وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری

عنوان:

جایگزینی عصاره آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و نانوذرات نقره به جای آنتی بیوتیک انتخابی در درمان آئرومونازیس (Aeromonasis) در بچه تاسماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*)

مجری:
مهدی معصوم زاده

شماره ثبت
٦٤٢٩٨

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری

عنوان طرح/پروژه: جایگزینی عصاره آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و نانوذرات نقره به جای آنتی بیوتیک انتخابی در درمان آئرومونازیس (Aeromonasis) در بچه تاسماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*)
کد مصوب: ۹۹۱۱۴۷-۰۱۰-۱۲-۳۲-۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان: مهدی معصوم زاده
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری: مهدی معصوم زاده
نام و نام خانوادگی همکار(ان): ایوب یوسفی جوردهی، علیرضا شناور ماسوله، سهیل بازاری مقدم ، ذبیح ا... پژند، علی حسین پور زلتی، فروزان باقرزاده لاکانی، مهدی علیزاده رودپشتی، هوشنگ یگانه راسته کناری، جلیل جلیل پور رودکلی، علی حلاجیان، محمود فلاح شجاعی، بهاره یونس حقیقی، مجید پورصفر
نام و نام خانوادگی مشاور(ان): مصطفی شریف روحانی، عیسی شریف پور
نام و نام خانوادگی ناظر(ان): -
محل اجرا: استان گیلان
تاریخ شروع: ۱۳۹۶/۱۲/۱
مدت اجرا: ٤ سال و ۲ ماه
ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار: سال ۱٤۰۲
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

طرح/پروژه: جایگزینی عصاره آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و نانوذرات نقره به جای آنتی بیوتیک انتخابی در درمان آئروموناز‌یس (Aeromonasis) در بچه تاسماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*)

کد مصوب : ۹۹۱۱۴۷-۰۱۰-۱۲-۳۲-۲

شماره ثبت (فروست) : ٦٤٢٩٨ تاریخ : ۱٤۰۲/۷/۳۰

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

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان در تاریخ ۱۴۰۲/۶/۲۶ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده □ مرکز ■ ایستگاه □

با سمت محقق غیر هیئت علمی در انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه

چکیده ۱

۱-مقدمه ۳

۱-۱- بیماری باکتریایی آئروموناز یس ۳

۱-۲-کنترل و درمان آئروموناز یس در ماهیان ۵

۱-۳- تاثیر گیاه دارویی آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره در کنترل و نابودي عوامل باکتریایی ۶

۱-۴- اهداف تحقیق ۸

۲- مواد و روش کار ۹

۲-۱- مواد مورد استفاده ۹

۲-۱-۱- مواد مصرفی ۹

۲-۱-۲-مواد غیر مصرفی ۹

۲-۲- تهیه نمونه عصاره آویشن شیرازی بمنظور بررسی کیفیت : ۹

۲-۲-۱- روش عصاره گیری و آزمایش‌های کمی و کیفی عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی: ۹

۲-۲-۱-۱- روش عصاره گیری ۱۰

۲-۲-۱-۲- روش و نتیجه آزمایش‌های کنترل کیفی ۱۰

۲-۳- تهیه نانوذره نقره کلوئیدی و آزمایش‌های کیفی آن ۱۱

۲-۳-۱- نتیجه آزمایش‌های کنترل کیفی ۱۱

۲-۴- تهیه باکتری آئروموناس هیدروفیلا کددار ۱۲

۲-۴-۱- تکثیر باکتری آئروموناس هیدروفیلا کددار ۱۲

۲-۵- تعیین آنتی‌بیوتیک مؤثر بر باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا ۱۳

۲- ۶- تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد (MIC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره آویشن شیرازی و نانوکلوئید نقره ۱۴

۲-۷-تعیین حداقل غلظت‌کشندگی(MBC) باکتری‌آئروموناس‌هیدروفیلا عصاره آویشن‌شیرازی و نانوکلوئیدنقره ۱۴

۲-۸- اجرای آزمایش‌های تعیین غلظت‌های کشنده عصاره آویشن شیرازی و نانوکلوئید نقره ۱۵

۲-۹- ایجاد آلودگی تجربی (Challenge) بچه ماهیان ازون برون به باکتری آئروموناس هیدروفیلا ۱۶

۲-۱۰- تیمار ماهیان آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا با عصاره آویشن شیرازی، محلول نانوکلوئید نقره و آنتی بیوتیک انروفلوکساسین.....۱۷
۲-۱۱-بررسی تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره بر برخی از شاخص های خونی ۱۸
۲-۱۱-۱- شمارش افتراقي گلبول های سفید.....۱۸
۲-۱۱-۲- تعیین غلظت هماتوکریت(HCT).....۱۹
۲-۱۱-۳- تعیین غلظت هموگلوبین (Hb).....۱۹
۲-۱۲- بررسی آسیب های بافتی ایجاد شده توسط عصاره آویشن شیرازی و نانوکلوئید نقره.....۲۰
۲-۱۳- جمع آوري داده‌ها و تجزیه و تحلیل آماري.....۲۱
۳- نتایج ۲۲
۳-۱- تعیین آنتی‌بیوتیک موثر بر باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا.....۲۲
۳-۲- تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا با عصاره آویشن شیرازی و نانوکلوئید نقره ۲۲
۳-۳- تعیین غلظت‌های نیمه کشنده عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره در بچه ماهیان ازون برون.....۲۴
۳-۳-۱- تعیین غلظت های نیمه کشنده عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی در بچه ماهیان ازون برون ۲۴
۳-۳-۲- تعیین غلظت‌های نیمه‌کشنده نانوکلوئید نقره در بچه ماهیان ازون برون ۲۷
۳-۴- تیمار ماهیان ازون برون آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا به روش تجربی توسط مقادیر مختلف عصاره آویشن شیرازی و نانوکلوئید نقره و آنتی بیوتیک انروفلوکساسین ۳۰
۳-۵-بررسی تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره بر شاخص های خون شناسی ۳۲
۳-۵-۱- تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره بر گلبول های سفید خون ۳۲
۳-۵-۲- تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره بر نوتروفیل های خون..... ۳۳
۳-۵-۳- تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره بر روی لنفوسیت های خون..... ۳۴
۳-۵-۴- تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره بر مونوسیت های خون..... ۳۵
۳-۵-۵- تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره بر ائوزینوفیل های خون ۳۶
۳-۵-۶- تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره بر گلبول های قرمز خون..... ۳۷
۳-۵-۷- تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره بر روی هموگلوبین خون..... ۳۸
۳-۵-۸- تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره بر روی هماتوکریت خون ۳۹
۳-۵-۹- تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره بر میانگین حجم گلبول های قرمز خون MCV ۴۰
۳-۵-۱۰- تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره بر میانگین هموگلوبین گلبول قرمز خون MCH ...۴۱

۳-۵-۱۱- تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانوکلوئیدنقره بر میانگین غلظت هموگلوبین گلبول‌های‌قرمز خون MCHC.....۴۲
۳-۶- بررسی تاثیرات هیستوپاتولوژیک عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره.....۴۲
۳-۶-۱- آسیب های بافت آبشش ۴۲
۳-۶-۱-۱- آسیب های بافت آبشش در تیمار ۱ (حمام نانو کلوئید نقره با غلظت ۰/۴ ppm) ٤٣
۳-۶-۱-۲- آسیب های بافت آبشش در تیمار ۲ (حمام نانوکلوئید نقره با غلظت ۰/۶ ppm) ٤٤
۳-۶-۱-۳- آسیب های بافت آبشش در تیمار ۳ (حمام نانوکلوئید نقره با غلظت ۰/۸ ppm) ٤٤
۳-۶-۱-۴- آسیب های بافت آبشش در تیمار ۴ (حمام نانوکلوئید نقره کلوئیدی با غلظت ۱ ppm)..... ٤٥
۳-۶-۱-۵- آسیب های بافت آبشش در تیمار ۵ (حمام عصاره آویشن شیرازی با غلظت ۱۰۰۰ ppm) . ٤٥
۳-۶-۱-۶- آسیب های بافت آبشش در تیمار ۶ (مصرف خوراکی عصاره آویشن شیرازی با غلظت ۱۰۰mg/bwfish)..... ٤٦
۳-۶-۱-۷- آسیب های بافت آبشش در تیمار ۷ (مصرف خوراکی آنتی بیوتیک انروفلوکساسین با غلظت ۱۰mg/bwfish) ٤٦
۳-۶-۲-آسیب های بافت کبد ۴۷
۳-۶-۲-۱- آسیب های بافت کبد در تیمار ۱ (حمام نانوکلوئید نقره با غلظت ۰/۴ ppm)..... ٤٧
۳-۶-۲-۲- آسیب های بافت کبد در تیمار ۲ (حمام نانوکلوئید نقره با غلظت ۰/۶ ppm) ٤٨
۳-۶-۲-۳- آسیب های بافت کبد در تیمار ۳ (حمام نانوکلوئید نقره با غلظت ۰/۸ ppm)..... ٤٩
۳-۶-۲-۴- آسیب های بافت کبد در تیمار ۴ (حمام نانوکلوئید نقره با غلظت ۱ ppm) ۵۰
۳-۶-۲-۵- آسیب های بافت کبد در تیمار ۵ (حمام عصاره آویشن شیرازی با غلظت ۱۰۰۰ ppm)..... ۵۱
۳-۶-۲-۶- آسیب های بافت کبد در تیمار ۶ (مصرف خوراکی عصاره آویشن شیرازی با غلظت mg/bwfish ۱۰۰) ۵۲
۳-۶-۲-۷- آسیب های بافت کبد در تیمار ۷ (مصرف خوراکی آنتی بیوتیک انروفلوکساسین با غلظت ۱۰mg/bwfish) ۵۳
۴-بحث و نتیجه گیری ۵۴
پیشنهادها..... ۶۳
منابع ۶۵
چکیده انگلیسی..... ۷۱

عنوان	«فهرست جداول»	صفحه

جدول ۱– آنالیز عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی تولید شده ۱۰

جدول۲- گروه های تیمار ماهیان آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا ۱۸

جدول ۳- قطر هالهی عدم رشد باکتری در آزمون آنتی بیوگرام ۲۲

جدول۴ - حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا با عصاره آویشن شیرازی و نانوکلوئید نقره ۲۳

جدول ۵ ـ مقایسه اثر تیمارهاي مختلف آویشن شیرازي روي مرگ و میر بچه ماهیان با میانگین وزن ۱/۱۴ ±۵/۸۲ گرم ازون برون (میانگین ۳ تکرار) طي ۹۶ ساعت ۲۵

جدول ۶ـ غلظت هاي کشنده عصاره آویشن شیرازي (میلی گرم در لیتر) طي ۴ روز در بچه ماهیان ازون برون ۲۵

جدول ۷ ـ مقایسه اثر تیمارهاي مختلف نانو کلوئید نقره روي مرگ و میر بچه ماهیان ازون برون (میانگین سه تکرار) در طي ۹۶ ساعت ۲۸

جدول ۸- تعیین غلظتهای کشنده نانو کلوئید نقره در طی ۴ روز بر روی بچه ماهیان ازون برون (میانگین سه تکرار) ۲۸

جدول ۹- تیمار ماهیان آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا ۳۱

عنوان	«فهرست اشکال»	صفحه

شکل ۱- دستگاه زتاسایزر برای آنالیز اندازه ذرات نانو ۱۲
شکل ۲- تکثیر باکتری آئروموناس هیدروفیلای کددار ۱۳
شکل ۳- انجام آزمون و دیسک‌های آنتی‌بیوگرام ۱۳
شکل ۴- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره آویش شیرازی و نانوکلوئید نقره ۱۵
شکل ۵- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MBC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره آویش شیرازی و نانوکلوئید نقره ۱۵
شکل ۶- نگهداری بچه ماهیان تیمارهای مختلف در وان های ۵۰ لیتری ۱۷
شکل ۷- تهیه نمونه خون از بچه ماهیان تیمارهای مختلف ۱۹
شکل۸ - نمونه برداری از آبشش ۲۰
شکل ۹- برش بافت با استفاده از میکروتوم ۲۰
شکل ۱۰- رنگ آمیزی اسلایدهای بافت آبشش ۲۱
شکل۱۱- نتایج آزمایش‌های تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا با عصاره آویشن شیرازی ۲۳
شکل ۱۲- نتایج آزمایش‌های تعیین حداقل غلظت کشندگی کنندگی (MBC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا با عصاره آویش شیرازی ۲۴
شکل۱۳- مشاهده پرخونی (C)،چسبندگی رشته های ثانویه (F) و نکروز سلولی(N) در بافت آبشش تیمار۱ (20x، H&E) ۴۳
شکل ۱۴- مشاهده نکروز سلولی رشته های اولیه و ثانویه (N) در بافت آبشش تیمار ۲ (40x، H&E) ۴۴
شکل ۱۵-مشاهده رسوبات هموسیدرین(He)، نکروز سلولی(N)، چسبندگی(F) وکوتاهی رشته‌های ثانویه دربافت آبشش تیمار۳(40x،H&E) ۴۴
شکل ۱۶- مشاهده چسبندگی رشته های ثانویه (F) ، نکروز سلولی (N) در بافت آبشش تیمار ۴ (20x، H&E) ۴۵
شکل۱۷- هیپرپلازی (Hp)، چماقی شدن (Cl)، پرخونی(C) و خونریزی (H) تیمار۵ (10X، H&E) ۴۵
شکل ۱۸- مشاهده چسبندگی رشته های ثانویه(F) ، نکروز سلولی (N)، تخریب لایه اپي تلیال، خونریزی و پرخونی در بافت آبشش تیمار ۶ ..... ۴۶
شکل ۱۹- مشاهده چسبندگی رشته های ثانویه (F)، تخریب لایه اپي تلیال، خونریزی و رسوبات هموسیدرین (He) در بافت آبشش تیمار ۷ ..... ۴۶
شکل ۲۰- اتساع سینوزوئید (SD)، رکورد صفراوی(Br)، خونریزی(H) و نکروز سلولي (N) بافت کبد تیمار ۱ (40x- H&E) ۴۷
شکل ۲۱ - اتساع سینوزوئید (SD)، رکورد صفراوی(Br)، پرخونی (C) و نکروز سلولي(N) بافت کبد تیمار ۲ (40x- H&E) ۴۸
شکل ۲۲ - اتساع سینوزوئید (SD)، رکورد صفراوی (Br) و نکروز سلولي(N) بافت کبد تیمار۳ (40x- H&E) ۴۹
شکل ۲۳- مشاهده شدت نکروز سلولي(N)، هیپرتروفی (H) و رکورد صفراوی (Br) بافت کبد تیمار ۴ (40x- H&E) ۵۰
شکل ۲۴- اتساع سینوزوئید (SD)، پراکندگی رکورد صفراوی(Br) و خونریزی (H) بافت کبد تیمار ۵(40x- H&E) ۵۱
شکل ۲۵- مشاهده شدت نکروز سلولي(N)، هیپرتروفی(H) و رکورد صفراوی(Br) بافت کبد تیمار بافت کبد تیمار ۶ ..... ۵۲

