تاثیر مقادیر مختلف عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس بر فراسنجه‌های خونی ماهیان آمور (*Ctenopharyngodon idella*) آلوده شده به باکتری *آئروموناس‌هیدروفیلا* (*Aeromonas hydrophila*)

سید محمد صادق رودبارکی[1*]، هادی ارشاد[1]، حسین خارا[1] و مهدی معصوم‌زاده[2]

[1] **لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات**

[2] **رشت، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای‌خزر، بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان**

تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

چکیده

هدف از تحقیق حاضر بررسی تاثیرات عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس بر فراسنجه‌های خونی در ماهیان مبتلا شده به (*Aeromonas hydrophila*) بوده است. ایجاد آلودگی تجربی ماهیان آمور با باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا با تراکم‌های ۱۰۶× ۱/۵ ، ۱۰۷× ۱/۵ ، ۱۰۸× ۱/۵ و ۱۰۹× ۱/۲ (cfu/ml) به محوطه صفاقی ماهیان انجام شد که نتایج نشان دهنده ایجاد بیماری در تراکم ۱۰۸× ۱/۵ و ۱۰۹× ۱/۲(cfu/ml) باکتری بوده است. تأثیر عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس در غلظت‌های تیماری ۲۵۰، ۴۱۰، ۵۸۰ و ۷۵۰ (ppm) به صورت حمام کوتاه مدت (به مدت ۶۰دقیقه) بر بچه‌ماهیان آمور (با میانگین وزنی ۲۵ گرم) طی مدت ۱۰روز با ۳ تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی فراسنجه‌های خونی ماهیان مورد آزمایش که بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه و آزمون دانکن انجام گرفت نشان داد که اختلاف معنی‌دار آماری در میزان گلبول‌های‌سفید، گلبول‌های‌قرمز، حجم متوسط گلبولی، غلظت متوسط هموگوبین در گلبول‌قرمز، غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های‌قرمز، نوتروفیل، لینفوسیت خون ماهیان با تیمار شاهد حکایت دارد ($P<0/05$)، بررسی نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس خصوصا در غلظت‌های پایین به دلیل عدم ایجاد تغییرات قابل توجه در فراسنجه‌های خونی می‌توانند به عنوان ترکیبات ضدمیکروبی در کنترل عوامل بیماریزا و درمان ماهی آمور مورد توجه قرار گیرند.

واژه های کلیدی: ماهی آمور، اکالیپتوس، *آئروموناس‌هیدروفیلا* ، فراسنجه‌های خونی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۴۱۲۲۲۹۰۸۱ ، پست الکترونیکی: sadegh.roudbaraki@gmail.com

مقدمه

کپورماهیان از جمله مهمترین ماهیان پرورشی در ایران بوده و در بیشتر مناطق کشور مزارع پرورشی ماهیان مذکور وجود دارد و بیش از ۶۰ درصد از تولیدات آبزیپروری کشور را به خود اختصاص داده‌اند. در بین ماهیان گرمابی نیز ماهی آمور یا کپور علف‌خوار(*Ctenopharyngodon idella*) با ارزش‌ترین و پرطرفدارترین گونه نزد مصرف کنندگان و تولیدکنندگان می‌باشد.ولی متاسفانه طی سال‌های اخیر، تلفات این ماهی با ارزش، پرورش این گونه را با چالش جدی مواجه ساخته است. بطوری که بسیاری از پرورش‌دهندگان نسبت این گونه را در استخر به حداقل رسانده و یا آن را حذف نموده‌اند (۱۰). از مهمترین عوامل تهدیدکننده پرورش متراکم ماهیان از جمله ماهی آمور آلودگی به عوامل بیماریزا و در نتیجه بروز تلفات در آنها می‌باشد. اولین بار رضویلر و همکاران با جدا سازی *آئروموناس‌هیدروفیلا* از ماهی آمور در استان گیلان احتمال بیماری‌زایی و ایجاد علائم بیماری توسط این باکتری را در

گونه آمور گزارش نمودند (۴). پیغان و اسماعیلی در بررسی علل این تلفات موفق به جداسازی آئروموناس‌های متحرک از آبشش، کلیه و کبد ماهی آمور گردیدند (۱). سلطانی و موسوی دو گونه *آئروموناس‌هیدروفیلا* و *آئروموناس‌ورونی* را از تلفات ماهی آمور در دو کارگاه در استان‌های گیلان و تهران گزارش نمودند (۵). باکتری‌های خانواده آئروموناس، باسیل‌های گرم منفی آب شیرین بوده که اشکال متحرک آنها می‌توانند میکروفلور جانوران آبزی باشند و در جانوران خونسرد، خونگرم و حتی انسان نیز بیماریزا باشند . آئروموناس‌های متحرک عامل سپتی‌سمی‌هموراژیک در ماهیان آب شیرین عبارتند از: *آئروموناس‌هیدروفیلا*، *آئروموناس‌کاویه* و *آئروموناس‌سوبریا* که همگی گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری، غیرهاگزا و متحرک بوده که در مورد نقش آنها به عنوان پاتوژن اولیه شک و تردید وجود دارد اما نقش مهمی را در روند بیماری در ماهیان مبتلا ایفا می‌کنند (۱۲). داروهای گیاهی طی قرن‌های متمادی تنها منبع قابل دسترس جهت درمان دردها و آلام بوده‌اند و امروزه نیز با وجود پیشرفت علم و توسعه کاربرد داروهای سنتزی، هنوز گیاهان دارویی در مقیاس وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرند. در مورد بیماری‌های عفونی باکتریایی با توجه به محدودیت‌های استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله ایجاد مقاومت‌های دارویی در ماهی و انسان (در مورد آنتی-بیوتیک‌هایی که هم در ماهی و هم در انسان مصرف می-شوند) مشکلات زیست‌محیطی و قیمت بالای برخی آنتی-بیوتیک‌ها، گرایش به جایگزینی آنها با مواد کم ضررتر و ارزان‌تر را تقویت نموده است . از بین مواد مختلف جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها، اخیر اً فرآورده‌هایی با منشاء گیاهی جایگاه ویژه‌ای یافته‌اند (۱۱).

اکالیپتوس یکی از معروفترین گیاهان دارویی است که از دیرباز اثرات ضدمیکروبی و خواص دیگر آن مورد توجه بوده است . این گیاه منبع غنی از پلی‌فنلها و ترپنوئیدهاست و ترکیب اصلی برگ آن اکالیپتول($C_{10}H_{18}O$) می‌باشد (۸). عصاره برگ این گیاه دارای خواص ضدسرطانی، ضد-التهابی، ضددرد، آنتی‌اکسیدان ، ضدازدیاد قندخون ، ضد-مالاریایی، ضدقارچی و ضدویروسی است (۲۱). هدف تحقیق حاضر ارزیابی اثر عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس بر فراسنجه‌هایی نظیر گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین، ایمنوگلوبین، لیزوزیم در ماهیان مبتلا شده به *آئروموناس‌هیدروفیلا* بوده است.

مواد و روشها

این تحقیق در پاییز ۱۳۹۱ در *موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر* به انجام رسید. عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس مصرفی در این تحقیق، جهت اطمینان از درصد خلوص (اتانول ۷۰درصد) ماده مؤثره، از یکی از شرکت های معتبر تولیدکننده داروهای گیاهی با نام شرکت زردبند، تهیه گردید (جدول۱).

