

مطالعه اثرات عصاره‌های آبی و الکلی گیاه مرزنجوش (*Origanum vulgare* L.) بر درصد

بقاء و برخی از شاخص‌های خونی ماهی کپور معمولی آلوده با آئروموناس هیدرو فیلا

(*Aeromonas hydrophila*)

چکیده

از معمول‌ترین باکتری‌های موجود در آب شیرین سراسر جهان آئروموناس هیدرو فیلا است که اغلب سبب بیماری در ماهیان پرورشی می‌شود. در طی سال‌های گذشته جهت مقابله با بیماری‌های عفونی آنتی‌بیوتیک‌ها به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در مقابل با رواج گرایش جهانی آبی‌پروری سبز و توسعه سیستم‌های ارگانیک کاربرد گیاهان دارویی به‌عنوان درمان آنتی‌بیوتیکی مورد توجه قرار گرفته است. در این میان مرزنجوش از گیاهان مورد استفاده در طب سنتی می‌باشد که برای درمان بسیاری از بیماری‌ها کاربرد دارد. در این تحقیق تأثیرات عصاره‌های آبی و الکلی گیاه مرزنجوش بر درصد بقاء و برخی از فاکتورهای خونی ماهی کپور معمولی که به باکتری آئروموناس هیدرو فیلا آلودگی داشتند مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا عصاره‌های آبی و الکلی گیاه مرزنجوش تهیه گردید و در مرحله بعد تعداد ۱۵۰ عدد ماهی کپور معمولی با میانگین وزن 100 ± 25 گرم تهیه شد. بعد از آدپتاسیون ماهی‌ها به ۵ گروه در ۳ تکرار (تعداد ۱۰ عدد ماهی در هر تکرار) تقسیم شدند. در گروه شاهد مثبت تزریق سرم فیزیولوژی در ناحیه داخل صفاقی انجام شد و ماهیان هیچ‌گونه عصاره‌ای دریافت نکردند. در تیمار شاهد منفی تزریق باکتری زنده آئروموناس به میزان 1×10^6 در ناحیه داخل صفاقی صورت پذیرفت و نمونه‌ها با غذای عادی کپور تغذیه شدند. همین مقدار باکتری به ۳ تیمار دیگر تزریق شد و به ترتیب تیمار سوم ۱۶ گرم عصاره آبی، تیمار چهارم ۱ گرم عصاره اتانولی و تیمار پنجم ۲۵ گرم عصاره متانولی به ازای هر ۱۰۰۰ گرم غذا دریافت کردند. بعد از اتمام دوره ۳۵ روزه آزمایش از نمونه‌ها خون‌گیری و تست‌های سنجش فاکتورهای خونی انجام شد. همچنین میزان درصد بقاء در طول دوره ثبت و محاسبه گردید. نتایج نشان داد که عصاره‌های گیاه مرزنجوش باعث تغییر در فاکتورهای خونی ماهیان مبتلا به باکتری مذکور گردیده که این تأثیرات با شدت بیشتر در عصاره‌های الکلی بخصوص متانولی نسبت به عصاره آبی مشاهده گردید. همچنین میزان درصد بقاء در تیمار دریافت‌کننده عصاره متانولی اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد از خود نشان داد که می‌توان بیان کرد احتمالاً بتوان از این گیاه برای درمان بیماری‌های ناشی از آئروموناس هیدرو فیلا در ماهیان به‌عنوان یک مکمل و یا جایگزین آنتی‌بیوتیکی استفاده کرد. البته برای تجویز قطعی نیاز به مطالعات تکمیلی و وسیع‌تر احساس می‌شود.

واژگان کلیدی: آئروموناس هیدرو فیلا، گیاهان دارویی، مرزنجوش، فاکتورهای خونی،

ماهی کپور معمولی.

مقدمه

از آنجاکه توسعه آبی‌پروری در جهان امروز در تأمین غذای بشر و اقتصاد کشورهای مختلف نقش بسیار مهمی دارد یکی از شرایط تولی د آبیان پرورشی حفظ بهداشت و جلوگیری از بروز بیماری‌های ماهیان از جمله بیماری‌های عفونی و غیر عفونی (محیطی، تغذیه‌ای، ژنتیکی) می‌باشد. اکثر عوامل باکتریایی ماهی قادر به ادامه حیات در خارج از بدن ماهی می‌باشند. زمانی که یک ماهی به‌وسیله هر نوع

محمود بهمنی^{۱*}

سید مهدی حسینی‌فرد^۲

مریم اهدایی^۳

۱. موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای

خزر، رشت، ایران

۲. استادیار بهداشت و بیماری‌های آبزیان، گروه

شیلات، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل،

ایران

۳. کارشناس ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، واحد

علوم و تحقیقات گیلان، دانشگاه آزاد اسلامی،

رشت، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات

Maryamehdaee62@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۷/۲۲

کد مقاله: ۱۳۹۳۰۳۰۱۷۹

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه

کارشناسی ارشد است.

عامل استرس‌زا دچار استرس شود، مقاومتشان نسبت به عوامل باکتریایی که در محیط و حتی در بدن خودشان وجود دارد، کم می‌شود که در نهایت باعث مرگ ماهی می‌شود (بهروزی، ۱۳۸۲).

