تعیین غلظت کشنده (LC 96h) عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و اثرات آن بر شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون بچه تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)

مصطفی شریف روحانی[1*]
سهیل بازاری مقدم[2]
مسعود حقیقی[3]
جلیل جلیل پور[2]
ذبیح ا... پژند[2]
محمد پوردهقانی[2]
مهدی معصوم زاده[2]

۱. موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران، ایران
۲. موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، رشت، ایران
۳. مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی، تنکابن، ایران

[*]مسئول مکاتبات:
mostafasharif@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۸/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۳۰
این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی می‌باشد.

چکیده

امروزه همگام با توسعه پرورش ماهیان خاویاری در کشور، لزوم توجه به سلامت آبزیان و استفاده از موادی با منشاء طبیعی در مبارزه با عوامل بیماری‌زای این ماهیان امری ضروری محسوب می گردد. لذا این مطالعه با هدف بررسی و تعیین غلظت کشندگی عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی در بچه تاس‌ماهی ایرانی به منظور دستیابی به اطلاعات در راستای اجرای مطالعات درمانی صورت پذیرفت. این بررسی بر روی بچه تاس‌ماهیان ایرانی با میانگین وزنی ۰/۵۱ ± ۳/۲۲ گرم و میانگین طولی ۰/۶۵ ± ۹/۱۷ سانتی‌متر اجرا شد. به منظور مطالعه تاثیرات این عصاره ، ۲۴۰ عدد بچه تاس‌ماهی در ۷ تیمار و یک گروه شاهد (هر تیمار با سه تکرار) در نظر گرفته شد. این آزمایش براساس روش O.E.C.D و در مدت زمان ۹۶ ساعت اجرا گردید. بدین منظور با استفاده از روش محاسباتی Probit Analaysis، نسبت به ترسیم معادله خط رگرسیون و سپس تعیین مقادیر مختلف غلظت‌های کشنده اقدام گردید. در این تحقیق مقادیر LC_{10} ، LC_{50} و LC_{90} عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی به ترتیب معادل ۴۳۱/۱۲، ۷۶۶/۶۵ و ۱۳۶۳/۶۴ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد. نتایج حاصل از مطالعه شمارش افتراقی گلبولهای سفید خون حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار آماری در میزان لنفوسیت، نوتروفیل و ائوزینوفیل بین تیمارها و شاهد بود ($p<۰/۰۵$).

واژگان کلیدی: عصاره هیدروالکلی، آویشن شیرازی، تاس‌ماهی ایرانی، غلظت کشنده، گلبول‌های سفید خون.

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی از دیر باز به علت داشتن برخی ترکیبات شیمیایی خاص، به طور ویژه‌ای در درمان انواع بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته است (یادگار و همکاران، ۱۳۸۸). آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora* یکی از شناخته شده‌ترین انواع گیاهان دارویی در طب سنتی ایران و اروپا می‌باشد. این گیاه، علفی، معطر و از تیره نعناعیان بوده و یکی از پرمصرف ترین گیاهان دارویی است که از قرن شانزدهم تاکنون به عنوان یک گیاه دارویی با ارزش مصرف شده و در تمام فارماکوپه‌های معتبر ثبت شده است (Naghibi *et al*., 2005). سرشاخه‌های هوایی این گیاه حاوی اسانس روغنی، تانن‌ها، ساپونین‌ها و مواد ضد عفونی کننده است (شریف روحانی و همکاران، ۱۳۹۰) و دو ماده مهم این گیاه، تیمول و کارواکرول می‌باشند (Mohagheghzadeh *et al*., 2000). روغن سفید آویشن، تنتور و عصاره مایع آن نیز به‌عنوان ترکیبات معطر در فرآورده‌های غذایی کاربرد دارد.

این گیاه در طب سنتی ایران به عنوان ضدعفونی کننده، بی‌حس کننده و ضد اسپاسم استفاده می‌شود. اثرات ضد قارچی (شریف روحانی، ۱۳۸۳)، آرام بخشی و بیهوش کنندگی اسانس آویش شیرازی (شریف روحانی و همکاران، ۱۳۸۶) در ماهیان گزارش شده است.