جدول ۱- مشخصات عصاره اکالیپتوس تهیه شده از شرکت زردبند

Batch	*Range*	*ویژگی*
clear	Clear	*ظاهر*
قهو ه ای	قهو ه ای	*رنگ*
5/21	4- 5/5	*pH*
1/037	1/022-1/045	*چگالی*
1/388	1/388-1/395	*Refractive Index*
4/00	3-4/6	*Dry residue*

به منظور ایجاد آلودگی تجربی در بچه‌ماهیان آمور به باکتری *آئروموناس‌هیدروفیلا* جدا شده از ماهیان خاویاری که جنس و گونه آن با استفاده از آزمایشات باکترولوژیک و روش ملکولی در موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر مشخص شده بود در محیط کشتتریپیکاز سوی براث(**TSB**) کشت داده شده و در مدت زمان ۲۴ ساعت در ۲۷ درجه سانتی گراد مورد انکوباسیون قرار گرفت با استفاده از دستگاه سانتریوفوژ جدا نموده تا باکتری خالص مورد آزمایش بدست آید. سپس باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* که با غلظت‌های 10^6 cfu/ml، 10^7 cfu/ml، 10^8cfu/ml با استاندارد نیم مک‌فارلند و 10^9 cfu/ml با

استاندارد ۴ مک‌فارلند برابر بود، تهیه شد. برای رسیدن به این غلظت‌ها و مقایسه آن با استاندارد مک‌فارلند باکتری سانتریوفوژ شده را با استفاده از سمپلر به میزان ۱۰۰ ماکرولیتر برداشته و به لوله آزمایش حاوی سرم فیزیولوژی اضافه و با دستگاه ورتکس آنها را میکس نموده و این کار تا زمانی که کدورت با استاندارد مک‌فارلند برابر شود ادامه پیدا کرد و سپس بصورت چشمی مورد مقایسه قرار گرفت، باکتری تهیه شده بدین روش به محوطه صفاقی ماهیان آمور با استفاده از سرنگ تزریق شد (۱۳)، سپس ماهیان به آکواریوم‌های ۲۰ لیتری با دمای ۲۰ درجه سانتی گراد منتقل شدند. ماهیان تا ۹۶ ساعت روزانه از نظر تلفات و علائم بیماری شامل بی‌حالی، اگزوفتالمی، تیرگی پوست و غیره مورد بررسی قرار گرفتند و تلفات روزانه ماهیان ثبت شد. بر اساس نتایج بدست آمده از انجام آزمایشات LC_{50} ۹۶ ساعته عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس بر روی بچه-ماهیان آمور و نتایج حاصله از حداقل غلظت مهار کنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتری آئروموناس هیدروفیلا (MBC) اقدام به انتخاب ۴ غلظت از عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس شد. بر اساس غلظت‌های مذکور گروه‌های تیمار و شاهد(مثبت و منفی) انتخاب و برای هر کدام از این گروه ها ۳ تکرار در نظر گرفته شد. ماهیان مبتلا به *آئروموناس‌هیدروفیلا* با غلظت‌های تیماری (ppm)۲۵۰ مقدار(cc)۵ عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس دریافت کردند، (ppm)۴۸۰ برابر(cc)۸,۲ از عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس، (ppm)۵۱۰ برابر(cc)۱۱ عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس، (ppm)۷۵۰ به مقدار (cc)۱۵ از عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس دریافت نمودند. شاهد مثبت (ماهیانی که به آنها باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* تزریق شده بود ولی مرحله درمان روی آنها صورت نگرفت و هیچگونه عصاره ای دریافت نکردند) و شاهد منفی (ماهیانی که به آنها باکتری *آئروموناس‌هیدروفیلا* تزریق نشده بود و مرحله درمان روی آنها صورت نگرفت و هیچگونه عصاره ای دریافت نکردند) انتخاب گردید و برای هر کدام از این گروه ها ۳ تکرار در نظر گرفته شد. پس از تعیین گروه‌های تیمار و شاهد نسبت به حمام بچه-ماهیان آمور آلوده شده به باکتری *آئروموناس‌هیدروفیلا* و دارای علائم ناشی از بیماری بعد از ۹۶ ساعت از زمان آلودگی، روزانه بمدت یک ساعت در طی ۱۰ روز اقدام گردید. جهت بررسی تاثیر مقادیر مختلف عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس بر فراسنجه‌های خونی ماهیان آمور تیمار شده با عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس مورد مطالعه نسبت به خونگیری از ۳۰ درصد نمونه ها (۳ قطعه ماهی از هر تکرار) به وسیله سرنگ ۲ سی‌سی از ساقه دمی و در بعضی موارد با قطع ساقه دمی اقدام و خون بدست آمده بلافاصله وارد اپندورف‌های حاوی ماده ضدانعقاد هپارین گردید. پس از تهیه نمونه‌های خون از ماهیان مورد بررسی اندازه‌گیری شاخص‌های خونی(CBC) به روش استاندارد به شرح ذیل انجام گردید:

تعیین درصد هموگلوبین در نمونه‌های‌خون (Hb): اندازه-گیری هموگلوبین با واحد گرم در دسی‌لیتر به دو روش دستگاهی با استفاده از **Sysmexlys** و یا با استفاده از محلول سیانومت هموگلوبین در طول موج ۵۴۰ نانومتر با درابکین و منحنی استاندارد به روش دستی امکان پذیر است. این آزمایش از روش دستگاهی استفاده شد (۱۸).

– **تعیین غلظت هماتوکریت در نمونه‌های خون (HCT) :** اندازه‌گیری هماتوکریت با لوله‌های میکروهماتوکریت و توسط میکروسانتریفوژ Hettich با دور rpm۱۴۰۰۰ اندازه-گیری شده است (۱۸).

گلبول‌قرمز به کمک محلول Lewis و با کمک پیپت ملانژور و لام نئوبار شمارش شده است.

گلبول‌سفید به کمک محلول Lewis در ۰/۱گرم (Brillant cresyl blue) به کمک پیپت ملانژور و لام نئوبار شمارش شده است **(۱۸)**.

شمارش افتراقی لکوسیت‌ها در نمونه‌های خون (diff): در این بررسی جهت تعیین مقادیر لوکوسیت‌های خون از روش‌های توصیه شده توسط Svobodova و همکاران در سال ۱۹۹۱ و Feldman و همکاران در سال ۲۰۰۰ استفاده و شمارش جمعیت انواع گلبول‌های‌سفید نمونه‌های خون ماهیان مورد بررسی با استفاده از لام نئوبار صورت پذیرفت (۱۵، ۱۸، ۲۱).

محاسبه **MCV** (حجم متوسط سلول) با واحد **(u3)** میکرون مکعب:

$$\text{MCV (mean cell volume)} = \frac{\text{هماتوکریت} \times 10}{\text{RBC (میلیون)}}$$

محاسبه MCH (هموگلوبین متوسط گویچه ای) با واحد پیکوگرم

$$\text{MCH (haemoglobin mean corpuscular)} = \frac{\text{هموگلوبین} \times 10}{\text{RBC (میلیون)}}$$

محاسبه MCHC (متوسط غلظت هموگلوبین سلول) با واحد درصد

$$\text{MCHC (concentration mean cell Hb)} = \frac{\text{هموگلوبین}}{\text{هماتوکریت}} \times 100$$

نمونه‌های خون تهیه شده در دمای آزمایشگاه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و سرم آنها جدا گردید.

اندازه‌گیری ایمنوگلوبین(IgM): جهت اندازه‌گیری IgMنمونه‌های سرم تهیه شده از ماهیان تیمار و شاهد از روش Nephelometry استفاده گردید (۲۵).

اندازه‌گیری غلظت آلبومین سرم: جهت اندازه‌گیری مقادیر **آلبومین** نمونه‌های سرم تهیه شده از ماهیان تیمار و شاهد از روش BCG/Colorinetric استفاده گردید (۱۴).

Albumin+BCG pH 4.2 Albumin-BCG(complex)

آلبومین موجود در سرم با Bromocresol green در pH اسیدی یک کمپلکس رنگی سبز-آبی را ایجاد می‌کند. شدت رنگ ایجاد شده متناسب با میزان آلبومین نمونه می‌باشد.

اندازه‌گیری مقادیر لیزوزیم: برای تعیین میزان لیزوزیم از روش ارائه شده توسط Kumari در سال ۲۰۰۶ استفاده شد. به این منظور از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای شکل الیزا، مقدار ۱۵ میکرولیتر سرم افزوده شد (۱۷). سپس ۱۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری میکروکوکوس لیزودیکتیکوس تهیه شده در بافر سیترات‌سدیم ۰/۰۲ مولار و pH ۵/۵ به میزان ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر اضافه گردید و جذب نوری اولیه در ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و پس از ۱ ساعت در دمای اتاق، مجدداً جذب نوری اندازه‌گیری شد.

روش‌های آماری: به منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها در گروه‌ها و تکرارها جهت تشکیل تیمارها از آزمون Shapiro-Wilk استفاده شد. در صورت نرمال بودن داده‌ها به منظور مقایسه آماری بین گروه‌ها در تیمارها از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (Oneway anova) و پس از انجام آزمون Test of Homogeneity of Variances جهت مقایسه گروه‌ها با یکدیگر از آزمون دانکن استفاده شد. کلیه آنالیز های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ استفاده شد.