آئروموناس هیدروفیلا و دیگر آئروموناس‌های متحرک معمول‌ترین باکتری‌ها در زیستگاه‌های آب شیرین سراسر جهان هستند و اغلب این باکتری‌ها سبب بیماری در ماهیان پرورشی می‌شوند (Cipriano, 2001). بسیاری از اعضاء این گروه به‌عنوان پاتوژن‌های اولیه برای گروه وسیعی از حیوانات خونسرد بخصوص ماهی شناخته شده‌اند (Aoki et al., 1971; Son et al., 1997). اگرچه آئروموناس‌های متحرک اختصاصاً به‌عنوان پاتوژن‌های ماهی شناخته شده‌اند، اما این باکتری‌ها همچنین به‌عنوان بخشی از میکروفلور نرمال روده‌ای ماهی‌های سالم هستند (Trust et al., 1974).

در طی سال‌های گذشته و جهت مقابله با بیماری‌های عفونی و بالا بردن کیفیت زندگی، آنتی‌بیوتیک‌ها به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفتند ولی متأسفانه مصرف بی‌رویه و گاهی نادرست این داروها سبب نابودی بعضی از ارگانیسم‌های حساس شده و شرایط زیست را برای بقاء باکتری‌های مقاوم مساعد نموده؛ به‌نحوی که از کارایی آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌ها کاسته شده است (خرغامی، ۱۳۸۹). در مزارع پرورشی در صورتی که که خسارت ماهیان تلف شده، هزینه درمان و کاهش میزان رشد ماهیانی که بعد از بیماری بهبود می‌یابند، محاسبه شود؛ خواهیم دید که منجر به افزایش قیمت تولید و سود کم برای آبی پروران می‌گردد (Barken et al., 2007).

رواج گرایش جهانی آبی‌پروری سبز و توسعه سیستم‌های ارگانیک که در آن بیشترین استفاده از مواد طبیعی و کم‌ترین استفاده از مواد شیمیایی و آلاینده به عمل می‌آید و با توجه به غنای سرزمینی و تنوع گیاهان دارویی کشور، می‌توان از گیاهان بومی ایران برای درمان آنتی‌بیوتیکی استفاده نمود. در این میان گیاه مرزنجوش (*Origanum vulgare* L) یکی از گیاهان قدیمی و مورد استفاده در طب سنتی ایران و ملل مختلف می‌باشد و برای درمان بسیاری از بیماری‌ها کاربرد دارد. در کشور ما ۲ گونه *O.vulgare* (بومی) و *O.majorana* (کشت شده) رشد می‌کنند (Mozaffarian, 1998; Barazandeh, 2000). بر اساس گزارش‌های تأیید شده جنس مرزنجوش یکی از مطالعه شده بزرگ‌ترین گروه‌های گیاهان نعنای در خصوص محتویات ترکیبات شیمیایی آن بوده است (Zargari, 1997).

طی سالیان اخیر، آبی‌پروری در رابطه با استفاده از داروها و اسانس‌های گیاهی نظیر اسانس گل میخک، آویشن، اکالیپتوس، شمعدانی و غیره بررسی‌هایی صورت گرفته است و تعدادی از این اسانس‌ها به علت داشتن اثرات مختلف نظیر آرام‌بخشی و بیهوشی، محرک سیستم ایمنی و ضد قارچی و میکروبی به‌عنوان مواد مؤثر و قابل استفاده در آبی‌پروری معرفی شده‌اند (موسوی، ۱۳۹۰). بر همین اساس مطالعه حاضر باهدف بررسی تأثیرات عصاره‌های آبی و الکلی گیاه مرزنجوش بر برخی از فاکتورهای خونی ماهی کپور معمولی آلوده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

گیاه مرزنجوش مورد نیاز در این مطالعه از شرکت گیاهان دارویی شفاعخش در تهران خریداری گردید. سپس برای حصول اطمینان از نوع و گونه خریداری شده با کارشناس مجرب کشاورزی دپارتمان تخصصی گیاهان دارویی دانشگاه شهید چمران اهواز مشاوره صورت گرفت. در نهایت و پس از تأیید گونه، گیاهان به آزمایشگاه انتقال یافتند.

ابتدا گیاه مرزنجوش خشک شده به‌دقت وزن‌کشی و اوزان به‌دست آمده ثبت شدند. سپس توسط آسیاب برقی به‌خوبی پودر گردید تا موجب سهولت در روند مراحل عصاره‌گیری شود. بعد از آن طی مراحل عصاره‌گیری از پودرهای تهیه شده به‌طور جداگانه و به روش پركولاسیون با استفاده از آب، اتانول ۹۶ درصد و متانول ۸۰ درصد عصاره تهیه شد و در مراحل بعد با حذف حلال وزن عصاره‌های به‌دست آمده اندازه‌گیری و ثبت شدند (صمصام شریعت، ۱۳۸۶).

عصاره‌گیری به روش پركولاسیون انجام شد. به همین منظور ابتدا پودر تهیه شده از گیاه را وزن کرده و مقدار ۵۰ گرم از آن را داخل ارلن ریخته و سپس به ازای هر ۱۰ گرم از پودر گیاه برای تهیه عصاره متانولی از ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول (و در مرحله بعد برای تهیه عصاره اتانولی از ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول)، ۱۰۰ میلی‌لیتر دی اتیل اتر و ۱۰۰ میلی‌لیتر n-هگزان به داخل ارلن اضافه گردید و دهانه آن را با ورقه