نظر به اهمیت کاربرد گیاهان دارویی در پزشکی و دامپزشکی و نیز لزوم جایگزینی این گیاهان با مواد شیمیایی در مبارزه با عوامل بیماری‌زا، ضروری است که برخی از گیاهان دارویی بومی ایران از جمله آویشن شیرازی به منظور کنترل و درمان بیماری‌های ماهیان و از جمله تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) مورد ارزیابی قرار گیرند. در این راستا ضروری است که آزمایشات تعیین عیار زیستی (Bioassay) عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی بر روی این گونه با ارزش نیز انجام گیرد. لذا این تحقیق با هدف تعیین غلظت‌های کشنده (LC) ۹۶ ساعته بر روی بچه تاس‌ماهیان ایرانی و بررسی تاثیرات غلظت کشنده بر شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون این ماهیان صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، پس از انتقال بچه تاس‌ماهیان ایرانی از استخرهای پرورشی خاکی به وان‌های فایبرگلاس (به منظور سپری نمودن دوره عادت دهی)، نسبت به آغاز انجام مراحل تعیین غلظت‌های کشنده عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی اقدام گردید. در این مطالعه عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی مورد نیاز از شرکت کشت و صنعت و فرآوری گیاهان دارویی سها جیسا با دارا بودن استانداردهای بین المللی ISO 9001، ISO 14001، HACCP و IQnet (سازمان جهانی کیفیت) تهیه گردید (جدول ۱) .

جدول ۱: آنالیز عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی مورد استفاده.

Certificate of Analysis: ***Zataria multiflora***			
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	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

محدوده پارامترهای فیزیکو شیمیایی آب در غلظت‌های مختلف عصاره هیدرو الکلی آویشن شیرازی و شاهد در آزمایشات عیار سنجی زیستی طی ۹۶ ساعت اندازه‌گیری شد. به طوری که دمای آب ۲۲/۹-۲۱/۳ درجه سانتی‌گراد ، pH ۸/۳- ۷/۴، اکسیژن محلول (DO) ۸/۵۵-۶ میلی‌گرم در لیتر، هدایت الکتریکی (EC) ۸۹۹-۷۲۵ میکروموس در سانتی‌متر، سختی کل ۲۰۰-۱۴۰ میلی‌گرم در لیتر، نیتریت ۰/۰۳۴-۰/۰۰۴ میلی‌گرم در لیتر، نیترات ۰/۰۵-۰/۰۰۲ میلی‌گرم در لیتر و آمونیاک ۰/۵۰۷-۰/۱۱۴میلی‌گرم در لیتر تعیین گردید.

به منظور اندازه‌گیری غلظت‌های کشنده عصاره مذکور بر روی بچه تاس‌ماهیان ایرانی از روش استاندارد O.E.C.D استفاده شد (TRC, 1984). با توجه به عدم وجود منابع اطلاعاتی در خصوص محدوده دامنه دوزهای قابل استفاده در آزمایشات غلظت‌های کشنده، نسبت به انجام آزمایش مقدماتی تعیین دامنه‌ای از دوزهای مناسب ($Pre\text{-}LC_{50}$) اقدام گردید. در نهایت پس از تعیین دامنه دوزها، جهت انجام آزمایش اصلی، دوزهای نهایی در محدوده غلظت های بدست آمده به روش لگاریتمی تعیین گردیدند. بدین منظور، تعداد ۲۴۰ عدد بچه تاس‌ماهی ایرانی با میانگین وزنی ۰/۵۱ ± ۳/۲۲ گرم و میانگین طولی ۰/۶۵ ± ۹/۱۷ سانتی‌متر به طور تصادفی انتخاب شدند و در ۷ تیمار (۵۰۰، ۵۸۳، ۶۹۴، ۸۲۸، ۹۸۶، ۱۱۷۴ و ۱۴۰۰ میلی‌گرم لیتر) و یک گروه شاهد (هر تیمار با سه تکرار) و هر تکرار با ۱۰ عدد ماهی در تشتک‌های مخصوص با آب‌گیری به میزان ۳۰ لیتر متصل به سیستم هوادهی قرار گرفتند.

پس از افزودن عصاره به هر تیمار کلیه علائم حرکتی بچه تاس‌ماهیان ایرانی و همچنین میزان تلفات آن‌ها در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ثبت گردید. داده‌های حاصله با استفاده از روش محاسباتی Probit Analysis مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (Finney, 1971). بدین منظور پس از ترسیم معادله خط رگرسیون (با سطح اطمینان ۹۵ درصد) نسبت به محاسبه مقدار x در معادله $Y= ax+b$ (شیب خط = b و عدد ثابت = a) اقدام و با استفاده از محاسبه Antilog x، مقادیر غلظت‌های کشنده در زمان‌های مختلف تعیین گردید. همچنین به منظور بررسی تاثیرات غلظت‌های مختلف عصاره بر میزان گلبول‌های سفید خون در تیمارهای مختلف از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way Anova) و مقایسه گروه‌ها با شاهد از آزمون چند دامنه دانکن (Duncana) استفاده شد. کلیه آنالیزهای آماری توسط برنامه SPSS ویرایش ۱۷ انجام گردید.