نتایج

با سپری شدن ۹۶ ساعت از مدت زمان تزریق تعداد ۱۴۰ عدد بچه‌ماهیان آمور به باکتری *آئروموناس‌هیدروفیلا* ماهیان روزانه مورد بررسی قرار **می**گرفتند در نتیجه مشخص شد که ماهیان تزریق شده با غلظت 10^6cfu /ml ، 10^7cfu /ml **(با استاندارد نیم مک**فارلند) فاقد علائم بیماری و همچنین تلفات ناشی از تزریق باکتری بودند. علائم بیماری در ۱۲ عدد بچه‌ماهی آمور در غلظت cfu /ml 10^8 (با استاندارد نیم مک‌فارلند) در مشاهده شد. اما علائم بیماری در غلظت cfu /ml 10^9 (با استاندارد چهار

مک‌فارلند) با شدت بیشتر نمایان شد و تعداد ۵۶ عدد از ماهیان در این غلظت تزریقی دچار تلفات گردیدند.

تیمار ماهیان آمور آلوده شده به باکتری *آئروموناس-هیدروفیلا* با غلظت 10^8 cfu /ml (با استاندارد نیم مک-فارلند) به تعداد ۸۴ عدد ماهی انجام گردید که در طی مرحله درمان در ۲۴ ساعت در تیمار چهارم با غلظت (ppm)۷۵۰ که بر اساس آن (cc) ۱۵ عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس به این تیمار و تکرار آن وارد شده بود دچار تلفات گردیدند (جدول۲).

جدول۲- تیمار ماهیان آلوده شده به *Aeromonas hydrophila*

شماره تیمار	۱			۲			۳			۴			۵	۶
غلظت تیمار	(ppm)۲۵۰			(ppm)۴۸۰			(ppm)۵۱۰			(ppm)۷۵۰			شاهد مثبت(+)	شاهدمنفی (-)
	۵(cc)			۸,۲(cc)			۱۱(cc)			۱۵(cc)				
تکرار	۱	۲	۳	۱	۲	۳	۱	۲	۳	۱	۲	۳	۰	۰
تلفات	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۲	۰		

بعد از طی دوره درمانی و تیمار ماهیان با غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس نتایج مربوط با توجه به عدم وجود علائم ظاهری بیماری در ماهیان بر اساس فراسنجه‌های خونی و سرمی مورد بررسی قرار گرفت که در ذیل به آنها پرداخت شده است:

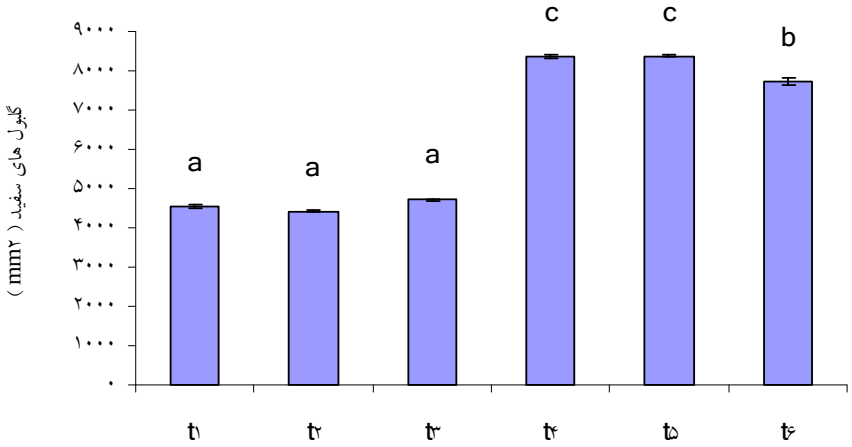
نتایج حاصل از بررسی فراسنجه‌های خونی ماهیان مورد آزمایش که بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه و آزمون دانکن انجام گرفت نشان داد که گلبول‌های‌سفید در تیمارهای اول، دوم و سوم نسبت به تیمارهای شاهد با کاهش قابل ملاحظه ای مواجه شده‌اند و در تیمار چهارم میزان گلبول‌های‌سفید نسبت به تیمار شاهد منفی افزایش پیدا کرده است، همچنین میزان گلبولهای‌قرمز در تیمار دوم نسبت به سایر تیمارها از کمترین میزان برخوردار می‌باشد و تیمارهای اول و چهارم نسبت به تیمارهای شاهد کمتر می‌باشد. میزان هموگلوبین در تیمار دوم نسبت به تیمار شاهد منفی افت چشمگیری داشته و نسبت به سایر تیمارها نیز از مقدار کمتری برخوردار می‌باشد. هماتوکریت خون ماهیان در تیمار دوم به طور قابل ملاحضه ای نسبت به تیمار شاهد منفی کاهش یافته است ودر تیمارهای اول و چهارم این کاهش کمتر می‌باشد.حجم متوسط گلبولی‌خون ماهیان در تیمار اول نسبت به تیمار شاهد منفی پایین‌تر بوده و در سایر تیمارها بالاتر می‌باشد. غلظت متوسط هموگوبین گلبول‌های‌قرمز خون در تیمار اول نسبت به تیمارهای شاهد کاهش یافته و در تیمار سوم از بالاترین میزان برخوردار می‌باشد. غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های‌قرمز خون در تیمار دوم نسبت به تیمارهای شاهد کاهش یافته و در سایر تیمارها افزایش داشته که این میزان در تیمار چهارم بیش از سایر تیمارها می‌باشد. میزان نوتروفیل در تیمارهای اول، دوم و سوم نسبت به تیمارهای شاهد کاهش یافته و در تیمار چهارم افزایش چشمگیری را میتوان دید. همچنین میزان لنفوسیت در تیمار چهارم نسبت به تیمارهای شاهد کاهش و در تیمارهای اول، دوم و سوم افزایش را نشان می‌دهد. نتایج از اختلاف معنی‌دار آماری در میزان گلبول‌های‌سفید، گلبول‌های‌قرمز، حجم متوسط گلبولی، غلظت متوسط هموگوبین در گلبول‌قرمز، غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های‌قرمز، نوتروفیل، لینفوسیت خون ماهیان حکایت دارد ($P<0/05$)، هچنین در نتایج حاصل از شمارش میزان مونوسیت و ائوزینوفیل خون ماهیان در بین تیمارهای مختلف هیچگونه اختلاف معنی دار آماری مشاهده نمی‌گردد ($P>0/05$) (جدول ۳).

نتایج حاصل از بررسی فراسنجه‌های سرمی ماهیان مورد آزمایش که بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه و

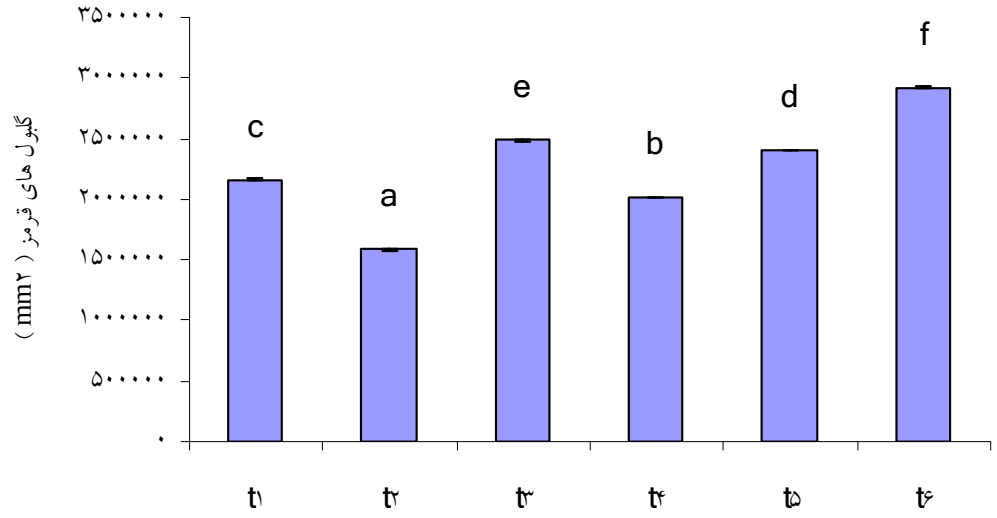
آزمون دانکن انجام گرفت نشان داد که میزان لیزوزیم در تیمار چهارم نسبت به تیمارهای شاهد افزایش داشته اما به نسبت تیمارهای اول، دوم و سوم کمتر می‌باشد و در تیمار اول از بالاترین مقدار برخوردار است، شمارش حاصل از ایمنوگلوبین نشان داد که تیمار سوم در مقایسه با تیمار شاهد منفی از میزان بیشتری برخوردار بوده اما نسبت به شاهد مثبت این میزان کمتر می‌باشد اما در تیمارهای اول، دوم و چهارم بطور قابل ملاحظه‌ای از هر دو شاهد مثبت و منفی بالاتر می باشد مقدار آلبومین موجود در خون ماهیان در تیمارهای اول تا چهارم نسبت به تیمارهای شاهد بالاتر بوده و در تیمارهای اول، دوم و چهارم تقریبا برابر بوده و در تیمار سوم بالاترین میزان را دارا می‌باشد، نتایج اختلاف معنی‌دار آماری را در میزان لیزوزیم، ایمنوگلوبین و آلبومین خون ماهیان در بین تیمارهای مختلف نشان می‌دهد (P<0/05) جدول (۴).

