وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – انستیتو تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر

عنوان :

بررسی تاثیر عصاره های سیر (*Allium sativum*) و آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر باکتریهای آئروموناس هیدروفیلا در بچه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)

مجری :
مهدی معصوم زاده

شماره ثبت
٤٨١٧٥

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- انستیتو تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر

عنوان پروژه : بررسی تاثیر عصاره های سیر (*Allium sativum*) و آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر باکتریهای آئروموناس هیدروفیلا در بچه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)

شماره مصوب پروژه : ۸۹۱۵٤-۸۹۱۳-۱۲-۸٦-۱٤

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : مهدی معصوم زاده

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) :

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : مهدی معصوم زاده

نام و نام خانوادگی همکار(ان) : مصطفی شریف روحانی ، جلیل جلیل پور، سهیل بازاری مقدم ، مهدی علیزاده، ذبیح ا... پژند، علیرضا شناور ماسوله، علی حلاجیان، محمد پوردهقانی، هوشنگ یگانه

نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -

نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : مسعود حقیقی

محل اجرا : استان گیلان

تاریخ شروع : ۸۹/۱۰/۱

مدت اجرا : ۲ سال

ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار : سال۱۳۹۵

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»

پروژه : بررسی تاثیر عصاره های سیر (*Allium sativum*) و آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر باکتریهای آئروموناس هیدروفیلا در بچه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)

کد مصوب : ۸۹۱۵٤-۸۹۱۳-۱۲-۸٦-۱٤

شماره ثبت (فروست) : ٤٨١٧٥ تاریخ : ۹٤/۸/۲٤

با مسئولیت اجرایی جناب آقای مهدی معصوم زاده دارای مدرک تحصیلی دکتری حرفه ای در رشته دامپزشکی می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان در تاریخ ۹۴/۷/۲۵ مورد ارزیابی و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده □ مرکز ■ ایستگاه □

با سمت کارشناس بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان در انستیتو تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر مشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
مقدمه ۳
۱- ۱- بیماری باکتریایی آئروموناز یس ۳
۱-۲- کنترل و درمان بیماری آئروموناز یس در ماهیان ۵
۱-۳- تاثیر گیاه دارویی آویشن شیرازی و سیر در کنترل و نابودی عوامل باکتریایی ۶
۱-۴- اهداف تحقیق ۹
۲- مواد و روش کار ۱۰
۲-۱- مواد مورد استفاده ۱۰
۲-۲- روش عصاره گیری و آزمایشات کمی و کیفی عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی ۱۱
۲-۳- روش عصاره گیری و آزمایشات کیفی عصاره هیدروالکلی سیر ۱۲
۲-۴- جدا سازی و شناسایی باکتری آئروموناس هیدوفیلا ۱۴
۲-۵- تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده گی از رشد(MIC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا ۱۵
۲-۶- تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا ۱۶
۲-۷- اجرای آزمایشات تعیین غلظتهای نیمه کشنده (Lethal Concentration) ۱۷
۲-۸- ایجاد آلودگی تجربی به باکتری آئروموناس هیدروفیلا در تاسماهی ایرانی ۱۸
۲-۹- تیمار ماهیان آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره های سیر و آویشن شیرازی ۱۹
۲-۱۰- بررسی تاثیر عصاره های سیر و آویشن شیرازی بر روی فاکتورهای خونی ۱۹
۲-۱۱- بررسی تاثیرات هیستوپاتولوژیک عصاره های سیر و اویشن شیرازی ۲۰
۲-۱۲- جمع آوری داده ها و تجزیه و تحلیل آماری ۲۲
۳- نتایج ۲۳
۳-۱- جداسازی باکتری از ماهیان مشکوک به بیماری آئروموناز یس ۲۳
۳-۲- تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده گی از رشد(MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) ۲۴
۳-۳- تعیین غلظتهای نیمه کشنده عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی. ۲۷
۳-۴- تیمار تاسماهیان آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا ۳۸
۳-۵- بررسی تاثیر عصاره های سیر و آویشن شیرازی بر روی فاکتورهای خونی ۳۹
۳-۶- بررسی تاثیرات هیستوپاتولوژیک عصاره های سیر و اویشن شیرازی ۴۷

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

۴- بحث و نتیجه گیری ۶۰
پیشنهادها ۶۷
منابع ۶۹
چکیده انگلیسی ۷۴

چکیده

در این تحقیق پس از جداسازی و شناسایی باکتری آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) نسبت به تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) توسط عصاره های سیر و آویشن شیرازی و نیز تعیین غلظتهای کشنده (LC_{50}) عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی در بچه تاسماهی ایرانی و نیز بررسی اثر بخشی و تعیین دوزهای تأثیرگذار

عصاره های مذکور بر روی بچه تاس ماهیان ایرانی آلوده شده به باکتری مرد بررسی در این مطالعه اقدام گردید. با توجه به عدم امکان تهیه باکتری آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) ثبت شده (تایید شده توسط آزمایشات مولکولی) درکشور در این مطالعه باکتری مذکور از ماهیان خاویاری مشکوک به بیماری آئروموئیازیس 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 (*Aeromonas hydrophila*) 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 ترتیب ۲mg/ml و ۰/۵ mg/ml تعیین گردید.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 یک ساعت 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 لیتر و در مدت زمان یک ساعت ۱۲۶۲۴/۰۸ میلی گرم در لیتر تعیین گردید.

در بررسی تعدادگلبولهای سفید نمونه های خونی تهیه شده از ماهیان تیمار شده با مقادیر مختلف عصاره های سیر و آویشن شیرازی جهت تعیین غلظتهای نیمه کشنده (LC_{50}) آنها ، اختلاف معنی دار آماری در میزان لنفوسیت ها و نیز نوتروفیل ها مشاهده گردید($P<0.05$). ولی در میزان مونوسیت ها و نیز ائوزینوفیل ها با مقادیر مختلف عصاره های مذکور اختلاف معنی دار آماری مشاهده گردید ($P>0.05$).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 اسلایدهای 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 و پرورش ماهیان مذکور 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 (*Aeromonas hydrophila*) از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد بطوریکه بر اساس پروژه بررسی کمی و کیفی بچه ماهیان خاویاری از مرحله تکثیر تا رهاکرد (شناور، ۱۳۸۲) و نیز طرح ملی بررسی وضعیت بهداشتی کارگاههای تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری (شناور، ۱۳۸۹) باکتری آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*)

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 بالینی متفاوت و حتی تلفات گردد. با توجه به این امر ضروری است به منظور درمان ماهیان مبتلا به آئرومونیازیس 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 در پزشکی و دامپزشکی از جمله در بهداشت و بیماریهای آبزیان را 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 آئرومونیازیس

بیماری باکتریایی آئرومونیازیس در نتیجه تاثیر آئروموناس های متحرک شامل آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*)، آئروموناس کاویا (*Aeromonas caviae*) و آئروموناس سوبریا (*Aeromonas sobria*) وگونه غیرمتحرک آئروموناس سالمونیسیدا (*Aeromonas salmonicida*) ایجاد می گردد. آئروموناس های متحرک

جزء باکتری های بی هوازی اختیاری ،گرم منفی و غیر هاگ زا می باشند. آئروموناس های متحرک از جمله میکروفلورهای جانوران آبزی می باشند و ممکن است در جانوران خون سرد، خون گرم و حتی انسان بیماریزا باشند اما آئروموناس سالمونیسیدا (*Aeromonas salmonicida*)یک پاتوزن اجباری ماهی می باشد (سلطانی،۱۳۷۵). باکتری آئروموناس هایدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) برای اولین بار در سال ۱۸۹۱ توسط Sanarelli جدا گردید که آنرا باسیلوس هیدروفیلوس فوسکوس نامید (سلطانی، ۱۳۷۵). باکتری آئروموناس هیدروفیلا یکی از باکتریهای مهم در صنعت پرورش ماهی می باشد . این باکتری به عنوان یک عامل بیماریزا در گونه های

مختلف ماهیان آب شیرین و گاهی ماهیان آب شور محسوب می شود (Imani and Akhlaghi, 2004). این باکتری می تواند باعث ایجاد سپتی سمی هموراژیک در گونه های مختلف شده و بیماری حاصل از آن در سراسر دنیا گسترش دارد (Aoki, 1999). برخی از محققین معتقدند آئروموناس هیدروفیلا یک بیماریزای فرصت طلب است و به عنوان یک ارگانیزم همه جایی و نامتجانس می باشد که در شرایط استرس یا در ارتباط با عفونت توسط سایر پاتوژن ها باعث ایجاد بیماری می شود در حالیکه گروه دیگر از محققین معتقدند آئروموناس هیدروفیلا یک عامل بیماریزای اولیه می باشد(Imani and Akhlaghi, 2004). باکتری آئروموناس هیدروفیلا در طبیعت به طور گسترده در آب های شیرین در قسمت رسوبات و نیز در دستگاه گوارش ماهی ها وجود دارد (Sugita *et al*., 1995).

در ایران در ارتباط با بیماریزایی این باکتری درگونه های مختلف ماهیان پرورشی از جمله کپور ماهیان پرورشی (Razavilar *et al*, 1981; Esmaeli and Peighan, 1997; Imani and Akhlaghi, 2004) و ماهیان خاویاری (سلطانی و همکاران،۱۳۷۹; شناور و همکاران،۱۳۸۲; شناور و همکاران، ۱۳۸۹) تحقیقات مختلفی صورت پذیرفته است. آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) می تواند جزئی از فلور میکروبی لوله گوارش ماهیان محسوب شود که در ماهیان با سنین مختلف از جمله تاسماهیان که دچار استرس گردیده و یا توسط عوامل بیماریزای مانند ویروس ها، انگل ها و سایر باکتریها مورد تهاجم قرار می گیرند آئرومونیازیس را ایجاد نماید (مخیر،۱۳۸۵).

عوامل مستعد کننده آئرومونیازیس شامل دمای بالا، تراکم زیاد، آلودگی با مواد آلی و کمبود اکسیژن بوده و ماهیان مبتلا به آئرومونیازیس 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 های نامنظم قرمز ظاهر می شود (مخیر،۱۳۸۵). بروز سپتی سمی هموراژیک (Hemorrhagic septicemia) را می توان از مهمترین تاثیرات باکتری های آئروموناس به حساب آورد. خونریزی های ایجاد شده در اثرآئروموناسهای متحرک ناشی از تاثیر همولیزین (Hemolysin) محلول می باشد که ممکن است موجب جراحات پوستی گردد (سلطانی،۱۳۷۵). علائم بالینی آئرومونیازیس می تواند به صورت یک پرخونی سطحی گسترده در ناحیه وسیعی از بدن بیشتر همراه با نکروز باله ها یا دم تا یک زخم وسیع روی بخش چشمگیری از سطوح جانبی تا ناحیه پشتی متغییر باشد (سلطانی،۱۳۷۵).

آئرومونیازیس می تواند به صورت های فوق حاد با علائم کم، حاد با علائم بالینی 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 آئرومونیازیس

در بیشتر موارد پرخونی احشاء همراه با خونریزی روی روده بند 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. همچنین از سایر علائم بالینی می توان به پرخونی مناطق وسیعی از سطح خارجی ناحیه خلفی همراه با برآمدگی فلس ها اشاره نمود (سلطانی، ۱۳۷۵).

۲-۱- کنترل و درمان آئرومونیازیس 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 ضروری است نسبت به کنترل و درمان ماهیان آلوده به باکتری های مذکور اقدام گردد.

درمان اختصاصی 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 آئرومونیازیس می تواند موثر باشد(مخیر،۱۳۸۵). به منظور کنترل و درمان آئرومونیازیس در ماهی از روشهای مختلفی استفاد می گردد.

واکسیناسیون یک روش انتخابی جهت پیشگیری از بروز بیماری می باشد. با توجه به تنوع آنتی ژنی در میان آئروموناسهای متحرک در صورت استفاده از واکسن و ایجاد مقاومت در برابر یک گونه خاص از این باکتری ها 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 .همچنین مخلوط یک لیتر محلول سبز مالاشیت ۲/۵ درصد با یک لیتر فرمالین جهت نابودی باکتری های آئروموناس نیز استفاده می گردد که با توجه به تاثیرات سوء زیست محیطی محلول سبز مالاشیت در تحقیقات مختلف انجام شده از جمله این تحقیق تلاش گردیده است نسبت به جایگزینی آن با مواد با منشاء طبیعی که فاقد تاثیرات سوء زیست محیطی هستند اقدام گردد.

استفاده از انواع آنتی بیو تیکها همانند درمان سایرانواع بیماریهای باکتریایی می تواند در نابودی باکتریهای آئروموناس موثر باشد. 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). استفاده از آنتی بیوتیکها و مواد ضد میکروبی روش معمول درمان این گونه عفونت ها در پرورش آبزیان می باشد. متعاقب این روش درمانی ایجاد سویه های مقاوم در میکروارگانیزم ها، مسئله باقیمانده دارو در بافت های ماهی و مشکلات زیست محیطی دور از انتظار نیست. از طرف دیگر این مواد شیمیایی موجب ممانعت از رشد فلور باکتریایی دستگاه گوارش ماهی می شوند که خود دارای اثرات مفیدی بر سلامتی ماهی هستند

(Mesalhy Aly *et al*., 2008). همچنین با توجه به سایر عوارض جانبی آنتی بیوتیک ها از جمله مشکلات زیست محیطی، تخریب فلور آب و روده، گرانی و مشکلات اجرایی تجویز آنها استفاده از پروبیوتیک ها که باکتری های با اثرات مفید بر سلامتی هستند و قادرند سیستم ایمنی میزبان را تحریک نمایند به عنوان جایگزین درمان آنتی بیوتیکی مطرح گردیده و به نظر می رسد استفاده از آ ن ها می تواند بسیاری از مشکلات ناشی از درمان و یا کنترل بیماری را مرتفع سازد (Fuller, 1989). همچنین استفاده از محرک های ایمنی شیمیایی مانند لوامیزول و محرک های حاصل از مواد طبیعی مانند آرگوسان که از جلبک لامیناریا دیجیتاتا بدست می آید نیز بکارگیری محرک های ایمنی گیاهی مانند سرخارگل به منظور افزایش قدرت ایمنی و ایجاد مقاومت در مقابل بیماری ها و بهبود فاکتورهای رشد در ماهی ها کاربرد زیادی یافته است (Yuan *et al*., 2008 ; Iwama , 1996 ; Raa ,1996).

علاوه بر تاثیر واکسن ها ،مواد ضد عفونی کننده شیمیایی و آنتی بیوتیکها در کنترل و نابودی باکتری آئروموناس هیدروفیلا از سایر مواد نیز می توان در کنترل و نابودی باکتری آئروموناس هیدروفیلا استفاده نمود.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.همچنین استفاده از

فرآورده های برخی از انواع جلبها و گیاهان دارویی از دیگر روشهایی می باشند که در نابودی عوامل باکتریایی می توانند موثر باشند. با توجه به اثرات سوء زیست محیطی و نیز عوارض سوء مواد ضد عفونی کننده شیمیایی بر روی انسان و نیز ایجاد سویه های مقاوم باکتریایی به دلیل بکارگیری نامناسب انواع آنتی بیوتیکها (شریف روحانی،۱۳۸۳) طی سالیان اخیر استفاده از فرآورده های گیاهان دارویی جهت کنترل و نابودی عوامل باکتریایی بیماریزا 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 حدود۴۰ 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، آنفلوانزا و ضد نفخ در انسان 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. فرآورده های دارویی مختلفی از این گیاه ساخته شده و بطور گسترده

مورد مصرف بیماران واقع می شود. شربت توسیان (Tussian)،قطره توسیگل (Tussi-gol)، قطره توسیوین (Tussivin)، قطره تیم آرتا (Thymarta) و شربت تیمکس(Thymex) از اشکال دارویی آویشن می باشد که عمدتاً بعنوان ضد سرفه و خلط آور مصرف می شوند. ازآویشن خواص ضد باکتریایی نیز گزارش شده است. بطوریکه استفاده از روغن این ماده در محیط کشت نشان دهنده اثر باکتریسیدال (bactericidal) بیشتر آن نسبت به آمپی سیلین علیه باکتریهای اشریشیا کلی(*E.coli*) و استافیلوکوکوس اورئوس(*Staphylococcus aureus*) می باشد. محسن زاده و همکاران 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(*E.coli*) ، استافیلوکوکوس اورئوس(*Staphylococcus aureus*) ، باسیلوس سرئوس(*Bacillus cereus*) و سود ومونـاس ائروژینوزا *Pseudomonas* (*aeruginosa*) را داشته است. نتایج حاصل از آزمایشات نشان دهنده وجود الکالوئید(Alkaloid)، ساپونین(Saponin) ، فلاونوئید (Flavonoid) و تانن(Tannin) 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. مقایسه اثرات ضد قارچی اسانس آویشن و نیستاتین(Nystatin) نشان داد آویشن اثر قویتری نسبت به نیستاتین(Nystatin) روی قارچهای کاندیدا البیکنس(*Candida albicans*)،آسپرژیلوس فلاووس (*Aspergillus flavus*) و تریکوفایتون منتاگریفایتیس (*Trichophyton mentagrophytes*) دارد. همچنین در بررسی گونه دیگری از آویشن که دارای مواد مؤثره تیمول(Thymol)،کارواکرول(Carvacrol) بوده است اثرات قویتری نسبت به نیستاتین(Nystatin) روی آسپرژیلوس فومیگاتوس (*Aspergillus fumigates*) 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 نیز بر روی تخم های قزل آلا (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 آئرومونـاس 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،

Sharif Rohani و همکاران در سال ۲۰۱۳ تحت عنوان بررسی تأثیر خوراکی مقادیر مختلف اسانس آویشن شیرازی بر روی برخی از فراسنجه های 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 گذشته 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 است. مهمترین ترکیب سیرکه خاصیت آنتی بیوتیکی دارد آلیسین(Allicin) 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 برخی از مطالعات، سیر بعنوان یک ماده محرک رشد و بهبود دهنده تغذیه و کارایی غذا در ماهی تیلاپیای نیل(*Oreochromis niloticus*) مورد استفاده قرارگرفته است(Diab *etal*.,2002 ; Shalaby *etal*.,2006). مطالعات متعددی مبنی بر خواص ضد میکروبی سیر تازه و عصاره 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 دارا می باشد و در بهبود ایمنی ماهی نیز مؤثر می 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 and Holub,1997). همچنین در خصوص 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 همسترهاهی و خوک (در مدلهای حیوانی) بررسی هایی 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 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 (*Tricodina* sp.) 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. Buchmann و همکاران در سال ۲۰۰۳ مطالعه ای در خصوص مقایسه اثربخشی پرکربنات سدیم و عصاره سیر بمنظور از بین بردن انگل ایک (*Ichthyophthirius multifiliis*) 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 ایکتیوفیتریوزیس(Ichthyophthiriasis) 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 ایرانی

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 .