به منظور بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی بر میزان شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون نسبت به خون‌گیری از بچه‌ماهیان اقدام گردید. در این تحقیق با توجه به کوچک بودن سایز بچه تاس‌ماهیان ایرانی مورد مطالعه، امکان خون‌گیری توسط سرنگ از طریق سیاهرگ دمی (caudal vein) امکان‌پذیر نبود، لذا عملیات خون‌گیری از طریق قطع ساقه دمی انجام شد. به منظور محاسبه و تعیین درصد فراوانی هر گروه از لکوسیت‌ها، لایه مناسبی از یاخته‌های خونی روی اسلایدهای میکروسکوپی به روش دولامی (یک لام به عنوان گسترش دهنده و لام دیگر که قطره خون روی آن قرار می‌گرفت) تهیه شد. سپس لام‌ها با استفاده از محلول رقیق ۱۰ درصد گیمسا رنگ‌آمیزی شدند و پس از خشک شدن در هوای آزاد به کمک عدسی ۴۰ میکروسکوپ نوری نیکون E600 شمارش افتراقی گسترش یاخته‌های سفید خون صورت گرفت (Klontz, 1994).

نتایج

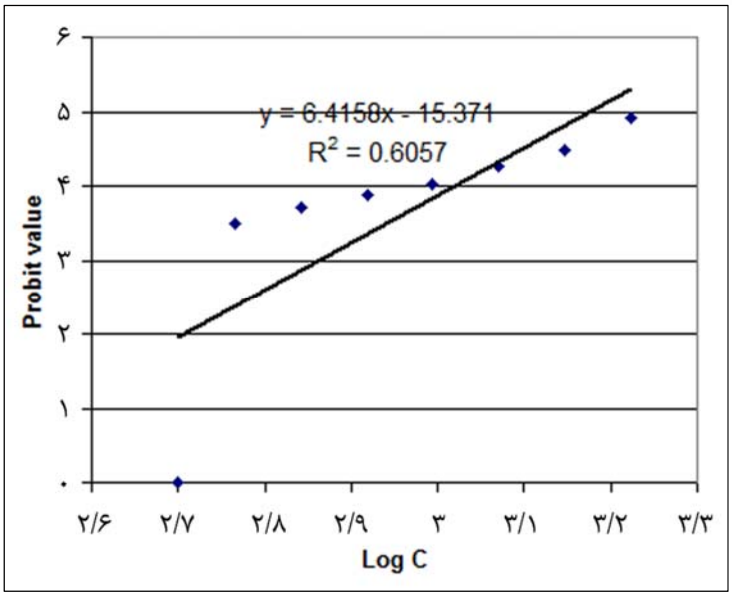
پس از انجام آزمایشات مقدماتی، سرانجام محدوده غلظت ۵۰۰ تا ۱۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره آویشن شیرازی برای انجام آزمایشات نهایی در نظرگرفته شد. بر اساس محاسبات لگاریتمی ۷ تیمار (۵۰۰، ۵۸۳، ۶۹۴، ۸۲۸، ۹۸۶، ۱۱۷۴ و ۱۴۰۰ میلی‌گرم لیتر) تعیین گردیده و نسبت به گروه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۲). همچنین میزان LC_{10} ، LC_{50} و LC_{90} عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی طی مدت زمان ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت محاسبه گردید (جدول ۳). بر این اساس میزان LC_{50} این عصاره طی مدت ۴ روز معادل ۷۶۶/۶۵ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد. همچنین معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی (R^2) حاکی از وجود ارتباط مستقیم (همبستگی قوی و مثبت) بین غلظت‌های مورد بررسی با میزان تلفات بچه تاس‌ماهیان ایرانی بوده است (شکل‌های ۱ تا ۴).

جدول ۲: مقایسه اثر تیمارهای مختلف عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی بر میزان بازماندگی بچه تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) (میانگین ۳ تکرار) در طی ۹۶ ساعت.