جدول۳ – میانگین فراسنجه‌های خونی در تیمارهای مختلف

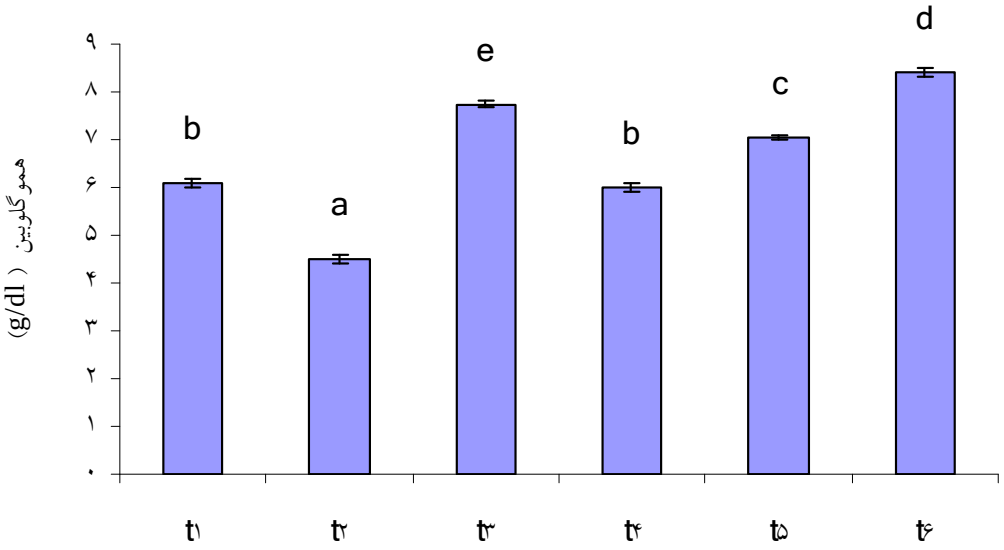
تیمار / فراسنجه خونی	تیمار ۱	تیمار۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵ (شاهد مثبت)	تیمار ۶ (شاهد منفی)
گلبول‌سفید	۴۵۵۰ ± ۵۰ ^{a}	۴۴۲۵ ±۲۵^{a}	۴۷۲۵ ±۲۵ ^{a}	۸۳۵۰ ±۵۰^{c}	۸۳۷۵ ±۲۵^{c}	۷۷۲۵ ±۷۵^{b}
گلبول‌قرمز	±۵۰۰۰ ^{C} ۲۱۶۵۰۰۰	±۴۵۰۰ ^{a} ۱۵۸۵۰۰۰	۲۴۸۵۰۰۰ ±۴۰۰۰ ^{e}	±۵۰۰۰ ^{b} ۲۰۱۵۰۰۰	۲۴۰۵۰۰۰ ±۳۵۰۰ ^{d}	±۴۵۰۷ ^{f} ۲۹۲۵۰۰۰
هموگلوبین	۶/۱ ±۰/1 ^{b}	۴/۵ ±۰/۱^{a}	۷/۷۵ ±۰/۰۵^{e}	۶ ±۰/۱^{b}	۷/۰۵ ±۰/۰۵^{c}	۸/۴ ±۰/۱^{d}
هماتوکریت	۲۴ ±۱ ^{b}	۱۹/۵ ±۰/۵ ^{a}	۳۱/۵ ±۰/۵ ^{cd}	۲۴ ± ۱^{b}	۲۹/۵ ±۰/۵ ^{c}	۳۳/۵ ±۰/۵^{d}
حجم متوسط گلبولیخون (MCV)	۱۱۴/۵ ± ۰ /۵^{a}	۱۲۵/۵ ±۰/۷۵^{b}	۱۲۵/۵ ± ۰/۲۵^{b}	۱۱۶ ± ۱^{a}	۱۲۳/۵ ±۱/۵^{b}	۱۱۵/۵ ± ۰/۵^{a}
غلظت متوسط هموگوبین در گلبول‌قرمز(MCH)	۲۷/۵ ± ۰ /۵۶ ^{a}	۲۸/۵ ± ۰/۵۰^{a}	۳۱/۵ ± ۰/۸۷^{b}	۲۹/۵ ± ۰/۸۱^{ab}	۲۸/۵ ± ۰/۵۰^{a}	۲۸/۵ ± ۰/۳۷^{a}
غلظت متوسط هموگلوبین گلبول های قرمز(MCHC)	۲۴/۵ ± ۰ /۵^{b}	۲۲/۵ ±۱/۵^{a}	۲۵/۵ ± ۰/۴۵^{b}	۲۶/۵ ± ۰/۵۰^{b}	۲۳/۵ ± ۰/۴۹^{a}	۲۴/۵ ± ۰/۳۷^{b}
نوتروفیل	۳۲/۵۰ ± ۰ /۵۰ ^{a}	۳۴/۵ ± ۰ /۴۵^{b}	۳۲/۵ ± ۱/۵ ۰^{a}	۴۳/۵۰ ± ۰/۵۰^{d}	۳۸/۵ ± ۱/۶۸ ^{c}	۳۸/۵۰ ± ۰/۵^{c}
لینفوسیت	۶۳/۵۰ ±۱ /۵^{c}	۶۲/۵ ±۰/۵^{c}	۶۳/۵۰ ±۲/۵۰^{c}	۵۴/۵ ± ۱/۵۰^{a}	۵۸/۵۰ ±۰/۵۰^{b}	۵۸/۵۰ ± ۲^{b}
مونوسیت	۳ ± ۰ /۸۱^{b}	۳ ±۰/۵^{b}	۳ ±۰/۶۸^{c}	۲ ± ۰/۵^{a}	۳ ±۰/۸۱ ^{c}	۲ ± ۰/۸۵^{a}
ائوزینوفیل	۱ ± ERR	۰	۱ ± ERR	۰	۰	۱ ± ERR



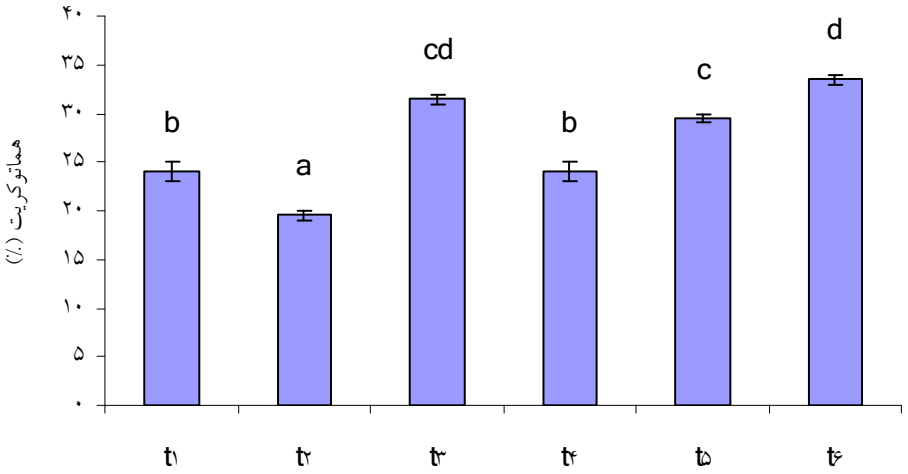
شکل۱– مقایسه میزان گلبول‌های سفید در تیمارهای مختلف