۲-۱- مواد مورد استفاده

۲-۱-۱- مواد مصرفی

مواد مصرفی در این پروژه عبارتند از:

بچه تاسماهی ایرانی۳ تا ۵ گرمی، 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 کشتMueller Hinton Broth ،باکتری آئروموناس هیدروفیلا ، 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(Laminar Hood)،دستگاه انکوباتور Memert ، فور(آون)، انکوباتور یخچال دار، بشر، هیتر ، بالن، بالن حجمی یا بالن ژوژه (Volumetric flask) ، بن ماری (water bath) ، 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 (percolation) ، 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 (Filtration)، 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 (percolation)، 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 (CH_2C_{l2}) 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 (water bath) با دمای حداکثر ۴۰ 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.

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

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

آماده سازی معرف: ۰/۸ گرم وانیلین را در ۴۰ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال (CH3COOH) حل 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

به منظور 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 آئرومونیازیس طی مراحل ذیل اقدام گردید :

۱-٤-۲- نمونه برداری و جداسازی باکتری از ماهیان مشکوک به آئرومونیازیس

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 آئرومونیازیس اشاره شده در مطالعات مختلف شامل خونریزی در سطح بدن و قاعده باله های شنا و دم بخصوص در زیر شکم ، پروولاپس 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 بر اساس روشهای استاندارد نمونه برداری جهت انجام بررسی های باکتری شناسی (Austin&Austin, 1993) نسبت به نمونه برداری از آنها اقدام گردید. برای تهیه کشت خالص از اندامهای کبد، کلیه و طحال ماهیان مشکوک به آئرومونیازیس از محیط کشت TSA استفاده گردید سپس پلیت ها به مدت ۷۲- ۲۴ ساعت در گرمخانه ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

۲-٤-۲- شناسایی باکتری های جداسازی شده با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی

بعد از رشد باکتری بر روی محیط های کشت، نسبت به تهیه کشتهای ایزوله اقدام 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.

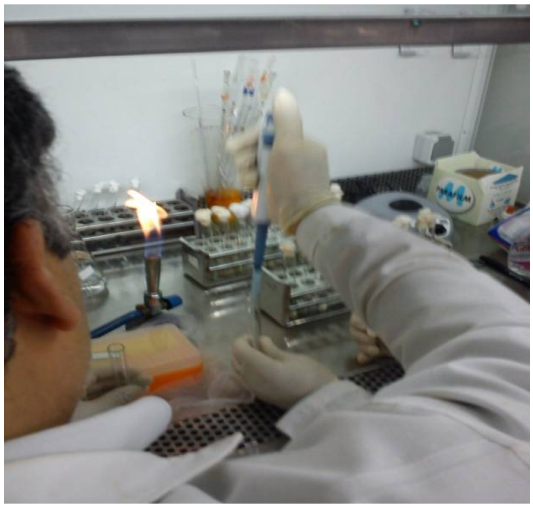
شکل۱-تهیه کشت های باکتریایی از نمونه های تهیه شده از ماهیان مشکوک به آئرومونیازیس

۵-۲- تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد (MIC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره های سیر و آویشن شیرازی

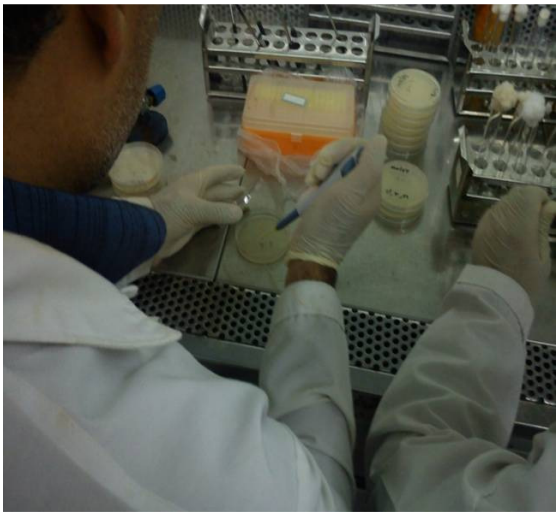
در این بررسی به منظور تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی رشد باکتری آئروموناس هیدروفیلا (MIC) توسط عصاره های سیر و آویشن شیرازی از روش رقت لوله ای (Sindambiwe *etal*., 1999 ; Vanden *etal*., 1991) استفاده گردید.در این روش برای تعیین MIC هر یک از عصاره های مورد بررسی یک سری ۱۰ تایی از لوله های آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. ۸ لوله برای آزمایش رقت های مختلف عصاره و یک لوله به عنوان کنترل مثبت و یک لوله نیز 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 مولر هینتون براث (Mueller Hinton Broth) در لوله های آزمایش اضافه گردید که میزان کدورت حاصل از باکتری با استاندارد ۰/۵ مک فارلند (۱/۵×۱۰^{۸} cfu/ml) تنظیم گردید سپس به لوله های حاوی محیط کشت مولر هینتون براث (Mueller 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 مولر هینتون آگار (Mueller Hinton Agar) مورد بررسی قرار گرفت از محتویات آن دسته از غلظت هایی که در محیط کشت مولر هینتون براث (Mueller Hinton Broth) درآزمایش تعیینMIC فاقد کدورت بودند،به میزان ۱ میلی لیتر برداشت شده و در محیط کشت مولر هینتون آگار(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 شدند، 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 هیدروفیلا توسط عصاره های سیر و آویش شیرازی



شکل۳-آزماشات تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MBC)
باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط 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 سازگاری ، بچه تاسماهیان ایرانی به تشتکهای ۳۰ لیتری مجهز به سیستم هوادهی منتقل شدند. این آزمایشات بر اساس O.E.C.D(TRC,1984)[1] صورت گرفت. در این روش(O.E.C.D) آزمایشات بصورت استاتیک (ثابت) انجام گردید. بدین معنی که محلول آزمایش در فرایند آزمون تغییر نکرده و میزان مرگ و میر ماهی برای آزمایشات تعیین غلظتهای کشنده طی ۹۶ ساعت و نیز یک ساعت ثبت گردید.

پس از ثبت میزان تلفات در طی ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت (درآزمایشات ۹۶ ساعته)و نیز در طی ۳۰ ، ۴۵ و ۶۰ دقیقه (در مطالعات یک ساعته) به منظور تعیین غلظت‌های کشنده LC_{10} , LC_{50} , LC_{90} نسبت به تعیین عدد پروبیت (Probit Value) تلفات از جدول مخصوص (ANOVA) و نیز تعیین لگاریتم غلظت‌های بکار رفته اقدام با بدست آوردن ضرایب a (عدد ثابت) و b (شیب خط) معادله رگرسیون (y = a + bx) تشکیل و برای حل معادله عدد پروبیت مشخص شده به جای y در معادله قرار گرفت (Probit Value = a + b (LogC) با حل معادله و گرفتن Anti Log ازLogC در معادله غلظت‌های‌کشنده LC_{10} , LC_{50} , LC_{90} تعیین و نتایج حاصل به روش Probit analysis (Finney , 1971) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

شکل٤- نمایی از تشتکها مورد استفاده در آزمایشات تعیین LC_{50}

1-Organization Economic Cooperation Development

۱-۷-۲- غلظت های نیمه کشنده ۹۶ ساعته عصاره های هیدرو الکلی سیر و آویشن شیرازی

پس از سپری شدن مراحل سازگاری 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.

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 سازگاری در وانهای فایبرگلاس نگهداری می شدند و۲۴ ساعت قبل از آزمایش غذادهی آنها قطع گردیده بود به تشتکها منتقل شدند. بطوریکه در هر تشتک ۱۰ عدد بچه تاسماهی ایرانی قرار گرفت.

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 سانتریفیوژ شده را با سمپلر برداشته و به لوله آزمایش حاوی سرم فیزیولوژی اضافه و با دستگاه هم زن آنها را یکنواخت 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 آئرومونیازیس 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 های۴۰۰،۶۰۰،۸۰۰ و۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر و توسط عصاره سیر غلظت های۶۰۰،۸۰۰،۱۰۰۰ و۱۲۰۰ میلی گرم در لیتر تهیه و بر اساس مقادیر مذکورگروه های تیمار و شاهد انتخاب و برای هر کدام از این گروه ها سه تکرار در نظر گرفته شد . پس از تعیین گروههای تیمار و شاهد نسبت به حمام ماهیان آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا (که علائم آئرومونیازیس 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 طی۷ روز اقدام و تغییرات ظاهری و میزان 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 LC_{50} :

بمنظور ارزیابی تأثیر عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی بر روی عوامل خونی در آزمایشات تعیین LC_{50} این مطالعه انجام پذیرفت. در این تحقیق با توجه به کوچک بودن اندازه بچه تاسماهیان ایرانی مورد مطالعه (حدود ۳ گرم)،امکان خونگیری توسط سرنگ از طریق سیاهرگ دمی (caudal vein) وجود نداشت لذا عملیات خونگیری از طریق قطع ساقه دمی انجام و نسبت به شمارش افتراقی گلبولهای سفید (عامری مهابادی، ۱۳۷۸) اقدام گردید.

۲-۱۰-۲- مطالعات هماتولوژی در ماهیان تیمار و شاهد

جهت بررسی تاثیر مقادیر مختلف عصاره های سیر و آویشن شیرازی بر عوامل خونی تاسماهیان ایرانی تیمار شده با عصاره های مورد بررسی نسبت به خونگیری از ۳۰ درصد نمونه ها (۳ قطعه ماهی از هر تکرار) 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 به شرح ذیل انجام گردید:

الف- شمارش افتراقی گلبول های سفید Differential leucocyte count (leucogramme)

برای شمارش افتراقی گلبول های سفید یا لکوسیت ها در هر میلی متر مکعب خون 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 گردید. برای این منظور دو سر لام گسترش را بین دو انگشت قرار داده سپس یک قطره خون روی لام قرار می گیرد و با دست دیگر لام گسترش دهنده با زاویه ۴۵ درجه قطره خون را به عقب کشیده و وقتی خون به لبه رسید لام گسترش دهنده به جلو رانده شده و گسترشی یکنواخت و پیوسته ای به وجود می آید. در ادامه 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 شده 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.

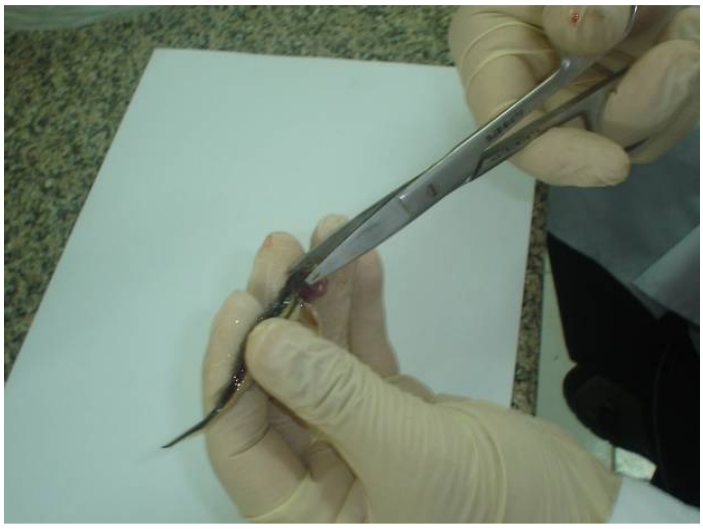
ج- تعیین غلظت هموگلوبین (Hb):

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 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 LC_{50} 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. سپس بعد از گذشت ۲۴ ساعت مجددا فرمالین نمونه ها تعویض گردید. نمونه های تثبیت شده در فرمالین با استفاده از دستگاه

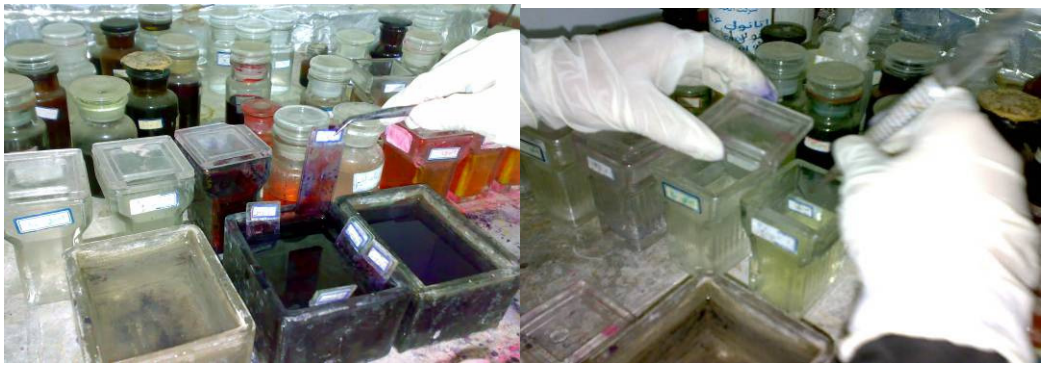
اتوماتیک عمل آوری بافت (Tisssue processor) آب گیری، شفاف سازی و پارافینه شده و با استفاده از دستگاه میکروتوم مقاطع میکروسکوپی به ضخامت ۵ میکرون از آنها تهیه و سپس نسبت به رنگ آمیزی گسترش ها تهیه شده از مقاطع میکروسکوپی به روش هماتوکسیلین و ائوزین(H&E) اقدام و مطالعه لامهای تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری صورت پذیرفت.



شکل۵ - نمونه برداری از آبشش

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 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} نیز از روش Probit analysis (Finney, 1971) استفاده شد.

۳- نتایج

۱-۳- جداسازی باکتری از ماهیان مشکوک به بیماری آئرومونیازیس

ماهیان پرورشی مشکوک به آئرومونیازیس دارای علائم ظاهری اشاره شده در منابع(Noga,2000) شامل خونریزی در قاعده باله ها، اطراف مخرج و اطراف ناحیه دهانی و از نظر کالبد گشائی دارای علائم پرخونی روده ها و تجمع مایع در محوطه شکمی بودند.

۱-۱-۳- شناسایی باکتری های جداسازی شده با استفاده از آزمایش های بیوشیمیایی

نتایج بررسی میکروسکوپی لام های تهیه شده از پرگنه های خالص که به روش گرم رنگ آمیزی(Gram Stain) شده بودند نشان داد باکتری جداسازی شده گرم منفی بوده و دارای ویژگی های میکروسکوپی باکتری آئرومونـاس می باشد. بررسی نتایج آزمونهای بیوشیمیایی و محیط های کشت افتراقی نشان داد باکتری جداسازی شده متحرک بوده و آزمونهای اکسیداز(Oxidase)، کاتالاز(Catalase)، اندول(Indol)، آرژنین(Arginin)، نیترات (NO_3^-)،O/F، بتاگالاکتوزیداز(β-galactosidase)، فسفاتاز،هیدرولیز ژلاتین، ساکاروز، مالتوز،گلوکز، فروکتوز، H_2S انجام شده جهت شناسایی باکتری جداسازی شده همگی مثبت و آزمونهای اوره، متیل رد ( ) Methyl Red ، اورنیتین دکربوکسیلاز (Ornithine decarboxylase) ، اینوزیتول (Inositol) در این بررسی همگی منفی بودند.

