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 (*Aeromunas hydrophila*)

محمود بهمنی[1*]
سید مهدی حسینی‌فرد[2]
مریم اهدایی[3]

۱. موسسه تحقیقات بین المللی 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.

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 مورداستفاده قرارگرفته‌اند. در مقابل با رواج گرایش جهانی آبزی‌پروری سبز و توسعه سیستم‌های ارگانیک کاربرد گیاهان داروئی به‌عنوان درمان آنتی‌بیوتیکی موردتوجه قرارگرفته است. در این میان مرزنجوش از گیاهان مورداستفاده 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 موردبررسی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا عصاره‌های آبی و الکلی گیاه مرزنجوش تهیه گردید و در مرحله بعد تعداد ۱۵۰عدد ماهی کپور معمولی با میانگین وزن ۲۵± ۱۰۰ گرم تهیه شد. بعد از آداپتاسیون 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 ۱۰۶×۱/۵ 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 ۱گرم عصاره اتانولی و تیمار پنجم ۰/۲۵گرم عصاره متانولی به ازای هر ۱۰۰۰ گرم غذا دریافت کردند. بعد از اتمام دوره ۳۵روزه 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 مبتلابه 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 فیلای 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 داروئی، مرزنجوش، فاکتورهای خونی، ماهی کپور معمولی.

مقدمه

ازآنجاکه توسعه آبزی‌پروری در جهان امروز در تأمین غذای بشر و اقتصاد کشورهای مختلف نقش بسیار مهمی دارد یکی از شرایط تولی د آبزیان پرورشی حفظ بهداشت و جلوگیری از بروز بیماری‌های ماهیان ازجمله 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

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2025-11-13]

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

آئروموناس هیدرو فیلا 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 شناخته‌شده‌اند (Aoki *et al*., 1971; Son *et al*., 1997). اگرچه آئروموناس‌های متحرک اختصاصاً به‌عنوان پاتوژن‌های ماهی شناخته‌شده‌اند، اما این باکتری‌ها همچنین به‌عنوان بخشی از میکروفلور نرمال روده‌ای ماهی-های سالم هستند (Trust *et al*., 1974).

در طی سال‌های گذشته و جهت مقابله با بیماری‌های عفونی و بالا بردن کیفیت زندگی، آنتی‌بیوتیک‌ها به‌طور گسترده‌ای مورداستفاده 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؛ به‌نحوی‌که از کارائی آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌ها کاسته شده است(ضرغامی، ۱۳۸۹). در مزارع پرورشی درصورتی‌که که خسارت ماهیان تلف‌شده، 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 آبزی پروران می‌گردد (Barken *et al*., 2007).

رواج گرایش جهانی آبزی‌پروری 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 مورداستفاده 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* (کشت‌شده) رشد می‌کنند (Mozaffarian, 1998; Barazandeh, 2000). بر اساس گزارش‌های تائید شده جنس مرزنجوش یکی از مطالعه شده بزرگ‌ترین گروه‌های گیاهان نعناع در خصوص محتویات ترکیبات شیمیایی آن بوده است (Zargari, 1997).

طی سالیان اخیر، آبزی‌پروری 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 قابل‌استفاده در آبزی‌پروری معرفی‌شده‌اند (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 هیدرو فیلا صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

گیاه مرزنجوش موردنیاز در این مطالعه از شرکت گیاهان داروئی شفابخش در تهران خریداری گردید. سپس برای حصول اطمینان از نوع و گونه خریداری‌شده با کارشناس مجرب کشاورزی دپارتمان تخصصی گیاهان داروئی دانشگاه شهید چمران اهواز مشاوره صورت گرفت. درنهایت و پس از تائید گونه، گیاهان به آزمایشگاه انتقال یافتند.

ابتدا گیاه مرزنجوش خشک‌شده به‌دقت وزن‌کشی و اوزان به‌دست‌آمده ثبت شدند. سپس توسط آسیاب برقی به‌خوبی پودر گردید تا موجب سهولت درروند مراحل عصاره گیری شود. بعدازآن طی مراحل عصاره‌گیری از پودرهای تهیه‌شده به‌طور جداگانه و به روش پرکولاسیون با استفاده از آب، اتانول ۹۶ درصد و متانول ۸۰ درصد عصاره تهیه شد و در مراحل بعد با حذف حلال وزن عصاره‌های به‌دست‌آمده اندازه‌گیری و ثبت شدند (صمصام شریعت، ۱۳۸۶).