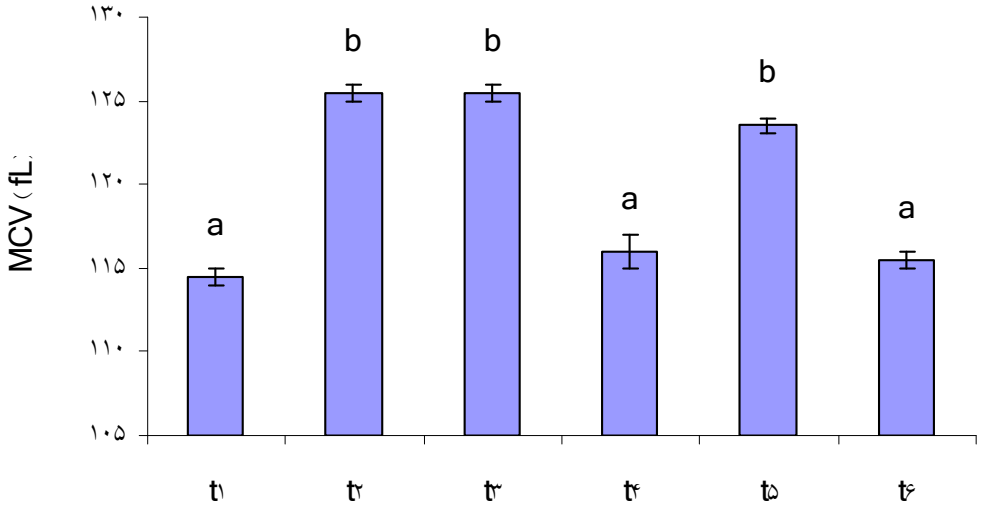
شکل۲- مقایسه میزان گلبول‌های قرمز در تیمارهای مختلف



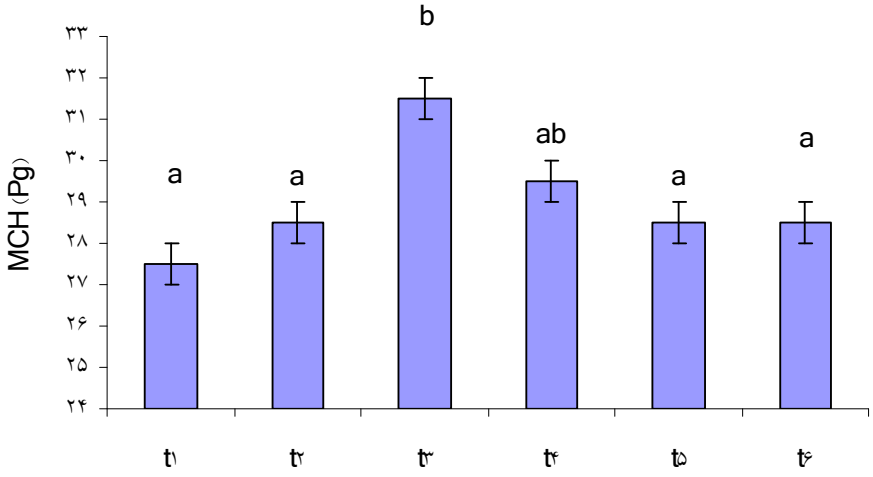
شکل۳-مقایسه میانگین میزان هموگلوبین در تیمارهای مختلف



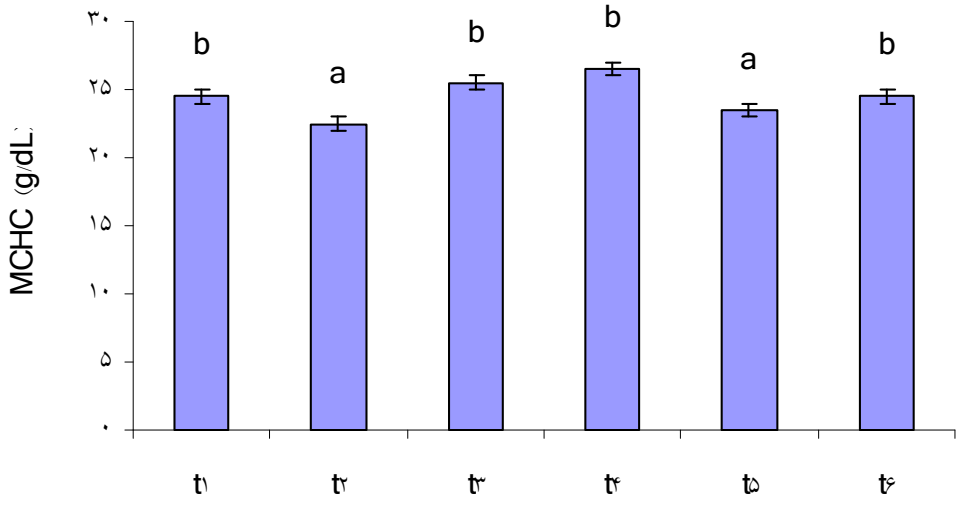
شکل۴- مقایسه میانگین میزان هماتوکریت در تیمارهای مختلف



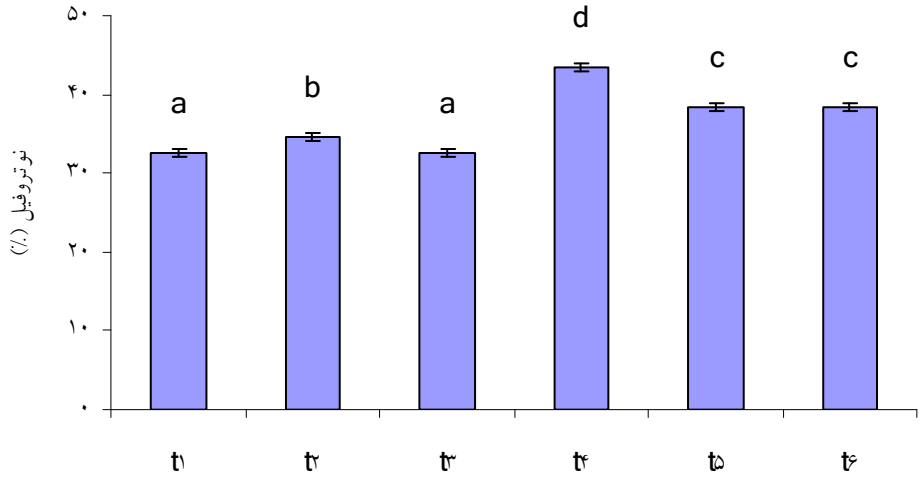
شکل۵- مقایسه میانگین میزان حجم متوسط گلبولی در تیمارهای مختلف



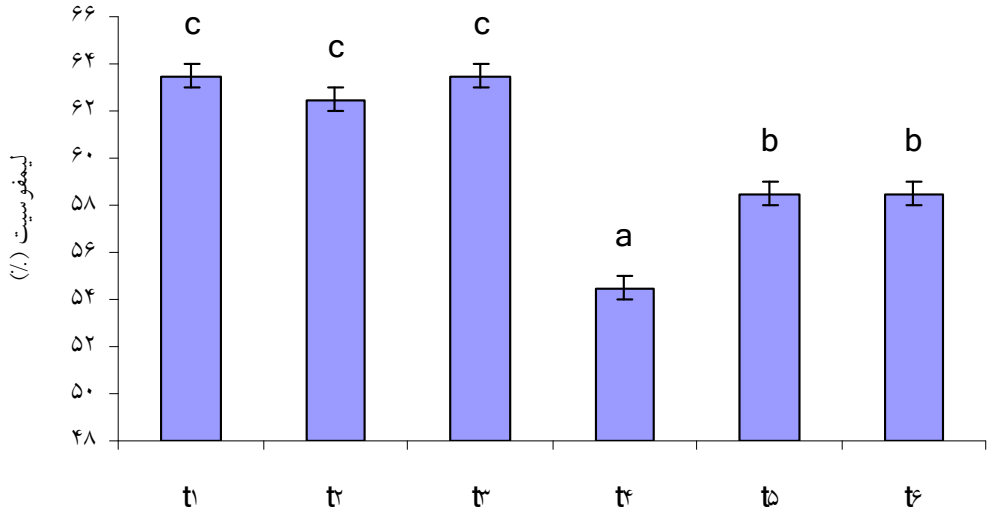
شکل۶- مقایسه میانگین میزان MCH در تیمارهای مختلف