عنوان	«فهرست نمودارها»	صفحه

نمودار ۱:معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگي probit value با لگاریتم غلظت عصاره آویشن شیرازي بر روي بچه ماهیان ازون برون (میانگین سه تکرار در ۲۴ ساعت) ۲۶

نمودار ۲: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگي probit value با لگاریتم غلظت عصاره آویشن شیرازي بر روي بچه ماهیان ازون برون (میانگین سه تکراردر ۴۸ ساعت) ۲۶

نمودار ۳: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگي probit value با لگاریتم غلظت عصاره آویشن شیرازي بر روي بچه ماهیان ازون برون (میانگین سه تکراردر ۷۲ ساعت) ۲۷

نمودار ۴: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگي probit value با لگاریتم غلظت عصاره آویشن شیرازي بر روي بچه ماهیان ازون برون (میانگین سه تکراردر ۹۶ ساعت) ۲۷

نمودار ۵: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگي probit value با لگاریتم غلظت نانوکلوئید نقره در بچه ماهیان ازون برون (میانگین سه تکرار در ۲۴ ساعت) ۲۹

نمودار ۶: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگيprobit value با لگاریتم غلظت نانوکلوئید نقره در بچه ماهیان ازون برون (میانگین سه تکرار در ۴۸ ساعت) ۲۹

نمودار ۷: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگيprobit value با لگاریتم غلظت نانوکلوئید نقره در بچه ماهیان ازون برون (میانگین سه تکرار در ۷۲ ساعت) ۳۰

نمودار ۸: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگيprobit value با لگاریتم غلظت نانوکلوئید نقره در بچه ماهیان ازون برون (میانگین سه تکرار در ۹۶ ساعت) ۳۰

نمودار ۹ - مقایسه تعداد گلبول هاي سفید خون در تیمار های مختلف ۳۲

نمودار۱۰ - مقایسه میزان نوتروفیل خون ماهیان در تیمار های مختلف ۳۳

نمودار ۱۱ - مقایسه میزان لنفوسیت خون ماهیان شاهد در تیمار های مختلف ۳۴

نمودار ۱۲ - مقایسه میزان مونوسیت خون ماهیان در تیمار های مختلف ۳۵

نمودار ۱۳ - مقایسه میزان ائوزینوفیل خون ماهیان در تیمار های مختلف ۳۶

نمودار۱۴ - مقایسه تعداد گلبول هاي قرمز خون ماهیان در تیمار های مختلف ۳۷

نمودار ۱۵- مقایسه میانگین هموگلوبین خون ماهیان در تیمار های مختلف ۳۸

نمودار ۱۶ - مقایسه درصد هماتوکریت خون ماهیان در تیمار های مختلف ۳۹

نمودار ۱۷ - مقایسه میزانMCV خون ماهیان شاهد با تیمار های مختلف ۴۰

نمودار ۱۸ - مقایسه میزانMCH خون ماهیان در تیمار های مختلف ۴۱

نمودار ۱۹ - مقایسه میزانMCHC خون ماهیان شاهد با تیمار های مختلف ۴۲

چکیده

در این تحقیق پس از تهیه باکتری کددار آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) با استفاده از آزمون آنتی بیوگرام نسبت به بررسی تاثیر دیسک های محتوی آنتی بیوتیک های مختلف بر روی باکتری مذکور اقدام گردید که بر اساس نتایج حاصل بیشترین قطر هاله عدم رشد باکتری آئروموناس هیدروفیلا (*hydrophila Aeromonas*) مربوط به دیسک حاوی آنتی بیوتیک های فولوموکئین و انروفلکساسین با ۲۲ میلی متر تعیین گردید. همچنین در این مطالعه حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا (*hydrophila Aeromonas*) توسط عصاره آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و نانوذره نقره کلوئیدی و نیز تعیین غلظت های کشنده (LC50) آنها در بچه ماهیان ازون برون (*Acipenser stellatus*) و نیز بررسی اثربخشی و تعیین مقادیر موثر ترکیبات مذکور بر روی ماهیان ازون برون آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا مورد بررسی قرار گرفت.

بر اساس مطالعات صورت گرفته در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) در این تحقیق حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره آویشن شیرازی و نانوذره نقره کلوئیدی به ترتیب ۲۵/۰ میلي گرم در لیتر و ۵/۰ میلیگرم در لیتر و حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره آویشن شیرازی و نانو ذره نقره کلوئیدی به ترتیب ۲۵/۰ میلي گرم در لیتر و ۲۵/۰ میلي گرم در لیتر تعیین گردید. بر اساس نتایج تعیین غلظت های نیمه کشنده (LC50) عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی و نانوذره نقره بر روی بچه ماهیان ازون برون در طی ۹۶ ساعت به ترتیب معادل ۶۵/۷۶۶ میلی گرم در لیتر و ۱۱/۱۰ میلی گرم در لیتر تعیین گردید.

پس از انجام مطالعات تعیین غلظت های نیمه کشنده عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی و نانوذره نقره کلوئیدی با توجه به نتایج بدست آمده نسبت به انجام مطالعات تعیین غلظت های تأثیرگذار ترکیبات مذکور در درمان ماهیان ازون برون آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا اقدام گردید. در این بررسی از غلظت های ۴/۰، ۶/۰، ۸/۰ و ۱ میلیگرم در لیتر نانوذره نقره کلوئیدی همراه با غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر عصاره آویشن شیرازی (تعیین شده در مطالعه معصوم زاده و همکاران در سال ۱۳۹۴) جهت تیمار بچه ماهیان ازون برون آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا بصورت حمام یک ساعته استفاده گردید. همچنین از عصاره آویشن شیرازی و آنتی بیوتیک انروفلوکساسین به ترتیب با غلظت ۱۰۰ میلی گرم و ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن ماهیان بصورت خوراکی طی ۱۰ روز جهت تیمار بچه ماهیان ازون برون آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا به مدت ۱۰ روز استفاده گردید که بر اساس نتایج حاصل بیشترین میزان بازماندگی در بین گروه های تیمار و شاهد مربوط به تیمار عصاره آویشن شیرازی با غلظت ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن ماهیان بصورت خوراکی طی ۱۰ روز بدون بروز هرگونه تلفات در ماهیان تحت تیمار بوده است.

در این مطالعه نتایج حاصل از شمارش افتراقي گلبول هاي سفيد نمونه های خونی تهیه شده از ماهیان تیمار شده با مقادیر مختلف عصاره آویشن شیرازی و نانوذره نقره کلوئیدی از وجود اختلاف معني دار آماري در ميزان گلبول های قرمز، لنفوسیت و نوتروفیل بین تیمارها و شاهد حکایت می نماید($P<0.05$).

بررسی اسلایدهای تهیه شده از مقاطع بافتی آبشش و کبد ماهیان ازون برون نمونه برداری شده از گروه های تیمار که تحت تأثیر غلظت های مختلف عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی و نانوذره نقره کلوئیدی قرار داشتند بروز برخی از آسیب های میکروسکوپیک نظیر پرخونی، چسبندگی در رشته های آبششی، نکروز سلولي، وجود رنگدانه های ملانین رشته های اولیه در آبشش، عوارضی نظیر تورم ابري در هپاتوسیت ها، نکروزسلولي، پرخونی و افزایش رنگدانه¬های ملانین در کبد را نشان داد.

کلمات کلیدی: عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی، نانوذره نقره کلوئیدی، ماهی ازون برون، حداقل غلظت مهارکنندگی باکتری، حداقل غلظت کشندگی باکتری

۱-مقدمه

كاهش روز افزون ذخاير ماهيان خاوياري لزوم تكثير و پرورش ماهيان مذكور را اجتناب ناپذير نموده است. از مهمترين عوامل تهديد كننده پرورش متراكم ماهيان از جمله ماهيان خاویاری آلودگی آنها به عوامل بیماریزا و در نتیجه بروز تلفات در آنها می‌باشد. در میان عوامل بیماریزای تهدید کننده آبزی پروری ماهیان خاویاری باکتری آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد بطوریکه بر اساس نتايج پروژه بررسي كمي و كيفي بچه ماهيان خاوياري از مرحله تكثير تا رهاكرد (شناور و همكاران، ۱۳۸۲) و نيز طرح ملي بررسي وضعيت بهداشتي كارگاه‌هاي تكثير و پرورش ماهيان خاوياري (شناور و همكاران، ۱۳۸۸) باکتری آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) می‌تواند در طی مراحل مختلف پرورش، ماهیان خاویاری را آلوده نموده و بر اساس شدت آلودگی و سن ماهیان مبتلا منجر به بروز علائم بالینی متفاوت و حتی تلفات گردد. با عنایت به این امر ضروری است به منظور درمان ماهیان مبتلا به آئرومونیازیس و جلوگیری از بروز تلفات در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری با استفاده از مواد مناسب اقدام گردد. با توجه به مشکلات متعدد استفاده از آنتی‌بیوتیک ها و مواد ضدعفونی کننده شیمیایی مورد استفاده در کنترل عوامل باکتریایی از جمله باکتری آئروموناس هیدروفیلا در آبزیان مانند ایجاد آلودگي‌هاي زيست محيطي و نیز تأثیرات سوء بر مصرف کنندگان ماهی (ایجاد مقاومتهای دارویی و...) لزوم جایگزینی مواد مذکور با موادی طبیعي مانند گیاهان دارویی در درمان بیماری‌های باکتریایی آبزیان از جمله آئرومونیازیس از اولویت‌های تحقیقاتی محققین بهداشت و بیماری های آبزیان محسوب می گردد.

همچنین نظر به کاربرد وسیع نانوذرات از جمله تأثیر نانوذرات فلزی مانند نانوذره نقره در نابودی عوامل بیماریزای میکروبی در مقادیر بسیار کم، موجب گردید این پژوهش با هدف بررسی امکان جایگزینی عصاره آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و نانوذره نقره با آنتی‌بیوتیک انتخابی در درمان بچه ماهیان ازون برون آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا اجرا گردد.

۱-۱- بیماری باکتریایی آئرومونازیس

آئرومونازیس از جمله مهمترین بیماری های باکتریایی شایع در ماهیان خاویاری در سنین مختلف می باشد که در نتیجه تأثیر آئروموناس‌های متحرک شامل آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*)، آئروموناس کاویا (*Aeromonas caviae*) و آئروموناس سوبریا (*Aeromonas sobria*) و گونه غیرمتحرک آئروموناس سالمونیسیدا (*Aeromonas salmonicida*) ایجاد می گردد. آئروموناس‌های متحرک جزء باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری، گرم منفی و غیرهاگ‌زا می‌باشند. آئروموناس‌های متحرک از جمله میکروفلورهای جانوران آبزی می باشند و ممکن است در جانوران خون سرد، خون گرم و حتی انسان بیماریزا باشند اما آئروموناس سالمونیسیدا (*Aeromonas salmonicida*) یک پاتوزن اجباری ماهی می‌باشد (سلطانی، ۱۳۷۵). باكتري آئروموناس هيدروفيلا (*Aeromonas hydrophila*) براي اولين بار

در سال ۱۸۹۱ توسط Sanarelli جداسازی گردید که آنرا باسیلوس هیدروفیلوس فوسکوس نامید (سلطانی، ۱۳۷۵). باکتری آئروموناس هیدروفیلا یکی از باکتریهای مهم در صنعت پرورش ماهی و به عنوان یک عامل بیماریزا در گونه‌های مختلف ماهیان آب شیرین و گاهی ماهیان آب شور محسوب می‌شود (Imani and Akhlaghi, 2004). این باکتری می‌تواند باعث ایجاد سپتی‌سمی هموراژیک در گونه‌های مختلف ماهی گردد و بیماری حاصل از آن در سراسر دنیا گسترش دارد (Aoki, 1999). برخی از محققین معتقدند آئروموناس هیدروفیلا یک بیماریزای فرصت‌طلب است و به عنوان یک ارگانیزم همه جایی و نامتجانس می‌باشد که در شرایط استرس یا در ارتباط با عفونت توسط سایر پاتوژن‌ها باعث ایجاد بیماری می‌شود در حالیکه گروه دیگر از محققین معتقدند آئروموناس هیدروفیلا یک عامل بیماریزای اولیه می‌باشد (Imani and Akhlaghi, 2004). باکتری آئروموناس هیدروفیلا در طبیعت به طور گسترده در آب‌های شیرین، در قسمت رسوبات و نیز در دستگاه گوارش ماهی ها وجود دارد (Sugita et al., 1995).

در ایران در ارتباط با بیماریزایی این باکتری درگونه‌های مختلف ماهیان پرورشی از جمله کپور ماهیان پرورشی (Esmaeli and Peighan, 1997; Razavilar et al, 1981; Imani and Akhlaghi, 2004) و ماهیان خاویاری (سلطانی،۱۳۷۹؛ شناور و همکاران، ۱۳۸۸؛ عادل و همکاران، ۱۳۹۳) تحقیقات مختلفی صورت پذیرفته است. آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) می‌تواند جزئی از فلور میکروبی لوله گوارش ماهیان محسوب شود که در ماهیان با سنین مختلف که دچار استرس گردیده و یا توسط عوامل بیماریزای مانند ویروس‌ها، انگل‌ها و سایر باکتری‌ها مورد تهاجم قرار می‌گیرند آئروموناسیس را ایجاد نماید (مخیر،۱۳۸۵).

عوامل مستعد کننده آئروموناسیس شامل دمای بالا، تراکم زیاد، آلودگی با مواد آلی و کمبود اکسیژن بوده و ماهیان مبتلا به آئروموناسیس تیره رنگ شده و بر روی بدن و باله‌های شنای آنها به ویژه در سطح شکمی و نیز در قسمت‌های سر و دهان خونریزی‌های نامنظم قرمز ظاهر می‌شود (مخیر،۱۳۸۵). بروز سپتی‌سمی هموراژیک (Hemorrhagic septicemia) را می‌توان از مهمترین تأثیرات باکتری‌های آئروموناس به حساب آورد. خونریزی‌های ایجاد شده در اثرآئروموناس‌های متحرک ناشی از تأثیر همولیزین (Hemolysin) محلول می‌باشد که ممکن است موجب جراحات پوستی گردد (سلطانی،۱۳۷۵). علائم بالینی آئروموناسیس می‌تواند به صورت یک پرخونی سطحی گسترده در ناحیه وسیعی از بدن بیشتر همراه با نکروز باله ها یا دم تا یک زخم وسیع روی بخش چشمگیری از سطوح جانبی تا ناحیه پشتی متغییر باشد (سلطانی،۱۳۷۵).

آئروموناسیس می‌تواند به صورت‌های فوق حاد با علائم کم، حاد با علائم بالینی ذکر شده و یا به فرم مزمن با زخم‌های بزرگی که برای مدت طولانی وجود دارند ظاهر گردد. در کالبد شکافی ماهیان مبتلا به آئروموناسیس در بیشتر موارد پرخونی احشاء همراه با خونریزی روی روده بند و پرده صفاقی مشاهده می‌گردد که در حالت‌های شدید بیماری ممکن است کل احشاء به رنگ قرمز درخشان بوده و چسبندگی فیبرینی ایجاد گردد همچنین طحال از نظر ماکروسکوپیک بزرگ، گرد و قرمز بوده و کلیه ها بزرگ و اغلب دچار نکروز گردیده و عضلات ممکن است دچار نکروز موضعی

شوند. همچنین از سایر علائم بالینی می‌توان به پرخونی مناطق وسیعی از سطح خارجی ناحیه خلفی همراه با برآمدگی فلس‌ها اشاره نمود (سلطانی، ۱۳۷۵).