عصاره‌گیری به روش پرکولاسیون انجام شد. به همین منظور ابتدا پودر تهیه‌شده 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 ۱۰۰میلی‌لیتر اتانول)، ۱۰۰ میلی‌لیتر دی اتیل اتر و ۱۰۰ میلی‌لیتر n-هگزان به داخل ارلن اضافه گردید و دهانه آن را با ورقه

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2025-11-13]

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 پس‌ازآن محلول در فریزر ۲۸- درجه سانتی گراد قرار گرفت. در فریزر تمام ناخالصی‌ها رسوب کردند و بعدازآن 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 برگرداندیم و بعد با انجام عمل تقطیر مجدد حلال آن را خارج نموده و عصاره‌های متانولی و اتانولی به‌دست‌آمده 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 عصاره گیری 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 صاف‌شده 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 سرنگی۰/۲۲µ انجام گرفت. بدین‌صورت که در مجاورت شعله و با استفاده از سرنگ‌های ۱۰ میلی‌لیتری که فیلتر سر سرنگی بر روی آن نصب‌شده بود، عصاره از بشر برداشته شد و پس از عبور از فیلتر به لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتر کاملاً استریل منتقل گردید. درنهایت عصاره‌ها به یخچال منتقل شدند تا در زمان موردنیاز از آن‌ها استفاده گردد.

جهت استاندارد نمودن روش و تکرارپذیری آن، وزن خشک عصاره‌ها تعیین گردید. بدین‌صورت 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 مدت۲۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از خشک شدن کامل عصاره‌ها و توزین مجدد، میانگین ۳ لوله برای هر عصاره به‌عنوان درصد ماده خشک عصاره‌ها محاسبه گردید (علیشاهی و همکاران، ۱۳۸۸).

گونه باکتری موردمطالعه، آئروموناس هیدرو فیلای جداشده 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 ۲۵± ۱۰۰ گرم تهیه گردید. ماهیان به ۱۵ مخزن ۱۰۰ لیتری فایبرگلاس با حجم آب‌گیری ۹۰ لیتر و به‌صورت تصادفی و ۱۰ عدد در هر مخزن منتقل شدند. . ماهیان جهت آداپتاسیون با شرایط جدید به مدت یک هفته نگهداری شدند. شروع غذادهی ۴۸ ساعت پس از انتقال صورت پذیرفت. همه‌ی نمونه‌ها در طول مدت‌زمان آداپتاسیون جیره‌ی غذایی مشابهی را مصرف کردند (جدول ۱). بعد از آداپتاسیون ۱۵۰ عدد ماهی به ۵گروه 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) هرکدام 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 موردنیاز به‌صورت 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

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2025-11-13]

شدن، خوراک در کیسه‌های نایلونی مشکی بسته‌بندی‌شده، 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 بدین‌صورت 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 ۱۰۰گرم 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 ۱۰۰۰گرم غذا	میزان باکتری تزریق‌شده	تعداد ماهی‌ها در طول آزمایش
۱-۳	شاهد منفی	–	–	$۱/۵×۱۰^{۶}$	۳۰
۴-۶	شاهد مثبت	–	–	تزریق سرم فیزیولوژی	۳۰
۷-۹	تیمار ۱	آبی	۱۶	$۱/۵×۱۰^{۶}$	۳۰
۱۰-۱۲	تیمار ۲	اتانولی	۱	$۱/۵×۱۰^{۶}$	۳۰
۱۳-۱۵	تیمار ۳	متانولی	۰/۲۵	$۱/۵×۱۰^{۶}$	۳۰

با توجه به تعیین LD_{50} باکتری آئروموناس هیدرو فیلا بر ماهی کپور معمولی درروش اسپرمن و کاربر (Hamilton *et al.*, 2008) که مقدار آن $۱/۵×۱۰^{۷}$ عنوان گردید؛ در روز۲۰ از زمان شروع مطالعه، تزریق درون صفاقی باکتری زنده آئروموناس هیدرو فیلا با یک دوز پائین تر از مقدار LD_{50} باهدف زنده‌مانی نمونه‌ها در چالش با باکتری (Martins *et al.*, 2008) و انجام مطالعه میزان $۱/۵×۱۰^{۶}$ (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 قابل‌مشاهده 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 غذادهی شدند). برای بی‌هوش کردن ماهیان از پودر گل میخک استفاده شد؛ بدین‌صورت 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 صاف‌کرده آن با آب آکواریوم‌ها به حجم یک لیتر رسانده (کاظمی‌پور 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 دمی صورت پذیرفت. خون‌گرفته شده در لوله‌آزمایش 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 هموسیتومترنوبار، 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 Elisa Reader (USA, Awareness) مدل Stat Fax-