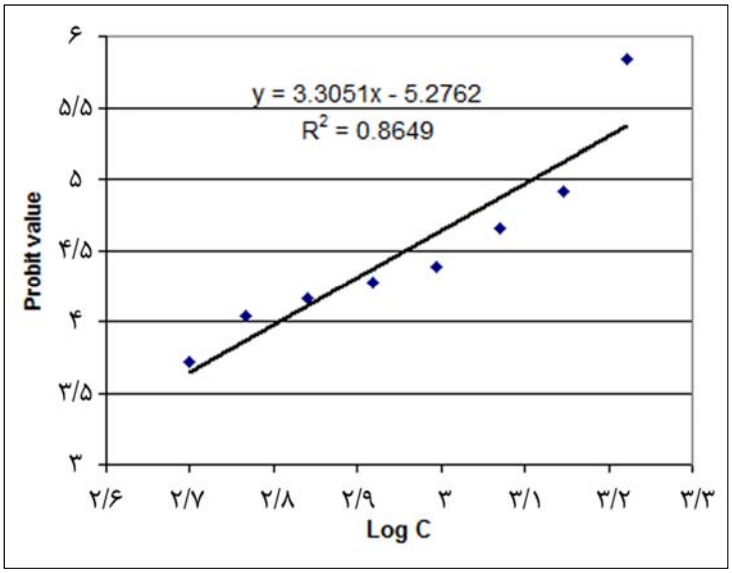
تیمار	غلظت عصاره آویشن شیرازی (ppm)	۲۴ ساعت		۴۸ ساعت		۷۲ ساعت		۹۶ ساعت		تغییرات نسبت به شاهد (درصد)				لگاریتم غلظت آویشن شیرازی	Probit value (عدد)			
		مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
شاهد	۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
I	۵۰۰	۰	۱۰	۱	۹	۲	۸	۲/۳۳	۷/۶۷	۰	−۱۰	−۲۰	−۲۳/۳	۲/۶۹۹۰	۰	۳/۷۱۸۴	۴/۱۵۸۴	۴/۲۷۱۰
II	۵۸۳	۰/۶۷	۹/۳۳	۱/۶۷	۸/۳۳	۲/۳۳	۷/۶۷	۳/۳۳	۶/۶۷	−۶/۷	−۱۶/۷	−۲۳/۳	−۳۳/۳	۲/۷۶۵۷	۳/۵۰۱۵	۴/۰۳۳۹	۴/۲۷۱۰	۴/۵۶۸۴
III	۶۹۴	۱	۹	۲	۸	۲/۶۷	۷/۳۳	۳/۶۷	۶/۳۳	−۱۰	−۲۰	−۲۶/۷	−۳۶/۷	۲/۸۴۱۴	۳/۷۱۸۴	۴/۱۵۸۴	۴/۳۷۸۱	۴/۶۶۰۲
IV	۸۲۸	۱/۳۳	۸/۶۷	۲/۳۳	۷/۶۷	۳/۶۷	۶/۳۳	۵	۵	−۱۳/۳	−۳۳/۳	−۳۶/۷	−۵۰	۲/۹۱۸۰	۳/۸۸۷۷	۴/۲۷۱۰	۴/۶۶۰۲	۵/۰۰۰۰
V	۹۸۶	۱/۶۷	۸/۳۳	۲/۶۷	۷/۳۳	۴/۳۳	۵/۶۷	۵/۶۷	۴/۳۳	−۱۶/۷	−۲۶/۷	−۴۳/۳	−۵۶/۷	۲/۹۹۳۹	۴/۰۳۳۹	۴/۳۷۸۱	۴/۸۳۱۳	۵/۱۶۸۷
VI	۱۱۷۴	۲/۳۳	۷/۶۷	۳/۶۷	۶/۳۳	۵/۳۳	۴/۶۷	۷/۳۳	۲/۶۷	−۲۳/۳	−۳۶/۷	−۵۳/۳	−۷۳/۳	۳/۰۶۹۷	۴/۲۷۱۰	۴/۶۶۰۲	۵/۰۸۲۸	۵/۶۲۱۹
VII	۱۴۰۰	۳	۷	۴/۶۷	۵/۳۳	۷	۳	۹/۶۷	۰/۳۳	−۳۰	−۴۶/۷	−۷۰	−۹۶/۷	۳/۱۴۶۱	۴/۴۷۵۶	۴/۹۱۷۲	۵/۵۲۴۴	۶/۸۳۸۴

جدول ۳ : غلظت‌های کشنده عصاره هیدروالُکلی آویشن شیرازی طی ٤ روز روی بچه تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) (میلی گرم در لیتر).