۱-۲-کنترل و درمان آئروموناziس در ماهیان

با توجه به خسارات و تلفات گسترده ناشي از آلودگي‌هاي ماهي‌ها از جمله ماهیان خاویاری به باکتری‌های گروه آئروموناس خصوصا آئروموناس هیدرفیلا، ضروری است نسبت به کنترل و درمان ماهیان آلوده به باکتری‌های مذکور اقدام گردد. درمان اختصاصی آئروموناziس بدون حذف عوامل اولیه ایجاد کننده بیماری (عوامل استرس‌زا و نیز عوامل بیماریزای ویروسی، انگلی و باکتریایی) از ارزش اندکی برخوردار است (سلطانی،۱۳۷۵). اصلاح و بهبود شرایط محیطی و از بین بردن عوامل استرس‌زا بویژه کاهش مواد آلی آب ماهی پرورشی و نیز کاهش دمای آب در صورت امکان در تقلیل ضایعات ناشی از آئروموناziس می‌تواند مؤثر باشد (مخیر، ۱۳۸۵) .

به منظور کنترل و درمان آئروموناziس در ماهی از روش‌هاي مختلفی استفاد مي‌گردد. واکسیناسیون یک روش انتخابی جهت پیشگیری از بروز این بیماری می‌باشد. با توجه به تنوع آنتی‌ژنی در میان آئروموناس‌های متحرک در صورت استفاده از واکسن و ایجاد مقاومت در برابر یک گونه خاص از این باکتری‌ها احتمال ایجاد محافظت در برابر سایر گونه‌ها وجود ندارد. از بین بردن باکتری‌های آئروموناس توسط ترکیبات ضدعفونی‌کننده از شایع‌ترین روش‌های پیشگیری از شیوع آئروموناziس در مراکز پرورش ماهی می‌باشد. در حال حاضر از مواد شیمیایی مختلفی جهت از بین بردن باکتری‌های آئروموناس استفاده می‌شود. سولفات مس ۱ در ۲ هزار به مدت ۱ تا ۲ دقیقه جهت از بین بردن باکتری‌های آئروموناس استفاده می‌گردد. همچنین مخلوط یک لیتر محلول سبز مالاشیت ۲/۵ درصد با یک لیتر فرمالین جهت نابودی باکتری‌های آئروموناس نیز استفاده می‌گردد اما با توجه به تأثیرات سوء زیست محیطی محلول

سبزمالاشیت در تحقیقات مختلف انجام شده از جمله این تحقیق تلاش گردیده است نسبت به جایگزینی آن با مواد با منشاء طبیعی که فاقد تأثیرات سوء زیست محیطی هستند اقدام شود. ترکیبات چهارتایی آمونیوم که با نام‌های تجاری مختلف از جمله دزجرم در دسترس پرورش دهندگان می‌باشد از دیگر ترکیبات شیمیایی می‌باشند که غالبا جهت نابودی عوامل باکتریایی مانند باکتری‌های آئروموناس از طریق ضدعفونی حوضچه‌ها و تجهیزات پرورش مورد استفاده قرار می‌گیرند. استفاده از انواع آنتی‌بیوتیک‌ها همانند درمان سایر انواع بیماری‌های باکتریایی می‌تواند در نابودی باکتری‌های آئروموناس موثر باشد. مصرف اکسي‌تتراسایکلین در غذاي ماهیان پرورشي به نسبت ۱۲-۱۵ گرم به ازای هر ۱۰۰ کیلوگرم وزن ماهي در غذای مصرفی براي مدت ۱۱ روز مي‌تواند مفید واقع شود. درمان با سولفامرازین بدین ترتیب انجام مي‌گیرد که در سه روز متوالي روزانه به میزان ۲۶۴ میلي‌گرم به ازای هر کیلوگرم ماهي به غذا اضافه مي‌شود و سپس درمان به میزان ۱۵۴ میلي‌گرم به ازای هر کیلوگرم ماهي در روز به مدت ۱۱ روز ادامه مي‌یابد (آذری تاکامی، ۱۳۷۶). استفاده از آنتي‌بیوتیك‌ها و مواد ضدمیکروبي روش معمول درمان عفونت‌های باکتریایی از جمله آئروموناziس در پرورش آبزیان

مي‌باشد. اما متعاقب بکارگیری آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های باکتریایی، ایجاد سویه‌هاي مقاوم و تجمع باقیمانده دارو در بافت‌هاي ماهي و مشکلات زیست محیطي دور از انتظار نیست. از طرف دیگر این مواد شیمیایي موجب ممانعت از رشد فلور باکتریایي دستگاه گوارش ماهي مي‌شوند که داراي اثرات مفیدي بر سلامت ماهی هستند (Mesalhy Aly et al., 2008).

با توجه به تأثیرات سوء ذکر شده در خصوص آنتی‌بیوتیک ها و نیز سایر عوارض جانبي آنها از جمله مشکلات زیست محیطي، تخریب فلور آب و روده ماهیان، گراني و مشکلات اجرایي تجویز آنها، به نظر می‌رسد استفاده از پروبیوتیك‌ها که باکتري‌هاي با اثرات مفید بر سلامتي بوده و قادرند سیستم ایمني میزبان را تحریك نمایند (Fuller, 1989) و همچنین استفاده از محرك‌هاي ایمنی شیمیایی مانند لوامیزول و محرک‌های ایمنی حاصل از مواد طبیعی مانند آرگوسان که از جلبك لامیناریا دیجیتاتا بدست می‌آید و نیز بکارگیری محرك‌هاي ایمني گیاهی مانند سرخارگل می‌توانند به منظور افزایش قدرت ایمني و ایجاد مقاومت در مقابل بیماري‌ها و بهبود فاکتورهاي رشد در ماهي‌ها مورد استفاده قرار گیرند (Iwama, 1996; Raa ,1996; Yuan et al., 2008). همچنین با توجه به کاربردهای گسترده نانوذرات از جمله تأثیرات آنها در نابودی عوامل میکروبی، استفاده از نانوذرات مانند نانوذره نقره در کنترل و نابودی عوامل باکتریایی از جمله آئروموناس هیدروفیلا می‌تواند مورد توجه محققین بهداشت و بیماری های آبزیان قرار گیرد (علیشاهی و همکاران، ۱۳۸۹; زرین مهر، ۱۳۹۳) .

۱-۳- تاثیر گیاه دارویی آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره در کنترل و نابودي عوامل باکتریایی

«آویشن شیرازی» از گیاهان تیره لابیاته با نام علمي *Zataria multiflora* یکي از شناخته شده‌ترین گیاهان دارویي در طب سنتي ایران و اروپا مي‌باشد. این گیاه علفي معطر که طول آن حدود۴۰ سانتي‌متر می‌باشد داراي خواص دارویي بسیاري است. روغن سفید آویشن تنتور و عصاره مایع آن بعنوان ترکیبات معطر در فرآورده‌هاي غذایي کاربرد دارد. قسمت‌هاي درماني این گیاه سرشاخه‌ها و برگ‌هاي خشك شده آن مي‌باشد. در طب سنتي از این گیاه در درمان اسپاسم، سیاه سرفه، برونشیت، عفونت ریه، سرماخوردگي، آنفلوانزا و ضد نفخ و از دم کرده آن براي درمان عفونت گوش میاني، نفخ و تهوع استفاده مي‌شود. عصاره آویشن بنام «تیمول» براي درمان آسم کاربرد دارد. بر اساس مطالعات انجام شده گیاه آویشن دارای خواص ضد باکتریایي بوده، بطوریکه استفاده از روغن آن در محیط کشت اثر باکتریسیدال (bactericidal) بیشتر را نسبت به آمپي‌سیلین علیه باکتری‌های اشریشیا کلي(*E.coli*) و استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) نشان داده است (Rasooli&Rezvani,2001). بر اساس نتایج مطالعات صورت گرفته عصاره و اسانس گیاه آویشن می‌تواند تاثیرات ضد باکتریایی بر روی باکتری های بیماری زای دام، طیور و آبزیان داشته باشد. بطوریکه براساس نتایج حاصل از بررسي رحیمی پردنجانی و همکاران (۱۳۹۴) اسانس آویشن دنائی بر روي باکتري‌هاي *Lactococcus garvieae, Yersinia ruckeri* جداسازی شده از ماهی قزل آلا و باکتری *Aeromonas hydrophila* جداسازی شده از ماهی کپور موثر می باشد.

تحقیقات متعددی در خصوص تأثیرات اسانس و عصاره گیاه آویشن شیرازی در آبزیان در کشور صورت گرفته است. شریف روحاني در سال۱۳۸۳، در بررسي كاربرد اسانس‌هاي گياهي در كنترل آلودگي‌هاي قارچي تخم قزل‌آلا تاثیر اسانس گیاه آویشن شیرازی در کنترل آلودگی‌های قارچی تخم‌های ماهی قزل‌آلا مورد بررسي قرار داد. از دیگر مطالعات انجام شده در خصوص تاثیر فرآورده های گیاه آویشن در آبزیان بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی آویشن بر روی باکتری های علیه استرپتوکوکوس اینیایی، یرسینیا راکری و آئروموناس هیدروفیلا ماهی توسط علیشاهی و همکاران (۱۳۸۹) بود که بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه عصاره آویشن دارای اثرات ضد باکتریایی بر آئروموناس هیدروفیلا می باشد. همچنین بر اساس نتایج سلطانی و همکاران (۱۳۸۸) اگر چه استفاده از اسانس آویشن شیرازی ,به میزان ۷۰ میلی‌گرم در لیتر موجب بقای تخم و افزایش درصد تفریخ و بازماندگی لاروهای ماهی قزل آلا تا وزن یک گرمی می‌گردد اما میزان بقای تخم و افزایش درصد تفریخ و بازماندگی لاروها بسیار کمتر از تاثیر آب اکسیژنه و مالاشیت گرین می‌باشد. نتایج مطالعه Sharif Rohani و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد استفاده از مقادیر مختلف اسانس آویشن شیرازی بصورت خوراکی بر روی برخی از فراسنجه‌هاي خونی و سرمی تاسماهی ایرانی تاثیرگذار می‌باشد. همچنین بر اساس نتایج مطالعه معصوم زاده همکاران (۱۳۹۴) عصاره آویشن شیرازي در جلوگیری از رشد و نابودی باکتري آئروموناس هیدروفیلا در بچه تاسماهی ایرانی موثر می‌باشد.

کاربرد وسیع نانوذرات در عرصه‌های مختلف موجب توجه ویژه به این مواد گردیده است. نانو ذرات معمولاً دارای قطر۱۰۰-۱ نانومتر می‌باشند. نانوذره نقره به دلایل مختلفی کاربرد فراوانی دارند که مهمترین این دلایل، ویژگی ضدمیکروبی این نانوذره می‌باشد (Baker et al., 2005; Li et al., 2011; Nowack et al., 2011). اثرات ضدباکتریایی نانوذرات نقره توسط بسیاری ازمحققان مورد بررسی قرار گرفت وتاثیرات آنها برعلیه طیف گسترده‌ای از میکروب‌ها از جمله باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک ها به اثبات رسیده است (Nanda and Saravanan.,2009). نانوذرات نقره با عناصرساختمانی از غشای سلولی باکتری‌ها واکنش می‌دهند و منجر به آسیب سلولی می‌شوند.

اگرچه اثرات ضدمیکروبی نقره از گذشته شناخته شده است اما با ساخته شدن ذرات نقره به صورت نانوذرات سطح تماس آنها بیشتر شده و خاصیت ضد میکروبی آنها به بیش از ۹۹ درصد افزایش می‌یابد (Mühling et al., 2009). نتایج بسیاری از مطالعات نشان می‌دهد برخلاف آنتی بیوتیک های رایج که معمولاً فقط روی باکتری‌ها اثر کشندگی و مهاری دارند، نانوذرات نقره علاوه بر باکتری‌ها اثرات کشندگی بر روی قارچ‌ها، پروتوزئواها و حتی ویروس‌ها نیز دارند. در صنعت شیلات و آبزی پروری نیز، نانوذرات نقره کاربردهای گوناگونی یافته‌اند که از آن جمله می‌توان به ساخت نانو فیلترهای مختلف با استفاده از سطوح پوشش داده شده با نانوذرات نقره جهت استفاده در حوضچه‌های نگهداری ماهیان اشاره نمود (قهرمانی و همکاران، ۱۳۹۱) .

۱-۴- اهداف تحقیق

این تحقیق به منظور دستیابی به اهداف ذیل صورت پذیرفت :

۱- تعیین مؤثرترین غلظت عصاره آویشن شیرازی و نانوکلوئید نقره در درمان آئرمونازیس تجربی بچه تاسماهی ازون برون

۲- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد باکتری (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) عصاره آویشن شیرازی و کلوئید نقره به روش آزمایشگاهیin vitro

۳- بررسي تأثيرات خون شناسی و آسیب شناسی عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره در بچه ماهیان ازون‌برون

۲- مواد و روش کار

۲-۱- مواد مورد استفاده

۲-۱-۱- مواد مصرفی

مواد مصرفي در اين پروژه عبارتند از:

۴۸۰ عدد بچه ازون‌برون ۵ تا ۱۰گرم، عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی، نانوذره نقره کلوئیدی، لام، لامل، تیغ اسکالپل، پنبه، فرمالین، پارافین، بوئن، گزیلل، هماتوکسیلین، ائوزین، ۱- بوتانول، اتانول ، اسیداستیک، اسید پیکریک، پارچه تنظیف، سرم فیزیولوژی، هپارین، محلول رنگ آمیزی سلول‌های خونی گیمسا، محیط کشت Tryptic Soy Broth (TSB)، محیط کشت Tryptic Soy Agar (TSA)، محیط کشتMueller Hinton Agar، محیط کشتMueller Hinton Broth ، باکتری آئروموناس هیدروفیلا، اتانول، پلیت استریل، دستکش ، آب مقطر، سرسمپلر، سرنگ

۲-۱-۲-مواد غیر مصرفی

وسایل و تجهیزات بکار رفته در این پروژه عبارتند از:

ترازوي ديجيتال با دقت ۰/۰۱گرم، میکروسکوپ نیکون 50i، لوپ آزمايشگاهي، وان نیم تنی، وان دو تنی، اکسیژن متر دیجیتال ، pH متر دیجیتال ، ترمومتر دیجیتال، سطل پلاستيكي، سمپلر، بشر مدرج، استوانه مدرج، پوآر، پیپت مدرج، ظروف نمونه برداری، ساعت آزمایشگاهی، هود استریل لامینار(Laminar Hood)،دستگاه انکوباتور Memert ، فور(آون)، انکوباتور یخچال دار، بشر، هیتر ، بالن، بالن حجمی یا بالن ژوژه (Volumetric flask) ، بن ماری (water bath) ، تشتک های پلاستیکی، آکواریوم و متعلقات مربوطه، ساچوك، ظروف پتري

۲-۲- تهیه نمونه عصاره آویشن شیرازی بمنظور بررسی کیفیت :

با توجه به نتایج بررسی‌ها و نیز نظر به دارا بودن استانداردهای بین المللیISO 9001 ،ISO 22000 و ISO 14001(سازمان جهاني كيفيت) توسط شرکت کشت و صنعت و فرآوری گیاهان دارویی سها جیسا، نسبت به تهیه عصاره گیاه آویشن شیرازی از شرکت مذکور اقدام گردید.