آلومینیوم بسته و برای ۷۲ ساعت نگهداری شدند و بعد از طی شدن این مدت، با کاغذ صافی مواد درون ارلن صاف گردیده و سپس با دستگاه Rotary evaporator حلال موجود در عصاره (متانول و اتانول) را خارج شد. بعد از طی شدن این مرحله نیاز به انجام دو مرحله چربی‌گیری وجود داشت. به همین منظور در مرحله اول ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول برای عصاره متانولی اضافه گردید (و ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول در زمان تهیه عصاره اتانولی) و پس از آن محلول در فریزر ۲۸- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در فریزر تمام ناخالصی‌ها رسوب کردند و بعد از آن در مرحله دوم دوباره عصاره را از صافی عبور دادیم و سپس تقطیر صورت پذیرفت. بعد از صاف کردن مجدداً ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال به محلول اضافه کرده و محلول را به فریزر با دمای ۲۸- سانتی‌گراد برگردانیدیم و بعد با انجام عمل تقطیر مجدد حلال آن را خارج نموده و عصاره‌های متانولی و اتانولی به دست آمده را به لوله‌های فالکون کاملاً استریل منتقل نموده و برای انجام مراحل بعدی آزمایش اقدام به ذخیره‌سازی عصاره‌ها در یخچال نمودیم. (صمصام شریعت، ۱۳۸۶).

در مرحله عصاره‌گیری آبی ۵۰ گرم از گیاه را داخل یک ارلن کاملاً تمیز و استریل ریخته و به آن ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید (صمصام شریعت، ۱۳۸۶). روی ارلن با کاغذ آلومینیوم پوشش داده شد و سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. بعد از گذشت زمان موردنظر محتویات موجود در ارلن را از روی چندلایه گاز استریل عبور داده تا رسوبات پودر مرزنجوش از عصاره جدا گردد. محلول صاف شده را به یک بشر تمیز و استریل منتقل نموده و به عصاره فرصت داده شد تا در دمای اتاق و در سایه حلال آن تبخیر گردد. بعد از گذشت ۱۵ روز عصاره آبی از کاغذ صافی عبور داده شد. برای اطمینان کامل از عدم حضور دانه‌های گیاه در عصاره؛ مجدد عمل صاف کردن به کمک فیلتر سر سرنگی ۲۲/۱۰ انجام گرفت. بدین صورت که در مجاورت شعله و با استفاده از سرنگ‌های ۱۰ میلی‌لیتری که فیلتر سر سرنگی بر روی آن نصب شده بود، عصاره از بشر برداشته شد و پس از عبور از فیلتر به لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتر کاملاً استریل منتقل گردید. در نهایت عصاره‌ها به یخچال منتقل شدند تا در زمان مورد نیاز از آن‌ها استفاده گردد.

جهت استاندارد نمودن روش و تکرارپذیری آن، وزن خشک عصاره‌ها تعیین گردید. بدین صورت که ۹ لوله خالی توسط ترازوی دیجیتالی حساس وزن شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از عصاره (اتانولی و متانولی) به هر لوله اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از خشک شدن کامل عصاره‌ها و توزین مجدد، میانگین ۳ لوله برای هر عصاره به عنوان درصد ماده خشک عصاره‌ها محاسبه گردید (علیشاهی و همکاران، ۱۳۸۸).

گونه باکتری مورد مطالعه، آئروموناس هیدرو فیلائی جدا شده از ماهی کپور علفخوار بیمار می‌باشد که جنس و گونه آن با آزمایشات باکتریولوژیک و PCR (با استفاده از پرایمرهای مخصوص این باکتری) توسط کارشناس علوم آزمایشگاهی در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی بابل مشخص گردیده شده بود.

جهت تهیه، نگهداری و تغذیه ماهیان تعداد ۱۵۰ عدد از ماهیان کپور معمولی با میانگین وزن 100 ± 25 گرم تهیه گردید. ماهیان به ۱۵ مخزن ۱۰۰ لیتری فایبرگلاس با حجم آب‌گیری ۹۰ لیتر و به صورت تصادفی و ۱۰ عدد در هر مخزن منتقل شدند. ماهیان جهت آدپتاسیون با شرایط جدید به مدت یک هفته نگهداری شدند. شروع غذادهی ۴۸ ساعت پس از انتقال صورت پذیرفت. همه‌ی نمونه‌ها در طول مدت زمان آدپتاسیون جیره‌ی غذایی مشابهی را مصرف کردند (جدول ۱). بعد از آدپتاسیون ۱۵۰ عدد ماهی به ۵ گروه تقسیم شدند. این گروه‌ها شامل یک گروه شاهد منفی (گروه دریافت‌کننده غذای عادی کپور معمولی بدون هیچ‌گونه عصاره بعلاوه تزریق باکتری زنده آئروموناس هیدرو فیلا در ناحیه صفاقی)، یک گروه شاهد مثبت (دریافت‌کننده غذای عادی ماهی کپور معمولی بدون هیچ‌گونه عصاره و تزریق سرم فیزیولوژی در ناحیه صفاقی) و ۳ گروه تیمار (تیمارهای دریافت‌کننده عصاره آبی، اتانولی و متانولی گیاه مرزنجوش بعلاوه تزریق باکتری زنده در ناحیه صفاقی) هر کدام با ۳ تکرار، بودند. بر اساس یافته‌های اهدایی (۱۳۹۱) میزان کمترین رقت مهاری رشد (MIC) عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی گیاه مرزنجوش بر باکتری آئروموناس هیدرو فیلا در شرایط *in-vitro* به ترتیب ۱۶، ۱ و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش گردید؛ بر همین اساس پس از تهیه غذای مورد نیاز به صورت دستی آماده، به ۱۰۰۰ گرم از خوراک مخصوص ماهی میزان ۱۶ گرم از عصاره آبی گیاه مرزنجوش توسط اسپری روی خوراک پاشیده شد (جدول ۲). این عمل بعد از به هم زدن خوراک چندین بار تکرار شد. برای حفظ بهتر عصاره مرزنجوش در خوراک به هنگام تغذیه ماهی، میزان ۱ درصد محلول ژلاتین به همان روش روی خوراک اسپری گردید و سپس به مدت ۴ ساعت خوراک در فور ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا کاملاً خشک گردد. بعد از خشک