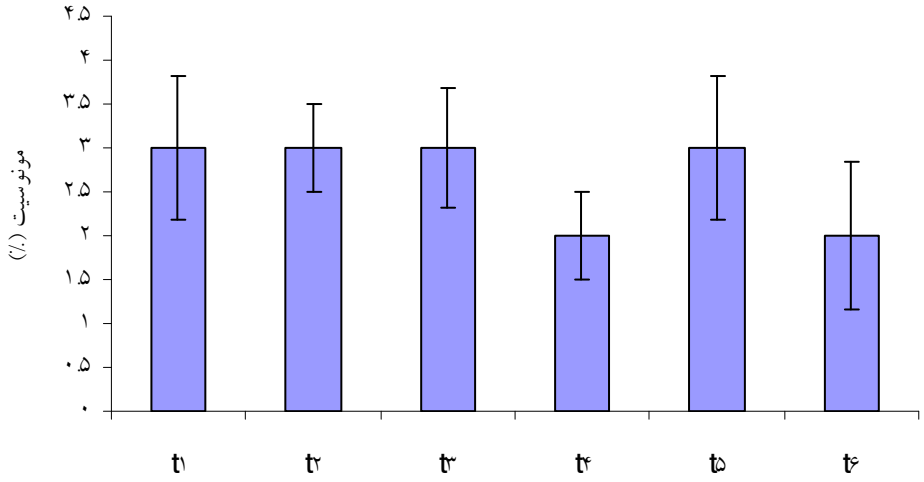
شکل۷- مقایسه میانگین میزان MCHC در تیمارهای مختلف



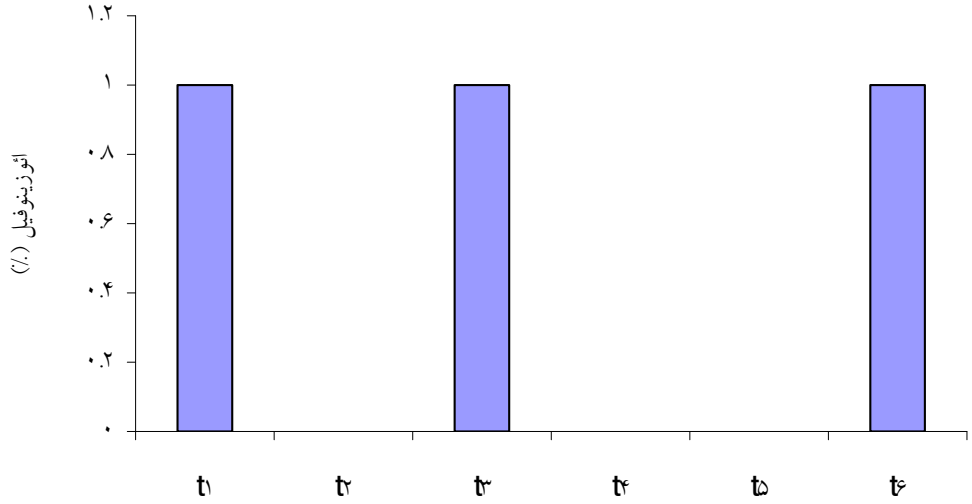
شکل۸- مقایسه میانگین میزان نوتروفیل در تیمارهای مختلف



شکل۹- مقایسه میانگین میزان لینفوسیت در تیمارهای مختلف



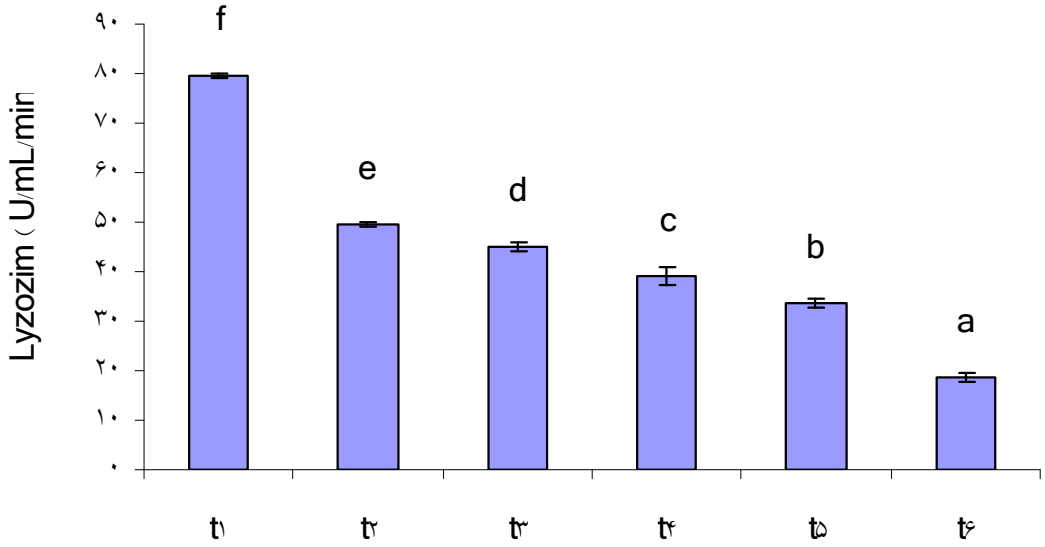
شکل۱۰- مقایسه میانگین میزان مونوسیت در تیمارهای مختلف



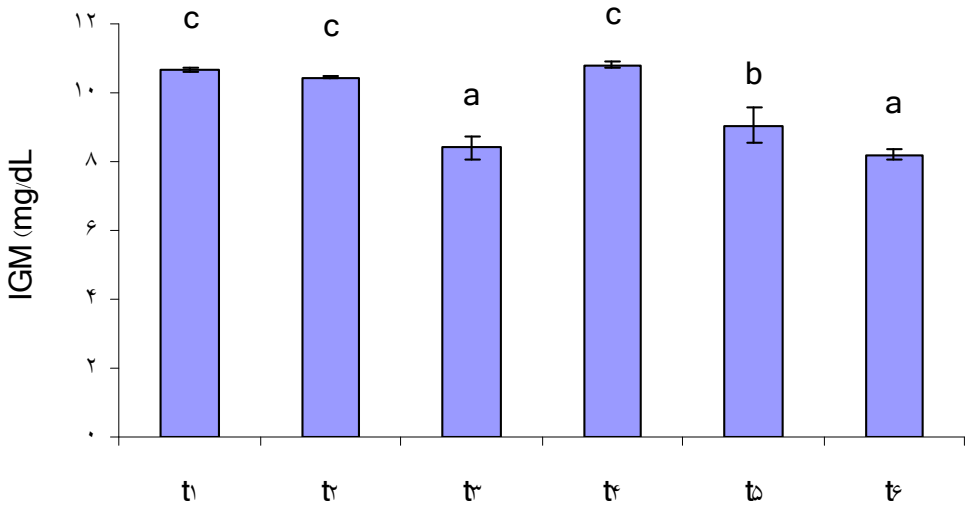
شکل۱۱- مقایسه میانگین میزان ائوزینوفیل در تیمارهای مختلف

جدول۴ - میانگین فراسنجه‌های سرمی در تیمارهای مختلف

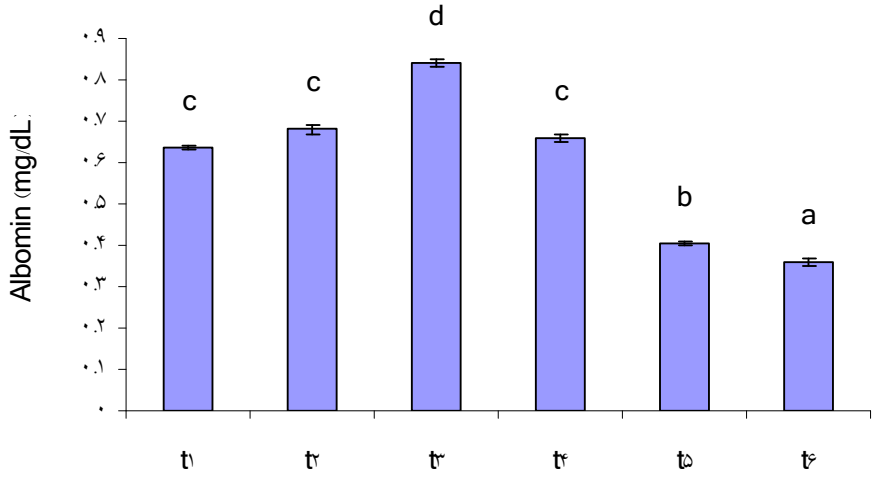
فراسنجه سرمی / تیمار	لیزوزیم	IgM ایمنوگلوبین	آلبومین
تیمار۱	۷۹/۵ ± ۰ /۵ f	۱۰/۶۵ ± ۰ /۰۵ c	۰/۶۴ ±۰ /۰۰۵ c
تیمار۲	۴۹/۵۰ ±۰/۵۶e	۱۰/۴۵ ±۰/۰۵c	۰/۶۸ ±۰/۰۱c
تیمار۳	۴۵ ±۱ d	۸/۴ ±۰/۳۲ a	۰/۸۴ ±۰/۰۱ d
تیمار۴	۳۹ ± ۱/۸۷c	۱۰/۸ ±۰/۱c	۰/۶۶ ± ۰/۰۱c
تیمار۵ (شاهد مثبت)	۳۳/۵ ± ۰/۸۸ b	۹/۰۵ ±۰/۵ b	۰/۴۱ ±۰/۰۰۵ b
تیمار۶ (شاهد منفی)	۱۸/۵ ±۰/۸۷a	۸/۲ ±۰/۱۴a	۰/۳۶ ± ۰/۰۱a