۲-۱-۳- شناسایی باکتری های جداسازی شده با استفاده از آزمایش های مولکولی

بر اساس نتایج اعلام شده توسط NCBI بررسی توالی بازهای آلی موجود در ساختار DNA باکتری جداسازی شده از ماهیان مشکوک به آئرومونیازیس که توسط آزمونهای بیوشیمیایی و آزمونهای تفریقی باکتری آئرومونـاس هیدروفیلا را تایید نموده بود از تطابق ویژگی های مولکولی باکتری جداسازی شده با باکتری آئرومونـاس هیدروفیلا حکایت داشت.نتایج بررسی DNA باکتری آئرومونـاس هیدروفیلا تایید شده توسط NCBI به شرح ذیل می باشد:

Aeromonas hydrophila 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank: JX987090.1
FASTA Graphics
Go to:
LOCUS JX987090 1407 bp DNA linear
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 cgaggggat 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 هیدروفیلا توسط عصاره های سیر و آویشن شیرازی

بر اساس نتایج حاصل مقادیر حداقل غلظت ممانعت کنندگی از باکتری آئروموناس هیدروفیلا (MIC) توسط عصاره های آویشن شیرازی و سیر در محیط مولر هینتون براث (Mueller Hinton Broth) به ترتیب برابر ۰/۲۵ mg/ml و ۱mg/ml و مقادیر حداقل غلظت کشندگی(MBC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره های مذکور در محیط مولر هینتون آگار(Mueller Hinton agar) به ترتیب برابر ۰/۵ mg/ml و ۲mg/ml تعیین گردید (جداول۳ و۴). بررسی نتایج حداقل غلظت ممانعت کنندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC)

باکتری آئروموناس هیدروفیلا نشان می دهد عصاره آویشن شیرازی در مقایسه با عصاره سیر از اثر ضد باکتری قوی تری بر روی باکتری آئروموناس هیدروفیلا برخوردار می باشد (جداول ۳ و ۴).

جدول۳ - حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد(MIC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره های سیر و آویشن شیرازی

شماره لوله	۱	۲	۳	٤	٥	٦	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	٤	٥	٦	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

شکل ۱۰- نتایج آزماشات تعیین حداقل غلظت کشندگی کنندگی (MBC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره های سیر و آویش شیرازی توسط هیدروفیلا عصاره های سیر و آویش شیرازی

۳-۳- تعیین غلظتهای نیمه کشنده عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی در بچه تاسماهی ایرانی

با توجه به همزمانی اجرای این تحقیق با اجرای پروژه ((بررسی تاثیر عصاره های سیر و آویشن شیرازی درکنترل انگل های خارجی بچه تاسماهی ایرانی)) و نیز مشابه بودن نوع و اندازه بچه ماهیان و نیز یکسان بودن عصاره های سیر و آویشن شیرازی مورد استفاده در این دو تحقیق جهت تعیین غلظتهای نیمه کشنده عصاره های هیدروالکلی سیر و آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهی ایرانی از نتایج پروژه مذکور به شرح ذیل استفاده گردید :

۱-۳-۳- تعیین غلظتهای نیمه کشنده عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی در 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 آزمایش های 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 آویشن شیرازی، آزمایشات ابتدایی (pre-LC_{50}) 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 ۳). همچنین میزانLC_{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 (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).

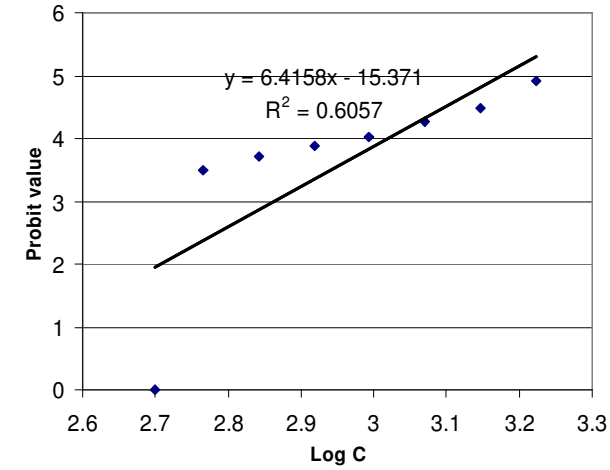
از لحاظ رفتاری علائمی از قبیل افزایش ترشح موکوس، تحریک پذیری، عدم تعادل، انقباض شدید عضلات و انحنای ستون فقرات عمدتاً در غلظتهای زیاد مشاهده شد. نتایج نشان داد که طی زمانهای ۲۴ الی ۹۶ ساعت، مقادیر LC_{10}، LC_{50} و LC_{90} کاهش می یابد. بدین معنی که مقاومت ماهیها در مدت زمان کوتاه بیشتر بوده و ماهیها توانایی تحمل غلظت بالاتری از عصاره را دارا می باشند ولی با گذشت زمان مقاومت بچه تاسماهیان ایرانی کاهش می یابد.

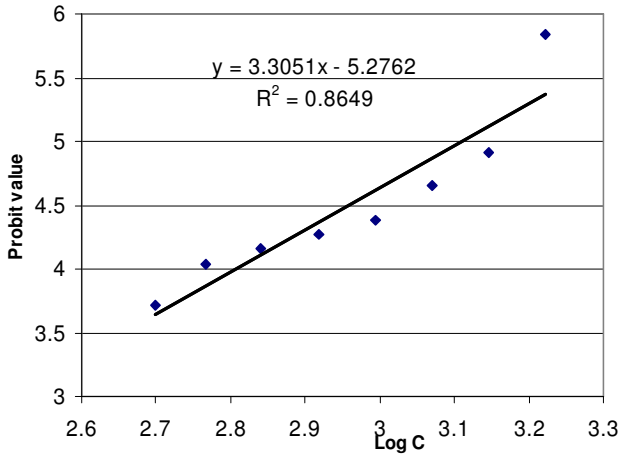
جدول ۵ ـ مقایسه اثر تیمارهای مختلف آویشن شیرازی روی مرگ و میر بچه ماهیان ۵ ـ ۳ گرمی تاسماهی ایرانی (میانگین ۳ تکرار) طی ۹۶ ساعت

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	۴/۳۷۱۰
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 ۶ ـ غلظتهای کشنده آویشن شیرازی در طی ۴ روز روی بچه تاسماهی ایرانی

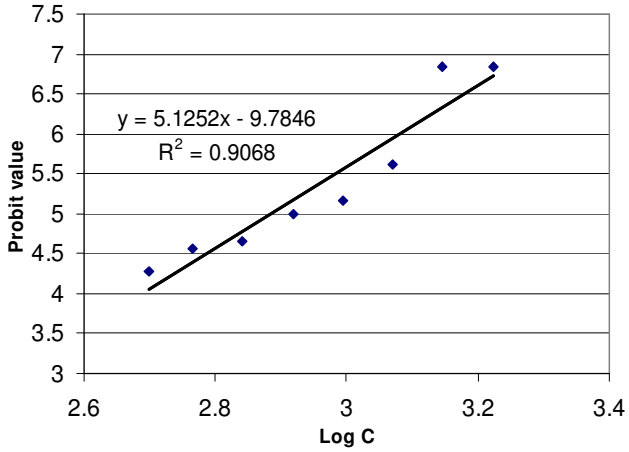
نام ماده	مقدار LC	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
آویشن شیرازی	LC_{10}	۹۴۴/۷۱	۵۲۶/۵	۴۶۶/۰۱	۴۳۱/۱۲
	LC_{50}	۱۴۹۶/۶۸	۱۲۸۵/۵۸	۹۲۱/۲۹	۷۶۶/۶۵
	LC_{90}	۲۳۷۰/۲۸	۲۰۳۹/۷۸	۱۸۱۹/۷	۱۳۶۳/۶۴



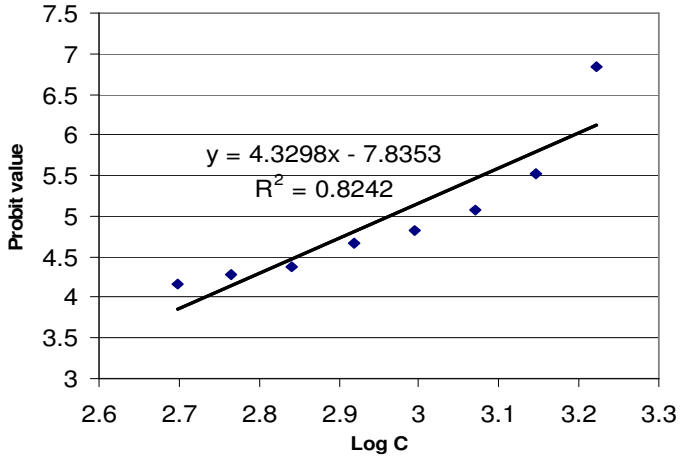


نمودار ۱:معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی probit value با لگاریتم غلظت آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ۲٤ ساعت

نمودار ۲:معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی probit value با لگاریتم غلظت آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ٤٨ ساعت



نمودار ۳:معادله خط رگرسیون آویشن شیرازی بر روی چه 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)

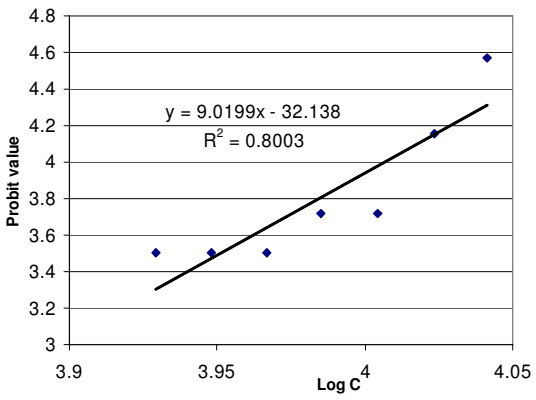
بمنظور یافتن محدوده غلظت عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی، آزمایشات ابتدایی (pre-LC_{50}) بر روی بچه تاسماهیان ایرانی انجام گرفت و سرانجام محدوده غلظت ۸۵۰۰ تا ۱۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر برای انجام آزمایشات نهایی تعیین گردید. بر اساس محاسبات لگاریتمی ۷ تیمار (۸۵۰۰، ۸۸۷۰، ۹۲۶۰، ۹۶۶۰، ۱۰۱۰۰، ۱۰۵۵۰ و ۱۱۰۰۰ میلی گرم لیتر) در نظر گرفته شد و نسبت به گروه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۵). همچنین میزان LC_{10}، LC_{50} وLC_{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 (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.

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

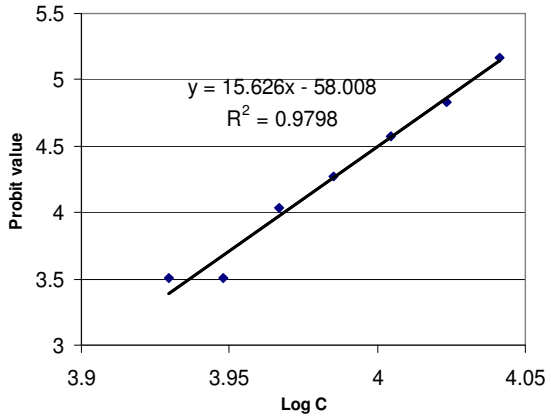
تیمار	غلظت آویشن شیرازی (ppm)	۳۰ دقیقه		۴۵ دقیقه		۶۰ دقیقه		تغییرات نسبت به شاهد			لگاریتم غلظت آویشن شیرازی	Probit value		
		مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	۳۰ دقیقه	۴۵ دقیقه	۶۰ دقیقه		۳۰ دقیقه	۴۵ دقیقه	۶۰ دقیقه
شاهد	۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
I	۸۵۰۰	۰/۶۷	۹/۳۳	۰/۶۷	۹/۳۳	۱/۳۳	۸/۶۷	-۶/۷	-۶/۷	-۱۳/۳	۳/۹۲۹۴	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

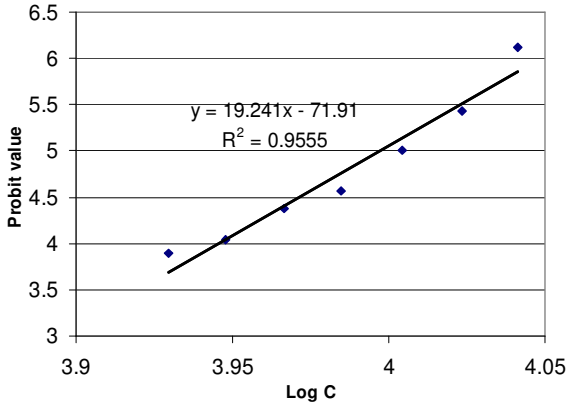
نام ماده	مقدار LC	۳۰ دقیقه	۴۵ دقیقه	۶۰ دقیقه
آویشن شیرازی	LC_{10}	۹۴۴۴/۹۵	۸۹۱۶/۶۱	۸۵۲۱/۱۸
	LC_{50}	۱۳۱۰۰/۸۶	۱۰۷۶۹/۶۱	۹۹۳۳/۴۴
	LC_{90}	۱۸۱۷۱/۸۸	۱۳۰۰۷/۶۸	۱۱۵۸۲/۴۳



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 طولی۰/۶۵ ± 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 (LC_{50}- 96 h):

در این تحقیق بمنظور یافتن محدوده غلظت عصاره هیدروالکلی سیر آزمایشات ابتدایی (pre-LC_{50}) بر روی بچه تاسماهیان ایرانی انجام گرفت و سرانجام محدوده غلظت۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ میلی گرم در لیتر برای انجام آزمایشات

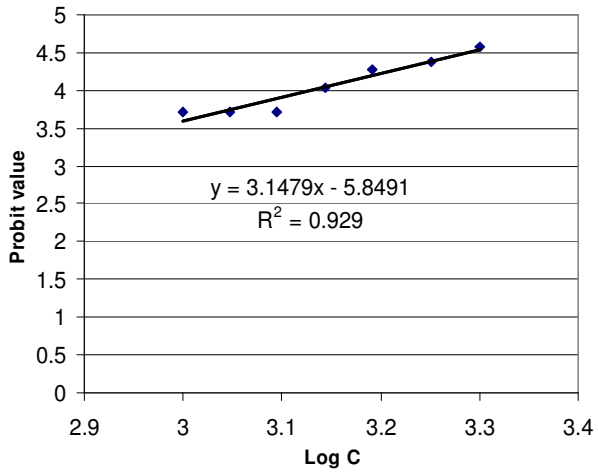
نهایی تعیین گردید. بر اساس محاسبات لگاریتمی ۷ تیمار (۱۰۰۰، ۱۱۱۶، ۱۲۴۶، ۱۳۹۱، ۱۵۵۴، ۱۷۸۵ و ۲۰۰۰ میلی گرم لیتر) در نظر گرفته شد و نسبت به گروه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱۷). همچنین میزان LC_{10}، LC_{50} و LC_{90} عصاره هیدروالکلی سیر طی مدت زمان ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت محاسبه گردید (جدول ۱۸). بر 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 (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). از لحاظ 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.