شدن، خوراک در کیسه‌های نایلونی مشکی بسته‌بندی شده، نشانه‌گذاری و تا زمان استفاده در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (علیشاهی و همکاران، ۱۳۹۰). برای تهیه خوراک با عصاره‌های اتانولی و متانولی مرزنجوش نیز به روش فوق عمل شد بدین صورت که میزان ۰/۲۵ گرم عصاره متانولی و ۱ گرم عصاره اتانولی به ازای هر ۱۰۰۰ گرم از غذا استفاده گردید (اهدایی، ۱۳۹۱).

جدول ۱: جیره غذایی کپور ماهیان طی دوره‌ی پرورش.

ترکیبات موجود در ۱۰۰ گرم غذا	
نوع ماده	میزان به گرم
آرد ماهی	۳۲/۸۸
آرد گندم	۵۵/۱۲
روغن ماهی	۱۰
ویتامین و مواد معدنی	۲

جدول ۲: گروه‌بندی ماهی‌ها در طول آزمایش.

شماره مخزن	گروه	نوع عصاره دریافتی	میزان گرم عصاره در ۱۰۰۰ گرم غذا	میزان باکتری تزریق شده	تعداد ماهی‌ها در طول آزمایش
۱-۳	شاهد منفی	-	-	$1/5 \times 10^6$	۳۰
۴-۶	شاهد مثبت	-	-	تزریق سرم فیزیولوژی	۳۰
۷-۹	تیمار ۱	آبی	۱۶	$1/5 \times 10^6$	۳۰
۱۰-۱۲	تیمار ۲	اتانولی	۱	$1/5 \times 10^6$	۳۰
۱۳-۱۵	تیمار ۳	متانولی	۰/۲۵	$1/5 \times 10^6$	۳۰

با توجه به تعیین LD₅₀ باکتری آئروموناس هیدرو فیلا بر ماهی کپور معمولی در روش اسپرمن و کاربر (et al., 2008) Hamilton) که مقدار آن $1/5 \times 10^7$ عنوان گردید؛ در روز ۲۰ از زمان شروع مطالعه، تزریق درون صفاقی باکتری زنده آئروموناس هیدرو فیلا با یک دوز پائین تر از مقدار LD₅₀ باهدف زنده‌مانی نمونه‌ها در چالش با باکتری (Martins et al., 2008) و انجام مطالعه میزان $1/5 \times 10^6$ (اخلاقی، ۱۳۷۹) به گروه شاهد منفی و ۳ تیمار دریافت‌کننده عصاره‌ها انجام گردید. بروز علائم بیماری از روز ۵ تا ۱۵ بعد از تزریق باکتری قابل مشاهده بود. پس از پایان دوره‌ی ۳۵ روزه آزمایش از هر مخزن ۳ ماهی به‌طور تصادفی انتخاب شدند (۲۴ ساعت قبل از انجام عمل خون‌گیری ماهیان قطع غذاهای شدند). برای بی‌هوش کردن ماهیان از پودر گل میخک استفاده شد؛ بدین صورت که مقدار ۳ گرم گل میخک در هاون چینی آسیاب و در یک بشر همراه مقداری آب در حرارت غیرمستقیم به مدت ۱۵ دقیقه دم شد؛ سپس صاف کرده آن با آب آکواریوم‌ها به حجم یک لیتر رسانده (کازمی‌پور و همکاران، ۱۳۸۴) و ماهی‌ها در ظرف گل میخک قرار داده شدند که حدوداً بعد از یک دقیقه بیهوشی اتفاق افتاد. خون‌گیری از ورید ناحیه ساقه دم صورت پذیرفت. خون گرفته شده در لوله آزمایش حاوی ماده ضد انعقاد هپارین به میزان ۱۵ میکرو لیتر برای هر میلی‌لیتر خون (توکلی و اخلاقی، ۱۳۸۸) ریخته شد و جهت انجام آزمایشات خونی به آزمایشگاه میکروبیولوژی و دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی بابل منتقل شدند. برای شمارش گلبول‌های قرمز از روش هموسیستمترنوبار، تعیین درصد هماتوکریت از روش میکروهماتوکریت (Stopskopf, 1993)، جهت سنجش میزان هموگلوبین از متد سیان مت هموگلوبین (Viget, 2000) و نیز برای اندازه‌گیری گلوبولین از دستگاه (USA, Awareness) Elisa Reader مدل Stat Fax-

2010 استفاده گردید. مقدار ایمونوگلوبولین کل از کسر پروتئین کل با پروتئین ترکیب شده با PEG سانتریفیوژ شده و برحسب میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد (Viget, 2000).

طرح این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی برنامه ریزی و اجرا گردید. قبل از تجزیه و تحلیل داده ها آزمون نرمالیت Shapiro-Wilk انجام شد و در صورت نرمال بودن از آزمون Anova و آزمون دانکن (Duncan) جهت تعیین اختلافات معنی دار بین گروه ها به وسیله نرم افزار Spss18 استفاده شد.