شکل۱۲- مقایسه میانگین میزان لیزوزیم با تیمارهای مختلف



شکل۱۳- مقایسه میانگین میزان IGM در تیمارهای مختلف



شکل۱۴- مقایسه میانگین میزان آلبومین در تیمارهای مختلف

بحث

با توجه به اینکه باکتری *آئروموناس‌هیدروفیلا* بطور طبیعی در اکثر منابع آبی حضور دارند ضروری است به منظور کنترل و حذف باکتری در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان گرمابی اقدام نمود برای این منظور در حال حاضر از مواد ضدعفونی‌کننده شیمیایی و نیز از انواع آنتی‌بیوتیک‌ها جهت درمان ماهیان بیمار استفاده می‌گردد که نتایج متفاوتی در ارتباط با هر کدام از آنها حاصل گردیده است که این امر می‌تواند ناشی از تغییر فراسنجه‌های فیزیکی و شیمیایی آب مانند دما، pH، اکسیژن محلول، مواد آلی و مواد معلق باشد (۶). تاثیرات سوء زیست‌محیطی مواد شیمیایی ضدعفونی-کننده و آنتی‌بیوتیک‌ها در کنار اثرات منفی آنها بر مصرف-کنندگان 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.

بررسی نتایج ایجاد آلودگی تجربی ماهی کپورعلفخوار به باکتری *آئروموناس‌هیدروفیلا* با غلظت‌های $۱/۵\times۱۰^{۶}$و $۱/۵\times۱۰^{۷}$ و $۱/۵\times۱۰^{۸}$و $۱/۲\times۱۰^{۹}$ (cfu/ml) از ایجاد بیماری در تزریق داخل صفاقی مقادیر $۱/۵\times۱۰^{۸}$و $۱/۲\times۱۰^{۹}$ حکایت می‌نماید هرچند علائم کلینیکی بیماری و نیز تلفات ماهیان در تزریق غلظت باکتریایی $۱/۲\times۱۰^{۹}$ نسبت

به $۱۰^{۸}$× ۱/۵ بیشتر بوده است، بررسی نتایج مذکور با نتایج بدست آمده از مطالعه Aboud در سال ۲۰۱۰ با تزریق غلظت $۱۰^{۹}$× ۱(cfu/ml) از باکتری *آئروموناس‌هیدروفیلا* در ماهی تیلاپیا نشان داد ماهی آمور نسبت به ماهی تیلاپیا در مقادیر پایین‌تر از باکتری *آئروموناس‌هیدروفیلا* به بیماری آئروموناز‌یس مبتلا می‌شود (۱۳). در بررسی دیگری نتایج بدست آمده از مطالعه توکلی و اخلاقی در سال ۱۳۸۸ با تزریق غلظت‌های باکتریایی $۱۰^{۵}$× ۲ ، $۱۰^{۶}$× ۴ ، $۱۰^{۷}$× ۳ (cfu/ml) باکتری *آئروموناس‌هیدروفیلا* به ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان (۲)، طافی و همکاران در سال ۱۳۹۲ با تزریق $۱۰^{۷}$ (cfu/ml) باکتری *آئروموناس‌هیدروفیلا* به ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان (۹) و همچنین نتیجه بدست آمده از مطالعه انجام شده توسط رحمتی اندانی و همکاران در سال ۱۳۹۰ با تزریق غلظت باکتریایی $۱۰^{۶}$× ۹/۸ (cfu/ml) باکتری *آئروموناس‌هیدروفیلا* به ماهی قزل‌آلای-رنگین‌کمان نشان داده شد که ماهی آمور نسبت به ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان در مقادیر بالاتر به بیماری آئروموناز‌یس مبتلا می شود و در نتیجه مقاوم‌تر می‌باشد (۳). در مطالعه انجام شده توسط علیشاهی و همکاران در سال ۱۳۸۸ میزان LD_{50} باکتری *آئروموناس‌هیدروفیلا* برای ماهی کپور علفخوار برابر $۱۰^{۷}$× ۱/۱ (cfu/ml) مشخص گردید(۱۰) ، همچنین در مطالعه دیگری از Weifeng و همکاران در سال ۲۰۰۴ مشخص شد که میزان LD_{50} *آئروموناس‌هیدروفیلا* برای ماهی کپور علفخوار در حدت $۱۰^{۷}$ (cfu/ml) می باشد (۲۳). Zheng و همکاران در سال ۲۰۱۲ میزان LD_{50} باکتری *آئروموناس‌هیدروفیلا* را برای ماهی کپور علفخوار در حدت $۱۰^{۸}$× ۱/۰ (cfu/ml) تعیین نمودند(۲۴). میتوان علت تفاوت در نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر با نتایج بدست آمده از مطالعه علیشاهی و همکاران و Weifeng و همکاران و Zheng و همکاران را در شرایط محیطی نظیر دمای آب جستجو نمود. تعداد گلبول‌های‌سفید و نسبت انواع آنها به عنوان یکی از شاخص های مهم سلامتی و وضعیت سیستم ایمنی به شمار می آید (۲۰). بر این اساس می توان نتیجه گرفت حمام ماهیان آمور با مقادیر ۲۵۰ ppm، ۴۱۰ ppm، ۵۸۰ ppm و ۷۵۰ ppm عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس به مدت ۱۰ روز، روزانه به مدت ۱ ساعت می‌تواند در تعداد انواع گلبول های سفید خون تغییرات قابل توجهی ایجاد نماید. در میزان گلبول‌های‌قرمز خون، هموگلوبین و هماتوکریت در بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد. بیشترین میزان گلبول‌قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت در شاهد منفی مشاهده شد و در غلظت ppm ۴۱۰ از کمترین میانگین برخوردار بود.

مقدار شاخص‌های سرمی از دیگر عوامل تعیین کننده وضعیت سلامتی جانوران مختلف از جمله ماهیان می باشند. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد در بین گروه-های تیمار با یکدیگر و نیز بین گروه‌های تیمار با شاهد مثبت و منفی در مقادیر آلبومین، لیزوزیم و IgM اختلاف معنی دار آماری وجود داشته بطوریکه لیزوزیم در مقدار ۲۵۰ppm بیشتر از سایر تیمارها و شاهد منفی کمتر از سایر تیمارها بوده است. بیشترین میزان آلبومین در غلظت ۵۸۰ ppm و تیمار منفی از کمترین میزان برخوردار بود. بیشترین میزان IgM در غلظت های ۲۵۰ ppm، ۴۱۰ ppm و ۷۵۰ ppm بود درحالی که شاهد منفی از کمترین مقدار برخوردار بوده است. بر اساس نتایج شیخ زاده و همکاران در سال ۱۳۸۸ غلظت های پایین اسانس اکالیپتوس به دو روش حمام و خوراکی می تواند منجر به افزایش گلبول های‌سفید خون در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) نسبت به گروه شاهد گردند (۷). بررسی نتایج حاصل از این مطالعه و نیز نتایج حاصل از سایر مطالعات نشان می دهد عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس خصوصا در غلظت‌های پایین به دلیل عدم ایجاد تغییرات قابل توجه در فراسنجه-های خونی می‌توانند به عنوان ترکیبات ضدمیکروبی در کنترل عوامل بیماریزا در ماهی آمور مورد توجه قرار گیرند. با توجه به اینکه در مدت زمان انجام آزمایش دمای آب پایین تر از حد اپتیموم برای ماهی آمور بوده است بنابراین

دمای آب میتواند عاملی برای عدم تحریک ایمنی در ماهی عمل نماید.

