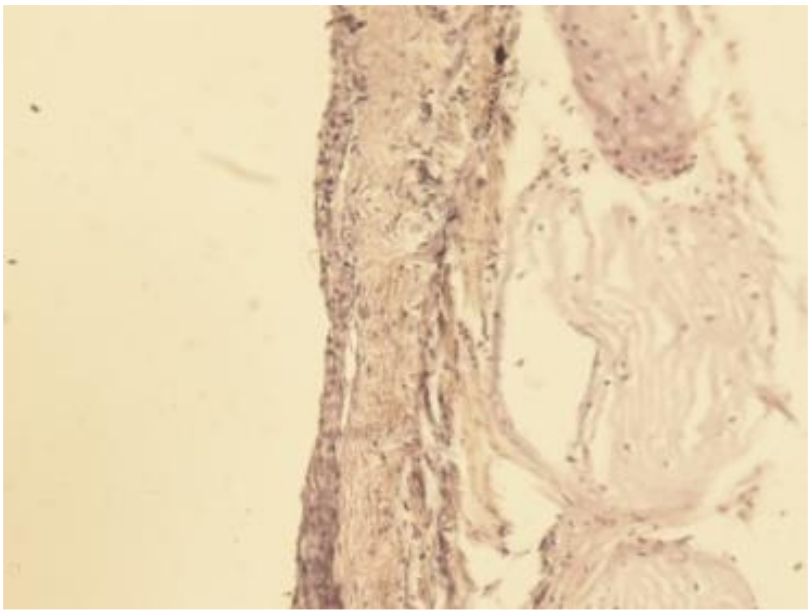
تصویر ۲۷- مشاهدده پرخونی (C) و مراکز ملانو ماکروفاژها (M) در کبد- تیمار٦ (H&E ،x٤٠)



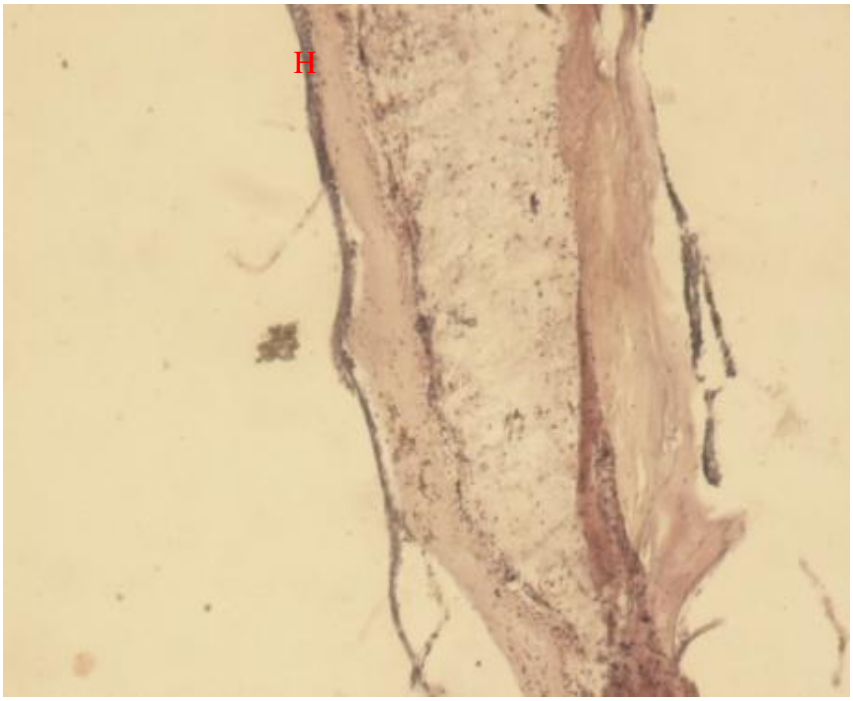
تصویر ۲۸-مشاهده نکروز (N) و تورم ابری (CS) در هپاتوسیتها- تیمار۷ (H&E ،x۱۰۰)

- **اثرات عصاره سیر وآویشن شیرازی (LC_{50}) بر بافت پوست بچه تاسماهی ایرانی:**

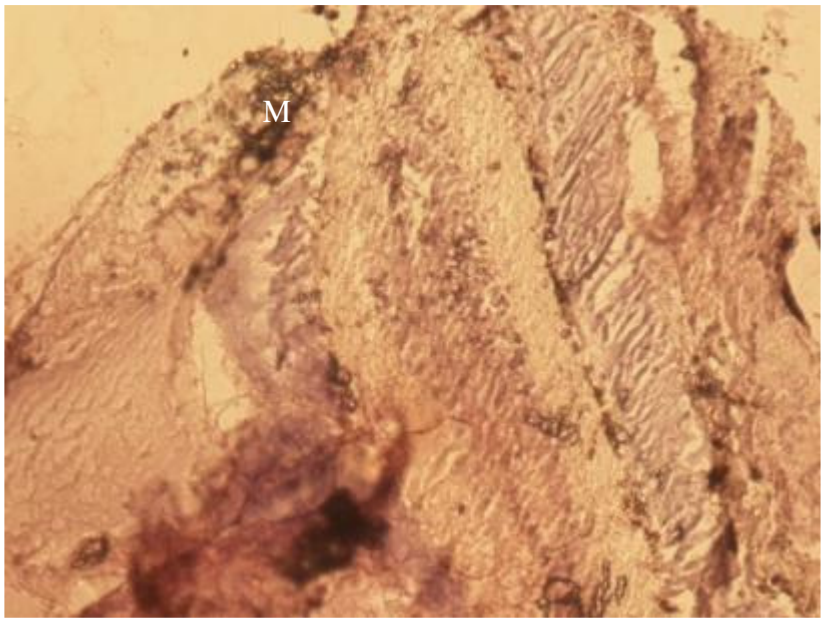
با توجه به اینکه نتایج تأثیرات عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی بر بافت پوست مشابه یکدیگر بوده، لذا تصاویر ذیل مربوط به تأثیرات هر دو عصاره می باشد.



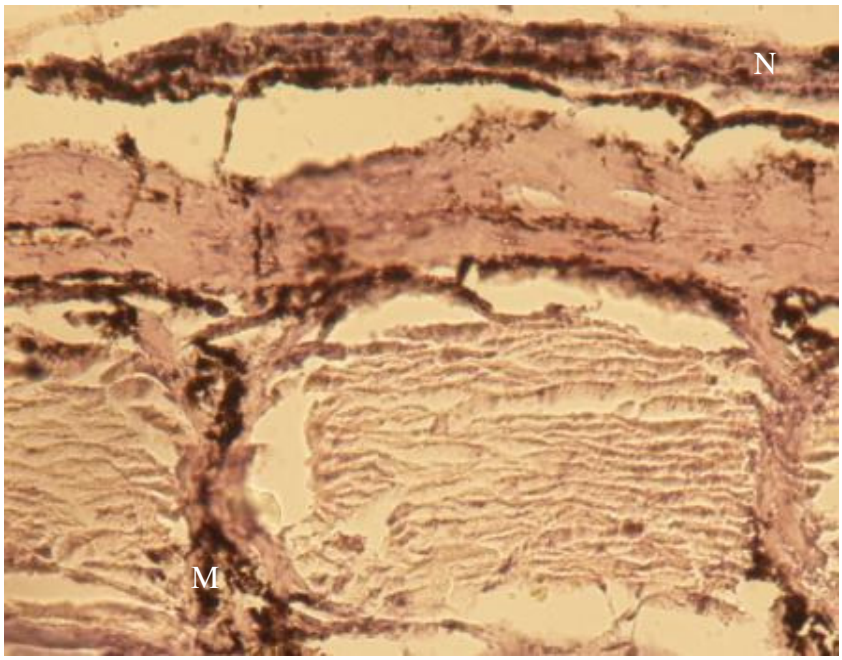
تصویر ۲۹- مشاهده اپیدرم و درم – تیمار ۱ (20x- H&E)



تصویر ۳۰- مشاهده اپیدرم و درم- تیمار ۳ (10x- H&E)



تصویر ۳۱- مشاهده افزایش ملانوفور و رسوب رنگدانه ملانین(M)- تیمار٦ (H&E, X20)



تصویر۳۲- مشاهده نکروز سلولی در اپیدرم (N)، افزایش ملانوفور و افزایش رنگدانه ملانین در لایه های پوست (M) تیمار۷ (H&E, X20)

- ✓ تقریبا تمامی عوارض گفته شده در تمامی تیمار ها مشاهده گردید ولی شدت آن از تیمار ۱ تا تیمار۷ تشدید یافته بود.

- ✓ در مجموع اثرتخریبی عصاره های مذکور (در مطالعات LC_{50}) در آبشش نسبت به دو بافت (پوست و کبد) بیشتر بوده است.

- مطالعات هماتولوژی تأثیر عصاره آویشن شیرازی- LC_{50} :

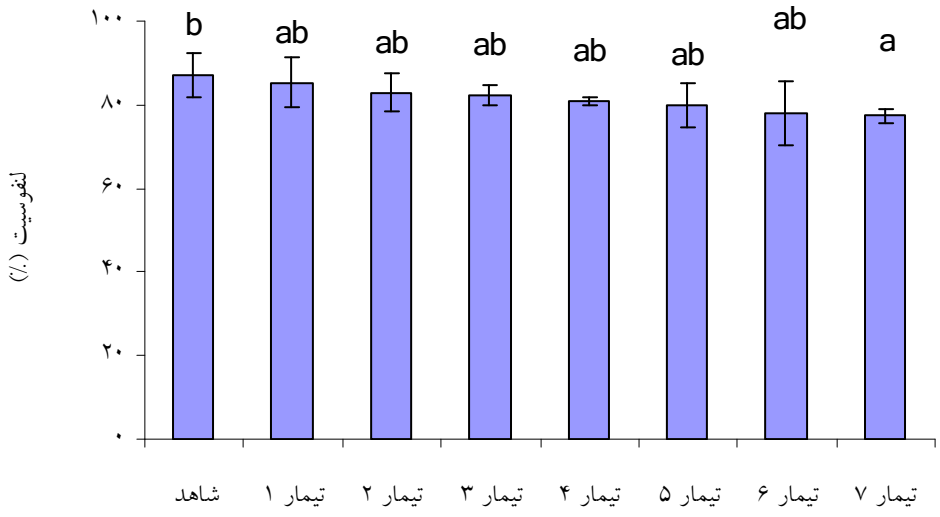
با توجه به کوچک بودن سایز بچه تاسماهیان ایرانی، فقط مطالعات افتراقی گلبولهای سفید ممکن بوده که در زیر به نتایج آن اشاره می گردد:

لنفوسیت: بررسی میزان لنفوسیت خون ماهیان مورد بررسی، بوسیله آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) نشان داد که بین تیمار ها اختلاف معنی دار آماری وجود دارد ($P<0.05$). همچنین بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه گروهها با یکدیگر، حاکی از کاهش لنفوسیت خون بچه ماهیان در غلظت های مختلف آویشن بوده است. بطوریکه کمترین میزان لنفوسیت در تیمار ۷ و بیشترین میزان لنفوسیت در شاهد مشاهده شده است و به لحاظ آماری نیز اختلاف معنی دار بین شاهد و سایر تیمارها مشاهده گردید.($P<0.05$).

جدول ۱۳- میانگین لنفوسیت در شاهد و تیمار های مختلف آویشن شیرازی

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد ± میانگین
لنفوسیت	شاهد	۸۷ ±۳[b]
	تیمار ۱	۸۵/۳۳ ±۳/۴۸ [ab]
	تیمار ۲	۸۳ ±۲/۵۲ [ab]
	تیمار ۳	۸۲/۲۳ ±۱/۴۵۰ [ab]
	تیمار ۴	۸۱ ± ۰/۵۷ [ab]
	تیمار ۵	۸۰ ± ۳ /۰۵[ab]
	تیمار ۶	۷۸ ±۱/۳۵ [ab]
	تیمار ۷	۷۷/۳۳ ± ۰/۸۸[a]

* حروف انگلیسی غیر همنام در جداول و نمودارها نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد.

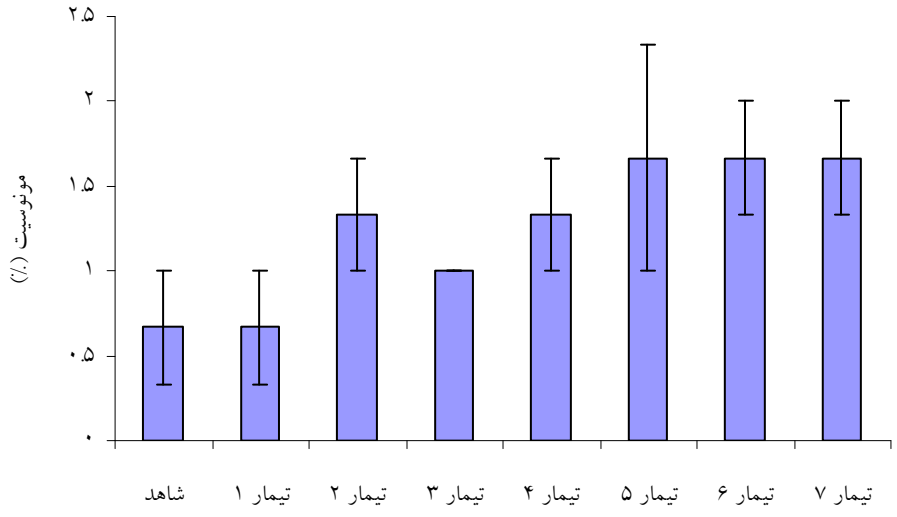


نمودار۸ : مقایسه میانگین میزان لنفوسیت شاهد با تیمار های مختلف آویشن شیرازی

مونوسیت: در مقایسه میزان مونوسیت خون ماهیان مورد بررسی بین تیمار ها بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه، اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد ($P>0.05$).

جدول ١٤- میانگین مونوسیت در شاهد و تیمار های مختلف

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد ± میانگین
مونوسیت	شاهد	۰/۶۷ ± ۰ /۳۳
	تیمار ۱	۰/۶۷ ± ۰ /۳۳
	تیمار ۲	۱/۳۳ ±۰/۳۳
	تیمار ۳	۱ ± ERR
	تیمار ۴	۱/۳۳ ±۰/۳۳
	تیمار ۵	۱/۶۶ ±۰/۶۶
	تیمار ۶	۱/۶۶ ±۰/۳۳
	تیمار ۷	۱/۶۶ ±۰/۳۳



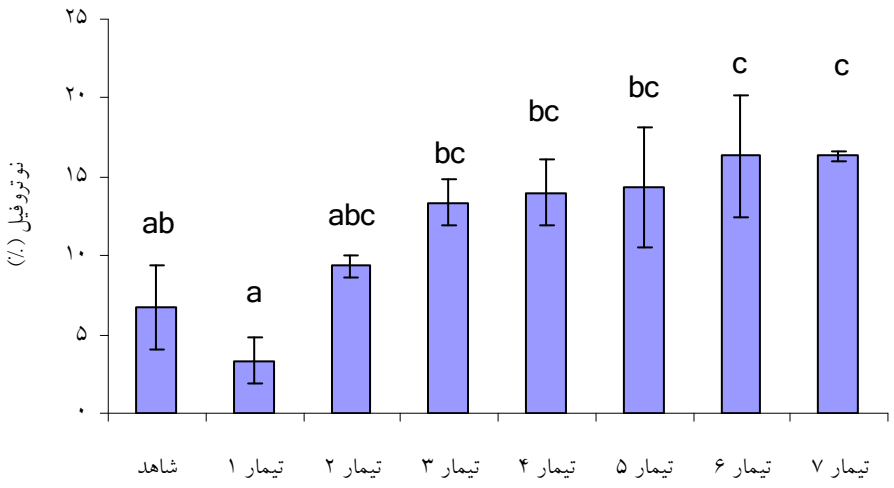
نمودار۹ : مقایسه میانگین میزان مونوسیت شاهد با تیمار های مختلف آویشن شیرازی

نوتروفیل :

بررسی میزان نوتروفیل خون ماهیان مورد بررسی، بوسیله آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) حاکی از وجود اختلاف معنی دار آماری بین تیمار ها بوده است (P<0.05). همچنین بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه گروهها با یکدیگر، حاکی از افزایش نوتروفیل خون بچه ماهیان در تیمارها بوده است. بطوریکه میزان این فاکتور در خون بچه ماهیان در تیمار ۶ و ۷ بیش از شاهد و سایر تیمار ها بوده و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار مشاهده گردید.(P<0.05).

جدول ۱۵- میانگین نوتروفیل در شاهد و تیمار های مختلف آویشن شیرازی

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد ± میانگین
نوتروفیل	شاهد	۶/۶۶ ± ۲ /۶۶^{ab}
	تیمار ۱	۳/۳۳ ±۱/۴۵^{a}
	تیمار ۲	۹/۳۳ ±۰/۶۶^{abc}
	تیمار ۳	۱۳/۳۳ ±۱/۴۵ ^{bc}
	تیمار ۴	۱۴ ± ۲/۰۸^{bc}
	تیمار ۵	۱۴/۳۳ ±۳/۸۴ ^{bc}
	تیمار ۶	۱۶/۳۳ ±۰/۳۳ ^{c}
	تیمار ۷	۱۶/۵۴ ±۰/۰۸ ^{c}

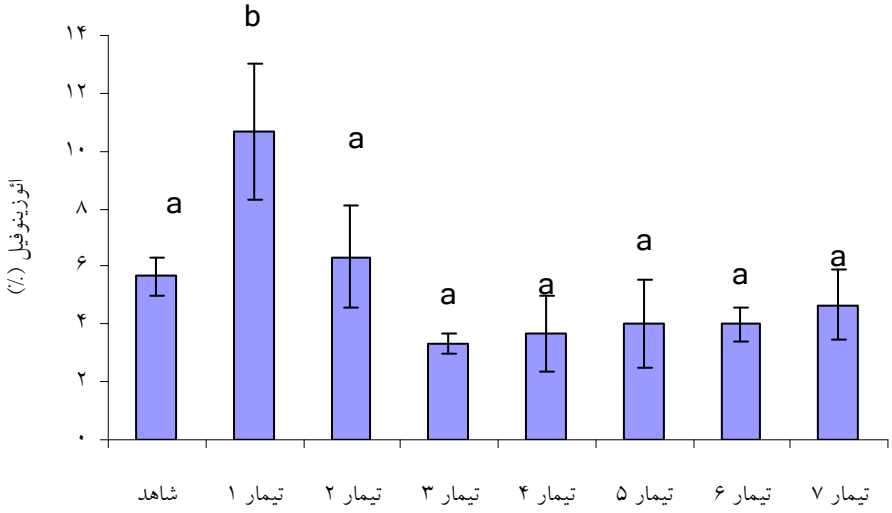


نمودار۱۰ : مقایسه میانگین میزان نوتروفیل در تیمار های مختلف آویشن شیرازی

ائوزینوفیل : بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) مقایسه میزان ائوزینوفیل خون ماهیان مورد بررسی در تیمار ها، اختلاف معنی دار آماری را نشان داد ($P<0.05$). بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه گروهها با یکدیگر، میزان ائوزینوفیل خون بچه ماهیان در تیمار ۱ بیش از سایر تیمارها و شاهد بوده و میزان این فاکتور در خون بچه ماهیان در تیمارها از روند نسبتاً کاهشی برخوردار بوده است و به لحاظ آماری نیز اختلاف معنی دار مشاهده گردید($P<0.05$).

جدول ۱۶- میانگین ائوزینوفیل در شاهد و تیمار های مختلف آویشن شیرازی

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد ± میانگین
ائوزینوفیل	شاهد	۵/۶۶ ± ۰ /۶۶^{a}
	تیمار ۱	۱۰/۶۶ ±۲/۳۳^{b}
	تیمار ۲	۶/۳۳ ±۱/۷۶^{a}
	تیمار ۳	۳/۳۳ ±۰/۳۳ ^{a}
	تیمار ۴	۳/۶۶ ± ۱/۳۳ ^{a}
	تیمار ۵	۴ ±۰/۵۲ ^{a}
	تیمار ۶	۴ ±۰/۵۷ ^{a}
	تیمار ۷	۵ ± ۰/۴۰^{a}



نمودار ۱۱ : مقایسه میانگین میزان ائوزینوفیل شاهد با تیمار های مختلف آویشن شیرازی

۲-۳- مطالعه اثرات عصاره هیدروالکلی سیر

بمنظور بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی سیر بر روی بچه تاسماهی ایرانی، نسبت به انجام مطالعات تعیین غلظتهای کشنده عصاره مذکور، تعیین فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب، مطالعات هماتولوژی و هیستوپاتولوژی اقدام گردید که نتایج آن بشرح ذیل می باشد:

۱-۲-۳- تعیین غلظتهای کشنده عصاره هیدروالکلی سیر بر روی بچه تاسماهی ایرانی

بمنظور تعیین غلظتهای کشنده عصاره هیدروالکلی سیر بر روی بچه تاسماهیان ایرانی با میانگین وزنی ۰/۵۱ ± ۳/۲۲ گرم و میانگین طولی ۰/۶۵ ± ۹/۱۷ سانتیمتر طی دوزمان ۹۶ ساعت و یک ساعت، ضمن انجام آزمایشات مربوطه، نمونه برداریهای لازم هم صورت پذیرفت.

- مطالعه غلظتهای کشنده طی ۹۶ ساعت (LC_{50}- 96 h):

در این تحقیق بمنظور یافتن محدوده غلظت عصاره هیدروالکلی سیر آزمایشات ابتدایی ($pre\text{-}LC_{50}$) بر روی بچه تاسماهیان ایرانی انجام گرفت و سرانجام محدوده غلظت ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ میلی گرم در لیتر برای انجام آزمایشات نهایی تعیین گردید. بر اساس محاسبات لگاریتمی ۷ تیمار (۱۰۰۰، ۱۱۱۶، ۱۲۴۶، ۱۳۹۱، ۱۵۵۴، ۱۷۸۵ و ۲۰۰۰ میلی گرم لیتر) در نظر گرفته شد و نسبت به گروه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱۷). همچنین میزان LC_{10} ، LC_{50} و LC_{90} عصاره هیدروالکلی سیر طی مدت زمان ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت محاسبه گردید (جدول ۱۸). بر این اساس، میزان LC_{50} این عصاره طی مدت ۴ روز معادل ۱۲۷۹/۹۷ میلی گرم در لیتر تعیین شد.

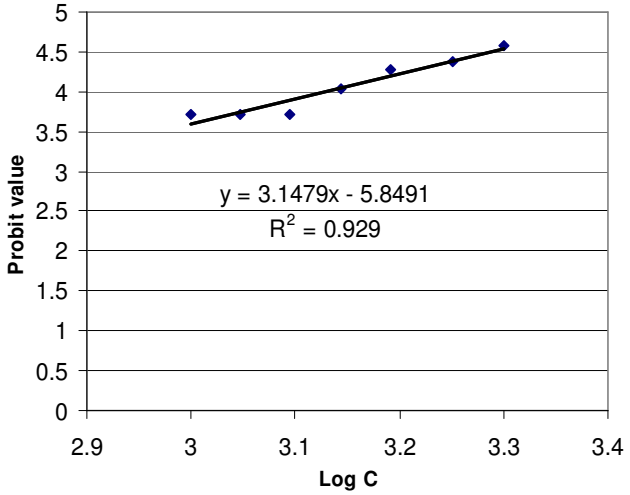
همچنین معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی (R^2) حاکی از وجود ارتباط مستقیم (همبستگی قوی و مثبت) بین غلظتهای مورد بررسی با میزان تلفات بچه تاسماهیان ایرانی می باشد (نمودارهای ۱۲ الی ۱۵). ازلحاظ رفتاری علائمی از قبیل تشکیل موکوس برروی پوست در غلظتهای زیاد، افزایش فعالیت، گاهی انحنای ستون فقرات مشاهده شد. نتایج نشان داد که طی زمانهای ۲۴ الی ۹۶ ساعت، مقادیر LC_{10}، LC_{50} و LC_{90} کاهش می یابد. بدین معنی که مقاومت ماهیها در مدت زمان کوتاه بیشتر بوده و ماهیها توانایی تحمل غلظت بالاتری از عصاره را دارا می باشند ولی با گذشت زمان مقاومت بچه تاسماهیان ایرانی کاهش می یابد.

جدول ۱۷ـ مقایسه اثر تیمارهای مختلف عصاره هیدروالکلی سیر بر میزان بازماندگی بچه تاسماهی ایرانی (میانگین ۳ تکرار) طی ۹۶ ساعت

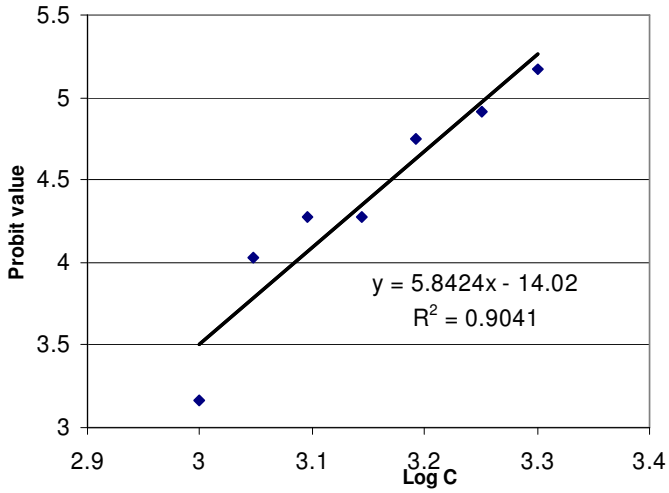
تیمار	غلظت عصاره سیر (ppm)	۲۴ ساعت		۴۸ ساعت		۷۲ ساعت		۹۶ ساعت		تغییرات نسبت به شاهد				لگاریتم غلظت عصاره سیر	Probit value			
		مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
شاهد	۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
I	۱۰۰۰	۰	۱۰	۰/۳۳	۹/۶۷	۰/۶۷	۹/۳۳	۱/۳۳	۸/۶۷	۰	-۳/۳	-۶/۷	-۱۳/۳	۳/۰۰۰۰	۰	۳/۱۶۱۶	۳/۵۰۱۵	۳/۸۸۷۷
II	۱۱۱۶	۱	۹	۱/۶۷	۸/۳۳	۲/۶۷	۷/۳۳	۳/۶۷	۶/۳۳	-۱۰	-۱۶/۷	-۲۶/۷	-۳۶/۷	۳/۰۴۷۷	۳/۷۱۸۴	۴/۰۳۳۹	۴/۳۷۸۱	۴/۶۶۰۲
III	۱۲۴۶	۱	۹	۲/۳۳	۷/۶۷	۳/۳۳	۶/۶۷	۵	۵	-۱۰	-۲۳/۳	-۳۳/۳	-۵۰	۳/۰۹۵۵	۳/۷۱۸۴	۴/۲۷۱۰	۴/۵۶۸۴	۵/۰۰۰۰
IV	۱۳۹۱	۱/۶۷	۸/۳۳	۲/۳۳	۷/۶۷	۴/۳۳	۵/۶۷	۶/۳۳	۳/۶۷	-۱۶/۷	-۲۳/۳	-۴۳/۳	-۶۳/۳	۳/۱۴۳۳	۴/۰۳۳۹	۴/۲۷۱۰	۴/۸۳۱۳	۵/۳۳۹۸
V	۱۵۵۴	۲/۳۳	۷/۶۷	۴	۶	۵/۶۷	۴/۳۳	۷/۶۷	۲/۳۳	-۲۳/۳	-۴۰	-۵۶/۷	-۷۶/۷	۳/۱۹۱۵	۴/۲۷۱۰	۴/۷۴۶۷	۵/۱۶۸۷	۵/۷۲۹۰
VI	۱۷۸۵	۲/۶۷	۷/۳۳	۴/۶۷	۵/۳۳	۶/۳۳	۳/۶۷	۸/۳۳	۱/۶۷	-۲۶/۷	-۴۶/۷	-۶۳/۳	-۸۳/۳	۳/۲۵۱۶	۴/۳۷۸۱	۴/۹۱۷۲	۵/۳۳۹۸	۵/۹۶۶۱
VII	۲۰۰۰	۳/۳۳	۶/۶۷	۵/۶۷	۴/۳۳	۸/۳۳	۱/۶۷	۹/۶۷	۰/۳۳	-۳۳/۳	-۵۶/۷	-۸۳/۳	-۹۶/۷	۳/۳۰۱۰	۴/۵۶۸۴	۵/۱۶۸۷	۵/۹۶۶۱	۶/۸۳۸۴

جدول ۱۸ـ غلظتهای کشنده عصاره سیر طی ٤ روز روی بچه تاسماهی ایرانی

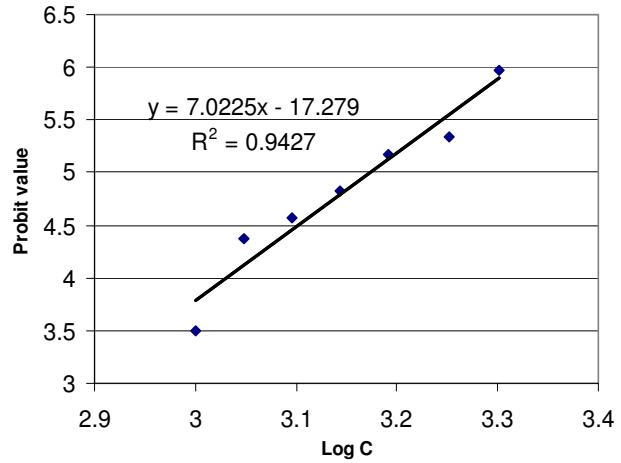
نام ماده	مقدار LC	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
سیر	LC_{10}	۱۰۹۴/۷۶	۱۰۸۶/۶۷	۹۷۷/۲۳	۹۰۹/۹۱
	LC_{50}	۲۷۹۵/۱۱	۱۸۰۰/۹۴	۱۴۸۷/۶۴	۱۲۷۹/۹۷
	LC_{90}	۷۱۳۶/۷۴	۲۹۸۴	۲۲۶۴/۶۴	۱۸۰۰/۵۲

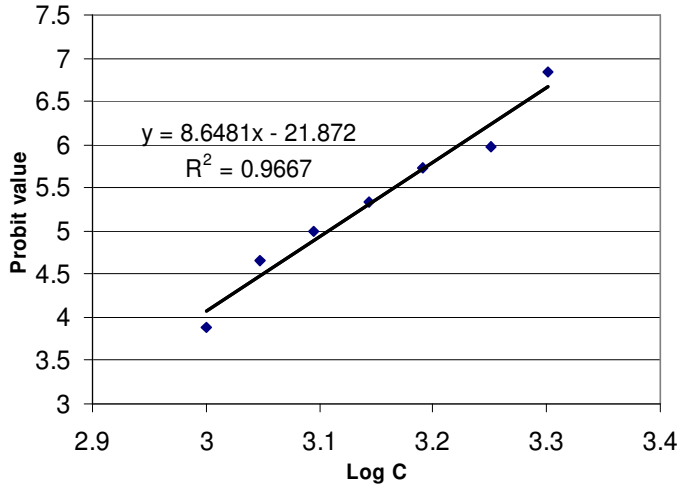


نمودار۱۲- معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ۲٤ ساعت



نمودار ۱۳- معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ٤۸ ساعت





نمودار۱٤-معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ۷۲ ساعت

نمودار ۱۵-معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ۹٦ ساعت

- مطالعه غلظتهای نیمه کشنده طی یک ساعت (LC_{50}- 1 h):

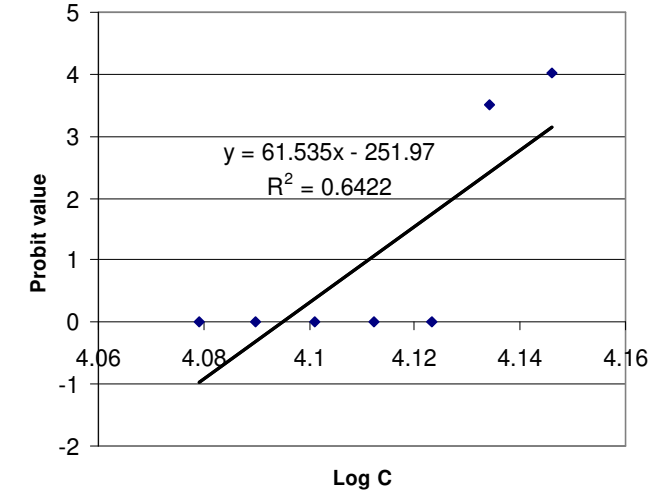
بمنظور یافتن محدوده غلظت عصاره هیدروالکلی سیر آزمایشات ابتدایی ($pre\text{-}LC_{50}$) بر روی بچه تاسماهیان ایرانی انجام گرفت و سرانجام محدوده غلظت ۱۲۰۰۰ تا ۱۴۰۰۰ میلی گرم در لیتر برای انجام آزمایشات نهایی تعیین گردید. بر اساس محاسبات لگاریتمی ۷ تیمار (۱۲۰۰۰، ۱۲۳۰۰، ۱۲۶۲۰، ۱۲۹۵۰، ۱۳۲۸۰، ۱۳۶۲۰ و ۱۴۰۰۰ میلی گرم لیتر) در نظر گرفته شد و نسبت به گروه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت(جدول ۱۹). همچنین میزان LC_{10} ، LC_{50} و LC_{90} عصاره هیدروالکلی سیر طی مدت زمان ۳۰، ۴۵، ۶۰ دقیقه محاسبه گردید (جدول ۲۰). لازم بذکر است در جداول ۱۹ و ۲۰ نتایج زمانهای ۱۵ و ۲۰ دقیقه نیز درج گردید. بر این اساس میزان LC_{50} این عصاره طی مدت یکساعت معادل ۱۲۶۲۴/۰۸ میلی گرم در لیتر تعیین شد. همچنین معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی (R^2) حاکی از وجود ارتباط مستقیم (همبستگی قوی و مثبت) بین غلظتهای مورد بررسی با میزان تلفات بچه تاسماهیان ایرانی می باشد (نمودارهای ۱۶ الی ۲۰). ازلحاظ رفتاری علائمی از قبیل تشکیل موکوس برروی پوست مخصوصاً در مراحل اولیه آزمایش در غلظتهای زیاد ،افزایش فعالیت،گاهی انحنای ستون فقرات مشاهده شد. نتایج نشان داد که طی زمانهای ۲۴ الی ۹۶ ساعت، مقادیر LC_{10} ، LC_{50} و LC_{90} کاهش می یابد. بدین معنی که مقاومت ماهیها در مدت زمان کوتاه بیشتر بوده و ماهیها توانایی تحمل غلظت بالاتری از عصاره را دارا می باشند ولی با گذشت زمان مقاومت بچه تاسماهیان ایرانی کاهش می یابد.

جدول ۱۹ ـ مقایسه اثر تیمارهای مختلف عصاره سیر روی مرگ و میر بچه ماهیان ۵ ـ ۳ گرمی تاسماهی ایرانی(میانگین ۳ تکرار) طی یک ساعت

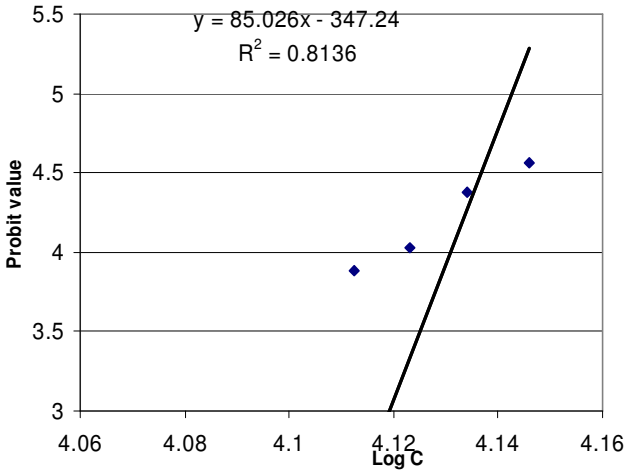
تیمار	غلظت عصاره سیر (ppm)	۱۵ دقیقه		۲۰ دقیقه		۳۰ دقیقه		۴۵ دقیقه		۶۰ دقیقه		تغییرات نسبت به شاهد					لگاریتم غلظت عصاره سیر	Probit value				
		مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	۱۵ دقیقه	۲۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	۴۵ دقیقه	۶۰ دقیقه		۱۵ دقیقه	۲۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	۴۵ دقیقه	۶۰ دقیقه
شاهد	۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
I	۱۲۰۰۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰/۶۷	۹/۳۳	۱	۹	۱/۶۷	۸/۳۳	۰	۰	-۶/۷	-۱۰	-۱۶/۷	۴/۰۷۹۲	۰	۰	۳۵۰۱۵	۳/۷۱۸۴	۴/۰۳۳۹
II	۱۲۳۰۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۱/۳۳	۸/۶۷	۲/۳۳	۷/۶۷	۳/۳۳	۶/۶۷	۰	۰	-۱۳/۳	-۲۳/۳	-۳۳/۳	۴/۰۸۹۹	۰	۰	۳/۸۸۷۷	۴/۲۷۱۰	۴/۵۶۸۴
III	۱۲۶۲۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۱/۳۳	۸/۶۷	۳/۳۳	۶/۶۷	۵	۵	۰	۰	-۱۳/۳	-۳۳/۳	-۵۰	۴/۱۰۱۱	۰	۰	۳/۸۸۷۷	۴/۵۶۸۴	۵/۰۰۰۰
IV	۱۲۹۵۰	۰	۱۰	۱/۳۳	۸/۶۷	۳	۷	۴/۶۷	۵/۳۳	۶/۶۷	۳/۳۳	۰	-۱۳/۳	-۳۰	-۴۶/۷	-۶۶/۷	۴/۱۱۲۳	۰	۳/۸۸۷۷	۴/۶۷۵۶	۴/۹۱۷۲	۵/۴۳۱۶
V	۱۳۲۸۰	۰	۱۰	۱/۶۷	۸/۳۳	۴	۶	۶/۳۳	۳/۶۷	۸/۳۳	۱/۶۷	۰	-۱۶/۷	-۴۰	-۶۳/۳	-۸۳/۳	۴/۱۳۳۲	۰	۴/۰۳۳۹	۴/۷۴۶۷	۵/۳۳۹۸	۵/۹۶۶۱
VI	۱۳۶۲۰	۰/۶۷	۹/۳۳	۲/۶۷	۷/۳۳	۴/۳۳	۵/۶۷	۶/۶۷	۳/۳۳	۹/۳۳	۰/۶۷	-۶/۷	-۲۶/۷	-۴۳/۳	-۶۶/۷	-۹۳/۳	۴/۱۳۴۲	۳/۵۰۱۵	۴/۳۷۸۱	۴/۸۳۱۳	۵/۴۳۱۶	۵/۶۹۸۵
VII	۱۴۰۰۰	۱/۶۷	۸/۳۳	۳/۳۳	۶/۶۷	۵/۶۷	۴/۳۳	۸/۳۳	۱/۶۷	۱۰	۰	-۱۶/۷	-۳۳/۳	-۵۶/۷	-۸۳/۳	-۱۰۰	۴/۱۴۶۱	۴/۰۳۳۹	۴/۵۶۸۴	۵/۱۶۸۷	۵/۹۶۶۱	۸/۷۱۹۰

جدول ۲۰ـ غلظتهای کشنده عصاره سیر طی یک ساعت روی بچه ماهی تاسماهی ایرانی

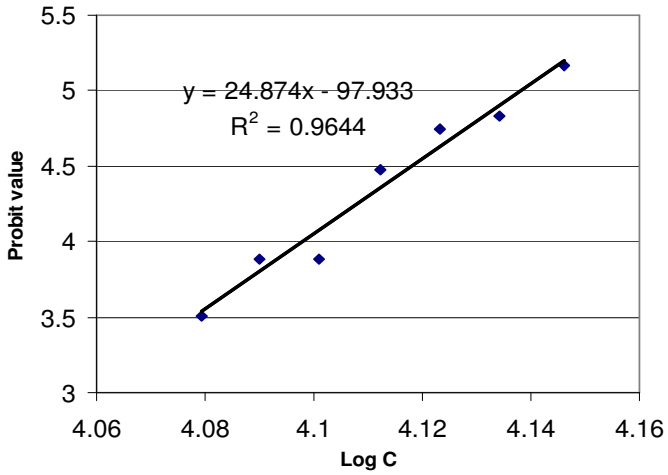
نام ماده	مقدار LC	۱۵ دقیقه	۲۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	۴۵ دقیقه	۶۰ دقیقه
سیر	LC_{10}	۱۴۲۹۲/۲۳	۱۳۴۱۵/۲۸	۱۲۲۰۶/۷۴	۱۱۸۹۳/۲۳	۱۱۷۴۸/۹۷
	LC_{50}	۱۴۹۹۳/۳۹	۱۳۸۸۹/۹۲	۱۳۷۴۳/۵۸	۱۳۰۵۵/۶۹	۱۲۶۲۴/۰۸
	LC_{90}	۱۵۷۳۲/۵۸	۱۴۳۸۱/۳۶	۱۵۴۷۷/۴۷	۱۴۳۳۵/۰۷	۱۳۳۲۶

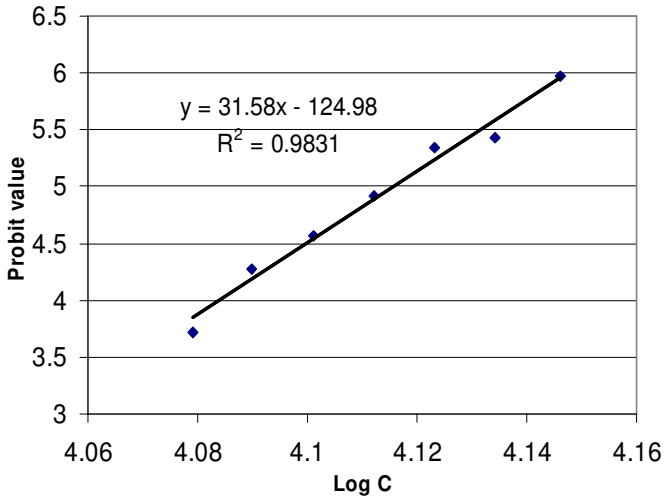


نمودار۱٦-معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ۱۵ دقیقه



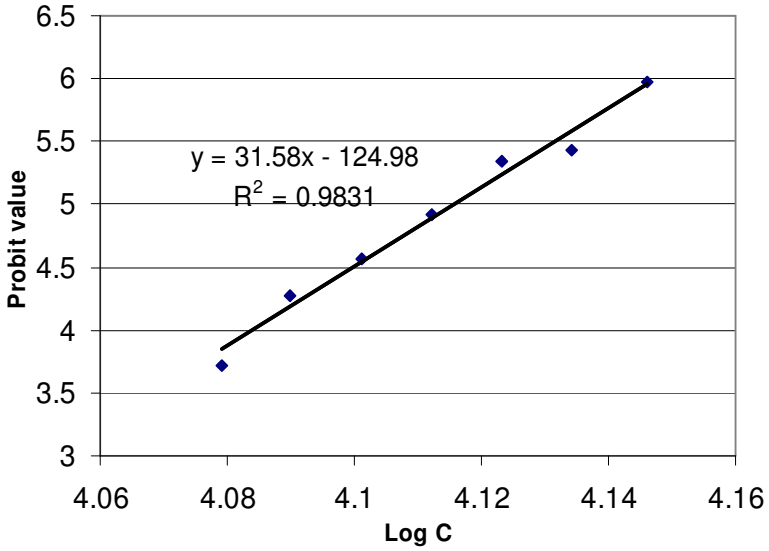
نمودار ۱۷-معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ۲۰ دقیقه





نمودار۱۸-معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ۳۰ دقیقه

نمودار ۱۹-معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ٤٥ دقیقه



نمودار ۲۰- معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ٦۰ دقیقه

- فاکتورهای فیزیکوشیمیایی در مطالعه تعیین LC_{50} (۹۶ ساعته و یکساعته) عصاره هیـدروالکلی سیر

محدوده پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب که در غلظت های مختلف عصاره هیدرو الکلی سیر و شاهد در آزمایشات عیار سنجی زیستی (LC_{50}) تا ۹۶ ساعت اندازه گیری شد که به ترتیب دما بین ۲۳-۲۲/۲ درجه سانتیگراد ،

pH ۸/۲- ۶/۷ ، اکسیژن محلول (DO) ۹/۱- ۶/۲ میلی گرم در لیتر ، هدایت الکتریکی (EC) ۹۱۲-۷۲۹(µs/cm)، سختی کل ۲۴۰-۱۴۰ میلی گرم در لیتر، نیتریت ۰/۰۲۲- ۰/۰۰۱ میلی گرم در لیتر ، نیترات ۰/۱۷۶-۰/۰۰۱ میلی گرم در لیتر و آمونیاک ۰/۸۶۴-۰/۱۳۱میلی گرم در لیتر تعیین گردید.

جدول ۲۱- فاکتورهای فیزیکو شیمیایی آب در آزمایش LC_{50}, 1h - سیر

غلظت (ppm)	دمای آب	**pH**	**DO**(ppm)	EC(µs/cm)	Tot.hardness(ppm)	$N\text{-}NH_3$ (ppm)	$N\text{-}NO_2^-$ (ppm)	$N\text{-}NO_3^-$ (ppm)
۱۲۰۰۰	۲۲/۴	۷/۸	۶/۳	۸۸۰	۱۸۰	۰/۶۱۷	۰/۰۰۶	۰/۱۳۴
۱۲۳۰۰	۲۲/۲	۷/۷۵	۶/۳	۸۱۵	۱۷۰	۰/۷۴۲	۰/۰۰۹	۰/۱۷۶
۱۲۶۲۰	۲۲/۲	۷/۷۲	۶/۴	۹۱۲	۲۰۰	۰/۷۲۷	۰/۰۰۹	۰/۱۱۲
۱۲۹۵۰	۲۲/۲	۷/۵۵	۶/۴	۸۰۸	۱۷۶	۰/۷۵۲	۰/۰۱۲	۰/۱۲۸
۱۳۲۸۰	۲۲/۳	۷/۵	۶/۳	۸۳۶	۱۸۴	۰/۸۰۱	۰/۰۰۸	۰/۱۳۹
۱۳۶۲۰	۲۲/۳	۷/۳	۶/۲	۸۰۳	۲۰۰	۰/۸۶۴	۰/۰۱۱	۰/۱۳۱
۱۴۰۰۰	۲۲/۳	۷/۱	۶/۲	۷۲۹	۱۸۶	۰/۷۳۵	۰/۰۰۹	۰/۱۱۵
شاهد	۲۲/۶	۸/۲	۶/۷	۸۹۰	۲۰۰	۰/۱۹۳	۰/۰۰۹	۰/۱۳۲

جدول۲۲- فاکتورهای فیزیکو شیمیایی آب در آزمایش LC_{50},24h - سیر

غلظت (ppm)	دمای آب	**pH**	**DO**(ppm)	EC(µs/cm)	Tot.hardness(ppm)	$N\text{-}NH_3$ (ppm)	$N\text{-}NO_2^-$ (ppm)	$N\text{-}NO_3^-$ (ppm)
۱۰۰۰	۲۳	۷/۹۸	۹	۷۶۸	۲۰۰	۰/۲۶۲	۰/۰۰۶	۰/۰۵۳
۱۱۱۶	۲۲/۸	۷/۹۴	۹	۸۱۹	۱۸۰	۰/۳۱۲	۰/۰۰۶	۰/۰۵۷
۱۲۴۶	۲۲/۸	۷/۹۳	۸/۸	۷۸۷	۲۰۰	۰/۲۲۲	۰/۰۰۷	۰/۰۴۸
۱۳۹۱	۲۲/۷	۷/۹۲	۸/۸	۸۰۵	۱۹۰	۰/۲۶۲	۰/۰۰۵	۰/۰۴
۱۵۵۴	۲۲/۷	۷/۸	۸/۵	۷۸۷	۲۰۰	۰/۲۴۷	۰/۰۰۴	۰/۰۵
۱۷۸۵	۲۲/۶	۷/۷۵	۸/۵	۷۹۷	۲۰۰	۰/۳۱۲	۰/۰۰۶	۰/۰۵۳
۲۰۰۰	۲۲/۶	۷/۷۵	۸/۴	۷۸۱	۱۸۰	۰/۱۶۴	۰/۰۰۳	۰/۰۱۵
شاهد	۲۳	۷/۹۵	۹/۱	۸۱۶	۱۶۰	۰/۲۶۴	۰/۰۰۲	۰/۰۷۹

جدول۲۳- فاکتورهای فیزیکو شیمیایی آب در آزمایش LC_{50}, 48 h – سیر

غلظت (ppm)	دمای آب	**pH**	**DO**(ppm)	EC(µs/cm)	Tot.hardness(ppm)	$N\text{-}NH_3$ (ppm)	$N\text{-}NO_2^-$ (ppm)	$N\text{-}NO_3^-$ (ppm)
۱۰۰۰	۲۲/۹	۷/۸۵	۸/۹	۸۰۵	۱۷۰	۰/۲۶۶	۰/۰۱	۰/۰۸
۱۱۱۶	۲۲/۸	۷/۸۲	۸/۸	۸۳۱	۱۸۰	۰/۱۳۷	۰/۰۲۲	۰/۰۶۴
۱۲۴۶	۲۲/۷	۷/۸	۸/۶	۸۴۷	۲۰۰	۰/۱۳۱	۰/۰۰۷	۰/۰۴۲
۱۳۹۱	۲۲/۷	۷/۷۵	۸/۶	۸۰۵	۲۰۰	۰/۲۵۲	۰/۰۰۷	۰/۰۷۹
۱۵۵۴	۲۲/۷	۷/۷۲	۸/۳	۸۲۴	۲۰۰	۰/۱۴۲	۰/۰۰۶	۰/۰۴۷
۱۷۸۵	۲۲/۵	۷/۶	۸/۳	۷۸۷	۲۲۰	۰/۱۴۶	۰/۰۰۷	۰/۰۳۸
۲۰۰۰	۲۲/۵	۷/۵۸	۸/۲	۸۹۹	۲۴۰	۰/۱۵	۰/۰۰۷	۰/۰۴
شاهد	۲۳	۷/۹	۹	۸۲۳	۱۷۰	۰/۳۸۶	۰/۰۰۵	۰/۰۸۶

جدول۲٤- فاکتورهای فیزیکو شیمیایی آب در آزمایش LC_{50}, 72 h – سیر

غلظت (ppm)	دمای آب	**pH**	**DO**(ppm)	EC(µs/cm)	Tot.hardness(ppm)	$N\text{-}NH_3$ (ppm)	$N\text{-}NO_2^-$ (ppm)	$N\text{-}NO_3^-$ (ppm)
۱۰۰۰	۲۲/۸	۷/۶	۸/۷	۷۶۳	۱۴۰	۰/۳۶۳	۰/۰۰۵	۰/۰۳۵
۱۱۱۶	۲۲/۸	۷/۵	۸/۵	۸۴۰	۱۶۰	۰/۲۱۸	۰/۰۰۸	۰/۰۳۲
۱۲۴۶	۲۲/۷	۷/۵	۸/۴	۸۳۰	۱۷۰	۰/۲۲۷	۰/۰۱	۰/۰۴۱
۱۳۹۱	۲۲/۷	۷/۴	۸/۴	۸۴۰	۲۳۰	۰/۲۸۴	۰/۰۰۲	۰/۰۳۵
۱۵۵۴	۲۲/۸	۷/۲	۸/۲	۸۳۵	۱۹۰	۰/۲۹۷	۰/۰۰۱	۰/۰۲۱
۱۷۸۵	۲۲/۵	۷/۲	۸/۱	۸۵۰	۲۰۰	۰/۳۱۲	۰/۰۰۱	۰/۰۴۴
۲۰۰۰	۲۲/۴	۷/۲	۸	۸۳۰	۲۱۰	۰/۳۲۳	۰/۰۰۱	۰/۰۲۲
شاهد	۲۲/۹	۷/۸	۸/۸	۸۵۴	۱۸۰	۰/۴۳۲	۰/۰۰۸	۰/۰۶۶

جدول ۲۵- فاکتورهای فیزیکو شیمیایی آب در آزمایش LC_{50}, 96 h – سیر

غلظت (ppm)	دمای آب	pH	DO(ppm)	EC(µs/cm)	Tot.hardness(ppm)	$N\text{-}NH_3$ (ppm)	$N\text{-}NO_2^-$ (ppm)	$N\text{-}NO_3^-$ (ppm)
۱۰۰۰	۲۲/۹	۷/۳	۸/۳	۸۳۴	۱۷۰	۰/۵۸۳	۰/۰۰۵	۰/۰۳۵
۱۱۱۶	۲۲/۸	۷/۲	۸/۲	۸۶۵	۱۸۰	۰/۴۰۱	۰/۰۰۴	۰/۰۳۵
۱۲۴۶	۲۲/۷	۷/۱	۸/۳	۸۴۳	۱۸۰	۰/۴۱۷	۰/۰۰۴	۰/۰۲۹
۱۳۹۱	۲۲/۷	۶/۹	۸/۱	۸۳۱	۱۸۰	۰/۳۴۱	۰/۰۰۵	۰/۰۳۵
۱۵۵۴	۲۲/۷	۶/۹	۸	۷۹۴	۱۸۰	۰/۳۱۸	۰/۰۰۴	۰/۰۳۴
۱۷۸۵	۲۲/۷	۶/۷	۷/۴	۷۷۶	۱۸۰	۰/۳۸۴	۰/۰۰۵	۰/۰۳۶
۲۰۰۰	۲۲/۵	۶/۷	۷/۴	۷۵۸	۱۸۰	۰/۴۱۱	۰/۰۰۵	۰/۰۳۶
شاهد	۲۲/۹	۷/۸	۸/۶	۸۷۰	۱۸۰	۰/۵۰۷	۰/۰۰۶	۰/۰۸۳

جدول ۲۶- غلظت اکسیژن محلول (mg/l) و درصد تغییرات آن در آب محیط عیار سنجی زیستی طی ۹۶ ساعت

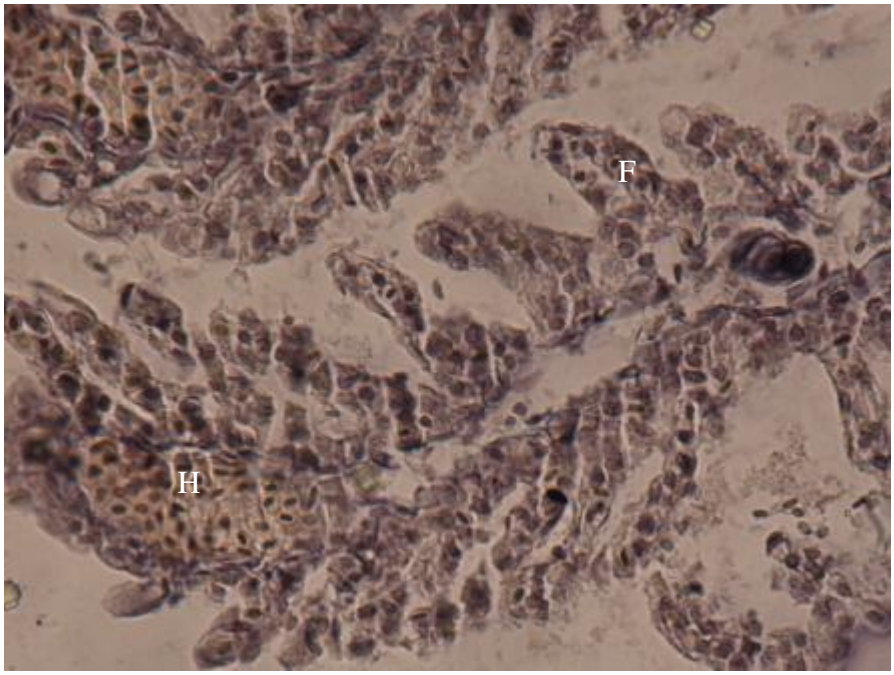
غلظت (mg/l)	24 h	48 h	72 h	96 h	درصد تغییرات اکسیژن محلول پس از ۹۶ ساعت
۱۰۰۰	۹	۸/۹	۸/۷	۸/۳	۷/۷
۱۱۱۶	۹	۸/۸	۸/۵	۸/۲	۸/۸
۱۲۴۶	۸/۸	۸/۶	۸/۴	۸/۳	۵/۶
۱۳۹۱	۸/۸	۸/۶	۸/۴	۸/۱	۷/۹
۱۵۵۴	۸/۵	۸/۳	۸/۲	۸	۵/۸
۱۷۸۵	۸/۵	۸/۳	۸/۱	۷/۴	۱۲/۹
۲۰۰۰	۸/۴	۸/۲	۸	۷/۴	۱۱/۹
شاهد	۹/۱	۹	۸/۸	۸/۶	۵/۴

در این مطالعه، میزان کاهش اکسیژن محلول در غلظت های مختلف برای عصاره سیر بین ۵/۶ تا ۱۲/۹ درصد بوده است. این مقدار کاهش اکسیژن ناچیز بوده و نمی تواند تأثیر چشمگیری بر روی بچه ماهیان در طی مدت آزمایش داشته باشد. دما و pH در آزمایشات فوق در محدوده ای مناسب قرارداشته و نوع آمونیاک آب محیط آزمایش بیشر به شکل آمونیم غیر سمی بوده که در محدوده مناسب استاندارد قرار داشت لذا تداخلی در محیط آزمایش ایجاد ننمود.

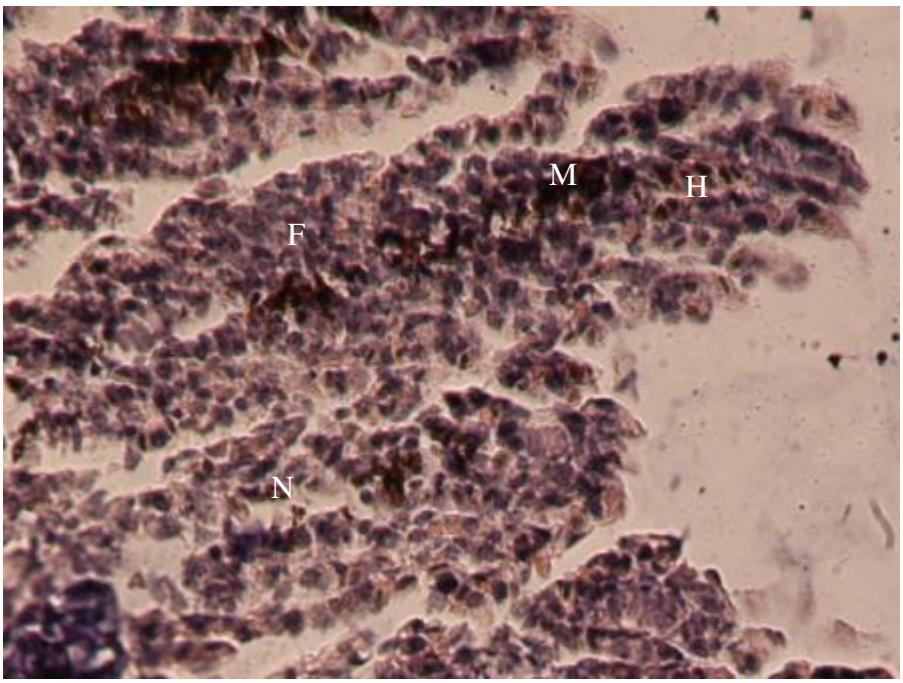
- اثرات هیستوپاتولوژیک غلظتهای مختلف عصاره هیدروالکلی سیر بربافتهای آبشش، کبد و پوست در مطالعه تعیین LC_{50} - ۹۶ ساعته

بررسی تصاویر تهیه شده از مقاطع بافتی آبشش، کبد و پوست بچه تاسماهیان ایرانی که تحت تأثیر غلظتهای مختلف عصاره هیدروالکلی سیر در آزمایش مربوط به تعیین غلظتهای کشنده قرار داشتند برخی از آسیب های میکروسکوپیک را نشان داده است. نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی بافت آبشش حاکی از ضایعات هیستوپاتولوژیک نظیر پرخونی، چسبندگی در رشته های آبششی، نکروز سلولی، وجود رنگدانه های ملانین در رشته های اولیه آبششی می باشد. بررسی مقاطع بافتی کبد در تیمارهای مختلف عوارضی نظیر تورم ابری در هپاتوسیتها، نکروزسلولی، مشاهده پرخونی، افزایش رنگدانه های ملانین و مراکز ملانو ماکروفاژها بوده است. در بررسی بافت پوست بچه تاسماهیان ایرانی تغییراتی نظیر پرخونی، افزایش ملانوفور و رنگدانه ملانین، افزایش سلول های موکوسی،افزایش حضور لنفوسیت، نکروز در لایه اپیدرم در تیمار های سیر مشاهده گردید.