جدول ۹ـ مقایسه اثر تیمارهای مختلف عصاره هیدروالکلی سیر بر میزان بازماندگی بچه تاسماهی ایرانی (میانگین ۳ تکرار) طی ۹۶ ساعت

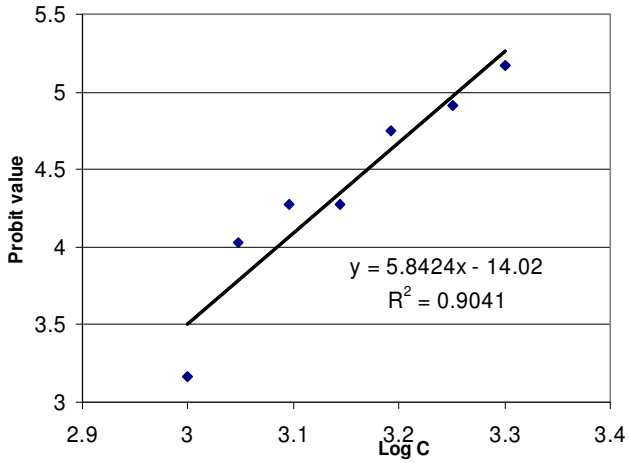
تیمار	غلظت عصاره سیر (ppm)	۲۴ ساعت		۴۸ ساعت		۷۲ ساعت		۹۶ ساعت		تغییرات نسبت به شاهد				لگاریتم غلظت عصاره سیر	Probit value			
		مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
شاهد	۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
I	۱۰۰۰	۰	۱۰	۰/۳۳	۹/۶۷	۰/۶۷	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	٤/۰۳۳۹	٤/۳۷۸۱	٤/۶۶۰۲
III	۱۲٤۶	۱	۹	۲/۳۳	۷/۶۷	۳/۳۳	۶/۶۷	۵	۵	-۱۰	-۲۳/۳	-۳۳/۳	-۵۰	۳/۰۹۵۵	۳/۷۱۸۴	٤/۲۷۱۰	٤/۵۶۸٤	۵/۰۰۰۰
IV	۱۳۹۱	۱/۶۷	۸/۳۳	۲/۳۳	۷/۶۷	٤/۳۳	۵/۶۷	۶/۳۳	۳/۶۷	-۱۶/۷	-۲۳/۳	-٤۳/۳	-۶۳/۳	۳/۱٤۳۳	٤/۰۳۳۹	٤/۲۷۱۰	٤/۸۳۱۳	۵/۳۳۹۸
V	۱۵۵٤	۲/۳۳	۷/۶۷	٤	۶	۵/۶۷	٤/۳۳	۷/۶۷	۲/۳۳	-۲۳/۳	-٤۰	-۵۶/۷	-۷۶/۷	۳/۱۹۱۵	٤/۲۷۱۰	٤/۷٤۶۷	۵/۱۶۸۷	۵/۷۲۹۰
VI	۱۷۸۵	۲/۶۷	۷/۳۳	٤/۶۷	۵/۳۳	۶/۳۳	۳/۶۷	۸/۳۳	۱/۶۷	-۲۶/۷	-٤۶/۷	-۶۳/۳	-۸۳/۳	۳/۲۵۱۶	٤/۳۷۸۱	٤/۹۱۷۲	۵/۳۳۹۸	۵/۹۶۶۱
VII	۲۰۰۰	۳/۳۳	۶/۶۷	۵/۶۷	٤/۳۳	۸/۳۳	۱/۶۷	۹/۶۷	۰/۳۳	-۳۳/۳	-۵۶/۷	-۸۳/۳	-۹۶/۷	۳/۳۰۱۰	٤/۵۶۸٤	۵/۱۶۸۷	۵/۹۶۶۱	۶/۸۳۸٤

جدول ۱۰ـ غلظتهای کشنده عصاره سیر طی ٤ روز روی بچه تاسماهی ایرانی

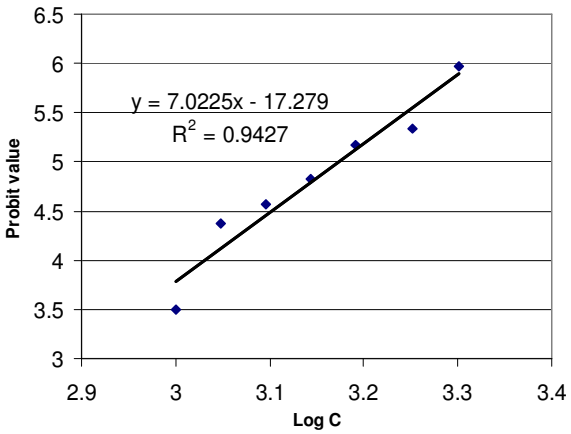
نام ماده	مقدار LC	۲٤ ساعت	٤۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹٦ ساعت
سیر	LC_{10}	۱۰۹٤/۷۶	۱۰۸۶/۶۷	۹۷۷/۲۳	۹۰۹/۹۱
	LC_{50}	۲۷۹۵/۱۱	۱۸۰۰/۹٤	۱٤۸۷/۶٤	۱۲۷۹/۹۷
	LC_{90}	۷۱۳۶/۷٤	۲۹۸٤	۲۲۶٤/۶٤	۱۸۰۰/۵۲



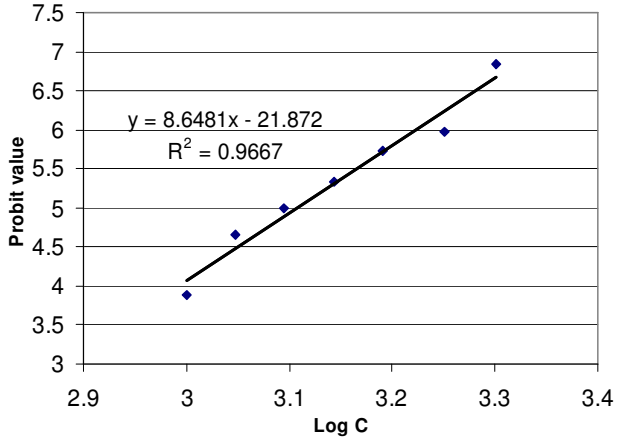
نمودار۸- معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ۲٤ ساعت



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):

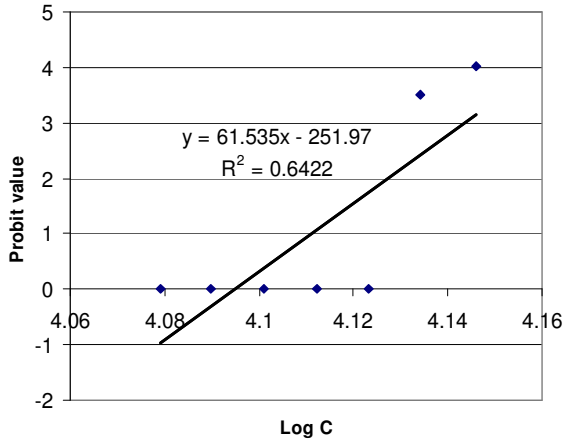
به منظور یافتن محدوده غلظت عصاره هیدروالکلی سیر آزمایشات ابتدایی (pre-LC_{50}) بر روی بچه تاسماهیان ایرانی انجام گرفت و سرانجام محدوده غلظت ۱۲۰۰۰ تا ۱۴۰۰۰ میلی گرم در لیتر برای انجام آزمایشات نهایی تعیین گردید. بر اساس محاسبات لگاریتمی ۷ تیمار (۱۲۰۰۰، ۱۲۳۰۰، ۱۲۶۲۰، ۱۲۹۵۰، ۱۳۲۸۰، ۱۳۶۲۰ و ۱۴۰۰۰ میلی گرم لیتر) در نظر گرفته شد و نسبت به گروه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱۹). همچنین میزانLC_{10} ، LC_{50} و LC_{90} عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی 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 (R2) 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). از لحاظ رفتاری علائمی از قبیل تشکیل موکوس برروی پوست مخصوصاً در مراحل اولیه آزمایش در غلظتهای زیاد ،افزایش فعالیت،گاهی انحنای ستون فقرات مشاهده شد.

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

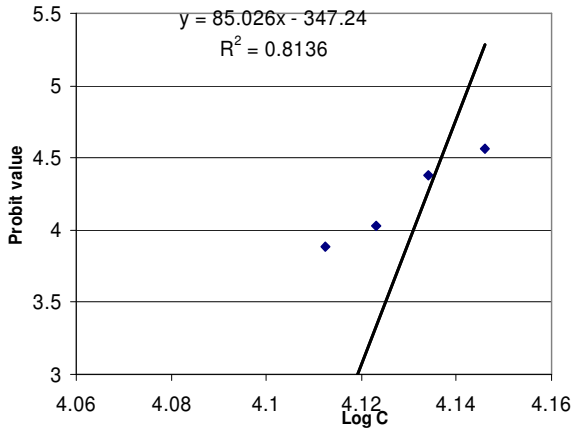
تیمار	غلظت عصاره سیر (ppm)	۱۵ دقیقه		۲۰ دقیقه		۳۰دقیقه		۴۵ دقیقه		۶۰ دقیقه		تغییرات نسبت به شاهد					لگاریتم غلظت عصاره سیر	Probit value				
		مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	۱۵ دقیقه	۲۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	۴۵ دقیقه	۶۰ دقیقه		۱۵ دقیقه	۲۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	۴۵ دقیقه	۶۰ دقیقه
شاهد	۰	۰	۱۰	۰	۱۰	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	۳/۵۰۱۵	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	۴/۴۷۵۶	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	۴/۱۲۳۲	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

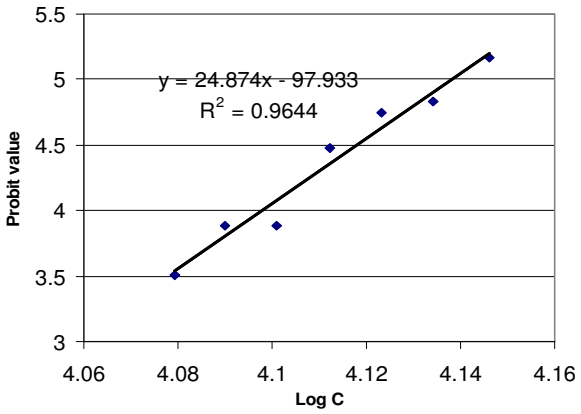
نام ماده	مقدار LC	۱۵ دقیقه	۲۰ دقیقه	۳۰ دقیقه	٤٥ دقیقه	٦٠ دقیقه
سیر	LC_{10}	۱۴۲۹۲/۲۳	۱۳۴۱۵/۲۸	۱۲۲۰۶/۷۴	۱۱۸۹۳/۲۳	۱۱۷۴۸/۹۷
	LC_{50}	۱۴۹۹۳/۳۹	۱۳۸۸۹/۹۲	۱۳۷۴۳/۵۸	۱۳۰۵۵/۶۹	۱۲۶۲۴/۰۸
	LC_{90}	۱۵۷۳۲/۵۸	۱۴۳۸۱/۳۶	۱۵۴۷۷/۴۷	۱۴۳۳۵/۰۷	۱۳۳۲۶



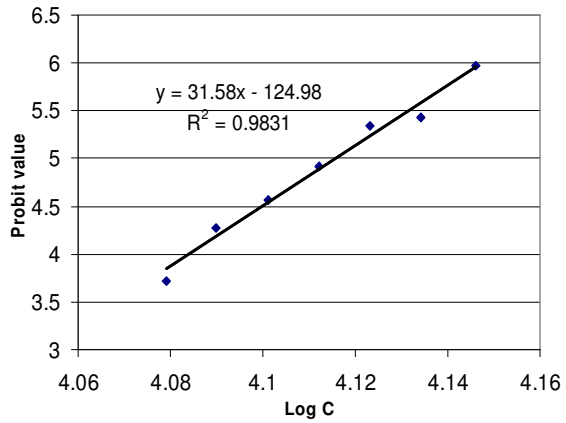
نمودار۱۲-معادله خط رگرسیون تأثیر عصاره سیر بر روی بچه تاسماهیان ایرانی در ۱۵ دقیقه



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 ٤٥ 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 تاثیر مقادیر مختلف عصاره های سیر و آویشن شیرازی در تیمار تاسماهیان ایرانی آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا 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 شدند. 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 عوامل خونی

۱-۵-۳- مطالعات هماتولوژی در بچه تاسماهیان ایرانی طی آزمایشات LC_{50}

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

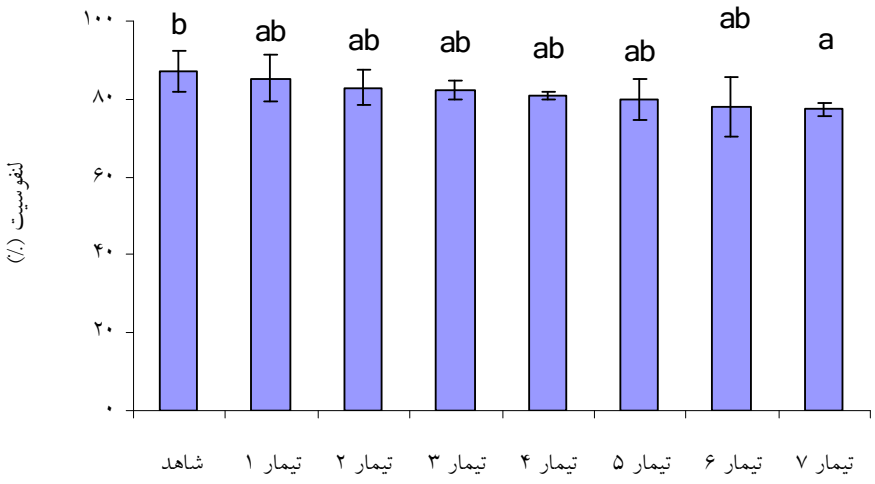
با توجه به کوچک بودن اندازه بچه تاسماهیان ایرانی، فقط مطالعات افتراقی گلبولهای سفید ممکن بوده که در زیر به نتایج آن اشاره می گردد:

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 نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد.

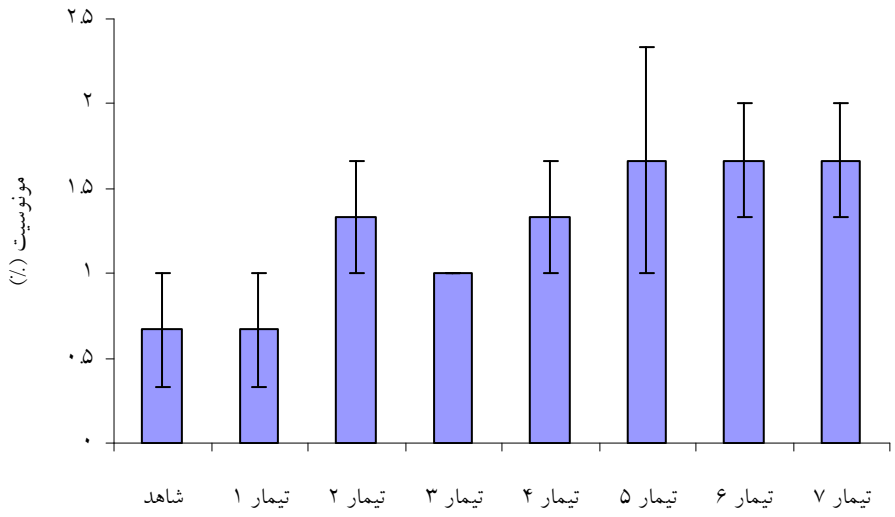


نمودار۱۶ : مقایسه میانگین میزان لنفوسیت شاهد با تیمار های مختلف آویشن شیرازی

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

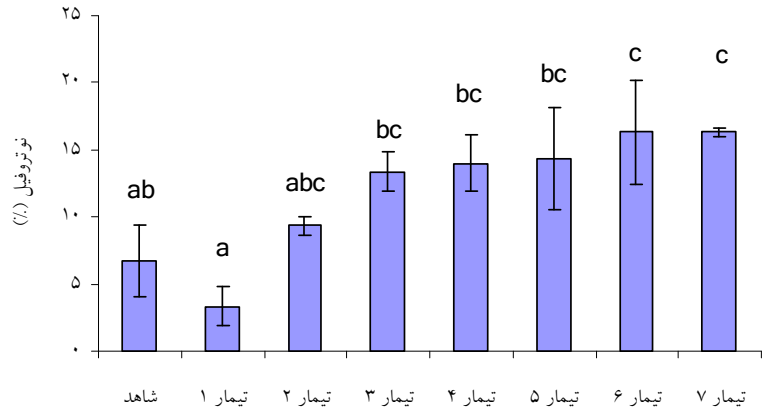


نمودار۱۷ : مقایسه میانگین میزان مونوسیت شاهد با تیمار های مختلف آویشن شیرازی

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 عامل 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 ۱۶- 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	

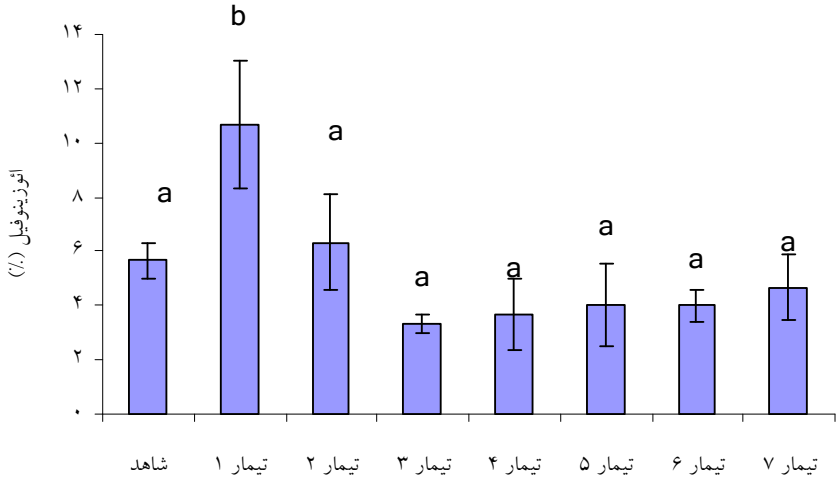


نمودار۱۸ : مقایسه میانگین میزان نوتروفیل در تیمار های مختلف آویشن شیرازی

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

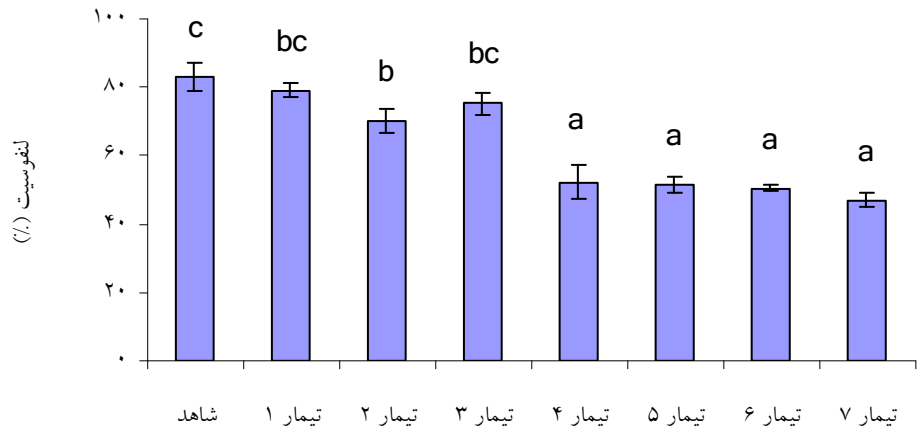
- مطالعات هماتولوژی تأثیر عصاره سیر- LC_{50} :