۲-۲-۱- روش عصاره گیری و آزمایش‌های کمی و کیفی عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی:

عصاره گیری از گیاه آویشن شیرازی مورد استفاده در این مطالعه در شرکت فرآوری گیاهان دارویی سها جیسا بشرح ذیل صورت پذیرفت:

۲-۲-۱-۱- روش عصاره گیری

عصاره‌گیری به روش پرکولاسیون(percolation)، با استفاده از اتانول ۵۵ درجه و در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد انجام گرفت. نسبت گیاه به حلال ۷ : ۱ تا ۱۰ : ۱ متغیر بوده که در این حالت از نسبت ۹ :۱ استفاده شد. عصاره‌گیری به مدت ۴ تا ۵ ساعت انجام گرفت و پس از خاتمه عصاره‌گیری و فیلتراسیون (Filtration)، عصاره حاصله پاستوریزه گردید.

۲-۲-۱-۲- روش و نتیجه آزمایش‌های کنترل کیفی

- **آماده سازی محلول نمونه:** ۲۰ میکرولیتر از عصاره، مستقیماً بر روی پلیت لکه گذاری گردید.

- **آماده سازی استاندارد:** استاندارد تیمول با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد (حجم مورد استفاده برای لکه گذاری ۲۰ میکرولیتر می‌باشد).

مشخصات TLC : TLC plastic sheets silica gel 60 F254

فاز متحرک : Ethyl acetate : Toluene (7: 93)

تهیه معرف وانیلین :

۱- وانیلین یک درصد اتانولی

۲- اسید سولفوریک ۵ درصد اتانولی

معرف فوق به دو صورت استفاده می‌شود، یا ابتدا محلول شماره یک اسپری می‌شود که پس از خشک شدن محلول شماره دو اسپری می‌گردد یا اینکه محلول یک و دو ابتدا مخلوط شده و سپس بر روی صفحه اسپری می‌گردد. نکته قابل توجه در این فرایند این است که معرف باید بصورت تازه مصرف گردد و آب نیز نداشته باشد.

روش کار:

پلیت را داخل تانک اشباع قرار داده پس از پیشروی حلال به اندازه مناسب، پلیت را خشک نموده، در حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد یا در جریان هوای گرم، معرف وانیلین بر روی آن اسپری می‌شود. پس از این فرآیند، مطابقت بین لکه ها در ناحیه مرئی قابل ملاحظه می‌باشد.

جدول ۱- آنالیز عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی تولید شده

SOHA JISSA Co. Plentation Industries & Processing of Medicinal Plants			
Doc.No.F.0439	**Certificate of Analysis: *Zataria multiflora***		**Batch No.025**
Test	**Method**	**Standard**	**Result**
Color	Organoleptic	Ligth brown-Dark brown	Brown
Odor	Organoleptic	Natural odor	Natural odor
Dry residue (100-105°c/2h)	BP2009	1.5% - 4%	2.95%
Density	BP2009	0.96 – 0.99	0.97
pH	BP2009	4.5 – 6.5	5.34

SOHA JISSA Co. Plentation Industries & Processing of Medicinal Plants			
Doc.No.F.0439	**Certificate of Analysis: *Zataria multiflora***		**Batch No.025**
Test	**Method**	**Standard**	**Result**
Alcohol contents	In house	10% - 20%	19%
Identification	TLC	Conform	Conform
Assay (Total phenolic as thymol)	DAB10	85 – 120 mg/100cc	111.1 mg/100cc
Total bacterial count	USP32	Max. 10^2 per ml	Max. 10^2 per ml
Total mould and yeasts	USP32	0	0
Staphylococcus aureus	USP32	Absent	Absent
Pseudomonas aeroginosa	USP32	Absent	Absent
Salmonella	USP32	Absent	Absent
E. coli	USP32	Absent	Absent

۲-۳- تهیه نانوذره نقره کلوئیدی و آزمایش‌های کیفی آن

با توجه به تولید نانوذره نقره کلوئیدی توسط شرکت‌های مختلف و از آنجا که در بسیاری از مطالعات انجام شده از محصول نانوذره کلوئیدی شرکت نانوپارس نصب (تهران-ایران) با نام تجاری نانوسید و با غلظت ۴۰۰۰ppm استفاده شده بود در این تحقیق نیز از محلول نانوذره نقره کلوئیدی مذکور جهت انجام مطالعات مورد نظر استفاده گردید.

۲-۳-۱- نتیجه آزمایش‌های کنترل کیفی

بر اساس اعلام شرکت نانوپارس نصب (تولید کننده نانوکلوئید نقره مورد استفاده در این مطالعه) ذرات نقره موجود که بوسیله دستگاه زتاسایزر تعیین گردیده بود بین ۳/۹-۱۶۳/۵ نانومتر و متوسط قطر آنها ۵۴/۸ نانومتر درصد می باشد. همچنین با ر سطحي نانو ذرات نقره موجود در کلوئید نانو ذرات نقره به طور میانگین ۰/۱۳± ۱/۰۳ میلی‌ولت گزارش گردید.

شکل ۱- دستگاه زتاسایزر برای آنالیز اندازه ذرات نانو

۲-۴- تهیه باکتری آئروموناس هیدروفیلا کددار

با توجه به ضرورت استفاده از باکتری آئروموناس هیدروفیلا کددار (تایید شده توسط آزمایش‌های بیوشیمیایی و مولکولی) علاوه بر باکتری کددار شناسایی شده در انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، نسبت به تهیه باکتری کددار از بانک میکروبی مرکز ذخایر زیستی کشور با کد IBRC-M10814 اقدام و نسبت به تکثیر باکتری مذکور اقدام گردید.

۲-۴-۱- تکثیر باکتری آئروموناس هیدروفیلا کددار

به منظور استفاده از باکتری آئروموناس هیدروفیلا کددار تهیه شده در مطالعات مورد نظر نسبت به کشت باکتری مذکور بر روی محیط عمومی TSA در شرایط استریل اقدام و سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه و پس از رشد باکتری آئروموناس هیدروفیلا نسبت به انتقال پلیت‌های محتوی باکتری مذکور به یخچال با دمای ۴ درجه سانتیگراد جهت استفاده در آزمایش‌های مورد نظر در این تحقیق اقدام گردید.

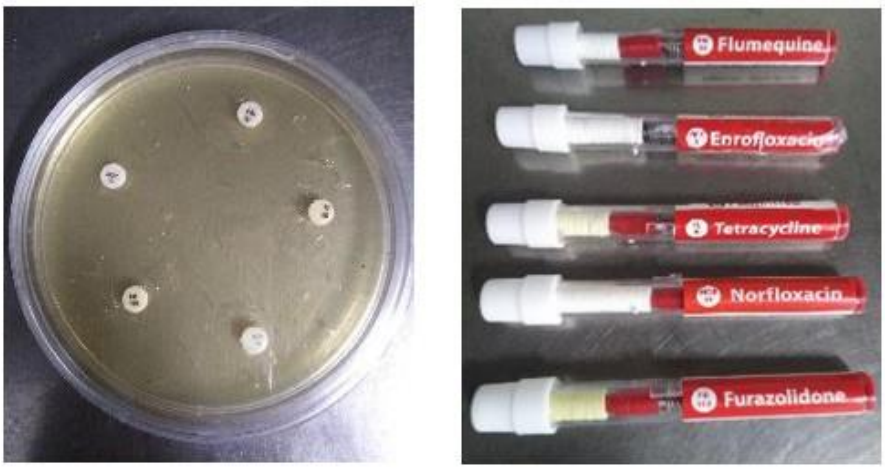
شکل ۲- تکثیر باکتری آئروموناس هیدروفیلای کددار

۲-۵- تعیین آنتی‌بیوتیک مؤثر بر باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا

به منظور تعیین آنتی‌بیوتیک مؤثر بر باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا نسبت به انجام آزمون آنتی‌بیوگرام اقدام گردید.

جهت انجام این آزمون سواپ یا آنس استریل را در سوسپانسیون باکتری آئرومونوناس هیدروفیلا با غلظت ۰/۵ مك فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$cfu/ml) وارد نموده و در سطح پلیت حاوی محیط کشت تریپتیک سوی آگار (TSA) باکتری مورد بررسی را کشت داده و سپس با استفاده از پنس استریل دیسک هایی حاوی آنتی بیوتیک‌های مختلف را که از یک ساعت قبل از انجام آزمون آنتی بیوگرام از فریزر بیرون آورده شده بود در سطح محیط کشت قرار داده و با نوک پنس

هر کدام از دیسک ها را در جای خود محکم نموده و پلیت‌های مذکور را به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده پس از طی مدت زمان مذکور با استفاده از خط‌کش دقیق قطر هاله عدم رشد را بر حسب میلیمتر اندازه گرفته و با استفاده از جدول میزان حساسیت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک به صورت حساس، نیمه حساس و مقاوم گزارش گردید.



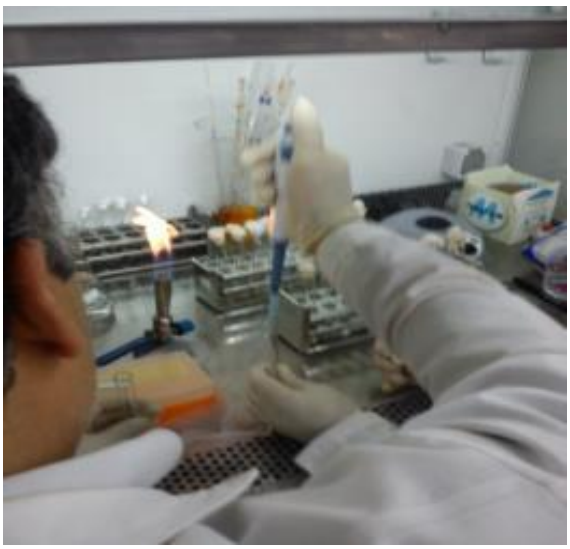
شکل ۳- انجام آزمون و دیسک‌های آنتی‌بیوگرام

۲- ۶- تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد (MIC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره آویشن شیرازی و نانوکلوئید نقره

به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد باکتری آئروموناس هیدروفیلا (MIC) توسط عصاره آویشن شیرازی و نانوکلوئید نقره از روش رقت لوله‌ای(Vanden et al., 1991; Sindambiwe et al., 1999) استفاده گردید. در این روش برای تعیین MIC عصاره آویشن شیرازی و نانوکلوئید نقره برای هرکدام بصورت جداگانه یک سری
۱۰ تایی از لوله‌های آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. ۸ لوله برای آزمایش رقت‌های مختلف و یک لوله به عنوان کنترل مثبت و یک لوله نیز به عنوان کنترل منفی بکار رفت. ابتدا باکتری آئروموناس هیدروفیلا که در محیطTryptic Soy Broth (TSB) کشت داده شده بود در شرایط استریل به محیط کشت مولر هینتون براث (Mueller Hinton Broth) در لوله‌های آزمایش اضافه و میزان کدورت حاصل از باکتری با استاندارد ۰/۵ مك فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$cfu/ml) تنظیم گردید. سپس به لوله‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون براث (Mueller Hinton Broth) همراه با باکتری آئروموناس هیدروفیلا عصاره‌آویشن شیرازی و محلول نانوکلوئید نقره با غلظت های ۰/۰۳۲، ۰/۰۶۳، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (علیشاهی و همکاران، ۱۳۸۹) اضافه نموده و لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه نگهداری و بعد از سپري شدن زمان مذکور کدورت آنها بررسي وغلظت آخرين لوله‌اي‌که در مقايسه با شاهد شفاف بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

۲-۷-تعیین حداقل غلظت کشندگی(MBC) باکتری‌آئروموناس‌هیدروفیلا عصاره آویشن‌شیرازی و نانوکلوئیدنقره

برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره آویشن شیرازی و نانوکلوئید نقره که در محیط مولر هینتون آگار (Mueller Hinton Agar) مورد بررسی قرار می‌گیرد از محتویات آن دسته از غلظت‌هایی که در محیط کشت مولر هینتون براث (Mueller Hinton Broth) در آزمایش تعیینMIC فاقد کدورت بودند، به میزان ۱ میلی لیتر برداشته و در محیط کشت مولر هینتون آگار(Mueller Hinton Agar) به روش خطی کشت داده شد سپس پلیت ها در درون انکوباتور در ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری و کمترین غلظتي از عصاره آویشن شیرازی و نانوکلوئید نقره که باکتری در آن رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت‌کشندگی (MBC) در نظر گرفته شد.



شکل ۴- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره آویش شیرازی و نانوکلوئید نقره

شکل ۵- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MBC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره آویش شیرازی و نانوکلوئید نقره

۲-۸- اجرای آزمایش‌های تعیین غلظت‌های کشنده عصاره آویشن شیرازی و نانوکلوئید نقره

بمنظور انجام آزمایش‌های تعیین غلظت‌های کشنده عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی و محلول نانو کلوئید نقره ، بعد از طی مراحل سازگاري، بچه ماهیان ازون برون به تشتک‌های ۴۰ لیتری مجهز به سیستم هوادهی منتقل شدند.

این آزمایش‌های بر اساس O.E.C.D (TRC,1984)[1] صورت گرفت. در این روش(O.E.C.D) آزمایش‌های بصورت استاتیک

1-Organization Economic Cooperation Development

(ثابت) انجام می‌گردد. بدین صورت که محلول آزمایش در فرآیند آزمون تغییر نکرده و میزان مرگ و میر ماهی برای آزمایش‌های تعیین غلظت‌های کشنده طی ۹۶ ساعت ثبت می‌گردد. با توجه به عدم وجود منابع اطلاعاتی در خصوص تعیین محدوده دامنه دوزهای قابل استفاده در آزمایش‌های LC_{50} عصاره هیدروالکلی آویشن‌شیرازی و محلول محلول نانو کلوئید نقره در بچه ماهیان ازون برون، نیاز به انجام آزمایش مقدماتی تعیین دامنه‌ای از غلظت‌های مناسب ($Pre\text{-}LC_{50}$) بود که این کار طی دو مرحله و در هر مرحله با ۵ تیمار (هر تیمار با ۳ تکرار) که به روش لگاریتمی تعیین گردیده بودند اجرا گردید. در نهایت پس از تعیین دامنه غلظت‌های مناسب، آزمایش اصلی LC_{50} با انتخاب ۵ تیمار (هر تیمار با ۳ تکرار) برای هریک از عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی و محلول نانو کلوئید نقره به اجرا درآمد و میزان تلفات در طی ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت به منظور تعیین غلظت‌هاي کشنده LC_{90} , LC_{50} , LC_{10} ثبت و نسبت به تعیین عدد پروبیت (Probit Value) تلفات از جدول مخصوص (ANOVA) و نیز تعیین لگاریتم غلظت‌هاي بکار رفته اقدام و با بدست آوردن ضرایب a (عدد ثابت) و b (شیب خط) معادله رگرسیون ($y = a + bx$) تشکیل و براي حل معادله عدد پروبیت مشخص شده به جاي y در معادله قرار گرفت و با حل معادله ($Probit\ Value = a + b\ (LogC)$) و گرفتن Anti Log ازLogC در معادله، غلظت‌هاي کشنده LC_{90} , LC_{50} , LC_{10} تعیین و نتایج حاصل به روش Probit analysis (Finney, 1971) مورد تجزیه و تحلیل آماري قرار گرفت.