نتایج

نتایج به دست آمده حاصل از آزمون دانکن در مورد میزان RBC نشان داد که اختلاف معنی داری بین تیمارهای مختلف وجود دارد (جدول ۳). در ضمن بیشترین مقدار گلبول قرمز در تیمار ۱ (شاهد مثبت) و کمترین مقدار در تیمار ۲ (شاهد منفی) گزارش شد. اختلاف معنی داری بین تیمارهای مختلف و گروه شاهد در میزان هموگلوبین و هماتوکریت مشاهده گردید. بیشترین مقدار هموگلوبین و هماتوکریت در تیمار ۱ (شاهد مثبت) و کمترین مقدار در تیمار ۲ (شاهد منفی) گزارش گردیدند. در فاکتورهای MCHC, MCH, MCV نیز اختلاف معنی دار آماری بین تیمارها و گروه شاهد مشاهده گردید؛ بر همین اساس بیش ترین مقدار حجم متوسط گلبول قرمز در تیمار ۴ (اتانولی) و کمترین مقدار در تیمار ۲ (شاهد منفی)؛ بیشترین مقدار هموگلوبین متوسط گلبول قرمز در تیمار ۱ (شاهد مثبت) و کمترین مقدار در تیمار ۳ (عصاره آبی) و بیشترین مقدار غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز در تیمار ۱ (شاهد مثبت) و کمترین مقدار در تیمار ۴ (اتانولی) گزارش شدند. همچنین اختلاف معنی دار آماری بین تیمارها در فاکتور درصد بقاء مشاهده گردید که بالاترین میزان در تیمار شاهد مثبت و کمترین در گروه شاهد منفی ثبت شد (جدول ۳).

جدول ۳: بررسی فاکتورهای خونی و درصد بقاء در تیمارهای مختلف و تعیین وجود اختلاف و یا عدم اختلاف معنی دار آماری بین گروه ها.

P_value	عصاره متانولی	عصاره اتانولی	عصاره آبی	شاهد منفی	شاهد مثبت	گروه ها
						فاکتورهای سلولی
۰/۰۱	۱۶۹۷±۵۳/۹ ^a	±۷۶/۸۹ ^b ۱۴۶۲	±۸۱/۲۷ ^b ۱۳۵۴	۱۱۶۳±۱۰۳ ^c	±۹۳/۹۳ ^a ۱۷۸۷	گلبول قرمز (RBC) (۱۰ ^۳)
۰/۰۵	۹/۴۹±۱/۱۱ ^{ab}	۸/۱۳±۰/۴۱ ^b	^b ۷/۳۸±۱/۷۵	۶/۵۷±۱/۸۳ ^b	±۱/۱۶ ^a ۱۰/۴۳	هموگلوبین (Hb) (گرم بر دسی لیتر)
۰/۰۱	۴۳/۴۳±۱/۴۲ ^a	±۱/۱۵ ^b ۳۹/۷۴	±۲/۸۲ ^c ۳۴/۴۰	۲۹/۴۹±۲/۴۲ ^c	±۱/۲۲ ^a ۴۵/۳۴	هماتوکریت (Hct) (درصد)
۰/۰۵	۵/۴۸ ^{ab} ۲۵۶/۱۴±	±۱۱/۴۳ ^a ۲۷۱/۸۱	±۴/۵۳ ^b ۲۵۴/۹۰	۲۵۳/۵۶±۱۴/۵۶ ^b	±۶/۸۲ ^b ۲۵۳/۹۱	حجم متوسط گلبول قرمز (MCV) (فمتولیتر)
۰/۰۵	۵۵/۹۳±۵/۷۳ ^a	±۲/۱۹ ^a ۵۵/۸۳	±۹/۲۲ ^a ۵۴/۵۹	۵۶/۴۹±۹/۲۴ ^a	±۳/۲۶ ^a ۵۸/۲۵	هموگلوبین متوسط گلبول قرمز (MCH) (پیکوگرم)
۰/۰۵	۲۱/۸۵±۲/۲۵ ^a	±۰/۵۴ ^a ۲۰/۵۹	۳/۲۵ ^a ۲۱/۴۵±	۲۲/۲۷±۳/۲۷ ^a	±۱/۹۱ ^a ۲۲/۹۷	غلظت متوسط هموگلوبین گلبول های قرمز (MCHC) (درصد)
۰/۰۱	۷۶/۶۶±۵/۷۷ ^b	۶۰±۱۰ ^c	±۵/۷۷ ^d ۳۶/۶۶	±۱۱/۵۴ ^d ۲۳/۳۳	۹۰±۱۰ ^a	Survival (درصد)
۰/۰۵	۲/۴۶±۰/۱۵ ^a	۱/۹±۰/۱۹ ^a	۱/۸۳±۰/۲۸ ^a	^a ۱/۶۶±۰/۸۵	۱/۷۵±۰/۵۰ ^a	Glubolin

بحث و نتیجه‌گیری

از اصول اولیه در اهداف سیستم پرورش آبزیان تولید بالا در حداقل زمان و در کمترین فضا می‌باشد که این امر خود زمینه‌ساز بسیاری از بیماری‌هاست (پیغان و اسماعیلی، ۱۳۷۶). با متراکم شدن صنعت پرورش ماهی، بیماری‌های عفونی و غیر عفونی نیز در حال گسترش یافتن می‌باشند بطوریکه هر ساله مقادیر زیادی از آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی به‌منظور کنترل این بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (شیخ زاده و همکاران، ۱۳۸۸). با توجه به دشواری‌ها و معایبی که درمان بیماری و عوارض ناشی از باقی ماندن داروها و ایجاد مقاومت‌های دارویی در ماهیان و مصرف‌کنندگان به همراه دارد استفاده از انواع واکسن‌ها، مواد کمک ایمنی و محرک‌های ایمنی به‌عنوان عوامل پیشگیری‌کننده در دستور کار پرورش‌دهندگان قرار گرفت (سلطانی، ۱۳۸۷).