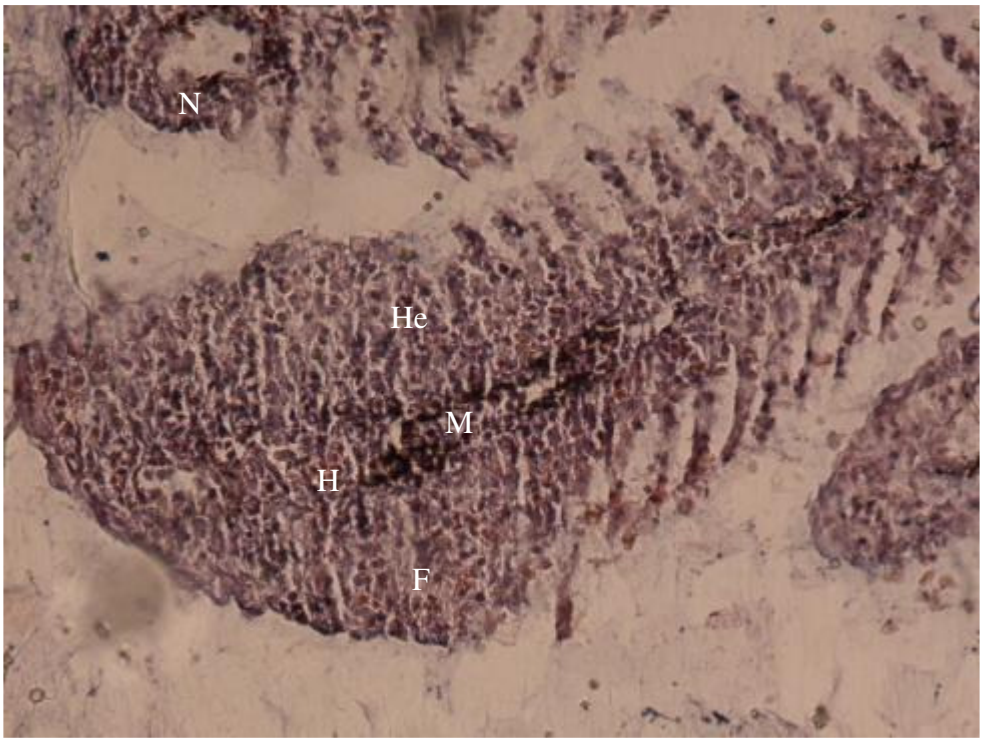
اثرات عصاره سیر (LC_{50}) بر بافت آبشش بچه تاسماهی ایرانی:



تصویر ۳۳- پرخونی (H) و چسبندگی (F) در رشته های آبشش – تیمار۱ (H&E ،x٤٠)

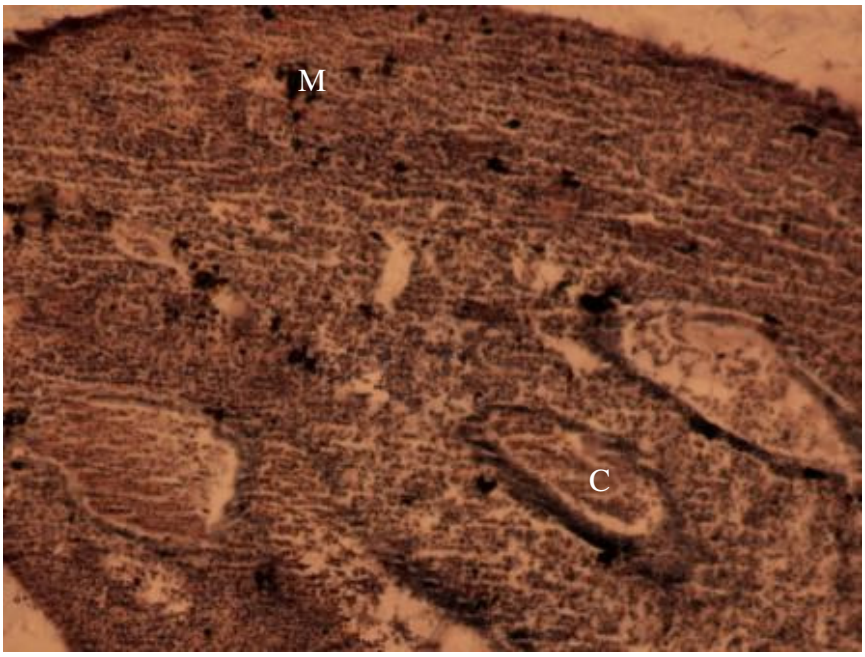


تصویر ٣٤- مشاهده پرخونی (H) رنگدانه های ملانین (M)، چسبندگی رشته های آبششی ثانویه (F) و نکروز در آبشش- تیمار۳ (H&E ،x٤٠)

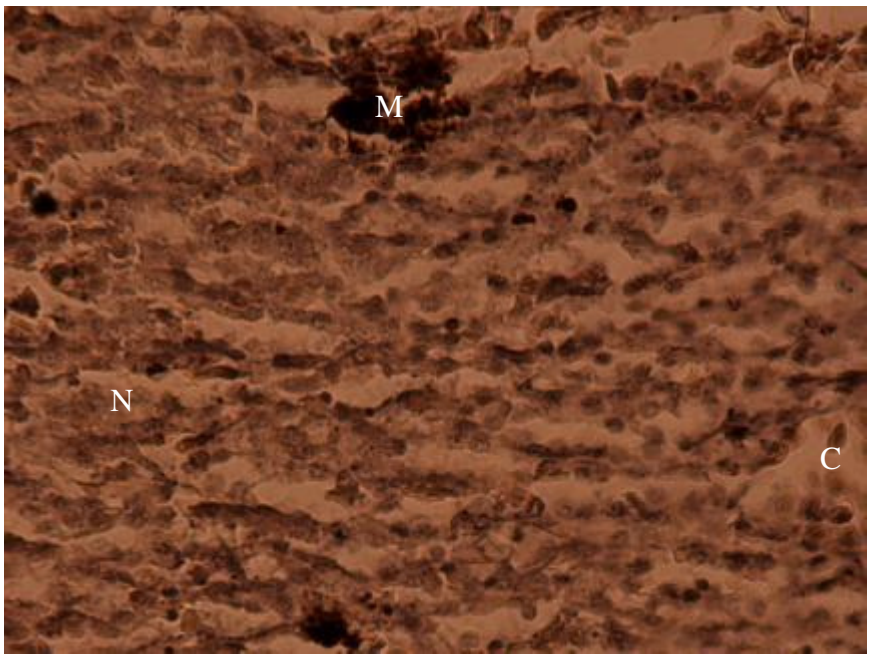


تصویر ۳۵- مشاهده پرخونی (H)، رنگدانه های ملانین (M) و چسبندگی (F) رشته های آبششی ثانویه – تیمار۷ (H&E ،x۲۰)

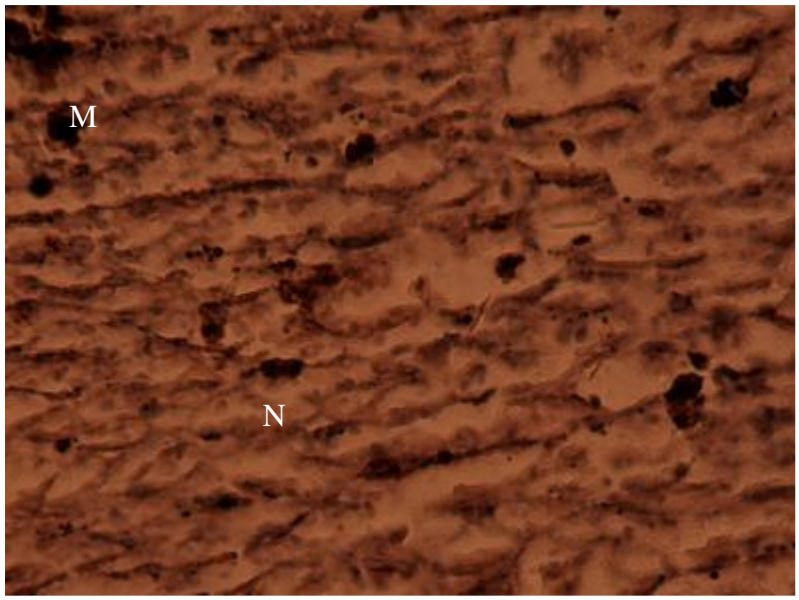
- **اثرات عصاره آویشن شیرازی (LC_{50}) بر بافت کبد بچه تاسماهی ایرانی:**



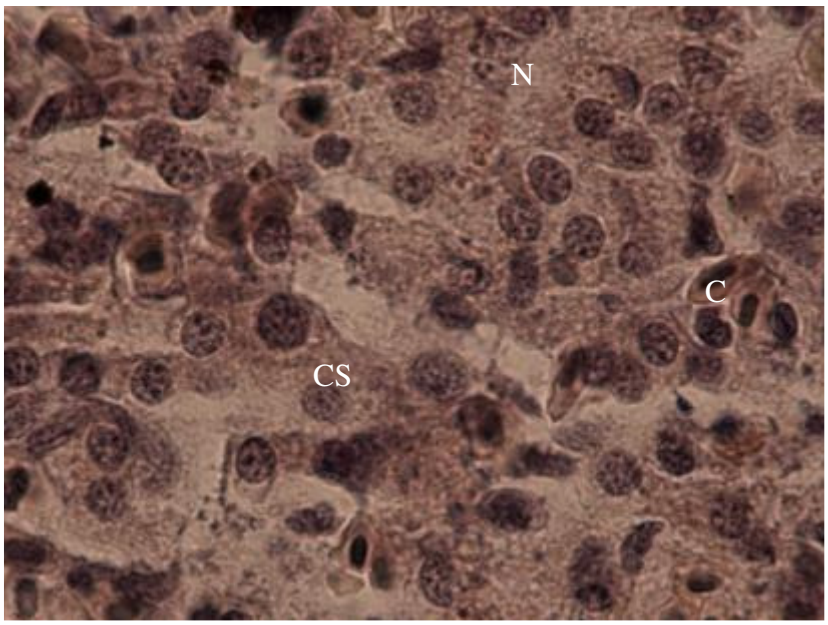
تصویر۳۶- مشاهده پرخونی (C) و حضور رنگدانه های ملانین (M) در کبد – تیمار۱ (H&E ،x۱۰)



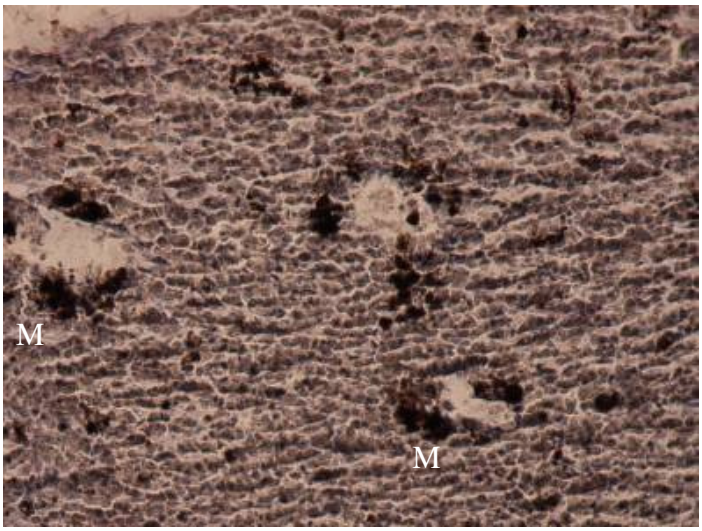
تصویر ۳۷- پرخونی (C) وجود رنگدانه های ملانین (M) و نکروز سلولی (N) در کبد- تیمار۲ (H&E ،x٤٠)



تصویر ۳۸- وجود رنگدانه های ملانین (M) و نکروز بافت کبد (N) – تیمار۳(H&E ،x٤٠)



تصویر ۳۹- پرخونی (C)، نکروز سلولی (N) و تورم ابری (CS) در کبد- تیمار٤ (H&E ،x١٠٠)



تصویر ٤٠- افزایش مراکز ملانوماکروفاژی (M) در کبد – تیمار٦ (x٢٠، H&E)

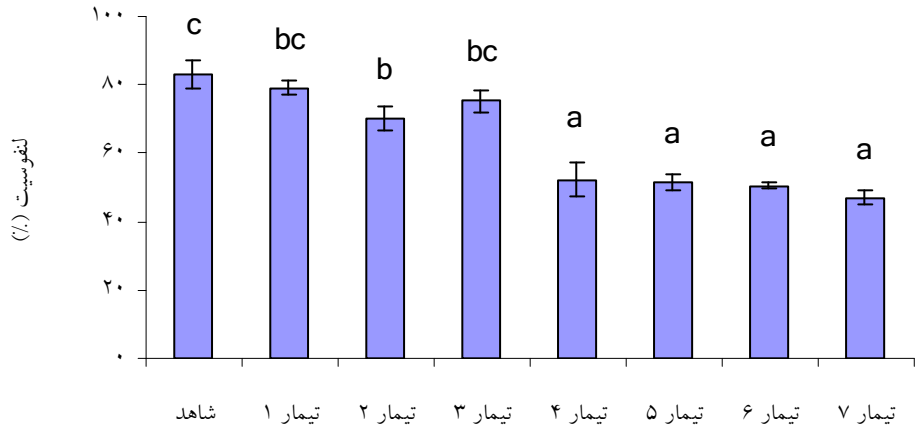
- مطالعات هماتولوژی تأثیر عصاره سیر- LC_{50} :

با توجه به کوچک بودن سایز بچه تاسماهیان ایرانی فقط انجام مطالعه افتراقی گلبولهای سفید ممکن بوده که در زیر به نتایج آن اشاره می گردد:

لنفوسیت: بررسی میزان لنفوسیت خون ماهیان مورد بررسی، بوسیله آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) نشان داد که بین تیمار ها اختلاف معنی دار آماری وجود دارد ($P<0.05$). همچنین بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه گروهها با یکدیگر، حاکی از کاهش لنفوسیت خون بچه ماهیان در غلظت های مختلف سیر بوده است. بطوریکه کمترین میزان لنفوسیت در تیمار ۷ و بیشترین میزان لنفوسیت در شاهد مشاهده شده است و به لحاظ آماری نیز اختلاف معنی دار بین شاهد و سایر تیمارها مشاهده گردید.($P<0.05$).

جدول ۲۷- میانگین لنفوسیت در شاهد و تیمار های مختلف سیر

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد ± میانگین
لنفوسیت	شاهد	۸۳ ± ۶/۹۲ ^{c}
	تیمار ۱	۷۹ ±۳/۴۶ ^{bc}
	تیمار ۲	۷۰/۳۳ ±۳/۳۸ ^{b}
	تیمار ۳	۷۵/۳۳ ± ۳/۱۸ ^{bc}
	تیمار ۴	۵۲/۳۳ ± ۵ /۲۴ ^{a}
	تیمار ۵	۵۱/۳۳ ±۲/۴۰ ^{a}
	تیمار ۶	۵۰/۳۳ ±۰/۸۸ ^{a}
	تیمار ۷	۴۷ ± ۲/۰۸ ^{a}

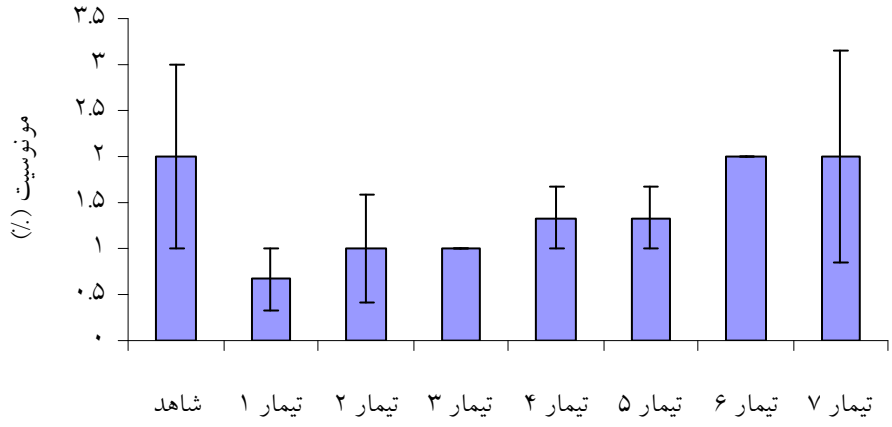


نمودار ۲۱- مقایسه میانگین میزان لنفوسیت شاهد با تیمار های مختلف سیر

مونوسیت : بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان مونوسیت خون ماهیان مورد بررسی بین تیمار ها اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد (P>0.05).

جدول ۲۸- میانگین مونوسیت در شاهد و تیمار های مختلف سیر

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد ± میانگین
مونوسیت	شاهد	۲ ±۱/۷۳
	تیمار ۱	۰/۶۶ ±۰/۳۳
	تیمار ۲	۱ ±۰/۵۸
	تیمار ۳	۱ ± ERR
	تیمار ۴	۱/۳۳ ± ۰/۵۷
	تیمار ۵	۱/۳۳ ± ۰/۵۷
	تیمار ۶	۲ ± ERR
	تیمار ۷	۲ ±۲

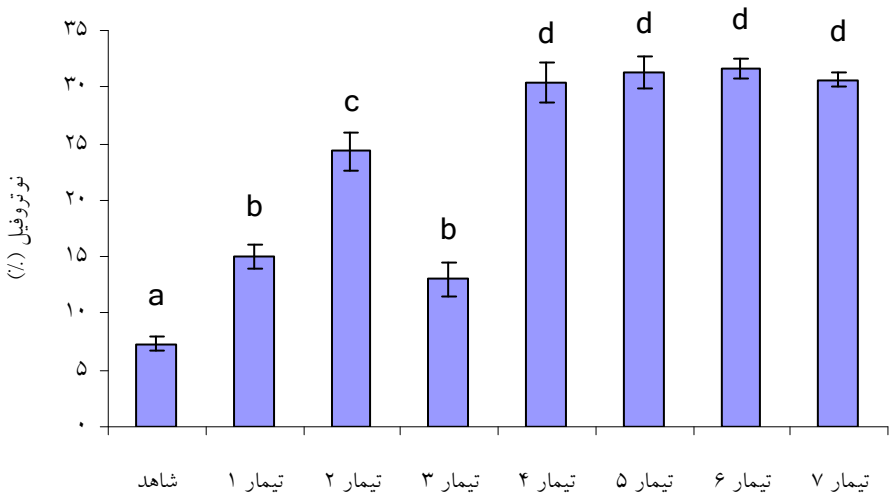


نمودار۲۲- مقایسه میانگین میزان مونوسیت شاهد با تیمار های مختلف

نوتروفیل : بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان نوتروفیل خون ماهیان مورد بررسی، بین تیمار ها اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد (P<0.05). و بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه گروهها با یکدیگر میزان نوتروفیل خون بچه ماهیان در تیمار ها افزایش یافته و میزان این فاکتور در خون بچه ماهیان در تیمار ۴،۵ ، ۶ و ۷ بیش از شاهد و سایر تیمار ها بوده و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار مشاهده گردید.(P<0.05) .

جدول ۲۹- میانگین نوتروفیل در شاهد و تیمار های مختلف سیر

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد ± میانگین
نوتروفیل	شاهد	۷/۳۳ ± ۰ /۶۶^{a}
	تیمار ۱	۱۵ ±۱^{b}
	تیمار ۲	۲۴/۳۳ ±۱/۶۶^{c}
	تیمار ۳	۱۳ ±۱/۵۳^{b}
	تیمار ۴	۳۰/۳۳ ± ۱/۷۶^{d}
	تیمار ۵	۳۱/۳۳ ±۱/۴۵^{d}
	تیمار ۶	۳۱/۶۶ ±۰/۸۸^{d}
	تیمار ۷	۳۰/۶۶ ± ۰/۶۶^{d}

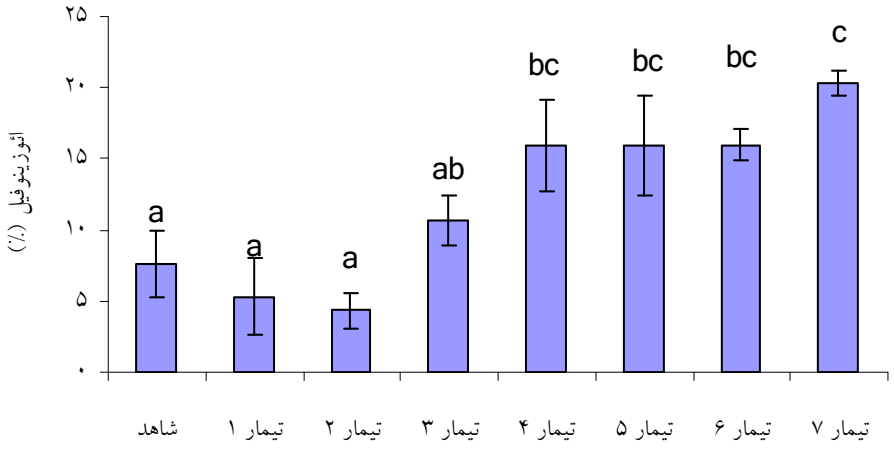


نمودار ۲۳- مقایسه میانگین میزان نوتروفیل در تیمار های مختلف سیر

ائوزینوفیل: بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) مقایسه میزان ائوزینوفیل خون ماهیان مورد بررسی بین تیمار ها، اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد (P<0.05). و بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه گروهها با یکدیگر میزان ائوزینوفیل خون بچه ماهیان در تیمار۷ بیش از سایر تیمارها بوده است و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار بین تیمار های ۷، ۶، ۵ و ۴ با سایر تیمار ها و شاهد مشاهده گردید(P<0.05).

جدول ۳۰- میانگین ائوزینوفیل در شاهد و تیمار های مختلف سیر

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد ± میانگین
ائوزینوفیل	شاهد	۷/۶۶ ± ۲ /۳۳ a
	تیمار ۱	۵/۳۳ ±۲/۶۶ a
	تیمار ۲	۴/۳۳ ±۱/۲۰ a
	تیمار ۳	۱۰/۶۶ ±۱/۷۶ ab
	تیمار ۴	۱۶ ± ۳/۲۱ bc
	تیمار ۵	۱۶ ±۳/۲۱ bc
	تیمار ۶	۱۶ ±۱/۱۵ bc
	تیمار ۷	۲۰/۳۳ ± ۰/۸۸c



نمودار ۲٤- میانگین ائوزینوفیل در شاهد و تیمار های مختلف سیر

۳-۳- اجرای آزمایشات تعیین EC_{50} (تعیین غلظت های مؤثره بر انگل تریکودینا):

بمنظور اجرای آزمایشات تعیین غلظت های مؤثره عصاره های سیر و آویشن شیرازی در مبارزه با انگل تریکودینا، پس از انتقال بچه ماهیان بهمراه آب استخرهای خاکی پرورشی (بمنظور عدم ایجاد تغییرات در میزان مواد آلی موجود در آب و عدم کاهش شدت انگل تریکودینا) به وانهای نیم تنی، بلافاصله زیست سنجی و نمونه برداری از بچه تاسماهیان ایرانی انجام شد و میزان شیوع و شدت انگل مذکور تعیین گردید. سپس بمنظور تعیین EC_{50} هر یک از عصاره ها، بچه تاسماهیان ایرانی به آکواریومهایی که بدین منظور آبگیری و هوادهی شده بودند منتقل شدند. در این راستا برای هر عصاره، ۸ تیمار و هرکدام با ۳ تکرار در نظر گرفته شد و در هر آکواریوم ۲۰ عدد بچه تاسماهی ایرانی قرار داده شد. بچه تاسماهیان مورد استفاده دارای میانگین وزنی ۰/۴۷ ± ۳/۱۴ گرم و میانگین طولی ۰/۵۹ ± ۸/۹۶ سانتیمتربودند.

با توجه به تعیین غلظتهای کشنده عصاره ها بر روی بچه تاسماهی ایرانی و تعیین MATC value (حداکثر غلظت مجاز) با استفاده از روابط لگاریتمی نسبت به تعیین دوزهای مناسب مطالعات EC_{50} اقدام گردید. لازم بذکر است قبل از انتقال بچه ماهیان جهت انجام آزمایش اصلی تعیین غلظت مؤثره عصاره ها بر روی انگل تریکودینا، یکبار بصورت آزمایشی دوزهای محاسبه شده توسط روابط لگاریتمی، مورد تیماربندی قرار گرفت و سپس بچه ماهیان با آب استخر خاکی پرورشی به وانهای نیم تنی انتقال و مورد آزمایش نهایی قرار گرفتند.

تصویر ٤١ – انگل تریکودینا scale bar 10 µm , (746X)

۱-۳-۳- تعیین غلظت مؤثر(EC_{50}) عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی بر علیه انگل تریکودینا

بمنظور بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی در مبارزه با انگل تک یاخته ای تریکودینا در بچه تاسماهی ایرانی، ضمن انجام مطالعات تعیین غلظتهای مؤثر عصاره بر انگل مذکور، نسبت به اندازه گیری فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب، بررسیهای هماتولوژی و هیستوپاتولوژی تأثیرات دوزهای مختلف اقدام گردید. با توجه به اینکه در نظر است دوز های مؤثر نیمه کشندگی عصاره آویشن شیرازی در مبارزه با تریکودینا طی مدت یکساعت تعیین گردد، لذا در این مطالعه در فواصل زمانی ۳۰ دقیقه ای نسبت به نمونه برداری از بچه ماهیان و بررسی شدت آلودگی به انگل مذکور در پوست و آبشش اقدام گردید.

در این تحقیق بمنظور یافتن محدوده غلظت عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی آزمایشات ابتدایی ($pre\text{-}EC_{50}$) بر روی انگل مذکور در بچه تاسماهیان ایرانی انجام گرفت و سرانجام محدوده غلظت ۲۰۰ تا ۶۰۰ میلی گرم در لیتر برای انجام آزمایشات نهایی تعیین گردید. بر اساس محاسبات لگاریتمی ۸ تیمار (۲۰۰، ۲۳۵، ۲۷۵، ۳۲۰، ۳۷۵، ۴۴۰ ، ۵۱۰ و ۶۰۰ میلی گرم لیتر) در نظر گرفته شد و نسبت به گروه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین میزان EC_{10} ، EC_{50} و EC_{90} عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی طی مدت زمان ۳۰ و ۶۰ دقیقه محاسبه گردید. بر این اساس ضمن اینکه برای اولین بار مشخص گردید که عصاره آویشن شیرازی می تواند در مبارزه با انگل تک یاخته ای تریکودینا مؤثر باشد، میزان EC_{50} این عصاره طی مدت یکساعت حمام برابر ۴۳۷/۶۲ میلی گرم در لیتر تعیین گردید. همچنین معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی (R^2) حاکی از وجود ارتباط مستقیم (همبستگی قوی و مثبت) بین غلظتهای مورد بررسی با میزان حذف انگل تریکودینا از بچه تاسماهیان ایرانی می باشد (نمودارهای ۲۵ الی ۳۲). ازلحاظ رفتاری هیچگونه علائم غیر طبیعی در تیمارهای مختلف مشاهده نگردید.

جدول ۳۱ ـ تأثیر غلظتهای مختلف آویشن شیرازی روی کاهش میزان شدت انگل تریکودینا در تاسماهی ایرانی طی ۳۰ دقیقه (تکرار ۱)

تیمار	غلظت آویشن شیرازی (ppm)	میانگین تعداد انگل در سه نمونه	مرده	تغییرات نسبت به شاهد	لگاریتم غلظت	Probit value
شاهد	۰	۱۶۸,۳۳	۰	۰	۰	۰
I	۲۰۰	۱۵۸,۳۳	۱۰	۵,۹۴	۲,۳	۳,۴۳۶۸
II	۲۳۵	۱۴۸,۳۳	۲۰	۱۱,۸۸	۲,۳۷	۳,۸۱۵۰
III	۲۷۵	۱۴۳,۳۳	۲۵	۱۴,۸۵	۲,۴۳	۳,۹۵۵۰
IV	۳۲۰	۱۳۱,۶۶	۳۶,۶۷	۲۱,۷۸	۲,۵۰	۴,۲۱۷۶
V	۳۷۵	۱۱۶,۶۶	۵۱,۶۷	۳۰,۶۹	۲,۵۷	۴,۴۹۲۸
VI	۴۴۰	۹۴	۷۴,۳۳	۴۴,۱۵	۲,۶۴	۴,۸۵۱۶
VII	۵۱۰	۸۳,۳۳	۸۵	۵۰,۴۹	۲,۷۰	۵,۰۱
VIII	۶۰۰	۲۰	۱۴۸,۳۳	۸۸,۱۱	۲,۷۷	۶,۱۸

جدول ۳۲ ـ تأثیر غلظتهای مختلف آویشن شیرازی روی کاهش میزان شدت انگل تریکودینا در تاسماهی ایرانی طی ۳۰ دقیقه (تکرار ۲)

تیمار	غلظت آویشن شیرازی (ppm)	میانگین تعداد انگل در سه نمونه	مرده	تغییرات نسبت به شاهد	لگاریتم غلظت	Probit value
شاهد	۰	۱۵۴,۳۳	۰	۰	۰	۰
I	۲۰۰	۱۵۸,۳۳	۵	۳,۲۳	۲,۳	۳,۱۴۷۸
II	۲۳۵	۱۴۸,۳۳	۶	۳,۸۸	۲,۳۷	۳,۲۲۵۶
III	۲۷۵	۱۴۳,۳۳	۱۱	۷,۱۲	۲,۴۳	۳,۵۳۱۶
IV	۳۲۰	۱۳۰	۲۴,۳۳	۱۵,۷۶	۲,۵۰	۳,۹۹۳۱
V	۳۷۵	۱۱۶,۶۶	۳۷,۶۷	۲۴,۴	۲,۵۷	۴,۳۰۶۵
VI	۴۴۰	۹۴	۶۰,۳۳	۳۹,۰۹	۲,۶۴	۴,۷۴۴۱
VII	۵۱۰	۸۵,۶۶	۶۸,۶۷	۴۴,۴۹	۲,۷۰	۴,۸۵۹۲
VIII	۶۰۰	۱۹,۳۳	۱۳۵	۸۷,۴۷	۲,۷۷	۶,۱۴۵۵

جدول ۳۳ ـ تأثیر غلظتهای مختلف آویشن شیرازی روی کاهش میزان شدت انگل تریکودینا در تاسماهی ایرانی طی ۳۰ دقیقه (تکرار ۳)

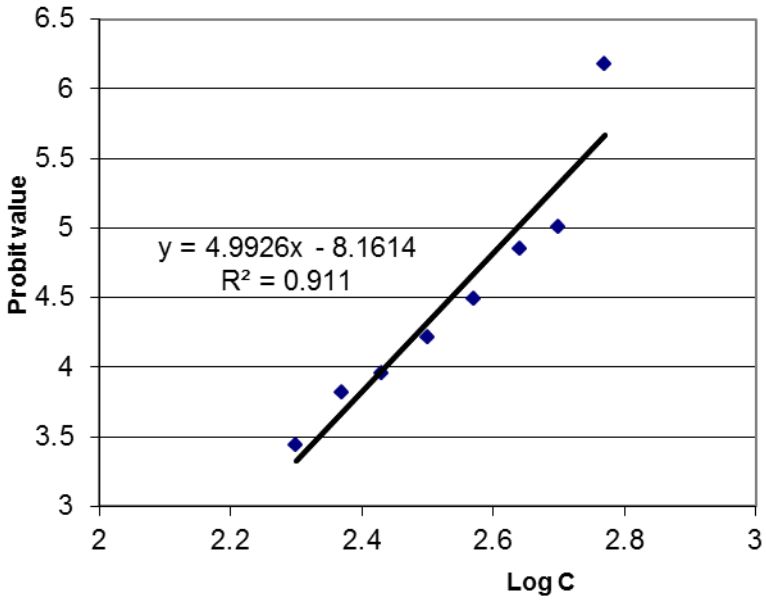
تیمار	غلظت آویشن شیرازی (ppm)	میانگین تعداد انگل در سه نمونه	مرده	تغییرات نسبت به شاهد	لگاریتم غلظت	Probit value
شاهد	۰	۱۵۵	۰	۰	۰	۰
I	۲۰۰	۱۵۲,۳۳	۲,۶۷	۱,۷۲	۲,۳	۲,۸۷۹۹
II	۲۳۵	۱۴۸,۳۳	۶,۶۷	۴,۳	۲,۳۷	۳,۲۸۳۱
III	۲۷۵	۱۴۳,۳۳	۱۱,۶۷	۷,۵۲	۲,۴۳	۳,۵۶۰۵
IV	۳۲۰	۱۳۰	۲۵	۱۶,۱۲	۲,۵۰	۴,۰۰۹۶
V	۳۷۵	۱۱۶,۶۶	۳۸,۳۴	۲۴,۷۳	۲,۵۷	۴,۳۱۶۰
VI	۴۴۰	۹۴	۶۱	۳۹,۳۵	۲,۶۴	۴,۷۲۸۵
VII	۵۱۰	۸۷,۳۳	۶۷,۶۷	۴۳,۶۵	۲,۷۰	۴,۸۳۸۹
VIII	۶۰۰	۱۸,۶۶	۱۳۶,۳۴	۸۷,۹۶	۲,۷۷	۶,۱۷

جدول ۳٤ ـ تأثیر غلظتهای مختلف آویشن شیرازی روی کاهش میزان شدت انگل تریکودینا در تاسماهی ایرانی طی ۳۰ دقیقه (میانگین سه تکرار)

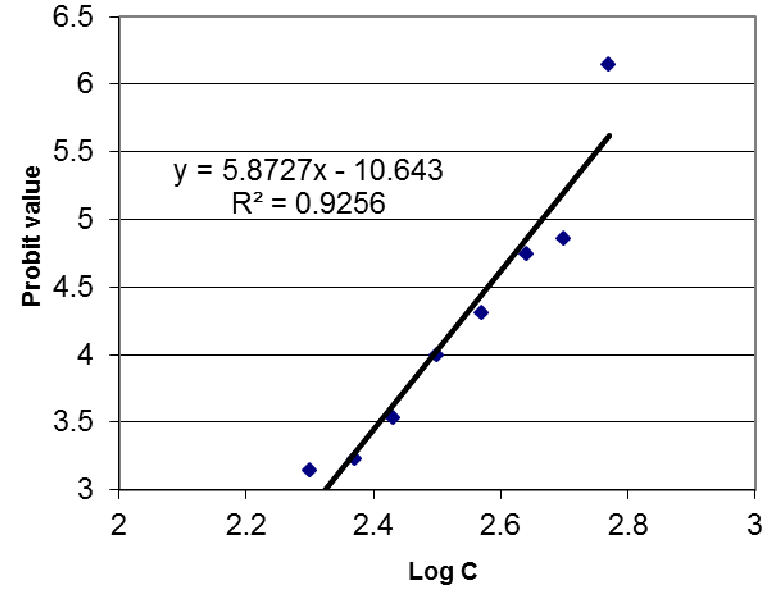
تیمار	غلظت آویشن شیرازی (ppm)	میانگین تعداد انگل در سه نمونه	مرده	تغییرات نسبت به شاهد	لگاریتم غلظت	Probit value
شاهد	۰	۱۵۹,۲۲	۰	۰	۰	۰
I	۲۰۰	۱۵۸,۳۳	۰,۸۹	۰,۵۵	۲,۳	۲,۴۲۴۲
II	۲۳۵	۱۴۸,۳۳	۱۰,۸۹	۶,۸۳	۲,۳۷	۳,۵۰۹۱
III	۲۷۵	۱۴۳,۳۳	۱۵,۸۹	۹,۹۷	۲,۴۳	۳,۷۱۲۷
IV	۳۲۰	۱۳۰,۵۵	۲۸,۶۷	۱۸	۲,۵۰	۴,۰۸۴۶
V	۳۷۵	۱۱۶,۶۶	۴۲,۵۶	۲۶,۷۳	۲,۵۷	۴,۳۷۸۱
VI	۴۴۰	۹۴	۶۵,۲۲	۴۰,۹۶	۲,۶۴	۴,۷۶۹۹
VII	۵۱۰	۸۵,۴۴	۷۳,۷۸	۴۶,۳۳	۲,۷۰	۴,۹۰۷۱
VIII	۶۰۰	۱۹,۳۳	۱۳۹,۸۹	۸۷,۸۵	۲,۷۷	۶,۱۶۵۰

جدول ۳۵ ـ غلظتهای مؤثر آویشن شیرازی طی ۳۰ دقیقه بر روی انگل موجود در بچه تاسماهی ایرانی

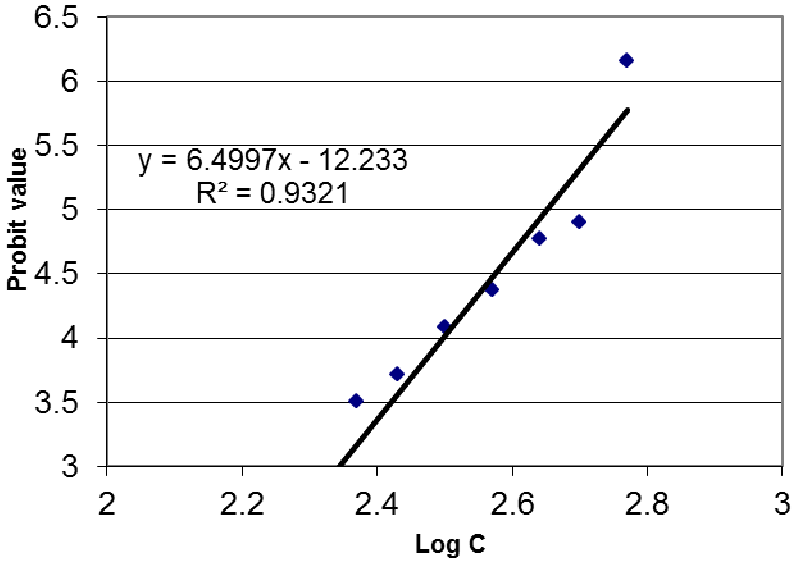
نام ماده	مقدار EC	تکرار ۱	تکرار ۲	تکرار ۳	میانگین سه تکرار
آویشن شیرازی	EC_{10}	۲۳۹/۵۵	۲۷۸/۸۶	۲۸۳/۶۶	۲۸۴/۵۱
	EC_{50}	۴۳۲/۶۱	۴۶۰/۸۹	۴۵۷/۰۸	۴۴۸/۰۲
	EC_{90}	۷۸۱/۲۶	۷۶۱/۹	۷۴۱/۳۱	۷۰۵/۵



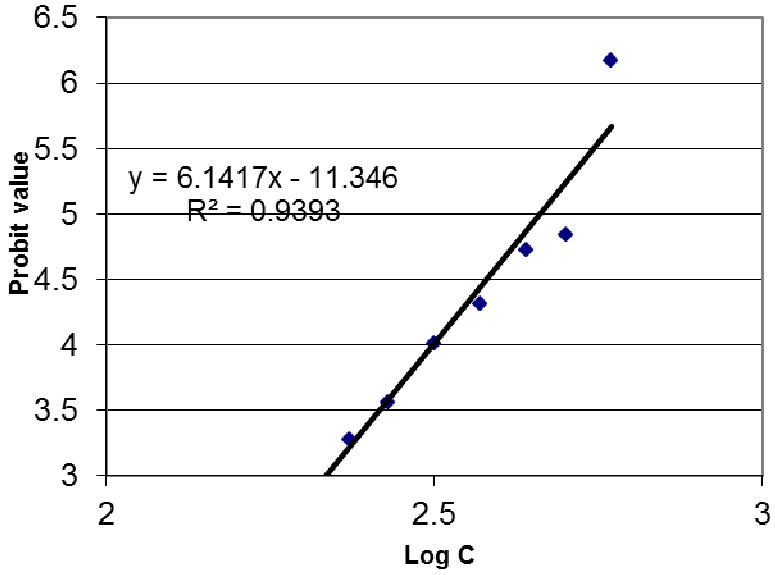
نمودار۲۵-معادله خط رگرسیون تأثیر غلظت آویشن شیرازی بر کاهش شدت تریکودینا در بچه تاسماهی ایرانی طی ۳۰ دقیقه (تکرار ۱)



نمودار ۲۶- معادله خط رگرسیون تأثیر غلظت آویشن شیرازی بر کاهش شدت تریکودینا در بچه تاسماهی ایرانی طی ۳۰ دقیقه (تکرار ۲)



نمودار۲۷- معادله خط رگرسیون تأثیر غلظت آویشن شیرازی بر کاهش شدت تریکودینا در بچه تاسماهی ایرانی طی ۳۰ دقیقه (تکرار ۳)



نمودار ۲۸- معادله خط رگرسیون تأثیر غلظت آویشن شیرازی بر کاهش شدت تریکودینا در بچه تاسماهی ایرانی طی ۳۰ دقیقه (میانگین سه تکرار)

جدول ۳۶ ـ تأثیر غلظتهای مختلف آویشن شیرازی روی کاهش میزان شدت انگل تریکودینا در تاسماهی ایرانی طی ۶۰ دقیقه (تکرار ۱)

تیمار	غلظت آویشن شیرازی (ppm)	میانگین تعداد انگل در سه نمونه	مرده	تغییرات نسبت به شاهد	لگاریتم غلظت	Probit value
شاهد	۰	۱۶۸,۳۳	۰	۰	۰	۰
I	۲۰۰	۱۵۵	۱۳,۳۳	۷,۹۲	۲,۳	۳,۵۸۸۲
II	۲۳۵	۱۴۰,۶	۲۷,۷۳	۱۶,۴۸	۲,۳۷	۴,۰۲۱۸
III	۲۷۵	۱۳۲,۳	۳۶,۰۳	۲۱,۴۱	۲,۴۳	۴,۲۰۷۴
IV	۳۲۰	۱۲۱,۶	۴۶,۷۳	۲۷,۷۶	۲,۵۰	۴,۴۰۸۲
V	۳۷۵	۹۸,۳	۷۰,۰۳	۴۱,۶۱	۲,۵۷	۴,۷۸۷۹
VI	۴۴۰	۸۶	۸۲,۳۳	۴۸,۹۱	۲,۶۴	۴,۹۷۲۴
VII	۵۱۰	۳۳,۳	۱۳۵,۰۳	۸۰,۲۲	۲,۷۰	۵,۸۴۸۸

جدول ۳۷ ـ تأثیر غلظتهای مختلف آویشن شیرازی روی کاهش میزان شدت انگل تریکودینا در تاسماهی ایرانی طی ۶۰ دقیقه (تکرار ۲)

تیمار	غلظت آویشن شیرازی (ppm)	میانگین تعداد انگل در سه نمونه	مرده	تغییرات نسبت به شاهد	لگاریتم غلظت	Probit value
شاهد	۰	۱۵۴,۳۳	۰	۰	۰	۰
I	۲۰۰	۱۴۸,۳	۶,۰۳	۳,۹۱	۲,۳	۳,۲۳۷۶
II	۲۳۵	۱۴۲,۳	۱۲,۰۳	۷,۸	۲,۳۷	۳,۵۸۱۳
III	۲۷۵	۱۳۱,۶	۲۲,۷۳	۱۴,۷۳	۲,۴۳	۳,۹۵۰۶
IV	۳۲۰	۱۲۲,۳	۳۲,۰۳	۲۰,۷۶	۲,۵۰	۴,۱۸۳۱
V	۳۷۵	۹۸,۳	۵۶,۰۳	۳۶,۳۱	۲,۵۷	۴,۶۴۹۵
VI	۴۴۰	۸۸,۳	۶۰,۰۳	۳۸,۹۰	۲,۶۴	۴,۷۱۸۱
VII	۵۱۰	۳۴,۳۳	۱۲۰	۷۷,۷۶	۲,۷۰	۵,۷۶۲۱

جدول ۳۸ ـ تأثیر غلظتهای مختلف آویشن شیرازی روی کاهش میزان شدت انگل تریکودینا در تاسماهی ایرانی طی ٦٠ دقیقه (تکرار ۳)

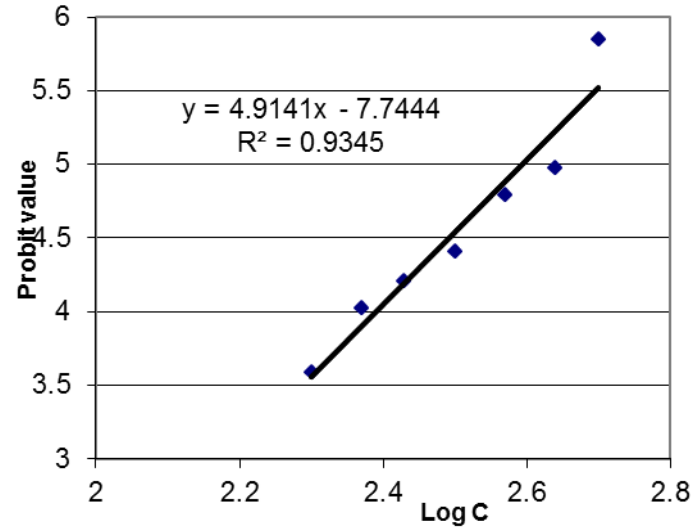
تیمار	غلظت آویشن شیرازی (ppm)	میانگین تعداد انگل در سه نمونه	مرده	تغییرات نسبت به شاهد	لگاریتم غلظت	Probit value
شاهد	۰	۱۵۵	۰	۰	۰	۰
I	۲۰۰	۱۴۸,۳	۶,۷	۴,۳۳	۲,۳	۳,۲۸۳۱
II	۲۳۵	۱۴۱,۶	۱۳,۴	۸,۶۵	۲,۳۷	۳,۶۳۴۲
III	۲۷۵	۱۳۰,۶	۲۴,۴۰	۱۵,۷۵	۲,۴۳	۳,۹۹۳۱
IV	۳۲۰	۱۲۰,۶	۳۴,۴۰	۲۲,۲۰	۲,۵۰	۴,۲۳۴۵
V	۳۷۵	۹۸,۳	۵۶,۷۰	۳۶,۵۸	۲,۵۷	۴,۶۵۴۹
VI	۴۴۰	۸۷,۶	۶۷,۴۰	۴۳,۴۹	۲,۶۴	۴,۸۳۳۸
VII	۵۱۰	۳۴,۳	۱۲۰,۷۰	۷۷,۸۷	۲,۷۰	۵,۷۶۵۵

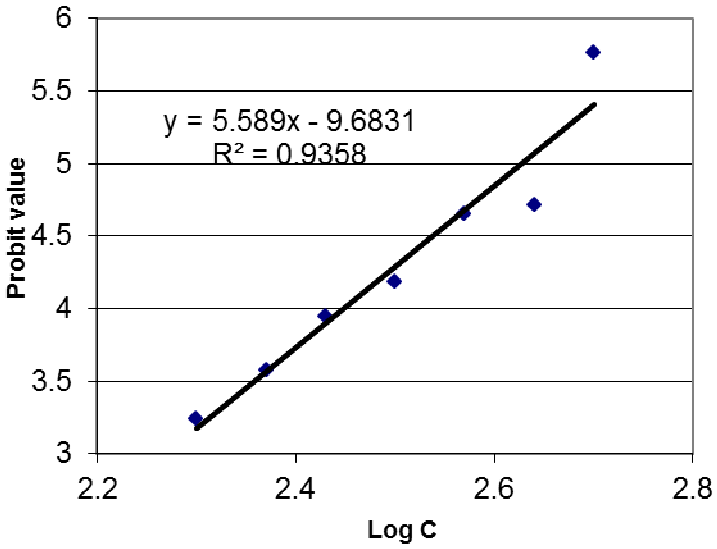
جدول ۳۹ ـ تأثیر غلظتهای مختلف آویشن شیرازی روی کاهش میزان شدت انگل تریکودینا در تاسماهی ایرانی طی ٦٠ دقیقه (میانگین سه تکرار)

تیمار	غلظت آویشن شیرازی (ppm)	میانگین تعداد انگل در سه نمونه	مرده	تغییرات نسبت به شاهد	لگاریتم غلظت	Probit value
شاهد	۰	۱۵۹,۲	۰	۰	۰	۰
I	۲۰۰	۱۵۰,۵۳	۸,۶۷	۵,۴۵	۲,۳	۳,۳۹۲۸
II	۲۳۵	۱۴۱,۵	۱۷,۷۰	۱۱,۱۲	۲,۳۷	۳,۷۷۸۸
III	۲۷۵	۱۳۱,۵	۲۷,۷۰	۱۷,۴۰	۲,۴۳	۴,۰۶۱۵
IV	۳۲۰	۱۲۱,۵	۳۷,۷۰	۲۳,۶۸	۲,۵۰	۴,۲۸۰۸
V	۳۷۵	۹۸,۳	۶۰,۹۰	۳۸,۲۶	۲,۵۷	۴,۶۹۹۸
VI	۴۴۰	۸۷,۳	۷۱,۹	۴۵,۱۷	۲,۶۴	۴,۸۷۶۹
VII	۵۱۰	۵۶,۸۷	۱۰۲,۳۳	۶۴,۲۸	۲,۷۰	۵,۳۶۳۸

جدول ٤٠ـ غلظتهای مؤثر آویشن شیرازی طی ٦٠ دقیقه بر روی انگل تریکودینا در بچه تاسماهی ایرانی

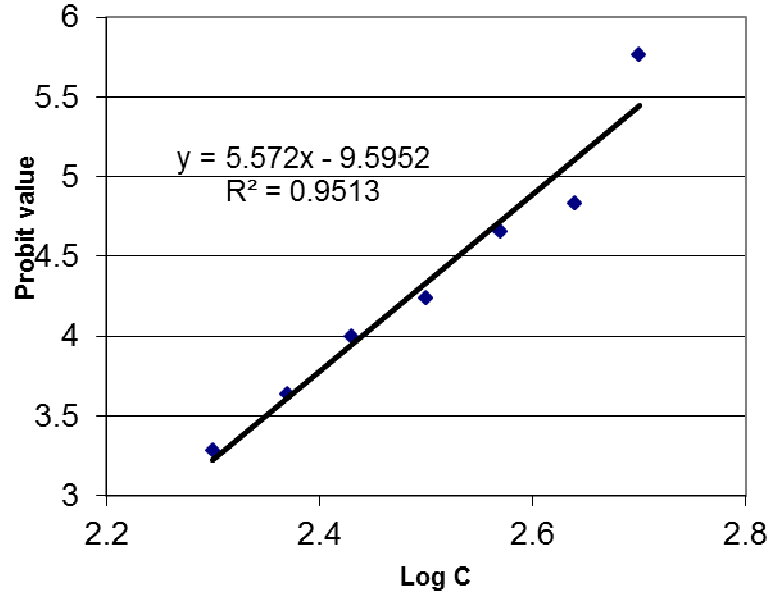
نام ماده	مقدار EC	تکرار ۱	تکرار ۲	تکرار ۳	میانگین سه تکرار
آویشن شیرازی	EC_{10}	۲۱۵/۰۸	۲۴۹/۹۲	۲۴۵/۲۹	۲۳۱/۹۵
	EC_{50}	۳۹۲/۱	۴۲۳/۷۴	۴۱۶/۲۹	۴۳۷/۶۲
	EC_{90}	۷۱۴/۸۳	۷۱۸/۴۶	۷۰۶/۹۷	۶۲۵/۸۵



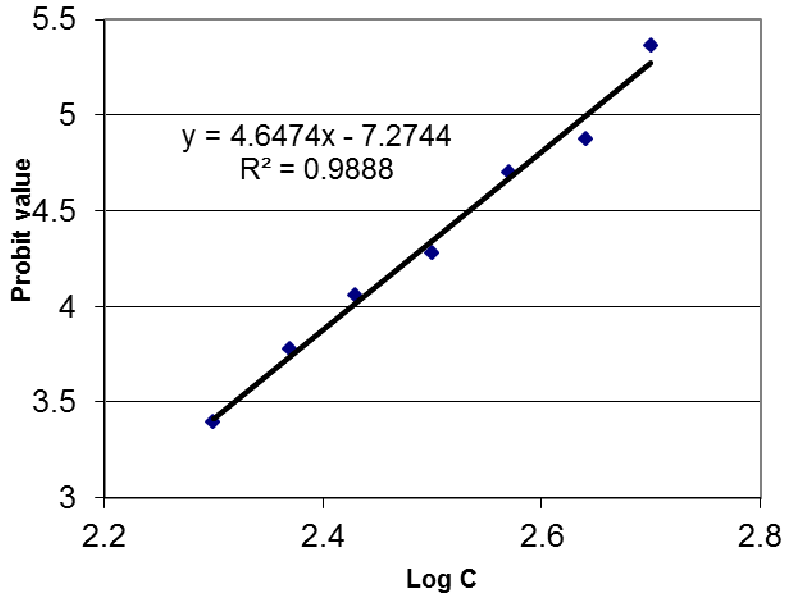


نمودار۲۹- معادله خط رگرسیون تأثیر غلظت آویشن شیرازی بر کاهش شدت تریکودینا در بچه تاسماهی ایرانی طی ٦٠ دقیقه (تکرار ۱)

نمودار ۳۰-معادله خط رگرسیون تأثیر غلظت آویشن شیرازی بر کاهش شدت تریکودینا در بچه تاسماهی ایرانی طی ٦٠ دقیقه (تکرار ۲)



نمودار ۳۱-معادله خط رگرسیون تأثیر غلظت آویشن شیرازی بر کاهش شدت تریکودینا در بچه تاسماهی ایرانی طی ٦٠ دقیقه (تکرار ۳)



نمودار ۳۲- معادله خط رگرسیون تأثیر غلظت آویشن شیرازی بر کاهش شدت تریکودینا در بچه تاسماهی ایرانی طی ٦٠ دقیقه (میانگین سه تکرار)

۲-۳-۳- فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب درمطالعه EC_{50} -عصاره آویشن شیرازی

محدوده پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب که در غلظت های مختلف عصاره هیدرو الکلی آویشن شیرازی و شاهد در آزمایشات (EC_{50}) طی یک ساعت اندازه گیری شد که به ترتیب دما بین ۲۲/۱-۲۱/۷ درجه سانتیگراد ، pH ۸/۰۱- ۷/۵۶ ، اکسیژن محلول (DO)۷/۷- ۶/۷ میلی گرم در لیتر، هدایت الکتریکی (EC) ۹۲۳- ۷۷۴ (µs/cm) ، سختی کل ۳۵۰-۲۵۰ میلی گرم در لیتر، نیتریت ۰/۰۱- ۰ میلی گرم در لیتر ، نیترات ۰/۰۴-۰/۰۱ میلی گرم در لیتر و آمونیاک ۰/۶۲- ۰/۲۳۱ میلی گرم در لیتر تعیین گردید.

جدول ٤١- فاکتورهای فیزیکو شیمیایی آب در آزمایش EC_{50}-1 h - آویشن شیرازی

غلظت (ppm)	دمای آب	**pH**	**DO**(ppm)	EC(µs/cm)	Tot.hardness(ppm)	$N\text{-}NH_3$ (ppm)	$N\text{-}NO_2^-$ (ppm)	$N\text{-}NO_3^-$ (ppm)
۲۰۰	۲۱/۸	۷/۶۹	۷/۷	۸۲۹	۲۶۳	۰/۳۸	۰/۰۰۶	۰/۰۳
۲۳۵	۲۱/۹	۷/۸۲	۷/۷	۷۷۶	۳۰۰	۰/۶۲	۰/۰۰۸	۰/۰۴
۲۷۵	۲۲/۱	۷/۸۶	۷/۵	۷۷۶	۲۵۰	۰/۶	۰/۰۰۹	۰/۰۴
۳۲۰	۲۱/۷	۷/۸۵	۷/۱	۸۴۶	۳۱۰	۰/۵۴	۰/۰۰۸	۰/۰۲
۳۷۵	۲۲	۷/۸۱	۷/۲	۷۹۶	۳۲۰	۰/۴۴	۰/۰۰۸	۰/۰۴
۴۴۰	۲۲/۱	۷/۸۸	۷/۳	۷۷۴	۲۹۸	۰/۵۳	۰/۰۰۹	۰/۰۳
۵۱۰	۲۱/۸	۷/۵۶	۶/۹	۹۱۳	۳۲۰	۰/۵۲	۰/۰۱	۰/۰۲
۶۰۰	۲۱/۷	۸/۰۱	۶/۷	۹۲۳	۳۵۰	۰/۶۲	۰/۰۰۸	۰/۰۲
شاهد	۲۲/۱	۷/۸۸	۷/۲	۸۰۹	۳۰۵	۰/۲۳۱	۰	۰/۰۱

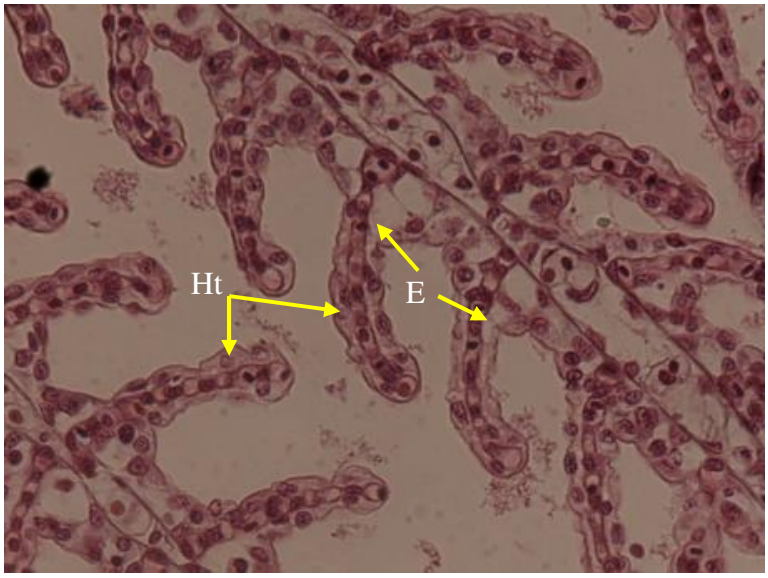
۳-۳-۳- اثرات هیستوپاتولوژیک غلظتهای مختلف عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی بربافتهای آبشش و پوست در مطالعه تعیین EC_{50}

درخاتمه مطالعه تعیین غلظتهای مؤثر (EC_{50}) عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی بر روی انگل تریکودینا در آکواریوم ها، نسبت به نمونه برداری از بافت های آبشش و پوست بمنظور تعیین اثرات هیستوپاتولوژیک این عصاره اقدام گردید لازم بذکر است که در اتمام مدت یکساعت نمونه برداری های بافتی انجام پذیرفت.

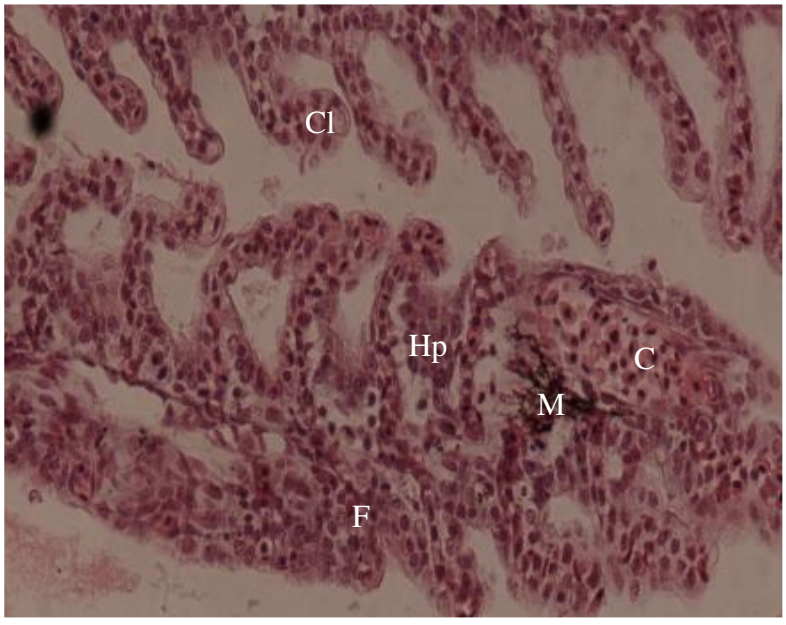
در تصاویر تهیه شده از مقاطع بافتی آبشش و پوست بچه تاسماهیان ایرانی که تحت تأثیر غلظتهای مختلف عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی طی مدت یک ساعت قرار داشتند، بطورکلی در آبشش بچه تاسماهی ایرانی عوارضی همچون پرخونی، وجود رنگدانه های ملانین، چسبندگی (همجوشی) رشته های ثانویه، هیپرپلازی، هیپرتروفی و چماقی شدن مشاهده گردید با توجه به اینکه چنین عوارضی حتی در ماهیان گروه شاهد نیز مشاهده گردید (که می تواند بدلیل شرایط زیست محیطی محیط پرورشی این ماهیان بوده باشد) ولی

شدت این عوارض در غلظتهای زیاد و یا بعبارتی تیمار های ۷ و ۸ بیشتر از سایر تیمارها بوده است. در بررسی بافت پوست تغییراتی نظیر پرخونی، حضور رنگدانه ملانین، و با افزایش غلظت عصاره جدا شدن لایه اپیدرم از درم بیشتر مشاهده گردید.