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2025-11-13]

2010 استفاده گردید. مقدار ایمنوگلوبولین کل از کسر پروتئین کل با پروتئین ترکیب‌شده با PEG سانتریفیوژ شده و برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد (Viget, 2000).

طرح این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی برنامه‌ریزی و اجرا گردید. قبل از تجزیه‌وتحلیل داده‌ها آزمون نرمالیته Shapiro-Wilk انجام شد و در صورت نرمال بودن از آزمون Anova و آزمون دانکن(Duncan) جهت تعیین اختلافات معنی‌دار بین گروه‌ها به‌وسیله نرم-افزار Spss18 استفاده شد.

نتایج

نتایج به‌دست‌آمده حاصل از آزمون دانکن در مورد میزان RBC نشان داد که اختلاف معنی‌داری 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 معنی‌داری 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 معنی‌دار 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 معنی‌دار 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 معنی‌دار آماری بین گروه‌ها.

فاکتورهای سلولی / گروه‌ها	شاهد مثبت	شاهد منفی	عصاره آبی	عصاره اتانولی	عصاره متانولی	P_value
گلبول قرمز (RBC) (10^3)	۹۳/۹۳±^{a} ۱۷۸۷	۱۱۶۳ ±۱۰۳^{c}	۸۱/۲۷ ± ^{b}۱۳۵۴	۷۶/۸۹± ^{b} ۱۴۶۲	۱۶۹۷± ۵۳/۹ ^{a}	۰/۰۱
هموگلوبین (Hb) (گرم بر دسی لیتر)	۱/۱۶ ±^{a} ۱۰/۴۳	۶/۵۷ ± ۱/۸۳^{b}	^{b}۷/۳۸ ±۱/۷۵	۸/۱۳ ± ۰/۴۱^{b}	۹/۴۹± ۱/۱۱^{ab}	۰/۰۵
هماتوکریت (Hct) (درصد)	۱/۲۲ ±^{a} ۴۵/۳۴	۲۹/۴۹± ۲/۴۲^{c}	۲/۸۲ ± ^{c}۳۴/۴۰	۱/۱۵ ±^{b} ۳۹/۷۴	۴۳/۴۳ ± ۱/۴۲^{a}	۰/۰۱
حجم متوسط گلبول قرمز(MCV) (فمتولیتر)	۶/۸۴ ±^{b} ۲۵۳/۹۱	۲۵۳/۵۶±۱۴/۵۶ ^{b}	۴/۵۳ ± ^{b}۲۵۴/۹۰	۱۱/۴۳ ±^{a} ۲۷۱/۸۱	۵/۴۸^{ab} ۲۵۶/۱۴±	۰/۰۵
هموگلوبین متوسط گلبول قرمز (MCH) (پیکوگرم)	۳/۳۶ ±^{a} ۵۸/۲۵	۵۶/۴۹ ± ۹/۲۴^{a}	۹/۲۲ ± ^{a}۵۴/۵۹	۲/۱۹ ±^{a} ۵۵/۸۳	۵۵/۹۳± ۵/۷۳^{a}	۰/۰۵
غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) (درصد)	۱/۹۱ ±^{a} ۲۲/۹۷	۲۲/۲۷ ± ۳/۲۷^{a}	۳/۲۵ ^{a}۲۱/۴۵±	۰/۵۴ ±^{a} ۲۰/۵۹	۲۱/۸۵± ۲/۲۵^{a}	۰/۰۵
Survival (درصد)	۹۰±۱۰^{a}	۱۱/۵۴ ±^{d} ۲۳/۳۳	۵/۷۷ ±^{d} ۳۶/۶۶	۶۰ ± ۱۰^{c}	۷۶/۶۶±۵/۷۷^{b}	۰/۰۱
Glubolin	۱/۷۵± ۰/۵۰^{a}	^{a}۱/۶۶ ± ۰/۸۵	۱/۸۳ ± ۰/۲۸^{a}	۱/۹ ± ۰/۱۹^{a}	۲/۴۶± ۰/۱۵^{a}	۰/۰۵