باکتری آئروموناس هیدرو فیلا از سببی سمی همورائیک ماهیان ناشی از استرس‌های ایجاد شده به‌وسیله عوامل مختلف جدا می‌شود که به‌عنوان عامل بیماری‌زا در تعداد زیادی از ماهیان آب شیرین، گاه‌گاهی آب‌شور و انسان به‌طور گسترده در جهان مطرح بوده است (Amin et al., 1985). تحقیقات انجام شده در ایران آئروموناس هیدرو فیلا را به‌عنوان عامل بیماری‌زای کپور ماهیان پرورشی و به‌صورت عامل ثانویه یا اولیه در مرگومیر ماهی‌آمو در خوزستان (Esmaeli and Peighan, 1997) معرفی گرد.

در دو دهه اخیر موفقیت‌های زیادی در استفاده از گیاهان دارویی در صنعت آبی‌پروری حاصل شده است. داروهایی با منشأ گیاهی با اهداف مختلف در صنعت آبی‌پروری کاربرد دارند که از آن جمله می‌توان به تحریک سیستم ایمنی ماهی و سایر آبزیان پرورشی (Vasudeva, 2004; Bisignano 2001) درمان بیماری‌های عفونی و آرام بخشی و بیهوشی ماهی، اشاره نمود (شریف روحانی و همکاران، ۱۳۸۶). از بین مواد مختلف جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها، اخیراً فرآورده‌هایی با منشأ گیاهی جایگاه ویژه‌ای یافته‌اند (Immanuel, 2004; Harikrishnan, 2003).

بر طبق نتایج به‌دست آمده از مطالعه؛ عصاره مرزنجوش بر فاکتور هماتوکریت در تیمارهای مختلف ماهیان کپور معمولی؛ اختلاف معنی‌دار آماری ($P < 0/01$) بین تیمارها قابل مشاهده است. تیمار شاهد مثبت بالاترین میزان هماتوکریت $45/34 \pm 1/22$ را نشان می‌دهد و این مقدار در تیمار منفی به کمترین میزان نسبت به سایر گروه‌ها می‌رسد. کاهش هماتوکریت و گلبول‌های قرمز در هنگام آلودگی با آئروموناس هیدرو فیلا با نتایج تحقیق توکلی و اخلاقی (۱۳۸۸) مطابقت دارد و برای آن می‌توان دلایل زیر را عنوان کرد: رقیق شدن خون به علت افزایش نفوذپذیری مویرگی، از دست رفتن گلبول‌های قرمز به علت خونریزی، تخریب گلبول‌های قرمز توسط همولیز باکتری، تخریب گلبول قرمز توسط کمپلمان از طریق فعال شدن مسیر آلترناتیو به‌وسیله لیپوپلی ساکارید باکتری، افزایش فاگوسیتوز گلبول‌های قرمزی که لیپو پلی ساکارید روی آن‌ها را پوشانده است (Moyner, et al., 1993; Rehulka, 1998). همچنین طبق مطالعه اخلاقی (۱۳۷۹)، پیرامون تأثیر تجویز ماده محرک ایمنی کوئل آ بر بروی فاکتورهای دفاع ایمنی اختصاصی ماهی کپور در عفونت تجربی با باکتری آئروموناس هیدروفیلا؛ نتایج نشان داد که درصد فاکتور هماتوکریت در خون ماهیانی که آلودگی تجربی با باکتری داشتند کاهش معنی‌داری ($P < 0/05$) از خود نسبت به ماهیان گروه کنترل نشان داده است و نیز درصد هماتوکریت خون ماهیانی که علاوه بر دریافت کوئل آ در آن‌ها عفونت ایجاد گردیده بود افزایش معنی‌داری ($P < 0/01$) نسبت به ماهیانی که فقط آلودگی تجربی داشتند مشاهده شد.

تغییر در میزان گلبول قرمز به طبع موجب تغییر در میزان سایر فاکتورهای گلبول قرمز خواهد شد به‌گونه‌ای که در بررسی تیمار شاهد مثبت (تزریق باکتری به همراه دریافت غذای فاقد عصاره مرزنجوش) MCV (حجم متوسط گلبول‌های قرمز) برابر با $253/91 \pm 6/84$ (هموگلوبین متوسط گلبول قرمز) MCH (هموگلوبین متوسط گلبول قرمز) $58/25 \pm 3/36$ پیکوگرم؛ میزان MCHC (غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز) $22/97 \pm 1/91$ درصد و نیز میزان Hb (هموگلوبین) $1/16 \pm 10/43$ گرم در دسی لیتر گزارش گردید که در فاکتورهای MCV، Hb دارای اختلاف معنی‌دار آماری و همچنین MCH و MCHC اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد. در مطالعه علشاهی و همکاران (۱۳۹۰) بر تأثیر تجویز خوراکی عصاره گیاه خار مریم (*Silybum marianum*) بر پاسخ ایمنی ماهی کپور معمولی (*Cyprinos carpio*)؛ در تیمار غیر ایمن شاهد (خوراک فاقد سیلی مارین) MCV برابر با $33/5 \pm 20/8$ فمتولیت؛ MCH $42/7 \pm 12/4$ پیکوگرم؛ میزان MCHC

۲۰/۸±۵/۵۴ درصد و در نهایت میزان Hb برابر با ۶±۱/۸ گرم در دسی لیتر بود که هیچ کدام از اعداد اعلام شده اختلاف معنی دار آماری با گروه شاهد خود نداشتند. تمامی اعداد گزارش شده در مطالعه حاضر با بررسی علیشاهی و همکاران (۱۳۹۰) نزدیک می باشند.