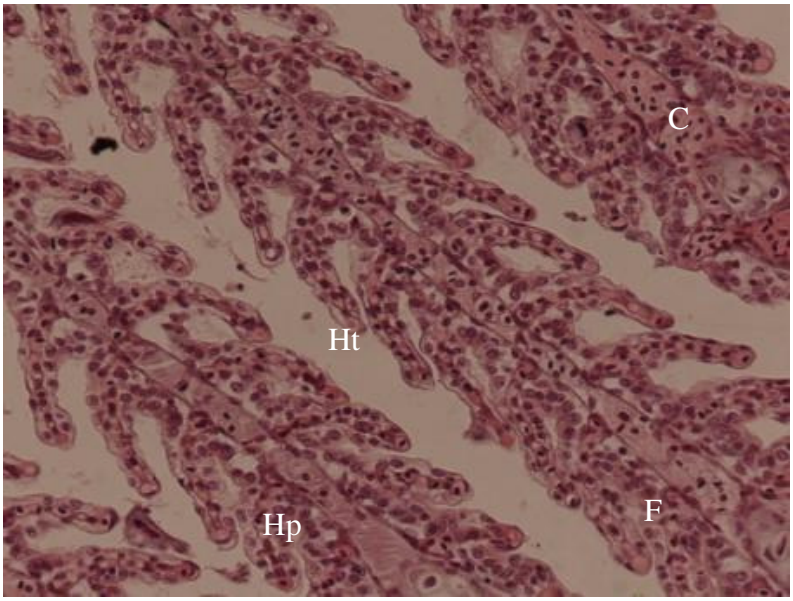
- اثرات عصاره آویشن شیرازی (EC_{50}) بر بافت آبشش بچه تاسماهی ایرانی



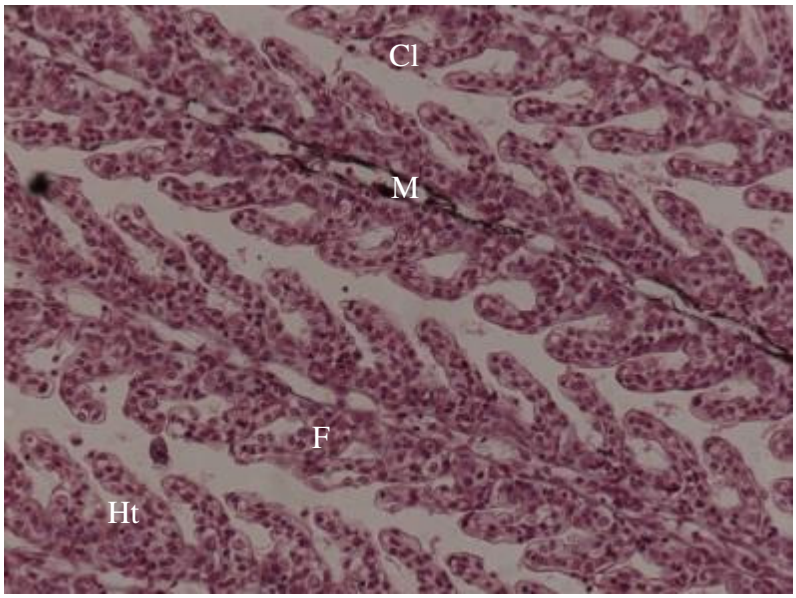
تصویر ٤٢- مشاهده تورم لایه پایه (E) و هیپرتروفی (Ht) رشته های ثانویه آبششی- تیمار ۱ (x٤٠، H&E)



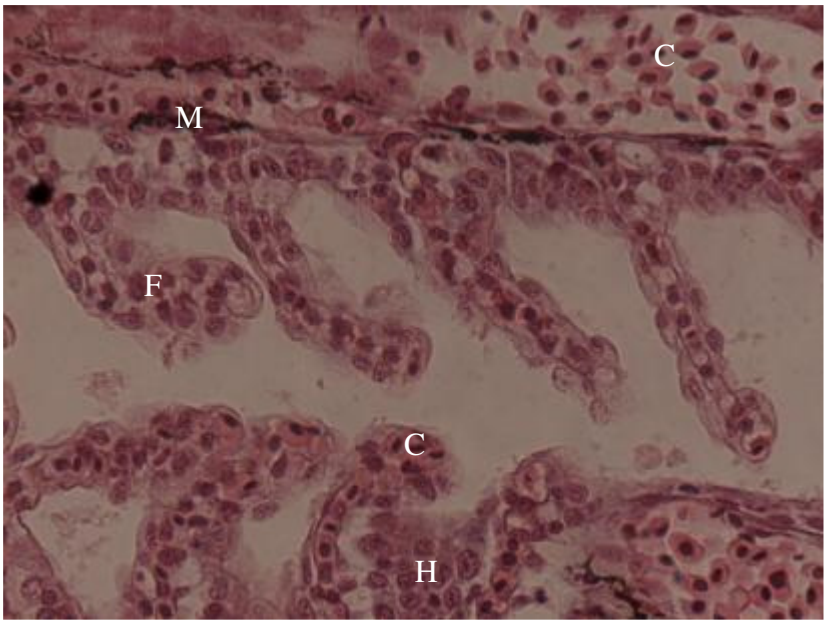
تصویر ٤٣- مشاهده پرخونی (C)، رنگدانه ملانین (M)، چماقی شدن(Cl)، چسبندگی رشته های آبششی ثانویه (F) و هیپرپلازی (Hp) در آبشش – تیمار ۳ (X ۲۰ ، H&E)



تصویر ٤٤- مشاهده پرخونی (C)، چسبندگی (F) هیپرپلازی (Hp) و هیپرتروفی (Ht) در رشته های آبششی ثانویه- تیمار٥ (x٢٠، H&E)

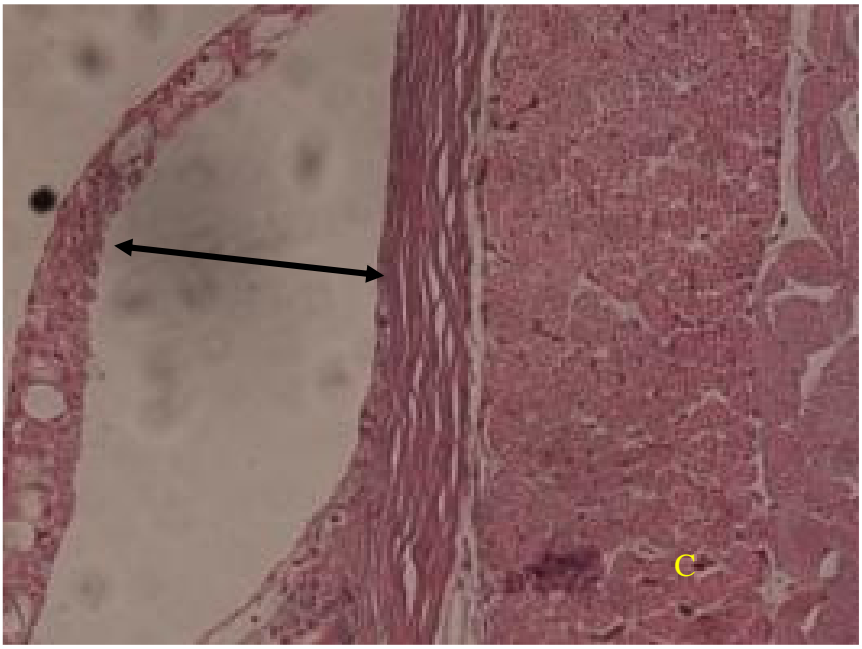


تصویر ٤٥- مشاهده پرخونی، رنگدانه ملانین (M)، چماقی شدن(Cl)، چسبندگی رشته های آبششی ثانویه (F) و هیپرتروفی (Ht) در آبشش – تیمار٧ (x٢٠، H&E)

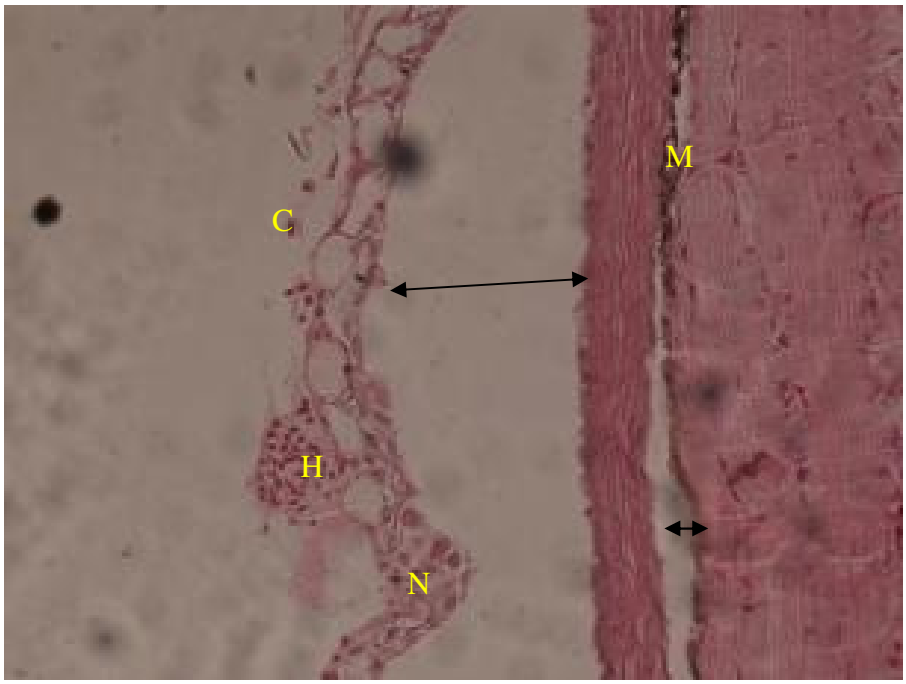


تصویر ٤٦-مشاهده پرخونی در رشته های اولیه و ثانویه (C)، چسبندگی رشته های آبششی ثانویه(F)، هیپرپلازی (H) و رنگدانه های ملانین (M) در آبشش – تیمار ۸(x٤٠ ،H&E)

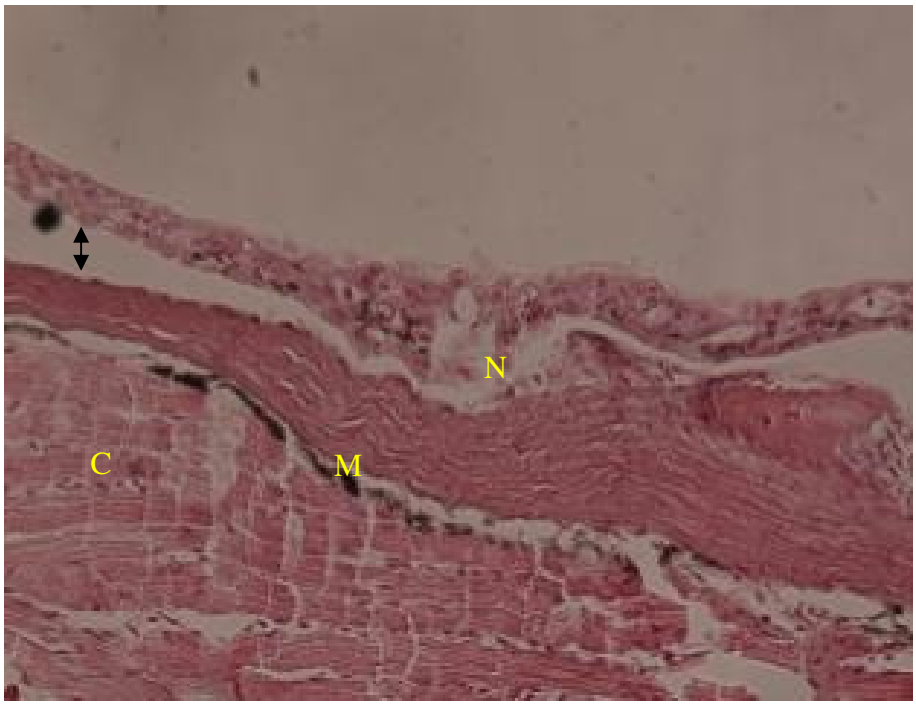
- اثرات عصاره آویشن شیرازی (EC_{50}) بر بافت پوست بچه تاسماهی ایرانی



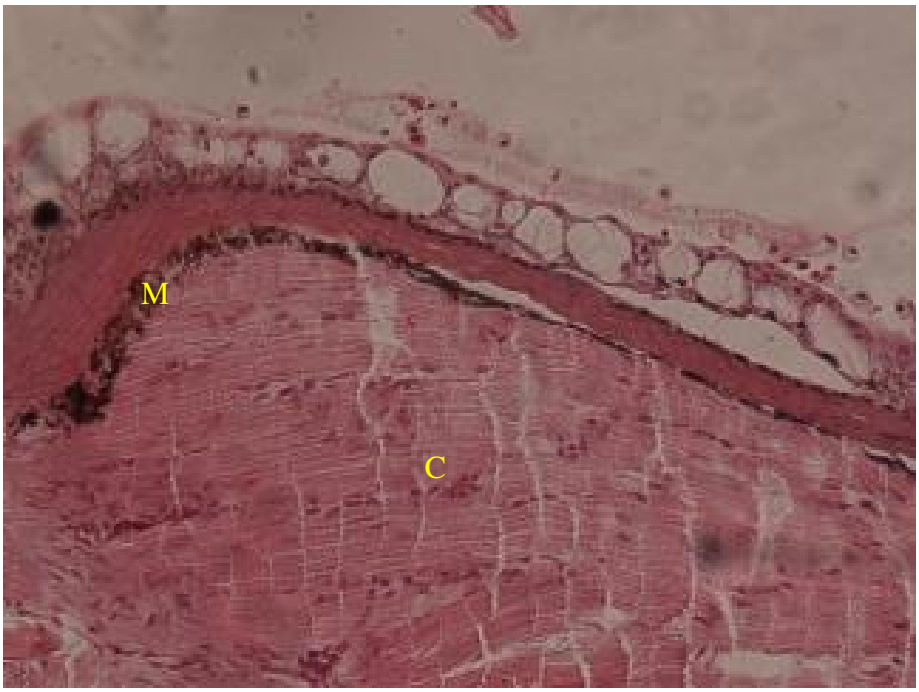
تصویر ٤٧- مشاهده پرخونی (C)، و جدا شدن اپیدرم از درم(پیکان) – تیمار ۱(H&E,20X)



تصویر ٤٨- مشاهده پرخونی (C)، خونریزی (H) حضور رنگدانه ملانین (M)، نکروز سلولی (N) و جدا شدن اپیدرم از درم و عضله (پیکان ها)- تیمار۵ (H&E,20X)



تصویر٤٩- مشاهده پرخونی (C)، حضور رنگدانه ملانین (M)، نکروز سلولی (N) و جدا شدن اپیدرم از درم (پیکان) – تیمار ۷ (H&E,20X)



تصویر ۵۰- مشاهده پرخونی (C) و حضور رنگدانه ملانین (M) – تیمار ۸ (H&E,20X)

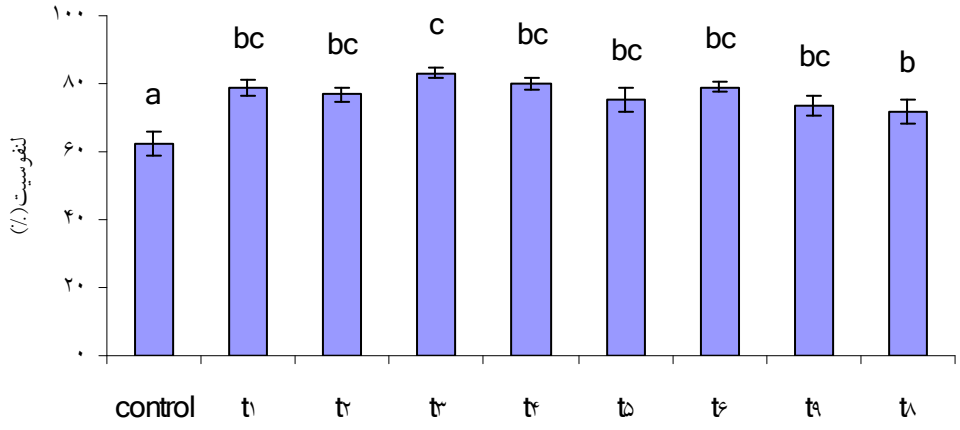
٤-۳-۳- مطالعات هماتولوژی تأثیر عصاره آویشن شیرازی- EC_{50} :

با توجه به کوچک بودن سایز بچه تاسماهیان ایرانی فقط انجام مطالعه افتراقی گلبولهای سفید ممکن گردیده که در زیر به نتایج آن اشاره می گردد:

لنفوسیت : مقایسه میزان لنفوسیت خون ماهیان مورد بررسی توسط آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) نشان داد که بین تیمار ها اختلاف معنی دار آماری وجود دارد ($P<0.05$). مقایسه بین گروهها با یکدیگر بر اساس آزمون دانکن (Duncana)، حاکی از افزایش میزان لنفوسیت خون بچه ماهیان در دزهای مختلف آویشن شیرازی نسبت به شاهد می باشد، بیشترین میزان لنفوسیت در تیمار ۳ و کمترین میزان لنفوسیت در خون بچه ماهیان شاهد مشاهده شده است و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار بین شاهد و سایر تیمارها مشاهده گردید ($P<0.05$).

جدول ٤٢- میانگین لنفوسیت در شاهد و تیمار های مختلف

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد ± میانگین
لنفوسیت	شاهد	۶۲/۲۵ ± ۶ /۹۴[a]
	تیمار ۱	۷۸/۸۷ ±۲/۵۵ [bc]
	تیمار ۲	۷۷ ±۲/۱۱ [bc]
	تیمار ۳	۸۳/۲۳ ±۱/۵۰ [c]
	تیمار ۴	۸۰ ± ۱/۷۸[bc]
	تیمار ۵	۷۵/۲۵ ± ۷ /۲۷[bc]
	تیمار ۶	۷۹ ±۱/۳۵ [bc]
	تیمار ۷	۷۳/۵ ±۲/۹۰ [bc]
	تیمار ۸	۷۱/۵ ± ۳/۵۲[b]

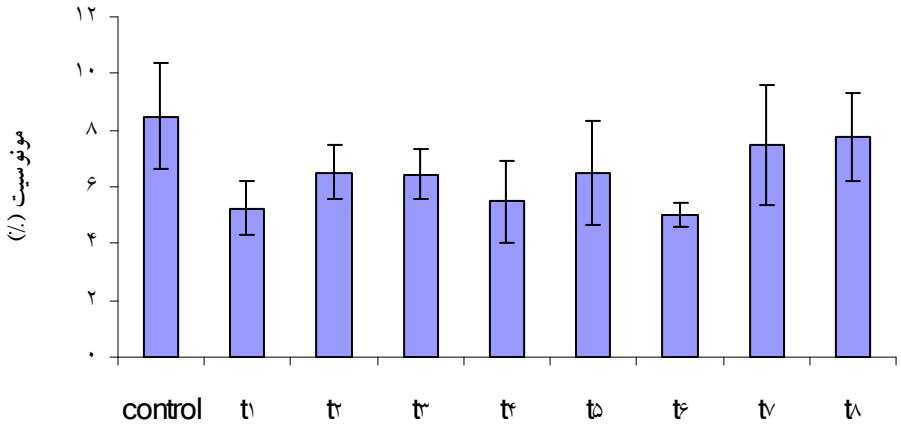


نمودار ۳۳- مقایسه میانگین میزان لنفوسیت شاهد با تیمار های مختلف

مونوسیت : به منظور مقایسه میزان مونوسیت خون ماهیان مورد بررسی بین تیمار ها، بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد (P>0.05).

جدول ٤٣- میانگین مونوسیت در شاهد و تیمار های مختلف

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد ± میانگین
مونوسیت	شاهد	۸/۵ ± ۱ /۸۴
	تیمار ۱	۵/۲۵ ±۰/۹۴
	تیمار ۲	۶/۵ ±۰/۹۵
	تیمار ۳	۶/۴۵ ±۰/۸۷
	تیمار ۴	۵/۵ ± ۱ /۴۴
	تیمار ۵	۶/۵ ±۱/۸۴
	تیمار ۶	۵ ±۰/۴۰
	تیمار ۷	۷/۵ ± ۲/۱۰
	تیمار ۸	۷/۷۵ ± ۱ /۵۴



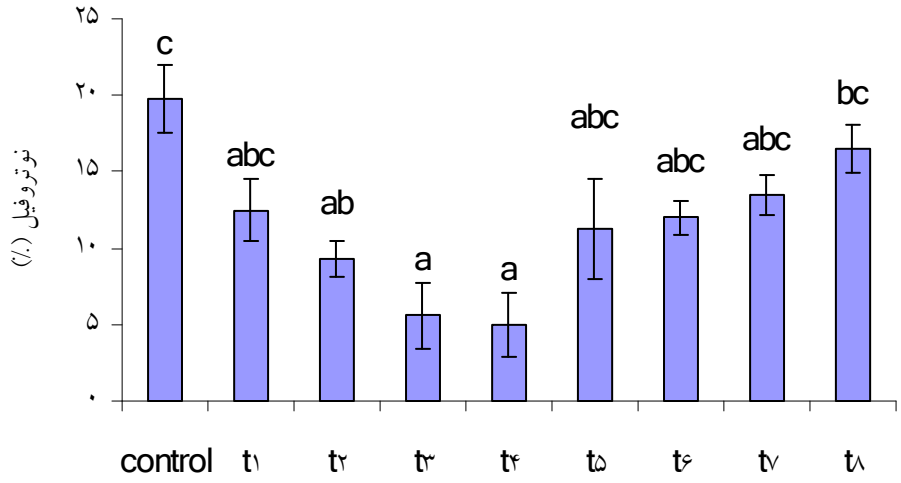
نمودار٣٤- مقایسه میانگین میزان مونوسیت شاهد با تیمار های مختلف

نوتروفیل :

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان نوتروفیل خون ماهیان مورد بررسی، بین تیمار ها اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P<0.05$). بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه گروهها با یکدیگر، میزان نوتروفیل خون بچه ماهیان در تیمار ها کاهش یافته و میزان این فاکتور در تمامی تیمارها کمتر از شاهد بوده و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار مشاهده گردید($P<0.05$) .

جدول ٤٤- میانگین نوتروفیل در شاهد و تیمار های مختلف

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد ± میانگین
نوتروفیل	شاهد	۱۹/۷۵ ± ۲ /۱۷^{c}
	تیمار ۱	۱۲/۵۰ ±۱/۹۷^{abc}
	تیمار ۲	۹/۲۸ ±۱/۲۲^{ab}
	تیمار ۳	۵/۶ ±۲/۱۸ ^{a}
	تیمار ۴	۵ ± ۲/۱۲^{a}
	تیمار ۵	۱۱/۲۵ ±۳/۲۵ ^{abc}
	تیمار ۶	۱۲ ±۱/۰۸ ^{abc}
	تیمار ۷	۱۳/۵ ± ۱/۳۲^{abc}
	تیمار ۸	۱۶/۵۰ ± ۱ /۵۵^{bc}



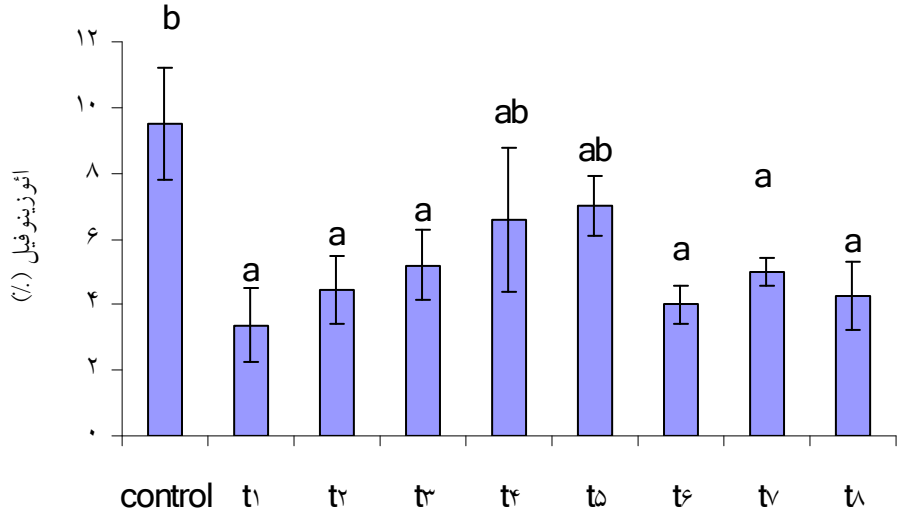
نمودار۳۵- مقایسه میانگین میزان نوتروفیل در تیمار های مختلف

ائوزینوفیل :

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان ائوزینوفیل خون ماهیان مورد بررسی بین تیمار ها اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P<0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه بین گروهها با یکدیگر، میزان ائوزینوفیل خون بچه ماهیان در شاهد بیش از سایر تیمارها بوده است و به لحاظ آماری اختلاف معنی داری مشاهده گردید($P<0.05$).

جدول ٤٥- میانگین ائوزینوفیل در شاهد و تیمار های مختلف

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد ± میانگین
ائوزینوفیل	شاهد	۹/۵ ± ۱ /۷۰ b
	تیمار ۱	۳/۳۷ ±۱/۱۴ a
	تیمار ۲	۴/۴۳ ±۱/۰۴ a
	تیمار ۳	۵/۲ ±۱/۰۶ a
	تیمار ۴	۶/۵۸ ± ۲/۱۸ ab
	تیمار ۵	۷ ±۰/۱۲ ab
	تیمار ۶	۴ ±۰/۵۷ a
	تیمار ۷	۵ ± ۰/۴۰ a
	تیمار ۸	۴/۲۵ ± ۱ /۰۳ a



نمودار۳٦- مقایسه میانگین میزان ائوزینوفیل شاهد با تیمار های مختلف

۵-۳-۳- تعیین غلظت مؤثر(EC_{50}) عصاره هیدروالکلی سیر بر علیه انگل تریکودینا :

بمنظور بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی سیر در مبارزه با انگل تک یاخته ای تریکودینا در بچه تاسماهی ایرانی، ضمن انجام مطالعات تعیین غلظتهای مؤثر عصاره بر انگل مذکور، نسبت به اندازه گیری فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب، بررسیهای هماتولوژی و هیستوپاتولوژی تأثیرات دوزهای مختلف اقدام گردید. با توجه به اینکه در نظر است دوز های مؤثر نیمه کشندگی عصاره آویشن شیرازی در مبارزه با تریکودینا طی مدت یکساعت تعیین گردد، لذا در این مطالعه در فواصل زمانی ۳۰ دقیقه ای نسبت به نمونه برداری از بچه ماهیان و بررسی شدت آلودگی به انگل مذکور در پوست و آبشش اقدام گردید.

در این تحقیق بمنظور یافتن محدوده غلظت عصاره هیدروالکلی سیر آزمایشات ابتدایی ($pre\text{-}EC_{50}$) بر روی انگل مذکور در بچه تاسماهیان ایرانی انجام گرفت و سرانجام محدوده غلظت ۵۰ تا ۴۰۰ میلی گرم در لیتر برای انجام آزمایشات نهایی تعیین گردید. بر اساس محاسبات لگاریتمی ۸ تیمار (۵۰، ۷۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۶۵، ۲۲۰ ، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم لیتر) در نظر گرفته شد و نسبت به گروه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین میزان EC_{10}، EC_{50} و EC_{90} عصاره هیدروالکلی سیر طی مدت زمان ۳۰ و ۶۰ دقیقه محاسبه گردید . بر این اساس میزان EC_{50} این عصاره طی مدت یکساعت حمام برابر ۱۷۲/۵۸ میلی گرم در لیتر تعیین گردید.

همچنین معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی (R^2) حاکی از وجود ارتباط مستقیم (همبستگی قوی و مثبت) بین غلظتهای مورد بررسی با میزان حذف انگل تریکودینا از بچه تاسماهیان ایرانی می باشد (نمودارهای ۳۷ الی ۴۴). ازلحاظ رفتاری هیچگونه علائم غیر طبیعی در تیمارهای مختلف مشاهده نگردید.

جدول ٤٦ ـ تأثیر غلظتهای مختلف سیر روی کاهش میزان شدت انگل تریکودینا در تاسماهی ایرانی طی ۳۰ دقیقه (تکرار ۱)

تیمار	غلظت آویشن شیرازی (ppm)	میانگین تعداد انگل در سه نمونه	مرده	تغییرات نسبت به شاهد	لگاریتم غلظت	Probit value
شاهد	۰	۱۶۸,۳	۰	۰	۰	۰
I	۵۰	۱۵۰	۱۸,۳	۱۰,۸۸	۱,۶۹۸۹	۳,۷۶۲۸
II	۷۰	۱۴۶,۶	۲۱,۷	۱۲,۹	۱,۸۴۵	۳,۸۶۸۹
III	۹۰	۱۳۱,۶	۳۶,۷	۲۱,۸۱	۱,۹۵۴۲	۴,۲۲۱۰
IV	۱۲۰	۱۱۶,۶	۵۱,۷	۳۰,۷۲	۲,۰۷۹۱	۴,۴۹۵۶
V	۱۶۵	۱۰۴,۳	۶۴	۳۸,۰۳	۲,۲۱۷۴	۴,۶۹۴۵
VI	۲۲۰	۹۱,۶	۷۶,۷	۴۵,۵۸	۲,۳۴۲۴	۴,۸۸۷۰
VII	۳۰۰	۸۳,۳	۸۵	۵۰,۵۱	۲,۴۷۷۱	۵,۰۱۲۵
VIII	۴۰۰	۲۶,۶	۱۴۱,۷	۸۴,۲	۲,۶۰۲۰	۶,۰۰۲۷

جدول ٤٧ ـ تأثیر غلظتهای مختلف سیر روی کاهش میزان شدت انگل تریکودینا در تاسماهی ایرانی طی ۳۰ دقیقه (تکرار ۲)

تیمار	غلظت آویشن شیرازی (ppm)	میانگین تعداد انگل در سه نمونه	مرده	تغییرات نسبت به شاهد	لگاریتم غلظت	Probit value
شاهد	۰	۱۵۴,۳۴	۰	۰	۰	۰
I	۵۰	۱۵۰	۴,۳۴	۲,۸۲	۱,۶۹۸۹	۳,۰۸۹۰
II	۷۰	۱۴۸,۳	۶,۰۴	۳,۹۲	۱,۸۴۵	۳,۲۳۷۶
III	۹۰	۱۲۸,۳	۲۶,۰۴	۱۶,۸۸	۱,۹۵۴۲	۴,۰۳۷۹
IV	۱۲۰	۱۱۹	۳۵,۳۴	۲۲,۹	۲,۰۷۹۱	۴,۲۵۷۹
V	۱۶۵	۱۰۱,۶	۵۲,۷۴	۳۴,۱۸	۲,۲۱۷۴	۴,۵۹۰۳
VI	۲۲۰	۹۳,۳	۶۱,۰۴	۳۹,۵۵	۲,۳۴۲۴	۴,۷۳۳۷
VII	۳۰۰	۸۵	۶۹,۳۴	۴۴,۹۳	۲,۴۷۷۱	۴,۸۷۱۸
VIII	۴۰۰	۲۵	۱۲۹,۳۴	۸۳,۸۱	۲,۶۰۲۰	۵,۹۸۶۳

جدول ٤٨ ـ تأثیر غلظتهای مختلف سیر روی کاهش میزان شدت انگل تریکودینا در تاسماهی ایرانی طی ۳۰ دقیقه (تکرار ۳)

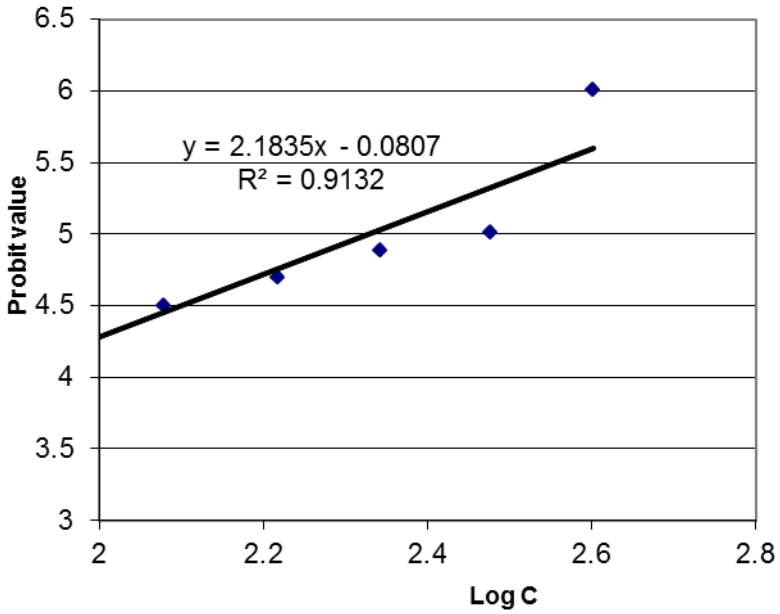
تیمار	غلظت آویشن شیرازی (ppm)	میانگین تعداد انگل در سه نمونه	مرده	تغییرات نسبت به شاهد	لگاریتم غلظت	Probit value
شاهد	۰	۱۵۵	۰	۰	۰	۰
I	۵۰	۱۵۰	۵	۳,۲۳	۱,۶۹۸۹	۳,۱۴۷۸
II	۷۰	۱۴۶,۶	۸,۴	۵,۴۲	۱,۸۴۵	۳,۳۹۲۸
III	۹۰	۱۳۱,۶	۲۳,۴	۱۵,۱	۱,۹۵۴۲	۳,۹۶۷۸
IV	۱۲۰	۱۱۸,۳	۳۶,۷	۲۳,۶۸	۲,۰۷۹۱	۴,۲۸۰۸
V	۱۶۵	۱۰۱,۶	۵۳,۴	۳۴,۴۶	۲,۲۱۷۴	۴,۵۹۸۴
VI	۲۲۰	۹۳,۳	۶۱,۷	۳۹,۸۱	۲,۳۴۲۴	۴,۷۴۱۵
VII	۳۰۰	۸۶,۶	۶۸,۴	۴۴,۱۳	۲,۴۷۷۱	۴,۸۵۱۶
VIII	۴۰۰	۲۳,۳	۱۳۱,۷	۸۴,۹۷	۲,۶۰۲۰	۶,۰۳۲۲

جدول ٤٩ ـ تأثیر غلظتهای مختلف سیر روی کاهش میزان شدت انگل تریکودینا در تاسماهی ایرانی طی ۳۰ دقیقه (میانگین سه تکرار)

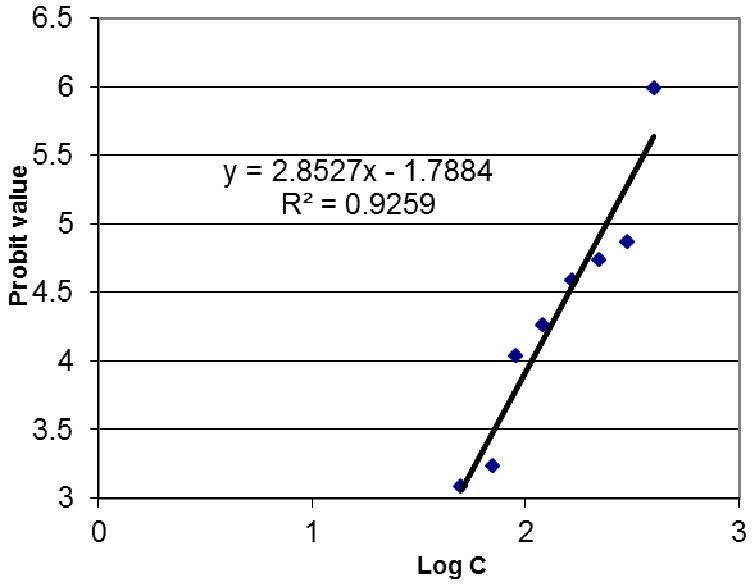
تیمار	غلظت آویشن شیرازی (ppm)	میانگین تعداد انگل در سه نمونه	مرده	تغییرات نسبت به شاهد	لگاریتم غلظت	Probit value
شاهد	۰	۱۵۹,۲۲	۰	۰	۰	۰
I	۵۰	۱۵۰	۹,۲۲	۵,۷۹	۱,۶۹۸۹	۳,۴۱۹۵
II	۷۰	۱۴۷,۱۷	۱۲,۰۵	۸,۰۴	۱,۸۴۵	۳,۵۹۴۹
III	۹۰	۱۳۰,۵	۲۸,۷۲	۱۸,۰۴	۱,۹۵۴۲	۴,۰۸۴۶
IV	۱۲۰	۱۱۷,۹۷	۴۱,۲۵	۲۵,۹۱	۲,۰۷۹۱	۴,۳۵۳۶
V	۱۶۵	۱۰۲,۵	۵۶,۷۲	۳۵,۶۳	۲,۲۱۷۴	۴,۶۳۰۸
VI	۲۲۰	۹۲,۷۴	۶۶,۴۸	۴۱,۷۶	۲,۳۴۲۴	۴,۷۰۰۴
VII	۳۰۰	۸۴,۹۷	۷۴,۲۵	۴۶,۶۴	۲,۴۷۷۱	۴,۹۱۴۷
VIII	۴۰۰	۲۴,۹۷	۱۳۴,۲۵	۸۴,۳۲	۲,۶۰۲۰	۶,۰۰۶۹

جدول ۵۰ ـ غلظتهای مؤثر سیر طی ۳۰ دقیقه بر روی انگل تریکودینا در بچه تاسماهی ایرانی

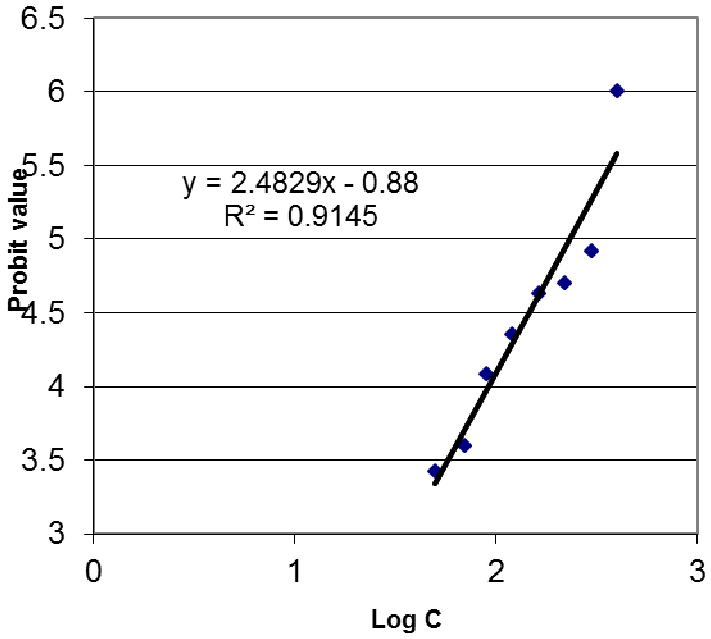
نام ماده	مقدار EC	تکرار ۱	تکرار ۲	تکرار ۳	میانگین سه تکرار
سیر	EC_{10}	۵۴/۹۴	۸۵/۱۹	۸۲/۳۸	۷۱/۱۲
	EC_{50}	۲۱۲/۲۳	۲۳۹/۶۶	۲۳۷/۵۲	۲۳۳/۴۵
	EC_{90}	۸۱۹/۹۷	۶۷۴/۳۷	۶۸۵/۰۱	۷۶۶/۳



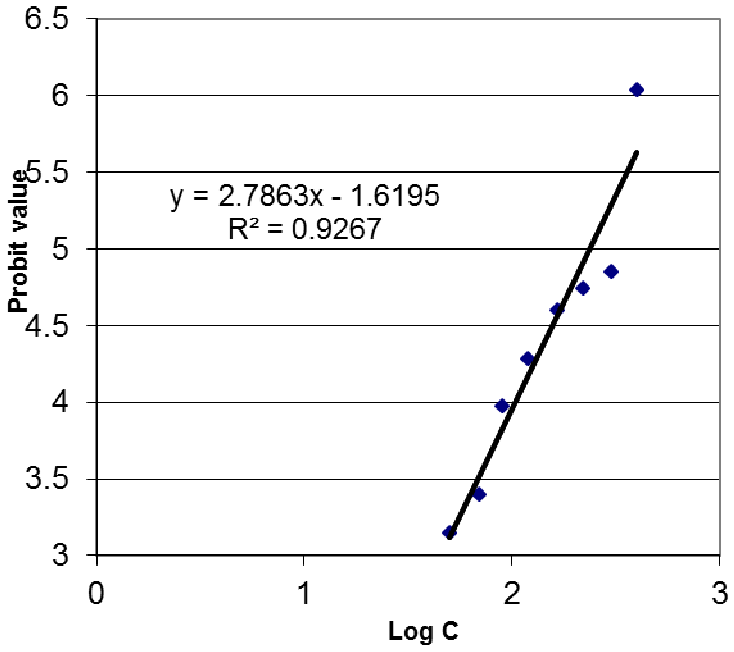
نمودار۳۷- معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر کاهش شدت انگل تریکودینا در بچه تاسماهی ایرانی طی ۳۰ دقیقه (تکرار ۱)



نمودار ۳۸- معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر کاهش شدت انگل تریکودینا در بچه تاسماهی ایرانی طی ۳۰ دقیقه (تکرار ۲)



نمودار ۳۹- معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر کاهش شدت انگل تریکودینا در بچه تاسماهی ایرانی طی ۳۰ دقیقه (تکرار ۳)



نمودار ٤٠- معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر کاهش شدت انگل تریکودینا در بچه تاسماهی ایرانی طی ۳۰ دقیقه (میانگین سه تکرار)

جدول ۵۱ ـ تأثیر غلظتهای مختلف سیر روی کاهش میزان شدت انگل تریکودینا در تاسماهی ایرانی طی ٦٠ دقیقه (تکرار ۱)

تیمار	غلظت آویشن شیرازی (ppm)	میانگین تعداد انگل در سه نمونه	مرده	تغییرات نسبت به شاهد	لگاریتم غلظت	Probit value
شاهد	۰	۱۶۸,۳	۰۰	۰	۰	۰
I	۵۰	۱۳۶,۶	۳۲	۱۹,۰۲	۱,۶۹۸۹	۴,۱۲۲۱
II	۷۰	۱۳۳,۳	۳۵	۲۰,۸	۱,۸۴۵	۴,۱۸۶۶
III	۹۰	۱۲۲,۳	۴۶	۲۷,۳۴	۱,۹۵۴۲	۴,۳۹۶۲
IV	۱۲۰	۱۰۴	۶۴,۳	۳۸,۲۱	۲,۰۷۹۱	۴,۶۹۹۸
V	۱۶۵	۹۶	۷۲,۳	۴۲,۹۶	۲,۲۱۷۴	۴,۸۲۱۱
VI	۲۲۰	۸۶,۶	۸۱,۷	۴۸,۵۵	۲,۳۴۲۴	۴,۹۶۲۴
VII	۳۰۰	۲۳,۳	۱۴۵	۸۶,۱۶	۲,۴۷۷۱	۶,۰۸۴۸

جدول ۵۲ ـ تأثیر غلظتهای مختلف سیر روی کاهش میزان شدت انگل تریکودینا در تاسماهی ایرانی طی ٦٠ دقیقه (تکرار ۲)

تیمار	غلظت آویشن شیرازی (ppm)	میانگین تعداد انگل در سه نمونه	مرده	تغییرات نسبت به شاهد	لگاریتم غلظت	Probit value
شاهد	۰	۱۵۴,۳				
I	۵۰	۱۳۸,۳	۱۶	۱۰,۳۷	۱,۶۹۸۹	۳,۷۳۵۴
II	۷۰	۱۳۵,۶	۱۸,۷	۱۲,۱۲	۱,۸۴۵	۳,۸۳۰۰
III	۹۰	۱۲۱,۶	۳۲,۷	۲۱,۲	۱,۹۵۴۲	۴,۲۰۰۵
IV	۱۲۰	۱۰۱,۶	۵۲,۷	۳۴,۱۶	۲,۰۷۹۱	۴,۵۹۰۳
V	۱۶۵	۹۵	۵۹,۳	۳۸,۴۴	۲,۲۱۷۴	۴,۷۰۵۰
VI	۲۲۰	۸۶	۶۸,۳	۴۴,۲۷	۲,۳۴۲۴	۴,۸۵۴۱
VII	۳۰۰	۲۰,۶	۱۳۳,۷	۸۶,۶۵	۲,۴۷۷۱	۶,۱۰۷۷

جدول ۵۳ ـ تأثیر غلظتهای مختلف سیر روی کاهش میزان شدت انگل تریکودینا در تاسماهی ایرانی طی ٦٠ دقیقه (تکرار ۳)

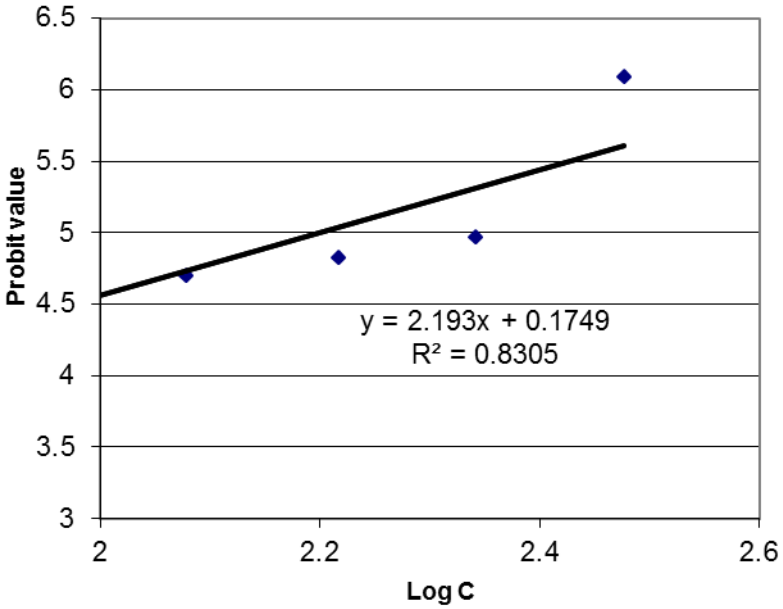
تیمار	غلظت آویشن شیرازی (ppm)	میانگین تعداد انگل در سه نمونه	مرده	تغییرات نسبت به شاهد	لگاریتم غلظت	Probit value
شاهد	۰	۱۵۵	۰	۰	۰	۰
I	۵۰	۱۳۸,۳	۱۶,۷	۱۰,۷۸	۱,۶۹۸۹	۳,۷۵۷۴
II	۷۰	۱۳۳,۳	۲۱,۷	۱۴	۱,۸۴۵	۳,۹۱۹۷
III	۹۰	۱۲۱,۶	۳۳,۴	۲۱,۵۵	۱,۹۵۴۲	۴,۲۱۰۸
IV	۱۲۰	۱۰۶,۶	۴۸,۴	۳۱,۲۳	۲,۰۷۹۱	۴,۵۰۹۸
V	۱۶۵	۹۵	۶۰	۳۸,۷۱	۲,۲۱۷۴	۴,۷۱۲۹
VI	۲۲۰	۸۸,۳	۶۶,۷	۴۳,۰۴	۲,۳۴۲۴	۴,۸۲۳۶
VII	۳۰۰	۲۵	۱۳۰	۸۳,۸۷	۲,۴۷۷۱	۵,۹۸۶۳

جدول ٥٤ ـ تأثیر غلظتهای مختلف سیر روی کاهش میزان شدت انگل تریکودینا در تاسماهی ایرانی طی ٦٠ دقیقه (میانگین سه تکرار)

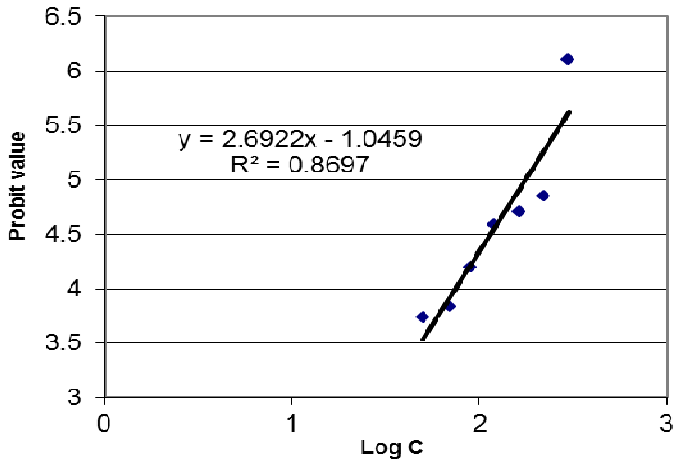
تیمار	غلظت آویشن شیرازی (ppm)	میانگین تعداد انگل در سه نمونه	مرده	تغییرات نسبت به شاهد	لگاریتم غلظت	Probit value
شاهد	۰	۱۵۹,۲				
I	۵۰	۱۳۷,۷۴	۲۱,۴۶	۱۳,۴۸	۱,۶۹۸۹	۳,۸۹۲۳
II	۷۰	۱۳۴,۰۷	۲۵,۱۳	۱۵,۷۹	۱,۸۴۵	۳,۹۹۳۱
III	۹۰	۱۲۱,۸۴	۳۷,۳۶	۲۳,۴۷	۱,۹۵۴۲	۴,۲۷۴۳
IV	۱۲۰	۱۰۴,۰۷	۵۵,۱۳	۳۴,۶۳	۲,۰۷۹۱	۴,۶۰۳۹
V	۱۶۵	۹۵,۳۴	۶۳,۸۶	۴۰,۱۲	۲,۲۱۷۴	۴,۷۴۹۲
VI	۲۲۰	۸۶,۹۷	۷۲,۲۳	۴۵,۳۷	۲,۳۴۲۴	۴,۸۸۱۹
VII	۳۰۰	۲۲,۹۷	۱۳۶,۲۳	۸۵,۵۸	۲,۴۷۷۱	۶,۰۵۸۱

جدول ۵۵ ـ غلظتهای مؤثر سیر طی ٦٠ دقیقه بر روی انگل تریکودینا در بچه تاسماهی ایرانی

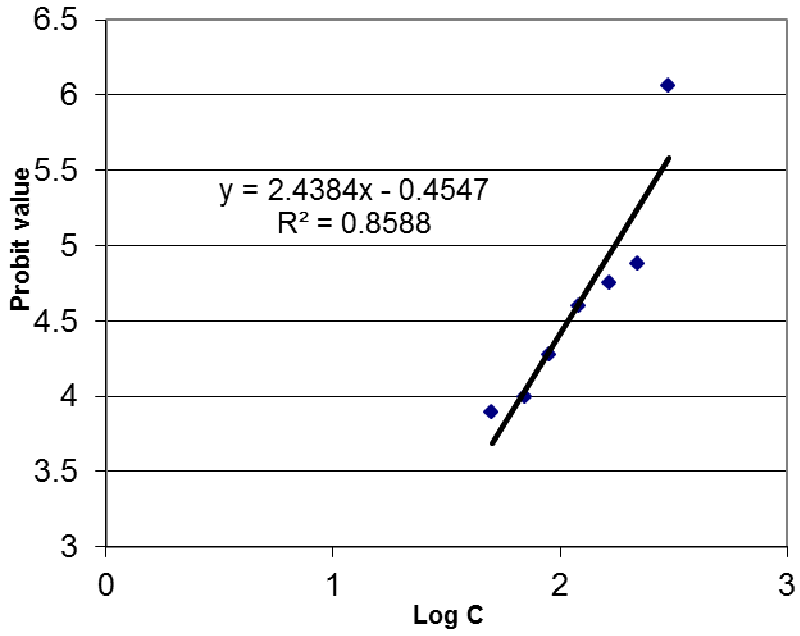
نام ماده	مقدار EC	تکرار ۱	تکرار ۲	تکرار ۳	میانگین سه تکرار
سیر	EC_{10}	۴۱/۲۹	۸۳/۷۷	۵۶/۵۱	۵۱/۴۲
	EC_{50}	۱۵۸/۵۶	۲۵۰/۶۷	۱۸۳/۲۷	۱۷۲/۵۸
	EC_{90}	۶۰۸/۹۸	۷۵۰/۲۴	۵۹۴/۴۳	۵۷۸/۸۹

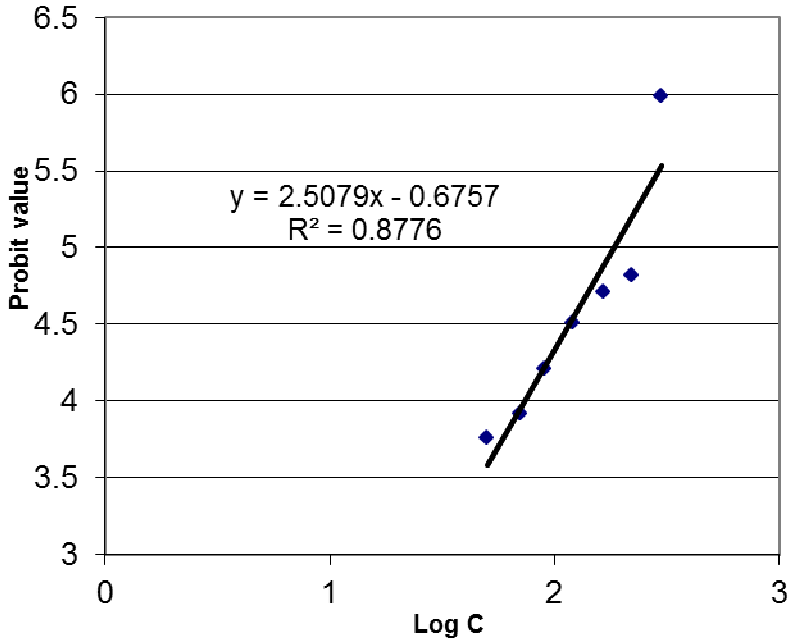


نمودار ٤١- معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر کاهش شدت انگل تریکودینا در بچه تاسماهی ایرانی طی ٦٠ دقیقه (تکرار ۱)



نمودار ٤٢- معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر کاهش شدت انگل تریکودینا در بچه تاسماهی ایرانی طی ٦٠ دقیقه (تکرار ۲)





نمودار۴۳- معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر کاهش شدت انگل تریکودینا در بچه تاسماهی ایرانی طی ٦٠ دقیقه (تکرار ۳)

نمودار ٤٤- معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر کاهش شدت انگل تریکودینا در بچه تاسماهی ایرانی طی ٦٠ دقیقه (میانگین سه تکرار)

٦-۳-۳- فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب درمطالعه EC_{50} -عصاره سیر

محدوده پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب که در غلظت های مختلف عصاره هیدرو الکلی سیر و شاهد در آزمایشات (EC_{50}) طی یک ساعت اندازه گیری شد که به ترتیب دما بین ۲۲/۳-۲۱/۹ درجه سانتیگراد ، pH ۷/۸۲- ۷/۵۴ ، اکسیژن محلول (DO)۷/۹- ۷ میلی گرم در لیتر، هدایت الکتریکی (EC) ۸۸۰-۷۶۷ (µs/cm) ، سختی کل ۳۱۰-۲۸۰ میلی گرم در لیتر، نیتریت ۰/۰۰۰۲- ۰ میلی گرم در لیتر ، نیترات ۰/۰۱-۰ میلی گرم در لیتر و آمونیاک ۰/۳۳۴- ۰/۲۳۱ میلی گرم در لیتر تعیین گردید.

جدول٥٦- فاکتورهای فیزیکو شیمیایی آب در آزمایش EC_{50}-1 h – سیر

غلظت (ppm)	دمای آب	pH	DO(ppm)	EC(µs/cm)	Tot.hardness(ppm)	$N\text{-}NH_3$ (ppm)	$N\text{-}NO_2^-$ (ppm)	$N\text{-}NO_3^-$ (ppm)
۵۰	۲۲/۳	۷/۵۴	۷/۸	۷۶۷	۲۸۰	۰/۲۸۲	۰/۰۰۱	۰/۰۱
۷۰	۲۲/۱	۷/۸۲	۷/۸	۸۸۲	۲۹۵	۰/۳۳۴	۰/۰۰۰۱	۰
۹۰	۲۲/۱	۷/۷۱	۷/۹	۷۹۳	۳۰۰	۰/۲۷۵	۰/۰۰۲	۰/۰۱
۱۲۰	۲۲	۷/۷۴	۷/۳	۸۸۰	۲۹۰	۰/۲۶۳	۰/۰۰۲	۰/۰۱
۱۶۵	۲۲	۷/۷۶	۷/۱	۷۸۲	۳۰۵	۰/۲۹۲	۰/۰۰۰۲	۰
۲۲۰	۲۲	۷/۷۷	۷/۱	۸۰۱	۳۱۰	۰/۲۴۴	۰/۰۰۰۳	۰
۳۰۰	۲۱/۹	۷/۷۳	۷/۱	۸۲۹	۲۹۰	۰/۲۷	۰	۰
۴۰۰	۲۱/۹	۷/۷۵	۷	۸۴۳	۳۱۰	۰/۲۵۳	۰	۰
شاهد	۲۲	۷/۸۱	۷/۱	۸۰۹	۳۰۵	۰/۲۳۱	۰	۰/۰۱

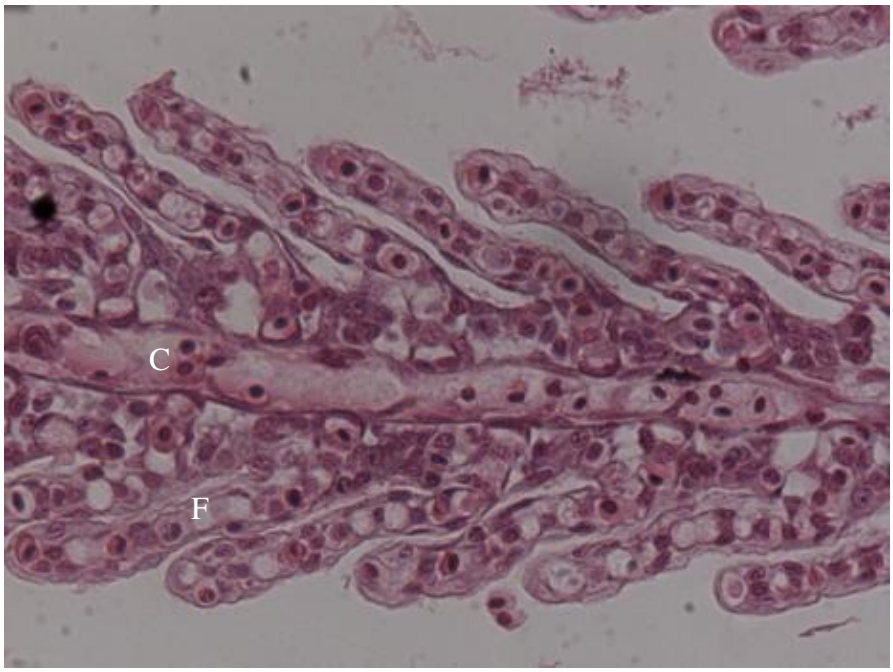
۷-۳-۳- اثرات هیستوپاتولوژیک غلظتهای مختلف عصاره هیدروالکلی سیر بربافتهای آبشش و پوست در مطالعه تعیین EC_{50}

طی انجام آزمایشات تعیین غلظتهای مؤثر (EC_{50}) عصاره هیدروالکلی سیر بر روی انگل تریکودینا در آکواریوم ها، نسبت به نمونه برداری از بافت های آبشش و پوست بمنظور تعیین اثرات هیستوپاتولوژیک این عصاره اقدام گردید لازم به توضیح است است که نمونه برداری های بافتی در خاتمه زمان یکساعت انجام گرفت.

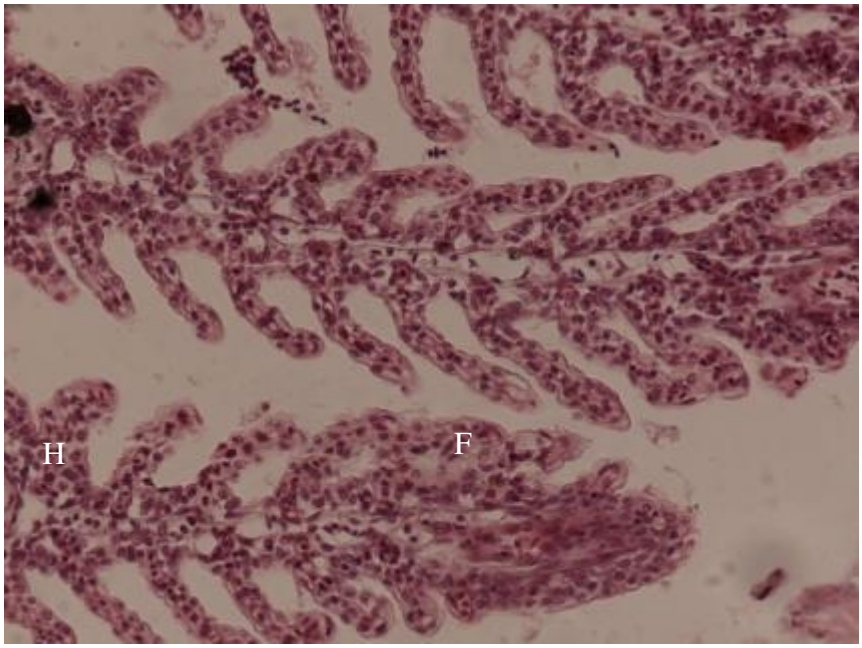
بطور کلی در آبشش بچه تاسماهی ایرانی عوارضی همچون پرخونی، وجود رنگدانه های ملانین، چسبندگی (همجوشی) رشته های ثانویه، هیپرپلازی، هیپرتروفی و چماقی شدن مشاهده گردید. با توجه به اینکه چنین عوارضی حتی در ماهیان گروه شاهد نیز مشاهده گردید (که می تواند بدلیل شرایط زیست محیطی محیط پرورشی این ماهیان بوده باشد) ولی شدت این عوارض در غلظتهای زیاد و یا بعبارتی تیمار های ۷ و ۸ بیشتر از

سایر تیمارها بوده است. در بررسی بافت پوست بچه تاسماهیان ایرانی تغییراتی نظیر پرخونی، حضور رنگدانه ملانین، و با افزایش غلظت عصاره جدا شدن لایه اپیدرم از درم بیشتر مشاهده گردید.