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 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 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}

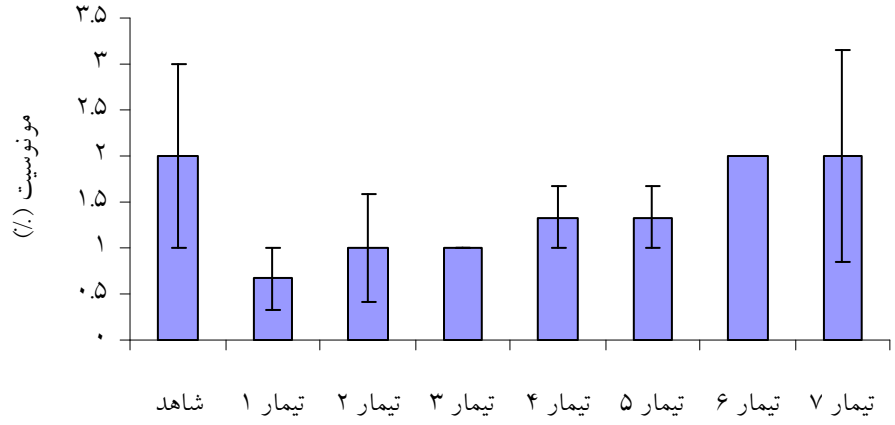


نمودار ۲۰- مقایسه میانگین میزان لنفوسیت شاهد با تیمار های مختلف سیر

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

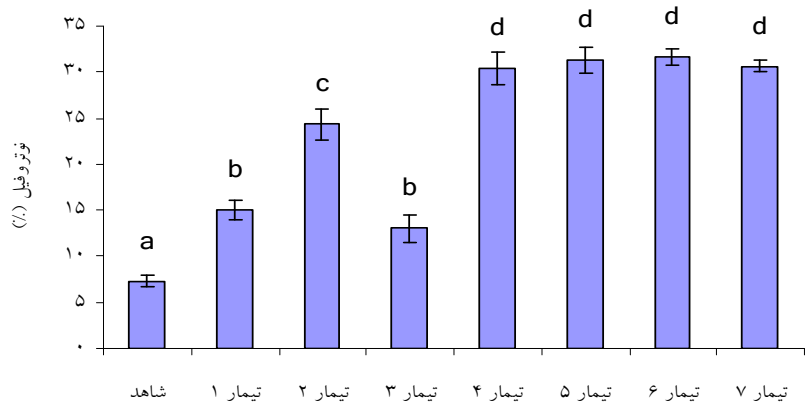


نمودار ۲۱- مقایسه میانگین میزان مونوسیت شاهد با تیمار های مختلف

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 عامل 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}

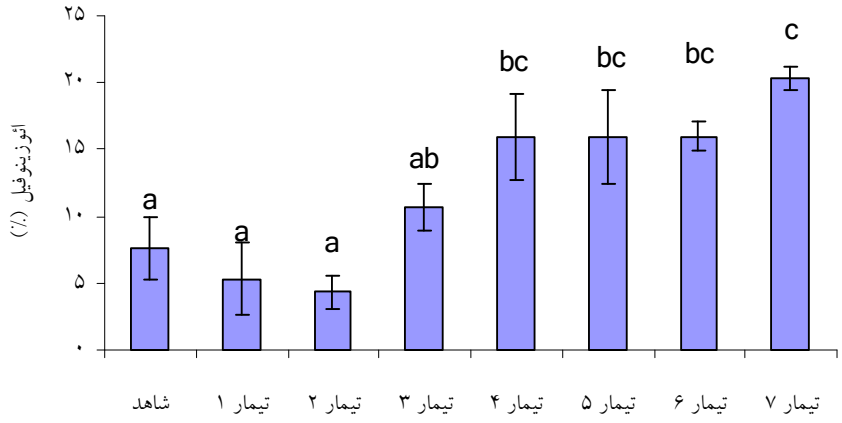


نمودار ۲۲- مقایسه میانگین میزان نوتروفیل در تیمار های مختلف سیر

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 ± ۰/۸۸ ^{c}



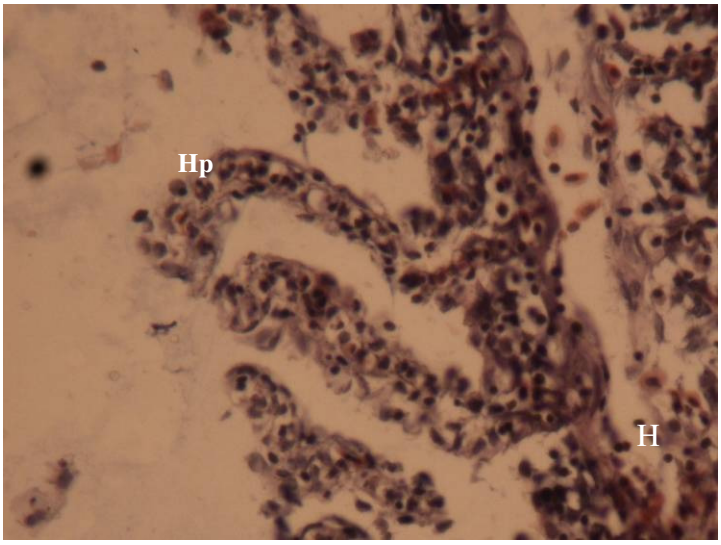
نمودار ۲۳- میانگین ائوزینوفیل در شاهد و تیمار های مختلف سیر

٦-۳- بررسی تاثیرات هیستوپاتولوژیک عصاره های سیر و آویشن شیرازی

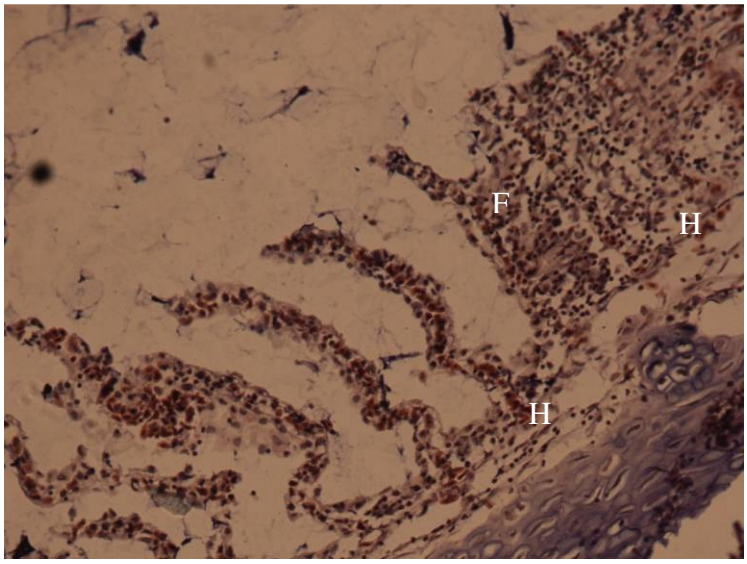
به منظور بررسی آسیب های بافتی مقادیر مختلف عصاره های سیر و آویشن شیرازی مورد استفاده در تیمار تاسماهیان ایرانی آلوده شده توسط باکتری آئروموناس هیدروفیلا نسبت به نمونه برداری و تهیه مقاطع بافتی از آبشش کبد و کلیه ماهیان تیمار و شاهد و بررسی میکروسکوپی آنها اقدام و نتایج ذیل حاصل گردید :

۱-٦-۳- آسیب های بافت آبشش

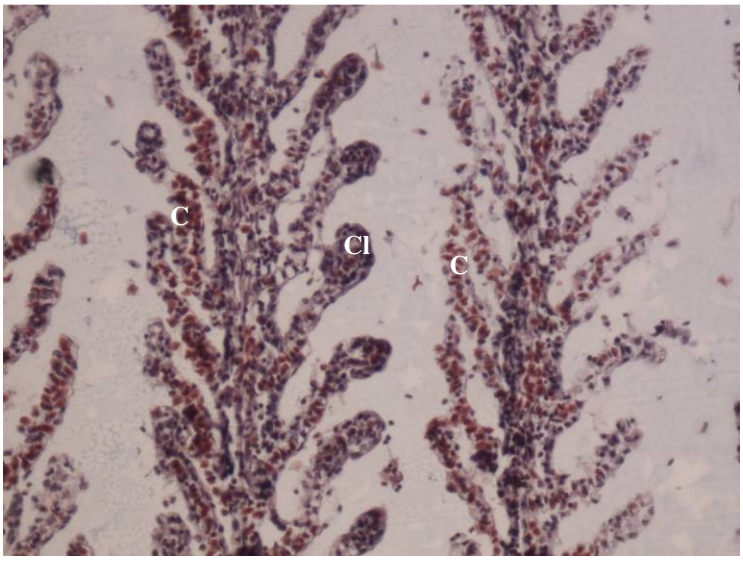
بررسی مقاطع بافتی تهیه شده از آبشش تاس ماهیان مورد بررسی در این مطالعه که طی مدت زمان یک هفته با استفاده مقادیر مختلف عصاره های سیر و آویشن شیرازی تحت تیمار قرار گرفته بودند از بروز برخی از آسیب های میکروسکوپیک حکایت دارد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه با افزایش غلظت عصاره های مورد بررسی در گروه های تیمار آسیب های میکروسکوپیک به شکل گسترده تری در آبشش ها ظاهر می گردند. همچنین بر اساس 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 Local Necrosis، وجود رنگدانه های ملانین در رشته های اولیه آبششی می باشد. (شکل های ۱۱ تا ۱۸).



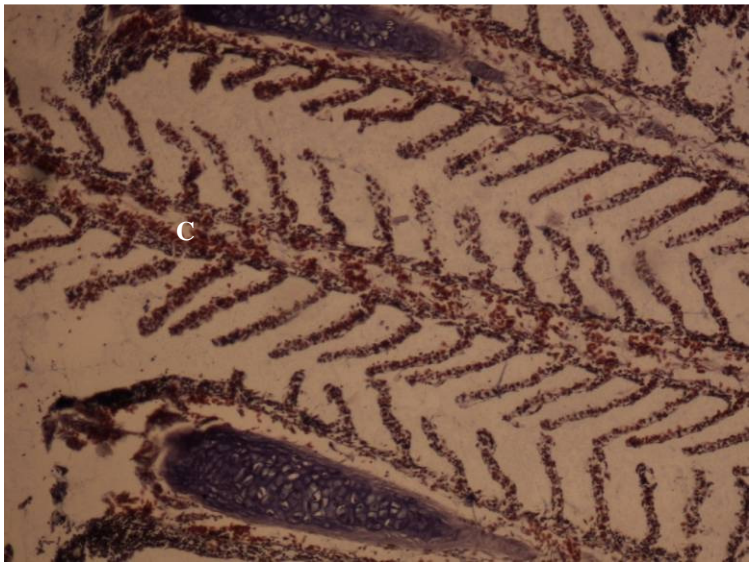
شکل۱۱: تورم سلولهای پوششی(CS)، هیپرپلازی (Hp) و خونریزی (H)
تیمار۱ عصاره آویشن شیرازی (H&E ، 40X)



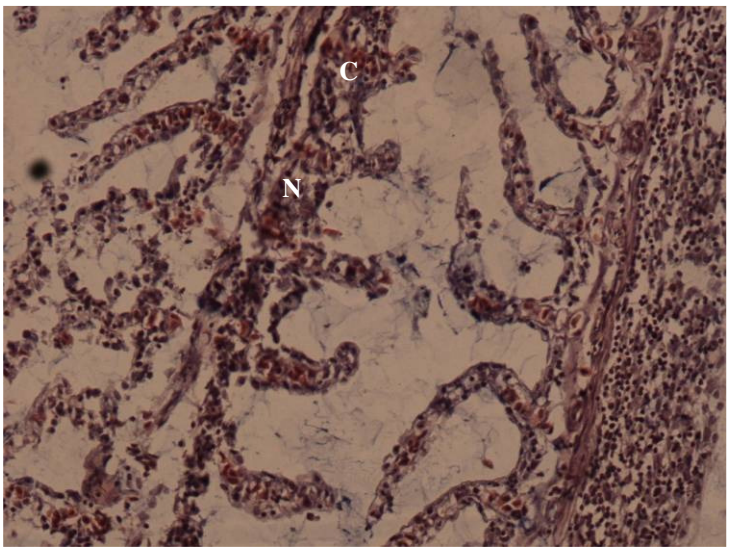
شکل۱۲: اتصال گسترده رشته های آبششی ثانویه (F) ،خونریزی (H)
تیمار۱ عصاره سیر (H&E ، 10X)



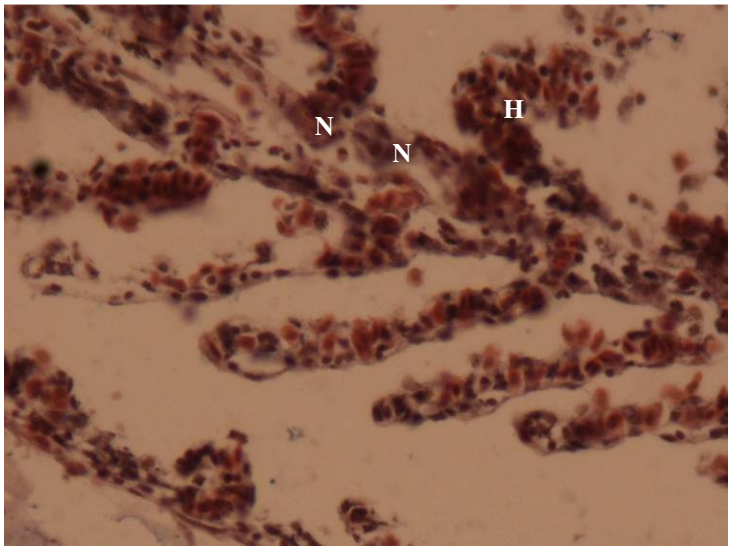
شکل۱۳: چماقی شدن رشته های آبششی(Cl)، پرخونی (C)- تیمار۲ عصاره آویشن شیرازی
(H&E ، 10X)



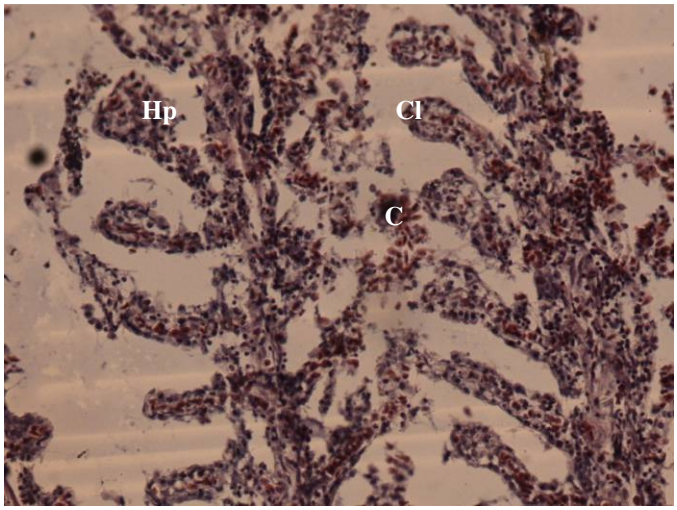
شکل۱٤: افزایش غضروف پشتیبان و پرخونی(C)- تیمار۲ عصاره سیر (H&E ، 10X)



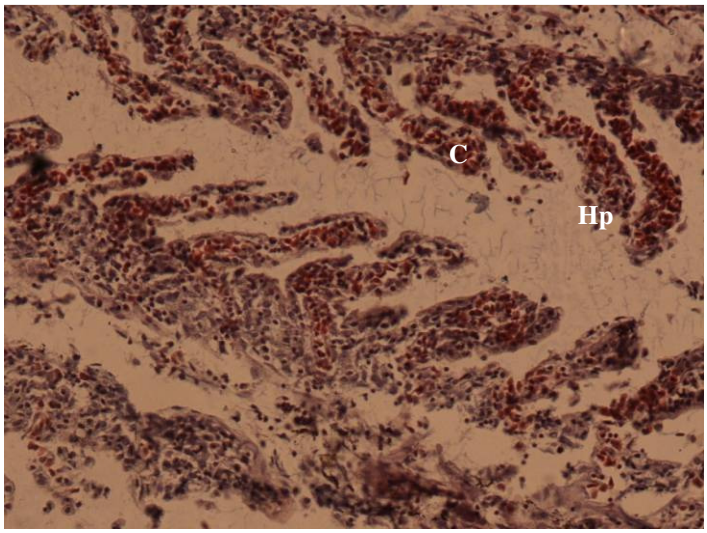
شکل۱۵: نکروز سلولی(N) و پرخونی(C)- تیمار ۳ عصاره آویشن شیرازی (H&E ، 10X)