۲-۹- ایجاد آلودگی تجربی (Challenge) بچه ماهیان ازون برون به باکتری آئروموناس هیدروفیلا

به منظور ایجاد آلودگی تجربی به باکتری آئروموناس هیدروفیلا در ماهیان گروه‌های شاهد و تیمار پس از تهیه کشت باکتری مذکور در محیط کشت TSB نسبت به تهیه غلظت 10^9 cfu/ml با استاندارد ۰/۵ مک فارلند اقدام گردید.

برای رسیدن به این غلظت و مقایسه آن با استاندارد مک فارلند، باکتری سانتریفیوژ شده را با سمپلر برداشته و به لوله آزمایش حاوی سرم فیزیولوژی اضافه و با دستگاه هم زن آنها را یکنواخت نموده و این کار تا زمانی که کدورت با استاندارد مک فارلند برابر شود ادامه پیدا کرد. غلظت تهیه شده از باکتری آئروموناس هیدروفیلا به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر به محوطه صفاقی ماهیان گروهای تیمار و شاهد تزریق (Omima A.E. Aboud ,2010) و ماهیان مذکور به وان‌های پلاستیکی ۵۰ لیتری منتقل گردیدند که آب خروجی از آنها در وان فایبرگلاس با حجم ۲۰۰۰ لیتر تخلیه و پس از ضدعفونی با استفاده از مواد ضدعفونی کننده وسیع الطیف و اطمینان از نابودی باکتری آئروموناس هیدروفیلا تزریق شده به بچه ماهیان ازون برون به سیستم فاضلاب رهاسازی می گردید. ماهیان آلوده شده توسط باکتری مورد بررسی در این مطالعه تا ۷۲ ساعت از نظر تلفات و نیز علائم بیماري آئروموني‌ازیس شامل بي‌حالي، خونریزی زیرجلدی در اطراف پلاک‌های استخوانی و انتهای باله ها خصوصا باله دمی، تیرگي پوست و .... مورد بررسي قرار گرفتند.

۲-۱۰- تیمار ماهیان آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا با عصاره آویشن شیرازی، محلول نانوکلوئید نقره و آنتی بیوتیک انروفلوکساسین

با توجه به اینکه در مطالعات تعیین مقادیر ترکیبات مورد بررسی در درمان بیماری های ماهیان از یک دهم غلظت نیمه کشندگی (LC_{50}) در طی ۹۶ ساعت به عنوان دوز درمانی مبنا استفاده می گردد و سایر مقادیر مورد بررسی در تیمار ماهیان تحت درمان، بصورت لگاریتمی از دوز درمانی مبنا جهت تعیین محدوده درمانی در نظر گرفته می شود لذا در این مطالعه نیز از نتایج تعیین غلظت نیمه‌کشندگی (LC_{50}) نانوکلوئید نقره با نام تجاری نانوسید در طی۹۶ ساعت جهت تعیین مقادیر نانوکلوئید نقره در تیمار ماهیان آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا از غلظت‌های ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، و۱ میلی‌گرم در لیتر به صورت حمام درمانی یک ساعته و به مدت ۱۰ روز متوالی استفاده شد.

همچنین جهت تیمار ماهیان مذکور با عصاره آویشن شیرازی (بر اساس نتایج آزمایش‌های LC_{50} و نتایج مطالعه معصوم زاده و همکاران در سال ۱۳۹۴) به ترتیب از غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم عصاره مذکور در هر لیتر آب بصورت حمام درمانی یک ساعته و غلظت ۱۰۰ میلی گرم از عصاره مذکور به ازای هر کیلوگرم وزن ماهیان بصورت خوراکی همراه با غذا به مدت ۱۰ روز و روزانه در سه نوبت خورانده شد (یک دهم مقدار عصاره آویشن شیرازی تعیین شده جهت تیمار ماهیان مبتلا به آئروموناز‌یس به روش حمام درمانی) استفاده گردید. در این مطالعه به منظور مقایسه تأثیرات نانوکلوئید نقره و عصاره آویشن شیرازی با مؤثرترین آنتی بیوتیک انتخابی در درمان آئروموناز‌یس (بر اساس نتایج حاصل از آنتی بیوگرام) ازآنتی بیوتیک انروفلوکساسین به مقدار ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن ماهیان تحت درمان بصورت خوراکی همراه با غذا به مدت ۱۰ روز (بر اساس توصیه شرکت رویان تولید کننده آنتی بیوتیک انروفلوکساسین مورد استفاده در این مطالعه) در یکی از گروه های تیمار استفاده گردید.

در مجموع در این مطالعه بر اساس جدول شماره ۲ هفت گروه تیمار، یک گروه شاهد مثبت (آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا و بدون انجام تیمار درمانی ماهیان آلوده) و یک گروه شاهد منفی (بدون تزریق باکتری آئروموناس هیدروفیلا و بدون انجام تیمار درمانی) جهت بررسی و مقایسه تاثیر عصاره آویشن شیرازی، محلول نانوکلوئید نقره و آنتی بیوتیک انروفلوکساسین بر روی بچه ماهیان ازون برون مبتلا به آئروموناز‌یس تعیین گردید.

شکل ۶- نگهداری بچه ماهیان تیمارهای مختلف در وان های ۵۰ لیتری

جدول۲- گروه های تیمار ماهیان آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا

نوع تیمار	شماره تیمار	غلظت مورد استفاده جهت تیمار
نانو کلوئید نقره (حمام درمانی)	۱	۰/۴ ppm
	۲	۰/۶ ppm
	۳	۰/۸ ppm
	۴	۱ppm
عصاره آویشن شیرازی (حمام درمانی)	۵	۱۰۰۰ppm
عصاره آویشن شیرازی (خوراکی)	۶	۱۰۰ mg/bwfish
آنتی بیوتیک انروفلوکساسین (خوراکی)	۷	۱۰ mg/bwfish
شاهد منفی	۸	-
شاهد مثبت	۹	-

۲-۱۱-بررسی تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره بر برخی از شاخص های خونی

جهت بررسي تاثير مقادير مختلف عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی و نانوکلوئید نقره بر برخی از شاخص های خونی ماهیان ازون برون تیمار شده با ترکیبات مذکور، نسبت به خونگيري از نزديک باله مخرجی ۳۰ درصد نمونه‌ها (۳ قطعه ماهي از هر تکرار) اقدام و خون بدست آمده بلافاصله وارد لوله‌های حاوي ماده ضد انعقاد هپارین گرديد. پس از تهيه نمونه‌هاي خون از ماهيان مورد بررسي، اندازه‌گيري شاخص‌هاي خوني (CBC) به روش استاندارد به شرح ذيل انجام گرديد:

۲-۱۱-۱- شمارش افتراقي گلبول های سفید [1]

براي شمارش افتراقی گلبول‌های سفید يا لکوسيت‌ها در هر ميلي‌متر مکعب خون لايه مناسبي از ياخته‌های خونی روی اسلايدهای ميکروسکوپی به روش دولامی (يک لام به عنوان گسترش دهنده و لام ديگر که قطره خون روی آن قرار می

[1] Differential leucocyte count (leucogramme)

گرفت به نام لام گسترش) تهیه گردید. برای این منظور دو سر لام گسترش را بین دو انگشت قرار داده سپس یک قطره خون روی لام قرار می‌گیرد و با دست دیگر لام گسترش دهنده با زاویه ۴۵ درجه قطره خون را به عقب‌کشیده و وقتی خون به لبه رسید لام گسترش دهنده به جلو رانده شده وگسترشی یکنواخت و پیوسته‌ای به وجود می‌آید.

در ادامه جهت جلوگیری از تغییر شکل یاخته‌ها و تأثیر منفی میکروارگانیسم‌ها پس از خشک شدن اسمیرها، بلافاصله اقدام به تثبیت آنها به وسیله متانول نموده و در نهایت با استفاده از محلول رقیق۱۰ درصد گیمسا (گیمسا به آب مقطر ۹ به ۱) لام‌ها به مدت۳۰ تا۶۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند و پس از خشک شدن در هواي آزاد مورد مطالعه میکروسکوپي قرار گرفته(Klontz, G.W.,1994) و درصد فراواني هر گروه از لوکوسیت‌ها (نوتروفیل، ائوزینوفیل، لنفوسیت و مونوسیت) براي هر نمونه تعیین گردید.

۲-۱۱-۲- تعیین غلظت هماتوکریت(HCT)

به منظور اندازه‌گیري مقادیر هماتوکریت پس از پر کردن لوله‌هاي موئینه هپارینه از نمونه‌هاي خون تهیه شده از ماهیان مورد بررسي و بستن آن با خمیر مخصوص نسبت به سانتریفیوژ آنها با سرعت حداقل ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه با استفاده از سانتریفیوژ میکروهماتوکریت اقدام و مقدار حجم سلولي یا هماتوکریت (HCT) هر نمونه محاسبه گردید.

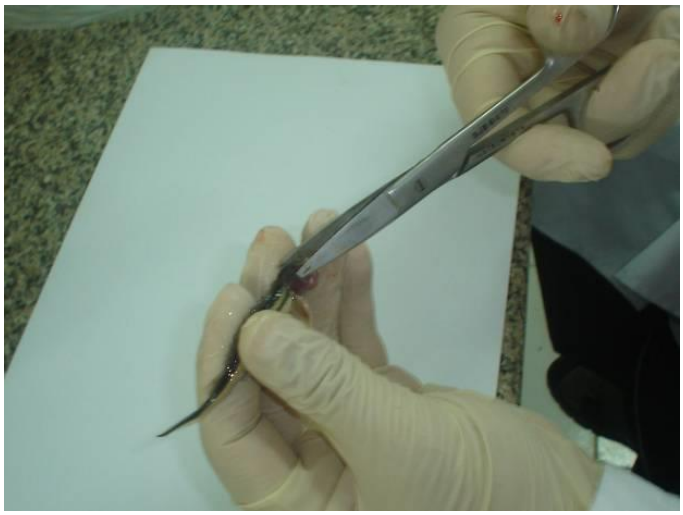
۲-۱۱-۳- تعیین غلظت هموگلوبین (Hb)

مقدار هموگلوبین هر نمونه خون به روش سیانومت هموگلوبین (با استفاده از کیت مخصوص و به روش کلرومتریك) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل JENWAY 6505 UV/Vis اندازه‌گیری گردید در این روش مقدار جذب نور ثبت و غلظت هموگلوبین بر حسب گرم در دسي‌لیتر محاسبه می‌گردد.

شکل ۷- تهیه نمونه خون از بچه ماهیان تیمارهای مختلف

۲-۱۲- بررسی آسیب های بافتی ایجاد شده توسط عصاره آویشن شیرازی و نانوکلوئید نقره

به منظور بررسی آسیب‌های بافتی ایجاد شده در ماهیان ازون‌برون تیمار شده با عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی و نانوکلوئید نقره به روش حمام یک ساعته، از هر تکرار ۳ عدد ماهی انتخاب و نسبت به تهیه نمونه هایی به ابعاد ۱×۱ سانتي‌مترمربع از آبشش وکبد اقدام گردید. نمونه‌های تهیه شده سپس به داخل ظروف محتوي ۴۰ میلی‌لیتر فرمالین ۱۰% منتقل و پس از مدت ۲۴ ساعت فرمالین نمونه‌ها تعویض گردید. نمونه‌هاي تثبیت شده در فرمالین با استفاده از دستگاه اتوماتيك عمل‌آوري بافت (Tisssue processor) آب‌گيري، شفاف‌سازي و پارافینه شده و با استفاده از دستگاه میکروتوم مقاطع میکروسکوپي به ضخامت ۵ میکرون از آنها تهیه و سپس نسبت به رنگ‌آمیزی مقاطع میکروسکوپي تهیه شده به روش هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) اقدام و مطالعه لام‌های تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ نوري صورت پذیرفت .



شکل۸ - نمونه برداری از آبشش

شکل ۹- برش بافت با استفاده از میکروتوم

شکل ۱۰- رنگ آمیزی اسلایدهای بافت آبشش

۲-۱۳- جمع آوري داده‌ها و تجزیه و تحلیل آماري

پس از جمع‌آوري داده‌ها، بمنظور تجزیه و تحلیل آماري و مقایسه بین نتایج تیمارهای مختلف از آزمون واریانس یکطرفه One-WayANOVA و آزمون دانکن Duncan وآزمون ضریب همبستگي پیرسون در سطح اطمینان ۹۵% استفاده شد. تمامی سنجش های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ و برای رسم نمودارها از نرم افزار Microsoft Office Excel2016 استفاده شد. به منظور انجام محاسبات LC_{50} نیز از روش Probit analysis (Finney, 1971) استفاده شد.

۳- نتایج

۳-۱- تعیین آنتی‌بیوتیک موثر بر باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا

نتایج حاصل از آزمون آنتی‌بیوگرام انجام شده بر اساس تشکیل هاله عدم رشد باکتری در اطراف دیسک های حاوی آنتی بیوتیک های مختلف در این مطالعه نشان داد که بیشترین قطر هاله عدم رشد باکتری آئروموناس هیدروفیلا مربوط به دیسک حاوی آنتی‌بیوتیک های فولوموکئین و انروفلوکساسین با ۲۲ میلی‌متر بوده و در اطراف دیسک حاوی آنتی بیوتیک فرازولیدون هیچ هاله ای تشکیل نگردید.