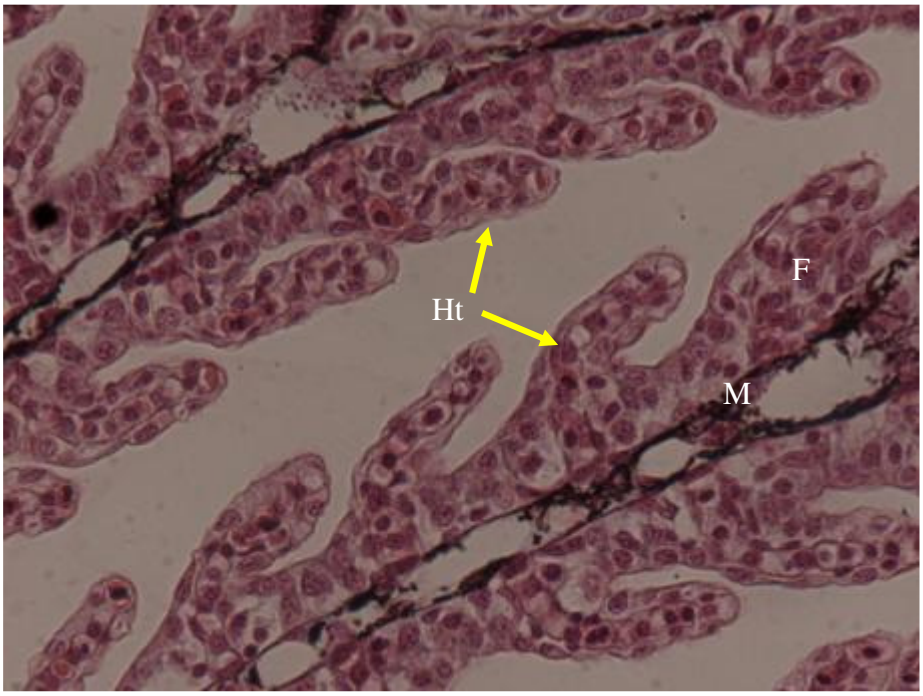
- اثرات عصاره سیر (EC_{50}) بر بافت آبشش بچه تاسماهی ایرانی:



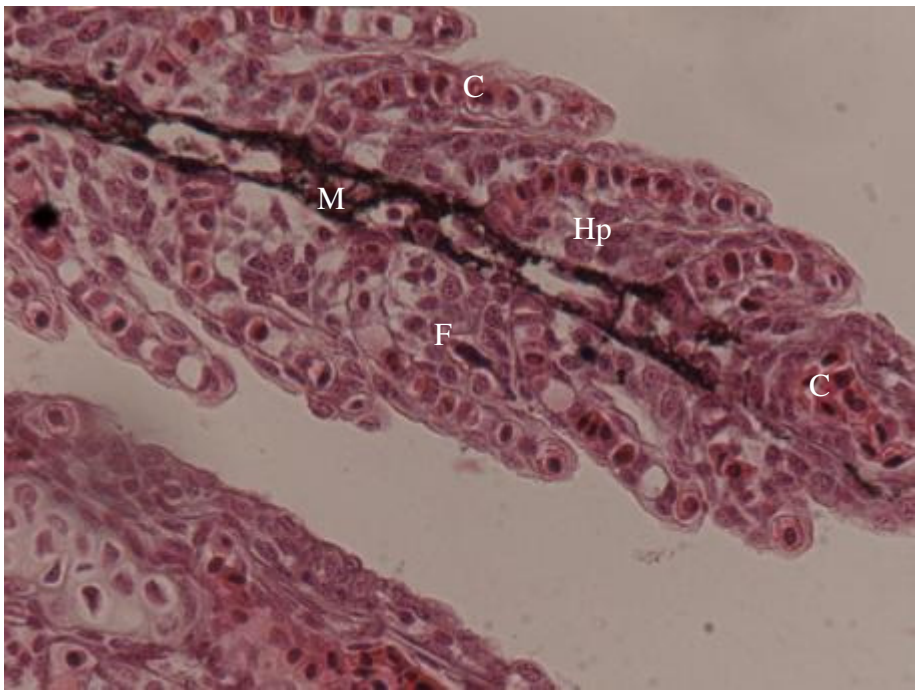
تصویر ۵۱- پرخونی رشته های اولیه و ثانویه آبششی (C) و چسبندگی رشته های ثانویه آبششی (F)تیمار۱ (H&E ،x٤٠)



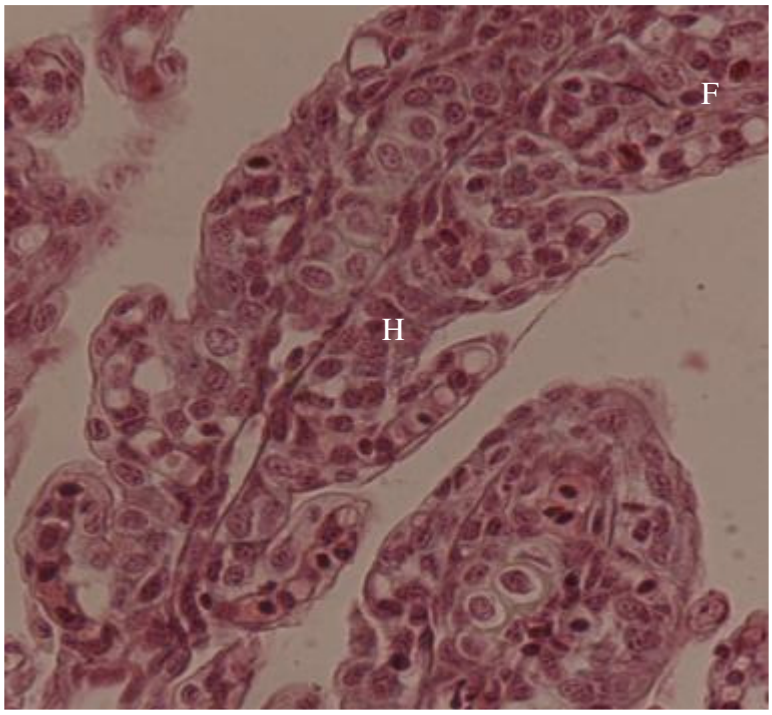
تصویر ۵۲- چسبندگی (F) و هیپرتروفی (H) در رشته های آبششی ثانویه- تیمار۳ (H&E ،x۲۰)



تصویر ۵۳ – مشاهده حضور رنگدانه های ملانین (M) و چسبندگی (F) و هیپرتروفی درآبشش (Ht)تیمار۵ (H&E ،x ٤٠)

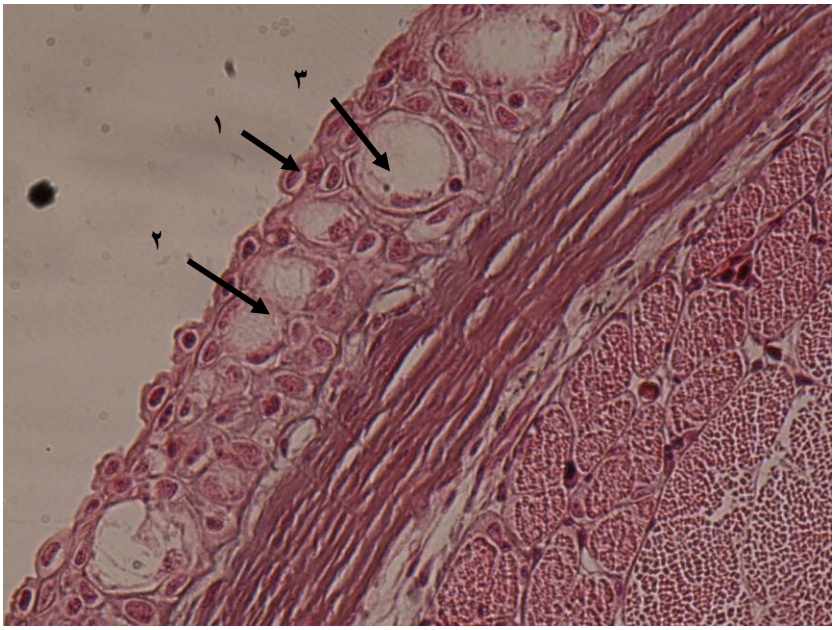


تصویر ٥٤- مشاهده پرخونی (C)، رنگدانه های ملانین (M) و چسبندگی رشته های آبششی ثانویه (F) و هیپرپلازی (Hp) در آبشش – تیمار٦ (H&E ،x٤٠)

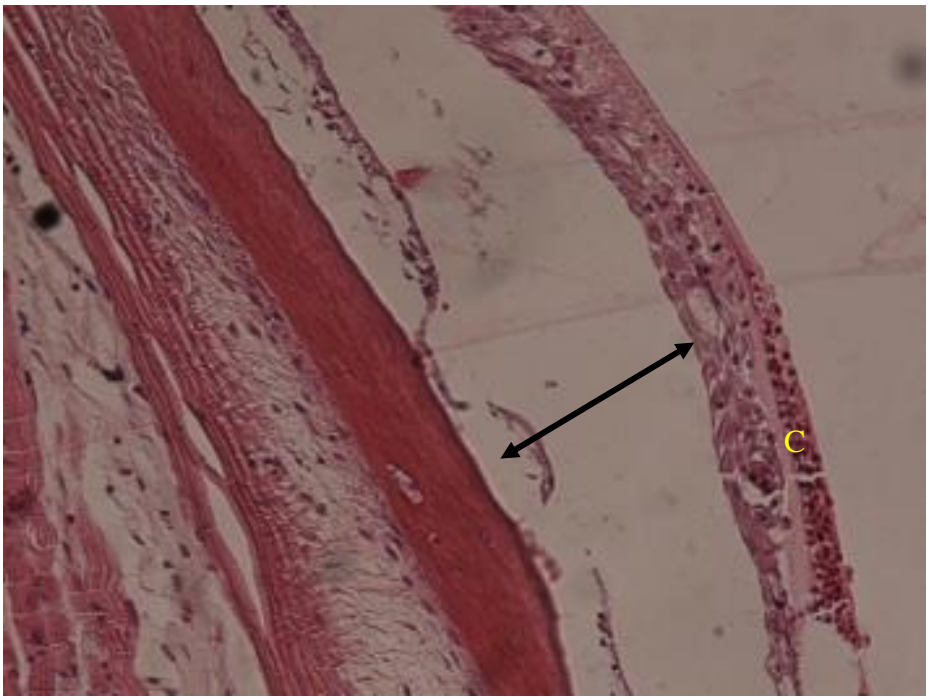


تصویر ۵۵ - مشاهده چسبندگی رشته های آبششی ثانویه (F) و هیپرپلازی (Hp) در آبشش - تیمار۸ (٤٠x، H&E)

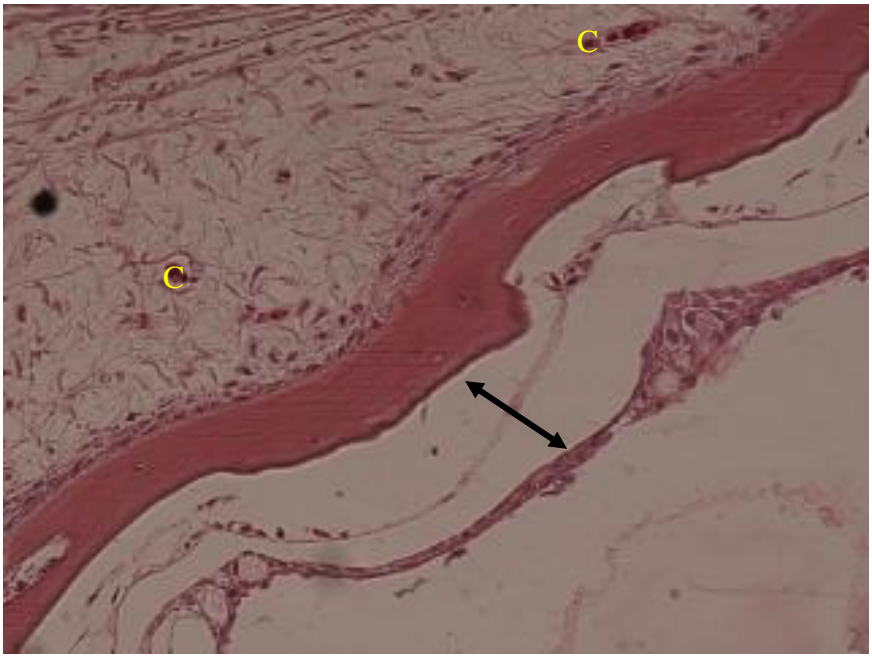
- اثرات عصاره سیر (EC_{50}) بر بافت پوست بچه تاسماهی ایرانی:



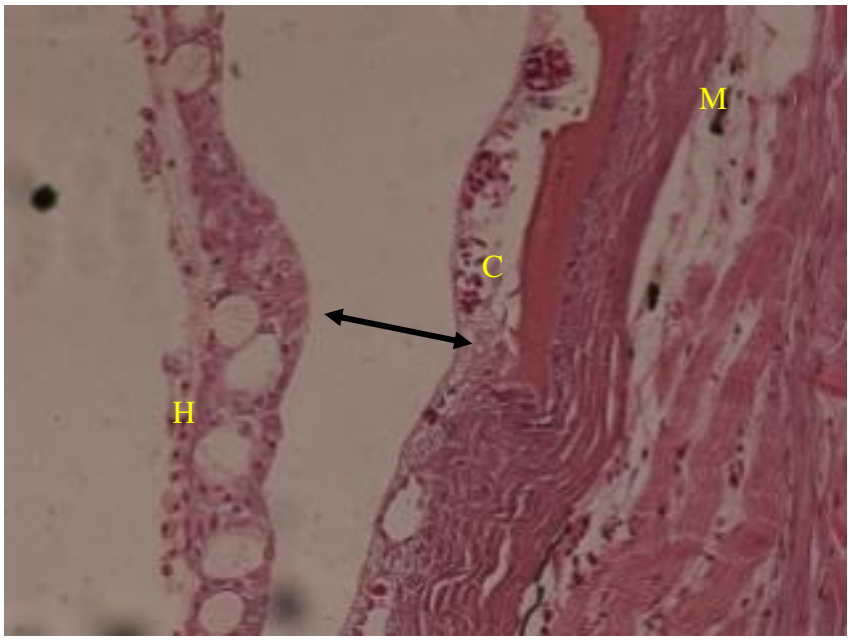
تصویر ٥٦ (شاهد)- سلول های پوششی(۱)، موکوسی(۲) و alarm (۳)در لایه اپی درمیس در تاسماهی ایرانی (H&E ,40X)



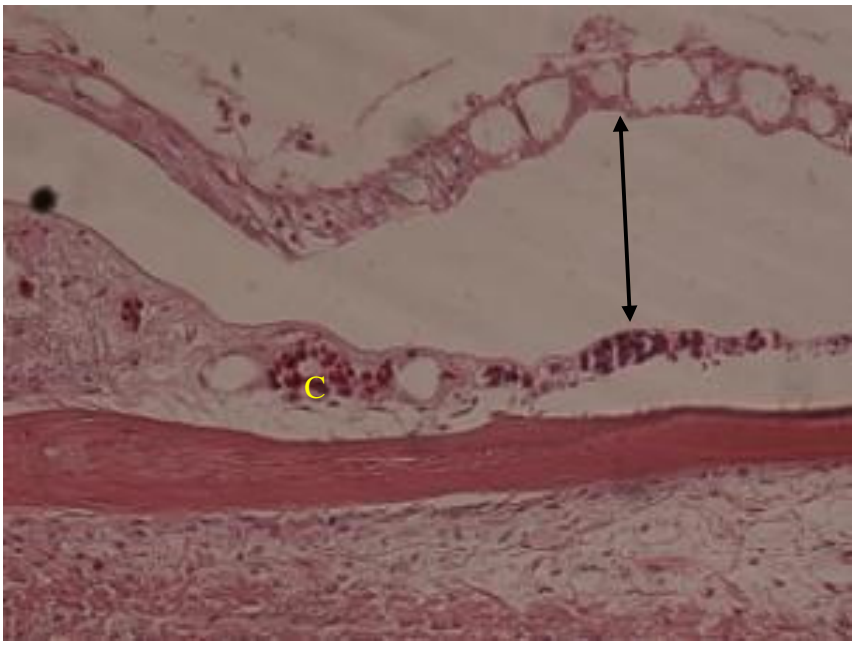
تصویر ۵۷ - مشاهده پرخونی (C)، و جدا شدن اپی درم از درم(پیکان) تیمار ۱ (H&E,20X)



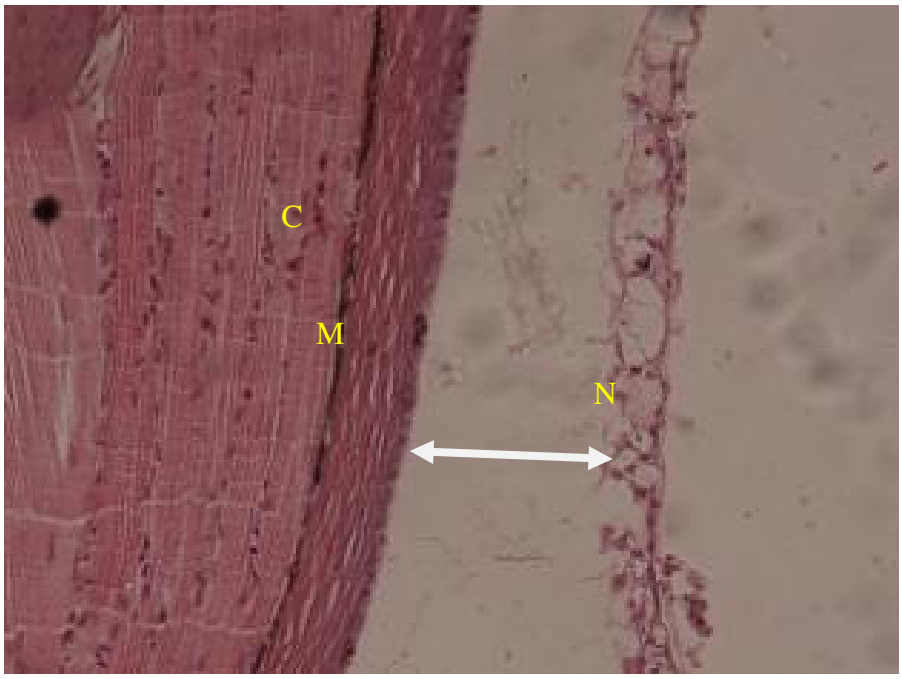
تصویر ۵۸- مشاهده پرخونی (C)، و جدا شدن اپی درم از درم(پیکان)- تیمار۳ (H&E,20X)



تصویر ۵۹- مشاهده پرخونی (C)، خونریزی (H) حضور رنگدانه ملانین (M) و جدا شدن اپی درم از درم(پیکان) تیمار۵ (H&E,20X)



تصویر ٦۰- مشاهده پرخونی (C)، و جدا شدن اپی درم از درم(پیکان) تیمار ۷ (H&E,20X)



تصویر ٦١ - مشاهده پرخونی (C)، حضور رنگدانه ملانین (M)، نکروز سلولی (N) و جدا شدن اپی درم از درم (پیکان) تیمار۸ (H&E,20X)

در بررسی پوست ماهیان، طی هر دو آزمون سیر و آویشن شیرازی تغییراتی نظیر پرخونی، افزایش رنگدانه ملانین، افزایش سلول های alarm، واکنش آماسی، جدا شدن لایه اپی درمیس(لایه خارجی) از لایه درمیس (لایه داخلی) و نکروز سلولی مشاهده گردید. شدت عوارض در آزمون ها با افزایش غلظت بیشتر گردید. حضور رنگدانه های ملانین در آزمون آویشن نسبت به سیر بیشتر بوده است. بیشترین عارضه دیده شده در هر دو آزمون پرخونی و خونریزی و جدا شدن دو لایه از هم بوده است.

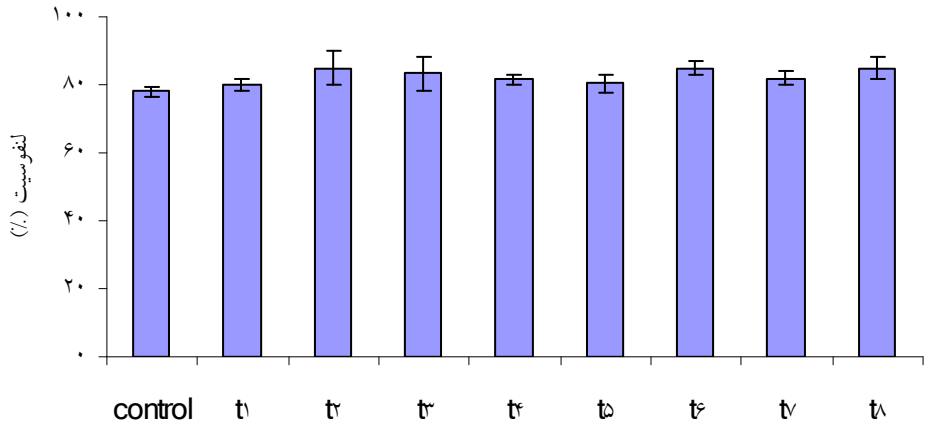
۸-۳-۳- مطالعات هماتولوژی تأثیر عصاره سیر- EC_{50}

با توجه به کوچک بودن سایز بچه تاسماهیان ایرانی فقط انجام مطالعه افتراقی گلبولهای سفید امکان پذیر شد که در زیر به نتایج آن اشاره می گردد:

لنفوسیت: بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) مقایسه میزان لنفوسیت خون بچه تاسماهیان حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار آماری بین تیمارها بود ($P>0.05$).

جدول ۵۷- میانگین لنفوسیت در شاهد و تیمار های مختلف

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد ± میانگین
لنفوسیت	شاهد	۷۸/۲۰ ± ۱ /۴۹
	تیمار ۱	۷۹/۷۵ ±۱/۷۹
	تیمار ۲	۸۵ ±۵/۰۶
	تیمار ۳	۸۳/۲۸ ±۴/۸۵
	تیمار ۴	۸۱/۵ ± ۱/۳۲
	تیمار ۵	۸۰/۵ ± ۲ /۵۹
	تیمار ۶	۸۵ ±۱/۸۲
	تیمار ۷	۸۲ ±۲/۱۲
	تیمار ۸	۸۴/۷۵ ± ۳/۱۹



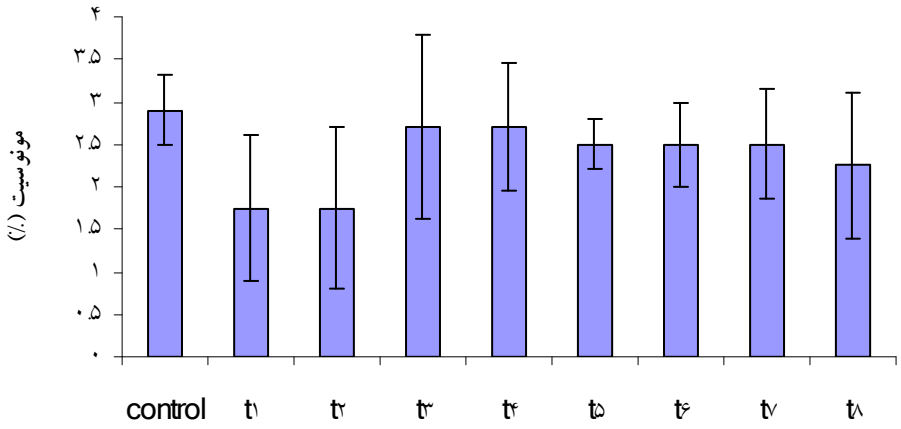
نمودار٤٥- مقایسه میانگین میزان لنفوسیت شاهد با تیمار های مختلف سیر

مونوسیت :

میزان مونوسیت خون بچه تاسماهیان ایرانی بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه(Oneway Anova) اختلاف معنی دار آماری بین تیمارها را نشان نداد ($P>0.05$).

جدول ۵۸- میانگین مونوسیت در شاهد و تیمار های مختلف

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد ± میانگین
مونوسیت	شاهد	۲/۹ ± ۰ /۴۰
	تیمار ۱	۱/۷۵ ±۰/۸۵
	تیمار ۲	۱/۷۵ ±۰/۹۴
	تیمار ۳	۲/۷۰ ±۱/۰۸
	تیمار ۴	۲/۷ ± ۰ /۷۵
	تیمار ۵	۲/۵ ±۰/۲۸
	تیمار ۶	۲/۵ ±۰/۵۰
	تیمار ۷	۲/۵ ± ۰/۶۴
	تیمار ۸	۲/۲۵ ± ۰ /۸۵

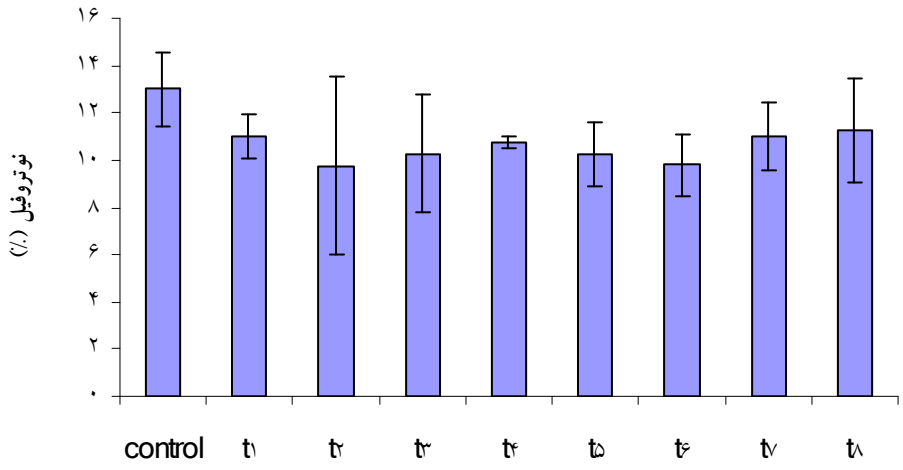


نمودار٤٦- مقایسه میانگین میزان مونوسیت شاهد با تیمار های مختلف سیر

نوتروفیل : بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان نوتروفیل خون ماهیان مورد بررسی بین تیمار ها اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد ($P>0.05$).

جدول ۵۹- میانگین نوتروفیل در شاهد و تیمار های مختلف

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد ± میانگین
نوتروفیل	شاهد	۱۳ ± ۱ /۶۰
	تیمار ۱	۱۱ ±۰/۹۱
	تیمار ۲	۹/۷۵ ±۳/۷۷
	تیمار ۳	۱۰/۲۵ ±۲/۴۹
	تیمار ۴	۱۰/۷۵ ± ۰/۲۵
	تیمار ۵	۱۰/۲۵ ±۱/۳۸
	تیمار ۶	۹/۸ ±۱/۳۲
	تیمار ۷	۱۱ ± ۱/۴۷
	تیمار ۸	۱۱/۲۵ ± ۲ /۲۱

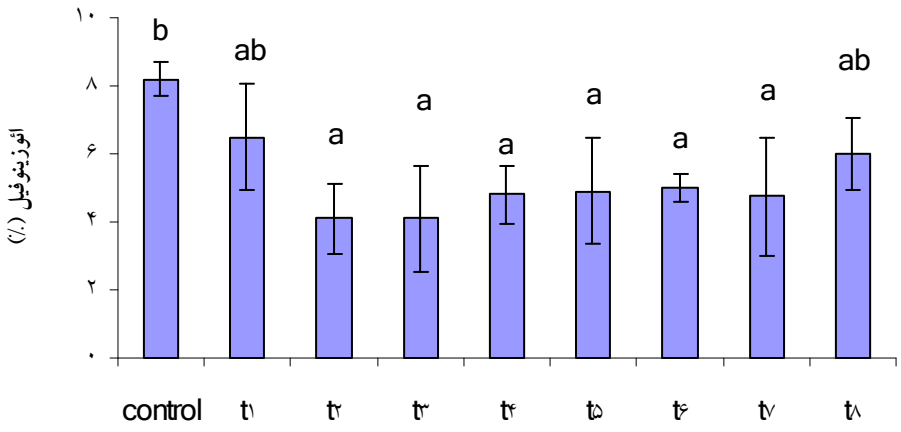


نمودار۴۷- مقایسه میانگین میزان نوتروفیل در تیمار های مختلف سیر

ائوزینوفیل: بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) میزان ائوزینوفیل در خون بچه ماهیان بین تیمار ها اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P<0.05$). بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه گروه ها با یکدیگر نشان داد که ائوزینوفیل خون بچه ماهیان در تیمار ها از روند کاهشی برخوردار بوده است و کمترین میزان ائوزینوفیل در خون بچه ماهیان تیمارهای ۲ و ۳ مشاهده شده است و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار آماری بین تیمار های ۲ تا ۷ با شاهد و سایر تیمار ها مشاهده گردید ($P<0.05$).

جدول ٦٠- میانگین ائوزینوفیل در شاهد و تیمار های مختلف

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد ± میانگین
ائوزینوفیل	شاهد	۸/۲ ± ۰ /۴۷^{ab}
	تیمار ۱	۶/۵ ±۱/۵۵^{b}
	تیمار ۲	۴/۱ ±۱/۰۴^{ab}
	تیمار ۳	۴/۱ ±۰/۵۵ ^{ab}
	تیمار ۴	۴/۸ ± ۰/۵۶ ^{b}
	تیمار ۵	۴/۹ ±۰/۵۵ ^{b}
	تیمار ۶	۵ ±۰/۴۰ ^{ab}
	تیمار ۷	۴/۷۵ ± ۱/۷۵^{ab}
	تیمار ۸	۶ ± ۱ /۰۳ ^{a}



نمودار٤٨- مقایسه میانگین میزان ائوزینوفیل شاهد با تیمار های مختلف سیر

٤-۳- شاخص درمانی (Therapeutic index)

نتایج حاصل از آزمایشات تعیین LC_{50} و EC_{50} و محاسبات انجام شده نشان داد که شاخص درمانی عصاره هیدرو الکلی سیر معادل ۷۳/۱۵ بوده که نسبت به عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی با میزان ۲۲/۶۹ از مقدار بزرگتری برخوردار بوده و بالطبع با توجه به تعریف این شاخص، از سلامتی بیشتری برای بچه تاسماهی ایرانی برخوردار است.

٥-۳- زمان اثر بخشی نهایی عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی در مبارزه با انگل

بمنظور بررسی مدت زمان اثربخشی نهایی عصاره ها، طی آزمایشات تعیین EC_{50} و پس از خاتمه زمان مطالعه مذکور طی یکساعت، بررسی ها بر روی تیمارهای مطالعاتی و انجام نمونه برداریها جهت تعیین میزان شدت

آلودگی انگلی ادامه یافت. این بررسی تا خاتمه زمان حذف کامل انگل تریکودینا از تمامی تیمارها ادامه داشت. نتایج نشان داد که انگل مذکور در تمامی تیمارهای عصاره هیدروالکلی سیر در مدت زمان ۹ ساعت بطور کامل از سطح آبشش و پوست بچه تاسماهیان ایرانی حذف گردید. این درحالیست که این زمان برای عصاره هیدرو الکلی آویشن شیرازی ۱۲ ساعت تعیین گردید.

جدول ٦١ - زمان اثر بخشی نهایی عصاره هیدروالکلی سیر در مبارزه با انگل تریکودینا

تیمار	غلظت (میلی گرم در لیتر)	مدت زمان (ساعت)																					
		۳۰ دقیقه	۱	۱/۵	۲	۲/۵	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴
۱	۵۰	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	*	–	–	–	–	–
۲	۷۰	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	*	–	–	–	–	–	–
۳	۹۰	–	–	–	–	–	–	–	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–
۴	۱۲۰	–	–	–	–	–	–	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
۵	۱۶۵	–	–	–	–	–	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
۶	۲۲۰	–	–	–	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
۷	۳۰۰	–	–	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
۸	۴۰۰	–	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

کلی آویشن شیرازی در مبارزه با انگل تریکودینا

تیمار	غلظت (میلی گرم در لیتر)	مدت زمان (ساعت)																					
		۳۰ دقیقه	۱	۱/۵	۲	۲/۵	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴
۱	۲۰۰	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	*	–	–
۲	۲۳۵	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	*	–	–	–	–
۳	۲۷۵	–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	*	–	–	–	–	–
۴	۳۲۰	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	*	–	–	–	–	–	–
۵	۳۷۵	–	–	–	–	–	–	–	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–
۶	۴۴۰	–	–	–	–	–	–	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
۷	۵۱۰	–	–	–	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
۸	۶۰۰	–	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

٤- بحث

نظر به توسعه تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری و لزوم توجه به امر بازسازی ذخایر در کشور، اهتمام جدی در خصوص توجه به عوامل تهدید کننده سلامت این ماهیان بسیار ضروری می باشد. مطالعات نشان می دهند که عوامل بیماریزای انگلی از جمله عوامل تهدید کننده ماهیان خاویاری محسوب می گردند (شناور ماسوله و همکاران، ۱۳۸۸). انگلها از جمله عوامل مهمی هستند که در مراحل و سنین مختلف رشد ماهیان می توانند باعث کاهش وزن، لاغری، کاهش بازده تولید مثلی یا عقیمی، کوری، رفتارهای غیر طبیعی، زخمهای جلدی، نارسایی آبششی و علایمی از این قبیل باشند که خود می تواند ضرر و زیان اقتصادی زیادی را به دنبال داشته باشد. مهمترین انگل تک یاخته خارجی شایع در ماهیان خاویاری انگل تریکودینا بوده که می تواند علاوه برایجاد آسیبهای مستقیم، در ایجاد عفونتهای ثانویه نیز نقش داشته باشند(Lyholt and Buchmann, 1995). آلودگی به انگل تریکودینا معمولا در ماهیان ضعیف یا ماهیانی دیده می شود که در شرایط محیطی نامناسب نگهداری می شوند. افزایش مواد آلی محلول در آب، رشد بیش از حد گیاهان در استخر و غذا دهی بیش از حد از جمله عواملی هستند که شرایط فیزیکوشیمیایی آب را به هم زده و رشد و تکثیراین مژه داران را افزایش می دهند (پیغان، ۱۳۸۰). تحمیل استرس هایی با علل متفاوت به بچه ماهیان پرورشی، موجب کاهش قدرت دفاعی بچه ماهیان در برابر انگل *Trichodina* sp. می گردند (جلالی،۱۳۷۷).

با توجه به اینکه امروزه مواد ضدعفونی کننده شیمیایی به منظور کنترل و حذف عوامل بیماریزا در آبزیان مورد استفاده قرار می گیرد لذا آلودگی های زیست محیطی، امکان بروز تلفات گسترده در ماهیان تحت درمان، وسعت زیاد استخرهای ماهیان پرورشی، لزوم خروج ارز از کشور به منظور واردات و در نهایت تاثیرات سوء بر مصرف کنندگان از جمله مسائلی هستند که کاربرد این مواد را با مسائل ومشکلات جدی روبرو ساخته است. این در حالیست که بمنظور مبارزه با انگل تریکودینا مواد شیمیایی مختلفی از جمله فرمالین و کلر معرفی گردیده اند (Madsen *etal*, 2000). همچنین Eissa در سال ۲۰۰۴ به استفاده از پرمنگنات پتاسیم در آلودگی به تریکودینا اشاره نموده است. با توجه به مشکلات و خطرات استفاده از موادشیمیایی لزوم بررسی جایگزین های طبیعی برای این مواد ضد عفونی کننده بیش از پیش احساس می گردد (Yao *etal*, 2011) .

در این میان نظر به ماهیت طبیعی و تأثیرات گیاهان دارویی در کنترل عوامل بیماریزا سبب گردیده که امروزه گرایش به استفاده از گیاهان دارویی در پزشکی و دامپزشکی از جمله در بهداشت و بیماریهای آبزیان بیش از پیش مورد توجه قرارگیرد. با توجه به غنا و تنوع گیاهان دارویی کشور، ارزیابی برخی از گیاهان دارویی بومی ایران بدین منظور ضروری است. در این تحقیق با توجه به اهمیت و کاربردی بودن استفاده از گیاهان دارویی بمنظور جایگزینی با مواد شیمیایی به بررسی تأثیر عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی در کنترل انگل تک یاخته ای تریکودینا پرداخته شد. بدین منظور انجام مطالعات تعیین عیار زیستی (Bioassay) این عصاره ها بر روی بچه تاسماهی ایرانی انجام پذیرفت.

مطالعات تعیین غلظتهای کشنده (LC_{50})عصاره آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهی ایرانی نشان داد که این مقدار طی ۹۶ ساعت معادل ۷۶۶/۶۵ میلی گرم در لیتر بوده است. با توجه به اینکه در نظر است تأثیرات این عصاره ها در حمام کوتاه مدت بمنظور حذف انگل خارجی تریکودینا نیز ارزیابی گردد لذا تعیین غلظتهای کشنده این عصاره ها طی مدت یکساعت نیز ضروری می نمود بر این اساس و با توجه به نتایج آزمایشات، مقدار LC_{50} یکساعته عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی معادل ۹۹۳۳/۴۴ میلی گرم در لیتر در بچه تاسماهی ایرانی محاسبه گردید. در مطالعاتی، معصوم زاده و همکاران (۱۳۸۹) و شریف روحانی و همکاران (۱۳۹۰) به تعیین غلظت نیمه کشنده اسانس آویشن شیرازی طی ۹۶ ساعت بترتیب بر روی بچه تاسماهی ایرانی و بچه قزل آلای رنگین کمان پرورشی پرداختند که مقادیر LC_{50} آنها بترتیب ۱۲/۱۱ و ۱۳/۶ میلی گرم در لیتر تعیین گردید که با توجه به نوع ترکیب و میزان ماده مؤثره در اسانس، مقادیر آن با بررسی حاضر متفاوت می باشد.

اما مطالعات تعیین LC_{50} عصاره هیدروالکلی سیر بر روی بچه تاسماهی ایرانی طی مدت ۹۶ ساعت نشاندهنده مقداری معادل ۱۲۷۹/۹۷ میلی گرم در لیتر بوده است این در حالیست که LC_{50} یکساعته این عصاره معادل ۱۲۶۲۴/۰۸ تعیین گردید. در مطالعه ای که توسط Abd El Galil و Aboelhadid در سال ۲۰۱۲ بمنظور بررسی تأثیر روغن سیر(Garlic oil) در مبارزه با انگل تریکودینا در ماهی تیلاپیای نیل (*O. niloticus*) انجام گرفت میزان LC_{50} روغن سیر را معادلppt ۶۱/۸۶ تعیین نمودند. بطوریکه شاخص سلامتی این روغنppt ۳ بوده و نشاندهنده ایمنی خوب این ماده می باشد.

با توجه به اینکه امروزه داروهای شیمیایی نظیر پرمنگات پتاسیم در مبارزه با انگلهای خارجی مورد استفاده قرار می گیرند لذا در بکارگیری این ماده بایستی به میزان سمیت و مقادیر کشندگی آن توجه نمود. درمانهای درازمدت با پرمنگنات پتاسیم در استخرهای نگهداری ماهیان با غلظت ۰/۶-۰/۳ میلی گرم در لیتر در زمان ۱۲ ساعت انجام

می شود. این در حالیست که مقادیر درمانی پرمنگنات پتاسیم خیلی نزدیک به غلظتهای کشنده برای ماهی است(اسوبودا،۱۹۹۵).

مطالعات کمی در خصوص بررسی سمیت حاد پرمنگنات پتاسیم ($Kmno_4$) درگونه های مختلف ماهیان صورت پذیرفته است(Marking and Bills,1975;Tucker,1987). در تعدادی از این بررسی ها، تاثیرات این ماده شیمیایی بر روی باس مخطط (Wellborn,1969;Hughes,1971;Bills,1993;Reardon and Harrell,1994) و نیز باس هیبرید صورت پذیرفت (Stratus,2004) .

طی تحقیقی که توسط Kori-Siakpere در سال ۲۰۰۸ انجام پذیرفت، سمیت حاد پرمنگنات پتاسیم بر روی گربه ماهی آفریقایی(*Clarias gariepinus*) مورد بررسی قرار گرفت، بطوریکه LC_{50} نودو شش ساعته معادل ۳/۰۲ میلی گرم در لیتر تعیین شد. این مطالعه نشان داد که سمیت $Kmno_4$ در مکانیسم تنفس ماهی مخصوصاً در آب با pH بالا بوسیله ایجاد ذرات ریز منگنز اکسیده ،آبشش ماهی را مسدود کرده و اختلال ایجاد می نماید. به

نظر می رسد که تأثیر کشندگی پرمنگنات پتاسیم ارتباطی به سمیت فلز منگنز ندارد، اما تا حدودی به خاصیت اکسیدکنندگی یون پرمنگنات (Mno_4) وابسته است(Griffin *et al*.,2002). در تحقیقی نیز LC_{50} نودوشش ساعته سولفات مس و پرمنگنات پتاسیم در بچه تاسماهی ایرانی ۳ تا ۵ گرمی به ترتیب ۰/۱۵ و ۰/۴۱ میلی گرم در لیتر تعیین گردید (مشتاقی و همکاران، ۱۳۸۹).

بررسی تصاویر تهیه شده از مقاطع بافتی آبشش، کبد و پوست بچه تاسماهیان ایرانی که تحت تأثیر غلظتهای مختلف کشنده عصاره هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی قرار داشتند برخی از آسیب های میکروسکوپیک را نشان داده است. نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی بافت آبشش حاکی از ضایعات هیستوپاتولوژیک نظیر پرخونی، چسبندگی در رشته های آبششی، نکروز سلولی، وجود رنگدانه های ملانین در رشته های اولیه آبششی می باشد. بررسی مقاطع بافتی کبد در تیمارهای مختلف عوارضی نظیر تورم ابری در هپاتوسیتها، نکروزسلولی، مشاهده پرخونی، افزایش رنگدانه های ملانین و مراکز ملانو ماکروفاژها بوده است. در بررسی بافت پوست بچه تاسماهیان ایرانی تغییراتی نظیر پرخونی، افزایش ملانوفور و رنگدانه ملانین، افزایش سلول های موکوسی، افزایش حضور لنفوسیت، نکروز در لایه اپیدرم مشاهده گردید. بررسی حاضر با مطالعات معصوم زاده و همکاران در سال ۱۳۸۹ که تأثیرات اسانس آویشن شیرازی را در بچه تاسماهیان ایرانی مطالعه نمود تا حد زیادی مطابقت دارد. با توجه به نتایج حاصل از تعیین مقادیر LC_{50} و نیز نتایج بررسی میکروسکوپی مقاطع بافتها به نظر می رسد استفاده از حمام عصاره ها بر روی بچه تاسماهیان ایرانی انگشت قد با اهداف درمانی باید به کمترین مقادیر ممکن غلظت عصاره ها و نیز کمترین مدت زمان جهت تیمار ماهیان محدود گردد (معصوم زاده و همکاران، ۱۳۸۹).

در بررسی گلبولهای سفید خون، اختلاف معنی دار آماری در میزان لنفوسیت تیمارهای مختلف مشاهده گردید($P<0.05$) . بطوریکه با افزایش غلظت عصاره ها در تیمارهای مطالعاتی تعیین غلظتهای کشنده، میزان لنفوسیت کاهش نشان داده است. افزایش غلظت عصاره ها به نوعی یک عامل استرس زا محسوب می گردد و هنگامی که به ماهی استرس داده می شود، سطوح در گردش لوکوسیتها با زمان تغییر می کند و این تغییرات به دنبال انواع فاکتورهای فیزیکی استرس زا، کاهش تعداد لنفوسیت ها یا تعداد این سلول نسبت به تعداد گلبولهای قرمز را شامل می‌شود (Roberts,1989 : Berlin *et al*, 2008). در این بررسی میزان مونوسیت بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی دار آماری نشان نداد ($P>0.05$). مقایسه میزان نوتروفیل خون بچه تاسماهیان ایرانی، حاکی از وجود اختلاف معنی دار آماری بین تیمارها بوده است ($P<0.05$). بطوریکه با افزایش غلظت عصاره ها، میزان نوتروفیل نیز افزایش یافت. با توجه به اینکه وظیفه نوتروفیل‌ها دفاع بر علیه عفونت‌ها و حرکت به سمت نواحی آسیب دیده بافتی می باشد لذا با افزایش آسیب های بافتی در غلظتهای بالاتر عصاره ها، بالطبع میتوان شاهد افزایش میزان نوتروفیل خون بود(تاکاشیما، ۱۳۷۸). ائوزینوفیل نیز در تیمارهای مختلف اختلاف معنی دار نشان داد ($P<0.05$)، بطوریکه میزان آن در شاهد بیش از سایر تیمارها بود.

طی انجام مطالعات تعیین غلظتهای کشنده عصاره های سیر و آویشن شیرازی مشاهده رفتارهای غیرطبیعی شامل افزایش تحریک پذیری، تعادل کم، انقباض شدید عضلات و انحنای ستون فقرات در غلظتهای زیاد این عصاره کاملاً مشهود بوده که با یافته های شریف روحانی و همکاران (۱۳۹۰)، Mitchell در سال ۱۹۸۴و Jeged در سال ۲۰۰۷ مطابقت دارد.

پس از انجام مطالعات تعیین غلظتهای کشنده عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی و با توجه به نتایج بدست آمده نسبت به انجام مطالعات تعیین غلظتهای تأثیر گذار(EC_{50}) عصاره های مذکور در مبارزه با انگل تک یاخته ای تریکودینا اقدام گردید. با توجه به اینکه در نظر بود دوز های مؤثر نیمه کشندگی عصاره آویشن شیرازی در مبارزه با تریکودینا طی مدت یکساعت تعیین گردد، لذا در این مطالعه در فواصل زمانی ۳۰ دقیقه ای نسبت به نمونه برداری از بچه ماهیان و بررسی شدت آلودگی به انگل مذکور در پوست و آبشش اقدام گردید.

در این تحقیق محدوده غلظت ۲۰۰ تا ۶۰۰ میلی گرم در لیتر برای انجام آزمایشات نهایی تعیین گردید. بر اساس محاسبات لگاریتمی ۸ تیمار (۲۰۰، ۲۳۵، ۲۷۵، ۳۲۰، ۳۷۵، ۴۴۰ ، ۵۱۰ و ۶۰۰ میلی گرم لیتر)در نظر گرفته شد و نسبت به گروه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت. بر این اساس ضمن اینکه برای اولین بار مشخص گردید که عصاره آویشن شیرازی می تواند در مبارزه با انگل تک یاخته ای تریکودینا مؤثر باشد، میزان EC_{50} این عصاره طی مدت یکساعت حمام برابر ۴۳۷/۶۲ میلی گرم در لیتر تعیین گردید. با توجه به اینکه تاکنون مطالعه ای در خصوص تأثیرات آویشن شیرازی بر انگل تریکودینا انجام نگرفته بود لذا امکان مقایسه نتایج غلظت مؤثره آویشن شیرازی بر تریکودینا با نتایج دیگران امکانپذیر نگردید.

بمنظور تعیین غلظت مؤثره عصاره هیدروالکلی سیر بر روی انگل مذکور در بچه تاسماهیان ایرانی محدوده غلظت ۵۰ تا ۴۰۰ میلی گرم در لیتر برای انجام آزمایشات نهایی تعیین گردید. بر اساس محاسبات لگاریتمی ۸ تیمار (۵۰، ۷۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۶۵، ۲۲۰ ، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم لیتر) در نظر گرفته شد و نسبت به گروه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت. بر این اساس میزان EC_{50} این عصاره طی مدت یکساعت حمام برابر ۱۷۲/۵۸ میلی گرم در لیتر تعیین گردید.

تاکنون تأثیرات ضد انگلی سیر بر روی انگل تریکودینا توسط محققینی در کشورهای مختلف انجام گردیده است. بطوریکه Madsen و همکاران در سال ۲۰۰۰ ، دوز ۲۰۰ میلی گرم در لیتر عصاره سیر را طی چندین روز در زدودن انگل تریکودینا در مارماهی مؤثر دانست. Noor El Deen در سال ۲۰۰۹ افزودن ۸۰۰ میلی گرم در کیلوگرم غذای ماهی تیلاپیا می تواند هم در حذف تریکودینا و هم آئروموناس هیدروفیلا مؤثر باشد.

Abd El Galil در سال ۲۰۱۲ به مطالعه کنترل تریکودینازیس و ژیروداکتیلوزیس در هچری ماهی تیلاپیای نیل با استفاده از سیر پرداخت. سیر مورد استفاده به دو صورت روغن سیر (ppt ۳) و سیر له شده (۳۰۰ میلی گرم در لیتر) به صورت حمام طولانی مدت (۵ ، ۱۵و ۳۰ روزه) بود. نتایج نشان داد که به ترتیب ۵۵ درصد و ۶۸ درصد

در درمان تریکودینازیس مؤثر بوده اند. Noor El Deen در سال ۲۰۱۰ تأثیر گذاری عصاره چای سبز را در مبارزه با انگل تریکودینا تعیین نمود. Yao و همکاران در سال ۲۰۱۱ به مطالعه سه نوع آلکالوئید (chelidonine، chelerythrine و sanguinarine) استخراج شده از گیاه مامیران (*Chelidonium majus*) در مبارزه با انگل تریکودینا پرداخت. نتایج حاکی از تأثیر کامل بر انگل تریکودینا بوده است بطوریکه میزان EC_{50} آنها بترتیب ۰/۶ ، ۰/۳۳ و ۰/۳۲ میلی گرم در لیتر تعیین گردید.

نتایج حاصل از شمارش افتراقی گلبولهای سفید خون در مطالعه تعیین غلظتهای مؤثر عصاره ها در مبارزه با تریکودینا نشان داد که میزان لنفوسیت در تیمارهای مختلف عصاره های آویشن شیرازی و سیر نسبت به شاهد تا حدودی روند افزایشی داشته، بطوریکه استفاده از این عصاره ها بعنوان عاملی در کاهش میزان استرس عمل نموده و بعنوان فاکتوری مثبت تلقی گردد (Berlin *et al*, 2008; Roberts,1989) . ائوزینوفیل نیز در تیمارهای مختلف هر دو عصاره اختلاف معنی دار آماری را نشان داد ($P<0.05$) بطوریکه در مقایسه با شاهد مقادیر کمتری را نشان دادند. نظر به اینکه مقادیر نوتروفیل و ائوزینوفیل (گرانولوسیتها) در مطالعه تعیین غلظتهای مؤثر بر حذف انگل تریکودینا نسبت به شاهد کاهش یافته، می تواند بعنوان شاخصی مثبت و ایجاد کننده آرامش در این ماهیان محسوب گردد. نتایج شمارش گلبولهای سفید بچه فیل ماهیان پرورشی در مطالعه تنگستانی و همکاران در سال ۱۳۹۰ که بمنظور بررسی تأثیر اسانس سیر بر شاخصهای خونی در فیل ماهی انجام شده بود مؤید نتایج تحقیق حاضر بر روی بچه تاسماهیان ایرانی می باشد. ضمناً در مطالعه Alishahi و Mesbah در سال ۲۰۱۰ بر روی شاخصهای ایمونولوژی *Astronatus ocellatus* نتایجی بدست آمد که تا حد زیادی با نتایج شمارش گلبولهای سفید تعیین غلظت مؤثره عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی مطابقت دارد.

طی انجام مطالعات تعیین غلظتهای مؤثره (EC_{50}) عصاره های سیر و آویشن شیرازی هیچگونه رفتار غیرطبیعی در بچه تاسماهیان ایرانی مشاهده نگردید که خود حاکی از عدم وجود شرایط استرس زا از قبیل تحریکات عصاره ها و... طی انجام آزمایش مذکور بوده است .

بررسی مدت زمان اثربخشی نهایی عصاره ها بمنظور حذف کامل انگل تریکودینا در تیمارهای مختلف، حاکی از تعیین زمان اثربخشی در دوز محاسبه شده EC_{50} عصاره هیدروالکلی سیر(۱۷۲/۵۸ میلی گرم در لیتر) در زمانی کمتر از ۳ ساعت می باشد. این در حالیست که زمان مذکور برای عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی (۴۳۷/۶۲ میلی گرم در لیتر) در مدت زمانی کمتر از ۵ ساعت تعیین گردید. این نتایج نشان داد که انگل مذکور در تمامی تیمارهای عصاره هیدروالکلی سیر در مدت زمان ۹ ساعت بطور کامل از سطح آبشش و پوست بچه تاسماهیان ایرانی حذف گردید. این زمان برای عصاره هیدرو الکلی آویشن شیرازی ۱۲ ساعت تعیین شد. Abd El Galil در سال ۲۰۱۲ درمطالعه کنترل تریکودینازیس و ژیروداکتیلوزیس درتیلاپیای نیل با استفاده روغن سیر (۳ ppt) و سیر له شده (۳۰۰ میلی گرم در لیتر) نتیجه گیری نمود که طی مدت یکساعت حمام با استفاده از

ترکیبات مذکور بترتیب ۷۴٪ و ۳۱٪ از میزان آلودگی انگلی کاسته شد. این در حالیست که در حمام ۲۴ ساعته درصد رهایش تیلاپیای نیل از انگلهای مذکور برای روغن سیر ۷۶٪ و برای سیر له شده ۷۹٪ درصد بوده است.

با توجه به اینکه عملکرد یک ماده ضدعفونی کننده تابع پیچیده ای از چندین متغیر، همچون نوع و مقدار ماده مورد نظر، نوع و غلظت میکروارگانیزم ها، زمان تماس ، کیفیت آب و ... می باشد. بنابراین در بسیاری از موارد بهترین روش برای انتخاب ماده ضدعفونی کننده مناسب، مطالعات آزمایشگاهی بوده که در آن کیفیت آب نیز کنترل شده باشد (چالکشی امیری، ۱۳۷۶). با توجه به نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر، تمامی فاکتورهای فیزیکوشیمیایی اندازه گیری شده، در محدوده مجاز قرار داشتند.

میزان سمیت غلظتهای مؤثره (EC_{50}) مواد در آبزیان، به سه دسته تقسیم می شود. در صورتیکه مقدار EC_{50} کمتر از یک میلی گرم در لیتر باشد در دسته مواد با سمیت زیاد طبقه بندی می شوند. اگر این مقدار از یک میلی گرم در لیتر بیشتر و از ۱۰۰ میلی گرم در لیتر کمتر باشد از مواد با سمیت متوسط و در صورتیکه مقدار EC_{50} بیش از ۱۰۰ میلی گرم درلیتر باشد از مواد با سمیت کم برای آبزیان محسوب خواهند شد(Carty *etal*, 1998). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی بترتیب با EC_{50} ، ۱۷۲/۵۸و ۴۳۷/۶۲ میلی گرم در لیتر در دسته مواد با سمیت کم طبقه بندی شده و جهت جایگزینی با مواد شیمیایی مناسب می باشند.

تعیین شاخص درمانی(Therapeutic index) می تواند مبنایی برای قضاوت سلامت مواد محسوب گردد (ابطحی و همکاران، ۱۳۸۴). نتایج حاصل نشان داد که شاخص درمانی در خصوص عصاره هیدرو الکلی سیر معادل ۷۳/۱۵ بوده که نسبت به عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی با میزان ۲۲/۶۹ از مقدار بزرگتری برخوردار بوده و بالطبع با توجه به تعریف این شاخص، از سلامتی بیشتری برخوردار است. این در حالیست که در مطالعه انجام شده توسط ابطحی و همکاران در سال ۱۳۸۴ شاخص درمانی فرمالین، سبز مالاشیت و پرمنگنات پتاسیم بترتیب ۰/۹۹ ، ۲/۲۵ و ۵/۳۷ اعلام گردید که با توجه به نتایج بدست آمده می توان به سلامتی بسیار بالاتر عصاره های گیاهی مورد استفاده در این تحقیق و جایگزینی این گیاهان دارویی با مواد شیمیایی تأکید نمود.

پیشنهادها

۱- نظر به اهمیت توجه به مبحث بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری و نظر به توسعه پرورش ماهیان خاویاری در کشور و لزوم جایگزینی گیاهان دارویی بومی کشور به جای داروهای شیمیایی استفاده از عصاره های سیر و آویشن شیرازی با توجه به نداشتن آثار سوء زیست محیطی و انسانی در کنترل انگل تک یاخته ای خارجی شایع (تریکودینا) در بچه تاسماهی ایرانی توصیه می گردد.

۲- با توجه به اینکه غلظت مؤثره عصاره هیدروالکلی سیردر کاهش جمعیت انگلی تریکودینا بمیزان ۵۰ درصد (EC_{50}) در دوز ۱۷۲/۵۸ میلی گرم در لیتر طی یکساعت بدست آمد، لذا براساس نتایج این تحقیق می توان در زمانی کمتر از سه ساعت شاهد حذف کامل انگل مذکور از بچه تاسماهیان ایرانی بود.

۳- در صورت استفاده از عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی می توان با استفاده از دوز ۴۳۷/۶۲ میلی گرم در لیتر به مدت یک ساعت، نیمی از جمعیت انگل تریکودینا از سطح پوست و آبشش بچه تاسماهیان ایرانی حذف خواهد گردید، این در حالیست که دوز مذکور توانایی حذف کامل این تک یاخته ای را در مدت زمان کمتر از پنج ساعت خواهد داشت.

۴- با توجه به تأثیر گذاری خوب عصاره های مذکور در کنترل انگل تریکودینا، پیشنهاد می گردد که مطالعات بیشتری در خصوص استفاده از این دو عصاره در حمام های طولانی مدت صورت گرفته و نتایج آن با مطالعه حاضر مقایسه گردد.

۵- ضروری است با توجه به تفاوتهای بین گونه ای تاسماهیان نسبت به بررسی تأثیرات مقادیر مختلف عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی بر فاکتورهای ایمنی در کنترل آلودگی انگلی خارجی سایر گونه های ماهیان خاویاری نیز تحقیقات جامعی صورت پذیرد.

۶- با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق در خصوص اثرات مثبت ضد انگلی عصاره های مذکور که برای اولین بار در سطح ملی و بین المللی بر روی انگلهای خارجی تک یاخته شایع در بچه تاسماهی ایرانی صورت پذیرفت، توصیه می گردد در خصوص تأثیرات برخی از مهمترین گونه های بومی گیاهان دارویی کشور برروی سایر گونه های ماهیان صورت پذیرد.

۷- توصیه می گردد با توجه به تنوع زیاد گونه های گیاهی خصوصا گیاهان دارویی در اکثر نقاط کشور، تأثیر گیاهان مذکور بر روی عوامل انگلی داخلی ماهیان نیز مورد بررسی و مطالعه قرار گیرد.

بخش چهارم:

بررسی تاثیر عصاره های سیر(*Allium sativum*) و آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر روی باکتری آئروموناس هیدروفیلا در بچه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۲۷۱
۱- مقدمه ۲۷۳
۲- مواد و روشها ۲۷۹
۳- نتایج ۲۹۲
۴- بحث و نتیجه گیری ۳۳۰
پیشنهادها ۳۳۶

چکیده

این تحقیق که به منظور بررسی تاثیر عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی بر روی باکتری آئروموناس هیدروفیلا در بچه تاسماهی ایرانی صورت پذیرفت نسبت به جداسازی و شناسایی باکتری مورد بررسی ،تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره های سیر و آویشن شیرازی،تعیین غلظتهای کشنده عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهی ایرانی و نیز بررسی اثر بخشی و تعیین دوزهای تأثیرگذار عصاره های مذکور بر روی باکتری آئروموناس هیدروفیلا در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) و کارگاهی (in vivo) اقدام گردید. با توجه به عدم وجود باکتری آئروموناس هیدروفیلا شناسایی شده توسط آزمایشات مولکولی (کددار) درکشور در این مطالعه باکتری مذکور از ماهیان خاویاری مشکوک به بیماری آئروموناز‌یس جداسازی و پس از شناسایی توسط آزمایشات بیوشمیایی نسبت به استخراج DNA و انجام آزمایشات مولکولی اقدام و نتایج توسط NSBI تایید و باکتری آئروموناس هیدروفیلا با کد Gen Bank JX987090 در NSBI ثبت گردید. بر اساس مطالعات صورت گرفته در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) در این تحقیق حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره های سیر و آویشن شیرازی به ترتیب ۱mg/ml و۰/۲۵ mg/ml و حداقل غلظت کشندگی(MBC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره های مذکور به ترتیب۲mg/ml و ۰/۵ mg/ml تعیین گردید.

مطالعات تعیین غلظتهای نیمه کشنده (LC50) عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهی ایرانی نشان داد که این مقدار طی ۹۶ ساعت معادل ۷۶۶/۶۵ میلی گرم در لیتر و در مدت زمان یک ساعت به میزان ۹۹۳۳/۴۴ میلی گرم در لیتر بوده است. همچنین بررسی غلظتهای نیمه کشنده (LC50) عصاره هیدروالکلی سیر طی مدت ۹۶ ساعت معادل ۱۲۷۹/۹۷ میلی گرم در لیتر و در مدت زمان یک ساعت ۱۲۶۲۴/۰۸ میلی گرم در لیتر تعیین گردید. در بررسی گلبولهای سفید خون، اختلاف معنی دار آماری در میزان لنفوسیت و نیز نوتروفیل در تیمارهای مختلف مشاهده گردید($P<0.05$). ولی میزان مونوسیت و نیز ائوزینوفیل بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی دار آماری نشان نداد ($P>0.05$).

پس از انجام مطالعات تعیین غلظتهای نیمه کشنده عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی و با توجه به نتایج بدست آمده نسبت به انجام مطالعات تعیین غلظتهای تأثیرگذار عصاره های مذکور بر روی باکتری آئروموناس هیدروفیلا اقدام گردید. در این بررسی محدوده غلظتهای ۴۰۰ تا ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی برای تیمار تاس ماهیان ایرانی آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا از طریق تزریق داخل صفاقی تعیین گردید. بر اساس نتایج حاصل غلظت موثر این عصاره طی مدت یکساعت حمام برابر ۸۰۰ میلی گرم در لیتر تعیین گردید. بمنظور تعیین غلظت مؤثره عصاره هیدروالکلی سیر بر روی باکتری مذکور

در تاسماهیان ایرانی محدوده غلظت ۶۰۰ تا ۱۲۰۰میلی گرم در لیتر تعیین و غلظت موثر این عصاره طی مدت یکساعت حمام برابر ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر محاسبه شد.

بررسی تصاویر تهیه شده از مقاطع بافتی آبشش، کبد و پوست بچه تاسماهیان ایرانی که تحت تأثیر غلظتهای مختلف عصاره هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی در آزمایش مربوط به تعیین غلظتهای کشنده قرار داشتند، برخی از آسیب های میکروسکوپیک نظیر پرخونی، چسبندگی در رشته های آبششی، نکروز سلولی، وجود رنگدانه های ملانین رشته های اولیه در آبشش، عوارضی نظیر تورم ابری در هپاتوسیتها ، نکروزسلولی، پرخونی، افزایش رنگدانه های ملانین و مراکز ملانو ماکروفاژها در کبد و نیز تغییراتی نظیر پرخونی اتساع فضای گلومرولی و مسدود شدن فضای بومن، خونریزی، نکروز سلولی، تورم ابری وهیپرتروفی را در کلیه نشان دادند.

۱-مقدمه

کاهش روز افزون ذخایر ماهیان خاویاری لزوم تکثیر مصنوعی ماهیان مذکور و نیز پرورش تمام دوره ای آنها را اجتناب ناپذیر نموده است. از مهمترین عوامل تهدید کننده پرورش متراکم ماهیان از جمله ماهیان خاویاری آلودگی آنها به عوامل بیماریزا و در نتیجه بروز تلفات در آنها می باشد. در میان عوامل بیماریزای تهدید کننده تاسماهیان باکتری آئروموناس هیدروفیلا از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد بطوریکه بر اساس بررسی های جامع صورت گرفته (پروژه های بررسی کمی و کیفی بچه ماهیان خاویاری از مرحله تکثیر تا رهاکرد طی سالهای ۱۳۷۹الی ۱۳۸۲ و نیز طرح ملی بررسی وضعیت بهداشتی کارگاههای تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری طی سالهای ۱۳۸۴الی ۱۳۸۸) باکتری آئروموناس هیدروفیلا می تواند در طی مراحل مختلف پرورش، ماهیان خاویاری را آلوده نموده و بر اساس شدت آلودگی و سن ماهیان مبتلا منجر به بروز علائم کلینیکی متفاوت و حتی تلفات گردد. با توجه به این امر ضروری است به منظور درمان ماهیان مبتلا به بیماری آئروموناز یس و جلوگیری از بروز تلفات در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری با استفاده از مواد مناسب اقدام گردد. با توجه به مشکلات متعدد استفاده از آنتی بیوتیکها و مواد ضد عفونی کننده شیمیایی به منظور کنترل عوامل باکتریایی از جمله باکتری آئروموناس هیدروفیلا در آبزیان مانند ایجاد آلودگی های زیست محیطی و نیز تاثیرات سوء بر مصرف کنندگان (ایجاد مقاومتهای دارویی و...) لزوم جایگزینی مواد مذکور با موادی با ماهیت طبیعی مانند گیاهان دارویی را در پزشکی و دامپزشکی از جمله در بهداشت و بیماریهای آبزیان از اولویت های تحقیقاتی قرارداده است. با توجه به این مهم این پژوهش با هدف بررسی تاثیرات عصاره های سیر و آویشن شیرازی بر باکتری آئروموناس هیدروفیلا در تاس ماهی ایرانی انجام گردید.

۱-۱- بیماری باکتریایی آئروموناز یس

بیماری باکتریایی آئروموناز یس درنتیجه تاثیر آئروموناسهای متحرک شامل آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) ، آئروموناس کاویا (*Aeromonas caviae*) و آئروموناس سوبریا (*Aeromonas sobria*) و گونه غیرمتحرک آئروموناس سالمونیسیدا ایجاد می گردد. آئروموناس های متحرک عامل سپتی سمی هموراژیک در ماهیان آب شیرین بوده این باکتری ها بی هوازی اختیاری ،گرم منفی، غیر هاگ زا، متحرک می باشند. آئروموناسهای متحرک از جمله میکروفلورهای جانوران آبزی می باشند و ممکن است در جانوران خون سرد، خون گرم وحتی انسان بیماریزا باشند اما آئروموناس سالمونیسیدا یک پاتوزن اجباری ماهی می باشد (سلطانی،۱۳۷۵). باکتری آئروموناس هایدروفیلا برای اولین بار در سال 1891 توسط Sanarelli جدا گردید که آنرا باسیلوس هیدروفیلوس فوسکوس نامید (سلطانی،۱۳۷۵). بر اساس مطالعات جدید انجام شده آئروموناس هیدروفیلا می تواند جزئی از فلور میکروبی لوله گوارش ماهیان محسوب شود که در ماهیان مختلف از جمله تاسماهیان در سنین مختلف که معمولا در اثر عوامل مختلف دچار استرس گردیده و یا توسط عوامل بیماریزای

مانند ویروس ها، انگل ها و سایر باکتریها مورد تهاجم قرار می گیرند بیماری آئرومونازیس را ایجاد نماید(مخیر، ۱۳۸۵) . عوامل مستعد کننده بیماری آئرومونازیس شامل دمای بالا، تراکم، آلودگی با مواد آلی و کمبود اکسیژن بوده و ماهیان مبتلا به بیماری آئرومونازیس تیره رنگ شده و بر روی بدن و باله های شنای آنها به ویژه در سطح شکمی و نیز در قسمتهای سر و دهان خونریزی ها یا هموراژی های نامنظم قرمز ظاهر می شود(مخیر، ۱۳۸۵). بروز سپتی سمی هموراژیک را می توان از مهمترین تاثیرات باکتری های آئروموناس به حساب آورد. خونریزی های ایجاد شده در اثر آئروموناسهای متحرک ناشی از تاثیر همولیزین محلول می باشد که ممکن است موجب جراحات پوستی اولسراتیو گردد (سلطانی،۱۳۷۵). علائم کلینیکی بیماری آئرومونازیس می تواند به صورت یک پرخونی سطحی گسترده در ناحیه وسیعی از بدن بیشتر همراه با نکروز باله ها یا دم تا یک اولسر وسیع روی بخش چشمگیری از سطوح جانبی تا ناحیه پشتی متغییر باشد(سلطانی،۱۳۷۵).