شکل۱۶: نکروز سلولی(N) و خونریزی (H)- تیمار ۳ عصاره سیر (H&E ، 40X)



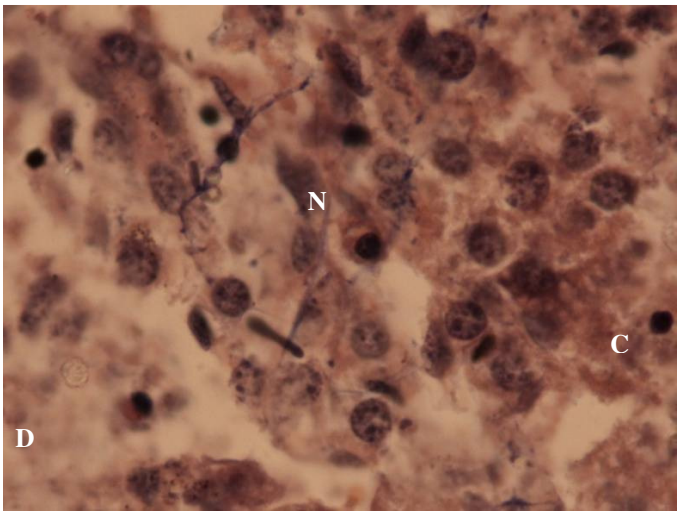
شکل۱۷: هیپرپلازی(Hp) ، چماقی شدن(Cl)، پرخونی(C)
تیمار٤ عصاره آویشن شیرازی (H&E ، 10X)



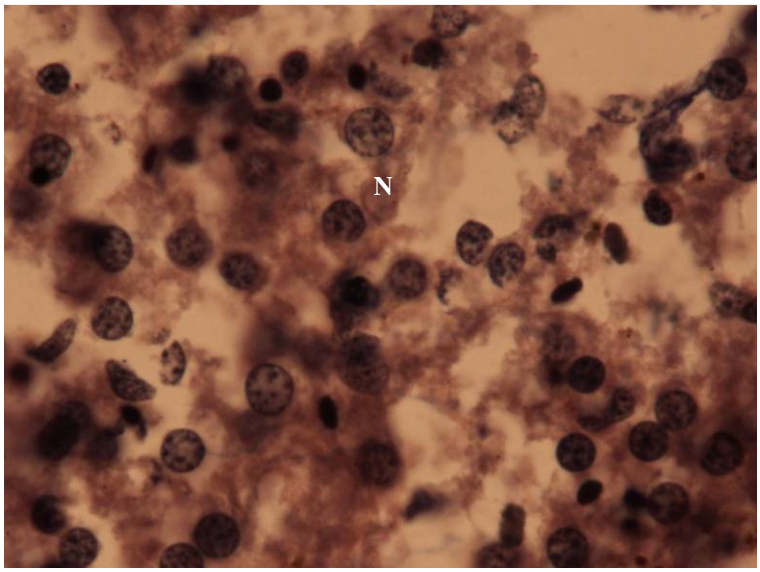
شکل۱۸: هیپرپلازی(Hp) و پرخونی(C) تیمار٤ عصاره سیر (H&E ، 10X)

۲-۶-۳- آسیب های بافت کبد

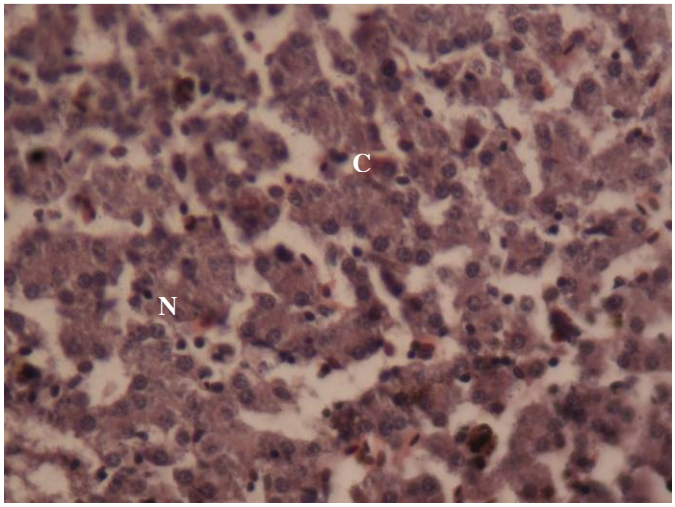
بررسی مقاطع بافتی تهیه شده از کبد تاس ماهیان مورد بررسی در این مطالعه که طی یک هفته با استفاده مقادیر مختلف عصاره های سیر و آویشن شیرازی تحت تیمار قرار گرفته بودند ازبروز برخی ازآسیب های میکروسکوپیک حکایت دارد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه با افزایش غلظت عصاره های مورد بررسی در گروه های تیمار آسیب های میکروسکوپیک به شکل گسترده تری در کبد ظاهرگردید. بررسی مقاطع بافتی کبد در تیمارهای مختلف عوارضی نظیر تورم سلولی Cell swelling در هپاتوسیتها، نکروزسلولیNcrosis، مشاهده پرخونی Hyperemia سینوزوئیدها، افزایش رنگدانه های ملانین Hypermelanosis و مراکز ملانوماکروفاژها (MMC) بوده است (شکل های ۱۹ تا ۲۶).



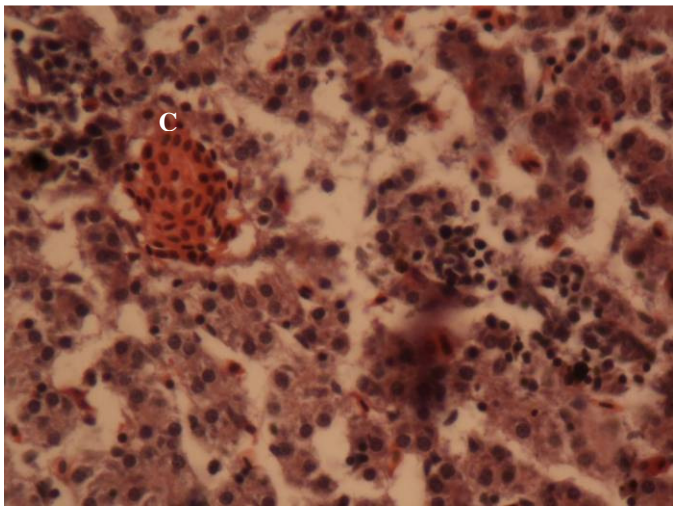
شکل۱۹: نکروز سلولی (N)،پرخونی(C) و دژنرسانس چربی (D)
تیمار۱ عصاره آویشن شیرازی (H&E - 100X)



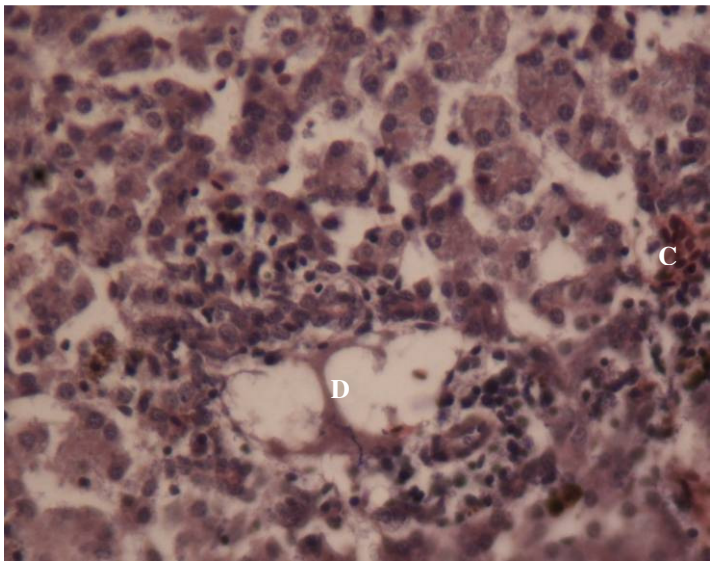
شکل۲۰: نکروز سلولی(N) و دژنرسانس چربی (D)- تیمار۱ عصاره سیر (H&E -100X)



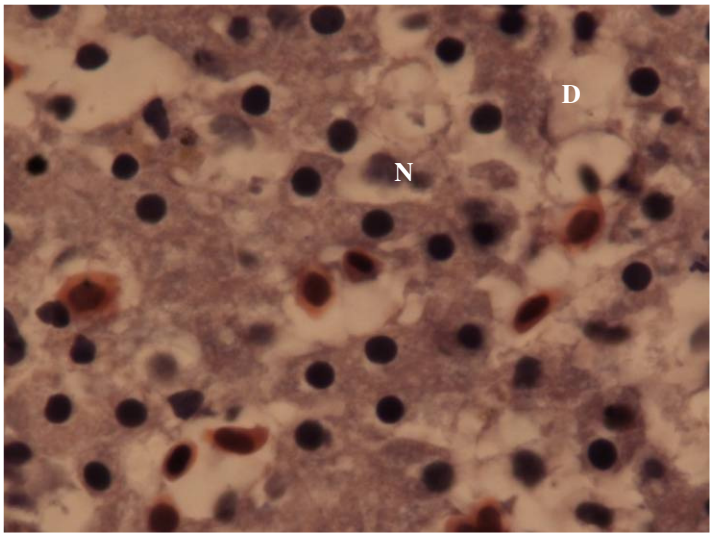
شکل۲۱: نکروز حاد (N) و پرخونی در بافت کبد (C)- تیمار۲ عصاره آویشن شیرازی (H&E - 40X)



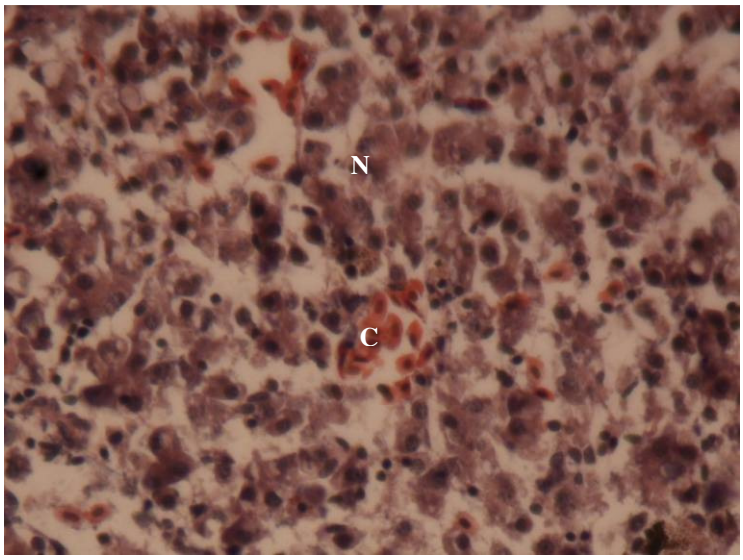
شکل۲۲: پرخونی همراه با فیبروز (C) و نکروز سلولی (N)-تیمار۲ عصاره سیر (H&E - 40X)



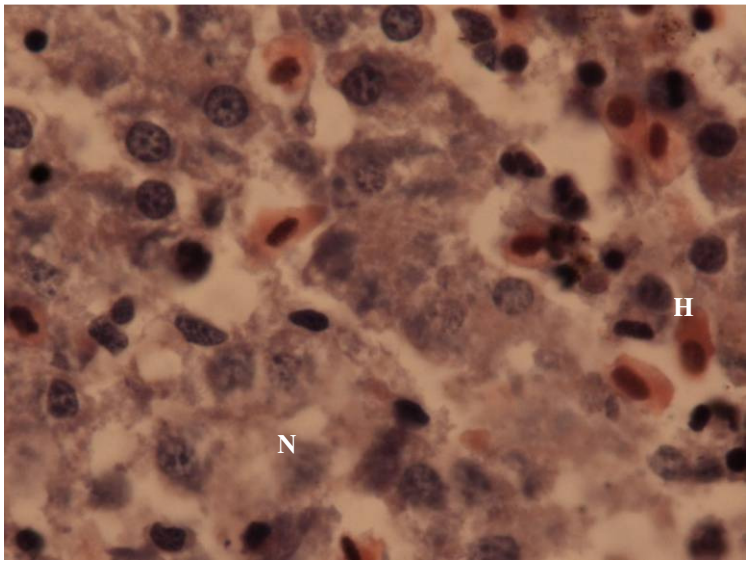
شکل ۲۳: دژنراسیون چربی (D)، پرخونی در بافت کبد (C) – تیمار۳ عصاره آویشن شیرازی (H&E - 40X)



شکل ۲٤: دژنرسانس چربی (D) ، نکروز سلولی (N)– تیمار۳ عصاره سیر(H&E -100X)



شکل ۲۵: پرخونی (C) و نکروز سلولی شدید (N)– تیمار٤ عصاره آویشن شیرازی (H&E - 40X)

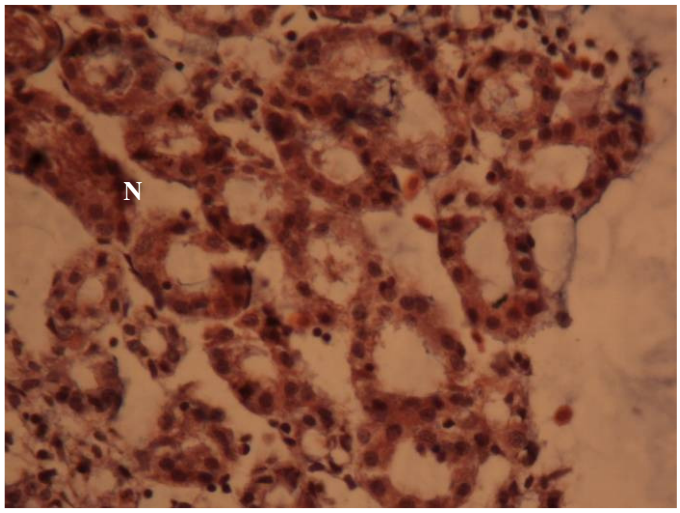


شکل ٢٦: خونریزی (H) و نکروز سلولی(N) – تیمار٤ عصاره سیر (H&E - 40X)

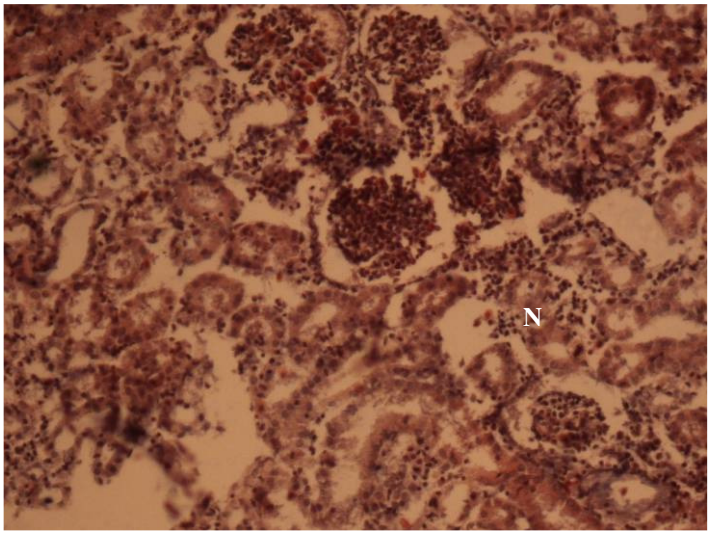
۳-٦-۳- آسیب های بافت کلیه

بررسی مقاطع بافتی تهیه شده از کلیه تاسماهیان 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 کلیه ظاهرگردید.در بررسی مقاطع بافتی کلیه در تیمارهای مختلف عوارضی نظیر اتساع فضای گلومرولی و مسدود شدن فضای بومن،

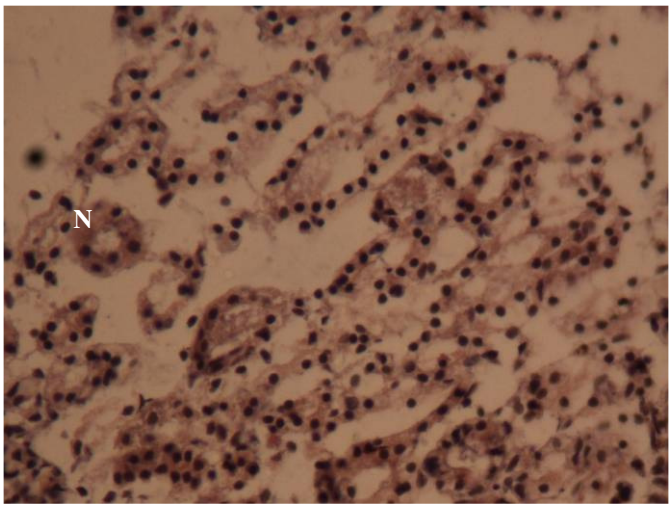
پرخونیHyperemia، نکروز سلولیNecrosis، تورم سلولی Cell swelling و هیپرتروفی Hyperthophy مشاهده گردید. (شکل های۲۷ تا ۳۳).