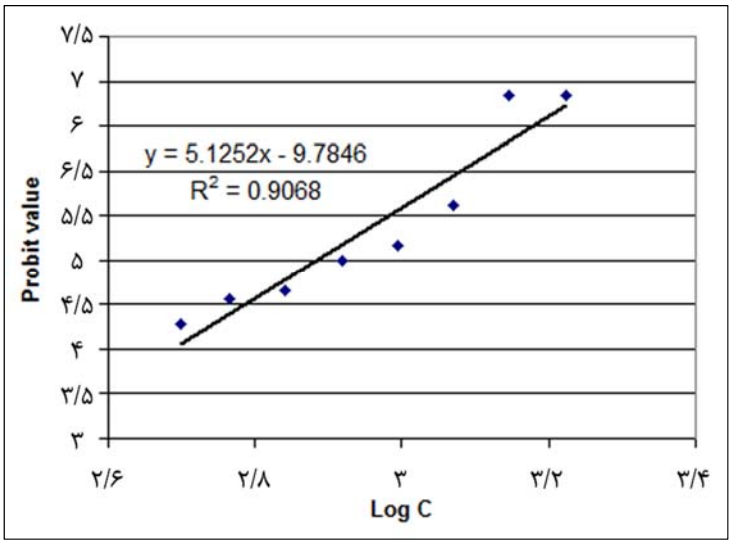
نام ماده	مقدار LC	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی	LC_{10}	۹۴۴/۷۱	۵۲۶/۵	۴۶۶/۰۱	۴۳۱/۱۲
	LC_{50}	۱۴۹۶/۶۸	۱۲۸۵/۵۸	۹۲۱/۲۹	۷۶۶/۶۵
	LC_{90}	۲۳۷۰/۲۸	۲۰۳۹/۷۸	۱۸۱۹/۷	۱۳۶۳/۶۴



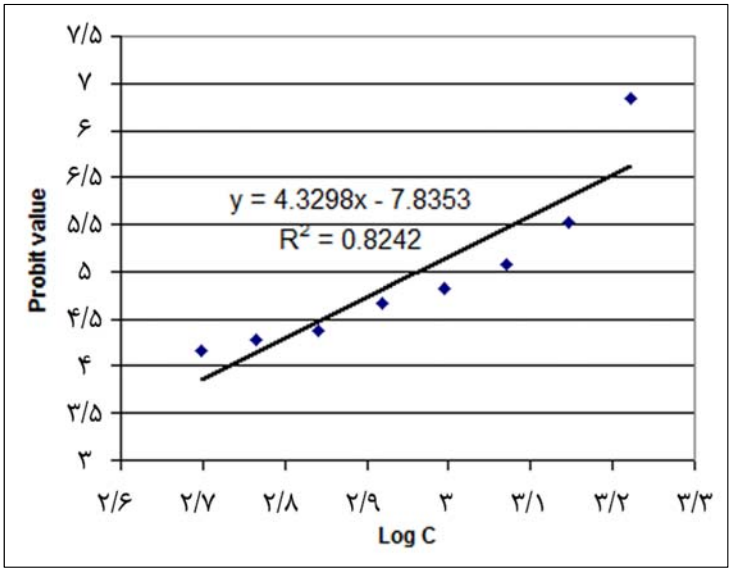
شکل۱: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی probit value با لگاریتم غلظت آویشن شیرازی بر روی بچه تاس‌ماهیان ایرانی (*Acipenser persicus*) در ۲٤ ساعت.



شکل ۲: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی probit value با لگاریتم غلظت آویشن شیرازی بر روی بچه تاس‌ماهیان ایرانی (*Acipenser persicus*) در ٤۸ ساعت.



شکل۳: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی probit value با لگاریتم غلظت آویشن شیرازی بر روی بچه تاس‌ماهیان ایرانی (*Acipenser persicus*) در ۷۲ ساعت.



شکل ٤:معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی probit value با لگاریتم غلظت آویشن شیرازی بر روی بچه تاس‌ماهیان ایرانی (*Acipenser persicus*) در ٩٦ ساعت.

در طول اجرای آزمایشات تعیین غلظت‌های کشنده عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی، بچه‌ماهیان از لحاظ رفتاری، علائمی از قبیل افزایش ترشح موکوس در مراحل اولیه آزمایش، تحریک پذیری، تعادل کم، انقباض شدید عضلات و انحنای ستون فقرات (به ویژه از تیمار ۳ به بعد) از خود نشان دادند. ضمناً بیش‌ترین تجمع بچه ماهیان در کف تشتک‌ها (گاهی به صورت وارونه) و تشکیل موکوس روی پوست به ویژه در تیمارهای ۶ و ۷ مشاهده گردید.

نتایج حاصل از شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون (جدول ۴) برای هریک از انواع گلبول‌های سفید (لنفوسیت، مونوسیت، نوتروفیل و ائوزینوفیل) به شرح ذیل بوده است:

بررسی میزان لنفوسیت خون بچه‌ماهیان مورد مطالعه حاکی از وجود اختلاف معنی دار آماری بین تیمارها بوده است (p<۰/۰۵). بر اساس آزمون درون گروهی دانکن، کاهش معنی‌داری در میزان لنفوسیت خون بچه ماهیان تیمار ۷ نسبت به شاهد و سایر تیمار ها مشاهده گردید (p<۰/۰۵).

در مقایسه میزان مونوسیت خون ماهیان مورد مطالعه، بین تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نگردید (p>۰/۰۵).