جدول ۳- قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری در آزمون آنتی بیوگرام

آنتی بیوتیک	مقدار آنتی‌بیوتیک استاندارد (µg)	قطر هاله (mm)
فولوموکئین	۳۰	۲۲
انروفلوکساسین	۵	۲۲
تتراسیکلین	۳۰	۲۰
نروفلوکساسین	۱۰	۱۷
فرازولیدون	۱۰۰	۰

۳-۲- تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا با عصاره آویشن شیرازی و نانوکلوئید نقره

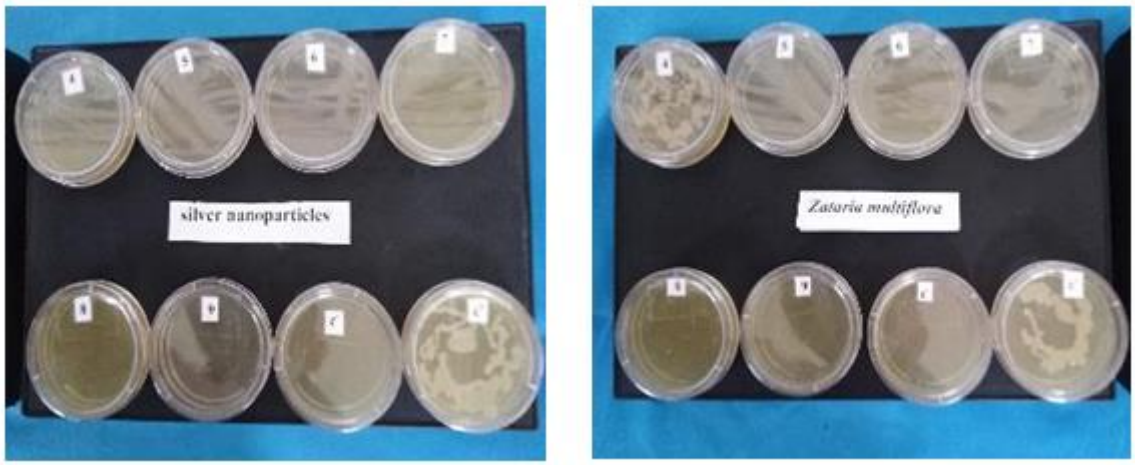
بر اساس نتایج حاصل، مقادیر حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد (MIC) باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا توسط عصاره آویشن‌شیرازی و محلول‌کلوئید نقره در محیط مولرهینتون براث (Mueller Hinton Broth) به ترتیب برابر ۰/۲۵ mg/ml و ۰/۲۵ mg/ml و مقادیر حداقل غلظت‌کشندگی(MBC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا با عصاره آویشن شیرازی و محلول‌کلوئید نقره در محیط مولر هینتون آگار (Mueller Hinton agar) به ترتیب برابر ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر تعیین گردید (جدول۴). بررسی نتایج تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا نشان می‌دهد نانوکلوئید نقره در مقایسه با عصاره آویشن شیرازی از اثر ضد باکتری قوی‌تری بر روی باکتری آئروموناس هیدروفیلا برخوردار می‌باشد (جدول ۴). با توجه به مقادیر حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا توسط آنتی بیوتیک انروفلوکساسین که در مطالعه Shan و همکاران (۲۰۱۸) بر روی محیط کشت به ترتیب برابر ۰/۲۴ و ۰/۴۸ میلی‌گرم در لیتر تعیین گردید، آنتی بیوتیک انروفلوکساسین از اثر مهارکنندگی باکتری آئروموناس هیدروفیلا قوی تری نسبت به نانوکلوئید

نقره و عصاره آویشن شیرازی برخوردار بوده در حالیکه نانوکلوئید نقره در مقایسه با آنتی بیوتیک انروفلوکساسین و عصاره آویشن شیرازی دارای اثر کشندگی قوی تری بر باکتری آئروموناس هیدروفیلا می باشد.

جدول٤ - حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا با عصاره آویشن شیرازی و نانوکلوئید نقره

شماره لوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	C^- کنترل منفی	C^+ کنترل مثبت
مقدار عصاره آویشن شیرازی و نانوکلوئید نقره در هر لوله آزمایش و پلیت mg/ml	۰/۰۳۲	۰/۰۶۳	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲	۴	۸		
رشد باکتری (عصاره آویشن شیرازی)	+	+	+	- MIC	- MBC	-	-	-	-	-	+
رشد باکتری (نانوذرات نقره)	+	+	+	- MIC MBC	-	-	-	-	-	-	+

شکل۱۱- نتایج آزمایش‌های تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا با عصاره آویشن شیرازی (سمت راست) و نانو کلوئید نقره (سمت چپ)



شکل ۱۲- نتایج آزمایش‌های تعیین حداقل غلظت کشندگی کنندگی (MBC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا با عصاره آویش شیرازی (سمت راست) و نانو کلوئید نقره (سمت چپ)

۳-۳- تعیین غلظت‌های نیمه کشنده عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره در بچه ماهیان ازون برون

۳-۳-۱- تعیین غلظت های نیمه کشنده عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی در بچه ماهیان ازون برون

بمنظور تعیین غلظت‌های کشنده عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی بر روی بچه ماهیان ازون برون با میانگین وزنی ۱/۱۴±۵/۸۲ گرم طی ۹۶ ساعت، ضمن انجام آزمایش‌هاي مربوطه، نمونه برداری‌های لازم صورت پذیرفت. در این تحقیق بر اساس آزمایش‌های ابتدایی ($pre\text{-}LC_{50}$) انجام شده بر روی بچه‌ماهیان ازون برون و براساس محاسبات لگاریتمی۷ تیمار ۵۰۰، ۵۸۳، ۶۹۴، ۸۲۸، ۹۸۶، ۱۱۷۴ و ۱۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر برای انجام آزمایش‌های نهایی تعیین غلظت‌های نیمه‌کشنده عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی انتخاب و نسبت به گروه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۵). همچنین میزان LC_{10}، LC_{50} و LC_{90} عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی طی مدت زمان ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت محاسبه گردید (جدول۶). بر این اساس میزان LC_{50} این عصاره طی مدت ۴ روز معادل ۷۶۶/۶۵ میلی‌گرم درلیتر تعیین شد. معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی (R2) حاکی از وجود ارتباط مستقیم (همبستگی قوی و مثبت) بین غلظت‌های مورد بررسی با میزان تلفات بچه ماهیان ازون برون می‌باشد (نمودارهای۱ الی ۴).

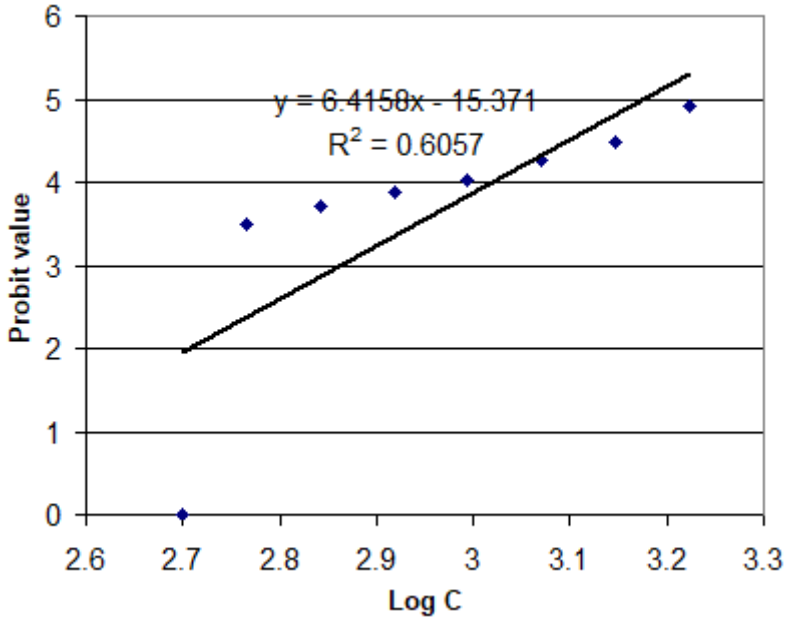
از لحاظ رفتاری علائمی از قبیل افزایش ترشح موکوس، تحریک پذیری، عدم تعادل، انقباض شدید عضلات و انحنای ستون فقرات عمدتاً در غلظت‌های زیاد مشاهده شد. نتایج حاصل نشان داد طی ۲۴ الی ۹۶ ساعت، مقادیر LC_{10}، LC_{50} و LC_{90} کاهش می‌یابد. بدین معنی که مقاومت ماهی‌ها در مدت زمان کوتاه بیشتر بوده و ماهی‌ها توانایی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

جدول ۵ ـ مقایسه اثر تیمارهای مختلف آویشن شیرازی روی مرگ و میر بچه ماهیان با میانگین وزن ۱/۱٤ ±۵/۸۲ گرم ازون برون (میانگین ۳ تکرار) طی ۹٦ ساعت

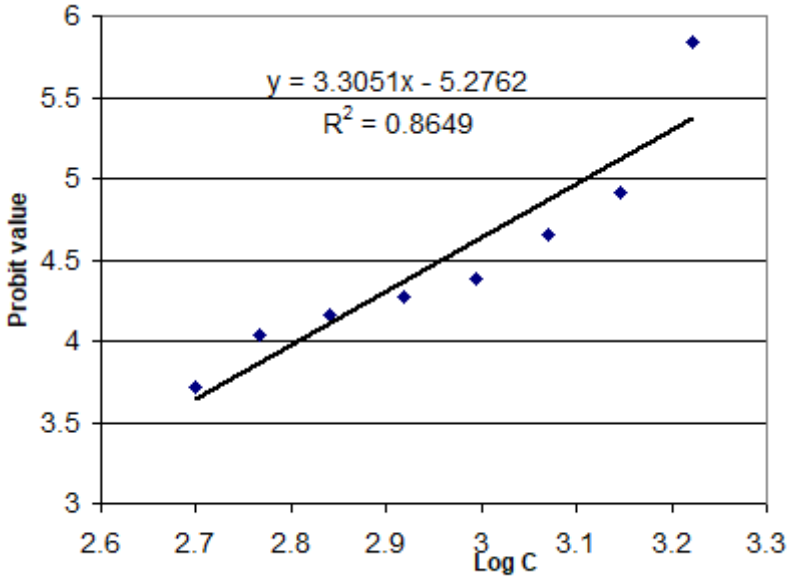
تیمار	غلظت آویشن شیرازی (ppm)	۲۴ ساعت		۴۸ ساعت		۷۲ ساعت		۹۶ ساعت		تغییرات نسبت به شاهد				لگاریتم غلظت آویشن شیرازی	Probit value			
		مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
شاهد	۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱	۵۰۰	۰	۱۰	۱	۹	۲	۸	۲/۳۳	۷/۶۷	۰	-۱۰	-۲۰	-۲۳/۳	۲/۶۹۹۰	۰	۳/۷۱۸۴	۴/۱۵۸۴	۴/۲۷۱۰
۲	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
۳	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
۴	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
۵	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
۶	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
۷	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 ٦ـ غلظت های کشنده عصاره آویشن شیرازی (میلی گرم در لیتر) طی ٤ روز در بچه ماهیان ازون برون

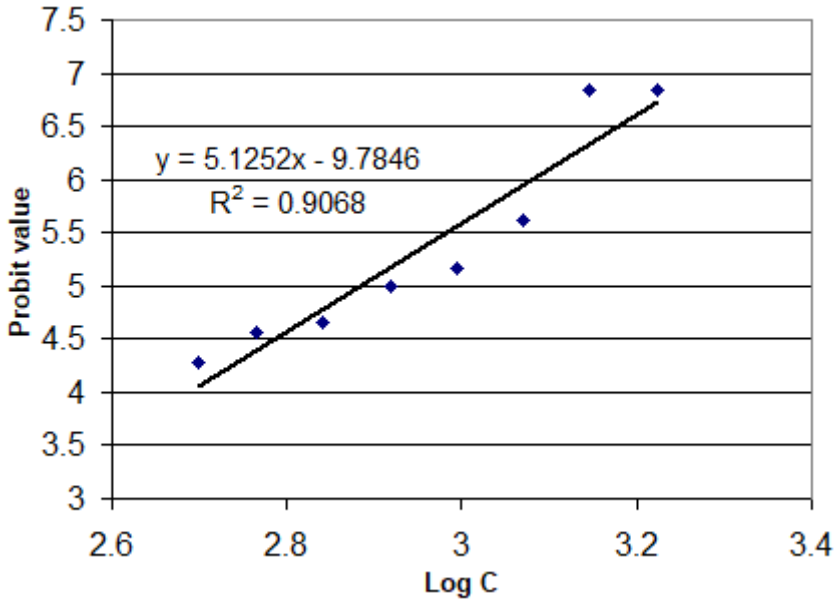
زمان / مقدار غلظت کشنده LC	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
LC_{10}	۹۴۴/۷۱	۵۲۶/۵	۴۶۶/۰۱	۴۳۱/۱۲
LC_{50}	۱۴۹۶/۶۸	۱۲۸۵/۵۸	۹۲۱/۲۹	۷۶۶/۶۵
LC_{90}	۲۳۷۰/۲۸	۲۰۳۹/۷۸	۱۸۱۹/۷	۱۳۶۳/۶۴



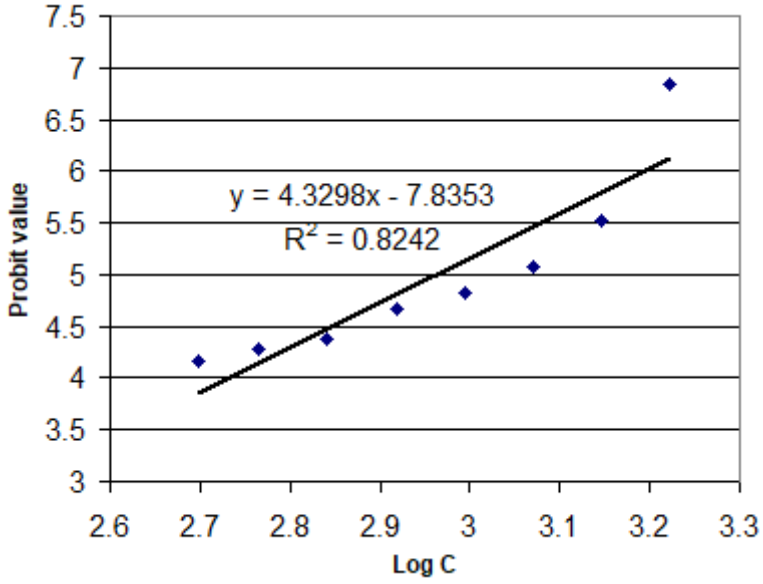
نمودار ۱:معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگي probit value با لگاریتم غلظت عصاره آویشن شیرازي بر روي بچه ماهیان ازون برون (میانگین سه تکرار در ۲۴ ساعت)



نمودار ۲: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگي probit value با لگاریتم غلظت عصاره آویشن شیرازي بر روي بچه ماهیان ازون برون (میانگین سه تکراردر ۴۸ ساعت)



نمودار ۳: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی probit value با لگاریتم غلظت عصاره آویشن شیرازی بر روی بچه ماهیان ازون برون (میانگین سه تکراردر ۷۲ ساعت)



نمودار ۴: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی probit value با لگاریتم غلظت عصاره آویشن شیرازی بر روی بچه ماهیان ازون برون (میانگین سه تکراردر ۹۶ ساعت)

۳-۳-۲- تعیین غلظت‌های نیمه‌کشنده نانوکلوئید نقره در بچه ماهیان ازون برون

بمنظور تعیین غلظت‌های کشنده نانوکلوئید نقره بر روی بچه ماهیان ازون برون با میانگین وزنی ۰/۵۱± ۴/۱۵ گرم و میانگین طولی۰/۶۵±۱۰/۱۷ سانتیمتر طی دو زمان ۹۶ ساعت و یک ساعت، ضمن انجام آزمایش‌های مربوطه،

نمونه‌برداری‌های لازم هم صورت پذیرفت. در این تحقیق بمنظور یافتن محدوده غلظت نانوکلوئید نقره آزمایش‌های ابتدایی (pre-LC_{50}) بر روی بچه ماهیان ازون برون انجام گرفت و سرانجام محدوده غلظت ۵ تا ۲۰/۵ میلی‌گرم در لیتر برای انجام آزمایش‌های نهایی تعیین گردید. بر اساس محاسبات لگاریتمی ۷ تیمار (۵، ۶/۲۳، ۷/۶۶، ۹/۴۲، ۱۱/۵۹، ۱۵ و ۲۰/۵ میلی‌گرم لیتر) در نظر گرفته شد و نسبت به گروه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۷).