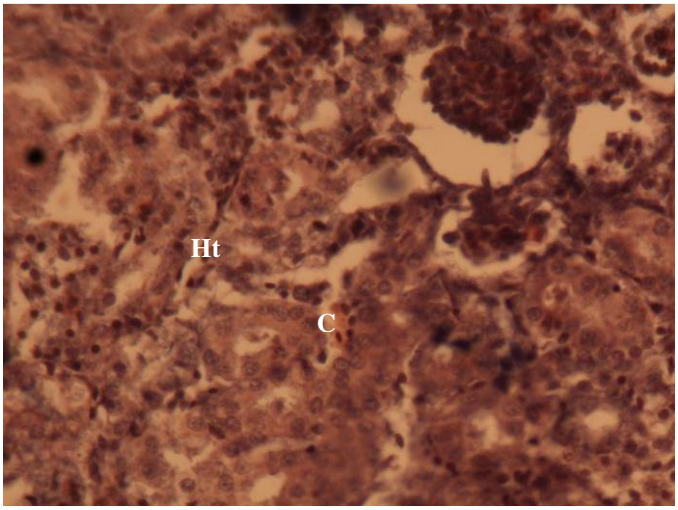
شکل ۲۷: تکثیر سلولهای مزانشیم proliferation of Mesenchyme و نکروز سلولی (N)
تیمار۱ عصاره آویشن شیرازی (H&E ، 40X)



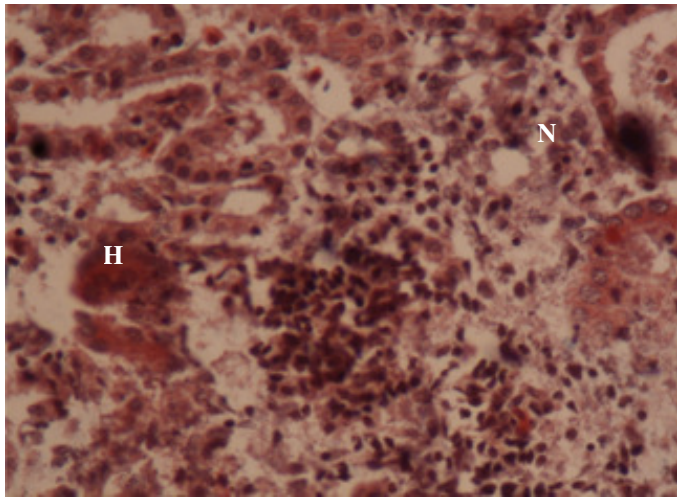
شکل ۲۸: حضور ذرات ائوزینوفیلی در داخل سلول های اپیتلیال و نکروز سلولی(N)
تیمار۱ عصاره سیر (H&E ، 10X)



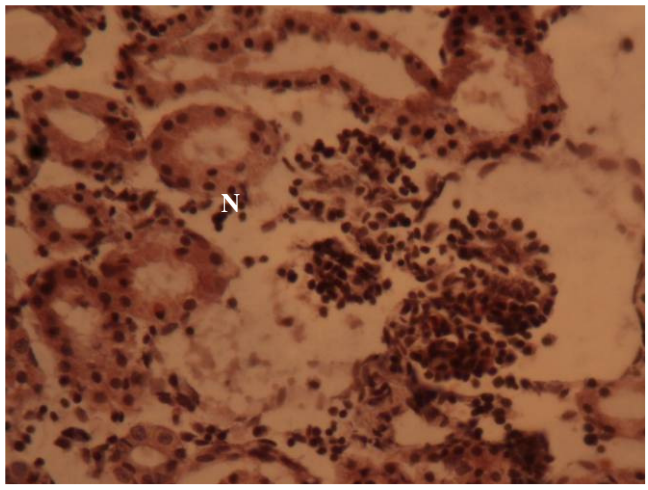
شکل ۲۹: مشاهده نکروز سلول(N)– تیمار۲ عصاره آویشن شیرازی (H&E ، 10X)



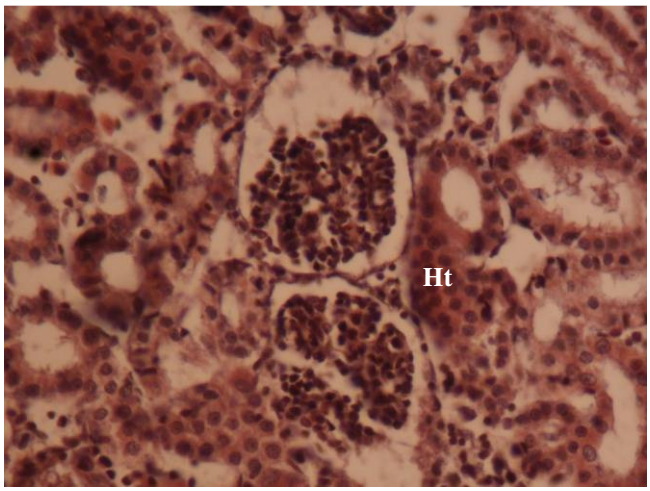
شکل ۳۰: مشاهده اتساع فضای گلومرولی ، پرخونی (C) ، هیپرتروفی (Ht) و بسته شدن لوله لومن– تیمار۲ عصاره سیر (H&E ، 40X)



شکل ۳۱: نکروز سلولی (N) و خونریزی (H) بسته شدن لوله لومن
تیمار۳ عصاره آویشن شیرازی (H&E ، 10X)



شکل ۳۲: اتساع فضای گلومرولی، تورم سلولی(CS) و نکروز سلولی (N)
تیمار٤ عصاره آویشن شیرازی (H&E ، 10X)



شکل ۳۳: اتساع فضای گلومرولی ، هیپرتروفی (Ht) و بسته شدن لومن
تیمار٤ عصاره سیر (H&E ، 40X)

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 فیزیکی وشیمیایی آب و... شرایط بروز انواع بیماریها خصوصا بیماریهای ناشی از عوامل بیماریزای فرصت طلب مانند بیماری باکتریایی آئروموونیازیس را در ماهیان خاویاری فراهم می نماید. آئروموونیازیس از مهمترین بیماریهای باکتریایی تاسماهیان در طی دوره پرورش آنها به شمار می آید.باکتری آئروموناس هیدروفیلا از مهمترین عوامل ایجاد کننده آئروموونیازیس محسوب گردیده و بر اساس بررسی های 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 بالینی متفاوت و حتی تلفات گردد. با توجه به اینکه باکتری آئروموناس هیدروفیلا بطور طبیعی در اکثر منابع آبی حضور دارد 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 (LC_{50}) عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهی ایرانی ۳ تا ۵ گرمی طی ۹۶ ساعت به ترتیب برابر ۷۶۶/۶۵ میلی گرم در لیتر و طی یک ساعت معادل ۹۹۳۳/۴۴ میلی گرم در لیتر محاسبه گردید. معصوم زاده و همکاران (۱۳۸۹) غلظت نیمه کشنده (LC_{50}) 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 (LC_{50}) 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.

بررسی و مقایسه مقادیر غلظتهای نیمه کشندگی LC_{50} 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 LC_{50} سولفات مس و پرمنگنات پتاسیم در بچه تاسماهی ایرانی طی ۹۶ ساعت به ترتیب برابر ۰/۱۵ 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 LC_{50} عصاره گیاه اکالیپتوس طی ۹۶ ساعت در بچه ماهیان کپور علفخوار(آمور) را معادل ppm ۲۴۷۸/۵۶ محاسبه نمود در حالیکه جوینده (۱۳۹۱) LC_{50} سولفات مس و پرمنگنات پتاسیم در ماهی آمور طی ۹۶ ساعت را به ترتیب برابر ppm ۴/۸۹۵ و ppm ۱/۰۵ تعیین نمود که در مقایسه با LC_{50} 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*) را مورد بررسی قرار داد ، بطوریکه LC_{50} ۹۶ ساعته آن را معادل ۳/۰۲ میلی 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 (LC_{50}) 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 برابر ۱ میکروگرم در میلی لیتر و۰/۲۵ 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 ۲ میکروگرم در میلی لیتر و ۰/۵ 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 مهارکنندگی رشد (Bacteriostatic) و باکتری کشی (Bactericid) 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 باکتری کشی(Bactericid) 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 *Lactococcus garvieae* (کوهپایه و همکاران ، ۱۳۸۸) و نیز بررسی تاثیر عصاره های آبی و الکلی آویشن شیرازی بر روی باکتری اشرشیاکولی انتروهموراژیک *Enterohemorrhagic E. coli* (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 مهارکنندگی رشد (Bacteriostatic) و باکتری کشی (Bactericid) قوی تری نسبت به عصاره آویشن برخوردار می باشد اما با توجه به تاثیرات نسبتا مناسب این عصاره می توان از آن به عنوان جایگزین گیاهی مناسبی برای آنتی بیوتیک ها بویژه آنتی بیوتیک هایی که باکتریها نسبت به آنها مقاومت یافته اند استفاده نمود (علیشاهی و همکاران ، ۱۳۸۹).

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 از 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 (Soko and Barker ., 2005; Chiamanat *et al.,* 2005; Madsen *et al.,* 2000 ; Bartolome *et al.*,2007 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 (Thymol) و کارواکرول (Carvacrol) 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 (Thymol) و کارواکرول (Carvacrol) مرتبط می

دانند (Dababneh.B.F.,2008).تیمول (Thymol) و کارواکرول (Carvacrol) دارای اثرات سینرژیستی(synergist) می باشند (Didry *et al*.,1994).

همچنین نتایج آنالیز سیر نشان می دهد آلیسین(Allicin) مهم ترین ترکیب موجود در این گیاه بوده و اثرات 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 (Thymol) و کارواکرول (Carvacrol) 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. همچنین زمانی که از دی متیل سولفوکساید (Dimethyl sulfoxide (DMSO 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 و همکاران در سال 1996 انجام شد نشان داد تغییر در تأثیر 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 تاسماهیان 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 (LC_{50}) 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 و ۱۲۰۰ 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 قرارگرفتند. بررسی نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد بین مقادیر مختلف عصاره های مورد بررسی (گروه های تیمار) در ایجاد بهبودی و از بین بردن علائم بالینی آئرومونیازیس و نیز کاهش میزان تلفات اختلاف معنی داری مشاهده نمی گردد در حالیکه بین گروه های تیمار و شاهد اختلاف معنی دار آماری می شود($P<0.05$) بطوریکه کلیه

ماهیان گروه های شاهد قبل از 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 اثرات عصاره های ۳ گیاه دارویی turmeric *Curcuma longa*, Tulsi plant *Ocimum sanctum*, neem *Azadirachta indica*, بر روی ماهیان گلدفیش *Carassius auratus* 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 سال ۲۰۰۷ اثرات عصاره های ۱۰گیاه دارویی را بر روی ماهیان *Carassius auratus* آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا به روش in vitro و in vivo مورد بررسی قرار دادند.آنها ماهیان آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا را به مدت ۱۵ روز با استفاده از غذاهای محتوی عصاره های مورد بررسی مورد تغذیه قرار دادند. نتایج حاصل از مطالعه مذکور نشان داد تغذیه ماهیان *Carassius auratus* آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا با غذای محتوی عصاره گیاه*phyllanthus emblicca* به مقدار ۲۵ 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 موارد مذکور در ارتباط با تاثیرات مقادیر مختلف عصاره های سیر و آویش شیرازی در تاسماهیان ایرانی مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی نتایج نمونه های خونی تهیه شده از تیمارهای مطالعاتی تعیین غلظتهای کشنده، اختلاف معنی دارآماری در میزان لنفوسیت تیمارهای مختلف را 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 ماهیان می تواند به دنبال عوامل استرس زا ایجاد گردد و از آنجا که افزایش غلظت عصاره ها به عنوان یک عامل استرس زا محسوب می شود لذا در این حالت سطوح لوکوسیتها با زمان تغییر کرده و منجر به کاهش تعداد لنفوسیت ها نسبت به تعداد

گلبولهای سفید می شود (Roberts,1989 ; Berlin *et al*., 2008) البته باید توجه نمود در موارد نقص سیستم ایمنی ماهیان نیز میزان لنفوسیت ها که شاخص تولید پادتن ها در ماهیان می باشند نیز کاهش می یابد که باید آنرا با تاثیر مواد استرس زا مانند عصاره ها که موجب تغییرات فیزیکی و شیمیایی آب و ایجاد استرس و کاهش لنفوسیت ها می شوند تفکیک نمود.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 نوتروفیل ها 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 محدود گردد (معصوم زاده و همکاران، ۱۳۸۹).عدم توجه به مقادیر توصیه شده عصاره های سیر و آویشن شیرازی می تواند موجب بروز تلفات گسترده، ایجاد واکنش های عصبی و نیز آسیبهای بافتی در ماهیان تحت تیمار با عصاره های مذکور گردد.

پیشنهادها

۱- با توجه به توسعه پرورش ماهیان خاویاری در کشور و در نتیجه امکان بروز آئرومونیازیس به منظور جلوگیری از تاثیرات سوء مواد ضد عفونی کننده شیمیایی و آنتی بیوتیکها 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 شیرازی می 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 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 عوامل خونی و نیز آسیب های بافتی در کنترل آلودگی های باکتریایی سایر گونه های ماهیان خاویاری نیز تحقیقات جامعی صورت پذیرد.

۵- 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.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مساعدت و همکاریهای آقایان دکتر عباسعلی مطلبی ریاست محترم وقت موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، دکتر مصطفی شریف روحانی معاونت محترم وقت تحقیقاتی موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور،

دکتر محمود بهمنی ریاست محترم موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، دکتر محمد پورکاظمی ریاست محترم وقت انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، دکتر شهرام عبدالملکی معاونت محترم تحقیقاتی موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، دکتر جلیل ذریه زهرا ریاست محترم بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان موسسه و روسای محترم مراکز تکثیر و بازسازی ذخایر شهید بهشتی و شادروان دکتر یوسف پور صمیمانه قدردانی و تشکر بعمل می آید. از رهنمودهای ارزشمند استاد مشاور محترم پروژه آقای دکتر عیسی شریف پور که راهنمائیهای دقیق و سازنده ایشان در هدایت علمی طرح بسیار مؤثر بوده است سپاسگزاری می گردد. از آقای دکتر مسعود حقیقی، ناظر محترم پروژه به جهت ارائه راهنماییهای مؤثر و ارزشمند تشکر و قدردانی می گردد.

از همکاران محترم بخش بهداشت و بیماریهای موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور آقایان دکتر شاپور کاکولکی و دکتر ابوالفضل سپهداری قدردانی و تشکر بعمل می آید.

از کلیه همکاران محترم پروژه که در کلیه مراحل اجرایی همکاری صمیمانه داشته اند آقایان دکترمحمدرضا مهرابی، دکتر علیرضا شناور ماسوله، مهندس جلیل جلیل پور، مهندس سهیل بازاری مقدم، مهندس مهدی علیزاده،

مهندس ذبیح ا... پژند، مهندس علی حلاجیان، مهندس محمد پوردهقانی، دکتر محمد علی یزدانی، مهندس هوشنگ یگانه و نیز کلیه همکاران اداری، مالی و پشتیبانی صمیمانه تشکر و قدردانی گردیده و توفیقات روز افزونشان را از خداوند متعال مسئلت دارد.

منابع

۱- آذری تاکامی، قباد. ۱۳۷۶. مدیریت بهداشتی و روشهای پیشگیری و درمان بیماریهای ماهی. انتشارات طاها- پریور. ۳۰۴ صفحه.

۲- 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 .

۳- اسوبودوا، ز.، ویکسوا، ب. ۱۹۹۵. تشخیص،پیشگیری و درمان بیماریها و مسمومیتهای ماهی، ترجمه شریف روحانی۱۳۷۴، انتشارات معاونت تکثیروپرورش آبزیان شیلات ایران. ۲۵۶صفحه.

۴- بازاری مقدم، س.، شریف روحانی، م.، شریف پور، ع.، حقیقی، ع.، مهرابی ، م.، معصوم زاده، م.، جلیل پور، ج.، علیزاده، م.، شناور ماسوله، ع.، پژند ، ذ.، پوردهقانی، م. حلاجیان، ع.، صادقی، م.،یزدانی ، م.،پور علی، ح. ۱۳۹۲ . بررسی تاثیر عصاره های سیر و آویشن شیرازی درکنترل انگل های خارجی بچه تاسماهی ایرانی. رشت: موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۱۴۴ صفحه.