میزان نوتروفیل خون بچه‌ماهیان در تیمارهای مختلف، اختلاف معنی‌دار آماری را نشان داد (p<۰/۰۵). همچنین به منظور مقایسه گروه‌ها با یکدیگر بر اساس آزمون چند دامنه دانکن، افزایش در میزان نوتروفیل خون بچه‌ماهیان با افزایش غلظت در تیمارها مشاهده گردید. به طوری که میزان این فاکتور در خون بچه‌ماهیان در تیمارهای ۶ و ۷ بیش از شاهد و سایر تیمارها بوده و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار قابل مشاهده بود (p<۰/۰۵).

مقایسه میزان ائوزینوفیل خون بچه‌ماهیان مورد مطالعه در تیمارها، حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار آماری بوده است (p<۰/۰۵). ضمناً بر اساس آزمون دانکن به منظور مقایسه گروه‌ها با یکدیگر، میزان ائوزینوفیل خون بچه‌ماهیان در تیمار ۱ بیش از سایر تیمارها و شاهد بوده و میزان این فاکتور در خون بچه‌ماهیان در تیمارها از روند نسبتاً کاهشی برخوردار بوده است و به لحاظ آماری نیز اختلاف معنی دار مشاهده گردید (p<۰/۰۵).

جدول٤: میانگین شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) در شاهد و تیمارهای مختلف.

تیمار	لنفوسیت	مونوسیت	نوتروفیل	ائوزینوفیل
شاهد	۸۷ ±۳[b]	۰/۶۷ ± ۰ /۳۳	۶/۶۶ ± ۲ /۶۶[ab]	۵/۶۶ ± ۰ /۶۶[a]
تیمار ۱	۸۵/۳۳ ±۳/۴۸[ab]	۰/۶۷ ± ۰ /۳۳	۳/۳۳ ±۱/۴۵[a]	۱۰/۶۶ ±۲/۳۳[b]
تیمار ۲	۸۳ ±۲/۵۲[ab]	۱/۳۳ ±۰/۳۳	۹/۳۳ ±۰/۶۶[abc]	۶/۳۳ ±۱/۷۶[a]
تیمار ۳	۸۲/۲۳ ±۱/۴۵۰[ab]	۱ ±ERR	۱۳/۳۳ ±۱/۴۵[bc]	۳/۳۳ ±۰/۳۳[a]
تیمار ۴	۸۱ ± ۰/۵۷[ab]	۱/۳۳ ±۰/۳۳	۱۴ ± ۲/۰۸[bc]	۳/۶۶ ± ۱/۳۳[a]
تیمار ۵	۸۰ ± ۳ /۰۵[ab]	۱/۶۶ ±۰/۶۶	۱۴/۳۳ ±۳/۸۴[bc]	۴ ±۱۰/۵۲[a]
تیمار ۶	۷۸ ±۱/۳۵[ab]	۱/۶۶ ±۰/۳۳	۱۶/۳۳ ±۰/۳۳[c]	۴ ±۰/۵۷[a]
تیمار ۷	۷۷/۳۳ ± ۰/۸۸[a]	۱/۶۶ ±۰/۳۳	۱۶/۵۴ ±۰/۰۸[c]	۵ ± ۰/۴۰[a]

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

بحث و نتیجه‌گیری

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 قرار گیرد. امروزه مواد ضدعفونی کننده شیمیایی به منظور کنترل و حذف عوامل بیماری‌زا در آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرد، لذا آلودگی‌های زیست محیطی، امکان بروز تلفات گسترده در ماهیان تحت درمان، وسعت زیاد استخرهای ماهیان پرورشی، لزوم خروج ارز از کشور به منظور واردات و در نهایت تاثیرات سوء بر مصرف کنندگان از جمله مسائلی هستند که کاربرد این مواد را با مسائل و مشکلات جدی روبرو ساخته است. لذا با توجه به مشکلات و خطرات استفاده از مواد شیمیایی لزوم بررسی جایگزین‌های طبیعی برای این مواد ضد عفونی کننده بیش از پیش احساس می گردد (Yao *et al*., 2011).