افزایش سطح پروتئین ها به ویژه گلوبولین سرم شاخص مناسبی برای بررسی وضعیت دفاع ایمنی ماهی می باشد (Siwicki et al., 1994). گزارش هایی از افزایش گلوبولین سرم به دنبال استفاده از محرک های ایمنی گیاهی وجود دارد (Vasudeva Rao, et al., 2004). افزایش میزان گلوبولین با افزایش میزان پروتئین تام و آلبومین قابل توجه است (Metwally, 2009). بر طبق نتایج به دست آمده اختلاف معنی دار آماری بین تیمارها مشاهده نگردید. بیشترین مقدار گلوبولین در تیمار دریافت کننده عصاره متانولی مشاهده شد که احتمالاً به دلیل تأثیر عصاره متانولی بر سیستم ایمنی ماهی کپور آلوده به باکتری آئروموناس می باشد. که این نتایج با بررسی علیشاهی و همکاران (۱۳۹۰) مطابقت دارد.

یکی از ویژگی های اصلی محرک های ایمنی افزایش بقاء ماهی بعد از چالش ایجاد شده با باکتری مورد استفاده می باشد (Brunt et al., 2007; Gudmundsdóttir and Magnadóttir, 1997). طبق بررسی های صورت گرفته اختلاف معنی دار آماری بین تیمارهای مختلف در فاکتور درصد بقاء مشاهده گردید. همان گونه که اعداد به دست آمده در این تیمارها نشان می دهند، عصاره متانولی توانسته درصد بقاء بالاتری نسبت به تیماری که فقط باکتری را دریافت کرده است نشان بدهد. نتایج تحقیق علیشاهی و همکاران (۱۳۹۰) نیز نشان داد که بعد از تجویز عصاره خار مریم در تیمار غیر ایمن افزایش بقاء نسبت به تیمار شاهد را باعث شده است.

در این تحقیق می توان گفت که عصاره های اتانولی و متانولی گیاه مرزنجوش با تأثیر بر برخی از فاکتورهای خون ماهی باعث افزایش مقاومت در برابر عفونت ناشی از آئروموناس هیدروفیلا شده اند؛ لذا می توان از عصاره های این گیاه برای درمان بیماری های ناشی از آئروموناس هیدرو فیلا در ماهیان به عنوان یک جایگزین و یا مکمل آنتی بیوتیکی (البته در صورت تأیید عدم وجود خاصیت بازدارندگی این عصاره بر آنتی بیوتیک مورد استفاده) مطرح و مصرف نمود. البته برای تجویز قطعی این عصاره ها نیاز به مطالعات تکمیلی و وسیع تر احساس می شود.

منابع

- اخلاقی، م.، ۱۳۷۹. مطالعه تأثیر تجویز ماده محرک ایمنی (کوئل آ) روی برخی پارامترهای دفاع ایمنی غیر اختصاصی ماهی کپور معمولی در عفونت تجربی با *Aeromonas hydrophila*. مجله پژوهش و سازندگی. شماره ۱۳. صفحه ۱۰۸.
- اخلاقی، م.، ۱۳۷۹. ایمنی زائی باکتری آئروموناس هیدرو فیلا در ماهی کپور معمولی. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. دوره ۵. شماره ۱. صفحات ۵۷-۶۲.
- اهدایی، م.، ۱۳۹۱. اثرات ضد باکتریایی عصاره های آبی و الکلی گیاه مرزنجوش (*Origanum vulgare* L.) علیه باکتری آئروموناس هیدروفیلا و مطالعه تأثیرات آن ها بر ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) آلوده با باکتری آئروموناس هیدرو فیلا. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات گیلان. ۱۰۷ ص.
- بهریزی، ش.، ۱۳۸۲. گزارش نهائی طرح تحقیقاتی بررسی آلودگی های انگلی و باکتریایی در مزارع پرورش ماهیان سرد آبی و گرم آبی استان مازندران. موسسه تحقیقات شیلات ایران. شماره ۸۱/۶۲۹ گ.ن. تهران. ۸۰ ص.
- پیغان، ر. و اسماعیلی، ف.، ۱۳۷۶. آلودگی ماهی کپور علفخوار به ارگانسیم های شبه آئروموناس های متحرک. مجله علمی شیلات ایران. سال شانزدهم. شماره ۲. صفحات ۳۷-۴۱.
- توکلی، ه. و اخلاقی، م.، ۱۳۸۸. بررسی میزان لیزوزیم، ایموگلوبولین، گلبول ها و هماتوکریت خون در ماهی قزل آلا رنگین کمان به دنبال عفونت تجربی با آئروموناس هیدرو فیلا بیماری ز. مجله تحقیقات دامپزشکی. دوره ۶۴ شماره ۲. صفحات ۱۶۲-۱۵۷.
- سلطانی، م.، ۱۳۸۷. ایمنی شناسی ماهیان و سخت پوستان. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۶۴ ص.
- شریف روحانی، م.، ۱۳۸۶. بررسی اثر بیپهوشی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) و ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران. سال شانزدهم. شماره ۴. صفحات ۱۰۶-۹۹.
- شیخ زاده، ن و همکاران، ۱۳۸۸. مطالعه اثرات اسانس اکالیپتوس (*Eucalyptus globules*) بر برخی فاکتورهای ایمنی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله تحقیقات دامپزشکی. دوره ۶۴ شماره ۱. صفحات ۵۴-۴۷.