۵- تاکاشیما، اف.، هیبایا ، تی. ۱۳۷۸. اطلس بافت‌شناسی ماهی، ترجمه ایرج پوستی و عبدالحمید صدیق مروستی .دانشگاه تهران، موسسه چاپ و انتشارات ، ۳۲۸ صفحه

۶- تنگستانی، ر.، علیزاده، ا.، ابراهیمی، ع و زارع، پ . ۱۳۹۰ . اثر اسانس گیاه سیر بر شاخصه های هماتولوژیک

فیل ماهیان جوان پرورشی. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۶، شماره ۳ ، ۲۱۶-۲۰۹ .

۷- 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.

۸- جوینده ف.۱۳۹۱. تعیین حد کشندگی و دز درمانی ، پرمنگنات پتاسیم ($KMno_4$) و سولفات مس($_4OSCu$) و تاثیر آنها بر وضعیت میکروبی پوست و آبشش و هیستوپاتولوژیکی بافت آبشش بچه ماهی آمور یا کپور علفخوار (*Ctenopharingodon idella*) .پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد لاهیجان .

۹- سلطانی م.۱۳۷۵. بیماری های باکتریایی ماهی.انتشارات سازمان دامپزشکی کشور با همکاری مؤسسه نشر جهاد. ۲۸۰-۲۷۹.

۱۰- سلطانی، م. ۱۳۷۹. طرح ایمن سازی تاسماهی ایرانی بر علیه عفونت های باکتریایی (آئروموناس هیدروفیلا) .گزارش نهایی. رشت : موسسه تحقیقات شیلات ایران .

۱۱- 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 .

۱۲-شریف روحانی، م . ۱۳۸۳. 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.

۱۳- 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.

۱۴- 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.

۱۵- 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.

۱۶- شیرانی بید آبادی، لیلا. محمودی، محسن. صابری، صدیقه. ذوالفقاری باغبادرانی، آزاده. نیل فروش زاده، محمدعلی. عبدلی،حمید.معطر،فریبرز.حجازی،سیدحسین.۱۳۸۷.تاثیر مخلوط عصاره های هیدروالکلی آویشن شیرازی،بومادران و بره موم در درمان لیشمانیوز جلدی روستایی: مدل حیوانی Balb/c ، مجله دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، دوره ۶۶ ، شماره ۱۱ ، ص ۷۹۰- ۷۸۵ .

۱۷- رودبارکی، صادق رودبارکی. ۱۳۹۲. بررسی تاثیر عصاره اکالیپتوس بر روی باکتری آئروموناس هیدروفیلا در ماهی آمور ، پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات دانشگاه آزاد اسلامی لاهیجان.

۱۸- عامری مهابادی، م. ۱۳۷۸. روش های آزمایشگاهی هماتولوژی دامپزشکی. موٌسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، شماره ۲۴۴۷. ۱۲۶ صفحه.

۱۹- علیشاهی ،م . مصباح ،م.۱۳۸۹ . اثر لوامیزول ، عصره اکیناسه و آویشن بر بازماندگی . برخی فاکتورهای رشد در ماهی اسکار ، نخستین همایش ماهیان زینتی ایران .

۲۰-علیشاهی، م . حیدری، م. پشم فروش، م. نجف زاده، ح. (۱۳۸۹): مطالعه اثرات ضد باکتریایی برخی عصاره های گیاهی علیه استرپتوکوکوس اینیانی ، یرسینیا راکری و آئروموناس هیدروفیلا ، مجله دامپزشکی ایران، دور ششم ،شماره۲ ،اتابستان۱۳۸۹

۲۱- کوهپایه عابد، مژدگانلو زهره، انصاری مهسا،عزتخواه مجید .۱۳۸۸. بررسی اثر عصاره متانولی گیاهان دارویی آویشن شیرازی و اوکالیپتوس بر روی باکتری لاکتوکوکوس گارویه در شرایط آزمایشگاهی، اولین همایش ملی بیماریهای اقتصادی صنعت پرورش قزل آلای رنگین کمان، کتابچه خلاصه مقالات ، صفحه ۴۰.

۲۲- گودرزی منصور، ستاری مرتضی، نجار پیرایه شهین، بیگدلی محسن.۱۳۸۵. بررسی تاثیر عصاره های آبی و الکلی گیاه آویشن شیرازی بر روی اشرشیاکولی انتروهموراژیک، یافته، دور هشتم، شماره ۳ ، صفحات ۷۰- ۶۳.

۲۳- 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.

۲۴- 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

۲۵- مخیر، بابا. ۱۳۸۵. بیماریهای ماهیان پرورشی. انتشارات دانشگاه تهران.

۲۶- 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.

27- Adetumbi, M., Javor G.T., Lau, B.H.S. 1986. *Allium sativum* (garlic). inhibits lipid synthesis by Candida albicans. Antimicrob. Agents. Chemother. 30: 499-501.

28- Adler, A.J., Holub, B.J. 1997. Effect of garlic and fish-oil supplementation on serum lipid and lipoprotein concentrations in hypercholesterolemia men. Am. J. Clin. Nutr. 65: 445-450.

29- Alishahi, M. and Mesbah, M., 2010. Comparison of the effect of some immunostimulants and herbal extracts on hematological parameters of Astronatus ocellatus. 1st Conference on Ornamental fish. Iran. Tehran. July 2010.

30- Aoki, T. 1999. Motile Aeromonads (Aeromonas hydrophila). In: Fish Diseases and Disorders. Edited by PTK Woo and D.W Bruno. CABI Publishing, USA. pp.427-453.

31- Austin B. & Austin D. A. 1993. Bacterial Fish Pathogens, 2ed, Ellis Harwood, New York, USA, 384pp.

32- Bartolome, R.; Ella, R. L.; Garcia, A.; Magboo, M. L. and Donne, R. 2007. Addition of Crude Methanolic *Allium sativum* (Garlic) extracts to commercial fish feed can potentially prevent or delay Ichthyophthiriasis in the Black Molly (*Poecilia sphenops*). Acta Manilana, 55: 37-42.

33- Brelin .D.stress coping strategics in brown trout (Salmo trutta):ecological significance aranching ,Acta Universitatis Upsaliensis Upsala 2008.68P.

34- Chitamanat, C.; Tongdonmuan, K. and Nunsong, W. 2005. The use of crude extracts from traditional medicinal plants to eliminate *Trichodina* sp. in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. Journal of Science Technology, 27: 359-364.

35- Corzo-Martinez, M., Corzo, N., Villamiel, M. 2007. Biological properties of onions and garlic. Trends. Food. Sci. Technol. 18: 609-625.

36- Dababneh B.F. 2008. Antimicrobial activity of selected Jordanian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms. journal of Food, Agriculture and Environment, 6, (2)134-139.

37- Diab, A.S., El-Nagar, G.O., Abd-El-Hady, Y.M. 2002. Evaluation of Nigella sativa L (black seeds; baraka), *Allium sativum* (garlic). and Biogen as feed additives on growth performance and immunostimulants of O. niloticus fingerlings. Suez Canal Vet. Med. J. 13: 745-75.

38- Didry N, Dubreuil L, Pinkas M. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenole on oral bacterial. Pharm. Acta. Helv. 1994; 69: 25-8.

39- Dudek, K., Sliwa, E., Tatara, M. 2006. Changes in blood Leucocyte pattern in piglets from sows treated with garlic preparations. Bull Vet Inst Pulway. 50: 236-267.

40- Esmaeli, F., Peighan, R. (1997) Infection of grass carp with the motile Aeromonas- like bacteria. Iranian Sci. Fish. J. 6: 1-8.

41- Fuller R. 1989. A review: probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, 66: 365-378.

42- Finney DJ. 1971. Statistical methods in biological assay, 2nd Ed Hafner Publishing Company, New York; N. Y. Cambridge University Press, London, England, p. 68.

43 -Imani, P., Akhlaghi, M. 2004. Immunogenicity of hemolysin, protease and Lipoplysaccharide extracted from Aeromonas hydrophila in common carp *Cyprinus carpiol*. Arch. Razi Ins. 57: 55-66.

44- Iwama G. 1996. Innate Immunity in fish,.in Iwama G. and Nakanishi T. The fish immune system. Academic Press, London, PP: 73-114.

45- Han, J., Lawson, L., Han, G., Han, P. 1995. A spectrophotometric method for quantitative determination of allicin and total garlic thiosulfinates. Anal. Biochem. 225: 157-160.
46- Klontz, G.W.1994. Fish Hematology. In: Techniques in Fish Immunology, Stolen, J.S., T.C. Flecher, A.F. Rowely, T.C. Zelikoff, S.L. Kaattari and S.A. Smith (Eds.). Vol. 2, SOS Publications, USA., ISBN: 0962550582, pp: 121-132.
47- Kori-Siakpere,O .2008. Acute toxicity of potassium permanganate to fingerlings of the Aferican catfish,Clarias gariepinus (Burchell,1822) African Journal of Biotecnology Vol.7(14), pp.2514-2520.
48- Madsen, H.C.K., Buchmann, K., Mellergaard, S. .2000a. Association between trichodiniasis in eel (*Anguilla anguilla*) and water quality in recirculation. Aquaculture 187, 275–281.
49- Madsen, H. C. K.; Buchmann, K. and Mellergaard, S. 2000b. Treatment of Trichodiniasis in eel (*Anguilla anguilla*) reared in recirculation systems in Denmark; alternatives to formaldehyde. Journal of Aquaculture. 186: 221-231.
50- Mahboubi M, Akbari M, Haghi G and Kazempour N. 2007. Comparison of antimicrobial activity of Respitol-B with mentofin containing menthol, eucalyptus oil. Iranian J. of medical Microbiol. 2007; 1 (1): 39 – 45.
51- Mesalhy Aly S., Abd-El-Rahman A.M., John G. and Mohamed M.F .2008. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. Aquaculture, 277: 1-6.
52- Noga, E. J. 2000. Fish disease diagnosis and treatment. Iowa State University Press, Ames.
53- Omima A.E. Aboud. 2010. Application of some Egyptian medicinal Plants to eliminate Trichodina sp. and Aeromonas hydrophila in tilapia (Oreochromis niloticus). Researcher. 2(10) . Pp: 12-16.
54- Raa J. 1996. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. Review of Fish Sciences, 4: 229-288.
55- Ramasamy Harikrishnan, Chellam Balasundaram . 2008 . In vitro and in vivo studies of the use of some medicinal herbals against the pathogen Aeromonas hydrophila in goldfish.J Aquat Anim Health. 2008 ;20(3):165-76
56- Rasooli , I . & Rezvani ,M.B (2001) : Antimicrobal effects of Ampicillin and essential oil of Zataria multiflora , Hakim, 4 : 219-25 .
57-Razavilar, V., Hasani, A., Azari-Takami, Gh .1981. The role of Aeromonas hydrophila in some fish diseases.J. Fac. Vet. Vet. Med. Univ. Tehran. 27: 21-33.
58- Ress, L. P., Minney, S. F., Plummer, N. J., Slatter, J. H., Skyrme, D. A. 1993. Aquantitative assessment of the antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum*). World. J. Microbiol. Biotechnol. 9: 303- 307.
59- Roberts,R.J. Fish pathology .1989. Secend ed., Baillier tinndal, 467p.
60- Roussis V., Chinou I., Perdetzoglou D. and LoukisA., 1996. Identification and bacteriostatic activity of the essential oil of Lamium graganicum L. spp. laevigatum Arcangeli. Journal of Essential Oil Research, 8: 291-93.
61- Sanarelli, G., 1891, Ueber einen neuen Mikroorganismus des Wassers, welcher fur Thiere mit veraenderlicher und konstanter Temperatur pathogen ist, Zentralbl. Bakteriol., 9:193–199; 222–228.
62- Shalaby, A.M., Khattab, Y.A., Abdel Rahman, A.M. 2006. Effects of Garlic (*Allium sativum*). and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.12: 172-201.
63- Sharif Rohani M. , Masoumzadeh M., Ebrahimzadeh Mousavi H. A.; Sharifpour I. ; Jalilpoor J. ; Pourdehghani M. ; Shenavar Masouleh A. ; Alizadeh M. ; Bazari Moghaddam . 2013. S. The effects of oral administration of different doses of *Zataria multiflora* essential oil on some blood and serum parameters in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). Iranian Journal of Fisheries Sciences. 12(2) 713-723.
64- Sharanu S., Biradar, N., Rajendara, Goud., Ujjwal Neogi and Ruchi Saumya .2007. In vitro and in vivo Antibacterial Studies of Medicinal Plant on Aeromonad Septicemia in Fish Caused by Aeromonas hydrophila.Journal of Fisheries and Aquatic science 2 (6): 417- 421,2007
65- Sindambiwe JB, Calomme M, Cos P, Totte J, Pieters L, Vlietinck A, et al. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activites. J Ethnopharmacol. 1999 Apr; 65(1): 71-77.
66- Soko, C.K. and D. E. Barker .2005. Efficacy of crushed garlic and lemon juice as bio-product treatments for *Ichthyophthirius multifiliis* (‘ich’) infections among cultured, juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aqua Assoc Can Spec Pub 9: 108-110.
67- Sugita, H., Tanaka, K., Yoshinami, M. and Deguchi, Y .1995. Distribution of aeromnas species in the intestinal tracts of river fish. Appl. Environ. Microbiol. 61: 4128-4130.
68- Sumiyoshi, H. 1997. New pharmacological activities of garlic and its constituents. Folia Pharmacol. Japonica. 110: 93-97.
69- T.R.C . 1984. OECD guidelines for testing of chemicals. Section 2. Effects on biotic systems. Pp. 1-39.

70-Vanden DA, Vlietinck AJ. In: Dey PM, Harborne JB. (Eds.), Methods in plant biochemistry: screening medthods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. London: Academic Press; 1991. p: 47-69.

71- Weber, N.D., Anderson, D.O., North, J.A., Murray, B.K., Lawson, L.D., Hughes, B.G. 1992. In vitro virucidal effects of *Allium sativum* (garlic) extract and compounds. Planta Med. 58:417-23.

72- Yao, J.Y., Shen, J.Y., Li, X.L., Xu, Y., Hao, G.J., Pan, X.Y., Wang, G.X., Yin, W.L .2011. Isolation of bioactive components from Chelidonium majus L. with activity against *Trichodina* sp. . Aquaculture. Journal. 318, 235–238.

73- Yaoling, L., Jiunrong, C., Mengsyh, S., Mingler, S., Li, Y.L., Chen, J.R., Shien M.S., Shien M.J .1998. The effects of garlic powder on the hypolipidemic function and antioxidative status in hamsters. Nutr. Sci. J. 23: 171-87.

74- Yuan C., Li D., Chen W. and Sun F .2008. Administration of herbal immunoregulation mixture enhances some immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*). Fish Physiology and Biochemistry, 10: 1007-1120.

Abstract:

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 lethal concentration (LC_{50}) of *Zataria multiflora* hydroalchoholic extract on fingerlings of Persian sturgeon showed that during 96h and 1h, the LC_{50} was 766.65 and 9933.44 mg/L, respectively. Also, LC_{50} of garlic extract during 96h and 1h was 1279.97 and 12624.08 mg/L, respectively. Investigation on white blood cells (WBC) showed significant difference in lymphocyte and neutrophil numbers in different treatments ($P<0.05$). But, there was no significant difference in monocyte and eosinophil numbers in different treatments ($P>0.05$).

In this study, concentrations ranging from 400 to 1,000 mg/ml of hydroalchoholic extracts of *Zataria mult*for treating Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) infected with the *Aeromonas hydrophila* by intraperitoneal injection were determined. Based on the results of the concentration of the extract to 800 mg/ml during shower hour was determined . Assay to determine the concentration of garlic extract on the bacteria in the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*)concentration range of 600 to 1200 mg/ml determine the effective concentration of extract equivalent to 1,000 mg/ml during shower hour was calculated.

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 kidny.

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – International Sturgeon Research Institute

---

Project Title : Study on the effects of applying Garlic (*Allium sativum*) and *Zataria multiflora* extracts on *Aeromonas hydrophila* in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fingerling
Approved Number: 14-86-12-8913-89154
Author: Mehdi Masoumzadeh
Project Researcher : Mehdi Masoumzadeh
Collaborator(s) *:* M. Sharif Rohani, J. Jalilpour, S. Bazari Moghaddam, A.R. Shenavar Masouleh, M. Alizadeh, Z. Pajand, A. Hallajian, M. Pour Dehghani, H. Yeganeh
Advisor(s): -
Supervisor: M. Haghighi
Location of execution : Guilan province
Date of Beginning : 2011
Period of execution : 2 Years
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 - International Sturgeon Research Institute

Project Title :

Study on the effects of applying Garlic (*Allium sativum*) and *Zataria multiflora* extracts on *Aeromonas hydrophila* in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fingerling

Project Researcher :

Mehdi Masoumzadeh

Register NO.

48175