در راستای بکارگیری عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی در مبارزه با عوامل بیماری‌زا، لزوم تعیین عیار زیستی این گیاه بر روی یکی از مهم‌ترین گونه‌های خاویاری دریای خزر ضروری است. نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت نیمه کشنده (LC_{50}) در مدت زمان ۹۶ ساعت معادل ۷۶۶/۶۵ میلی‌گرم در لیتر بود. در مطالعات انجام شده توسط معصوم‌زاده و همکاران (۱۳۸۹) و نیز شریف روحانی و همکاران (۱۳۹۰) که به ترتیب به تعیین غلظت نیمه کشنده اسانس آویشن شیرازی طی ۹۶ ساعت بر روی بچه تاس‌ماهی ایرانی و بچه قزل آلای رنگین کمان پرورشی پرداختند مقادیر ۱۲/۱۱ و ۱۳/۶ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد که با توجه به نوع ترکیب و میزان ماده مؤثره در اسانس، مقادیر آن با بررسی حاضر متفاوت می‌باشد. مطالعه حاضر نشان داد که طی زمان‌های ۲۴ الی ۹۶ ساعت، مقادیر LC_{10}، LC_{50} و LC_{90} کاهش یافته است. به طوری که غلظت ۱۴۹۶/۶۸ میلی‌گرم در لیتر عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی می‌تواند ۵۰ درصد از بچه تاس‌ماهیان را در مدت ۲۴ ساعت تلف نموده و این مقدار طی ۹۶ ساعت به ۷۶۶/۶۵ میلی‌گرم در لیتر خواهد رسید. مقادیر LC_{10} و LC_{90} نیز به ترتیب از ۹۴۴/۷۱ و ۲۳۷۰/۲۸ میلی‌گرم در لیتر در ۲۴ ساعت به ۴۳۱/۱۲ و ۱۳۶۳/۶۴ میلی‌گرم در لیتر ۹۶ ساعت تنزل پیدا نمود. این مسئله نشان دهنده مقاومت زیادتر ماهی‌ها در مدت زمان کوتاه و توانایی تحمل غلظت بالاتری از عصاره در این مدت زمان می‌باشد ولی با گذشت زمان مقاومت بچه تاس‌ماهیان ایرانی کاهش خواهد یافت. ترشح موکوس در سطح پوست بدن بچه تاس‌ماهی ایرانی نیز با افزایش غلظت عصاره افزایش یافت بطوریکه این افزایش ترشح در تیمارهای ۶ و ۷ بارزتر بود. این مطالعه نشان داد که هر چقدر غلظت عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی و نیز زمان مجاورت بچه ماهی با آن کم‌تر باشد، به همان نسبت میزان ترشح موکوس از آن کم‌تر خواهد بود. چنین نتیجه‌ای نیز در مطالعه شریف روحانی و همکاران (۱۳۹۰) در بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به منظور تعیین غلظت نیمه کشنده بدست آمد. مشاهده رفتارهای غیرطبیعی شامل افزایش تحریک‌پذیری، تعادل کم، انقباض شدید عضلات و انحنای ستون فقرات در غلظت‌های زیاد این عصاره آشکار بود به طوری که این رفتارها، با یافته‌های شریف‌روحانی و همکاران (۱۳۹۰)، Mitchell (۱۹۸۴) و Jegede (۲۰۰۷) مطابقت دارد. مقادیر غلظت‌های کشنده هیچگاه یک مقدار ثابت و مطلق نبوده، به این دلیل که فاکتورهای زیادی نظیر اختلافات فردی، سنی، جنسی، وزنی، عوامل محیطی، خصوصیات فیزیکوشیمیایی آب، نحوه تجویز و سایر فاکتورهای دیگر در تعیین LC_{50} موثر می‌باشند (میرستاری، ۱۳۸۱). در بررسی شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون بچه تاس‌ماهی ایرانی مشخص گردید که میزان لنفوسیت در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌دار آماری را نشان داده است ($p<۰/۰۵$). به طوری که با افزایش غلظت عصاره‌ها در تیمارهای مطالعاتی، میزان لنفوسیت کاهش یافته است. افزایش غلظت عصاره‌ها به نوعی یک عامل استرس زا محسوب می‌گردد و هنگامی که به ماهی استرس وارد گردد، سطوح در گردش لوکوسیت‌ها متناسب با زمان تغییر می‌کند و این تغییرات به دنبال انواع فاکتورهای فیزیکی استرس‌زا، کاهش تعداد لنفوسیت‌ها یا تعداد این سلول‌ها نسبت به تعداد گلبول‌های قرمز را شامل می‌شود (Roberts, 1989; Brelin *et al*., 2008). در این تحقیق، میزان مونوسیت در بین تیمارهای مختلف، اختلاف معنی‌دار آماری نشان نداد ($P>۰/۰۵$). این در حالی است که بررسی میزان نوتروفیل خون بچه تاس‌ماهیان ایرانی، حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارها بود ($P<۰/۰۵$). به طوری که با افزایش غلظت عصاره‌ها، میزان نوتروفیل نیز افزایش یافت. با توجه به این که وظیفه نوتروفیل‌ها دفاع بر علیه عفونت‌ها و حرکت به سمت نواحی آسیب دیده بافتی می‌باشد، لذا در غلظت‌های زیادتر عصاره آویشن شیرازی، می‌توان شاهد افزایش میزان نوتروفیل خون بود (تاکاشیما، ۱۳۷۸). ائوزینوفیل نیز در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌دار آماری را نشان داد ($P<۰/۰۵$)، به‌طوری‌که میزان آن در شاهد بیش از سایر تیمارها بود.