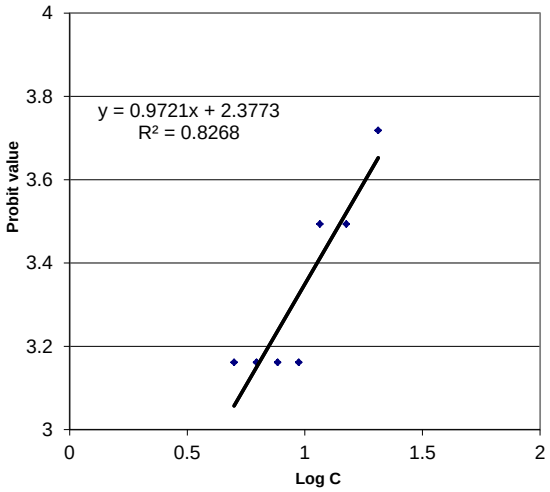
همچنین میزان LC_{10}، LC_{50} و LC_{90} نانوکلوئید نقره طی مدت زمان ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت محاسبه گردید(جدول ۸). بر این اساس، میزان LC_{50} نانو کلوئید نقره طی مدت ۴ روز معادل ۷/۶۶ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد. همچنین معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی (R2) حاکی از وجود ارتباط مستقیم (همبستگی قوی و مثبت) بین غلظت های مورد بررسی با میزان تلفات بچه تاسماهیان ایرانی می باشد (نمودارهای ۵ الی۸). از لحاظ رفتاری علائمی از قبیل تشکیل موکوس برروی پوست در غلظت های زیاد، افزایش فعالیت، گاهی انحنای ستون فقرات مشاهده شد. نتایج نشان داد که با افزایش زمان، مقادیر LC_{10}، LC_{50} و LC_{90} نانو کلوئید نقره بر روی بچه ماهیان ازون برون کاهش می‌یابد. . به عبارت دیگر یک رابطه معکوس بین زمان و علظت کشنده نانو کلوئید نقره بر روی بچه ماهی مذکور وجود دارد.

جدول ۷ ـ مقایسه اثر تیمارهای مختلف نانو کلوئید نقره روی مرگ و میر بچه ماهیان ازون برون (میانگین سه تکرار) در طی ۹۶ ساعت

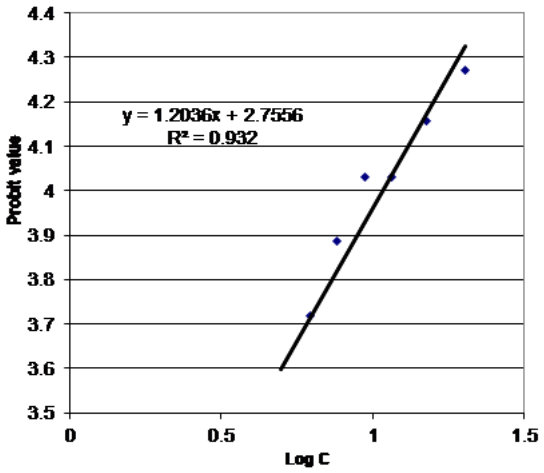
تیمار	غلظت نانو ذره نقره (ppm)	۲۴ ساعت		۴۸ ساعت		۷۲ ساعت		۹۶ ساعت		تغییرات نسبت به شاهد				لگاریتم غلظت ذرات معلق	Probit value			
		مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
شاهد	۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱	۵	۰/۳۳	۹/۶۷	۰/۶۶	۹/۳۴	۲	۸	۳	۷	-۳/۳	-۶/۶	-۲۰	-۳۰	۰/۶۹	۳/۱۶۱۶	۳/۴۹۳۷	۴/۱۵۸۴	۴/۴۷۵۶
۲	۶/۲۳	۰/۳۳	۹/۶۷	۱	۹	۲/۳۳	۷/۶۷	۳/۳۳	۶/۶۷	-۳/۳	-۱۰	-۲۳/۳	-۳۳/۳	۰/۷۹	۳/۱۶۱۶	۳/۷۱۸۴	۴/۲۷۱	۴/۵۸۴
۳	۷/۶۶	۰/۳۳	۹/۶۷	۱/۳۳	۸/۶۷	۳/۶۶	۶/۳۴	۴	۶	-۳/۳	-۱۳/۳	-۳۶/۶	-۴۰	۰/۸۸	۳/۱۶۱۶	۳/۸۸۷۷	۴/۶۵۷۵	۴/۷۴۶۷
۴	۹/۴۲	۰/۳۳	۹/۶۷	۱/۶۶	۸/۳۴	۴	۶	۵	۵	-۳/۳	-۱۶/۶	-۴۰	-۵۰	۰/۹۷	۳/۱۶۱۶	۴/۰۲۹۹	۴/۷۴۶۷	۵
۵	۱۱/۵۹	۰/۶۶	۹/۳۴	۱/۶۶	۸/۳۴	۴/۶۶	۵/۳۴	۵/۶۶	۴/۳۴	-۶/۶	-۱۶/۶	-۴۶/۶	-۵۶/۶	۱/۰۶	۳/۴۹۳۷	۴/۰۲۹۹	۴/۹۱۴۷	۵/۱۶۶۲
۶	۱۵	۰/۶۶	۹/۳۴	۲	۸	۵	۵	۶	۴	-۶/۶	-۲۰	-۵۰	-۶۰	۱/۱۷	۳/۴۹۳۷	۴/۱۵۸۴	۵	۵/۲۵۳۳
۵	۲۰/۵	۱	۹	۲/۳۳	۷/۶۷	۵/۳۳	۴/۶۷	۶/۶۶	۳/۳۴	-۱۰	-۳/۲۳	-۵۳/۳	-۶۶/۶	۱/۳۱	۳/۷۱۸۴	۴/۲۷۱	۵/۰۷۵۳	۵/۴۲۶۱

جدول ۸- تعیین غلظتهای کشنده نانو کلوئید نقره در طی ٤ روز بر روی بچه ماهیان ازون برون (میانگین سه تکرار)

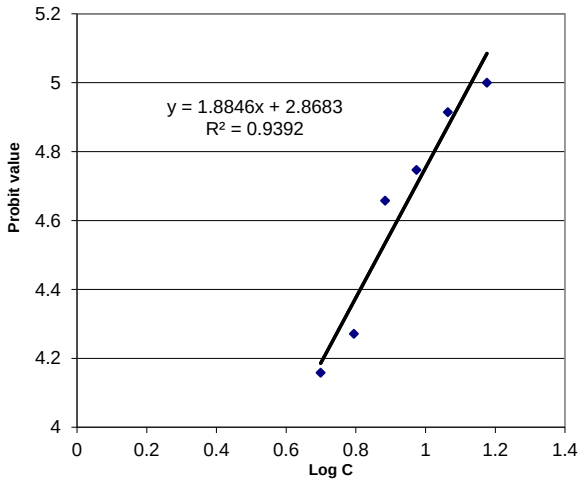
زمان / مقدار غلظت کشنده LC	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
LC10	۲۳/۹۶	۶/۳۰	۲/۸۲	۱/۹۶
LC50	۴۹۸/۸۵	۷۳/۲۳	۱۳/۵۲	۱۰/۱۱
LC90	۱۰۳۸۳/۸	۸۵۰/۲۴	۶۴/۷۳	۵۲/۲۳



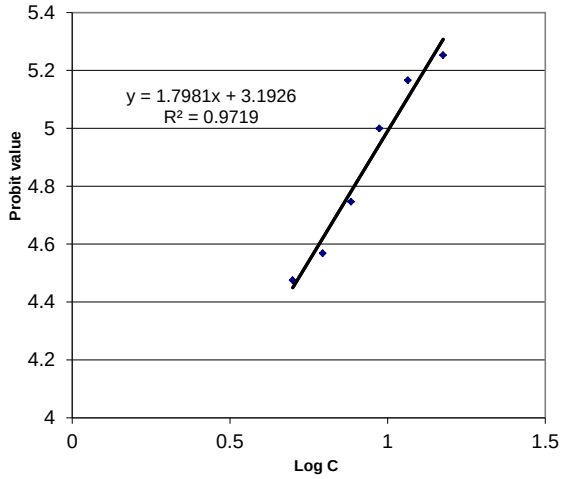
نمودار ۵: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگي probit value با لگاریتم غلظت نانوکلوئید نقره در بچه ماهیان ازون برون (میانگین سه تکرار در ۲۴ ساعت)



نمودار ۶: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگيprobit value با لگاریتم غلظت نانوکلوئید نقره در بچه ماهیان ازون برون (میانگین سه تکرار در ۴۸ ساعت)



نمودار ۷: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگیprobit value با لگاریتم غلظت نانوکلوئید نقره در بچه ماهیان ازون برون (میانگین سه تکرار در ۷۲ ساعت)



نمودار ۸: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگیprobit value با لگاریتم غلظت نانوکلوئید نقره در بچه ماهیان ازون برون (میانگین سه تکرار در ۹۶ ساعت)

۳-۴- تیمار ماهیان ازون برون آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا به روش تجربی توسط مقادیر مختلف عصاره آویشن شیرازی و نانوکلوئید نقره و آنتی بیوتیک انروفلوکساسین

بر اساس نتایج تاثیر مقادیر مختلف عصاره آویشن شیرازی و محلول نانوکلوئید نقره در تیمار ماهیان ازون‌برون آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا، با افزایش غلظت ترکیبات مذکور مورد استفاده بهبودی سریع‌تر علائم بالینی ماهیان آلوده شده نسبت به گروه شاهد حاصل گردید. همچنین مقایسه تعداد ماهیان تلف شده در گروه‌های مختلف نشان داد تمام ماهیان گروه شاهد مثبت در مدت زمان آزمایش (۱۰روز) تلف شدند. (جدول۹).

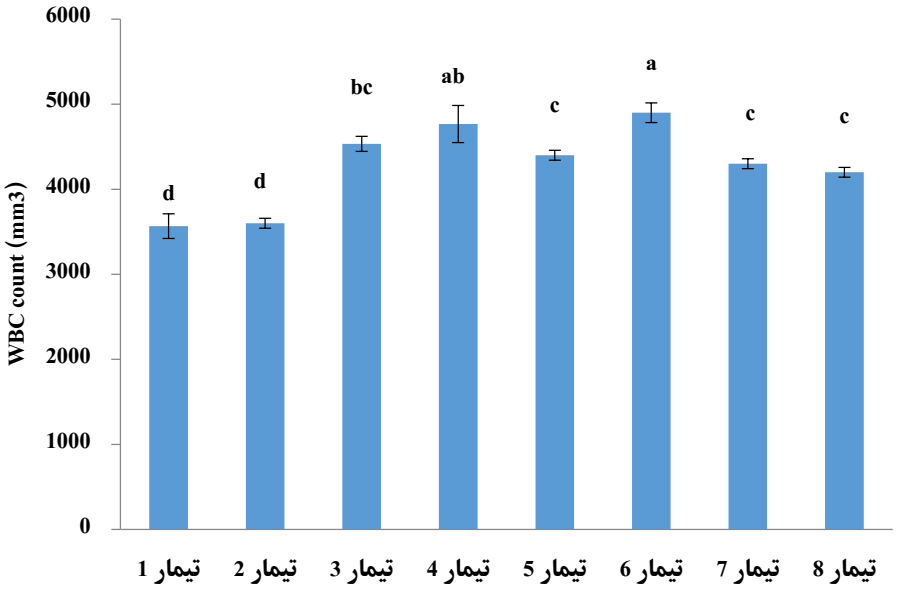
جدول ۹- تیمار ماهیان آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا

نوع تیمار	شماره تیمار	غلظت مورد استفاده جهت تیمار	تعداد تلفات تیمار
نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی	۱	۰/۴ ppm	۲
	۲	۰/۶ ppm	۲
	۳	۰/۸ ppm	۳
	۴	۱ppm	۳
عصاره آویشن شیرازی به روش حمام درمانی	۵	۱۰۰۰ppm	۲
عصاره آویشن شیرازی به روش خوراکی	۶	۱۰۰ mg/bwfish	۰
آنتی بیوتیک انروفلوکساسین به روش خوراکی	۷	۱۰ mg/bwfish	۴
شاهد منفی	۸	-	۰
شاهد مثبت	۹	-	۱۰

۳-۵-بررسی تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره بر شاخص های خون شناسی

۳-۵-۱- تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره بر گلبول های سفید خون

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway ANOVA) در مقایسه تعداد گلبول هاي سفيد خون در ماهيان تيمارهای مختلف اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد (P=0.000 ,df= 7 ,F=18.556). بر اساس نتایج حاصل از آزمون دانکن میانگین تعداد گلبول هاي سفيد در تيمارهای۳، ۴ و ۶ به شکل معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بوده کمترین تعداد گلبول های سفید در تیمار های ۱ و ۲ مشاهده گردید (نمودار ۹).

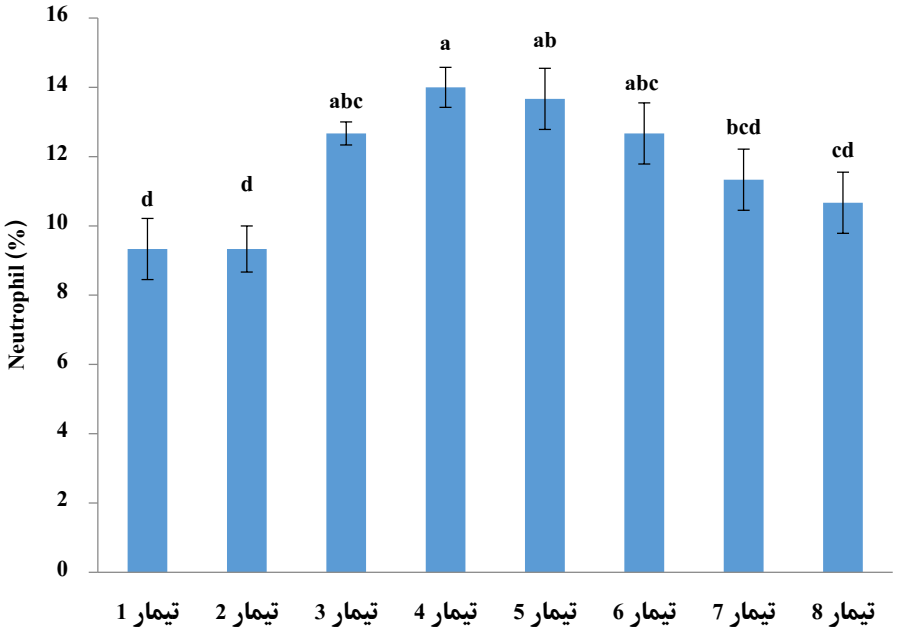


نمودار ۹ - مقایسه تعداد گلبول هاي سفيد خون در تیمار های مختلف

تیمار ۱: ppm ۰/۴ نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۲: ppm ۰/۶ نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۳: ppm ۰/۸ نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۴: ppm۱ نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۵ : ppm۱۰۰۰ عصاره آویشن شیرازی به روش حمام درمانی، تیمار ۶ : mg/bwfish ۱۰۰ عصاره آویشن شیرازی به روش خوراکی، تیمار ۷ : شاهد منفی، تیمار ۸ : شاهد مثبت- حروف غیرهمنام در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار آماری (p<0.05) می باشد.