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2025-11-13]

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 هرساله مقادیر زیادی از آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی به‌منظور کنترل این بیماری‌ها مورداستفاده 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 سپتی سمی هموراژیک ماهیان ناشی از استرس‌های ایجادشده 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 انجام‌شده در ایران آئروموناس هیدرو فیلا را به‌عنوان عامل بیماری‌زای کپور ماهیان پرورشی و به‌صورت عامل ثانویه یا اولیه در مرگ‌ومیر ماهی آمور در خوزستان (Esmaeli and Peighan, 1997) معرفی گردد.

در دو دهه اخیر موفقیت‌های زیادی در استفاده از گیاهان داروئی در صنعت آبزی‌پروری حاصل‌شده است. داروهایی با منشأ گیاهی با اهداف مختلف در صنعت آبزی‌پروری کاربرد دارند که از آن جمله می‌توان به تحریک سیستم ایمنی ماهی و سایر آبزیان پرورشی , (Vasudeva, 2004; Bisignano2001) 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 به‌دست‌آمده از مطالعه؛ عصاره مرزنجوش بر فاکتور هماتوکریت در تیمارهای مختلف ماهیان کپور معمولی؛ اختلاف معنی‌دار آماری (P<۰/۰۱) بین تیمارها قابل‌مشاهده است. تیمار شاهد مثبت بالاترین میزان هماتوکریت ۱/۲۲±۴۵/۳۴ 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<۰/۰۵) از خود نسبت به ماهیان گروه کنترل نشان داده است و نیز درصد هماتوکریت خون ماهیانی که علاوه بر دریافت کوئل‌آ در آن‌ها عفونت ایجاد گردیده بود افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۱) 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 ۶/۸۴±۲۵۳/۹۱ فمتولیتر؛ MCH (هموگلوبین متوسط گلبول قرمز) ۳/۳۶±۵۸/۲۵ پیکوگرم؛ میزان MCHC (غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز) ۱/۹۱±۲۲/۹۷ درصد و نیز میزان Hb (هموگلوبین) ۱/۱۶ ±۱۰/۴۳ 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 علیشاهی 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 ۳۳/۵ ±۲۰۸ فمتولیتر؛ MCH ۱۲/۴±۴۲/۷ پیکوگرم ؛ میزان MCHC

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2025-11-13]

۲۰/۸±۵/۵۴ درصد و درنهایت میزان Hb برابر با ۱/۸±۶ گرم در دسی لیتر بود که هیچ‌کدام از اعداد اعلام‌شده اختلاف معنی‌دار آماری با گروه شاهد خود نداشتند. تمامی اعداد گزارش‌شده در مطالعه حاضر با بررسی علیشاهی و همکاران (۱۳۹۰) نزدیک می‌باشند.

افزایش سطح پروتئین‌ها به‌ویژه گلوبولین سرم شاخص مناسبی برای بررسی وضعیت دفاع ایمنی ماهی می‌باشد (Siwicki *et al*., 1994). گزارش‌هایی از افزایش گلوبولین سرم به دنبال استفاده از محرک‌های ایمنی گیاهی وجود دارد (Vasudeva Rao, *et al*., 2004). افزایش میزان گلوبولین با افزایش میزان پروتئین تام و آلبومین قابل توجیه است (Metwally, 2009). بر طبق نتایج به‌دست‌آمده اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارها مشاهده نگردید. بیشترین مقدار گلوبولین در تیمار دریافت‌کننده عصاره متانولی مشاهده شد که احتمالاً به دلیل تأثیر عصاره متانولی بر سیستم ایمنی ماهی کپور آلوده به باکتری آئروموناس می‌باشد. که این نتایج با بررسی علیشاهی و همکاران (۱۳۹۰) مطابقت دارد.