بیماری آئرومونازیس می تواند به صورت های فوق حاد با علائم کم، حاد با علائم کلینیکی ذکر شده و یا به فرم مزمن با زخم های بزرگی که برای مدت طولانی وجود دارند ظاهر گردد. در کالبد شکافی ماهیان مبتلا به آئرومونازیس در بیشتر موارد پرخونی احشاء همراه با خونریزی خونریزی روی مزانتر ها و پرده صفاقی مشاهده می گردد که در حالتهای شدید بیماری ممکن است کل احشاء به رنگ قرمز درخشان بوده و چسبندگی فیبرینی ایجاد گردد همچنین طحال از نظر ماکروسکوپیک بزرگ، گرد و قرمز بوده و کلیه ها بزرگ و اغلب دچار نکروز گردیده و عضلات ممکن است دچار نکروز موضعی شوند (سلطانی،۱۳۷۵). بیماری اغلب با ادمای شکمی یا آب آوردگی ارتباط دارد . آئروموناسهای متحرک از نظر درون گونه ای و بین گونه ای در آسیب سازی یا قابلیت ایجاد بیماری با یکدیگر متفاوتند.شرایط آسیب شناختی منصوب به اعضاء کمپلکس آئروموناسهای متحرک می تواند شامل زخم های پوستی، خوردگی دم یا باله، زخم های چشمی، Erythrodermatitis، مسمومیت خونی همراه با خون ریزی، بیماری زخم سرخ و بیماری بیرون افتادگی پولک ها باشد.هنگامی که علائم بالینی عفونت وجود داشته باشد، ممکن است در ماهی بیرون زدگی چشم از حدقه، سرخی پوست و انباشتگی مایع در کیسه های پولک ایجاد گردد. ممکن است شکم در اثر Edem متورم گردد. و فلس ها از پوست به صورت برجسته مشاهده شوند. ممکن است آبشش ها دچار خون ریزی گردند و زخم هایی بر روی پوست ایجاد گردد(سلطانی ،۱۳۷۵).

۲-۱- کنترل و درمان بیماری آئرومونازیس در ماهیان

با توجه به خسارات و تلفات گسترده ناشی از آلودگی های ماهی ها از جمله تاس ماهیان به باکتریهای گروه آئروموناس خصوصا آئروموناس هیدرفیلا در مرکز تکثیر و پرورش ضروری است نسبت به کنترل و درمان ماهیان آلوده به باکتری های گروه آئروموناس اقدام گردد.

درمان اختصاصی بیماری آئرومونیازیس بدون حذف عوامل اولیه ایجاد کننده بیماری(عوامل استرس زا و نیز عوامل بیماریزای ویروسی، انگلی و باکتریایی) از ارزش اندکی برخوردار است(سلطانی،۱۳۷۵).اصلاح و بهبود شرایط محیطی و از بین بردن عوامل استرس زا بویژه کاهش مواد آلی آب پرورشی و نیز درجه حرارت در صورت امکان در تقلیل ضایعات ناشی از بیماری آئرومونیازیس می تواند موثر باشد(مخیر، ۱۳۸۵). به منظور کنترل و درمان بیماری آئرومونازیس در ماهی از روشهای مختلفی استفاد می گردد.

واکسیناسیون یک روش انتخابی جهت پیشگیری از بروز بیماری می باشد. با توجه به تنوع آنتی ژنتیکی در میان آئروموناسهای متحرک در صورت ایجاد مقاومت در برابر یک گونه خاص از این باکتری ها در صورت بکارگیری واکسن احتمال ایجاد محافظت در برابر سایر گونه ها وجود ندارد.در حال حاضر از مواد شیمیایی مختلفی جهت از بین بردن باکتری های آئروموناس استفاده می شود. سولفات مس ۱ در ۲ هزار به مدت ۱ تا ۲ دقیقه جهت از بین بردن باکتری های آئروموناس استفاده می گردد . در خصوص به کار بردن فرمالین و مالاشیت سبز نتایج خوبی به همراه داشته است . می توان یک لیتر محلول سبز مالاشیت ۲/۵ درصد را که با یک لیتر فرمالین مخلوط شده باشد به کار برد . همچنین بر اساس نتایج بررسی های انجام شده به کار بردن محلول ۱ در ۱۰ هزار کلرور فمرول یا کلرور بنزتونیک را توصیه شده است.

استفاده از انواع آنتی بیو تیکها همانند درمان انواع بیماریهای باکتریایی می تواند در نابودی باکتریهای آئروموناس استفاده شود. مصرف اکسی تتراسایکلین در غذای ماهیان پرورشی به نسبت ۵۵ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم ماهی در روز برای مدت ۱۰ روز می تواندمفید واقع شود.درمان با سولفامرازین بدین ترتیب انجام می گیرد که در سه روز متوالی روزانه به میزان ۲۶۴ میلی گرم به هر کیلوگرم ماهی به غذا اضافه می شود و سپس درمان به میزان ۱۵۴ میلی گرم به ازاء هر کلیوگرم ماهی در روز به مدت ۱۱ روز ادامه می یابد(آذری تاکامی، ۱۳۷۶).

علاوه بر تاثیر واکسن ها ،مواد ضد عفونی کننده شیمیایی و آنتی بیوتیکها در کنترل و نابودی باکتری آئروموناس هیدروفیلا از سایر مواد در کنترل و نابودی باکتری آئروموناس هیدروفیلا استفاده می شود.امروزه استفاده از فن آوری نانو ذرات با توجه به کاربرد وسیع آن جهت نابودی عوامل میکروبی مورد توجه قرارگرفته است که از جمله می توان به کاربرد نانو ذرات نقره در کنترل و نابودی عوامل باکتریایی اشاره نمود.استفاده از فرآورده های برخی از انواع جلبها و گیاهان دارویی از دیگر روشهایی می باشند که به منظور نابودی عوامل باکتریایی مورد توجه می باشند. با توجه به توسعه پرورش گونه های مختلف آبزیان بروز انواع بیماریها از جمله بیماریهای ناشی از عوامل باکتریایی مانند باکتری آئروموناس هیدروفیلا در ماهیان مزارع پرورشی گسترش یافته است از سویی دیگر با توجه به مشکلات ناشی از استفاده از مواد ضد عفونی کننده شیمیایی و نیز انواع آنتی بیوتیکها جهت درمان بیماریهای باکتریایی از جمله بیماری آئروموناسیس مانند اثرات سوء زیست محیطی و نیز عوارض سوء این مواد بر روی انسان از جمله اثرات سمی، واکنش های ازدیاد حساسیت، بروز عفونتهای ثانویه،

اختلالات در سوخت و ساز و نیز ایجاد مقاومتهای باکتریایی‌در نتیجه استفاده بی رویه از آنتی بیوتیکها خصوصا انواعی که مصرف مشترک انسانی دارند،زمینه ساز ایجاد ،به خطر افتادن امنیت غذایی و بهداشت عمومی می شوند. این نحوه استفاده از آنتی بیوتیکها با عث ایجاد سویه های مقاوم باکتریایی شده و مشکلات زیادی به همراه می آورد(شریف روحانی،۱۳۸۴).با توجه به مشکلات مذکور بررسی طی سالیان اخیراستفاده از گیاهان دارویی جهت کنترل و نابودی عوامل باکتریایی بیماریزا از جمله باکتری آئروموناس هیدروفیلا در آبزیان مورد توجه قرار گرفته است .

۳-۱- تاثیر گیاه دارویی آویشن شیرازی و سیر در کنترل و نابودی عوامل باکتریایی

«آویشن» از گیاهان تیره لابیاته با نام علمی *Zataria multiflora* یکی از شناخته شده ترین گیاهان دارویی در طب سنتی ایران و اروپا می باشد. این گیاه علفی معطر که طول آن حدود ۴۰ سانتی متر است دارای خواص دارویی بسیاری است. روغن سفید آویشن، تنتور و عصاره مایع آن بعنوان ترکیبات معطر در فراورده های غذایی کاربرد دارد. قسمت های درمانی این گیاه سرشاخه ها و برگهای خشک شده آن می باشد. در طب سنتی از این گیاه بعنوان ضد اسپاسم، درمان سیاه سرفه، برونشیت، عفونت ریه، سرماخوردگی، آنفولانزا و ضد نفخ استفاده می شود. دم کرده آن نیز برای درمان عفونت گوش میانی، نفخ و تهوع استفاده می شود. عصاره آویشن بنام «تیمول» برای درمان آسم کاربرد دارد. ضماد آویشن برای نیش و گزیدگی حشرات مؤثر است. روغن آن سمی است و مصرف خوراکی ندارد. برای درمان آفت و عفونت های قارچی حلق و دهان نیز استفاده می شود.فرآورده های دارویی مختلفی از این گیاه ساخته شده و بطور گسترده مورد مصرف بیماران واقع می شود. شربت توسیان، قطره توسیگل، قطره توسیوین، قطره تیم آرتا و شربت تیمکس از اشکال دارویی آویشن می باشد که عمدتاً بعنوان ضد سرفه و خلط آور مصرف می شوند. از آویشن خواص ضدباکتریایی نیز گزارش شده است. استفاده از روغن این ماده در محیط کشت نشان دهنده اثر باکتریسیدال بیشتر نسبت به آمپی سیلین علیه اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس می باشد (Rasooli & Rezvani , 2001). محسن زاده وهمکاران در سال ۱۳۸۲ طی بررسی خواص ضد باکتریایی غلظتهای مختلف اسانس تعدادی از گیاهان دارویی کشور بیان نمودند که اسانس آویشن بیشترین اثر ضد باکتریایی با روشMIC روی باکتریهایی اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و سود ومونـاس ائروژینوزا را داشته است. نتایج حاصل از آزمایشات فیتوشیمی نشان دهنده وجود الکالوئید، ساپونین، فلاونوئید و تانن در آویشن می باشد. در خصوص اثرات ضد انگلی آویشن شیرازی مطالعه بسیار کمی صورت گرفته است. شیرانی بیدآبادی در سال ۱۳۸۷، تحقیقی تحت عنوان تأثیر مخلوط عصاره های هیدروالکلی آویشن شیرازی و بومادران و بره موم در درمان انگل لیشمانیوز جلدی روستایی را در مدل حیوانی اجرا نموده است. در سال ۱۹۸۵ مقایسه ای بین اثر ضد قارچی اسانس آویشن و نیستاتین صورت گرفته است و نتیجه گرفته شده که آویشن اثر قویتری نسبت به نیستاتین روی قارچهای کاندیدا البیکنس،

آسپرژیلوس فلاووس و تریکوفایتون منتاگریفایتیس دارد. در سال ۱۹۸۰ در گونه دیگری از آویشن که دارای مواد مؤثره تیمول، کارواکرول و پارایتیس بوده است اثرات قویتری نسبت به نیستاتین روی آسپرژیلوس فومیگاتوس مشاهده شده است (جعفرزاده خسروی ، ۱۳۶۶).

سوابق تحقیق در زمینه تأثیر اسانس آویشن در آبزیان در داخل کشور منحصر به چندین تحقیق می باشد که از آن جمله می توان به پروژه پایان نامه دکترای تخصصی شریف روحانی در سال۱۳۸۳، با عنوان بررسی کاربرد اسانسهای گیاهی در کنترل آلودگیهای قارچی تخم قزل آلا اشاره نمود در این تحقیق چندین اسانس گیاهی از جمله آویشن در بررسی آزمایشگاهی (in vitro) با تکنیک حداقل غلظت مهار کنندگی MIC و کارگاهی (in vivo) مورد بررسی تجربی قرار گرفتند. از دیگر تحقیقات صورت گرفته در ارتباط با تأثیر آویشن شیرازی در آبزیان در ایران می توان به مطالعات انجام شده توسط آهنگرزاده و همکاران در سال ۱۳۸۶ تحت عنوان بررسی اثر آویشن شیرازی برروی تعداد کل باکتری و قارچ در مرحله انکوباسیون تخم ماهی کپور، علیشاهی و همکاران در سال ۱۳۸۹ با عنوان مطالعه اثرات ضد باکتریایی برخی عصاره های گیاهی بر باکتری آئروموناس هیدروفیلا ، سلطانی و همکاران در سال ۱۳۸۸ تحت عنوان ارزیابی اثرات اسانس آویشن شیرازی بر میزان تفریخ تخم قزل آلای رنگین کمان و درصد بقای لارو آن در مقایسه با آب اکسیژنه و مالاشیت گرین، شریف روحانی و همکاران در سال ۲۰۱۳ تحت عنوان بررسی تأثیر خوراکی مقادیر مختلف اسانس آویشن شیرازی بر روی برخی از فاکتورهای خونی و سرمی تاسماهی ایرانی اشاره نمود.

سیر با نام علمی *Allium sativum* و نام لاتین Garlic، گیاهی است دو ساله با پیازی مرکب که از قدیم الایام تا کنون به عنوان یکی از گیاهان مهم دارویی و چاشنی غذایی به کار برده می شود. تا سال ۲۰۰۶، حداقل ۲۶۴۰ مورد مطالعه علمی از جنبه های مختلف شیمیایی، فارماکولوژی، بالینی و اپیدمیولوژیکی بر روی سیر انجام شده است. مطالعات فارماکولوژی و بالینی بر روی سیر در زمینه اثرات ضد میکروبی، اثرات ضد سرطان، کاهش میزان قند خون، تحریک سیستم ایمنی، اثرات ضد التهابی و آنتی اکسیدانی انجام شده اند. مهمترین ترکیب سیر که خاصیت آنتی بیوتیکی دارد آلیسین است. آلیسین همان جزئی از سیر است که سبب تندی و طعم گزنده و خاصیت آنتی بیوتیکی سیر می شود. آلیسین یک ماده دارویی قدرتمند است که در برابر باکتریها، ویروسها، کپکها، مخمرها و ارگانیسم های دیگر مقاومت می کند. آلیسین ماده شکننده ای است و در درجه حرارت اتاق در مدت ۲۴ ساعت ترکیبهای دیگری می سازد. در یک مطالعه، سیر بعنوان یک ماده محرک رشد و بهبود دهنده تغذیه و کارایی غذا در ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) مورد استفاده قرار گرفته است. (Diab *etal*, 2002: Shalaby *etal*, 2006). مطالعات متعددی مبنی بر خواص ضد میکروبی سیر تازه یا عصاره فریز شده و خشک شده سیر بصورت پودر بر ضد باکتری های بیماریزای مختلف و نیز اثر آن بر بیماریهای قارچی (Adetumbi *etal*, 1986) و ویروس های بیماریزا انجام شده است (Weber *etal*, 1992). Han و همکاران در سال ۱۹۹۵ اعلام کردند که خواص آنتی بیوتیکی یک میلی گرم آلیسین، معادل IU ۱۵ پنی سیلین می باشد. سیر

خرد یا له شده همراه سایر عصاره های گیاهی آثار پیشگیری کننده مناسبی بر علیه عوامل بیماریزای ماهی نظیر باکتری و قارچ داشته باشد و در بهبود ایمنی ماهی نیز مؤثر باشد (Adetumbi *etal*, 1986; Corzo-Martinez *etal*, 2007; Ress *etal*, 1993). در مطالعات انسانی نقش سیر در کاهش کلسترول کل، لیپوپروتئین کم چگال خون (LDL-C) و نیز کاهش فشار خون اثبات گردید(Adler, A.J. and Holub, B.J., 1997). همچنین تأثیر مصرف پودر سیر بر کاهش تجمع چربی ها در کبد، افزایش میزان اسیدهای صفراوی دفعی و نیز افزایش میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی، بهبود رشد، تغذیه، بقاء و افزایش پاسخ های ایمنی در همستر، ماهی و خوک (در مدلهای حیوانی) بررسیهایی صورت گرفته است (Diab *etal*, 2002; Dudek *etal*, 2006; Yaoling *etal*, 1998). در ارتباط با سیستم ایمنی محققین نشان دادند که ترکیب S-allyl cystein موجود در سیر خرد شده، از متابولیسم سلولهای سرطانی جلوگیری کرده و باعث بهبود پاسخهای ایمنی می شود (Sumiyoshi, 1997). در مطالعه ای بررسی اثر اسانس سیر به عنوان یک ماده محرک سیستم ایمنی، بر شاخصهای هماتولوژی و ایمنی سلولی در فیل ماهی جوان پرورشی انجام گردید (تنگستانی و همکاران، ۱۳۹۰). همچنین در ارتباط با تأثیرات ضد انگلی سیر در آبزیان میتوان به مطالعات Madsen و همکاران در سال ۲۰۰۰ در ارتباط با تأثیر سیر در کنترل آلودگی مارماهی (*Anguilla anguilla*) به انگل تریکودینا اشاره نمود. ضمناً Chiamanat و همکاران در سال ۲۰۰۵ در تحقیقی کوتاه اثر سیر خام را بمنظور حذف انگل تک یاخته ای تریکودینا در بچه ماهیان تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) بررسی نمودند. در سال ۲۰۰۳، Buchmann و همکاران مطالعه ای در خصوص مقایسه اثربخشی پرکربنات سدیم و عصاره سیر بمنظور از بین بردن ترونت و توموسیست انگل ایک انجام دادند. Soko وBarker نیز در سال ۲۰۰۵ طی تحقیقی، اثر بخشی سیر له شده را بمنظور درمان ایک (*Ichthyophthirius multifiliis*) در ماهیان جوان تیلاپیا مورد مطالعه قراردادند. همچنین Bartolome و همکاران در سال ۲۰۰۷ در مطالعه ای اثرات افزودن عصاره الکلی سیر خام به غذای مولی سیاه (Black Molly) بمنظور پیشگیری از بیماری ایکتیوفتریازیس را بررسی نمودند.

٤-۱- اهداف تحقیق

این تحقیق به منظور دستیابی به اهداف ذیل صورت پذیرفت :

۱ـ بررسی اثربخشی عصاره های سیر و آویشن شیرازی در کنترل و نابودی باکتری آئروموناس هیدروفیلا

۲ـ تعیین مقادیر مناسب عصاره های مورد مطالعه به منظور مبارزه با باکتری آئروموناس هیدروفیلا در بچه تاسماهی

۳- معرفی موثرترین عصاره گیاهی از بین عصاره های گیاهی مورد بررسی به منظور جایگزینی با آنتی بیوتیکهای مورد استفاده برعلیه باکتری آئروموناس هیدروفیلا در بچه تاسماهی ایرانی

۲- مواد و روش کار

این تحقیق طی دو مرحله در موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر انجام گردید. درمرحله اول (سال ۱۳۹۰) نسبت به جداسازی و شناسایی باکتری آئروموناس هیدروفیلا از ماهیان مشکوک به بیماری آئروموناز یس و نیز تعیین حداقل غلظتهای مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MBC) عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی در باکتری آئروموناس هیدروفیلا اقدام گردید.

در مرحله دوم (سال ۱۳۹۱) پس از مشخص شدن نتایج سال اول، اقدام به تعیین غلظتهای مؤثره عصاره های مذکور در درمان تاسماهیان ایرانی آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا به روش تجربی و نیز بررسی تاثیرات هیستوپاتولوژی عصاره های مورد مطالعه بر روی ماهیان گروه های تیمار صورت پذیرفت .

۱-۲- مواد مورد استفاده

۱-۱-۲- مواد مصرفی

مواد مصرفی در این پروژه عبارتند از:

بچه تاسماهی ایرانی، عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی*، لام ، لامل، تیغ اسکالپل، پنبه، فرمالین، پارافین، بوئن، گزیلل، هماتوکسیلین، ائوزین، ۱- بوتانول، اتانول ، اسیداستیک، اسید پیکریک، پارچه تنظیف، سرم فیزیولوژی، هپارین، محلول رنگ آمیزی سلول‌های خونی گیمسا، محیط کشت Tryptic Soy Broth (TSB)،محیط کشت Tryptic Soy Agar (TSA) ، محیط کشتMueller Hinton Agar ،محیط کشت Mueller Hinton Broth ،باکتری آئروموناس هیدروفیلا ، پنبه ، اتانول ، پلیت استریل، دستکش ، آب مقطر، سرسمپلر ، سرنگ

۲-۱-۲-مواد غیر مصرفی

وسایل و تجهیزات بکار رفته در این پروژه عبارتند از:

ترازوی دیجیتال با دقت۰/۰۱ گرم ، میکروسکوپ نیکون 50i، لوپ آزمایشگاهی ، وان نیم تنی، وان دو تنی، اکسیژن متر دیجیتال ، pH متر دیجیتال ، ترمومتر دیجیتال، سطل پلاستیکی، سمپلر، بشر مدرج، استوانه مدرج، پوآر، پیپت مدرج، ظروف نمونه برداری، ساعت آزمایشگاهی، هود استریل لامینار،دستگاه انکوباتور Memert ، فور(آون)، انکوباتور یخچال دار، بشر، هیتر ، بالن ، بالن ژوژه، بن ماری تشتک های پلاستیکی، آکواریوم و متعلقات مربوطه، ساچوک، ظروف پتری،

* تهیه نمونه عصاره های سیر و آویشن شیرازی بمنظور بررسی کیفیت :

بمنظور تهیه عصاره های سیر و آویشن شیرازی تماسها و مکاتبات متعددی با شرکتهای فعال در این زمینه انجام گرفت. پس از اخذ نمونه ها میزان حلالیت عصاره ها در آب مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج بررسیها

و نیز نظر به دارا بودن استانداردهای بین المللی ISO 9001 ، ISO 14001 ، HACCP و IQnet (سازمان جهانی کیفیت) توسط شرکت کشت و صنعت و فرآوری گیاهان دارویی سها جیسا ، این شرکت بعنوان تأمین کننده عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی انتخاب گردید.

۲-۲- روش عصاره گیری و آزمایشات کمی و کیفی عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی:

عصاره گیری از گیاه آویشن شیرازی مورد استفاده در این مطالعه در شرکت فرآوری گیاهان دارویی سها جیسا بشرح ذیل صورت پذیرفت:

الف- روش عصاره گیری :

عصاره گیری به روش پرکولاسیون، با استفاده از اتانول ۵۵ درجه و در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد انجام گرفت. نسبت گیاه به حلال ۷ : ۱ تا ۱۰ : ۱ متغیر بوده که در این حالت از نسبت ۹ : ۱ استفاده شد. عصاره گیری به مدت ۴ تا ۵ ساعت انجام گرفت و پس از خاتمه عصاره گیری و فیلتراسیون، عصاره حاصله پاستوریزه گردید.

ب- روش و نتیجه آزمایشات کنترل کیفی :

۱-ب- آماده سازی محلول نمونه: ۲۰ میکرولیتر از عصاره، مستقیماً بر روی پلیت لکه گذاری گردید.

۲- ب- آماده سازی استاندارد: استاندارد تیمول با غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد (حجم مورد استفاده برای لکه گذاری ۲۰ میکرولیتر می باشد).

تهیه معرف وانیلین :

۳-وانیلین یک درصد اتانولی

۴-اسید سولفوریک ۵ درصد اتانولی

معرف فوق به دو صورت استفاده می شود، یا ابتدا محلول شماره یک اسپری می شود که پس از خشک شدن محلول شماره دو اسپری می گردد یا اینکه محلول یک و دو ابتدا مخلوط شده و سپس بر روی صفحه اسپری می گردد. نکته قابل توجه در این فرایند این است که معرف باید بصورت تازه مصرف گردد و آب نیز نداشته باشد.

روش کار:

پلیت را داخل تانک اشباع قرار داده پس از پیشروی حلال به اندازه مناسب، پلیت را خشک نموده، در حرارت ۱۰۰ درجه سانتیگراد یا در جریان هوای گرم، معرف وانیلین بر روی آن اسپری می شود. پس از این فرایند، مطابقت بین لکه ها در ناحیه مرئی قابل ملاحظه می باشد.

جدول ۱- آنالیز عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی تولید شده

SOHA JISSA Co. Plentation Industries & Processing of Medicinal Plants			
Doc.No.F.0439	Certificate of Analysis: ***Zataria multiflora***		Batch No.025
Test	**Method**	**Standard**	**Result**
Color	Organoleptic	Ligth brown-Dark brown	Brown
Odor	Organoleptic	Natural odor	Natural odor
Dry residue (100-105°c/2h)	BP2009	1.5% - 4%	2.95%
Density	BP2009	0.96 – 0.99	0.97
pH	BP2009	4.5 – 6.5	5.34
Alcohol contents	In house	10% - 20%	19%
Identification	TLC	Conform	Conform
Assay (Total phenolic as thymol)	DAB10	85 – 120 mg/100cc	111.1 mg/100cc
Total bacterial count	USP32	Max. 10^2 per ml	Max. 10^2 per ml
Total mould and yeasts	USP32	0	0
Staphylococcus aureus	USP32	Absent	Absent
Pseudomonas aeroginosa	USP32	Absent	Absent
Salmonella	USP32	Absent	Absent
E. coli	USP32	Absent	Absent

۳-۲- روش عصاره گیری و آزمایشات کیفی عصاره هیدروالکلی سیر

الف- روش عصاره گیری:

عصاره گیری به روش پرکولاسیون، در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد با محلول آب/ اتانول (۴۵/۵۵) انجام گرفت. نسبت گیاه به حلال ۵ : ۱ تا ۹ : ۱ متغیر بوده که در این حالت از نسبت ۸ : ۱ استفاده شد. عصاره گیری به مدت ۸ تا ۱۰ ساعت انجام گرفت و پس از خاتمه عصاره گیری، عملیات پاستوریزاسیون و فیلتراسیون انجام گردید.

ب- روش و نتیجه آزمایشات کنترل کیفی:

تست **TLC** : مقدار ۲۰ میلی لیتر عصاره را با ۵ تا ۲۰ میلی لیتر دی کلرومتان استخراج نموده و پس از عبور از روی محلول سولفات سدیم،در ظرف مناسب جمع آوری می نماییم. نمونه استخراج شده را بر روی بن ماری با دمای حداکثر۴۰ درجه سانتیگراد تغلیظ نموده،تا نمونه کاملاً خشک شود. نمونه حاصله را در۱ تا۲ میلی

لیترمتانول حل نموده و از این محلول برای لکه گذاری استفاده می نماییم.حجم مورد استفاده بمنظور لکه گذاری ۲۰ میکرولیتر می باشد.

آماده سازی معرف: ۰/۸ گرم وانیلین را در ۴۰ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال نموده و پس از افزودن ۲ میلی لیتر اسید سولفوریک، کاملاً مخلوط می نماییم.

روش کار:

پلیت لکه گذاری شده را داخل تانک اشباع قرار داده پس از پیشروی حلال به اندازه مناسب، صفحه TLC را خارج نموده و خشک می نماییم. بر روی پلیت گرم، معرف را اسپری نموده و سپس به مدت ۳ تا ۵ دقیقه در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد قرار می دهیم. در این حالت حضور آلیسین در نمونه (نزدیک به جبهه حلال)یا در جریان هوای گرم، معرف وانیلین بر روی آن اسپری می شود. پس از این فرایند، مطابقت بین لکه ها در ناحیه مرئی قابل ملاحظه می باشد.

جدول ۲– آنالیز عصاره هیدروالکلی سیر تولید شده

SOHA JISSA Co. Plentation Industries & Processing of Medicinal Plants			
Doc.No.F.0438	Certificate of Analysis: ***Allium sativum***		Batch No.025
Test	**Method**	**Standard**	**Result**
Color	Organoleptic	Ligth brown-Dark brown	Brown
Odor	Organoleptic	Natural odor	Natural odor
Dry residue (100-105°c/2h)	BP2009	2% - 4%	3.03%
Density	BP2009	0.85 – 1	0.98
pH	BP2009	5 – 7	6.36
Alcohol contents	In house	10% - 20%	19%
Identification	TLC	Conform	Conform
Assay	DAB10	85 – 120 mg/100cc	108.2 mg/100cc
Total bacterial count	USP32	Max. 10^2 per ml	Max. 10^2 per ml
Total mould and yeasts	USP32	0	0
Staphylococcus aureus	USP32	Absent	Absent
Pseudomonas aeroginosa	USP32	Absent	Absent
Salmonella	USP32	Absent	Absent
E. coli	USP32	Absent	Absent

بمنظور اجرای این پروژه تحقیقاتی و در راستای دستیابی به اهداف این تحقیق، آزمایشات مختلفی به صورت in vitro و in vivo به شرح ذیل اجرا گردید:

٤-۲- جداسازی و شناسایی باکتری آئروموناس هیدروفیلا

با توجه به ضرورت استفاده از باکتری آئروموناس هیدروفیلا کد دار (تایید شده توسط آزمایشات بیوشیمیایی و مولکولی) و عدم وجود باکتری کد دار مذکور در مراکز علمی و دانشگاهی کشور نسبت به جداسازی و شناسایی باکتری مورد بررسی از ماهیان مشکوک به بیماری آئروموناز یس طی مراحل ذیل اقدام گردید :

۱-٤-۲-نمونه برداری و جداسازی باکتری از ماهیان مشکوک به بیماری آئروموناز یس

به منظور جداسازی باکتری آئروموناس هیدروفیلا مورد استفاده در این مطالعه بر اساس گزارش بروز بیماری و تلفات در ماهیان خاویاری پرورشی در مراکز خصوصی و نیز در بخش تکثیر و پرورش موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر نسبت به بررسی علائم بالینی و کالبدگشایی ماهیان بیمار اقدام و ماهیان دارای علائم بیماری آئروموناز یس اشاره شده در مطالعات مختلف شامل خونریزی در سطح بدن و قاعده باله های شنا و دم بخصوص در زیر شکم ، پرولاپس مخرج ،آسیت، پرخونی و هموراژی در روده ها، کبد، کلیه و طحال و همچنین خونریزی روی مزانترها و پرده صفاقی به صورت زنده و با استفاده از کپسول هوا و ظروف پلی اتیلنی مخصوص حمل ماهی به آزمایشگاه بهداشت و بیماریهای موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر منتقل و براساس روشهای نمونه برداری جهت انجام باکتری شناسی Austin& Austin (1993) نسبت به نمونه برداری از آنها اقدام گردید. برای تهیه کشت خالص از اندامهای کبد، کلیه و طحال کشت باکتریایی در محیط های کشت از محیط کشت TSAاستفاده گردید سپس پلیت ها به مدت ۷۲- ۲۴ ساعت در گرمخانه ۲۴۰ سانتی گراد انکوبه شدند.

۲-٤-۲- شناسایی باکتری های جداسازی شده با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی و مولکولی

بعد از رشد باکتری بر روی محیط های کشت، نسبت به تهیه کشتهای ایزوله اقدم گردید تا کلنی های تک حاصل شود .از کلنی های تک حاصل لام های میکروسکوپی تهیه ونسبت به رنگ آمیزی آنها با استفاده از رنگ آمیزی گرم و بررسی با استفاده از میکروسکوپ نوری اقدام گردید. سپس نسبت به انجام تست های بیوشیمیایی و تهیه محیط های کشت افتراقی جهت بررسی تحرک ، اکسیداز، کاتالاز، ایندول، آرژنین، نیترات ، O/F، بتاگالاکتوزیداز ، فسفاتاز، هیدرولیزژلاتین، ساکاروز، مالتوز، گلوکز، فروکتوز، H_2S ،اوره، متیل رد، اورنیتین دکربوکسیلاز، اینوزیتول جهت تائید تشخیص باکتری جداسازی شده استفاده گردید.

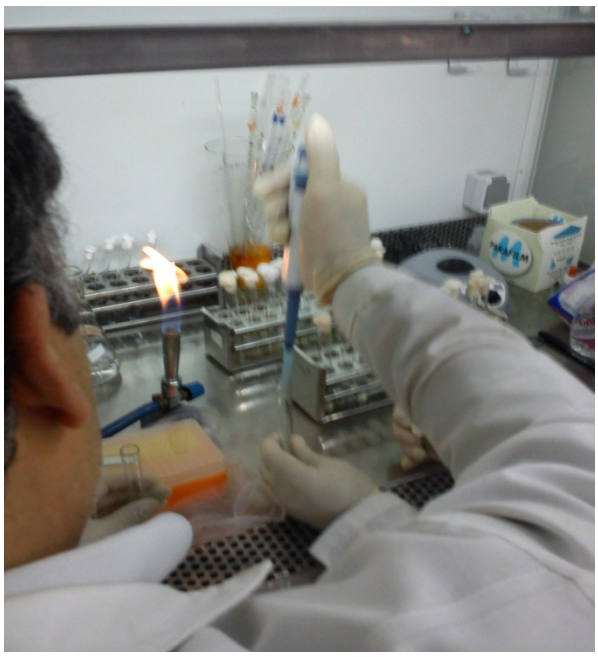
شکل۱-تهیه کشت های باکتریایی از نمونه های تهیه شده از ماهیان مشکوک به بیماری آئروموناز‌یس

۵-۲- تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد(MIC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره های سیر و آویشن شیرازی

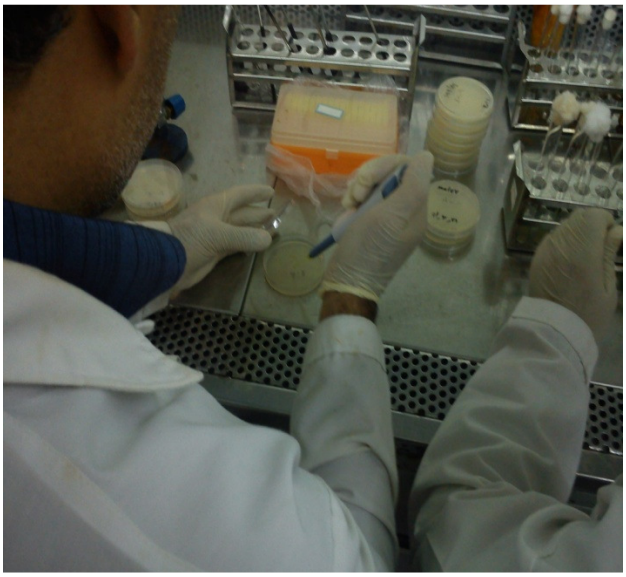
در این بررسی به منظور تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی رشد باکتری آئروموناس هیدروفیلا (MIC) توسط عصاره های سیر و آویشن شیرازی از روش رقت لوله ای (Vanden etal, 1991 و Sindambiwe etal, 1999) استفاده گردید.در این روش از برای تعیین MIC هر یک از عصاره های مورد بررسی یک سری ۱۰ تایی از لوله های آزمایش استفاده گردید. ۸ لوله برای آزمایش رقت های مختلف عصاره و یک لوله به عنوان کنترل مثبت و یک لوله به عنوان کنترل منفی بکار رفت. ابتدا باکتری آئروموناس هیدروفیلا که در محیط Tryptic Soy Broth (**TSB**) کشت داده شده بود در شرایط استریل به محیط کشت Mueller Hinton Broth در لوله های آزمایش اضافه گردید که میزان کدورت حاصل از باکتری با استاندارد (۰/۵)نیم مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ cfu/ml) تنظیم گردید سپس به لوله های حاوی محیط کشتMueller Hinton Broth همراه با باکتری آئروموناس هیدروفیلا عصاره سیر و آویشن شیرازی با غلظت های۰/۰۳۲ ، ۰/۰۶۳ ، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ ، ۰/۵ ، ۱ ، ۲ ، ۴ میلی گرم در میلی لیتر اضافه شد.(علیشاهی و همکاران، ۱۳۸۹) سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در انکوباسیون نگهداری گردید و بعد ازسپری شدن زمان فوق کدورت آنها بررسی وغلظت آخرین لوله ای که شفاف بود در مقایسه با شاهد به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

٦-۲- تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)باکتری آئروموناس عصاره های سیر و آویشن شیرازی

برای تعیین حداقل غلظت کشندگی(MBC) عصاره سیر و آویشن شیرازی که در محیط Mueller Hinton Agar مورد بررسی قرار گرفت از محتویات آن دسته از غلظت هایی که در محیط کشت Mueller Hinton Broth در آزمایش تعیینMIC فاقد کدورت بودند،به میزان۱ میلی لیتر برداشت و در محیط کشت Mueller Hinton Agar به روش خطی کشت داده شد سپس پلیت ها در درون انکوباتور در ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد، پس از بررسی نتایج کمترین غلظتی از عصاره که باکتری در آن رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت کشندگی(MBC) در نظر گرفته شد.



شکل۲-آزماشات تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)باکتری آئروموناس توسط هیدروفیلا عصاره های سیر و آویش شیرازی



شکل۳-آزماشات تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MBC)باکتری آئروموناس توسط هیدروفیلا عصاره های سیر و آویش شیرازی

۷-۲- اجرای آزمایشات تعیین غلظتهای کشنده (Lethal Concentration) :

بمنظور انجام آزمایشات تعیین غلظتهای کشنده عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی، بعد از طی مراحل آداپتاسیون، بچه تاسماهیان ایرانی به تشتکهای ۳۰ لیتری مجهز به سیستم هوادهی منتقل شدند. این آزمایشات بر اساس O.E.C.D(TRC,1984)[۲] صورت گرفت. در این روش(O.E.C.D) آزمایشات بصورت استاتیک (ثابت) انجام گردید. بدین معنی که محلول آزمایش در طی تست تغییر نکرده و میزان مرگ و میر ماهی برای آزمایشات تعیین غلظتهای کشنده طی ۴ روز و نیز یک ساعت ثبت گردید.

پس از ثبت میزان تلفات در رکوردگیری‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت (در آزمایشات ۹۶ ساعته)و نیز ۳۰ ، ۴۵ و ۶۰ دقیقه (در مطالعات یک ساعته) درصد تغییرات نسبت به شاهد تعیین و عدد پروبیت (Probit Value) آنها از جدول مخصوص (ANOVA) برداشت و به همراه لگاریتم غلظت‌های بکار رفته به روش Probit analysis (Finney , 1971) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و با تحصیل ضرایب a (عدد ثابت) و b (شیب خط) معادله رگرسیون (y = a + bx) تشکیل و سپس برای حل معادله و تعیین غلظت‌های کشنده (LC_{90} , LC_{50} , LC_{10}) عدد پروبیت آن از جدول ANOVA برداشته شده و به جای y در معادله قرار گرفت (Probit Value = a + b (LogC)) و با حل معادله و گرفتن Anti Log از LogC در معادله، مقایسه غلظت‌های کشنده LC10 , LC_{50} , LC_{90} برای زمان‌های مد نظر بدست می آید.

1-Organization Economic Cooperation Development

شکل٤- نمایی از تشتکها مورد استفاده در آزمایشات تعیین LC50

۱-۷-۲-غلظت های نیمه کشنده ۹٦ ساعته عصاره های هیدرو الکلی سیر و آویشن شیرازی :

پس از سپری شدن مراحل آداپتاسیون بچه تاسماهیان ایرانی در وان های فایبر گلاس و نیز عدم مشاهده تلفات در این ماهیان، نسبت به آغاز انجام مراحل تعیین غلظت نیمه کشنده (LC_{50}) عصاره های سیر و آویشن شیرازی اقدام گردید. با توجه به عدم وجود منابع اطلاعاتی در خصوص تعیین محدوده دامنه دوزهای قابل استفاده در آزمایشات LC50 این دو عصاره در ماهیان، نیاز به انجام آزمایش مقدماتی تعیین دامنه ای از دوزهای مناسب (Pre-LC50) بود که این کار طی دو مرحله و در هر مرحله با ۷ تیمار (هر تیمار با ۳ تکرار) که به روش لگاریتمی تعیین گردیده بودند اجرا گردید. در نهایت پس از تعیین دامنه دوزها، آزمایش اصلی LC50 با انتخاب ۷ تیمار (هر تیمار با ۳ تکرار) برای هریک از عصاره های هیدرو الکلی سیر و آویشن شیرازی به اجرا درآمد و نتایج کلیه مراحل جهت تجزیه و تحلیل ثبت گردید.

۲-۷-۲- غلظتهای نیمه کشنده یک ساعته عصاره های هیدرو الکلی سیر و آویشن شیرازی :

با توجه به اینکه در نظر است دوز ها و غلظتهای مؤثر این عصاره ها طی مدت یک ساعت تعیین گردد، بدین منظور لزوم تعیین اثرات غلظت های کشنده این عصاره ها طی مدت یک ساعت وجود داشت. لذا این امر با اجرای یک مرحله آزمایش مقدماتی تعیین دامنه ای از دوزهای مناسب (Pre-LC50) انجام گردید. پس از مشخص شدن نتایج در این مرحله ، آزمایش اصلی LC50 با انتخاب ۷ تیمار (هر تیمار با ۳ تکرار) که بروش لگاریتمی تعیین گردیده بودند برای هریک از عصاره های سیر و آویشن شیرازی به اجرا درآمد و اطلاعات کلیه مراحل جهت تجزیه و تحلیل نهایی ثبت گردید. برای انجام این مطالعات از تشتکهای ۳۰ لیتری که مجهز به سیستم هوادهی بودند استفاده گردید. سپس بچه ماهیان مورد آزمایش که جهت آداپتاسیون در وانهای

فایبرگلاس نگهداری می شدند،۲۴ ساعت قبل از آزمایش غذادهی آنها قطع گردید و سپس به تشتکها منتقل شدند. بطوریکه در هر تشتک ۱۰ عدد بچه تاسماهی ایرانی وارد گردید.

۸-۲- ایجاد آلودگی تجربی (Challenge) به باکتری آئروموناس هیدروفیلا در تاسماهی ایرانی

به منظور ایجاد آلودگی تجربی به باکتری آئروموناس هیدروفیلا در ماهیان گروه های شاهد و تیمار پس از تهیه کشت باکتری مذکور در محیط کشت TSB نسبت به تهیه غلظت 10^9 cfu/ml با استاندارد مک فارلند اقدام گردید. برای رسیدن به این غلظت و مقایسه آن با استاندارد مک فارلند باکتری سانتریوفوژ شده را با سمپلر برداشته و به لوله آزمایش حاوی سرم فیزیولوژی اضافه و با دستگاه ورتکس آنها را میکس نموده و این کار تا زمانی که کدورت با استاندارد مک فارلند برابر شود ادامه پیدا کرد. غلظت تهیه شده از باکتری آئروموناس هیدروفیلا به میزان ۰/۵ میلی لیتر به محوطه صفاقی ماهیان گروهای تیمار و شاهد تزریق (Omima A.E. Aboud 2010,) و ماهیان مذکور به وان های پلاستیکی ۱۰۰ لیتری منتقل گردیدند. ماهیان آلوده شده توسط باکتری مورد بررسی در این مطالعه تا ۹۶ ساعت از نظر تلفات و نیز علائم بیماری آئرومونازیس شامل بی حالی،خونریزی زیرجلدی در اطراف پلاک های استخوانی و انتهای باله ها خصوصا باله دمی،تیرگی پوست و غیره مورد بررسی قرار گرفتند.

۹-۲- تیمار ماهیان آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره سیر و آویشن شیرازی

بر اساس نتایج بدست آمده از آزمایشات LC_{50} یک ساعته و نتایج حاصله از(MIC) و (MBC) عصاره سیر و آویشن شیرازی نسبت به انتخاب غلظت هایی از عصاره های مورد بررسی با هدف تیمار ماهیان آلوده شده به باکتری آئروموناس اقدام گردید. در این مطالعه به منظور درمان ماهیان بیمار با استفاده از عصاره آویشن شیرازی غلظت های۸۰۰،۶۰۰،۴۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر و توسط عصاره سیر غلظت های۶۰۰،۸۰۰،۱۰۰۰ و ۱۲۰۰ میلی گرم در لیتر تهیه و بر اساس مقادیر مذکورگروه های تیمار و شاهد انتخاب و برای هر کدام از این گروه ها ۳ تکرار در نظر گرفته شد . پس از تعیین گروههای تیمار و شاهد نسبت به حمام ماهیان آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا (که علائم ظاهری بیماری آئرومونازیس در آنها ظاهر شده بود اقدام گردید) توسط غلظت های مختلف عصاره های سیر و آویشن شیرازی تهیه شده توسط شرکت سها جیسا روزانه بمدت یک ساعت در طی۷روز اقدام و تغییرات ظاهری و تلفات ماهیان در گروه های شاهد و تیمار روزانه ثبت گردید.

۱۰-۲- بررسی تاثیر عصاره های سیر و آویشن بر روی فاکتورهای خونی

۱-۱۰-۲- مطالعات هماتولوژی در بچه تاسماهیان ایرانی طی آزمایشات LC50 :

بمنظور ارزیابی تأثیر عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی بر روی فاکتورهای خونی در آزمایشات **LC50** و این مطالعه انجام پذیرفت. در این تحقیق با توجه به کوچک بودن سایز بچه تاسماهیان ایرانی مورد مطالعه (حدود ۳ گرم)، امکان خونگیری توسط سرنگ از طریق سیاهرگ دمی (caudal vein) امکانپذیر نبود لذا عملیات خونگیری از طریق قطع ساقه دمی انجام شد. با توجه به مقدار خون بسیار کم جمع آوری شده از هر ماهی، امکان انجام مطالعات سرولوژیک مهیا نگردید و فقط به شمارش افتراقی گلبولهای سفید (عامری مهابادی، ۱۳۷۸) بسنده شد.

۲-۱۰-۲- مطالعات هماتولوژی در ماهیان تیمار و شاهد

جهت بررسی تاثیر مقادیر مختلف عصاره های سیر و آویشن شیرازی بر فاکتورهای خونی تاسماهیان ایرانی تیمار شده با عصاره های مورد بررسی نسبت به خونگیری از ۳۰ درصد نمونه ها (۳ قطعه ماهی از هر تکرار) به وسیله سرنگ ۲ میلی لیتر از ساقه دمی اقدام و خون بدست آمده بلافاصله وارد اپندورف های حاوی ماده ضد انعقاد هپارین گردید. پس از تهیه نمونه های خون از ماهیان مورد بررسی اندازه گیری شاخص های خونی (CBC) به روش استاندارد (Voigt,۲۰۰۰) به شرح ذیل انجام گردید:

الف- شمارش افتراقی گلبول های سفید **Differential leucocyte count (leucogramme)**

برای شمارش تعداد لکوسیت ها یا مجموع یاخته های سفید خون در هر میلی متر مکعب لایه مناسبی از یاخته های خونی روی اسلایدهای میکروسکوپی به روش دولامی (یک لام به عنوان گسترش دهنده و لام دیگر که قطره خون روی آن قرار می گرفت به نام لام گسترش) تهیه شد. دو سر لام گسترش بین دو انگشت قرار داده شد، سپس یک قطره خون روی لام قرار گرفت و با دست دیگر لام گسترش دهنده با زاویه ۴۵ درجه، قطره خون به عقب کشیده و وقتی خون به لبه رسید لام گسترش دهنده به جلو رانده شد و گسترشی یکنواخت و پیوسته به وجود آمد. جهت جلوگیری از تغییر شکل یاخته ها و تأثیر منفی میکروارگانیسم ها پس از خشک شدن اسمیرها، بلافاصله اقدام به تثبیت آنها به وسیله متانول شد. در نهایت با استفاده از محلول رقیق ۱۰ درصد گیمسا (گیمسا به آب مقطر ۹ به ۱) لام ها به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه رنگ آمیزی شدند و پس از خشک شدن در هوای آزاد مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفته (Klontz, G.W., 1994) و درصد فراوانی هر گروه از لوکوسیتها (نوتروفیل، ائوزینوفیل، لنفوسیت و مونوسیت) برای هر نمونه تعیین گردید.

ب- تعیین غلظت هماتوکریت(**HCT**) :

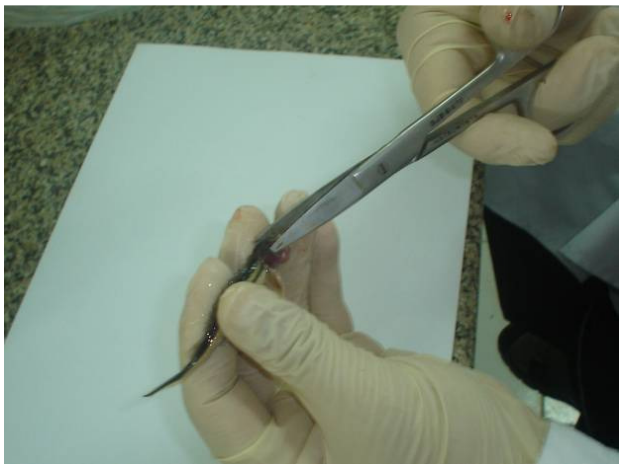
به منظور اندازه گیری مقادیر هماتوکریت پس از پر کردن لوله های موئینه هپارینه از نمونه های خون تهیه شده از ماهیان مورد بررسی و بستن آن با خمیر مخصوص نسبت به سانتریفیوژ آنها با سرعت حداقل ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه با استفاده از سانتریفیوژ میکروهماتوکریت اقدام و مقدار حجم سلولی یا هماتوکریت (HCT) هر نمونه محاسبه گردید.

ج- تعیین غلظت هموگلوبین (Hb):

مقدار هموگلوبین هر نمونه خون به روش سیانومت هموگلوبین (با استفاده از کیت مخصوص و به روش کلرومتریک) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدلJENWAY 6505 UV/Vis در طول موج ۵۴۰ اندازه گیری گردید در این روش مقدار جذب نور ثبت و غلظت هموگلوبین بر حسب گرم در دسی لیتر محاسبه می گردد.

۱۱-۲- بررسی تاثیرات هیستوپاتولوژیک عصاره های سیر و آویشن شیرازی

به منظور انجام مطالعات هیستوپاتولوژی تاثیرات عصاره های سیر و آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهیان ایرانی انگشت قد در آزمایشات تعیین LC50 و تاثیرات مقادیر مختلف عصاره های مذکور در ماهیان تیمار شده به روش حمام یک ساعته از هر تکرار ۳ عدد ماهی انتخاب و نسبت به تهیه نمونه هایی به ابعاد ۱×۱ سانتی متر مربع از پوست، آبشش، کبد، طحال، کلیه اقدام نموده سپس نمونه های تهیه شده به داخل ظروف محتوی ۴۰ سی سی فرمالین ۱۰٪ منتقل و پس از مدت ۲۴ ساعت به آزمایشگاه بافت شناسی انتقال داده شدند. نمونه های فیکس شده در فرمالین با استفاده از دستگاه اتوماتیک عمل آوری بافت آب گیری، شفاف سازی و پارافینه شده و با استفاده از دستگاه میکروتوم مقاطع میکروسکوپی به ضخامت ۵ میکرون از آنها تهیه و سپس نسبت به رنگ آمیزی لامهای تهیه شده از مقاطع میکروسکوپی به روش هماتوکسیلین و ائوزین(H&E) اقدام و مطالعه لامهای تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری صورت پذیرفت.



شکل ٦- نمونه برداری از پوست

شکل۷- برش دادن بافت با استفاده از میکروتوم

شکل ۸- رنگ آمیزی اسلایدهای بافت آبشش

۱۲-۲- جمع آوری داده ها و تجزیه و تحلیل آماری

پس از خاتمه هر مرحله از آزمایشات و پس از جمع آوری داده ها، بمنظور تجزیه و تحلیل آماری و رسم نمودارهای مربوطه از نرم افزارهای SPSS ver 17.0 و Excel 2007 و به منظور بررسی توزیع نرمال داده ها در گروه ها و تکرار ها جهت تشکیل تیمار ها از آزمون Kolmogorov-smirnov استفاده شد. در این مطالعه از آزمونهای One Way Anova، آزمون دانکن، آزمون و ضریب همبستگی پیرسون استفاده گردید. بمنظورانجام محاسبات LC50 نیز از روش Probit analysis (Finney , 1971) استفاده شد.

۳- نتایج

۱-۳- جداسازی و شناسایی باکتری آئروموناس هیدروفیلا

با توجه به ضرورت استفاده از باکتری آئروموناس هیدروفیلا کد دار (تایید شده توسط آزمایشات بیوشیمیایی و مولکولی) و عدم وجود باکتری کد دار مذکور در مراکز علمی و دانشگاهی کشور نسبت به جداسازی و شناسایی باکتری مورد بررسی از ماهیان مشکوک به بیماری آئروموناسیس طی مراحل ذیل اقدام گردید :

۱-۱-۳- جداسازی باکتری از ماهیان مشکوک به بیماری آئروموناسیس

جهت جداسازی باکتری آئروموناس هیدروفیلا از ماهیان خاویاری نسبت به شناسایی و انتخاب ماهیان پرورشی مشکوک به بیماری آئروموناسیس بر اساس علائم ظاهری اقدام گردید. ماهیان شناسایی شده جهت جداسازی باکتری آئروموناس هیدروفیلا دارای علائم ظاهری اشاره شده در منابع(Noga,2000)شامل هموراژی در قاعده باله ها، اطراف مخرج و اطراف ناحیه دهانی و از نظر کالبد گشائی دارای علائم پرخونی روده ها و آسیت بودند.

۲-۱-۳- شناسایی باکتری های جداسازی شده با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی

نتایج بررسی میکروسکوپی لام های تهیه شده از کلنی های خالص و تک رنگ آمیزی که به روش گرم رنگ آمیزی شده بودند نشان داد باکتری جداسازی شده گرم منفی بوده و دارای ویژگی های میکروسکوپی باکتریآئروموناس می باشد. بررسی نتایج تست های بیوشیمیایی و محیط های کشت افتراقی نشان داد باکتری جداسازی شده متحرک بوده و تستهای اکسیداز، کاتالاز، اندول، آرژنین، نیترات،O/F، بتاگالاکتوزیداز، فسفاتاز،هیدرولیز ژلاتین، ساکاروز، مالتوز، گلوکز، فروکتوز، H2S انجام شده جهت شناسایی باکتری جداسازی شده همگی مثبت و تستهای اوره، متیل رد، اورنیتین دکربوکسیلاز، اینوزیتول در این بررسی همگی منفی بودند.

۳-۱-۳- شناسایی باکتری های جداسازی شده با استفاده از آزمایشات مولکولی

بر اساس نتایج اعلام شده توسط NCBI بررسی توالی بازهای آلی موجود در ساختار DNA باکتری جداسازی شده از ماهیان مشکوک به بیماری آئروموناز‌یس که توسط آزمایشات بیوشیمیایی و تستهای تفریقی باکتری آئروموناس هیدروفیلا را تایید نموده بود از تطابق ویژگی های مولکولی باکتری جداسازی شده با باکتری آئروموناس هیدروفیلا حکایت داشت.نتایج بررسی DNA باکتری آئروموناس هیدروفیلا تایید شده توسط NCBI به شرح ذیل می باشد:

Aeromonas hydrophila 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank: JX987090.1
Graphics FASTA
Go to:

BCT 13-AUG-2013
DEFINITION Aeromonas hydrophila 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION JX987090
VERSION JX987090.1 GI:441088528
KEYWORDS .
SOURCE Aeromonas hydrophila
ORGANISM Aeromonas hydrophila
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Aeromonadales;
Aeromonadaceae; Aeromonas.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1407)

TITLE Identification of Aeromonas hydrophila in sturgeon
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1407)
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (20-OCT-2012) Disease, International Sturgeon Institute,
Sade Sangar, Rasht, Guilan, Iran
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1407
/organism="Aeromonas hydrophila"
ORIGIN
1 aaaagttagg ctttgctact tttgccggcg agcggcggac gggtgagtaa tgcctgggga
61 tctgcccagt cgagggggat aacagttgga aacgactgct aataccgcat acgccctacg

121 ggggaaagga ggggaccttc gggcctttcg cgattggatg aacccaggtg ggattagcta
181 gttggtgggg taatggctca ccaaggcgac gatccctagc tggtctgaga ggatgatcag
241 ccacactgga actgagacac ggtccagact cctacgggag gcagcagtgg ggaatattgc
301 acaatggggg aaaccctgat gcagccatgc cgcgtgtgtg aagaaggcct tcgggttgta
361 aagcactttc agcgaggagg aaaggttggc gcctaatacg tgtcaactgt gacgttactc
421 gcagaagaag caccggctaa ctccgtgcca gcagccgcgg taatacggag ggtgcaagcg
481 ttaatcggaa ttactgggcg taaagcgcac gcaggcggtt ggataagtta gatgtgaaag
541 ccccgggctc aacctgggaa ttgcatttaa aactgtccag ctagagtctt gtagaggggg
601 gtagaattcc aggtgtagcg gtgaaatgcg tagagatctg gaggaatacc ggtggcgaag
661 gcggcccccc ggacaaagac tgacgctcag gtgcgaaagc gtggggagca aacaggatta
721 gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gtcgatttgg aggctgtgtc cttgagacgt
781 ggcttccgga gctaacgcgt taaatcgacc gcctggggag tacggccgca aggttaaaac
841 tcaaatgaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgatgcaac
901 gcgaagaacc ttacctggcc ttgacatgtc tggaatcctg tagagatacg ggagtgcctt
961 cgggaatcag aacacaggtg ctgcatggct gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt
1021 taagtcccgc aacgagcgca acccctgtcc tttgttgcca gcacgtaatg gtgggaactc
1081 aagggagact gccggtgata aaccggagga aggtggggat gacgtcaagt catcatggcc
1141 cttacggcca gggctacaca cgtgctacaa tggcgcgtac agagggctgc aagctagcga
1201 tagtgagcga atcccaaaaa gcgcgtcgta gtccggatcg gagtctgcaa ctcgactccg
1261 tgaagtcgga atcgctagta atcgcgaatc agaatgtcgc ggtgaatacg ttcccgggcc
1321 ttgtacacac cgcccgtcac accatgggag tgggttgcta ccagaagtag atagcttaac
1381 cttcgggagg gcgtctatag gggatag

۲-۳- تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC) باکتری آئروموناس توسط عصاره های سیر و آویشن شیرازی

بررسی نتایج تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از باکتری آئروموناس هیدروفیلا (MIC) توسط عصاره های آویشن شیرازی و سیر در محیط های مولر هینتون براث نشان داد این مقدار برای آویشن شیرازی و سیر به ترتیب در آزمایش تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده (MIC) و مولر هینتون آگار در آزمایش تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) با باکتری آئروموناس هیدروفیلا با $۱/۵\times۱۰^{۸}$cfu یا نیم مک فارلند(محیط کشت مولر هینتون براث در این آزمایش تعیینMIC ۴/۵ میلی لیتر و میزان باکتری در هر لوله ۰/۵ میلی لیتر در نظر گرفته شد).

نتایج نشان دهنده اثر ضد باکتری عصاره های آویشن شیرازی و سیر بر روی باکتری آئروموناس هیدروفیلا می باشد و در (جدول ۴ و۳) قدرت حداقل رقت مهاری و کشندگی عصاره اکالیپتوس را بر روی باکتری نشان می دهد.

جدول۳ - حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد(MIC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره های سیر و آویشن شیرازی

شماره لوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	C^-	C^+
مقدار عصاره هر لوله mg/ml	۰/۳۲	۰/۶۳	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲	۴	۸		
عصاره آویشن شیرازی	+	+	+	– MIC	–	–	–	–	–	+	–
عصاره سیر	+	+	+	+	+	– MIC	–	–	–	+	–

جدول٤ - حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد(MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتری(MBC) آئروموناس هیدروفیلا

شماره پلیت	۴	۵	۶	۷	۸	۹
مقدار عصاره هر پلیت mg/ml	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲	۴	۸
عصاره آویشن شیرازی	+	– MBC	–	–	–	–
عصاره سیر				MBC–	–	–

(+)رشد باکتری در محیط کشت

(–)عدم رشد باکتری در محیط کشت

شکل۱۰-نتایج آزماشات تعیین حداقل غلظت کشندگی کنندگی (MBC) باکتری آئروموناس توسط هیدروفیلا عصاره های سیر و آویش شیرازی

۳-۳- تعیین غلظتهای نیمه کشنده عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهی ایرانی

با توجه به اهمیت تعیین غلظتهای نیمه کشنده عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهی ایرانی جهت تعیین غلظت های موثر عصاره های مذکور جهت درمان ماهیان آلوده شده به باکتری

آئروموناس هیدروفیلا از نتایج پروژه بررسی تاثیر عصاره های سیر و آویشن شیرازی درکنترل انگل های خارجی بچه تاسماهی ایرانی که همزمان با این مطالعه انجام گردید به شرح ذیل استفاده گردید:

۱-۳-۳- تعیین غلظتهای نیمه کشنده عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهی ایرانی

بمنظور تعیین غلظتهای کشنده عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهیان ایرانی با میانگین وزنی ۰/۵۱ ± ۳/۲۲ گرم و میانگین طولی ۰/۶۵ ± ۹/۱۷ سانتیمتر طی دو زمان ۹۶ ساعت و یک ساعت، ضمن انجام آزمایشات مربوطه، نمونه برداریهای لازم هم صورت پذیرفت.

- مطالعه غلظتهای نیمه کشنده طی ۹٦ ساعت (LC50- 96 h):

در این تحقیق بمنظور یافتن محدوده غلظت عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی، آزمایشات ابتدایی (pre-LC50) بر روی بچه تاسماهیان ایرانی انجام گرفت و سرانجام محدوده غلظت ۵۰۰ تا ۱۴۰۰ میلی گرم در لیتر برای انجام آزمایشات نهایی در نظرگرفته شد. براساس محاسبات لگاریتمی۷ تیمار (۵۰۰،۵۸۳،۶۹۴، ۸۲۸، ۹۸۶، ۱۱۷۴ و ۱۴۰۰ میلی گرم لیتر) در نظر گرفته شد و نسبت به گروه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۵). همچنین میزان LC10 ، LC50 و LC90 عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی طی مدت زمان ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت محاسبه گردید (جدول۶). بر این اساس میزان LC50 این عصاره طی مدت ۴ روز معادل ۷۶۶/۶۵ میلی گرم در لیتر تعیین شد. معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی (R2) حاکی از وجود ارتباط مستقیم (همبستگی قوی و مثبت) بین غلظتهای مورد بررسی با میزان تلفات بچه تاسماهیان ایرانی می باشد (نمودارهای ۱ الی ۴).

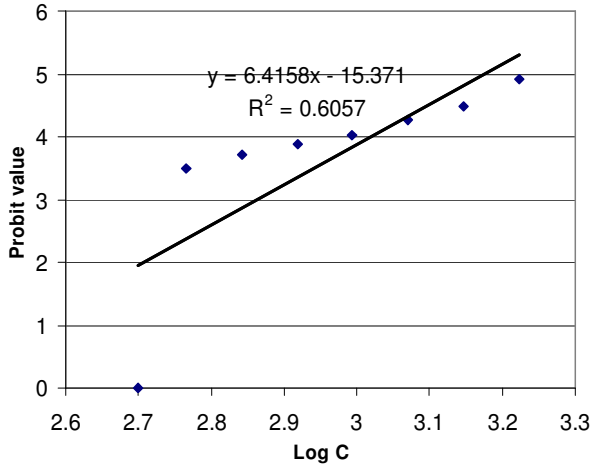
از لحاظ رفتاری علائمی از قبیل افزایش ترشح موکوس، تحریک پذیری، عدم تعادل، انقباض شدید عضلات و انحنای ستون فقرات عمدتاً در غلظتهای زیاد مشاهده شد. نتایج نشان داد که طی زمانهای ۲۴ الی ۹۶ ساعت، مقادیر LC10، LC50 و LC90 کاهش می یابد. بدین معنی که مقاومت ماهیها در مدت زمان کوتاه بیشتر بوده و ماهیها توانایی تحمل غلظت بالاتری از عصاره را دارا می باشند ولی با گذشت زمان مقاومت بچه تاسماهیان ایرانی کاهش می یابد.