منابع

۱. پیغان، ر.، اسماعیلی، ف.، ۱۳۷۲. آلودگی ماهی کپور علف‌خوار به ارگانیسم های شبیه آئروموناس‌های متحرک. مجله علمی شیلات. شماره ۲. صفحات ۸-۱.

۲. توکلی، ه.، اخلاقی، م.، ۱۳۸۸. بررسی تغییر میزان لیزوزیم،ایمنوگلوبولین،گلبول ها و هماتوکریت خون در ماهی قزل آلای رنگین کمان به دنبال عفونت تجربی با *آئروموناس هیدروفیلا* بیماریزا. مجله تحقیقات دامپزشکی.دوره ۶۴، شماره ۲. صفحات ۱۶۲-۱۵۷.

۳. رحمتی اندانی، ح.، توکمه‌چی، ا.، مشکینی، س.، ابراهیمی، ه.، ۱۳۹۰. افزایش مقاومت ماهی قزل آلای رنگین کمان در برابر عفونت با *آئروموناس هیدروفیلا* و *یرسینیا روکری* با استفاده از لاکتوباسیلهای جدا شده از روده ماهی کپور معمولی. مجله دامپزشکی ایران، دوره هفتم. شماره ۲. صفحات ۳۵-۲۶.

۴. رضویلر، و.، حسنی طباطبائی، ع.، آذزی تاکامی، ق.، ۱۳۶۰. بررسی نقش بیماریزایی *آئروموناس هیدرو فیلا* در بعضی از بیماری های ماهی، مجله دانشکده دامپزشکی. دوره ۳۷. شماره ۲. صفحات ۳۷-۲۱.

۵. سلطانی، م.، ابراهیم زاده موسوی، ح.، ۱۳۷۵. جداسازی *آئروموناس هیدروفیلا* و *آئروموناس ورونی* از تلفات ماهی آمور در استان گیلان و تهران. مجله علمی دانشکده دامپزشکی اهواز. سال سوم. شماره چهارم. صفحات ۲۹-۲۴.

۶. شریف روحانی، م.، ۱۳۸۴. بررسی کاربرد برخی اسانس ها گیاهی در کنترل آلودگیهای قرچی تخم ماهیان قزل آلای رنگین کمان بعنوان جایگزین احتمالی مالاشیت گرین در شرایط کارگاهی. پایان نامه دکترای تخصصی بهداشت و بیماری های آبزیان دانشگاه تهران. شماره ۱۹۳.

۷. شیخ‌زاده، ن.، سلطانی، م.، ابراهیم‌زاده موسوی، ح.، خسروی، ع.، باقری، ه.، فتحی، ع.، زرگر، ا.، ۱۳۸۸. مطالعه اثر اسانس اکالیپتوس بر برخی فاکتورهای ایمنی ماهی کپور معمولی.مجله دامپزشکی ایران. دوره ۶۴. شماره ۱. صفحات ۵۴-۴۷.

۸. صمصام شریعت، ه.، معطر، ف.، ۱۳۷۰. گیاهان و داروهای طبیعی. انتشارات مشعت اصفهان. چاپ دوم. صفحات ۴۳۱-۴۳۲.

۹. طافی، ع.، مشکینی، س.، توکمه‌چی، ا.، ۱۳۹۲. مطالعه تاثیر کیتوزان بر برخی از پاسخ‌های ایمنی قزل‌آلای رنگین کمان و افزایش مقاومت آن به دنبال رویاروئی تجربی با *آئروموناس هیدروفیلا*. مجله پژوهش‌های جانوری. جلد ۲۶. شماره ۴. صفحات ۴۷۷-۴۶۸.

۱۰. علیشاهی، م.، سلطانی، م.، زرگر، ا.، ۱۳۸۸. بررسی باکتریایی تلفات ماهی آمور در استان خوزستان. مجله دامپزشکی ایران . شماره ۲۲. صفحات۳۴-۲۵.

۱۱. علیشاهی، م.، قربانپور نجف‌آبادی، م.، نجف‌زاده، ح.، پشم‌فروش، م.، ۱۳۸۹. مطالعه اثر ضد باکتریایی برخی عصاره های گیاهی بر علیه *استرپتوکوکوس اینیایی*، *آئروموناس هیدروفیلا*، *یرسینا راکری*. مجله دامپزشکی ایران. دوره ششم. شماره ۲. صفحات ۳۰-۲۱.

۱۲. مخیر، ب.،۱۳۸۵ . بیماری‌های ماهیان پرورشی .چاپ پنجم. انتشارات دانشگاه تهران. ۶۳۸ صفحه.

13. Aboud, O., 2010. Application of some Egyptian medicinal Plants to eliminate Trichodina sp and *Aeromonas hydrophila* in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Tishreen Magazine. researcher.2(10): p 12-16.

14. Doumas, B., Watson, W., Biggs, H., 1971. Clin Chem Acta 31: p 87-96

15. Feldman, B., Zinkl, J., Jian, N., Schalm, S., 2000. Veterinery Hematology. Lippincott Williams & Publications, Canada. p 1120- 1125.

16. Krajnovic-Ozretic, M., 1991. Hematological and biochemical characteristics of reared sea bass (Dicentrarchus Labrax L.). Acta Biol. Jogosl. Ichtyologia.23:p 25-34.

17. Kumari, J., 2006. Seasonal variation in the innate immune parameters of the Asian catfish Clarias batrachus. Aquaculture. 252: p 121-127.

18. Lewis, S., 1975. Practical haematology. Edinburgh . New York . Churchill Livingstone . New York : distributed by Longman, 629 p

19. Roberrts, T., Hutson, D., 1998. Metabolic pathway of agrochemicals part2: Insecticides and fungicides. The royal society chemistry. Cambrides.UK.

20. Shalaby, A., Khattab, Y., Abdel Rahman, A., 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: p 172 - 201.

21. Svobadova, Z., Pravda, D., Palackova, Y., 1991. Unifid methods of hematological examination of fish. Research Institue of fish Culture and Hydrobiology, Vodrany, Czechoslovakia. p 31.

22. Takasaki, M., Konoshima, T., Etoh, H., 2000. Cancer chemo preventive activity of euglobal-G1 from leaves of *Eucalyptus grandis*. Can Let. 155: 61-65.

23. Weifeng, M., Yaping, W., Wenbo, W., Jianxin, F., Zuoyan, Z., 2004. Enhanced resistance to *Aeromonas hydrophila* infection and enhanced phagocytic activities in human lactoferrin-transgenic grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Aquaculture.p 93-103

24. Zheng, W., Haipeng, C., Xianle, Y., 2012. Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) infected with multiple strains of *Aeromonas hydrophila* .African Journal of Microbiology Research Vol. 6(21). p 4512-4520

25. Zilva, J F. Pannall, P R.1984. Cilinical chemistry in diagnosis and treatment.publ.Lioyd-Luke(medical book)Ltd.London. p 348-352

Effects of different amounts of hydroalcoholic extract of eucalyptus on the blood parameters of Gras Carp (*Ctenopharyngodon idella*) infected with *Aeromonas hydrophila*

Roudbaraki S.M.S.[1], Ershad H.[2], Khara H.[2] and Masoumzadeh M.[2]

[1] Fisheries Dept, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, I.R. of Iran

[2] Veterinary International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, I.R. of Iran

Abstract

The purpose of this study the effect of eucalyptus extract on blood and immune parameters in fish infected with Aeromonas hydrophila after treatment with eucalyptus extract was Created grass carp experimentally infected with Aeromonas hydrophila density 1.5×106 ,1.5×107 ,1.5×108 ,1.2 ×109 (cfu/ml) The peritoneal cavity of fish was the results indicate that disease in dense 1.5×108 ,1.2 ×109 (cfu/ml) bacteria have been. Effect of eucalyptus extract concentrations 250 , 410 ,580 ,750 (ppm) baths for a short time (60 minutes) on the grass carp (average weight 25 g) were evaluated over a period of 10 days with 3 replicates. The results of the analysis of blood parameters of the fish that were tested on the basis of one way ANOVA and Duncan test showed that there was a significant difference in the amount of white blood cells, red blood cells, mean corpuscular volume, mean concentration of hemoglobin in the red blood cell, medium concentration Hemoglobin, RBC, neutrophil, Lymphocyte, Fetal blood, with control treatment ($p<0.05$), The serological results showed that the extract increases the amount of lysozyme and immunoglobulin and albumin blood Eucalyptus species in different treatments were compared to the negative control and significant differences between the treatments in question existed ($p<0.05$).

Key words: grass carp, eucalyptus, Aeromonas hydrophila, blood factors