- صمصام شریعت، ۱۳۸۶، ۵، عصاره‌گیری و استخراج مواد مؤثره گیاهان دارویی؛ روش‌های شناسایی و ارزیابی آن‌ها، انتشارات مانی اصفهان. ۲۵۸ ص.
- ضرغامی، ص. ۱۳۸۹. تشخیص و تعیین میزان بروز ژن‌های tetA و tetE ایجادکننده مقاومت به اکسی‌تتراسایکلین در آئروموناس هیدروفیلا جدا شده از ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی (مطالعه موردی در بازار ماهی کرج). پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشکده منابع طبیعی تهران.
- علیشاهی، م.، سلطانی، م.، مصباح، م. و اسمعیلی‌راد، ا. ۱۳۹۰. تأثیر تجویز خوراکی عصاره خار مریم (*Silybum marianum*) بر پاسخ‌های ایمنی ماهی کپور معمولی. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۶، شماره ۳، صفحات ۲۶۳-۲۵۵.
- کاظمی‌پور، ی.، رضایی، م. و کیانی، م. ۱۳۸۴. مقایسه کیفی اثر سیر و عصاره بابونه و گل خطمی در ترمیم ظاهری زخم‌های سطحی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان. شماره ۶۶ صفحات ۹۷-۹۳.
- موسوی، س. م. ۱۳۹۰. گیاهان دارویی جدید در آبزی‌پروری. اولین همایش ملی آبزی‌پروری ایران، بندر انزلی.
- Amin, N. E., Abdallah, I., Elallay, T. and Ahmed, S. M., 1985. Motile Aeromonas septicemia among Tilapia (*Sarotherodon niloticus*) in Upper Egypt. J. Fish Pathol. 20: 93-97.
- Aoki, T., Egusa, S., Ogata, Y. and Watanabe, T., 1971. Detection of resistance factors in fish pathogen *Aeromonas liquefaciens*. Journal of General Microbiology, 65:343-349.
- Barazandeh, M. M., 2000. Essential oil composition of *Origanum majorana* L. Iran. Med. and Aromatic Plants Res. 2000; 10: 65 - 75.
- Bisignano, G., Laganà, M.G. and Trombetta, D. 2001. In vitro antibacterial activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. EMS Microbiology Letters. 198, 1 (20) 9-13.
- Brunt, J., Newaj-Fizul, A. and Austin, B., 2007. The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis. 30: 573-579.
- Cipriano, R. C., 2001. Aeromonas Hydrophila and Motile Aeromonads cepticemais of fish. FISH Disease leaflet.
- Esmali, F. and Peighan, R., 1997. Infection of grass carp with the motile Aeromonas- like bacteria. Iranian Sci. Fish. J. 6: 1-8.
- Gudmundsdóttir, B. K. and Magnadóttir, B., 1997. Protection of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against an experimental infection of *Aeromonas salmonicida* sub sp. achromogenes. Fish Shellfish Immunol. 7: 55-69.
- Harkrishnan, R., Balasundaram, G., 2003. Modern trends in Aeromonas hydrophila diseases management with fish. Fisher is science, 13:281-329.
- Immanuel, G., Vincylai, V. C., Sivaram, V. and Palavesam, A., 2004. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. Aquaculture, 236, 53-65.
- Moyner, K., Roed, K. H., Sevatdal, S. and Heum, M., 1993. Changes in non-specific immune parameters in Atlantic salmon, *Salmo salar* L, induced by *Aeromonas salmonicida* infection. Fish Shellfish Immunol. 3: 253-265.
- Mozaffarian, V. A., 1998. Dictionary of Iranian Plants Names, Farhang Moaser, Tehran. 1998, p: 381.
- Rehulka, J., 1998. The blood indices of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in aeromonas-induced ulcerous dermatitis. Acta Vet.
- Siwicki, A. K., Anderson, D. P. and Rumsey, G. L., 1994. Dietary intake of Immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Vet. Immunol. Immunopathol. 41: 125-139.
- Son, R., Rusul, G., Sahilah, A. M., Zainuri, A., Raha, A. R. and Salmah, I., 1997. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultured fish, Tilapia (*Tilapia mossambica*). Letters in Applied Microbiology, 24:479-482
- Stopskopf, M., 1993. Clinical pathology in fish medicine. Edited by Stopskopf WB. Sanders company, Philadelphia. USA, pp.113-131.
- Trust, T. J., Bull, L. M., Currie, B. R. and Buckley, J. T., 1974. Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microflora of the Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), gold fish (*Carrasius auratus*), and Rainbow trout (*Salmo gairdne*). Journal of Fisheries Research Board of Canada. 36:1174-1176.
- Vasudeva Rao, Y., Romesh, M. and Chakrabarti, R., 2004. Potentiation of antibody production in Indian major carp *Labeo rohita*, rohu, by *Achyranthes aspera* as an herbal feed ingredient. Aquaculture. 238: 67-73.
- Zargari, A., 1987. Iranian Medicinal Plants. 4th ed. Tehran: Tehran University Press; 1987:51-9.