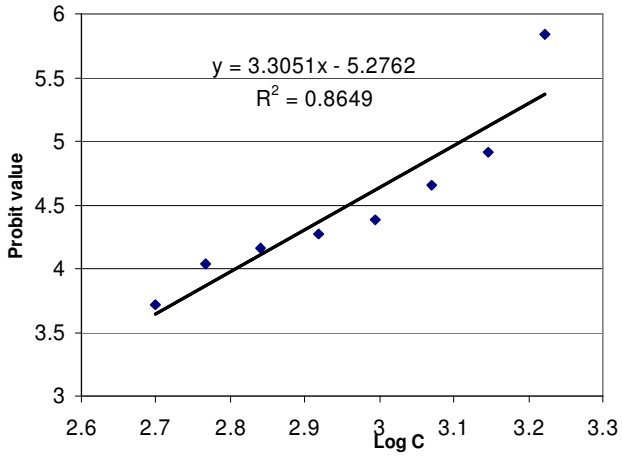
جدول ۵ ـ مقایسه اثر تیمارهای مختلف آویشن شیرازی روی مرگ و میر بچه ماهیان ۵ ـ ۳ گرمی تاسماهی ایرانی (میانگین ۳ تکرار) طی ۹۶ ساعت

تیمار	غلظت آویشن شیرازی (ppm)	۲۴ ساعت		۴۸ ساعت		۷۲ ساعت		۹۶ ساعت		تغییرات نسبت به شاهد				لگاریتم غلظت آویشن شیرازی	Probit value			
		مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
شاهد	۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
I	۵۰۰	۰	۱۰	۱	۹	۲	۸	۲/۳۳	۷/۶۷	۰	−۱۰	−۲۰	−۲۳/۳	۲/۶۹۹۰	۰	۳/۷۱۸۴	۴/۱۵۸۴	۴/۲۷۱۰
II	۵۸۳	۰/۶۷	۹/۳۳	۱/۶۷	۸/۳۳	۲/۳۳	۷/۶۷	۳/۳۳	۶/۶۷	−۶/۷	−۱۶/۷	−۲۳/۳	−۳۳/۳	۲/۷۶۵۷	۳/۵۰۱۵	۴/۰۳۳۹	۴/۲۷۱۰	۴/۵۶۸۴
III	۶۹۴	۱	۹	۲	۸	۲/۶۷	۷/۳۳	۳/۶۷	۶/۳۳	−۱۰	−۲۰	−۲۶/۷	−۳۶/۷	۲/۸۴۱۴	۳/۷۱۸۴	۴/۱۵۸۴	۴/۳۷۸۱	۴/۶۶۰۲
IV	۸۲۸	۱/۳۳	۸/۶۷	۲/۳۳	۷/۶۷	۳/۶۷	۶/۳۳	۵	۵	−۱۳/۳	−۳۳/۳	−۳۶/۷	−۵۰	۲/۹۱۸۰	۳/۸۸۷۷	۴/۲۷۱۰	۴/۶۶۰۲	۵/۰۰۰۰
V	۹۸۶	۱/۶۷	۸/۳۳	۲/۶۷	۷/۳۳	۴/۳۳	۵/۶۷	۵/۶۷	۴/۳۳	−۱۶/۷	−۲۶/۷	−۴۳/۳	−۵۶/۷	۲/۹۹۳۹	۴/۰۳۳۹	۴/۳۷۸۱	۴/۸۳۱۳	۵/۱۶۸۷
VI	۱۱۷۴	۲/۳۳	۷/۶۷	۳/۶۷	۶/۳۳	۵/۳۳	۴/۶۷	۷/۳۳	۲/۶۷	−۲۳/۳	−۳۶/۷	−۵۳/۳	−۷۳/۳	۳/۰۶۹۷	۴/۲۷۱۰	۴/۶۶۰۲	۵/۰۸۲۸	۵/۶۲۱۹
VII	۱۴۰۰	۳	۷	۴/۶۷	۵/۳۳	۷	۳	۹/۶۷	۰/۳۳	−۳۰	−۴۶/۷	−۷۰	−۹۶/۷	۳/۱۴۶۱	۴/۴۷۵۶	۴/۹۱۷۲	۵/۵۲۴۴	۶/۸۳۸۴

جدول ٦ ـ غلظتهای کشنده آویشن شیرازی در طی ٤ روز روی بچه تاسماهی ایرانی

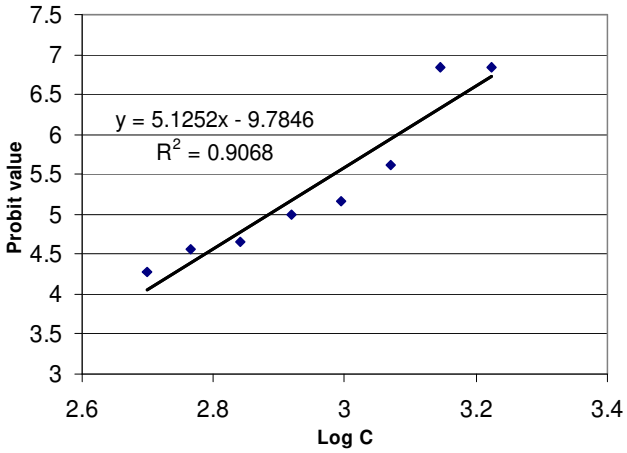
نام ماده	مقدار LC	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
آویشن شیرازی	LC_{10}	۹۴۴/۷۱	۵۲۶/۵	۴۶۶/۰۱	۴۳۱/۱۲
	LC_{50}	۱۴۹۶/۶۸	۱۲۸۵/۵۸	۹۲۱/۲۹	۷۶۶/۶۵
	LC_{90}	۲۳۷۰/۲۸	۲۰۳۹/۷۸	۱۸۱۹/۷	۱۳۶۳/۶۴



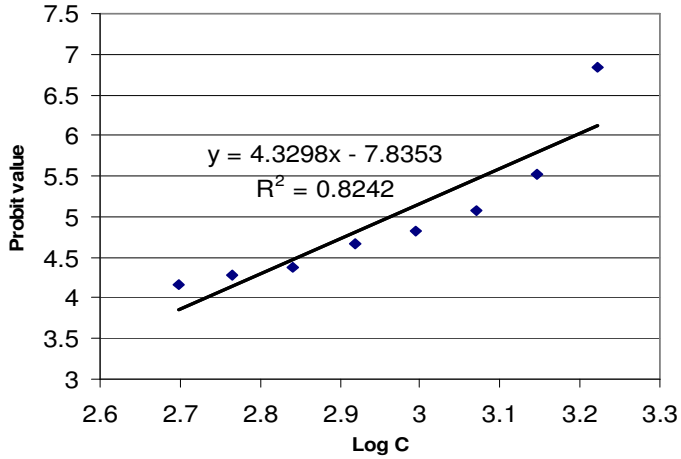


نمودار ۱:معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی probit value با لگاریتم غلظت آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ۲٤ ساعت

نمودار ۲:معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی probit value با لگاریتم غلظت آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ٤۸ ساعت



نمودار ۳:معادله خط رگرسیون آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ۷۲ ساعت



نمودار ٤:معادله خط رگرسیون آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ۹٦ ساعت

- مطالعه غلظتهای نیمه کشنده طی یک ساعت (LC50- 1 h)

بمنظور یافتن محدوده غلظت عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی، آزمایشات ابتدایی (pre-LC50) بر روی بچه تاسماهیان ایرانی انجام گرفت و سرانجام محدوده غلظت ۸۵۰۰ تا ۱۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر برای انجام آزمایشات نهایی تعیین گردید. بر اساس محاسبات لگاریتمی ۷ تیمار (۸۵۰۰، ۸۸۷۰، ۹۲۶۰، ۹۶۶۰، ۱۰۱۰۰، ۱۰۵۵۰ و ۱۱۰۰۰ میلی گرم لیتر) در نظر گرفته شد و نسبت به گروه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۷). همچنین میزان LC10 ، LC50 و LC90 عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی طی مدت زمان ۳۰، ۴۵، ۶۰ دقیقه محاسبه گردید (جدول ۸). بر این اساس میزان LC50 این عصاره طی مدت یکساعت معادل ۹۹۳۳/۴۴ میلی گرم در لیتر تعیین شد. همچنین معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی (R2) حاکی از وجود ارتباط مستقیم (همبستگی قوی و مثبت) بین غلظتهای مورد بررسی با میزان تلفات بچه تاسماهیان ایرانی می باشد (نمودارهای ۵ الی ۷).

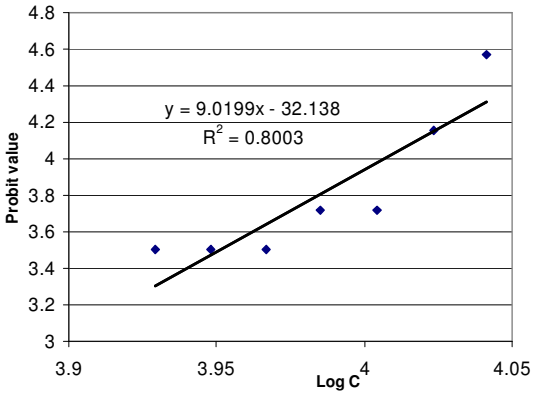
از لحاظ رفتاری علائمی از قبیل افزایش ترشح موکوس در مراحل اولیه آزمایش، تحریک پذیری، تعادل کم، انقباض شدید عضلات و انحنای ستون فقرات عمدتاً در غلظتهای زیاد مشاهده شد. نتایج نشان داد که طی زمانهای ۲۴ الی ۹۶ ساعت، مقادیر LC10 ، LC50 و LC90 کاهش می یابد. بدین معنی که مقاومت ماهیها در مدت زمان کوتاه بیشتر بوده و ماهیها توانایی تحمل غلظت بالاتری از عصاره را دارا می باشند ولی با گذشت زمان مقاومت بچه تاسماهیان ایرانی کاهش می یابد.

جدول ۷ ـ مقایسه اثر تیمارهای مختلف آویشن شیرازی روی مرگ و میر بچه ماهیان ۵ ـ ۳ گرمی تاسماهی ایرانی (میانگین ۳ تکرار) طی یک ساعت

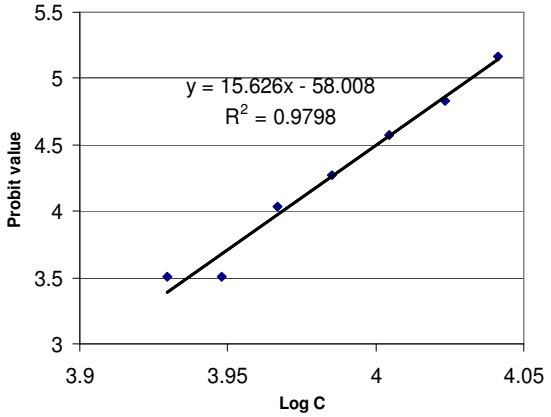
تیمار	غلظت آویشن شیرازی (ppm)	۳۰ دقیقه		۴۵ دقیقه		۶۰ دقیقه		تغییرات نسبت به شاهد			لگاریتم غلظت آویشن شیرازی	Probit value		
		مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	۳۰ دقیقه	۴۵ دقیقه	۶۰ دقیقه		۳۰ دقیقه	۴۵ دقیقه	۶۰ دقیقه
شاهد	۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
I	۸۵۰۰	۰/۶۷	۹/۳۳	۰/۶۷	۹/۳۳	۱/۳۳	۸/۶۷	-۶/۷	-۶/۷	-۱۳/۳	۳/۹۲۹۴	۳/۵۰۱۵	۳/۵۰۱۵	۳/۸۸۷۷
II	۸۸۷۰	۰/۶۷	۹/۳۳	۰/۶۷	۹/۳۳	۱/۶۷	۸/۳۳	-۶/۷	-۶/۷	-۱۶/۷	۳/۹۴۷۹	۳/۵۰۱۵	۳/۵۰۱۵	۴/۰۳۳۹
III	۹۲۶۰	۰/۶۷	۹/۳۳	۱/۶۷	۸/۳۳	۲/۶۷	۷/۳۳	-۶/۷	-۱۶/۷	-۲۶/۷	۳/۹۶۶۶	۳/۵۰۱۵	۴/۰۳۳۹	۴/۳۷۸۱
IV	۹۶۶۰	۱	۹	۲/۳۳	۷/۶۷	۳/۳۳	۶/۶۷	-۱۰	-۲۳/۳	-۳۳/۳	۳/۹۸۵۰	۳/۷۱۸۴	۴/۲۷۱۰	۴/۵۶۸۴
V	۱۰۱۰۰	۱	۹	۳/۳۳	۶/۶۷	۵	۵	-۱۰	-۳۳/۳	-۵۰	۴/۰۰۴۳	۳/۷۱۸۴	۴/۵۶۸۴	۵/۰۰۰۰
VI	۱۰۵۵۰	۲	۸	۴/۳۳	۵/۶۷	۶/۶۷	۳/۳۳	-۲۰	-۴۳/۳	-۶۶/۷	۴/۰۲۳۳	۴/۱۵۸۴	۴/۸۳۱۳	۵/۴۳۱۶
VII	۱۱۰۰۰	۳/۳۳	۶/۶۷	۵/۶۷	۴/۳۳	۸/۶۷	۱/۳۳	-۳۳/۳	-۵۶/۷	-۸۶/۷	۴/۰۴۱۴	۴/۵۶۸۴	۵/۱۶۸۷	۶/۱۱۲۳

جدول ۸ ـ غلظتهای کشنده آویشن شیرازی طی یک ساعت روی بچه تاسماهی ایرانی

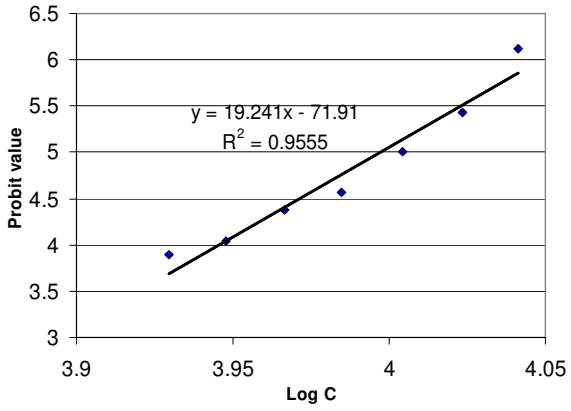
نام ماده	مقدار LC	۳۰ دقیقه	۴۵ دقیقه	۶۰ دقیقه
آویشن شیرازی	LC_{10}	۹۴۴۴/۹۵	۸۹۱۶/۶۱	۸۵۲۱/۱۸
	LC_{50}	۱۳۱۰۰/۸۶	۱۰۷۶۹/۶۱	۹۹۳۳/۴۴
	LC_{90}	۱۸۱۷۱/۸۸	۱۳۰۰۷/۶۸	۱۱۵۸۲/۴۳



نمودار۵: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی probit value با لگاریتم غلظت آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ۳۰ دقیقه



نمودار ٦ : معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی probit value با لگاریتم غلظت آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ٤٥ دقیقه



نمودار۷: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی probit value با لگاریتم غلظت آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ٦٠ دقیقه

۲-۳-۳- تعیین غلظتهای نیمه کشنده عصاره هیدروالکلی سیر بر روی بچه تاسماهی ایرانی

بمنظور تعیین غلظتهای کشنده عصاره هیدروالکلی سیر بر روی بچه تاسماهیان ایرانی با میانگین وزنی ۰/۵۱ ± ۳/۲۲ گرم و میانگین طولی ۰/۶۵ ± ۹/۱۷ سانتیمتر طی دوزمان ۹۶ ساعت و یک ساعت، ضمن انجام آزمایشات مربوطه، نمونه برداریهای لازم هم صورت پذیرفت.

- مطالعه غلظتهای نیمه کشنده طی ۹٦ ساعت (LC_{50}- 96 h)

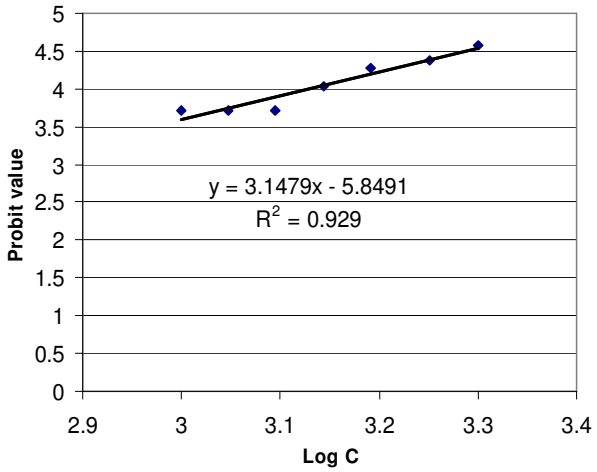
در این تحقیق بمنظور یافتن محدوده غلظت عصاره هیدروالکلی سیر آزمایشات ابتدایی (pre-LC50) بر روی بچه تاسماهیان ایرانی انجام گرفت و سرانجام محدوده غلظت ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ میلی گرم در لیتر برای انجام آزمایشات نهایی تعیین گردید. بر اساس محاسبات لگاریتمی ۷ تیمار (۱۰۰۰، ۱۱۱۶، ۱۲۴۶، ۱۳۹۱، ۱۵۵۴، ۱۷۸۵ و ۲۰۰۰ میلی گرم لیتر) در نظر گرفته شد و نسبت به گروه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۹). همچنین میزان LC10، LC50 و LC90 عصاره هیدروالکلی سیر طی مدت زمان ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت محاسبه گردید (جدول ۱۰). بر این اساس، میزان LC50 این عصاره طی مدت ۴ روز معادل ۱۲۷۹/۹۷ میلی گرم در لیتر تعیین شد. همچنین معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی (R2) حاکی از وجود ارتباط مستقیم (همبستگی قوی و مثبت) بین غلظتهای مورد بررسی با میزان تلفات بچه تاسماهیان ایرانی می باشد (نمودارهای ۸ الی ۱۱). ازلحاظ رفتاری علائمی از قبیل تشکیل موکوس برروی پوست در غلظتهای زیاد، افزایش فعالیت، گاهی انحنای ستون فقرات مشاهده شد. نتایج نشان داد که طی زمانهای ۲۴ الی ۹۶ ساعت، مقادیر LC10، LC50 و LC90 کاهش می یابد. بدین معنی که مقاومت ماهیها در مدت زمان کوتاه بیشتر بوده و ماهیها توانایی تحمل غلظت بالاتری از عصاره را دارا می باشند ولی با گذشت زمان مقاومت بچه تاسماهیان ایرانی کاهش می یابد.

جدول ۹ـ مقایسه اثر تیمارهای مختلف عصاره هیدروالکلی سیر بر میزان بازماندگی بچه تاسماهی ایرانی (میانگین ۳ تکرار) طی ۹۶ ساعت

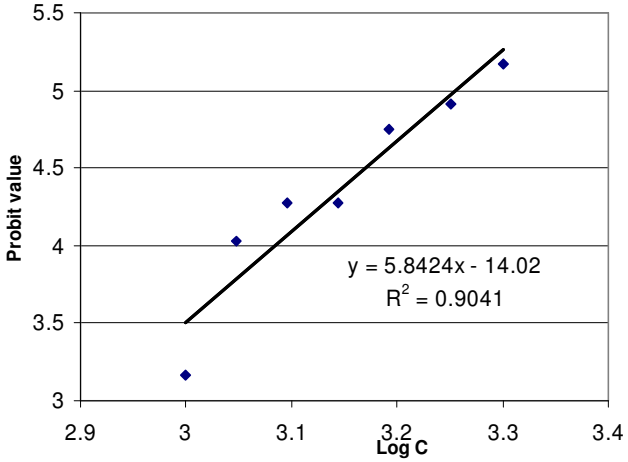
تیمار	غلظت عصاره سیر (ppm)	۲۴ ساعت		۴۸ ساعت		۷۲ ساعت		۹۶ ساعت		تغییرات نسبت به شاهد				لگاریتم غلظت عصاره سیر	Probit value			
		مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
شاهد	۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
I	۱۰۰۰	۰	۱۰	۰/۳۳	۹/۶۷	۰/۶۷	۹/۳۳	۱/۳۳	۸/۶۷	۰	-۳/۳	-۶/۷	۱۳/۳-	۳/۰۰۰۰	۰	۳/۱۶۱۶	۳/۵۰۱۵	۳/۸۸۷۷
II	۱۱۱۶	۱	۹	۱/۶۷	۸/۳۳	۲/۶۷	۷/۳۳	۳/۶۷	۶/۳۳	-۱۰	-۱۶/۷	-۲۶/۷	۳۶/۷-	۳/۰۴۷۷	۳/۷۱۸۴	۴/۰۳۳۹	۴/۳۷۸۱	۴/۶۶۰۲
III	۱۲۴۶	۱	۹	۲/۳۳	۷/۶۷	۳/۳۳	۶/۶۷	۵	۵	-۱۰	-۲۳/۳	-۳۳/۳	-۵۰	۳/۰۹۵۵	۳/۷۱۸۴	۴/۲۷۱۰	۴/۵۶۸۴	۵/۰۰۰۰
IV	۱۳۹۱	۱/۶۷	۸/۳۳	۲/۳۳	۷/۶۷	۴/۳۳	۵/۶۷	۶/۳۳	۳/۶۷	-۱۶/۷	-۲۳/۳	-۴۳/۳	۶۳/۳-	۳/۱۴۳۳	۴/۰۳۳۹	۴/۲۷۱۰	۴/۸۳۱۳	۵/۳۳۹۸
V	۱۵۵۴	۲/۳۳	۷/۶۷	۴	۶	۵/۶۷	۴/۳۳	۷/۶۷	۲/۳۳	-۲۳/۳	-۴۰	-۵۶/۷	۷۶/۷-	۳/۱۹۱۵	۴/۲۷۱۰	۴/۷۴۶۷	۵/۱۶۸۷	۵/۷۲۹۰
VI	۱۷۸۵	۲/۶۷	۷/۳۳	۴/۶۷	۵/۳۳	۶/۳۳	۳/۶۷	۸/۳۳	۱/۶۷	-۲۶/۷	-۴۶/۷	-۶۳/۳	۸۳/۳-	۳/۲۵۱۶	۴/۳۷۸۱	۴/۹۱۷۲	۵/۳۳۹۸	۵/۹۶۶۱
VII	۲۰۰۰	۳/۳۳	۶/۶۷	۵/۶۷	۴/۳۳	۸/۳۳	۱/۶۷	۹/۶۷	۰/۳۳	-۳۳/۳	-۵۶/۷	-۸۳/۳	۹۶/۷-	۳/۳۰۱۰	۴/۵۶۸۴	۵/۱۶۸۷	۵/۹۶۶۱	۶/۸۳۸۴

جدول ۱۰ـ غلظتهای کشنده عصاره سیر طی ٤ روز روی بچه تاسماهی ایرانی

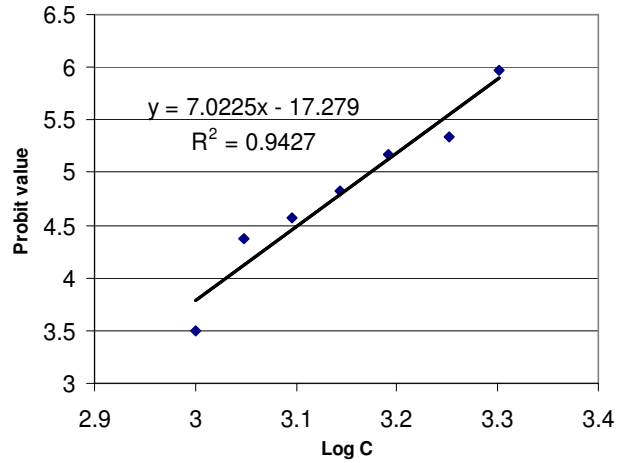
نام ماده	مقدار LC	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
سیر	LC_{10}	۱۰۹۴/۷۶	۱۰۸۶/۶۷	۹۷۷/۲۳	۹۰۹/۹۱
	LC_{50}	۲۷۹۵/۱۱	۱۸۰۰/۹۴	۱۴۸۷/۶۴	۱۲۷۹/۹۷
	LC_{90}	۷۱۳۶/۷۴	۲۹۸۴	۲۲۶۴/۶۴	۱۸۰۰/۵۲



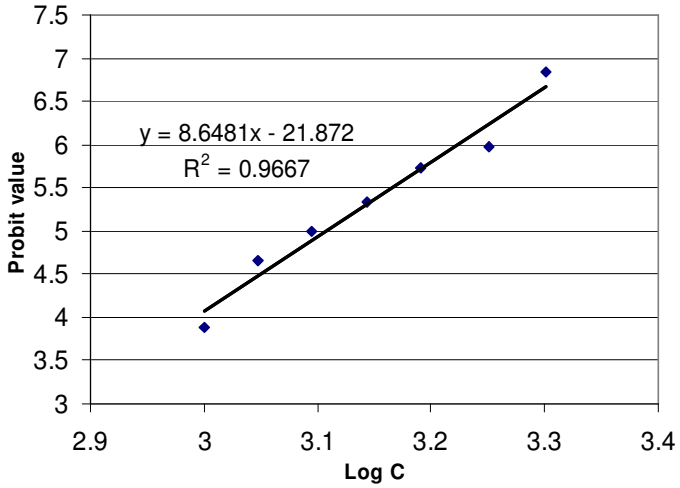
نمودار۸- معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ۲٤ ساعت



نمودار ۹- معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ٤۸ ساعت



نمودار۱۰-معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ۷۲ ساعت



نمودار ۱۱-معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ۹۶ ساعت

- **مطالعه غلظتهای نیمه کشنده طی یک ساعت** (LC_{50}- 1 h):

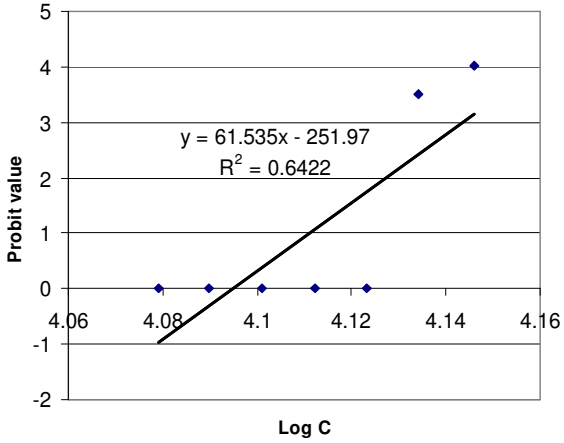
بمنظور یافتن محدوده غلظت عصاره هیدروالکلی سیر آزمایشات ابتدایی (pre-LC50) بر روی بچه تاسماهیان ایرانی انجام گرفت و سرانجام محدوده غلظت ۱۲۰۰۰ تا ۱۴۰۰۰ میلی گرم در لیتر برای انجام آزمایشات نهایی تعیین گردید. بر اساس محاسبات لگاریتمی ۷ تیمار (۱۲۰۰۰، ۱۲۳۰۰، ۱۲۶۲۰، ۱۲۹۵۰، ۱۳۲۸۰، ۱۳۶۲۰ و ۱۴۰۰۰ میلی گرم لیتر) در نظر گرفته شد و نسبت به گروه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت(جدول ۱۱). همچنین میزان LC10 ، LC50 و LC90 عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی طی مدت زمان ۳۰، ۴۵، ۶۰ دقیقه محاسبه گردید (جدول ۱۲). لازم بذکر است در جداول ۱۹ و ۲۰ نتایج زمانهای ۱۵ و ۲۰ دقیقه نیز درج گردید. بر این اساس میزان LC50 این عصاره طی مدت یکساعت معادل ۱۲۶۲۴/۰۸ میلی گرم در لیتر تعیین شد. همچنین معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی (R2) حاکی از وجود ارتباط مستقیم (همبستگی قوی و مثبت) بین غلظتهای مورد بررسی با میزان تلفات بچه تاسماهیان ایرانی می باشد (نمودارهای ۱۲ الی ۱۵). ازلحاظ رفتاری علائمی از قبیل تشکیل موکوس برروی پوست مخصوصاً در مراحل اولیه آزمایش در غلظتهای زیاد ،افزایش فعالیت،گاهی انحنای ستون فقرات مشاهده شد. نتایج نشان داد که طی زمانهای ۲۴ الی ۹۶ ساعت، مقادیر LC10 ، LC50 و LC90 کاهش می یابد. بدین معنی که مقاومت ماهیها در مدت زمان کوتاه بیشتر بوده و ماهیها توانایی تحمل غلظت بالاتری از عصاره را دارا می باشند ولی با گذشت زمان مقاومت بچه تاسماهیان ایرانی کاهش می یابد.

جدول ۱۱ ـ مقایسه اثر تیمارهای مختلف عصاره سیر روی مرگ و میر بچه ماهیان ۵ ـ ۳ گرمی تاسماهی ایرانی(میانگین ۳ تکرار) طی یک ساعت

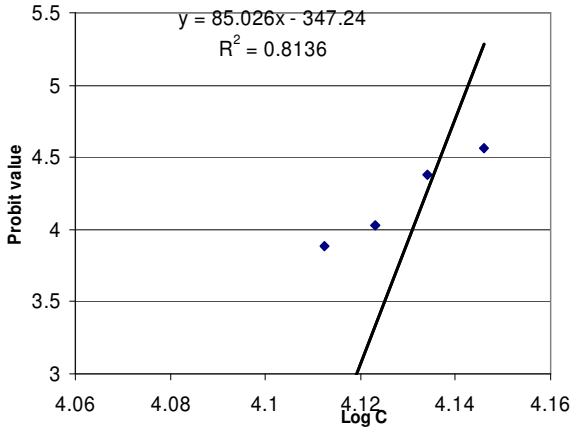
تیمار	غلظت عصاره سیر (ppm)	۱۵ دقیقه		۲۰ دقیقه		۳۰ دقیقه		۴۵ دقیقه		۶۰ دقیقه		تغییرات نسبت به شاهد					لگاریتم غلظت عصاره سیر	Probit value				
		مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	۱۵ دقیقه	۲۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	۴۵ دقیقه	۶۰ دقیقه		۱۵ دقیقه	۲۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	۴۵ دقیقه	۶۰ دقیقه
شاهد	۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
I	۱۲۰۰۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰/۶۷	۹/۳۳	۱	۹	۱/۶۷	۸/۳۳	۰	۰	−۶/۷	−۱۰	−۱۶/۷	۴/۰۷۹۲	۰	۰	۰	۳/۵۰۱۵	۳/۷۱۸۴	۴/۰۳۳۹
II	۱۳۳۰۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۱/۳۳	۸/۶۷	۲/۳۳	۷/۶۷	۳/۳۳	۶/۶۷	۰	۰	−۱۳/۳	−۲۳/۳	−۳۳/۳	۴/۰۸۹۹	۰	۰	۰	۳/۸۸۷۷	۴/۲۷۱۰	۴/۵۶۸۴
III	۱۳۶۲۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۱/۳۳	۸/۶۷	۳/۳۳	۶/۶۷	۵	۵	۰	۰	−۱۳/۳	−۳۳/۳	−۵۰	۴/۱۰۱۱	۰	۰	۰	۳/۸۸۷۷	۴/۵۶۸۴	۵/۰۰۰۰
IV	۱۲۹۵۰	۰	۱۰	۱/۳۳	۸/۶۷	۳	۷	۴/۶۷	۵/۳۳	۶/۶۷	۳/۳۳	۰	−۱۳/۳	−۳۰	−۴۶/۷	−۶۶/۷	۴/۱۱۳۳	۰	۰	۳/۸۸۷۷	۴/۴۷۵۶	۴/۹۱۷۲	۵/۴۳۱۶
V	۱۳۲۸۰	۰	۱۰	۱/۶۷	۸/۳۳	۴	۶	۶/۳۳	۳/۶۷	۸/۳۳	۱/۶۷	۰	−۱۶/۷	−۴۰	−۶۳/۳	−۸۳/۳	۴/۱۱۳۲	۰	۴/۰۳۳۹	۴/۷۴۶۷	۵/۳۳۹۸	۵/۹۶۶۱
VI	۱۳۶۲۰	۰/۶۷	۹/۳۳	۲/۶۷	۷/۳۳	۴/۳۳	۵/۶۷	۶/۶۷	۳/۳۳	۹/۳۳	۰/۶۷	−۶/۷	−۲۶/۷	−۴۳/۳	−۶۶/۷	−۹۳/۳	۴/۱۳۴۲	۳/۵۰۱۵	۴/۳۷۸۱	۴/۸۳۱۳	۵/۴۳۱۶	۵/۴۹۸۵
VII	۱۴۰۰۰	۱/۶۷	۸/۳۳	۳/۳۳	۶/۶۷	۵/۶۷	۴/۳۳	۸/۳۳	۱/۶۷	۱۰	۰	−۱۶/۷	−۳۳/۳	−۵۶/۷	−۸۳/۳	−۱۰۰	۴/۱۴۶۱	۴/۰۳۳۹	۴/۵۶۸۴	۵/۱۶۸۷	۵/۹۶۶۱	۸/۷۱۹۰

جدول ۱۲ـ غلظتهای کشنده عصاره سیر طی یک ساعت روی بچه ماهی تاسماهی ایرانی

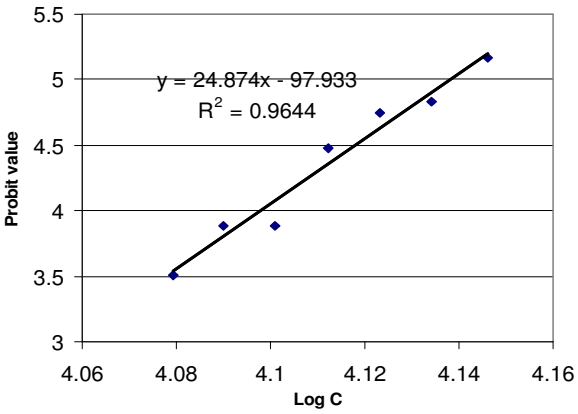
نام ماده	مقدار LC	۱۵ دقیقه	۲۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	۴۵ دقیقه	۶۰ دقیقه
سیر	LC_{10}	۱۴۲۹۲/۲۳	۱۳۴۱۵/۲۸	۱۲۲۰۶/۷۴	۱۱۸۹۳/۲۳	۱۱۷۴۸/۹۷
	LC_{50}	۱۴۹۹۳/۳۹	۱۳۸۸۹/۹۲	۱۳۷۴۳/۵۸	۱۳۰۵۵/۶۹	۱۲۶۲۴/۰۸
	LC_{90}	۱۵۷۳۲/۵۸	۱۴۳۸۱/۳۶	۱۵۴۷۷/۴۷	۱۴۳۳۵/۰۷	۱۳۳۲۶



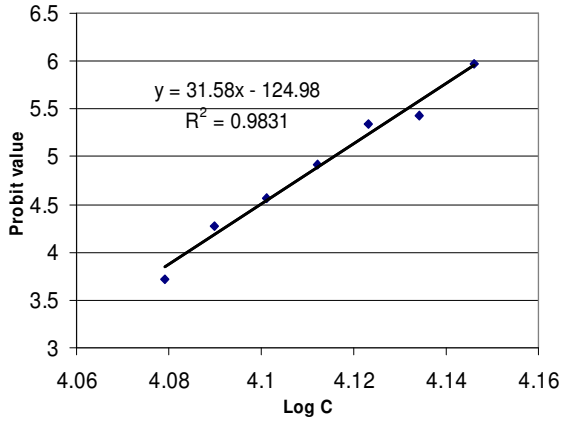
نمودار۱۲-معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ۱۵ دقیقه



نمودار ۱۳-معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ۲۰ دقیقه



نمودار۱٤-معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ۳۰ دقیقه



نمودار ۱۵-معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ٤۵ دقیقه

٤-۳-تیمار تاسماهیان ایرانی آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا به روش تجربی توسط مقادیر مختلف عصاره های سیر و آویشن شیرازی

بر اساس نتایج تیمار ۱۵۰ عدد تاسماهی ایرانی آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا (۱۰ عدد ماهی در هر تکرار) توسط مقادیر مختلف عصاره های سیر و آویشن شیرازی با افزایش غلظت عصاره های مورد استفاده بهبودی سریع تر علائم بالینی ماهیان آلوده شده نسبت به گروه شاهد حاصل گردید. بر اساس نتایج مذکور عصاره آویش شیرازی در مقایسه با عصاره سیر از کارایی بهتری در بهبود علائم بیماری ناشی از آلودگی ماهیان مورد بررسی به باکتری آئروموناس هیدروفیلا برخودار بوده است. همچنین مقایسه تعداد ماهیان تلف شده در گروه های مختلف نشان داد کلیه ماهیان گروه شاهد طی مدت زمان آزمایش (۷ روز)تلف گریدند. همچنین بر این اساس تعداد بیشتری از ماهیان در گروه های تیمار عصاره سیر نسبت به گروه های تیمار عصاره آویشن شیرازی دچار تلفات گردیدند (جدول۱۳).

جدول۱۳- تیمار ماهیان آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا

نوع تیمار	شماره تیمار	غلظت عصاره مورد استفاده جهت تیمار(ppm)	تعداد تلفات تیمار
عصاره سیر	۱	۶۰۰	۱۲
	۲	۸۰۰	۱۰
	۳	۱۰۰۰	۸
	۴	۱۲۰۰	۷
عصاره آویشن شیرازی	۵	۴۰۰	۹
	۶	۶۰۰	۷
	۷	۸۰۰	۶
	۸	۱۰۰۰	۶
شاهد	۹	-	۳۰

۵-۳-بررسی تاثیر عصاره های سیر و آویشن بر روی فاکتورهای خونی

۱-۵-۳- مطالعات هماتولوژی در بچه تاسماهیان ایرانی طی آزمایشات LC50

- مطالعات هماتولوژی تأثیر عصاره آویشن شیرازی- LC_{50} :

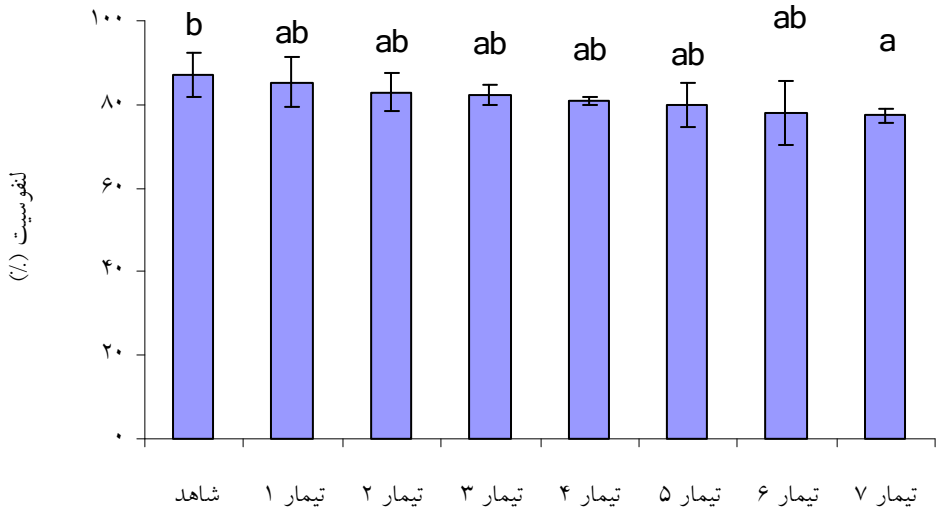
با توجه به کوچک بودن سایز بچه تاسماهیان ایرانی، فقط مطالعات افتراقی گلبولهای سفید ممکن بوده که در زیر به نتایج آن اشاره می گردد:

لنفوسیت: بررسی میزان لنفوسیت خون ماهیان مورد بررسی، بوسیله آزمون تجزیه واریانس یکطرفه(Oneway Anova) نشان داد که بین تیمار ها اختلاف معنی دار آماری وجود دارد (P<0.05). همچنین بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه گروهها با یکدیگر، حاکی از کاهش لنفوسیت خون بچه ماهیان در غلظت های مختلف آویشن بوده است. بطوریکه کمترین میزان لنفوسیت در تیمار ۷ و بیشترین میزان لنفوسیت در شاهد مشاهده شده است و به لحاظ آماری نیز اختلاف معنی دار بین شاهد و سایر تیمارها مشاهده گردید.(P<0.05).

جدول ١٤- میانگین لنفوسیت در شاهد و تیمار های مختلف آویشن شیرازی

فاکتور	شماره تیمار	غلظت عصاره مورد استفاده جهت تیمار(ppm)	خطای استاندارد ± میانگین
لنفوسیت	شاهد	0	۸۷ ±۳^{b}
	تیمار ۱	۵۰۰	۸۵/۳۳ ±۳/۴۸ ^{ab}
	تیمار ۲	۵۸۳	۸۳ ±۲/۵۲ ^{ab}
	تیمار ۳	۶۹۴	۸۲/۲۳ ±۱/۴۵۰ ^{ab}
	تیمار ۴	۸۲۸	۸۱ ± ۰/۵۷ ^{ab}
	تیمار ۵	۹۸۶	۸۰ ± ۳ /۰۵^{ab}
	تیمار ۶	۱۱۷۴	۷۸ ±۱/۳۵ ^{ab}
	تیمار ۷	۱۴۰۰	۷۷/۳۳ ± ۰/۸۸^{a}

* حروف انگلیسی غیر همنام در جداول و نمودارها نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد.

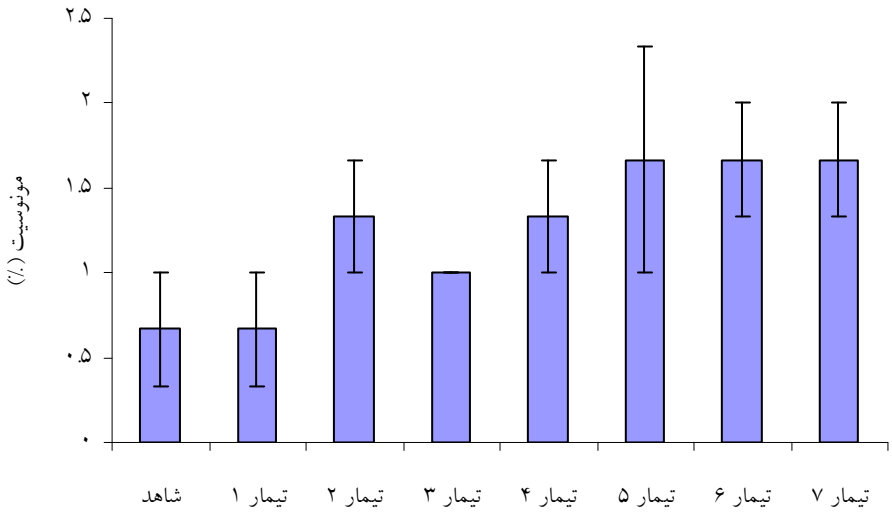


نمودار١٦ : مقایسه میانگین میزان لنفوسیت شاهد با تیمار های مختلف آویشن شیرازی

مونوسیت: در مقایسه میزان مونوسیت خون ماهیان مورد بررسی بین تیمار ها بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه، اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد (P>0.05).

جدول ۱۵- میانگین مونوسیت در شاهد و تیمار های مختلف

فاکتور	تیمار	غلظت عصاره مورد استفاده جهت تیمار(ppm)	خطای استاندارد ± میانگین
مونوسیت	شاهد	0	۰/۶۷ ± ۰ /۳۳
	تیمار ۱	۵۰۰	۰/۶۷ ± ۰ /۳۳
	تیمار ۲	۵۸۳	۱/۳۳ ±۰/۳۳
	تیمار ۳	۶۹۴	۱ ±۰
	تیمار ۴	۸۲۸	۱/۳۳ ±۰/۳۳
	تیمار ۵	۹۸۶	۱/۶۶ ±۰/۶۶
	تیمار ۶	۱۱۷۴	۱/۶۶ ±۰/۳۳
	تیمار ۷	۱۴۰۰	۱/۶۶ ±۰/۳۳



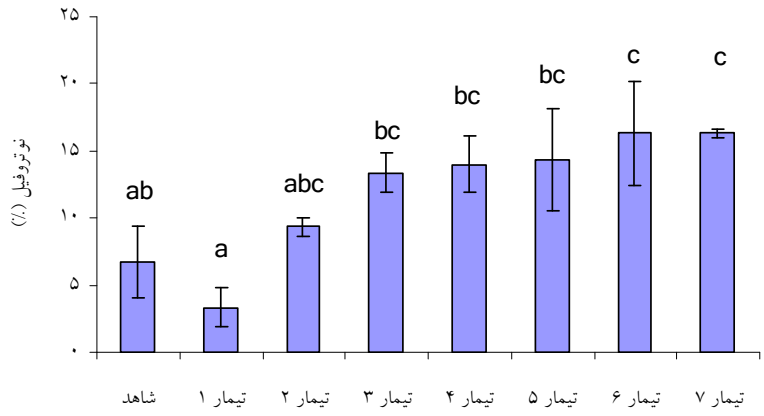
نمودار۱۷ : مقایسه میانگین میزان مونوسیت شاهد با تیمار های مختلف آویشن شیرازی

نوتروفیل : بررسی میزان نوتروفیل خون ماهیان مورد بررسی، بوسیله آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) حاکی از وجود اختلاف معنی دار آماری بین تیمار ها بوده است (P<0.05). همچنین بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه گروهها با یکدیگر، حاکی از افزایش نوتروفیل خون بچه ماهیان در تیمارها

بوده است. بطوریکه میزان این فاکتور در خون بچه ماهیان در تیمار ۶ و ۷ بیش از شاهد و سایر تیمار ها بوده و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار مشاهده گردید.($P<0.05$).

جدول ١٦- میانگین نوتروفیل در شاهد و تیمار های مختلف آویشن شیرازی

فاکتور	تیمار	غلظت عصاره مورد استفاده جهت تیمار(ppm)	خطای استاندارد ± میانگین
نوتروفیل	شاهد	0	۶/۶۶ ± ۲ /۶۶^{ab}
	تیمار ۱	۵۰۰	۳/۳۳ ±۱/۴۵^{a}
	تیمار ۲	۵۸۳	۹/۳۳ ±۰/۶۶^{abc}
	تیمار ۳	۶۹۴	۱۳/۳۳ ±۱/۴۵ ^{bc}
	تیمار ۴	۸۲۸	۱۴ ± ۲/۰۸^{bc}
	تیمار ۵	۹۸۶	۱۴/۳۳ ±۳/۸۴ ^{bc}
	تیمار ۶	۱۱۷۴	۱۶/۳۳ ±۰/۳۳ ^{c}
	تیمار ۷	۱۴۰۰	

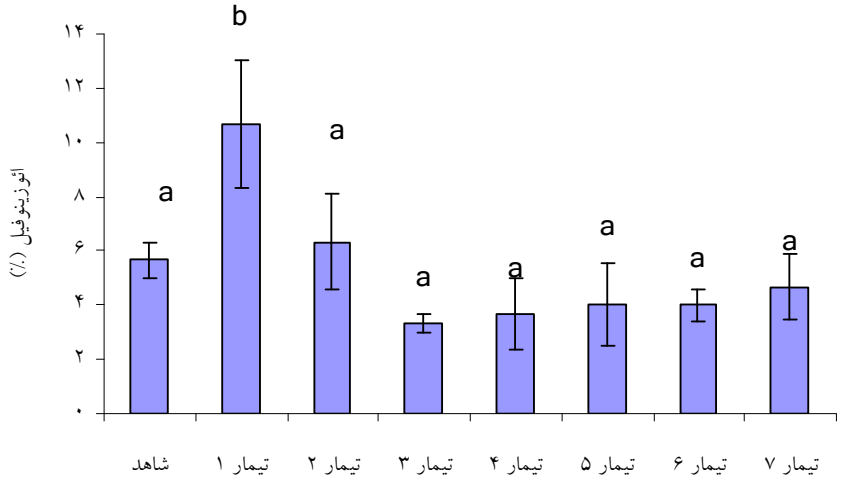


نمودار۱۸ : مقایسه میانگین میزان نوتروفیل در تیمار های مختلف آویشن شیرازی

ائوزینوفیل : بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) مقایسه میزان ائوزینوفیل خون ماهیان مورد بررسی در تیمار ها، اختلاف معنی دار آماری را نشان داد ($P<0.05$). بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه گروهها با یکدیگر، میزان ائوزینوفیل خون بچه ماهیان در تیمار ۱ بیش از سایر تیمارها و شاهد بوده و میزان این فاکتور در خون بچه ماهیان در تیمارها از روند نسبتاً کاهشی برخوردار بوده است و به لحاظ آماری نیز اختلاف معنی دار مشاهده گردید($P<0.05$).

جدول ۱۷- میانگین ائوزینوفیل در شاهد و تیمار های مختلف آویشن شیرازی

فاکتور	تیمار	غلظت عصاره مورد استفاده جهت تیمار(ppm)	خطای استاندارد ± میانگین
ائوزینوفیل	شاهد	0	۵/۶۶ ± ۰ /۶۶^{a}
	تیمار ۱	۵۰۰	۱۰/۶۶ ±۲/۳۳^{b}
	تیمار ۲	۵۸۳	۶/۳۳ ±۱/۷۶^{a}
	تیمار ۳	۶۹۴	۳/۳۳ ±۰/۳۳ ^{a}
	تیمار ۴	۸۲۸	۳/۶۶ ± ۱/۳۳ ^{a}
	تیمار ۵	۹۸۶	۴ ±۱۰/۵۲ ^{a}
	تیمار ۶	۱۱۷۴	۴ ±۰/۵۷ ^{a}
	تیمار ۷	۱۴۰۰	۵ ± ۰/۴۰^{a}



نمودار۱۹ : مقایسه میانگین میزان ائوزینوفیل شاهد با تیمار های مختلف آویشن شیرازی

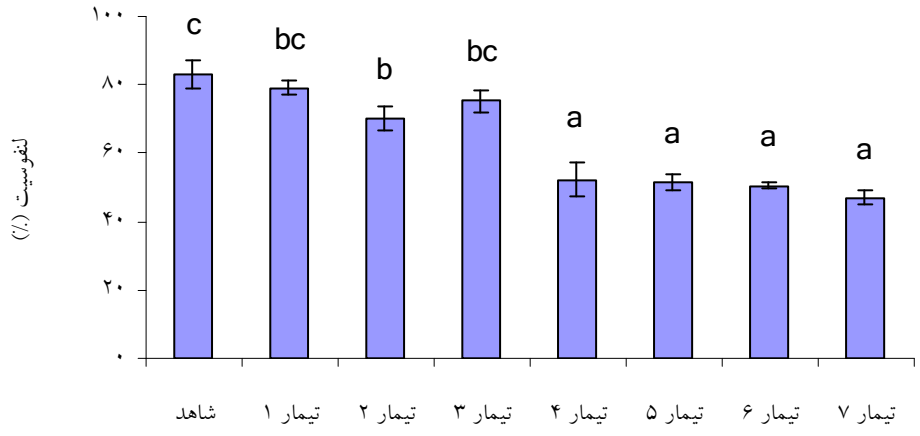
- مطالعات هماتولوژی تأثیر عصاره سیر- LC_{50} :

با توجه به کوچک بودن سایز بچه تاسماهیان ایرانی فقط انجام مطالعه افتراقی گلبولهای سفید ممکن بوده که در زیر به نتایج آن اشاره می گردد:

لنفوسیت: بررسی میزان لنفوسیت خون ماهیان مورد بررسی،بوسیله آزمون تجزیه واریانس یکطرفه(Oneway Anova) نشان داد که بین تیمار ها اختلاف معنی دار آماری وجود دارد (P<0.05). همچنین بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه گروهها با یکدیگر، حاکی از کاهش لنفوسیت خون بچه ماهیان در غلظت های مختلف آویشن بوده است. بطوریکه کمترین میزان لنفوسیت در تیمار ۷ و بیشترین میزان لنفوسیت در شاهد مشاهده شده است و به لحاظ آماری نیز اختلاف معنی دار بین شاهد و سایر تیمارها مشاهده گردید.(P<0.05).

جدول ۱۸- میانگین لنفوسیت در شاهد و تیمار های مختلف سیر

فاکتور	تیمار	غلظت عصاره مورد استفاده جهت تیمار(ppm)	خطای استاندارد ± میانگین
لنفوسیت	شاهد	۰	۸۳ ± ۶/۹۲ c
	تیمار ۱	۱۰۰۰	۷۹ ±۳/۴۶ bc
	تیمار ۲	۱۱۱۶	۷۰/۳۳ ±۳/۳۸ b
	تیمار ۳	۱۲۴۶	۷۵/۳۳ ± ۳/۱۸ bc
	تیمار ۴	۱۳۹۱	۵۲/۳۳ ± ۵ /۲۴ a
	تیمار ۵	۱۵۵۴	۵۱/۳۳ ±۲/۴۰ a
	تیمار ۶	۱۷۸۵	۵۰/۳۳ ±۰/۸۸ a
	تیمار ۷	۲۰۰۰	۴۷ ± ۲/۰۸ a

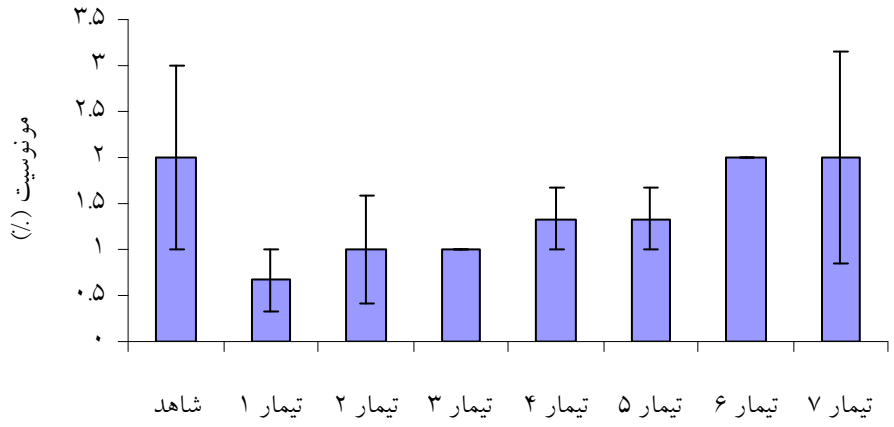


نمودار ۲۰- مقایسه میانگین میزان لنفوسیت شاهد با تیمار های مختلف سیر

مونوسیت : بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان مونوسیت خون ماهیان مورد بررسی بین تیمار ها اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد (P>0.05).

جدول ۱۹- میانگین مونوسیت در شاهد و تیمار های مختلف سیر

فاکتور	تیمار	غلظت عصاره مورد استفاده جهت تیمار(ppm)	خطای استاندارد ± میانگین
مونوسیت	شاهد	۰	۲ ±۱/۷۳
	تیمار ۱	۱۰۰۰	۰/۶۶ ±۰/۳۳
	تیمار ۲	۱۱۱۶	۱ ±۰/۵۸
	تیمار ۳	۱۲۴۶	۱ ±۰
	تیمار ۴	۱۳۹۱	۱/۳۳ ± ۰ /۵۷
	تیمار ۵	۱۵۵۴	۱/۳۳ ± ۰ /۵۷
	تیمار ۶	۱۷۸۵	۲ ±۰
	تیمار ۷	۲۰۰۰	۲ ±۲

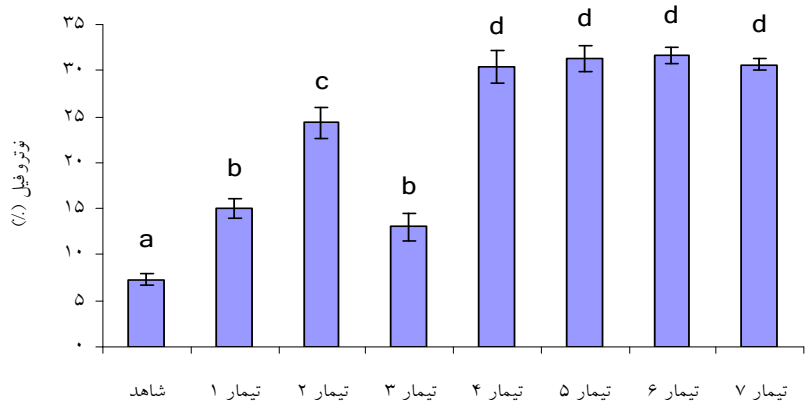


نمودار۲۱- مقایسه میانگین میزان مونوسیت شاهد با تیمار های مختلف

نوتروفیل : بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان نوتروفیل خون ماهیان مورد بررسی، بین تیمار ها اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد (P<0.05). و بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه گروهها با یکدیگر میزان نوتروفیل خون بچه ماهیان در تیمار ها افزایش یافته و میزان این فاکتور در خون بچه ماهیان در تیمار ۴،۵ ، ۶ و ۷ بیش از شاهد و سایر تیمار ها بوده و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار مشاهده گردید.(P<0.05) .

جدول ۲۰- میانگین نوتروفیل در شاهد و تیمار های مختلف سیر

فاکتور	تیمار	غلظت عصاره مورد استفاده جهت تیمار(ppm)	خطای استاندارد ± میانگین
نوتروفیل	شاهد	۰	۷/۳۳ ± ۰ /۶۶^{a}
	تیمار ۱	۱۰۰۰	۱۵ ±۱^{b}
	تیمار ۲	۱۱۱۶	۲۴/۳۳ ±۱/۶۶^{c}
	تیمار ۳	۱۲۴۶	۱۳ ±۱/۵۳^{b}
	تیمار ۴	۱۳۹۱	۳۰/۳۳ ± ۱/۷۶^{d}
	تیمار ۵	۱۵۵۴	۳۱/۳۳ ±۱/۴۵^{d}
	تیمار ۶	۱۷۸۵	۳۱/۶۶ ±۰/۸۸^{d}
	تیمار ۷	۲۰۰۰	۳۰/۶۶ ± ۰/۶۶^{d}

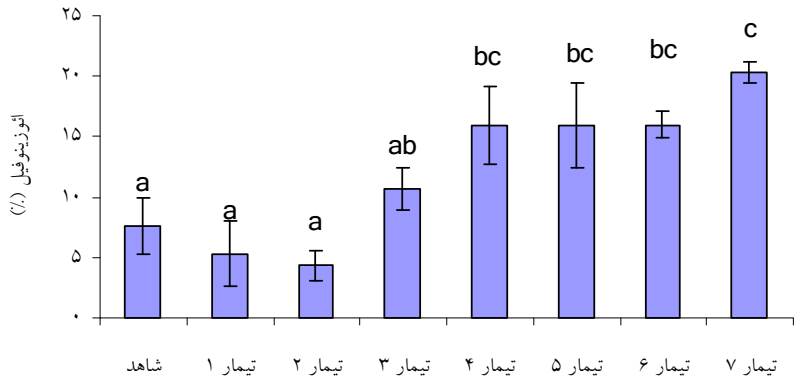


نمودار ۲۲- مقایسه میانگین میزان نوتروفیل در تیمار های مختلف سیر

ائوزینوفیل: بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) مقایسه میزان ائوزینوفیل خون ماهیان مورد بررسی بین تیمار ها، اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد (P<0.05). و بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه گروهها با یکدیگر میزان ائوزینوفیل خون بچه ماهیان در تیمار۷ بیش از سایر تیمارها بوده است و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار بین تیمار های ۷، ۶، ۵ و ۴ با سایر تیمار ها و شاهد مشاهده گردید(P<0.05).

جدول ۲۱- میانگین ائوزینوفیل در شاهد و تیمار های مختلف سیر

فاکتور	تیمار	غلظت عصاره مورد استفاده جهت تیمار(ppm)	خطای استاندارد ± میانگین
ائوزینوفیل	شاهد	۰	۷/۶۶ ± ۲ /۳۳ a
	تیمار ۱	۱۰۰۰	۵/۳۳ ±۲/۶۶ a
	تیمار ۲	۱۱۱۶	۴/۳۳ ±۱/۲۰ a
	تیمار ۳	۱۲۴۶	۱۰/۶۶ ±۱/۷۶ ab
	تیمار ۴	۱۳۹۱	۱۶ ± ۳/۲۱ bc
	تیمار ۵	۱۵۵۴	۱۶ ±۳/۲۱ bc
	تیمار ۶	۱۷۸۵	۱۶ ±۱/۱۵ bc
	تیمار ۷	۲۰۰۰	۲۰/۳۳ ± ۰/۸۸c



نمودار ۲۳- میانگین ائوزینوفیل در شاهد و تیمار های مختلف سیر

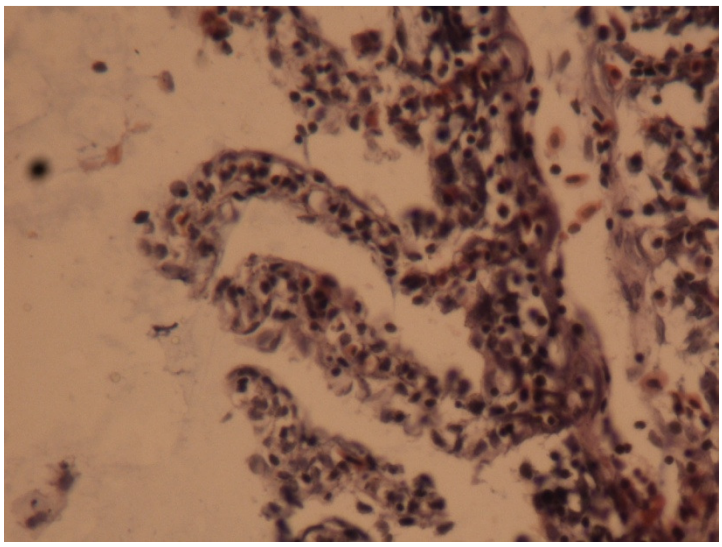
٦-۳- بررسی تاثیرات هیستوپاتولوژیک عصاره های سیر و آویشن شیرازی

به منظور بررسی آسیب های بافتی مقادیر مختلف عصاره های سیر و آویشن شیرازی مورد استفاده در تیمار تاس ماهیان ایرانی آلوده شده توسط باکتری آئروموناس هیدروفیلا نسبت به نمونه برداری و تهیه مقاطع بافتی از آبشش کبد و کلیه ماهیان تیمار و شاهد و بررسی میکروسکوپی آنها اقدام و نتایج ذیل حاصل گردید:

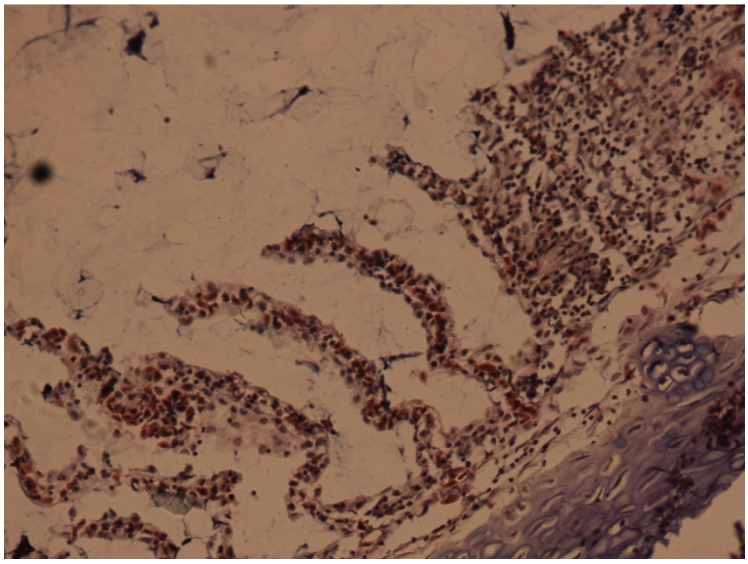
۱-٦-۳- آسیب های بافت آبشش

بررسی مقاطع بافتی تهیه شده از آبشش تاس ماهیان مورد بررسی در این مطالعه که طی مدت زمان یک هفته با استفاده مقادیر مختلف عصاره های سیر و آویشن شیرازی تحت تیمار قرار گرفته بودند از بروز برخی از آسیب

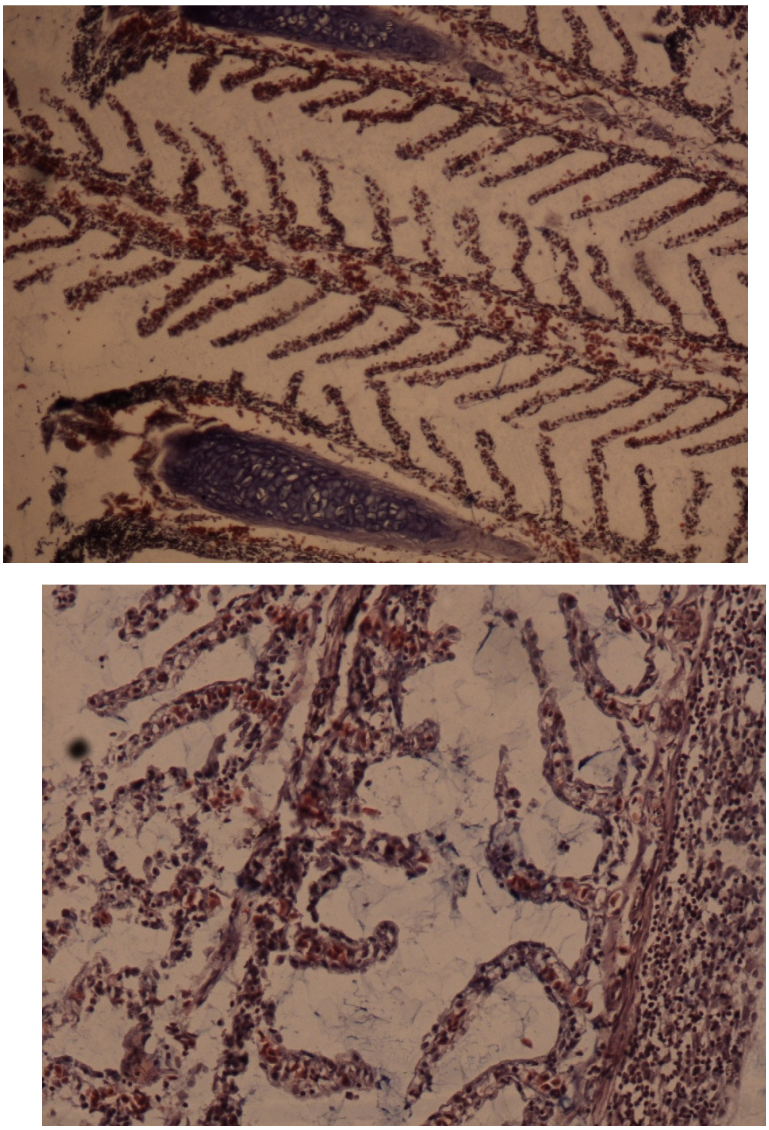
های میکروسکوپیک حکایت دارد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه با افزایش غلظت عصاره های مورد بررسی در گروه های تیمار آسیب های میکروسکوپیک به شکل گسترده تری در آبشش ها ظاهر می گردند. همچنین براساس بررسی های میکروسکوپیک ،آسیبهای مشاهده شده در مقاطع بافتی تهیه شده از آبششهای بچه تاسماهیان ایرانی جوان شامل پرخونی Hyperemia، هیپرپلازی Hyperplasia، چسبندگی رشته های آبششی، نکروز سلولی موضعی Ncrosis، وجود رنگدانه های ملانین در رشته های اولیه آبششی می باشد. (شکل های ۱۱ تا ۱۸).