با توجه به دوزهای مختلف مورد استفاده از این عصاره در تیمارهای مختلف و نتایج حاصل از میزان مرگ و میر بچه تاس‌ماهیان به نظر می‌رسد که دامنه تغییرات تاثیر گذاری این عصاره نسبتاً کم باشد. لذا می توان در صورت استفاده از این عصاره با توجه به خواص درمانی مناسب آویشن شیرازی، دامنه خطرپذیری کمی را برای بچه تاس‌ماهیان ایرانی متصور بود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مساعدت جناب آقای دکتر محمود بهمنی ریاست محترم و جناب آقای دکتر شهرام عبدالملکی معاونت محترم تحقیقاتی موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر و نیز از کارشناسان محترم بخش بهداشت و بیماری‌های موسسه مذکور تشکر به عمل می‌آید. این مقاله بخشی از نتایج طرح " بررسی تاثیر عصاره‌های سیر و آویشن شیرازی در کنترل انگل‌های تک یاخته‌ای خارجی شایع در بچه تاس‌ماهی ایرانی " با کد مصوب ۸۹۱۵۶-۸۹۱۳-۱۲-۸۶-۱۴ بوده که با حمایت مالی مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور به انجام رسیده است.

منابع

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

شریف روحانی، م.، ۱۳۸۳. بررسی کاربرد برخی اسانس‌ها گیاهی در کنترل آلودگی‌های قارچی تخم ماهیان قزل آلای رنگین کمان به عنوان جایگزین احتمالی مالاشیت گرین در شرایط کارگاهی. پایان نامه دکترای تخصصی بهداشت و بیماری های آبزیان دانشگاه تهران . شماره ۱۹۳.

شریف روحانی، م.، حقیقی، م. و عصاییان، ح.، ۱۳۹۰. غلظت نیمه کشنده اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) در بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی، مجله علمی شیلات ایران، سال بیستم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۰، صفحات ۹۵-۸۹.

شریف روحانی، م.، حقیقی، م.، عصاییان، ح. و لشتوآقایی، غ. ر.، ۱۳۸٦. بررسی اثر بیهوشی اسانس آویشن شیرازی *Zataria multiflora* Boiss. (Labiatae) بر ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) و ماهی قزل آلای رنگین کمان پرورشی (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات، سال شانزدهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۶، صفحات ۱۰۶-۹۹.

عامری مهابادی، م.، ۱۳۷۸. روش‌های آزمایشگاهی هماتولوژی دامپزشکی. مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، شماره ۲۴۴۷. ۱۲۶ ص.

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 ص.

میرستاری، ق.، ۱۳۸۱. اصول زهرشناسی. مرکز دانشگاهی تهران، صفحات ۲۲۰-۱۸۱.

یادگار، ع.، ستاری، م.، بیگدلی، م. و بختیاری، ف.، ۱۳۸۸. بررسی و مقایسه اثرات ضد باکتریایی عصاره الکلی برگ، گل و ریشه آویشن شیرازی بر روی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین. فصلنامه گیاهان دارویی، تابستان ۱۳۸۸، صفحات ۵۸-۶۵.

Brelin, D., 2008. Stress coping strategics in brown trout (*Salmo trutta*): ecological significance aranching, Acta Universitatis Upsaliensis Upsala. 68P.

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

Jegede, T., 2007. Acute- toxicity of Sodium chloride (NaCl) on *Oreochromis niloticus* fingerlings. Journal of Fisheries International, 2. (4): 292-294.

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.

Mitchell, A. J., 1984. Parasites and diseases of Striped Bass. In: J.P.Mc Craren (Ed.), the aquaculture of Striped Bass: A proceeding. UMSGM P8401. University of Maryland, College Park, us. Pp. 177-204.

Mohagheghzadeh, A., Shams-Ardekani, M. and Ghannadi, A., 2000. Volatile constituents of callus and flower-bearing tops of *Zataria multiflora* Bioss (Lamiaceae). Flavour Fragr Journal, 15:373-376.

Naghibi, F., Mosaddegh, M., Mohammadi Motamed, S. and Ghorbani, A., 2005. Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology. Iranian Journal Pharmacology Research, 2: 63- 79.

Roberts, R. J., 1989. Fish pathology. Secend ed., Baillier tinndal, 467p.

TRC, 1984. O.E.C.D. Guideline for testing of chemicals, section 2. Effects on biotic systems. Pp. 1-39.

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