یکی از ویژگی‌های اصلی محرک‌های ایمنی افزایش بقاء ماهی بعد از چالش ایجادشده با باکتری مورداستفاده می‌باشد (Brunt *et al*., 2007; Gudmundsdóttir and Magnadóttir, 1997). طبق بررسی‌های صورت گرفته اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارهای مختلف در فاکتور درصد بقاء مشاهده گردید. همان‌گونه که اعداد به‌دست‌آمده در این تیمارها نشان می‌دهند، 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 می‌توان گفت که عصاره‌های اتانولی و متانولی گیاه مرزنجوش با تأثیر بر برخی از فاکتورهای خون ماهی باعث افزایش مقاومت در برابر عفونت ناشی از آئروموناس هیدروفیلا شده‌اند؛ لذا می‌توان از عصاره‌های این گیاه برای درمان بیماری‌های ناشی از آئروموناس هیدرو فیلا در ماهیان به‌عنوان یک جایگزین و یا مکمل آنتی‌بیوتیکی (البته در صورت تائید عدم وجود خاصیت بازدارندگی این عصاره بر آنتی‌بیوتیک مورداستفاده) مطرح و مصرف نمود. البته برای تجویز قطعی این عصاره‌ها نیاز به مطالعات تکمیلی و وسیع‌تر احساس می‌شود.

منابع

اخلاقی، م.، ۱۳۷۹. مطالعه تأثیر تجویز ماده محرک ایمنی(کوئل آ) روی برخی پارامترهای دفاع ایمنی غیراختصاصی ماهی کپور معمولی در عفونت تجربی با *Aeromunas 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 ۶۲-۵۷.

اهدایی، م.،۱۳۹۱. اثرات ضد باکترایی عصاره‌های آبی و الکلی گیاه مرزنجوش (*Origanum vulgare* L.) علیه باکتری آئروموناس هیدروفیلا و مطالعه تأثیرات آن‌ها بر ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) آلوده با باکتری آئروموناس هیدرو فیلا.پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات گیلان. ۱۰۷ ص.

بهروزی، ش.، ۱۳۸۲. گزارش نهائی طرح تحقیقاتی بررسی آلودگی‌های انگلی و باکتریایی در مزارع پرورش ماهیان سرد آبی و گرم آبی استان مازندران. موسسه تحقیقات شیلات ایران. شماره ۸۱/۶۲۹گ.ن. تهران. ۸۰ ص.

پیغان، ر. و اسماعیلی، ف.، ۱۳۷۶. آلودگی ماهی کپور علفخوار به ارگانیسم‌های شبه آئروموناس‌های متحرک. مجله علمی شیلات ایران. سال شانزدهم. شماره۲. صفحات ۴۱-۳۷.

توکلی، ه. و اخلاقی، م.، ۱۳۸۸. بررسی میزان لیزوزیم، ایمنوگلوبولین،گلبول‌ها و هماتوکریت خون در ماهی قزل آلای رنگین‌کمان به دنبال عفونت تجربی با آئروموناس هیدرو فیلای بیماری‌زا.مجله تحقیقات دامپزشکی. دوره ۶۴. شماره ۲. صفحات ۱۶۲-۱۵۷.

سلطانی، م.، ۱۳۸۷. ایمنی‌شناسی ماهیان و سخت‌پوستان.انتشارات دانشگاه تهران. ۲۶۴ ص.

شریف روحانی، م.، ۱۳۸۶. بررسی اثر بیهوشی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) و ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykis*). 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.

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2025-11-13]

صمصام شریعت، ه.، ۱۳۸۶. عصاره‌گیری و استخراج مواد مؤثره گیاهان داروئی؛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 جداشده 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 پاسخ-های ایمنی ماهی کپور معمولی. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره۶۶، شماره۳، صفحات۲۶۳-۲۵۵.

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 Aeromonase 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 liqefaciens*. Jornal 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.

Esmaeli, 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 diseas management with fish.Fisher is science, 13:281-329.

Immanuel, G., Vincybai, 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, Salmosalar L, induced by Aeromonas salmonicida infection. Fish Shellfish Immunol. 3: 253-265.

Mozaffarian, V. A., 1998. Dictionary of Iranian Plants Names, Farhange Moaser, Tehran. 1998, p: 381.

Rehulka, J., 1998. The blood indices of the rainbow trout, Oncorhynchusmykiss (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. Antibitic yesistance and plasmid profile of Aeromonas hydrophila isolates from cultured fish,Tilapia(*Tilapia mossambia*). 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 gasterointstinal microflora of the Grass carp (*Ctenopharyngdon idella*), gold fish (*Carrasius auratus*), and Rainbow trout (*Salmo gairdne*).Jurnal of Fisheries Reserch 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.4st ed. Tehran: Tehran University Press; 1987:51-9.

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2025-11-13]