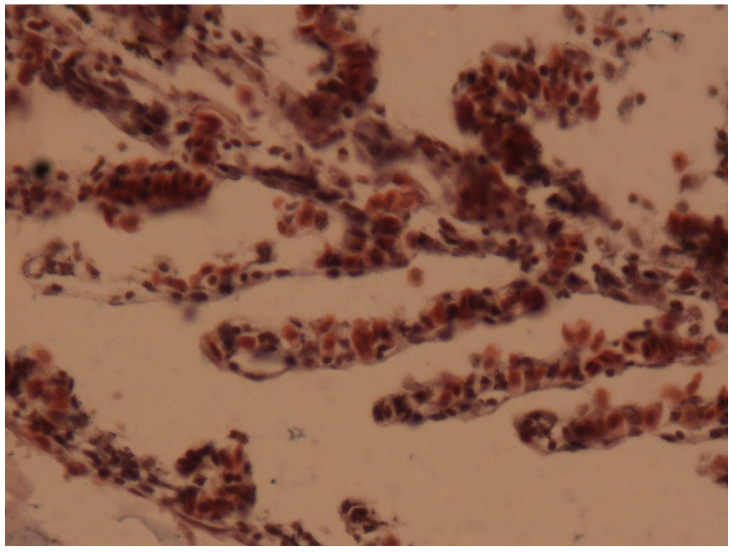
(I



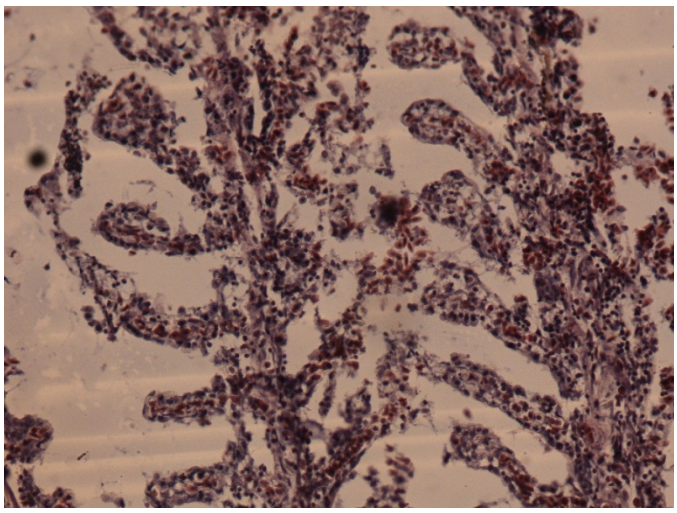
شکل۱۲: اتصال گسترده لاملا همراه با از بین رفتن فضاهای بین لاملایی،خونریزی و نکروز سلولی- تیمار۱ عصاره سیر (H&E ، X۲۰)



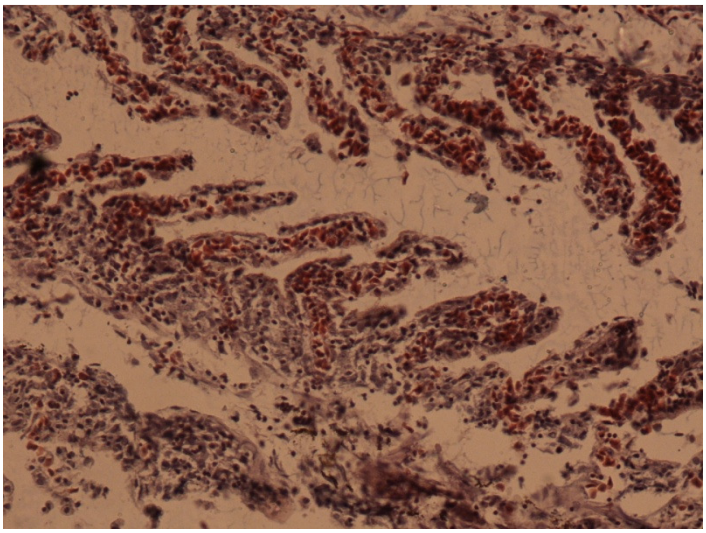
شکل۱۵: نکروز سلولی، هیپرپلازی و پرخونی- تیمار ۳ عصاره آویشن شیرازی (H&E ، X۲۰)



شکل۱٦: نکروز سلولی و خونریزی - تیمار ۳ عصاره سیر (H&E ، X۴۰)



شکل۱۷: نکروز سلولی، هیپرپلازی، چماقی شدن، پرخونی- تیمار٤ عصاره آویشن شیرازی (H&E ، X۲۰)

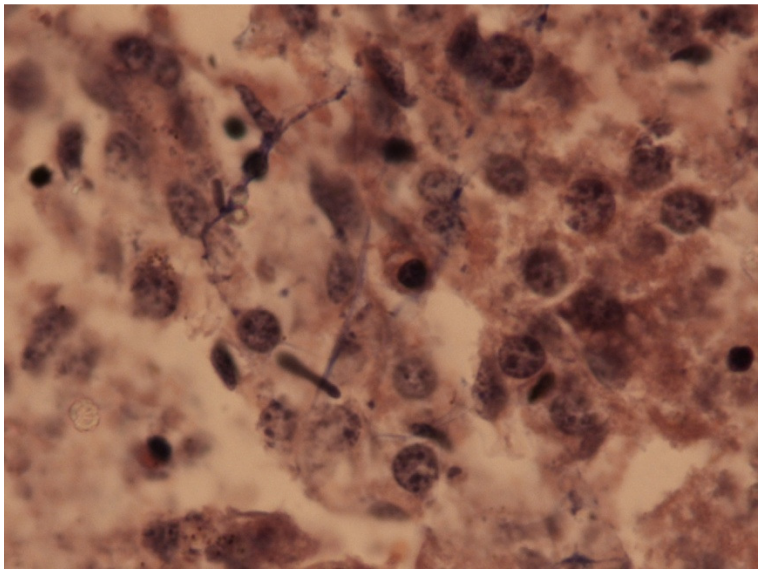


شکل۱۸: هیپرپلازی، چسبندگی رشته های آبششی و پرخونی –تیمار٤ عصاره سیر (H&E ، X۲۰)

.

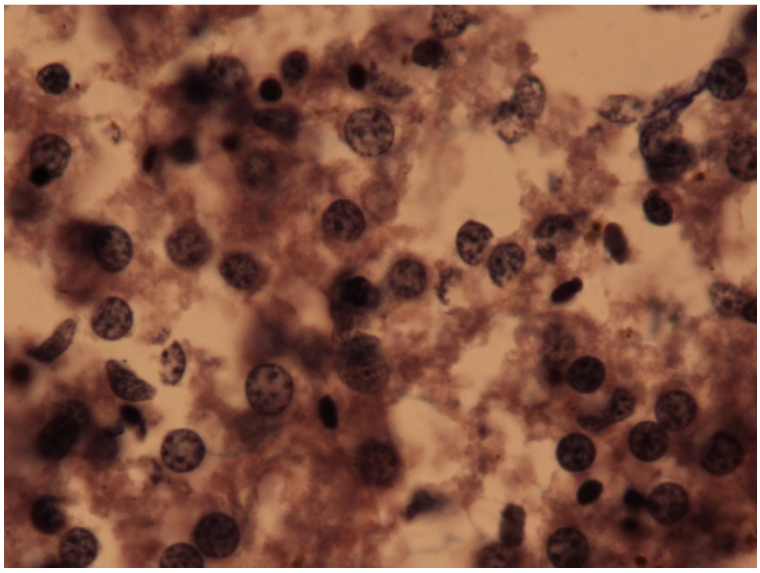
۲-٦-۳- آسیب های بافت کبد

بررسی مقاطع بافتی تهیه شده از کبد تاس ماهیان مورد بررسی در این مطالعه که طی یک هفته با استفاده مقادیر مختلف عصاره های سیر و آویشن شیرازی تحت تیمار قرار گرفته بودند از بروز برخی از آسیب های میکروسکوپیک حکایت دارد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه با افزایش غلظت عصاره های مورد بررسی در گروه های تیمار آسیب های میکروسکوپیک به شکل گسترده تری در کبد ظاهرگردند. بررسی مقاطع بافتی کبد در تیمارهای مختلف عوارضی نظیر تورم سلولی Cell swelling در هپاتوسیتها ، نکروزسلولیNcrosis، مشاهده پرخونیHyperemia سینوزوئیدها، افزایش رنگدانه های ملانین Hypermelanosis و مراکز ملانو ماکروفاژها بوده است. (شکل های ۱۹ تا ۲۶).

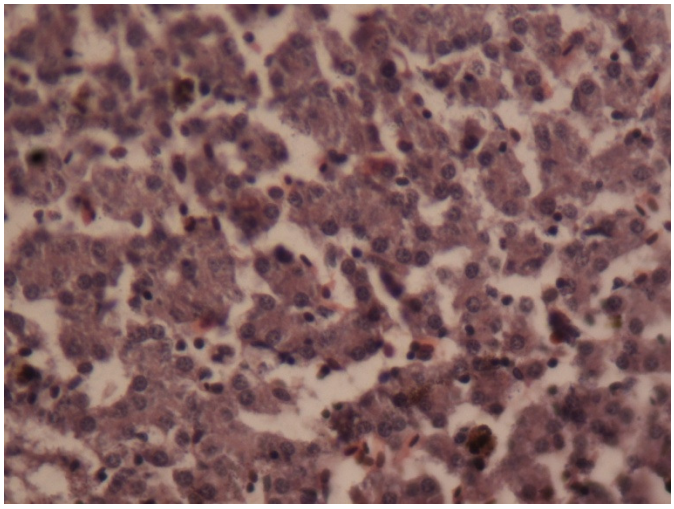


شکل۱۹: نکروز سلولی ،پرخونی و دژنرسانس چربی - تیمار۱ عصاره

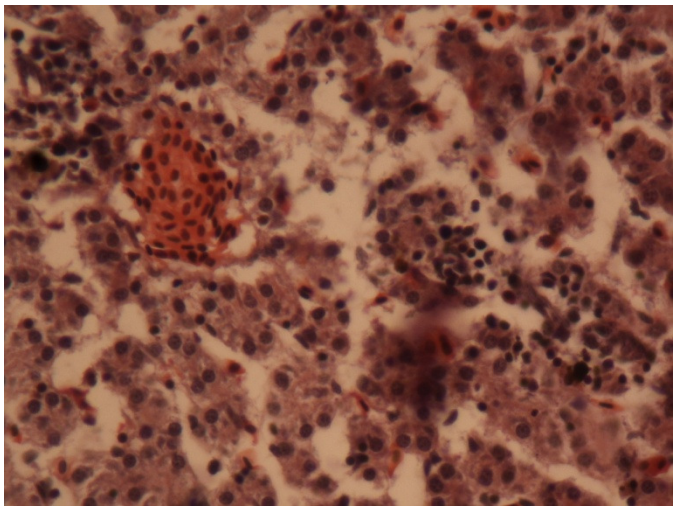
آویشن شیرازی (H&E - X 100)



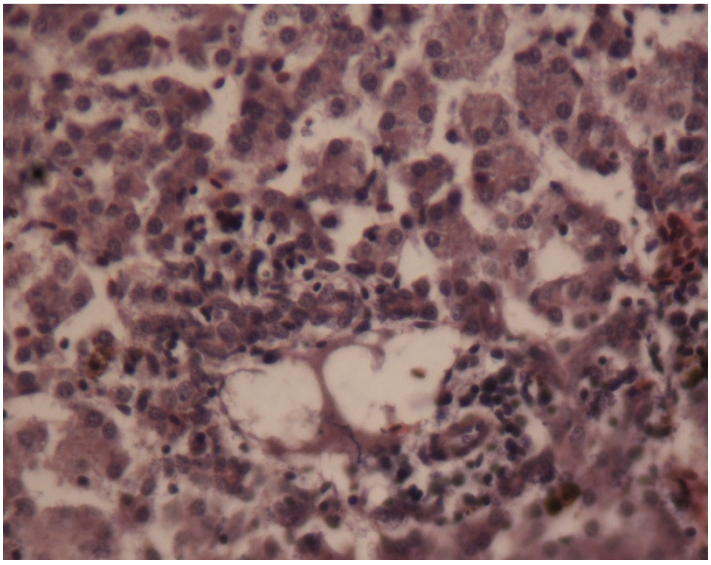
شکل۲۰: تورم سلولی ، نکروز سلولی و دژنرسانس چربی -تیمار۱ عصاره سیر (H&E -X 100)



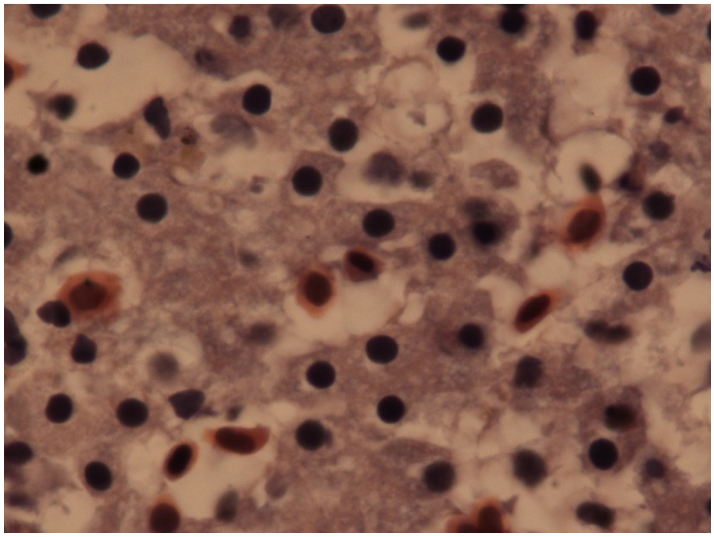
شکل۲۱: نکروز حاد و پرخونی در بافت کبد- تیمار۲ عصاره آویشن شیرازی(H&E - X۴۰)



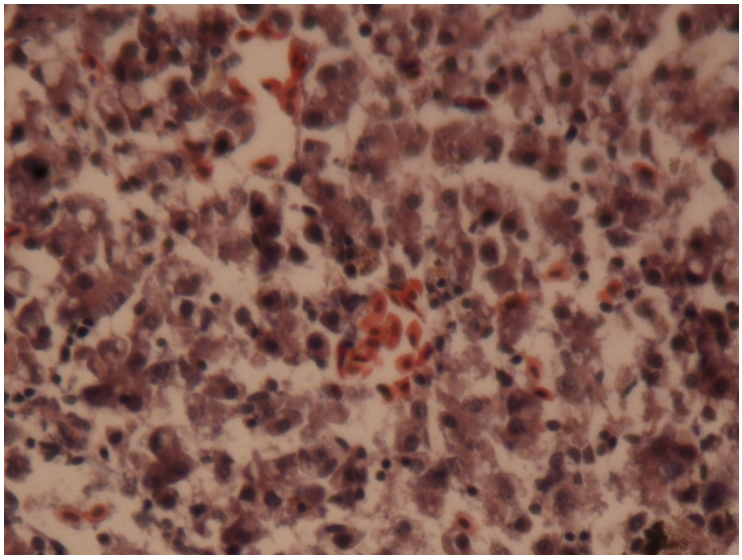
شکل۲۲: پرخونی همراه با فیبروز و نکروز سلولی-تیمار۲ عصاره سیر (H&E - X۴۰)



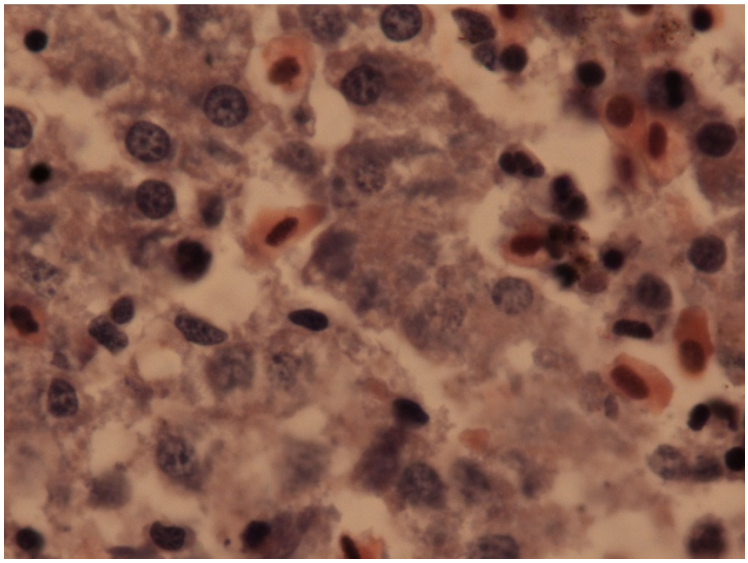
شکل ۲۳: دژنراسیون چربی، پرخونی در بافت کبد – تیمار۳ عصاره آویشن شیرازی (H&E - X۴۰)



شکل ۲٤: دژنرسانس چربی، نکروز سلولی– تیمار۳ عصاره سیر(H&E -X100)



شکل ۲۵: پرخونی و نکروز سلولی شدید– تیمار٤ عصاره آویشن شیرازی (H&E - X۴۰)

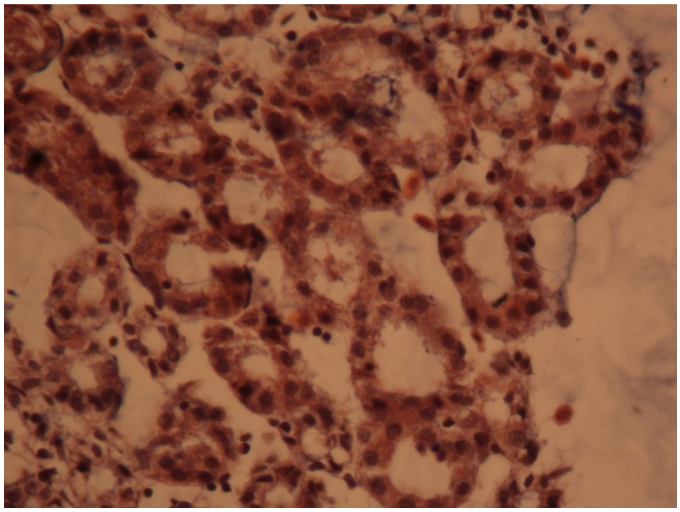


شکل ۲٦: خونریزی و نکروز سلولی و هیپرتروفی –تیمار٤ عصاره سیر (H&E - X۴۰)

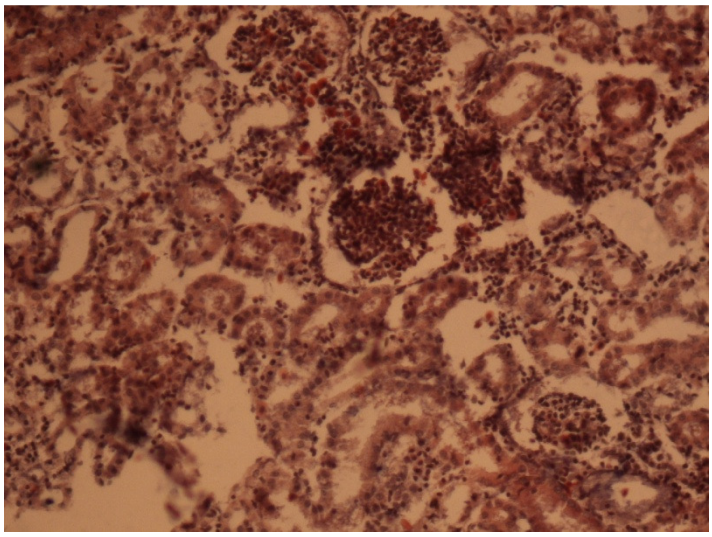
۳-٦-۳- آسیب های بافت کلیه

بررسی مقاطع بافتی تهیه شده از کبد تاس ماهیان مورد بررسی در این مطالعه که طی یک هفته با استفاده مقادیر مختلف عصاره های سیر و آویشن شیرازی تحت تیمار قرار گرفته بودند از بروز برخی از آسیب های میکروسکوپیک حکایت دارد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه با افزایش غلظت عصاره های مورد بررسی در گروه های تیمار آسیب های میکروسکوپیک به شکل گسترده تری در کبد ظاهرگردند.در بررسی مقاطع

بافتی کلیه در تیمارهای مختلف عوارضی نظیر اتساع فضای گلومرولی و مسدود شدن فضای بومن، پرخونیHyperemia، نکروز سلولیNcrosis، تورم سلولی Cell swelling وهیپرتروفیHyperthophy مشاهده گردید. (شکل های۲۷ تا ۳۳).

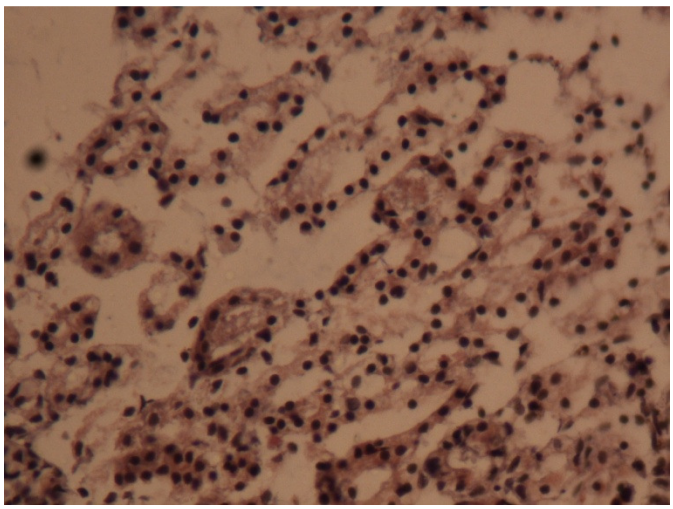


شکل ۲۷: پرولیفراسیون مزانشیم و نکروز سلولی – تیمار۱ عصاره آویشن شیرازی (H&E ، X۴۰)

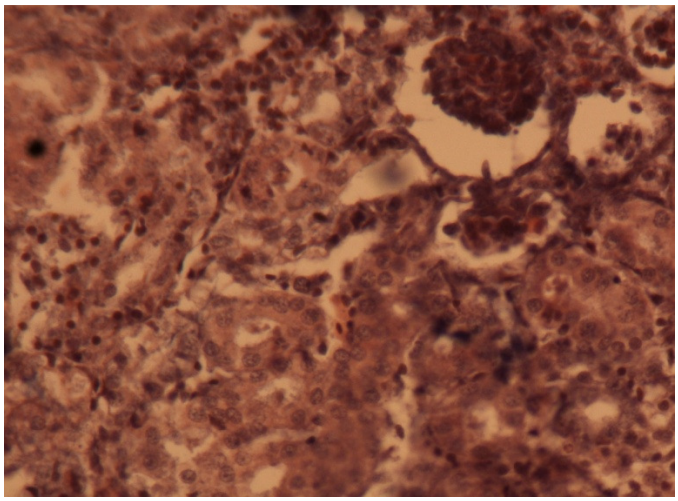


شکل ۲۸: حضور ذرات ائوزینوفیلی در داخل سلول های اپیتلیال و نکروز سلولی

تیمار۱ عصاره سیر (H&E ، X۲۰)

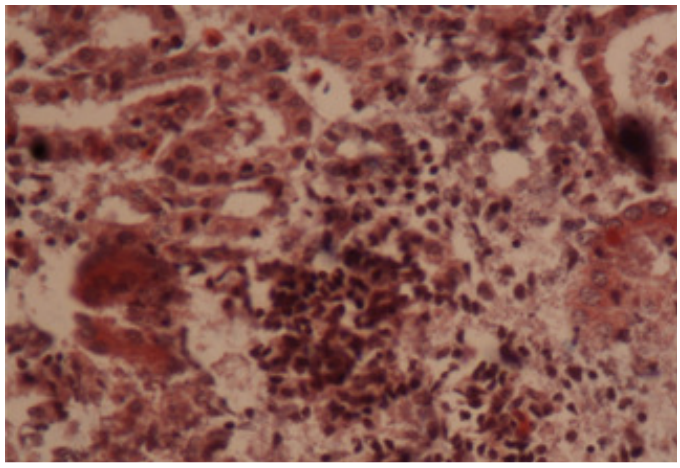


شکل ۲۹: مشاهده نکروز سلول- تیمار۲ عصاره آویشن شیرازی (H&E ، X۱۰)

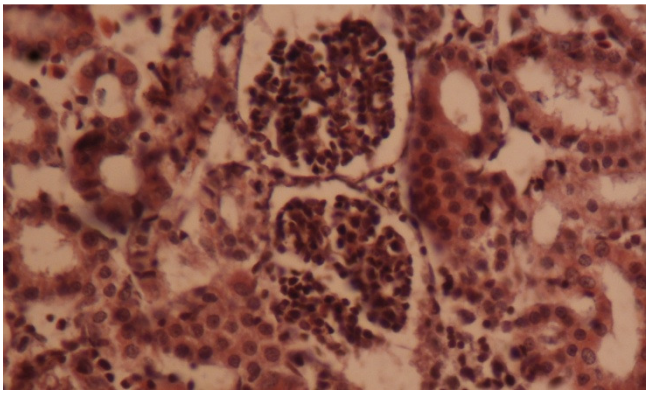


شکل ۳۰: مشاهده اتساع فضای گلومرولی ، پرخونی ، هیپرتروفی و

بسته شدن لوله لومن- تیمار۲ عصاره سیر (H&E ، X٤٠)



شکل ۳۱: نکروز سلولی و خونریزی بسته شدن لوله لومن- تیمار۳ عصاره آویشن شیرازی (H&E ، X۱۰)



شکل ۳۳: اتساع فضای گلومرولی ، هیپرتروفی و بسته شدن لومن تیمار٤ عصاره سیر (H&E ، X۴۰)

٤-بحث و نتیجه گیری

کاهش صید و بهره برداری ماهیان خاویاری از دریای خزر و رودخانه های منتهی به آن و نیز توجیه اقتصادی نسبتا مناسب سرمایه گذاری در پرورش تاسماهیان موجب توسعه پرورش متراکم ماهیان مذکور در نقاط مختلف کشور گردیده است به طوریکه پرورش ماهیان خاویاری از ۱۹ استان کشور گزارش گردیده است.شرایط پرورشی ماهیان خاویاری مانند تراکم نسبتا زیاد ماهیان در استخرهای پرورشی،دستکاری های زیاد ،تغییرات فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب و... شرایط بروز انواع بیماریها خصوصا بیماریهای ناشی عوامل بیماریزای فرصت طلب مانند بیماری باکتریایی آئروموناز‌یس را ماهیان خاویاری فراهم می نماید. بیماری آئروموناز‌یس از مهمترین بیماریهای باکتریایی تاسماهیان در طی دوره پرورش آنها به شمار می آید.باکتری آئروموناس هیدروفیلا از مهمترین عوامل ایجاد کننده بیماری آئروموناز‌یس محسوب گردیده و بر اساس بررسیهای جامع صورت گرفته باکتری مذکور می تواند در طی مراحل مختلف پرورش تاسماهیان را آلوده نموده و بر اساس شدت آلودگی و سنین ماهیان مبتلا منجر به بروز علائم کلینیکی متفاوت و حتی تلفات گردد. با توجه به اینکه باکتری آئروموناس هیدروفیلا بطور طبیعی در اکثر منابع آبی حضور دارند ضروری است به منظور کنترل و حذف باکتری آئروموناس هیدروفیلا در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری اقدامات لازم صورت پذیرد. برای این منظور در حال حاضر از مواد ضد عفونی کننده شیمیایی و نیز از انواع آنتی بیوتیکها جهت درمان ماهیان بیمار استفاده می گردد که نتایج متفاوتی در ارتباط با هر کدام حاصل گردیده است.

تاثیرات سوء زیست محیطی مواد شیمیایی ضد عفونی کننده و آنتی بیوتیکها در کنار اثرات منفی آنها بر مصرف کنندگان از ماهیان تحت درمان مانند ایجاد مقاومت داروئی در برابر عوامل باکتریایی موجب گردیده است امروزه استفاده از مواد طبیعی مانند گیاهان دارویی مورد توجه ویژه قرار گیرد. با توجه به مشکلات و خطرات استفاده از موادشیمیایی لزوم بررسی جایگزین های طبیعی برای این مواد ضد عفونی کننده بیش از پیش احساس می گردد (Yao etal, 2011) .

در این میان نظر به ماهیت طبیعی و تأثیرات گیاهان دارویی در کنترل عوامل بیماریزا سبب گردیده که امروزه گرایش به استفاده از گیاهان دارویی در پزشکی و دامپزشکی از جمله در بهداشت و بیماریهای آبزیان بیش از پیش مورد توجه قرارگیرد.با توجه به خواص متعدد گزارش شده از جمله تاثیرات ضد باکتریایی گیاهان دارویی سیر و آویشن شیرازی در تحقیق صورت پذیرفته جهت بررسی تاثیرات عصاره آنها بر روی باکتری آئروموناس هیدروفیلا و نیز تاسماهی ایرانی نسبت به انجام آزمایشات in vitro و in vivo اقدام گردید.

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق مقادیر غلظتهای نیمه کشنده (LC50) عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهی ایرانی طی ۹۶ ساعت به ترتیب برابر ۷۶۶/۶۵ میلی گرم در لیتر و طی یک ساعت برابر معادل ۹۹۳۳/۴۴ میلی گرم در لیتر محاسبه گردید. معصوم زاده و همکاران (۱۳۸۹) غلظت نیمه کشنده (LC50) اسانس آویشن شیرازی طی ۹۶ ساعت بر روی بچه تاسماهی ایرانی را معادل ۱۲/۱۱ میلی گرم در لیتر تعیین نمودند که

با توجه به نوع ترکیب و میزان ماده مؤثره در اسانس، مقادیر آن با بررسی حاضر متفاوت می باشد. شریف روحانی و همکاران (۱۳۹۰) غلظت نیمه کشنده اسانس آویشن شیرازی طی ۹۶ ساعت بر روی بچه قزل آلای رنگین کمان برابر ۱۳/۶ میلی گرم در لیتر تعیین نمودند.

در این مطالعه مقادیر غلظتهای نیمه کشنده (LC50) عصاره هیدروالکلی سیر بر روی بچه تاسماهی ایرانی طی ۹۶ ساعت به ترتیب معادل ۱۲۷۹/۹۷ میلی گرم در لیتر و طی یک ساعت برابر ۱۲۶۲۴/۰۸ میلی گرم در لیتر تعیین گردید.Abd El Galil و Aboelhadid در سال ۲۰۱۲ میزان LC50 روغن سیر بر روی ماهی تیلاپیای نیل (O. niloticus) معادلppt ۶۱/۸۶ تعیین نمودند.

بررسی و مقایسه مقادیر غلظتهای نیمه کشندگی LC50 عصاره های سیر و آویشن شیرازی حاصل از این بررسی از بالا بودن محدوده سلامت عصاره های مذکور و کم خطر بودن آنها نسبت به مواد شیمیایی ضد عفونی کننده حکایت دارد . بر اساس نتایج مطالعات انجام شده LC50 سولفات مس و پرمنگنات پتاسیم در بچه تاسماهی ایرانی طی ۹۶ ساعت به ترتیب ۱۵برابر/۰ و ۰/۴۱ میلی گرم در لیتر تعیین گردید (مشتاقی و همکاران، ۱۳۸۹)که نشانگر پایین بودن محدوده سلامت و پر خطر بودن ضد عفونی کننده های شیمیایی مذکور حکایت دارد.

بررسی نتایج مطالعات محققین مختلف در ارتباط با مقادیر غلظتهای نیمه کشندگی (LC_{50}) فرآورده های گیاهان دارویی و مواد شیمیایی از کم خطر بودن فرآورده های گیاهان دارویی نسبت به مواد شیمیایی در اغلب موارد حکایت دارد. رودبارکی (۱۳۹۲) مقادیر LC50 عصاره گیاه اکالیپتوس طی ۹۶ ساعت در بچه ماهیان کپور علفخوار(آمور) را معادل ۲۴۷۸/۵۶ ppm محاسبه نمود در حالیکه جوینده (۱۳۹۱) LC50 سولفات مس و پرمنگنات پتاسیم در ماهی آمور طی ۹۶ ساعت را به ترتیب برابر ۴/۸۹۵ ppm و ۱/۰۵ ppm تعیین نمود که در مقایسه با LC50 تعیین شده برای عصاره اکالیپتوس در مقادیر پایینی قرار داشته که این امر از سمی و پر خطر بودن این مواد شیمیایی نسبت به عصاره اکالیپتوس حکایت دارد. اسوبودا (۱۹۹۵)در بررسی خود نشان داد مقادیر درمانی پرمنگنات پتاسیم خیلی نزدیک به غلظتهای نیمه کشنده برای ماهی است.همچنین Kori-Siakpere در سال ۲۰۰۸ سمیت حاد پرمنگنات پتاسیم بر روی گربه ماهی آفریقایی(Clarias gariepinus) مورد بررسی قرار داد ، بطوریکه LC50 ۹۶ ساعته آن را معادل ۳/۰۲میلی گرم در لیتر تعیین نمود این مطالعه نشان داد که سمیت Kmno4 مخصوصاً در آب با pH بالا بوسیله ایجاد ذرات ریز منگنز اکسیده ،آبشش ماهی را مسدود کرده و اختلال تنفسی ایجاد می نماید.

بالا بودن مقادیر نیمه کشندگی (LC50) فرآورده های گیاهان دارویی نسبت به مواد شیمیایی را علاوه بر تاثیرات ترکیبات موجود در آنها می توان احتمالا به نیمه عمر پایین فرآورده های گیاهان دارویی و تجزیه سریع و عدم تجمع بافتی آنها نسبت داد.با توجه به این امر گیاهان دارویی می توانند جایگزین مناسبی برای مواد شیمیایی در کنترل عوامل بیماری زا در آبزیان معرفی نمود.

در این تحقیق حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی به ترتیب برابر1میکروگرم در میلی لیتر و0/25 میکروگرم در میلی لیتر تعیین گردید.همچنین مقادیر حداقل غلظت کشندگی کنندگی (MBC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی به ترتیب برابر 2 میکروگرم در میلی لیتر و0/5 میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد.بررسی و مقایسه نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج سایر مطالعات صورت گرفته در ارتباط با گیاهان دارویی نشان می دهد عصاره های مورد بررسی در این مطالعه خصوصا عصاره آویشن شیرازی دارای تاثیرات باکتریواستاتیکی و باکتریسیدی مناسبی بر روی باکتری آئروموناس هیدروفیلا می باشند.مقایسه نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج بررسی تاثیر عصاره ۹ گیاه دارویی بر روی باکتری آئروموناس هیدروفیلا که توسط علیشاهی و همکاران (۱۳۸۹) انجام پذیرفت نشان می دهد مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره آویشن شیرازی مشابه می باشد.همچنین بر اساس نتایج علیشاهی و همکاران (۱۳۸۹) عصاره های آویشن شیرازی و عصاره پوست انار از بیشترین قدرت باکتریسیدی در مورد باکتری آئروموناس هیدروفیلا در بین ۹ عصاره گیاه دارویی مورد بررسی برخوردار بودند. همچنین بررسی نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج بررسی قدرت ضد باکتری عصاره متانولی آویشن شیرازی بر روی باکتری لاکتوکوکوس گارویه (کوهپایه و همکاران ، ۱۳۸۸) و نیز بررسی تاثیر عصاره های آبی و الکلی آویشن شیرازی بر روی باکتری اشرشیاکولی انتروهموراژیک (گودرزی و همکاران ،۱۳۸۵) مطابقت دارد.

مقایسه اثرات ضد باکتریایی عصاره آویشن با آنتی بیوتیک فورازولیدون نشان می دهد اگرچه فورازولیدون از نظرحداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) وحداقل غلظت کشندگی کنندگی (MBC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا و نیز از نظر هاله ممانعت از رشد باکتری مذکور دارای قدرت باکتریواستاتیکی و باکتریوسیدی قوی تری نسبت به عصاره آویشن برخوردار می باشد اما با توجه به تاثیرات نسبتا مناسب این عصاره می توان با خالص سازی مواد موثره آن بعوان جایگزین گیاهی مناسبی برای آنتی بیوتیک ها بویژه آنتی بیوتیک هایی که باکتریها نسبت به آنها مقاومت یافته اند استفاده نمود(علیشاهی و همکاران ، ۱۳۸۸).

در ارتباط با تاثیرات عصاره سیر بر روی عوامل بیماریزا مطالعات متعددی در داخل و خارج از کشور صورت پذیرفته است.بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه و نیز سایر مطالعات صورت گرفته عصاره سیر دارای تاثیرات ضد باکتریایی کمتری نسبت به برخی از گیاهان دارویی برخوردار بوده و بیشتر دارای تاثیرات ضد انگلی بویژه بروی انگل های خارجی ماهی می باشد(and Soko., 2005; Chiamanat *et al.,* 2005; Madsen *et al.,* 2000 Abd El Galil *et al.,* 2012; Noor El Deen *et al.,* 2009; *Bartolome et al.*,2007 ; Barker و بازاری مقدم و همکاران., ۱۳۹۲).

بر اساس مطالعات صورت گرفته عصاره های آویشن شیرازی و سیر از نظر نوع و میزان ماده موثره با یکدیگر متفاوت می باشند. بر اساس آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده گیاه آویشن تیمول و کارواکرول دو ماده اصلی

تشکیل دهنده این گیاه می باشند. بر اساس نتایج تحقیقات صورت گرفته محققین اثرات ضد باکتریایی گیاه آویشن را بیشتر به ترکیبات تیمول و کارواکرول مرتبط می دانند (Dababneh.B.F.,2008). تیمول و کارواکرول دارای اثرات سینرژیستی می باشند (Didry N etal.,1994).

همچنین نتایج آنالیز سیر نشان می دهد آلیسین مهم ترین ترکیب موجود در این گیاه بوده واثرات ضد میکروبی سیر را مربوط به آلیسین می دانند بطوریکه Han و همکاران در سال ۱۹۹۵ اعلام کردند که خواص آنتی بیوتیکی یک میلی گرم آلیسین، معادل IU ۱۵ پنی سیلین می باشد. با توجه به نتایج تعیین مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) وحداقل غلظت کشندگی کنندگی (MBC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره های سیر و آویشن شیرازی در این مطالعه و نوع ترکیبات ضد باکتریایی آنها می توان نتیجه گرفت ترکیبات تیمول و کارواکرول موجود در آویشن شیرازی نسبت به آلیسین موجود در گیاه سیر از تاثیرات ضد باکتریایی قوی تری برخوردارند.همچنین کسب نتایج متفاوت از تاثیرات فراورده های یک گیاه دارویی (عصاره اسانس و...) بر روی عوامل بیماریزا علاوه بر متفاوت بودن ترکیبات موثر آنها در فرآورده های مختلف یک گیاه دارویی (عصاره اسانس و...) می توان به نوع روش های بکار گرفته شده در استخراج فرآورده گیاه دارویی از جمله به نوع حلال مورد استفاده مربوط دانست مثلا عصاره هایی که با روش ها و حلال های متفاوتی از یک گیاه گرفته شده، می توانند اثرات ضد باکتریائی متفاوتی بر روی یک باکتری خاص از خود نشان دهند (۲۸) همچنین زمانی که از دی متیل سولفوکساید به عنوان حلال استفاده شود قارچ ها در مقایسه با باکتر یها نسبت به اسانس اکالیپتوس حساس تر می باشند در حالی که اگر از اتانول به عنوان حلال استفاده شود اثر ضد باکتری اسانس اکالیپتوس از اثر ضد قارچی آن بیشتر می شود(Mahboubi M et al.,2007).از سویی دیگر بر اساس تحقیقی که توسط Roussis وهمکاران (1996) انجام شد که نشان داد تغییر درتأثیر فراورده های گیاهان دارویی بر روی فعالیت میکروارگانیسمهای مختلف به نوع و اندازه مولکولهای ترکیبات مؤثر و قدرت نفوذپذیری آنها به داخل میکروارگانیسم وابسته است.

پس از انجام مطالعات تعیین غلظتهای کشنده عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی و با توجه به نتایج بدست آمده نسبت به انجام مطالعات تعیین غلظتهای تأثیر گذار عصاره های مذکور در مبارزه با باکتری آئروموناس هیدروفیلا و درمان تاس ماهیان ایرانی آلوده شده از طریق تزریق داخل صفاقی باکتری مذکور اقدام گردید. تعیین غلظتهای درمانی عصاره های مورد بررسی در این مطالعه بر اساس مقدار غلظتهای کشنده (**LC50**) عصاره های مذکور طی یک ساعت صورت پذیرفت. در این تحقیق غلظت های ۴۰۰، ۶۰۰،۸۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر برای انجام آزمایشات نهایی بررسی تاثیر عصاره آویشن شیرازی و غلظت های ۶۰۰ ،۸۰۰،۱۰۰ و۱۲۰۰ میلی گرم در لیتر برای انجام آزمایشات نهایی بررسی تاثیر عصاره سیر به روش **in vivo** بر روی تاس ماهیان ایرانی آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا تعیین و نسبت به گروه شاهد مورد ارزیابی قرار گردیدند. در این مطالعه به منظور ارزیابی تاثیر گذاری مقادیر مختلف عصاره های مورد بررسی بر روی ماهیان

آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا،بهبودی و از بین رفتن علائم بالینی بیماری آئروموناز یس و نیز میزان تلفات مشاهده شده در ماهیان هر یک از گروه های تیمار به شاخص های ارزیابی مد نظر قرار گرفتند.بررسی نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد بین مقادیر مختلف عصاره های مورد بررسی در ایجاد بهبودی و از بین بردن علائم بالینی بیماری آئروموناز یس و نیز میزان تلفات مشاهده شده اختلاف معنی داری مشاهده نمی گردد در بین گروه های تیمار و شاهد اختلاف معنی دار آماری می شود بطوریکه کلیه ماهیان گروه های شاهد قبل اتمام مدت آزمایش (یک هفته) تلف گردیدند. با توجه به نتایج حاصل اگرچه اختلاف معنی داری در بین گروه های تیمار مشاهده نگردید اما غلظت های ۱۰۰۰ و۸۰۰ میلی گرم در لیتر عصاره های سیر و آویشن شیرازی جهت درمان تاسماهیان ایرانی آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا با استفاده از روش حمام کوتاه مدت به مدت یک هفته و روزانه به مدت یک ساعت مناسب تشخیص داده شد.

بررسی مطالعات صورت گرفته در خصوص تاثیرات ضد باکتریایی گیاهان دارویی در ماهیان مختلف نشان می دهد غالب مطالعات مذکور صرفا به روش آزمایشگاهی (in vitro) تاثیرات ضد باکتریایی گیاهان دارویی را مورد بررسی قرار داده اند. Ramasamy Harikrishnan و Chellam Balasundaram در سال اثرات عصاره های ۳ گیاه دارویی turmeric *Curcuma longa*, Tulsi plant *Ocimum sanctum*, neem *Azadirachta indica*, بر روی ماهیان گلدفیش آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا را در به روش in vitro و in vivo مورد بررسی قرار دادند آنها به منظور تیمار ماهیان آلوده شده نسبت به حمام آنها روزانه به مدت ۵ دقیقه در وانهای محتوی یک لیتر از محلول یک درصد سه عصاره گیاهی مورد بررسی اقدام نمودند نتایج حاصل بیانگر تاثیرات سینرژیستی سه عصاره گیاهی مورد بررسی در بهبود شاخص های هماتولوژی ماهیان آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا داشت.همچنین Sharanu و همکاران در سال۲۰۰۷ اثرات عصاره های ۱۰گیاه دارویی را بروی ماهیان *Carassius auratus* آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا به روش in vitro و in vivo مورد بررسی قرار دادند آنها ماهیان آلوده شده را به مدت ۱۵ روز با استفاده از غذای محتوی عصاره های مورد بررسی مورد تغذیه قرار داده که بر اساس نتایج تغذیه ماهیان آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا با غذای محتوی عصاره گیاه *phyllanthus emblicca* به مقدار۲۵ میلی گرم به ازای هر گرم وزن بدن ماهی به مدت ۱۵ روز می تواند در بهبود بیماری ناشی از آئروموناس هیدروفیلا موثر باشد.

طی انجام مطالعات تعیین غلظتهای مؤثره عصاره های سیر و آویشن شیرازی در درمان تاسماهیان آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا هیچگونه رفتار غیرطبیعی در آنها مشاهده نگردید که خود حاکی از عدم وجود شرایط استرس زا از قبیل تحریکات عصاره ها و... طی انجام آزمایش مذکور بوده است .

با توجه به اینکه مصرف هر گونه ماده ای به عنوان داروی موثر در درمان بیماریهای ناشی از عوامل بیماریزا مستلزم مطالعات هماتولوژی و پاتولوژی می باشد لذا در این تحقیق مطالعات مذکور در ارتباط با تاثیرات مقادیر مختلف عصاره های سیر و آویش شیرازی در تاسماهیان ایرانی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج بررسی نمونه های خونی تهیه شده از تیمارهای مطالعاتی تعیین غلظتهای کشنده، اختلاف معنی دار آماری در میزان لنفوسیت تیمارهای مختلف نشان داد($P<0.05$) . بطوریکه با افزایش غلظت عصاره های مورد بررسی در میزان لنفوسیتها کاهش مشاهده می گردد. نظر به اینکه کاهش لنفوسیتها در ماهی می تواند به دنبال عوامل استرس زا ایجاد گردد و از آنجا که افزایش غلظت عصاره ها به عنوان یک عامل استرس زا محسوب گردد لذا در این حالت سطوح در گردش لوکوسیتها با زمان تغییر کرده و کاهش تعداد لنفوسیت ها نسبت به تعداد گلبولهای قرمز را شامل می‌شود (Roberts,1989 : Berlin *et al*, 2008). در این بررسی میزان مونوسیت بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی دار آماری نشان نداد ($P>0.05$). مقایسه میزان نوتروفیل خون بچه تاسماهیان ایرانی، حاکی از وجود اختلاف معنی دار آماری بین تیمارها بوده است ($P<0.05$). بطوریکه با افزایش غلظت عصاره ها، میزان نوتروفیل نیز افزایش یافت. با توجه به اینکه وظیفه نوتروفیل‌ها دفاع بر علیه عفونت‌ها و حرکت به سمت نواحی آسیب دیده بافتی می باشد لذا با افزایش آسیب های بافتی در غلظتهای بالاتر عصاره ها، بالطبع می توان شاهد افزایش میزان نوتروفیل ها در خون بود(تاکاشیما، ۱۳۷۸). ائوزینوفیل نیز در تیمارهای مختلف اختلاف معنی دار نشان داد ($P<0.05$) ، بطوریکه میزان آن در شاهد بیش از سایر تیمارها بود. نتایج شمارش گلبولهای سفید بچه فیل ماهیان پرورشی در مطالعه تنگستانی و همکاران در سال ۱۳۹۰ که بمنظور بررسی تأثیر اسانس سیر بر شاخصهای خونی در فیل ماهی انجام شده بود موید نتایج تحقیق حاضر بر روی بچه تاسماهیان ایرانی می باشد. ضمناً در مطالعه Alishahi و Mesbah در سال ۲۰۱۰ بر روی شاخصهای ایمونولوژی *Astronatus ocellatus* نتایجی بدست آمد که تا حد زیادی با نتایج شمارش گلبولهای سفید تعیین غلظت مؤثره عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی مطابقت دارد.

در این مطالعه به منظور بررسی آسیب های بافتی ناشی از مقادیر مختلف عصاره های سیر و آویش شیرازی استفاده شده در تعیین غلظتهای موثر عصاره های مذکور در درمان تاسماهیان ایرانی آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا نسبت به نمونه برداری و تهیه مقاطع بافتی از آبشش، کبد و کلیه ماهیان گروه های تیمار اقدام گردید. بررسی تصاویر تهیه شده از مقاطع بافتی آبشش، کبد و کلیه تاسماهیان ایرانی که تحت تأثیر غلظتهای مختلف کشنده عصاره هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی قرار داشتند برخی از آسیب های میکروسکوپیک را نشان داده است. نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی بافت آبشش حاکی از ضایعات هیستوپاتولوژیک نظیر پرخونی، چسبندگی در رشته های آبششی، نکروز سلولی، وجود رنگدانه های ملانین در رشته های اولیه آبششی می باشد. بررسی مقاطع بافتی کبد در تیمارهای مختلف عوارضی نظیر تورم سلولی در هپاتوسیتها، نکروزسلولی، مشاهده پرخونی، افزایش رنگدانه های ملانین و مراکز ملانو ماکروفاژها بوده است. در بررسی بافت کلیه در تیمارهای مختلف تغییراتی نظیر اتساع فضای گلومرولی و مسدود شدن فضای بومن، خونریزی، نکروز سلولی، تورم سلولی وهیپرتروفی مشاهده گردید. نتایج حاصل از بررسی با مطالعات معصوم زاده و همکاران در سال ۱۳۸۹ که تأثیرات اسانس آویشن شیرازی را در بچه تاسماهیان ایرانی مطالعه نمودند تا

حد زیادی مطابقت دارد. همچنین آسیب های بافتی مشاهده شده در این مطالعه با نتایج گزارش شده توسط بازاری مقدم و همکاران در سال ۱۳۹۲ مطابقت دارد. با توجه به نتایج بررسی میکروسکوپی اسلایدهای تهیه شده از مقاطع بافتی در گروههای تیمار افزایش مقادیر عصاره های سیر و آویشن شیرازی موجب افزایش شدت آسیبهای بافتی می گردد لذا به نظر می رسد استفاده از حمام عصاره های مورد بررسی بر روی بچه تاسماهیان ایرانی انگشت قد با اهداف درمانی باید به کمترین مقادیر ممکن غلظت عصاره ها و نیز کمترین مدت زمان جهت تیمار ماهیان باید محدود گردد (معصوم زاده و همکاران، ۱۳۸۹).

پیشنهادها

۱- با توجه به توسعه پرورش ماهیان خاویاری در کشور و در نتیجه امکان بروز بیماری آئروموناز‌یس به منظور جلوگیری از تاثیرا سوء مواد ضد عفونی کننده شیمیایی و آنتی بیوتیکها لزوم جایگزینی این مواد توسط گیاهان دارویی بومی کشور از جمله عصاره های سیر و آویشن شیرازی در بچه تاسماهی ایرانی توصیه می گردد.

۲- با توجه به اینکه غلظت ۸۰۰ میلی گرم در لیتر عصاره هیدروالکلی آویش شیرازیمی تواند درکاهش تلفات و بهبود علائم ناشی از آلودگی تاسماهیان ایرانی به باکتری آئروموناس هیدروفیلا طی یک هفته با استفاده از حمام روزانه به مدت یکساعت می تواند موثر باشد لذا براساس نتایج این تحقیق می تواند در درمان آلودگی تاسماهیان ایرانی به باکتری آئروموناس هیدروفیلا توصیه می گردد.

۳- با توجه به تأثیر گذاری خوب عصاره های مورد بررسی در این مطالعه در کنترل باکتری آئروموناس هیدروفیلا ، پیشنهاد می گردد که مطالعاتی در خصوص استفاده از این دو عصاره از راه خوراکی نیز صورت گرفته و نتایج حاصل با مطالعه حاضر مقایسه گردد.

۴- ضروری است با توجه به تفاوتهای بین گونه ای تاسماهیان نسبت به بررسی تأثیرات مقادیر مختلف عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی بر فاکتورهای خونی و نیز آسیب های بافتی در کنترل آلودگی های باکتریایی سایر گونه های ماهیان خاویاری نیز تحقیقات جامعی صورت پذیرد.

۴- توصیه می گردد با توجه به تنوع زیاد گونه های گیاهان دارویی در اکثر نقاط کشور، تأثیر گیاهان مذکور بر روی عوامل باکتریایی ماهیان مورد بررسی و مطالعه قرار گیرد.

منابع

۱. ابراهیمی،ع .۱۳۸۵ . تغذیه و نیازهای غذایی ماهیان در آبزی پروری، انتشارات جهاد دانشگاهی واحد صنعتی اصفهان، ۳۰۴ صفحه.

۲. اخلاقی،م ، کشاورزی،م. ۱۳۸۱. وقوع استرپتوکوکوزیز در مزارع پرورش قزل آلای استان فارس،مجله تحقیقات - دامپزشکی ایران ،دوره سوم،شماره دوم، صفحات۱۸۹-۱۸۳

۳. پیربلوطی، ع.ق.، پیرعلی، ا.، پیشکار، غ.ر.، جلالی، م.ع.، رئیسی، م.، جعفریان، م. و حامدی، ب.، ۱۳۹۰. اثر اسانس چند گیاه دارویی بر سیستم ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Onchorynchus mykiss*) ، فصلنامه داروهای گیاهی، سال دوم، شماره ۲، صفحات ۱۵۵-۱۴۹.

۴. تیرزاد، ا.، ترجمه: ربانی، م.، محزونیه، م.، ۱۳۸۳، ایمنی شناسی دامپزشکی، انتشارات دانشگاه تهران، ص ۷۰۶- ۱۵۰ .

۵. - سلطانی، س.، ۱۳۸۰، بررسی اثرات سمی کبالت بر برخی فاکتورهای خونی و بافت آبشش در ماهی کپور نقره ای، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، ص ۴- ۲.

۶. طبرستانی، مجتبی، ۱۳۹۰،خونشناسی پزشکی، سازمان چاپ و نشر مشهد،ص ۱۴۳، ص ۹۵۰.

۷. علیشاهی، م.، نجف زاده ورزی، ح.، قربانپور نجف آبادی، م. و مصباح، م.، ۱۳۸۸. بررسی اثر ضد باکتریایی برخی عصاره های گیاهی بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی عامل استرپتوکوکوزیس در قزل آلا، نخستین همایش ملی بیماری های اقتصادی صنعت پرورش قزل آلای رنگین کمان، ۱۳۸۸/۰۲/۲۷.

۸. علیشاهی، م.، مصباح، م. وخواجه جوپاش، ا.، ۱۳۸۹. مقایسه ی اثر ارگوسان و عصاره گیاه گون بر بازماندگی و برخی فاکتورهای رشد در ماهی اسکار *Astronorus ocellatus*، نخستین همایش ماهیان زینتی ایران، ۱۳۸۹/۰۴/۳۰.

۹. ابطحی، ب.، نظری، ر.، رسولی، ع.، شفیع زاده، پ. ۱۳۸۴. مقایسه شاخص های درمانی داروهای ضد قارچی فرمالین، سبز مالاشیت و پرمنگنات پتاسیم در تاسماهی ایرانی. مجله پژوهش و سازندگی. شماره ۶۷. صفحات ۴۹-۴۲.

۱۰. آذری تاکامی، قباد. ۱۳۷۶. مدیریت بهداشتی و روشهای پیشگیری و درمان بیماریهای ماهی. انتشارات طاها- پریور. ۳۰۴ صفحه.

۱۱. اسوبودوا، ز.، ویکسوا، ب. ۱۹۹۵. تشخیص،پیشگیری و درمان بیماریها و مسمومیتهای ماهی، ترجمه شریف روحانی۱۳۷۴، انتشارات معاونت تکثیروپرورش آبزیان شیلات ایران. ۲۵۶صفحه.

۱۲. آهنگر زاده، م.، شریف روحانی، م.، سید مرتضایی، ر.، هوشمند کوچی، ح.، کر، ن م. ۱۳۸۶. بررسی اثر اسانس آویشن شیرازی بر روی تعداد کل باکتری و قارچ در مرحله انکوباسیون تخم ماهی کپور ،پنجمین گرد همایی دامپزشکان علوم بالینی ایران ،دانشگاه اهواز .

۱۳. تاکاشیما، اف.، هیبایا ، تی. ۱۳۷۸. اطلس بافت‌شناسی ماهی، ترجمه ایرج پوستی و عبدالحمید صدیق مروستی .دانشگاه تهران، موسسه چاپ و انتشارات ، ۳۲۸ صفحه

۱۴. تنگستانی، ر.، علیزاده، ا.، ابراهیمی، ع.، زارع، پ. ۱۳۹۰. اثر اسانس گیاه سیر بر شاخصه های هماتولوژیک فیل ماهیان جوان پرورشی. مجله تحقیقات دامپزشکی. دوره ۶۶. شماره ۳ . ۲۱۶-۲۰۹.

۱۵. جعفرزاده خسروی، ف . ۱۳۶۶. بررسی اثرات ضد قارچی گیاهان منطقه سمنان (قسمت اول)، پایان نامه دکتری داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران شماره ۲۵۵۵ ، ۷۱ ص.

۱۶. چالکشی امیری، م. ۱۳۷۶. اصول تصفیه آب . نشر ارکان .۴۲۸ صفحه

۱۷. رجحان،م.ص.ضروریات بافت شناسی(جامع ۱). انتشارات چهر.تهران ۲۱۷ صفحه.

۱۸. سلطانی، م. ، اسفندیاری ، م. ، خضرایی نیا ، س. ، ساجدی ، م .۱۳۸۸. ارزیابی اثرات اسانس آویشن شیرازی بر میزان تفریخ تخم قزل آلای رنگین کمان و درصد بقائ لارو آن در مقایسه با آب اکسیژنه و مالاشیت گرین . مجله تحقیقات دامپزشکی دانشگاه تهران ، دوره ۶۴ ، شماره ۲ ، ص ۱۳۴-۱۲۷ .

۱۹. شریف روحانی، م. ۱۳۸۴. بررسی کاربرد برخی اسانس ها گیاهی در کنترل آلودگیهای قرچی تخم ماهیان قزل آلای رنگین کمان بعنوان جایگزین احتمالی مالاشیت گرین در شرایط کارگاهی ، پایان نامه دکترای تخصصی بهداشت و بیماری های آبزیان دانشگاه تهران . شماره ۱۹۳.

۲۰. شریف روحانی، م.، حقیقی، م. و عصاییان، ح. ۱۳۹۰. غلظت نیمه کشنده اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) در بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان پرورشی. مجله علمی شیلات ایران. سال بیستم. شماره ۲. تابستان ۱۳۹۰. صفحات ۸۹ تا ۹۵.

۲۱. شناور ماسوله، ع. سلطانی، م. معصومیان، م. ابراهیم زاده موسوی، ح. جلیل‌پور، ج. سیف زاده، م. ۱۳۷۹. گزارش نهایی پروژه بررسی کمی و کیفی بچه ماهیان خاویاری (بخش کنترل کیفی)، موسسه تحقیقات شیلات ایران.

۲۲. شناور ماسوله، ع. سلطانی، م. معصومیان، م. ابراهیم زاده موسوی، ح. جلیل‌پور، ج. ۱۳۸۰. گزارش نهایی پروژه بررسی کمی و کیفی بچه ماهیان خاویاری (بخش کنترل کیفی)، موسسه‌تحقیقات شیلات ایران. ۸۵ صفحه.

۲۳. شناور ماسوله، ع. سلطانی، م. معصومیان، م. ابراهیم زاده موسوی، ح. جلیل‌پور، ج. معصوم زاده ، م. بازاری مقدم ، س. ۱۳۸۱. گزارش نهایی پروژه بررسی کمی و کیفی بچه ماهیان خاویاری (بخش کنترل کیفی)، موسسه‌تحقیقات شیلات ایران. ۷۹ صفحه.

۲۴. شناور ماسوله، ع. پورکاظمی، م. ستاری، م . جلیل‌پور، ج. معصوم زاده ، م. ۱۳۸۲. گزارش نهایی پروژه بررسی کمی و کیفی بچه ماهیان خاویاری (بخش کنترل کیفی)، موسسه‌تحقیقات شیلات ایران. ۹۶ صفحه.

۲۵. شناور ماسوله، ع. سعیدی، ع. رستمی، ح. پورکاظمی، م. بازاری مقدم، س. جلیل پور، ج. معصوم زاده، م. علیزاده، م. پوردهقان، م. کاظمی، ر. صادقی راد، م. حقیقی، س. ۱۳۸۸. گزارش نهایی طرح ملی بررسی وضعیت بهداشتی مراکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری ، موسسه‌تحقیقات شیلات ایران. ۳۹۰ صفحه.

۲۶. قلعه‌گلاب، ن. موذنی‌جولا، غ. ۱۳۷۸. تأثیرعصاره‌سیربرسالمونلاتیفی‌موریوم‌طیور،موسسه‌تحقیقات‌واکسن‌و-سرم‌سازی‌شعبه‌فارس. ،صفحه ۴ تا ۱۰.

۲۷. عامری مهابادی، م. ۱۳۷۸. روش های آزمایشگاهی هماتولوژی دامپزشکی. موٌسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، شماره ۲۴۴۷. ۱۲۶ صفحه.

۲۸. علیشاهی ،م . مصباح ،م.۱۳۸۹ . اثر لوامیزول ، عصره اکیناسه و آویشن بر بازماندگی . برخی فاکتورهای رشد در ماهی اسکار ، نخستین همایش ماهیان زینتی ایران .

۲۹. محسن زاده، م. گرگان زاده، ا. رضائیان دلوئی، ر. قزوینی، ک. ۱۳۸۲. بررسی خواص ضد باکتریایی غلظتهای مختلف اسانس تعدادی از گیاهان دارویی ایران، خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره دامپزشکی ایران، اسفند ۱۳۸۲، ص ۳۳۳.

۳۰. مشتاقی، ب. نظامی بلوچی، ش. پژند، ذ. شناورماسوله، ع. ۱۳۸۹. تعیین حد کشندگی سولفات مس و پرمنگنات پتاسیم و تأثیر آنها بر وضعیت میکروبی پوست و آبشش و بررسی هیستوپاتولوژیکی بافت آبشش بچه تاسماهیان ایرانی.
پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان. ۱۵۹ صفحه.

۳۱. معصوم زاده، م. شریف روحانی، م. شناورماسوله، ع. بازاری مقدم، س. جلیل پور، ج. علیزاده، م. حقیقی، س. پوردهقانی، م. حلاجیان، ع. ۱۳۸۹. بررسی کاربرد اسانس آویشن شیرازی در کنترل آلودگیهای قارچی تاسماهی ایرانی. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۹۴ صفحه.

۳۲. میرستاری، ق، .۱۳۸۱. اصول زهر شناسی. مرکزدانشگاهی تهران. صفحه.۲۲۰-۱۸۱.

۳۳. علیشاهی، م.، قربانپور نجف آبادی، م.، نجف زاده ورزی، ح. و پشم فروش، م.، ۱۳۸۹. مطالعه اثرات ضد باکتریایی برخی عصاره های گیاهی علیه استرپتوکوکوس اینیایی، یرسینیا راکری و آئروموناس هیدروفیلا، مجله دامپزشکی ایران دوره ششم- شماره ۲- تابستان ۱۳۸۹.

۳۴. فولر، ر.، ترجمه افشار مازندران، ن.، رجب، ا.، ۱۳۸۰، پروبیوتیکها و کاربرد آنها در تغذیه دام و طیور، انتشارات نوربخش، ص ۳۹۰- ۳۵۴.

۳۵. قاسمی، عبدالله . پیر علی ، اسماعیل. پیشکار ، غلامرضا. ۱۳۹۰. اثر اسانس چند گیاه دارویی بر سیستم ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) . فصل نامه گیاهان دارویی. شماره ۲، صفحه ۱۴۹ تا ۱۵۵.

۳۶. قاسمی پیربلوطی، ع .۱۳۸۸ . گیاهان دارویی و معطر(شناخت وبررسی اثرات آن ها)، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی، ۵۰۰ صفحه.

۳۷. مظلومی، م.، ۱۳۸۲، استرپتوکوکوزیس، انتروکوکوزیس، بیماری های مهم اقتصادی در پرورش ماهی، انتشارات نوید، ص۹۴.

۳۸. وهاب زاده رودسری، ح.، زمینی، ع.، عباس زاده مزرعه خلف، م. ۱۳۸۸. تأثیر پروبیوتیک Vanagen بر شاخصهای رشد و بازماندگی قزل آلای رنگین کمان .نخستین همایش ملی بیماریهای اقتصادی صنعت پرورش قزل آلای رنگین کمان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

1. Abdelkhalek, N.K.M.; Zaki, V.H.; Yousef, M.A.A. 2008. Effect of some immunostimulants on health status ans disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). 8th International symposium of tilapia in aquaculture. pp. 1073-1088.
2. Ainsworth, A.J.; Mao, C.P.; Boyle, C.R. 1994. Immune response enhancement in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, using β-glucan from *Schizophyllum commune*. In: Stolen, J.S. Fletcher, T.C. (Eds.). Modulators of Fish Immune Responses. Vol. 1, SOS Publications, Fair Heavan, NJ, 67-81.
3. Alexander, J.B. and Ingram, G.A. 1992. Noncellular nonspecific defense mechanisms of fish. Annu. Rev.Fish Dis. 2: 249–279.
4. Alishahi, M.; Ranjbar, M.M.; Ghorbanpour, M.; Mesbah, M.; Razi Jalali, M. 2010. Effects of dietary *Aloe vera* on some specific and nonspecific immunity in the common carp (*Cyprinus carpio*). Int. J. Vet. Res. 4: 189-195.
5. Alvarez-Pellitero, P.; Sitja, A.B.; Bermudez, R.; Quiroga, I. 2006. Levamisole activates several innate immune factors in *Scophthalmus maximus* (L.). Teleostei. Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 19(4): 727-738.
6. Amery, W.K. 1978. The mechanism of action of levamisole: immune restoration through enhanced cell maturation. J. Reticuloenodo Soc. 23: 181-187.
7. Anderson, D.P.; Swicki, A.K.; Dixon. O.W. 1989. Immunostimulation by levamisole in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) *in vivo*. In Virus of Lower Vertebrates (Ahne, W. and Kurstak, E., Eds.), New York: Sringer-Verlag: pp. 469-478.
8. Anderson, D.P. and Jeney, G. 1992. Immunostimulants added to inject *Aeromonas salmonicida* bacterin enhance the defense mechanisms and protection in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss*). Vet. Immunol Immunopathol. 34(3-4): 379-389.
9. Anderson, D.P. and Swicki, A.K. 1994. Duration of protection against *Aeromonas samonicida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion. Progres. Fish Cul. 56: 258-261.
10. Ardó, L. 2013. Application of herbal extracts to omprove health status and innate immune response of fish. Doctoral PhD Thesis. University of Debrecen. Doctoral School of Animal Husbandry.
11. Baba, T.; Watase, Y.; Yoshinaga, Y. 1993. Activation of mononuclear phagocytes functions by levamisole immersion in carp. Nippon. Suisan. Gakkaishi. 59: 301-307.
12. Atherton, P. 1998. Aloe vera revised. Br. J. Phytotherapy. 4: 176-183.
13. Begum, S.S. and Navaraj, P.S. 2012. Synergistic effect of plant extracts supplemented diets on immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Mystus keletius*. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences. 2(4): 30-36.
14. Beppu, H.; Nagamura, Y.; Fujita, K. 1993. Hypoglycemic and antidiabetic effects in mice of aloe-arborescens miller var natalensis berger. Phytother. Res. 7: S37-S42.
15. Bilen, S. and Bulut, M. 2010. Effects of Laurel (*Laurus nobilis*) on the non-specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Journal of Animal and Veterinary Advances. 9(8): 1275-1279.
16. Bilen, S.; Bulut, M.; Bilen, A.M. 2011. Immunostimulant effects of *Coggyria coggyria* on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Shellfish Immunol. 30: 451-455.
17. Blazer, V.S. 1992. Nutrition and disease resistance in fish. Annu. Rev. Fish Dis. 2: 309-323.
18. Birkemo, G.A.; Luders, T.; Andersen, O.; Nes, I.F.; Nissen-Meyer, J. 2003. Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). J. Biochem. Mol. Biol. Biophys. 1646: 207–215.
19. Boshra, H.; Li, J.; Sunyer, J.O. 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. Fish Shell-fish Immunol. 20: 239–262.

20. Bottenberg, M.M.; Wall, G.C.; Harvey, R.L.; Habib, S. 2007. Oral *Aloe vera*-induced hepatitis. Ann. Pharmacother. 41:1740-1743.
21. Bullock, G.; Blazer, V.; Tsukuda, S.; Summerfelt, S. 2000. Toxicity of acidified chitosan for cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquacul. 185(3-4): 272-280.
22. Bunyapraphatsara, N.; Yongchaiyudha, S.; Rungpitarangsi, V.; Chokechaijaroenporn, O. 1996. Antidiabetic activity of *Aloe vera* L juice. II. Clinical trial in diabetes mellitus patients in combination with glibenclamide. Phytomedicine. 3:245-248.
23. Chalaprawat, M. 1997. The hypoglycemic effects of *Aloe vera* in Thai diabetic patients. J. Clin. Epidemiol. 50(1): 3S.
24. Chantanachookhin, C.; Seikai, T.; Tanaka, M. 1991. Comparative study of the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish. Aquaculture. 99: 143–155.
25. Chen, X.; Wu, Z.; Yin, J.; Li, L. 2003. Effects of four species of herbs on immune function of *Carassius auratus gibelio*. J. Fish Sci. China. 10: 36-40.
26. Chinchar, V.G.; Bryanm L,; Silphadaung, U.; Noga, E.; Wade, D.; Rollins-Smith, L. 2004. Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides. Virology. 323: 268–275.
27. Choi, S.W.; Son, B.W.; Son Y.S.; Park, Y.I.; Lee, S.K.; Chung, M.H. (2001). The wound-healing effect of a glycoprotein fraction isolated from *Aloe vera*. British Journal of Dermatology, 145(4): 535-545.
28. Choi, S.H.; Park, K.H.; Yoon, T.J.; Kim, J.B.; Jang, Y.S.; Choe, C.H. 2008. Dietary Korean mistletoe enhances cellular non-specific immune responses and survival of Japanese eel (*Anguilla japonica*). Fish Shellfish Immunol. 24: 67-73.
29. Choonhakarn, C.; Busaracome, P.; Sripanidkulchai, B.; Sarakarn, P. 2010. A prospective, randomized clinical trial comparing topical Aloe vera with 0.1% triamcinolone acetonide in mild to moderate plaque psoriasis. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 24, 168–172.
30. Choudhury, D.; Pal, A.K.; Sahu, N.P.; Kumar, S.; Das, S.S.; Mukherjee, S.C. 2005. Dietary yeast RNA supplementation reduces mortality by *Aeromonas hydrophila* in rohu (*Labeo rohita* L.) juveniles. Fish and Shellfish Immunol. 19: 281-291.
31. Christybapita, D.; Divyagnaneswari, M..; Dinakaran, M.R. 2007. Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. Fish Shellfish Immunol. 23: 840-852.
32. Cook, M.T.; Hayball, P.J.; Birdseye, L.; Bagley, C.; Nowak, B.F.; Hayball, J.D. 2003. Isolation and partial characterization of a pentraxin-like protein with complement-fixing activity from snapper (*Pagrus auratus,* Sparidae) serum. Dev. Comp. Immunol. 27: 579–588.
33. Cook, M.T.; Hayball, P.J.; Nowak و B.F.; Hayball, J.D. 2005. The opsonising activity of a pentraxin-like protein isolated from snapper (*Pagrus auratus,* Sparidae) serum. Dev. Comp. Immunol. 29: 703–712.
34. Davis, R.H.; DiDonato, J.J.; Johnson, R.W.; Stewart C.B. 1994. *Aloe vera*, hydrocortisone, and sterol influence on wound tensile strength and anti-inflammation. J. Am. Podiatr Med. Assoc. 84(12): 614-621.
35. Davis, K.; Philpott, S.; Kumar, D.; Mendal, M. 2006. Randomised double-blind placebo-controlled trial of *Aloe vera* for irritable bowel syndrome. Int J Clin Pract. 60(9): 1080-1086.
36. De Haas, C.J.; van Leeuwen, E.M.M.; van Bommel, T.; Verhoef, J.; van Kessel, K.P.M.; van Strijp, J.A.G. 2000. Serum amyloid P component bound to Gram-negative bacteria prevents lipopolysaccharide-mediated classical pathway complement activation. Infection and Immunity. 68 1753–1759.
37. Divyagnaneswari, M.; Christybapita, D.; Dinakaran, M.R. 2007. Enhancement of nonspecific immunity and disease resistance in *Oreochromis mossambicus* by *Solanum trilobatum* leaf fractions. Fish Shellfish Immunol. 23: 249-259.
38. Divyagnaneswari, M.; Christybapita, D.; Dinakaran, M.R. 2008. Immunomodulatory activity of *Solanum trilobatum* leaf extract in *Oreochromis mossambicus*. Diseases in Asian Aquaculture. VI: 221-234.
39. Drăgan, S.; Gergen, I.; Socaciu, C. 2008. Food functional with natural bioactive component in metabolic syndrome. Ed. Eurostampa, Timişoara, 314: 200-202.
40. Duffy, J.E.; Carlson, E.A.; Li, Y.; Prophete, C.; Zelikoff, J.T. 2002. Impact of polychlorinated biphenyls (PCBs) on the immune function of fish: age as a variable in determining adverse outcome. Marine Environmental Research. 54: 559–563
41. Duffy, J.E.; Carlson, E.A.; Li, Y.; Prophete, C.; Zelikoff, J.T. 2003. Age-related differences in the sensitivity of the fish immune response to a Coplanar PBC. Ecotoxicology. 12: 251-259.
42. Dügenci, S.K.; Arda, N.; Candan, A. 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. Journal of Ethnopharmacology. 88: 99-106.

43. Ellingsen, T.; Strand, C.; Monsen, E.; Bogwald, J.; Dalmo, R.A. 2005. The ontogeny of complement component C3 in the spotted wolfish (*Anarhichas minor* Olafsen). Fish Shellfish Immunol. 18: 351–358.
44. Ellis, A.E., 1999. Immunity to bacteria in fish. Fish Shellfish Immunol. 9: 291- 308.
45. Ellis, A.E. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. Dev. Comp. Immunol. 25: 827- 839.
46. Eshghi, F.; Hosseinimehr, S.J.; Rahmani, N.; Khademloo, M.; Norozi, M.S.; Hojati, O. 2010. Effects of *Aloe vera* cream on posthemorrhoidectomy pain and wound healing: results of a randomized, blind, placebo-control study. J. Altern. Complement Med. 16(6): 647-650.
47. Esua, M.F. and Rauwald, J.W. 2006. Novel bioactive maloyl glucans from *Aloe vera* gel: isolation, structure elucidation and in vitro bioassays. Carbohydr. Res. 341(3): 355-364.
48. Farahi, A.; Kasiri, M.; Sudagar, M.; Soleimani Iraei, M.; Zorriehzahra, S.M.J. 2012. Effect of dietary supplementation of *Melissa officinalis* and *Aloe vera* on hematological traits, lipid oxidation of carcass and performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Anim. Feed Res. 2(1): 1-5.
49. Fischer, U.; Utke, K.; Somamoto, T.; Kollner, B.; Ototake, M.; Nakanishi, T. 2006. Cytotoxic activities of fish leucocytes. Fish Shellfish Immunol. 20: 209–226.
50. Fulton, J.E. 1990. The stimulation ofpostdermabrasion wound healing with stabilized *Aloe vera* gel – polyethylene oxide dressing. J.Dermatol. Surg. Oncol. 16: 460 – 467.
51. Govind, P. 2013. Some medicinal plants to treat fish ectoparasitic infections. Int. J. Pharmaceu. Res. Sci. 2(2): 532-538.
52. Gottumukkala Venkateswara, R.; Mukhopadhyay, T.; Annamalai, T.; Radhakrishnan, N.; Sahoo, M.R. 2011. Chemical constituents and biological studies of *Origanum vulgare* Linn. Pharmacognosy Res. 3(2): 143–145.
53. Grayfer, L. and Belosevic, M. 2013. Cytokine regulation of teleost inflammatory responses. New Advances and Contributions to Fish Biology. Chapter 2. pp. 59-96.
54. Grinde, B.; Lie, O.; Poppe, T.; Salte, R. 1988. Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture. Aquacultyre. 68: 299-304.
55. Guttvik, A.; Paulsen, B.; Dalmo, R.A.; Espelid, S.; Lund, V.; Bolwald, J. 2002. Oral administration of LPS to Atlantic salmon *Salmo salar* fry, uptake, distribution, influence on growth and immune stimulation. Aquaculture. 214: 35-53.
56. Haghighi, M. and Sharifrohani, M. 2013. The effects of powdered ginger (*Zingiber officinale*) on the haematological and immunological parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Medicinal Plants and Herbal Therapy Research. 1: 8-12.
57. Hajibeglou, A.A. and Sudagar, M. 2010. Immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with herbal immunostimulants diets. Agriculture J. 5(3): 163-172.
58. Haride, L.J.; Flectcher, T.C.; Secombes, C.J. 1990. The effect of vitamin E on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture. 87: 1-13.
59. Haride, L.J.; Flectcher, T.C.; Secombes, C.J. 1991. The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture. 95: 201-214.
60. Haride, L.J.; Ellis, A.E.; Secombes, C.J. 1996. In vitro activation of rainbow trout macrophages stimulates inhibition of *Renibacterium salmoninarum* growth concomitant with augmented generation of respiratory burst products. Dis. Aquat. Org. 25: 175-183.
61. Harikrishnan, R.; Balasundaramb, C; Kim, M.C.; Kim, J.S.; Han, Y.J.; Heo, M.S. 2003. Innate immune response and disease resistance in *Carassius auratus* by triherbal solvent extracts. Fish Shellfish Immunol. 27: 508-515.
62. Harikrishnan, R.; Balasundaramb, C; Heo, M.S. 2010a. Herbal supplementation diets on hematology an innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. Fish Shellfish Immunol. 28: 354-361.
63. Harikrishnan, R.; Heo, J.; Balasundaramb, C; Kim, M.C.; Kim, J.S.; Han, Y.J.; Heo, M.S. 2010b. Effect of *Punica granatum* solvent extracts on immune system and disease resistance in *Paralichthys olivaceus* againt lymphocystis disease virus (LDV). Fish Shellfish Immunol. 29: 668-673.
64. Hibiya, T. 1994. An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany. 5–125.
65. Holland, M.C.H. and Lambris, J.D. 2002. The complement system in teleosts. Fish Shellfish Immunol. 12: 399-420.
66. Hoover, G.J.; Mowafi, A.; Simko, E.; Kocal, T.E.; Ferguson, H.W.; Hayes, M.A. 1998. Plasma proteins rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) isolated by binding to lipolysaccharide from *Aeromonas salmonicida*. Comp. Biochem. Physiol. 120: 559-569.
67. Hrubec, T. C. Ward, D.; Smith, S.A.; Robertson, J.L. 2004. Age related changes in humoral immune response of hybrid striped bass (Morone chrysops × Morone saxatilis). Veterinary Immunol. Immunopathol. 101: 103–108.

68. Ingram, G.A. and Alexander, J.B. 1980. The immune response of the brown trout *Salmo trutta* to lipopolysaccharide. J. Fish Biol. 6: 181–197.
69. Ispir, U. and Yonar, M.E. 2007. Effects of levamisol on phagocytic activity on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.). Acta Vet. Brno. 76: 493-497.
70. Itou, T.; Lida, T.; Kawatsu, H. Kinetics of oxygen metabolism during respiratory burst in Japanese eel neutrophils. Dev. Comp. Immunol. 20: 323-330.
71. Iwama, G. and Nakanishi, T. 1996. Innate immunity in fish. In: The fish immune system. Academic Press, London, UK. p. 73-114.
72. Jain, J. and Wu, Z. 2003. Effect of traditional Chinese medicine on non-specific immunity and disease resistance of large yellow croaker *Psedcosciaena crocea*. Aquaculture. 218: 1-9.
73. Jain, J. and Wu, Z. 2004. Influences of traditional Chinese medicine on non-specific immunity of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). Fish Shellfish Immunol. 16: 185-191.
74. Janssen, P.A. 1976. The levamisole story. Prog. Drug Res. 20: 347-383.
75. Jeney, G. and Anderson, D.P. 1993. Enhanced immune response and protection in rainbow trout *Aeromonas salmonicida* bacterian following prior immersion in immunostimulants. Fish Shelfish Immunol. 3(1): 51-58.
76. Jeney, G.; Galeoti, M.; Jeney, Z.; Anderson, D.P. 1997. Prvention of stress in rainbow trout (O. mykiss) fed diets containing different doses of glucan. Aquaculture, 154: 1-15.
77. Jeney, G. and Jeney, Z. 2002. Application of immunostimulants for modulation of the non-specific defense mechanisms in sturgeon hybrid: *Acipenser ruthenus* x *A. baeri*. J. Appl. Ichthyol. 18: 416-418.
78. Jha, A.K.; Pal, A.K.; Sahu, N.P.; Kumar, S.; Mukherjee, S.C. 2007. Haemato- immunological responses to dietary yeast RNA, w-3fatty acid and β-carotene in *Catla catla* juveniles. Fish Shellfish Immunol. 23: 917-927.
79. Jia, X.; Patrzykat, A.; Devlin, R.H.; Ackerman, P.A.; Iwama,G.K.; Hancock, R.E.W. 2000. Antimicrobial Peptides Protect Coho Salmon from *Vibrio anguillarum* Infections. Appl. Environ Microbiol. 66(5): 1928–1932.
80. Jones, K. 2004. A brief history of skin care with *Aloe vera*. Cosmetics & Toiletries, 119: 71-74.
81. Johnson, K.A.; Flynn, J.K.; Amend, D.F. 1982. Duration of immunity in salmonids vaccinated by direct immersion with Yersinia ruckeri and Vibrio anguillarum bacterins. J. Fish Dis. 5: 207–213.
82. Kajita, Y.; Sakia, M.; Atsuta, S.; Kobayashi, M. 1990. The immunomodulatory effect of levamisole on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Fish Pathol. 25: 93-98.
83. Kanat, O.; Ozet, A.; Ataergin, S. 2006. Aloe vera-induced acute toxic hepatitis in a healthy young man. Eur. J. Int. Med. 17:589.
84. Kathi, J. and Kemper, V. 1999. *Aloe Vera*. Longwood Herbal Task Force: http://www.mcp.edu/herbal/default.htm. 1-24.
85. Keles, O.; AK, S.; Bakirel, T.; Alpinar, K. 2001. Screening of some Turkish plants for antibacterial activity. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 25: 559-565.
86. Keles, O.; Candan, A.; Bakirel, T.; Karatas, S. 2002. The investigation of the anabolic efficiency and effect on the non-specific immune system of zeranol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Turk. J. Vet. Anim. Sci. 26: 925-931.
87. Kim, K.H.; Hwang, Y.J.; Bai, S.C. 1999. Resistance to *Vibrio alginolyticus* in juvenile rockfish *(Sebastes schlegel*) fed diets containing different doses of aloe. Aquaculture. 180: 13-21.
88. Kodama, H.; Matsuoka, Y.; Tanaka, Y.; Liu, Y.C.; Iwasaki, T.; Watarai, S. 2004. Changes of C-reactive protein levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sera after exposure to anti-ectoparasitic chemicals used in aquaculture. Fish Shellfish Immunol. 16: 589–597.
89. Koukoulitsa, C.; Karioti, A.; Bergonzi, C.; Pescitelli, G.; Bari, L.D.; Skaltsa, H. 2006. Polar constituents from the aerial parts of *Origanum vulgare* L. ssp *hirtum* growing wild in Greece. J. Agric. Food Chem. 54: 5388–5392.
90. Kranjnovic-Ozretic, M. 1991. Hematological and biochemical characteristics of reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) Acta Biol. Jogosl. Ichtyologia. 23: 25-34.
91. Kumar, S.; Sahu, N.P.; Pal, A.K.; Choudhury, D.; Yengkokpam, S.; Mukherjee, S.C. 2005. Effect of dietary carbohydrate on haematology, respiratory burst activity and histological changes in *L. rohita* juvenile. Fish Shellfish Immunol. 19: 331-344.
92. Kumar Jha, A.; Pal, A.K.; Sahu, N.P.; Kumar, S.; Mukherjee, S.C. 2007. Haemato-immunological responses to dietary yeast RNA, ω-3 fatty acid and β-carotene in *Calta calta* juveniles. Fish Shellfish Immunol. 23: 917-927.
93. Kumari, J. and Sahoo, P.K. 2006. Non-specific immune response of healthy and immunocompromised Asian catfish (*Clarias batrachus*) to several immunostimulants. Aquqculture. 255: 133-141.

94. Lambas, J. and Ellis, A.E. 1994. Atlantic salmon (*Salmosalar*) neutrophil responses to *Aeromonas salmonicida*. Fish Shellfish Immunol. 4: 201-219.
95. Lange, S.R.; Bambir, S.; Dodds, A.W.; Magnadottir, B. 2004a. The ontogeny of complement component C3 in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) an immunohistochemical study. Fish Shellfish Immunol. 16: 359–367.
96. Lange, S.R.; Bambir, S.; Dodds, A.W.; Magnadottir, B. 2004b. An immunohistochemical study on complement component C3 in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglosus hippoglossus* L.). Dev. Comp. Immunol. 28: 593–601.
97. Lapatra, S.E.; Lauda, K.A.; Jones, G.R.; Sjhewmaker, W.S.; Bayne, C.J. 1998. Resistance to IHN Virus infection in rainbow trout is increased by glucan while subsequent production of serum neutralizing activity is decreased. Fish Shellfish Immunol. 8: 435- 446.
98. Lee, K.H.; Kim, J.H.; Lim, D.S.; Kim, C.H. 2000. Anti-leukaemic and anti-mutagenic effects of di (2-ethylhexyl) phthalate isolated from *Aloe vera* Linne. J. Pharm. Pharmacol. 52(5): 593-598.
99. Lie, O.; Evensen, O.; Sorensen, A.; Froysadal, E. 1989. Study on lysozyme activity in some fish species. Disease of Aquatic Organism. 6: 1-5.
100. Liu, Y.; Iwasaki, T.; Watarai, S.; Kodama, H. 2004. Effect of turpentine oil on C-reactive protein (CRP) production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Shellfish Immunol. 17: 203–210.
101. Londolt, M.L. 1989. The relationship between diet and the immune responses of fish. Aquaculture. 79: 193-206.
102. Lund, V. and Olafsen, J.A. 1998. A comparative study of pentraxin-like proteins in different fish species. Dev. Comp. Immunol. 22: 185-194.
103. MacArthur, J.I. and Fletcher, T.C. 1985. Phagosytosis in fish. In: Fish Immunology by M.J. Manning & M.F. Tatner, Academic Press, London. pp. 29-46.
104. Magnadottir, B.; Lange, S.; Gudmundsdottir, S.; Bogwald, J.; Dalmo, R.A. 2005. Ontogeny of humoral immune parameters in fish. Fish Shellfish Immunol. 19: 429–439.
105. Magnadóttir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish Shellfish Immunol. 20: 137-151.
106. Magnadóttir, B. 2010. Immunological control of fish diseases. Journal of Marine Biotechnology. 12: 361–379.
107. Maier, V.H.; Dorn, K.V.; Gudmundsdottir, B.K.; Gudmundsson, G.H. 2008. Characterisation of cathelicidin gene family members in divergent fish species. Molecular Immunol. 45: 3723–3730.
108. Mandrioli, R.; Mercolini, L.; Ferranti, A.; Fanali, S.; Raggi, M.R. 2011. Determination of aloe emodin in Aloe vera extracts and commercial formulations by HPLC with tandem UV absorption and fluorescence detection. Food Chemistry 126: 387–393.
109. Manning, M.J. and Nakanishi, T. 1996. Cellular defenses. In: Iwama, G.K., Nakanishi, T (eds.): Fish Physiology. XV. The fish immune system. Academic press. London, England. 159-205.
110. Maqsood, S.; Sammon, M.H.; Singh, P. 2009. Immunostimulatory effect of leaf extract of *Ocimum sanctum* Linn. in *Oreochromis mossambicus* (Peters). Hydrobiologia. 403: 113-120.
111. Matsushita, M.; Endo, Y.; Nonaka, M.; Fujita, T. 1998. Complement-related serine proteases in tunicates and vertebrates. Current Opinion in Immunology. 10: 29-35.
112. Maurilio, L.F. 2011. The use of probiotic in aquaculture: an overview. Journal of Microbiology. 2(12): 471-478.
113. McBeath, A.J.A.; Snow, M.; Secombes, C.J.; Ellis, A.E.; Collet, B. 2007. Expression kinetics of interferon and interferon-induced genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following infection with infectious pancreatic necrosis virus and infectious salmon anaemia virus. Fish Shellfish immunol. 22(3): 230-241.
114. Mercaldo-Allen, R.; Dawson, M.A.; Kuropat, C.A.; Kapareiko, D. 2003. Variability in blood chemistry of Yellowtail Flounder, Limanda ferruginea with regard to sex, season and geographic location. NOAA Technical Memorandum NMFS-NE-180: 20.
115. Misra, C.K.; Das, J.; Pradhan, P.; Pattnaik, S.; Sathi, S. and Mukherjee. S.C. 2004. Changes in lysomal enzyme activity and protection against *Vibrio* infection in *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) post larvae after bath immunostimulation with β-glucan. Fish Shellfish Immunol. 17: 389-395.
116. Misra, C.K.; Das, J.; Pradhan, P.; Pattnaik, S.; Sathi, S.; Mukherjee. S.C. 2004. Changes in lysomal enzyme activity and protection against *Vibrio* infection in *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) post larvae after bath immunostimulation with β-glucan. Fish Shellfish Immunol. 17: 389-395.
117. Misra, C.K. 2004. Comparative study on the effect of different immunostimulants on the immune system of *L. rohita* (Homilton, 1822). Ph.D Thesis. CIFE (Inland Aquaculture), Mumbai, India. P. 231.
118. Misra, C.K.; Das, B.K.; Mukherjee. S.C.; Pattnaik, P. 2006. Effect of multiple injections of β-glucan on non-specific immune response and disease resistance in *Labeo rohita* fingerlings. Fish Shellfish Immunol. 20: 305-319.
119. Miyazaki, T. 1998. A simple method to evaluate respiratory burst activity of blood phagocytes from Japanese flounder. Fish Pathol. 33: 141- 142.

120. Morimoto, C.; Abe, T.; Homma, M. 1979. Restoration of T-cells functions in aged mice with long-term administration of levamisole. Clin. Immunopathol. 12: 316-322.
121. Mueller, S.O. and Stopper, H. 1999. Characterization of the genotoxicity of anthraquinones in mammalian cells. Biochim. Biophys. Acta. 1428: 406-414.
122. Mulero, V.; Esteban, M.A.; Munoz, J.; Meseguer, J. 1998. Dietary intake of levamisol enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilhead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish Shellfish Immunol. 8: 49-62.
123. Mulero, I.; Garcia Ayala, A.; Meseguer, J.; Mulero, V. 2007. Maternal transfer of immunity and ontogeny of autologous immunocompetence of fish: A mini review. Aquaculture. 268: 244–250.
124. Namaware, Y.K.; Baker, H.N.; Tomlinson, M.G. 1994. The effect of various stress, corticosteroids and adrenergic agents on phagocytosis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish Physiol. Biochem. 13: 31-34.
125. Nassiff, H. A.; Fajardo, F.; Velez, F. 1993. Effectof Aloe on hyperlipidemiain patient's refractory tothe diet.Rev.CubaMed.Gen.Integr. 9:43-51.
126. Nauta, A.J.; Daha, M.; van Kooten, C.; Roos, A. 2003. Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins. Trends in Immunology. 24: 148–154.
127. Nayak, S.K.; Swain, P.; Nanda, S.; Dash, S.; Shukla, S.; Meher, P. K.; Maiti, N.K. 2008. Effect of endotoxin on the immunity of India major carp, *Labeo rohita.* Fish Shellfish Immunol. 24: 394-399.
128. Newall, C.A.; Anderson, L.A.; Phillipson, J.D. 1996. Herbal medicines. A guide for health-care professionals. Londen: The pharmaceutical press.
129. Nikoskelainen, S.; Lehtinen, J.; Lilius, E.M. 2002. Bacteriolytic activity of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) complement. Dev. Comp. Immunol. 26: 797-804.
130. Novoa, B.; Figueras, A.; Ashton, I.; Secombes, C.J. 1996. In vitro studies on the regulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophage respiratory burst activity. Dev. Comp. Immunol. 20: 207-216.
131. Nya, E.J. 2009. Studies on dietary supplements for the control of *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Doctor of Philosophy thesis. School of Life Sciences, Heriot Watt University, Edinburgh, UK.
132. Nya, E.J. and Austin, B. 2009a. Use of garlic, *Alium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis. 32: 963-970.
133. Nya, E.J. and Austin, B. 2009b. Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe, as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis. 32: 971-977.
134. Ogunbiyi, P.O.; Conlon, P.D.; Black, W.D.; Eyre, P. 1988. Levamisole-induced attenuation of alveolar macrophage dysfunction in respiratory virus-infected calves. Int. J. Immunopharmacol. 10: 377-385.
135. Oliver, G.; Eaton, C.A.; Campbell, N. 1986. Interaction between *Aeromonas salmonicida* and peritoneal macrophages of brook trout (*Salvelinum fontinalis*). Vet. Immunol. Immunopathol. 12: 223-234.
136. Ozakan, G., Simsek, B., Kuleasan, H. 2007. Antioxidant activities of Satureja cilicica essential oil in butter and in vitro. J. Food. Engineering. 79: 1391-1396.
137. Panigrahi, A.; Kiron, V.; Kobayashi, T.; Puangkaew, J.; Satoh, S.; Sugita, H. 2004. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. Vet. Immunol. Immunopathol. 102: 379- 388.
138. Parry R.M.; Chandan, R.C.; Shahani, K.M. 1965. A rapid and sensitive assay of muramidase. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119: 384-386.
139. Paulsen, S.M.; Lunde, H.; Engstad, R.E.; Robertsen, B. 2003. *In vivo* effects of glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon, *Salmo salar L.* Fish Shellfish Immunol. 14: 39- 54.
140. Pecere, T.; Sarinella, F.; Salata, C.; Gatto, B.; Bet, A.; Dalla Vecchia, F.; Diaspro, A.; Carli, M.; Palumbo, M.; Palu, G. 2003. Involvement of p53 in specific anti-neuroectodermal tumor activity of aloe-emodin. Int. J. Cancer. 106(6): 836-847.
141. Prathyusha, P.; Subramanian, M.S.; Nisha, M.C.; Santhanakrishnan, R.; Seena, M.S. 2009. Pharmacognostical and phytochemical studies on Origanum vulgare L. (Laminaceae). Anc. Sci. Life. 29(2): 17–23.
142. Pugh, N.; Ross, S.A.; ElSohly, M.A.; Pasco, D.S. 2001.Characterization of aloeride, a new high molecular weight polysaccharide from *Aloe vera* with potent immunostimulatory activity. J. Agricultural Food Chemistry. 49(2): 1030–1034.
143. Raa, J.; Roerstad, G.; Ingested, R.; Roberston, B. 1992. The use of immunostimulants to increase resistance of qquatic organisms to microbial infections. In: Shariff, IM., Subasinghe, RP., Arthur JR., editors. Diseases in Asian aquaculture: I. Fish health sections. Manila, Philippines: Asian Fisheries Society. 39-50.

144. Raa, J. 1996. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. Reviews in Fisheries Science. 4(3): 229-288.
145. Raa, J. 1999. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. 172: 63-92.
146. Rabe, C.; Musch, A.; Schirmacher, P.; Kruis, W.; Hoffmann, R. 2005. Acute hepatitis induced by an Aloe vera preparation: a case report. World J. Gastroenterol. 11(2): 303-304.
147. Rao, Y.V.; Das, B.K.; Pardhan, J.; Chakrabarti, R. 2006. Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish Shellfish Immunol. 20: 263-273.
148. Razquin, B.E.; Castillo, A.; Lopez-Fierro, P.; Alvarez, F.; Zapata, A.; Villena, A. 1990. Ontogeny of IgM-producing cells in the lymphoid organs of rainbow trout, *Salmo gardnieri* Richardson: an immunological and enzyme-histochemical study. J. Fish Biology. 36: 159–173.
149. Renox, G. 1980. The general immunopharmacology of levamisole. Drugs. 19: 89-99.
150. Roberston, B.; Rostadt, G.; Engstadt, R.; Raa, J. 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. J. Fish Dis. 13: 391-400.
151. Roberts, T.R. and Hutson, D.H. 1998. Metabolic pathways of agrochemicals part 2: Insecticides and fungicides. The royal society chemistry. Cambridge. UK.
152. Robertson, B. 2006. The interferon system of teleost fish. Fish Shellfish Immunol. 20: 172-191.
153. Roch, P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. Aquaculture. 172: 125-145.
154. Rombout, J.H.; Huttenhuis, H.B.T.; Picchietti, S.; Scapigliati, S. 2005. Phylogeny and ontogeny of fish leucocites. Fish and Shellfish Immunology 19, 441–455.2005. Immunization of carp (*Cyprinus carpio)* with a *Vibrio anguillarum* bacterin: Indications for a common mucosal immune system. Dev. Comp. Immunol. 10: 341–351.
155. Rosca-Casian, O.; Parvu, M.; Vlase, L.; Tamas, M. 2007. Antifungal activity of Aloe vera leaves. Fitoterapia. 78(3): 219-222.
156. Rowley, A. 1990. Collection, separation and identification of fish leucocytes. In: Stolen, J.S.; Fletcher. T.C.; Anderson, D.P.; Kaattari, S.L.; Rowley, A.F. (eds.), Techniques in fish immunology. Fish immunology technical communications. SOS Publications, USA, pp. 113-136.
157. Rubin-Bejerano, I.; Fraser, I., Grisafi, P.; Fink, G.R. 2033. Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans.* Proc. Natl. Acad. Sci.100(19): 11007–11012.
158. Sahoo, P.K. and Mukherjee, S.C. 1999. Influence of the immunostimulant, chitosan on immune responses of healthy and cortisol-treated rohu (*Labeo rohita*). J. Aquacul. Tropics. 14(3): 209-215.
159. Sahu, S., 2004. Antibacterial activity of plant extracts on fish microbial pathogens. MSc. Diss. CIFA. Kausalyaganga BhubaSakai, M. 1999. Current research status of fishimmunostimulants. Aquaculture. 172: 63-92.
160. Sahu, S. 2004. Antibacterial activity of plant extracts on fish microbial pathogens M. F. Sci. Dissertation thesis, CIFA, Kausalyaganga, Bhubaneswar. India. P. 237.
161. Sahu, S.; Das, B.K.; Mishara, B.K.; Pradhan, J.; Sarangi, N. 2006. Effect of *Alium sativum* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. J. Appl. Ichthyol. 22: 1-6.
162. Sahu, S.; Das, B.K.; Pradhan, J.; Mohapatra, B.C.; Mishra, B.K.; Sarangi, N. 2006. *Magnifera indica* kernel as a feed additive on immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Labeo rohita* fingerlings. Fish Shellfish Immunol. 23: 109-118.
163. Sahu, S.; Das, B.K.; Pradhan, J.; Mohapatra, B.C.; Mishra, B.K.; Sarangi, N. 2007. Effect of *Magnifera indica* Kernel as a food additive on immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Labeo rohita* fingerlings. Fish Shellfish Immunol. 23: 109-118.
164. Sakai, D.K. 1992. Repertoire of complement in immunological defense mechanisms of fish. Annu. Rev. Fish Dis. 2: 223-247.
165. Sakai, M.; Kamiya, H.; Ishii, S.; Atsuta, S.; Koybayashi, M. 1992. The immune stimulating effects of chitin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. In: Shariff, M., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R. (eds.). Proceedings of the first symp. On Dis. in Asian Aquacult. 26-29 Nov. Manila, Philippines. pp. 413-417.
166. Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture. 172: 63-92.
167. Sampedro, M.C.; Artola, R.L.; Murature, M.; Murature, D.; Ditamo, Y.; Roth, G.A.; Kivatinitz, S. 2004. Mannan from Aloe saponaria inhibits tumoral cell activation and proliferation. Int. Immunopharmacol. 4: 411-418.
168. Saurabh, S. and Sahoo, P.K. 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. Aquaculture Research 39: 223–239.

169. Schorkhuber, M.; Richter, M.; Dutter, A.; Sontag, G.; Marian, B. 1998. Effect of anthraquinone laxatives on the proliferation and urokinase secretion of normal, premalignant and malignant colonic epithelial cells. Eur. J. Cancer. 34: 1091-1098.
170. Schroder, M.B.; Villena, A.J.; Jorgensen, T.O. 1998. Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobulin producing cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Dev. Comp. Immunol. 22: 507–517.
171. Secombes, C.J. 1990. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In: Stolen, J.S., Anderson, D.P., Roberston, B.S., van Muiswinkel, W.B. (Eds.), Techniques in fish immunology. SOS Publications, Fair Haven, pp. 137-154.
172. Secombes, C.J. and Fletcher, T.C. 1992. The role of phagocytes in the protective mechanism in fish. Annu. Rev. Fish Dis. 2: 53-71.
173. Secombes, C.J. 1996. The non-specific immune system: cellular defenses. In: Iwama, G., Nakanishi, T. editors. The fish immune system: organism, pathogens and environment. San Diago, CA: Academic Press; p. 63-103.
174. Secombes, C.J. and Oliver, G. 1997. Furunculosis. Academic press, New York. pp. 269-296 .
175. Seeley, K.R.; Gillespie, P.D.; Weeks, B.A. 1990. A simple technique for the rapid spectrophotometric determination of phagocytosis by fish macrophages. Mar. Environb. Res. 30: 37-41.
176. Selvaraj, V.; Sampath, K.; Sekar, V. 2004. Extraction and characterization of LPS from *Aeromonas hydrophila* and its effects on survival and haematology of the carp, *Cyprinus carpio*. Asian Fish. Sci. 17: 163-173.
177. Shalaby, A.M.; Khattab, Y.A.; Abdel Rahman, A.M. 2006. Effects of garlic (*Alium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Orechromis niloticus*). J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis. 12: 172-201.
178. Sharon, N. and Lis, H. 1993. Carbohydrates in cell recognition. Sci. Am. 268(1): 82–89.
179. Sharp, G.J.E. and Secombes C.J. 1992.Observations on the killing of *Aeromonas salmonicida* by rainbow trout (*O. mykiss*, Walbaum) macrophages. Diseases in Asian Aquaculture. 1: 379-389.
180. Sharp, G.J.E. and Secombes C.J. 1993. The role of reactive oxygen species in the killing of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* by rainbow trout macrophages. Fish Shellfish Immunol. 3: 119-129.
181. Shelton, R.M. 1991. Aloe vera: its chemical and therapeutic properties. Int. J. Dermatol. 30: 679-683.
182. Shenkin, A.; Cederblad, G.; Elia, M.; Isaksson, B. 1996. Laboratory assessment of protein energy status. Clin. Chim. Acta. 253: S5- S59.
183. Shephard, K.L. 1994. Functions for fish mucus. Reviews in Fish Biology Fisheries 4: 401–429.
184. Shida, T.; Yagi, A.; Nishimura, H.; Nishioka, I. 1985. Effect of aloe extract on peripheral phagocytosis in adult bronchial asthma. Planta Med. 273-275.
185. Silva, F.V.; Guimarães, A.G.; Silva, E.R.; Sousa-Neto, B.P.; Machado, F.D.; Quintans-Júnior, L.J.; Arcanjo, D.D.; Oliveira, F.A.; Oliveira, R.C. 2012. Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano. J. Med. Food. 5(11): 984-991.
186. Singh, R.P.; Dhanalakshmi, S.; Rao, A.R. 2000. Chemomodulatory action of *Aloe vera* on the profiles of enzymes associated with carcinogen metabolism and antioxidant status regulation in mice. Phytomedicine. 7(3): 209-219.
187. Siwicki, A. 1987. Immunostimulating activity of levamisole in carp spawners, *Cyprinus carpio* L. J. Fish Biology. 31: 245-246.
188. Siwicki, A. and Studnicka, M. 1987. The phagocytic ability of the neutrophils and serum lysozyme activity in experimentally infected carp, *Cyprinus carpio*. J. Fish Biol. 31: 57- 60.
189. Siwichi, A.k. and Korwin-Kossakowski, M. 1988. The influence of levamisole on the growth of carp (*Cyprinus carpio*) larvae. Journal of Applied Ichthyology. 4: 178-181.
190. Siwicki, A.K. 1989. Immunostimulating influence of levamisole on non-specific immunity in carp (*C. carpio*). Developmental and Comparative Immunology. 13: 87-91.
191. Siwicki, A.K.; Anderson, D.P.; Dixon, O.W. 1990. In vitro immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spleen cells with levamisole. Developmental and Comparative Immunology. 14(2): 231-237.
192. Siwicki, A.; Anderson. D.P.; Dixon, O.W. 1992. In vitro effect of levamisole on the neutrophil activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Arch. Immunol. Ther. Exp. 40(5-6): 253-256.
193. Siwicki, A.K.; Anderson, D.P.; Rumsey, G.L. 1994. Dietary intake immunostimulants by rainbow trout affects non specific immunity and protection against furunculosis. Veterinary Immunology and Immunopathology. 41: 139-159.

194. Siwicki, A.K. and Studnicka, M. 1994. Stimulation of non specific immunity after immunosuppression induced by chemical stress in carp (*Cyprinus carpio*). In: Muller, R. and Lioyd, R. (Eds.). Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Fishing news Books, Oxford, pp. 148-152.
195. Solem, T.; Jorgenson, J.B.; Robertson, B. 1995. Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharides. Fish Shellfish Immunol. 5: 475-491.
196. Solomkin, J.S.; Mills, E.L.; Scott Giebink, G.; Nelson, R.D.; Simmons, R.L.; Quie, P.G. 1978. Phagocytosis of *Candida albicans* by human leukocytes: opsonic requirements. Journal of Infectious Disease. 137(1): 30-37.
197. Stikney, R.R. 2000. Encyclopedia of aquaculture. Wiley-Interscience Press. Pp. 676-679.
198. Subramanian, S.; Mackinnon, S.L.; Ross, N.W. 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermalmucus of various fish species. Comparative Biochemistry and Physiology B. 148: 256–263.
199. Subramanian, S.; Ross, N.W.; Mackinnon, S.L. 2008. Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. Comparative Biochemistry and Physiology B. 150: 85–92.
200. Sveinbjornsson, B.; Olsen, R.; Paulsen, S. 1996. Immunocytochemical localization of lyzosyme in intestinal eosinophilic granule cells (EGCs) of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J. Fish Dis. 19: 349-355.
201. Swain, P.; Dash, S.; Sahoo, P.K.; Routray, P.; Sahoo, S.K.; Gupta. S.D.; Meher, P.K. Sarangi, N. 2007. Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. Fish Shellfish Immunol. 22: 38-43.
202. Syed, T.A.; Ahmad, S.A.; Holt, A.H. 1996a. Management of psoriasis with *Aloe vera* extract in a hydrophilic cream: a placebo-controlled, double blind study. Trop. Med. Int. Health. 1(4): 505-509.
203. Syed, T.A.; Cheema, K.M.; Ashfaq, A.; Holt, A.H. 1996b. *Aloe vera* extract of 0.5% in a hydrophilic cream versus *Aloe vera* gel for the management of genital herpes in males. A placebo – controlled, double blind, comparative study. [Letter] J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 7: 294-295.
204. Syed, T. A.; Afzal, M.; Ahmad, S. A. 1997. Management of genital herpes in men with 0.5% Aloe vera extract in a hydrophylic cream: a placebo-controlled double blind study. J. Dermatol. Treat. 8: 99-102.
205. Szalai, A.J.; Norcum, M.T.; Bly, J.E.; Clem, L.W. 1992. Isolation of an acute-phase and phosphorylcholine-reactive pentraxin from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Comparative Biochemistry and Physiology B. 102: 535–543.
206. Szalai, A.J.; Bly, J.E.; Clem, L.W. 1994. Changes in serum concentrations of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) phosphorylcholine-reactive protein (PRP) in response to inflammatory agents, low temperature-shock and infection by the fungus *Saprolegnia* sp. Fish Shellfish Immunol. 4: 323-336.
207. Tan, B.K. and Vanitha, J. 2004. Immunomodulatoryand antimicrobial effects of some traditional Chinese medicinal herbs: a review. Curr. Med. Chem. 11(11): 1423–1430.
208. Tatner, M.F. and Horne, M.T. 1983. Susceptibility and immunity to *Vibrio anguillarum* in post-hatching rainbow trout fry, *Salmo gairdneri* Richardson 1836. Dev. Comp. Immunol. 7: 465–472.
209. t'Hart, L.A.; van den Berg, A.J.; Kuis, L.; van Dijk, H.; Labadie, R.P. 1989. An anti-complementary polysaccharide with immunological adjuvant activity from the leaf parenchyma gel of *Aloe vera*. Planta Med. 55(6): 509-512.
210. Tremacoldi, C.R. and Pascholati, S.F. 2002. Detection of trypsin inhibitor in seeds of *Eucalyptus urophylla* and its influence on the *in vitro* growth of the fungi *Pisolithus tinctorius* and *Rhizoctonia solani*. Brazilian J. Microbiol. 33: 281- 286.
211. Vallejo, A.N.; Miller, N.W.; Clem, L.W. 1992. Antigen processing and presentation in teleost immune responses. Annual Review of Fish Diseases. 2: 73-89.
212. Valero, D. 2005. http://www.foodnavigator.com/Science-Nutrition/Aloe-vera-developed-as-natural-preservative.
213. Vázquez, B.; Avila, G.; Segura, D.; Escalante, B. 1996. Antiinflammatory activity of extracts from Aloe vera gel. J. Ethnopharmacol. 55(1): 69-75.
214. Vinodhini, R. and Narayanan, M. 2009. The impact of toxic heavy metals on the hematological parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). Iran. J. Environ. Health Sci. Eng. 8: 23-28.
215. Vogler, B. K. and Ernest, E. 1999. *Aloe vera*: a systematic review of its clinical effectivention. British J. Gen. Practice. 49(447): 823-828.
216. Waagbo, R. 1994. The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon *Salmo salar* L. A review. Aqua. Fish Manage. 25: 175-197.
217. Walter, B.M. and Bilkei, G. 2004. Immunostimulatory effect of dietary oregano etheric oils on lymphocytes from growth-retarded, low-weight growing-finishing pigs and productivity. Tijdschr. Diergeneeskd. 129(6): 178-181.
218. Whyte, S.K. 2007. The innate immune response of finfish. A review of current knowledge. Fish Shellfish Immunol. 23: 1127–1151.

219. Wiegertjes, G.F.; Stet. R.J.M.; Parmentier, H.K.; Van Muiswinkel, W.B. 1996. Immunogenetics of disease resistance in fish, a comparable approach. Dev. Comp. Immunol. 20: 365-381.
220. Willett, C.; Cortes, A.; Zuasti, A.; Zapata, A. 1999. Early hematopoiesis and developing lymphoid organs in the zebrafish. Developmental Dynamics. 214: 323–336.
221. Williams, M.S.; Burk, M.; Loprinzi, C.L. 1996. Phase III double-blind evaluation of an *Aloe vera* gel as a prophylactic agent for radiation-induced skin toxicity. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 36: 345-349.
222. Witeska, M. 1998. Changes in selected blood indices of common carp after exposure to cadmium. Acta Vet. Brno. 3: 289-293.
223. Wu, J.H.; Xu, C.; Shan, C.Y.; Tan, R.X. 2006. Antioxidant properties and PC12 cell protective effects of APS-1, a polysaccharide from *Aloe vera* var. chinensis. Life Sci. 1-2-78(6): 622-630.
224. Yagi, A.; Shibata, S.; Nishioka, I.; Iwadare, S.; Ishida, Y. 1982. Cardiac stimulant action of constituents of *Aloe* saponaria. J. Pharm. Sci. 71(7): 739-741.
225. Yagi, A.; Kabash, A.; Okamura, N.; Haraguchi, H.; Moustafa, S.M.; Khalifa, T. I. 2002. Antioxidant, free radical scavenging and anti-inflammatory effects of aloesin derivatives in *Aloe vera*. Planta Med. 68(11): 957-960.
226. Yagi, A.; Kabash, A.; Mizuno, K.; Moustafa, S.M.; Khalifa, T.I.; Tsuji, H. 2003. Radical scavenging glycoprotein inhibiting cyclooxygenase-2 and thromboxane A2 synthase from *Aloe vera* gel. Planta Med. 69(3): 269-271.
227. Yano, T.; Matsuyama, H.; Mangindann, R.E.P. 1991. Polysaccharide-induced protection of carp, *Cyprinus carpio* against bacterial infection. J. Fish Dis. 14: 557-582.
228. Yano, T. 1996. The non-specific immune system: humoral defense. In: The fish immune system. Organism, Pathogen and Environment. Iwama, G and Nakanishi, T. (Eds.). Academic Press, Londen. Pp. 105-157.
229. Yilmaz, S.; Ergun, S.; Yigit, M. 2011. Effects of thyme, rosemary and fenugreek on some hematological and immunological parameters of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Aquaculture Europe. Conference Rhodes, Greek, p. 311-312.
230. Yin, G.; Jeney, G.; Racz, T.; Xu, P.; Jun, X.; Jeney, Z. 2006. Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture. 253: 39-47.
231. Yin, G.; Ardó, L.; Thompson, K.D,; Adams, A.; Jeney, Z.; Jeney, G. 2009. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio* and protection against *Aeromonas hydrophila*. Fish Shellfish Immunol. 26 (1): 140-145.
232. Yongchaiyudha, S.; Rungpitarangsi, V.; Bunyapraphatsara, N.; Chokechaijaroenporn, O. 1996. Antidiabetic activity of *Aloe vera* L. juice. I. Clinical trial in new cases of diabetes mellitus. Phytomedicine 3: 241-243.
233. Zapata, A.; Diez, B.; Cejalov, T.; Gutierrez-defrias, C.; Cortes, A. 2006. Ontogeny of immune system of fish. Fish Shellfish Immunol. 20:126-136.
234. Zawahry, M.E.L., Rashed Hegazy, M., Helal, M. 1973. Use of aloe in treating leg ulsers and dermatoses. Int. J. Dermatol. 12: 68-73.
235. Zheng, Z.L.; Tan, J.Y.W.; Liu, H.Y.; Zhou, X.H.; Xiang, X.; Wang, K.Y. 2009. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquaculture. 292: 214–218.

Abstract

In recent years, according to increase in consumption of fish in the world, however, due to the lack of control of many common diseases with disease-causing pathogens, the total world production of fish has decreased. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is one of the most preferred species in aquaculture of Iran. Development of an economical artificial to accelerate the growth and to maintain the health status of this fish is of major importance for sustainable rainbow trout culture. Fish diseases are a serious threat to economic viability of any aquaculture practice. Currently, the commercial aquaculture industry prefers to reduce the costs of production. Because the cost of antibiotics used for prevention and treatment of diseases, and excessive use of growth hormones for improving growth performance is very high. However, the development of antibiotic resistant bacterial strains, accumulation of residue in cultured fish and environmental problems associated with the use of chemicals have led to investigate on suitable methods of disease management. Therefore, a new approach to immunotherapy is actively used to prevent or treat fish diseases, increased disease resistance, feed efficiency and growth performance of fish in a sustainable aquaculture industry. In this regard, extensive research has been carried out to test the new compounds led to the development of the aquaculture industry. It has been proved that use of medicinal herbs in fish diet enhance the immune system against infections with various bacteria, especially, *Aeromonas hydrophila* in different species of fish, which is of the major bacterial pathogens, leading to heavy mortality rate and decrease the productivity efficiency, causing high economic loss of the fish farmers. The present project "the use of development medicinal plants in Aquaculture" with 4 separate sections reveled their results as follows:

Part one: In this study, *Origanum vulgare, Aloe vera* extracts and placebo (70 % lactose, 10 % starch and 20 % talc) were used at a rate of 1% and levamisole at a rate of 0.1% of weight feed at a rate 2% of body weight.In conclusion, dried *Origanum Vulgare* and *Aloe vera* extracts at a rate of 1% of weight feed increased specific and non-specific immune systems in rainbow trout (13 and 2 gram) in identical weeks (2, 4, 6, 8 and 10). Therefore, these extracts can use to enhance immune system in aquaculture industry.

Part two: In this study, some non-specific immune responses, hematology and biochemical parameters in rainbow trout juveniles (16 gr mean weight) and their resistance to *Streptococcus iniae* were evaluated following oral administration of *Echinacea purpurea* and *Astragalus sp.* extract. Three concentrations (0.5, 1 and 1.5 gr/kg of feed) of *Echinacea purpurea* and three concentrations (2, 3 and 5 gr/kg of feed) of *Astragalus sp* extract and control group were used for 60 days. Parameters evaluated included: levels of C4, C3 (complement components), free oxygen radicals (respiratory burst), Lysozyme, numbers of lymphocytes, monocytes and neutrophils. In the end, the relative survival rate (RSR) of fish was evaluated against *S. iniae*. The results showed that the levels of C3, lysozyme, oxygen free radicals, the number of neutrophils and lymphocytes in the experiment groups (the highest dose) compared to control group were increased significantly ($p < 0/05$). While, the values of C4 and number of monocytes compared to the control group were not significantly different ($p > 0.05$). The relative survival rates of fish following challenge with *Streptococcus iniae*, were 91/11, 93/33 and 44/44 percent in experiments (*Echinacea purpurea* and *Astragalus sp.)* and control groups, respectively. In conclusion, it may be state that *Echinacea purpurea* and *Astragalus sp.* extracts enhance the non-specific immune system and fish resistance against Streptococcusis, and it seems it can be used as immunostimulant in feed.

Part three: Today, regarding the development of sturgeon rearing and importance of the aquatic health, it is necessary to apply natural material to combat pathogenic factors. Therefore, using medicinal plants is an excellent alternative instead of chemical material to control pathogenic factors. As, protozoan ectoparasites are one of the most important factors which have threatened sturgeon life, so this study carried out to determine lethal concentration of garlic (*Allium sativum*) and *Zataria multiflora* hydroalchoholic extracts on fingerlings of Persian sturgeon
(*Acipenser persicus*) that the efficiency and the effective dose of theses extracts determined for controlling protozoan parasite naming Trichodina. Then, considering the results of the mentioned experiments, the study conducted on effective concentrations (EC_{50}) of these extracts to combat Trichodina protozoan parasite. In this study the concentration of *Zataria multiflora* hydroalchoholic extract for final experiments was 200 to 600 mg/L. Therefore, it was determined for the first time that *Zataria multiflora* extract can be effective to combat Trichodina. The EC_{50} of *Zataria multiflora* extract for 1h bath is 437.62mg/L. Moreover, the concentration of garlic hydroalchoholic extract for final experiments set at 50 to 400 mg/L and the EC_{50} of garlic extract is 172.58 mg/L for 1h. In experiments of EC_{50}, the differential counts of white blood cells (WBC) showed no significant difference in numbers of lymphocytes, monocytes and neutrophils in different treatments ($P>0.05$). But there is significant difference in numbers of eosinophils in different treatments ($P<0.05$). During the experiments of EC_{50} for garlic and *Zataria multiflora* extracts, no abnormal behavior observed in Persian sturgeon fingerlings which indicates that these extracts have not created stressful and irritable conditions. The final effective time for these extracts to completely eradicate Trichodina by garlic hydroalchoholic extract is less than 3h in 172.58 mg/L (EC_{50}). But, for *Zataria multiflora* hydroalchoholic extract, it is less than 5h in

437.62 mg/L. The results showed that in all treatments of garlic hydroalchoholic extract, Trichodina eradicated completely from gill and skin of Persian sturgeon fingerlings during 9h. This time for *Zataria multiflora* hydroalchoholic extract is 12h. The results of this study showed that garlic and *Zataria multiflora* hydroalchoholic extracts with EC_{50} of 172.58 and 437.62mg/L, have categorized in low toxicity materials which are suitable to be replaced with chemical materials. This investigation showed that the therapeutic index of garlic hydroalchoholic extract is 73.15 that found to be more than *Zataria multiflora* hydroalchoholic extract (22.69). So, regarding this index, garlic hydroalchoholic extract is more healthful. Considering the results of this study which indicates the health of these herbal extracts, applying medicinal herbs can be emphasized as a suitable material to be replaced with chemical ones.

Part four: In order to investigate the effect of ethanol extracts of garlic (*Allium sativum*) and *Zataria multiflora*

on *Aeromonas hydrophila* bacteria Persian sturgeon (*Acipenser persicus*)took the kids to the isolation and identification of bacteria , the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of bacteria *Aeromonas hydrophila* by garlic (*Allium sativum*) and *Zataria multiflora* hydroalchoholic extracts to determine the lethal concentrations of hydroalchoholic extracts of garlic (*Allium sativum*) and *Zataria multiflora* hydroalchoholic extracts on Persian sturgeon (*Acipenser persicus*)children , and also to evaluate the efficacy and determine the effective doses of the bacterium *Aeromonas hydrophila* extracts of in vitro and in vivo were measured . Due to the absence of the *Aeromonas hydrophila* identification by molecular country in the study of bacteria isolated from sturgeon disease is suspected after detection by screening DNA extraction and molecular By toward action and results by NSBI *Aeromonas hydrophila* bacteria and Authentication Code NSBI was recorded in Gen Bank JX987090 . Based on studies done in vitro (in vitro) in this study, the minimum inhibitory concentrations (MIC) *Aeromonas hydrophila* bacteria by extracts of garlic and thyme and arrange 1 mg/ml, 0.25mg/ml and the minimum bactericidal concentration (MBC) of bacteria *Aeromonas hydrophila* by the extracts, respectively , and 2mg/ml, 0.5mg/ml.
Study on the pictures taken out from sections of gill, liver and kidny of Persian sturgeon fingerlings (*Acipenser persicus*) showed that in different doses of garlic (*Allium sativum*) and *Zataria multiflora* hydroalchoholic extracts the teretment grups were examined and some microscopic damages observed. They are hyperemia, adhesion in the gill filaments, cell necrosis, melanin pigments in gill primary filaments, cloudy swelling of hepatocytes, liver necrosis, hyperemia and increase in melanin pigments and melano macrophage centers in liver, glomerular changes such as congestion and blocked the dilation of Bowman's space , bleeding, cell

necrosis , cloudy swelling of the in kidney.

key words: *Acipenser persicus;* control group; bacteria *Aeromonas hydrophila;* garlic and medicinal plants

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES SCIECNE RESEARCH INSTITUTE

Project Title : A feasibility study on the application Development of farming aquatic plants in the country
Approved Number: 014-74-12-8913
Author: Mostafa sharif rohani
Project leader Researcher : Mostafa sharif rohani
Collaborator(s) : Haghighi,Maesoom Zadeh,Pourgholam, Bazari Moghadam
Advisor(s): -
Supervisor: -
Location of execution : Tehran province
Date of Beginning : 2011
Period of execution : 3 Years & 3 Months
Publisher : *Iranian Fisheries Science Research Institute*
Date of publishing : 2016
All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES SCIENCE RESEARCH INSTITUTE

Project Title :

A feasibility study on the application Development of farming aquatic plants in the country

Project leader Researcher :
Mostafa Sharif rohani

Register NO.

46541