۳-۵-۲- تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره بر نوتروفیل های خون

بررسی نتایج آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway ANOVA) درصد نوتروفیل خون ماهیان در تیمار های مختلف از وجود اختلاف معنی دار آماری حکایت می نماید (P=0.002 ,df= 8 ,F=5.605). بر اساس نتایج حاصل از آزمون دانکن، درصد نوتروفیل خون در تیمار های ۴ و ۵ نسبت به سایر تیمارها افزایش داشته ($p <0.05$) ولی کمترین میزان نوتروفیل در تیمارهای ۱، ۲، ۷ و ۸ مشاهده گردید که اختلاف معنی دار نداشتند ($p >0.05$) (نمودار ۱۰). .

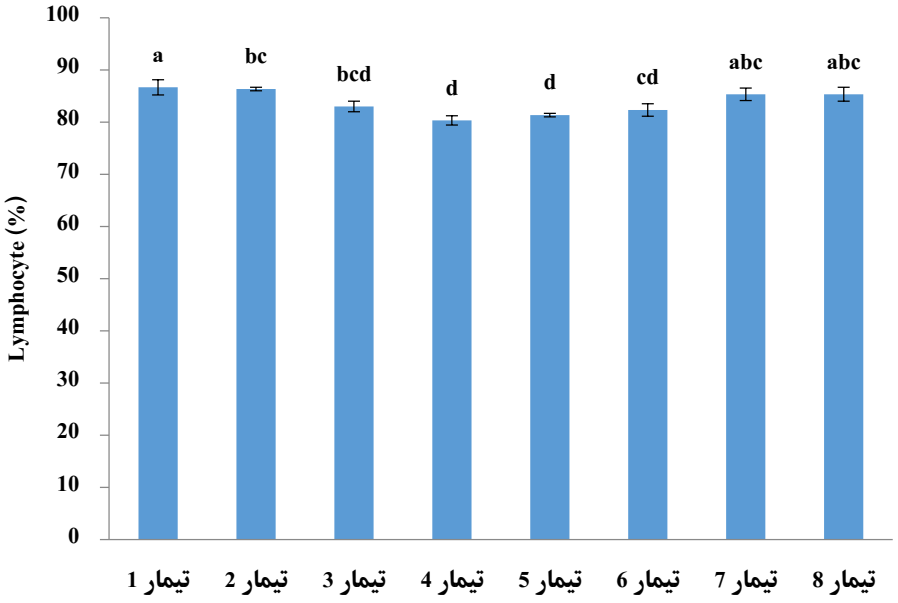


نمودار ۱۰ - مقایسه میزان نوتروفیل خون ماهیان در تیمار های مختلف

تیمار ۱: ۰/۴ ppmنانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۲: ۰/۶ ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۳: ۰/۸ ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۴: ۱ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۵ : ۱۰۰۰ppm عصاره آویشن شیرازی به روش حمام درمانی، تیمار ۶ : ۱۰۰ mg/bwfish عصاره آویشن شیرازی به روش خوراکی، تیمار ۷ : شاهد منفی، تیمار ۸ : شاهد مثبت- حروف غیرهمنام در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار آماری ($p<0.05$) می باشد.

۳-۵-۳- تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره بر روی لنفوسیت های خون

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway ANOVA) در مقایسه درصد لنفوسیت خون ماهیان در تیمارهای مختلف اختلاف معنی دار آماری مشاهده گردید (P=0.003 ,df= 8 ,F=5.237). نتایج آزمون دانکن نشان داد که درصد لنفوسیت در تیمارهای ۱، ۷ و ۸، از نظر آماری بیشتر از سایر تیمارها بود ($p <0.05$) اما بین این تیمارها اختلاف معنی دار وجود نداشت. کمترین درصد لنفوسیت در تیمارهای ۳، ۴، ۵ و ۶ مشاهده گردید که اختلاف معنی دار بین این تیمارها وجود نداشت ($p >0.05$) .

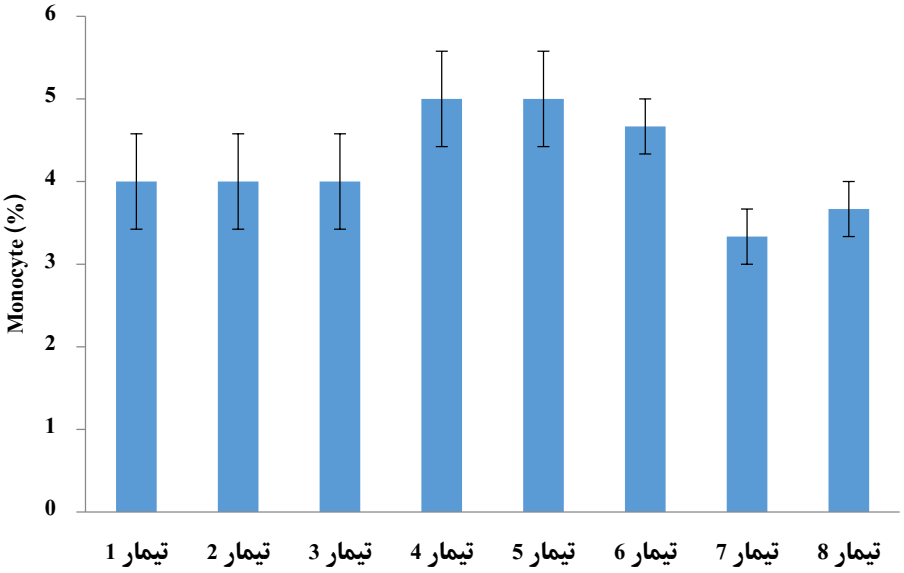


نمودار ۱۱ - مقایسه میزان لنفوسیت خون ماهیان شاهد در تیمار های مختلف

تیمار ۱: ۰/۴ ppmنانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۲: ۰/۶ ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۳: ۰/۸ ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۴: ۱ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۵ : ۱۰۰۰ppm عصاره آویشن شیرازی به روش حمام درمانی، تیمار ۶ : ۱۰۰ mg/bwfish عصاره آویشن شیرازی به روش خوراکی، تیمار ۷ : شاهد منفی، تیمار ۸ : شاهد مثبت- حروف غیرهمنام در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار آماري (p<0.05) مي باشد.

۳-۵-۴- تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره بر مونوسیت های خون

بر اساس نتایج حاصل از آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway ANOVA)، در درصد مونوسیت های خون ماهیان در تیمار های مختلف اختلاف معنی دار وجود نداشت (P=0.231 ,df= 8 ,F=1.516).

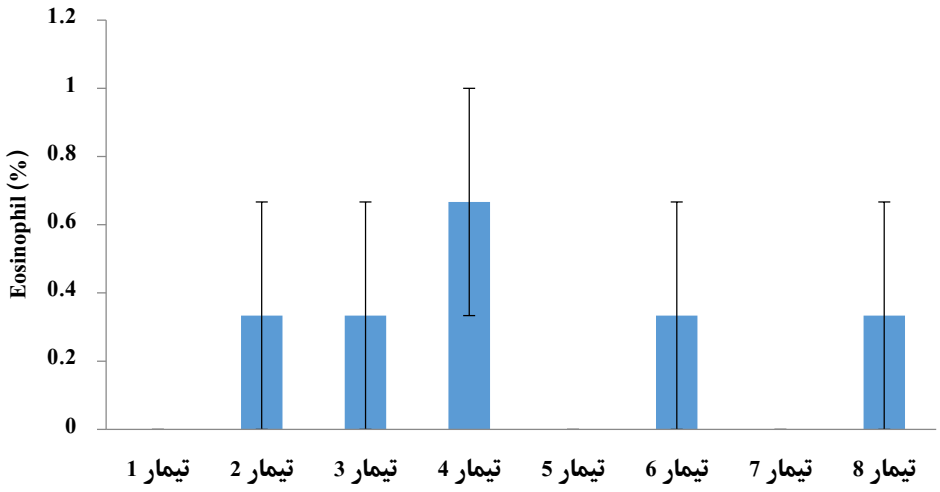


نمودار ۱۲ - مقایسه میزان مونوسیت خون ماهیان در تیمار های مختلف

تیمار ۱: ۰/۴ ppmنانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۲: ۰/۶ ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۳: ۰/۸ ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۴: ۱ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۵ : ۱۰۰۰ppm عصاره آویشن شیرازی به روش حمام درمانی، تیمار ۶ : ۱۰۰ mg/bwfish عصاره آویشن شیرازی به روش خوراکی، تیمار ۷ : شاهد منفی، تیمار ۸ : شاهد مثبت

۳-۵-۵- تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره بر ائوزینوفیل های خون

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway ANOVA)، در مقایسه درصد ائوزینوفیل خون ماهیان در تیمار های مختلف اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد (P=0.599 ,df= 8 ,F=0.800).

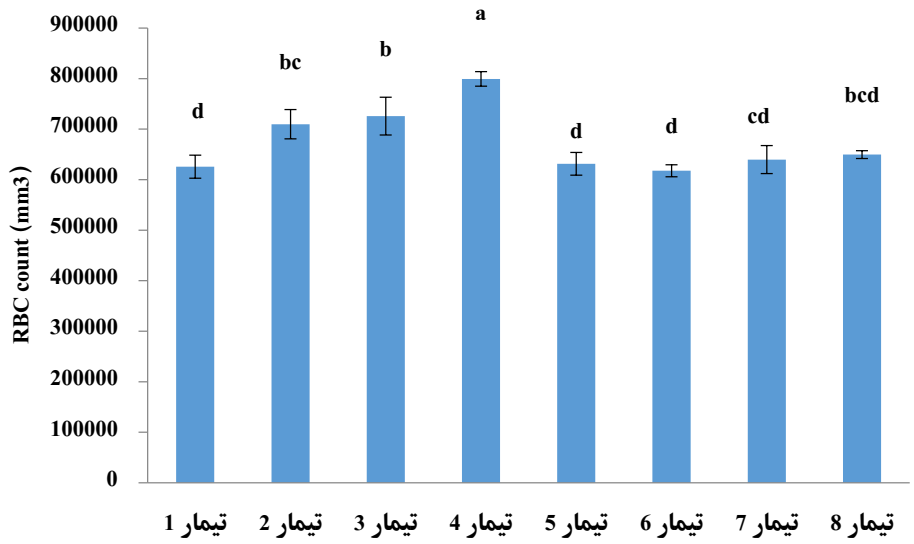


نمودار ۱۳ - مقایسه میزان ائوزینوفیل خون ماهیان در تیمار های مختلف

تیمار ۱: ۰/۴ ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۲: ۰/۶ ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۳: ۰/۸ ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۴: ۱ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۵ : ۱۰۰۰ppm عصاره آویشن شیرازی به روش حمام درمانی، تیمار ۶ : ۱۰۰ mg/bwfish عصاره آویشن شیرازی به روش خوراکی، تیمار ۷ : شاهد منفی، تیمار ۸ : شاهد مثبت

۳-۵-۶- تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره بر گلبول های قرمز خون

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway ANOVA) در مقایسه تعداد گلبول هاي قرمز خون ماهیان در تیمار های مختلف وجود اختلاف معنی‌دار آماری را نشان داد (P=0.000 ,df= 7 ,F=7.391). در بررسی نتایج حاصل از آزمون دانکن میانگین تعداد گلبول هاي قرمز در تیمار های ۳ و ۴ به شکل معنی‌داری بیشتر از سایر تیمار ها بود ($p <0.05$) ولی در تیمار۴ بیشتر مشاهده گردید. کمترین تعداد گلبول‌هاي قرمز در تیمارهای ۱، ۵ و۶، ۷ و ۸ مشاهده گردید که اختلاف معنی دار نداشتند ($p >0.05$).

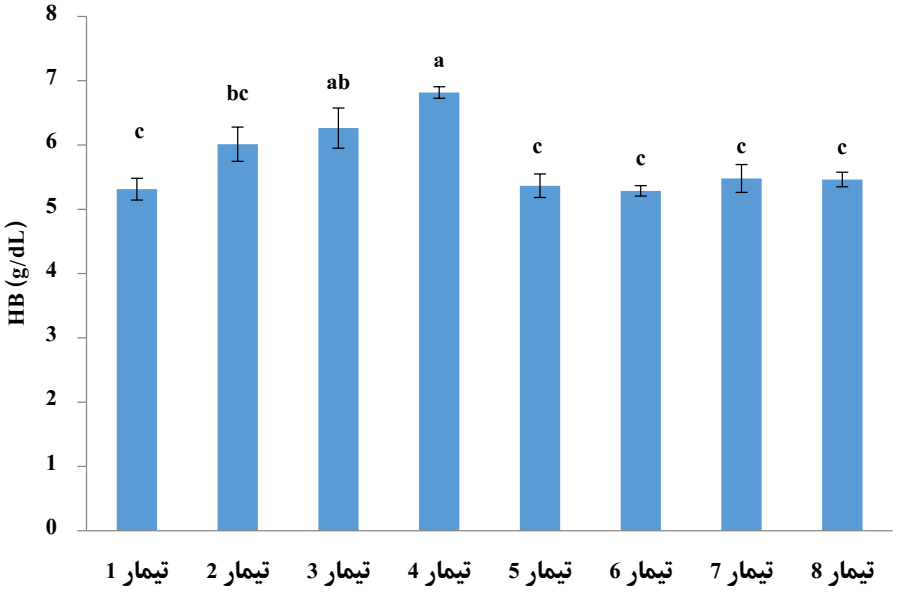


نمودار ۱۴ - مقایسه تعداد گلبول هاي قرمز خون ماهیان در تیمار های مختلف

تیمار ۱: ۰/۴ ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۲: ۰/۶ ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۳: ۰/۸ ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۴: ۱ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۵ : ۱۰۰۰ppm عصاره آویشن شیرازی به روش حمام درمانی، تیمار ۶ : ۱۰۰ mg/bwfish عصاره آویشن شیرازی به روش خوراکی، تیمار ۷ : شاهد منفی، تیمار ۸ : شاهد مثبت- حروف غیرهمنام در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار آماری (p<0.05) می باشد.

۳-۵-۷- تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره بر روی هموگلوبین خون

بررسی نتایج آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway ANOVA) به منظور مقایسه هموگلوبین خون ماهیان در تیمارهای مختلف از وجود اختلاف معنی‌دار آماری حکایت می‌نماید (P=0.001 ,df= 7 ,F=8.157). همچنین بر اساس نتایج حاصل از آزمون دانکن میانگین هموگلوبین در تیمارهای ۳ و ۴ به شکل معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود (p<0.05) ولی بیشترین مقدار در تیمار ۴ مشاهده شد. کمترین میزان هموگلوبین در تیمار های ۱، ۲، ۵، ۶، ۷ و ۸ مشاهده گردید که اختلاف معنی دار نداشتند (p>0.05).

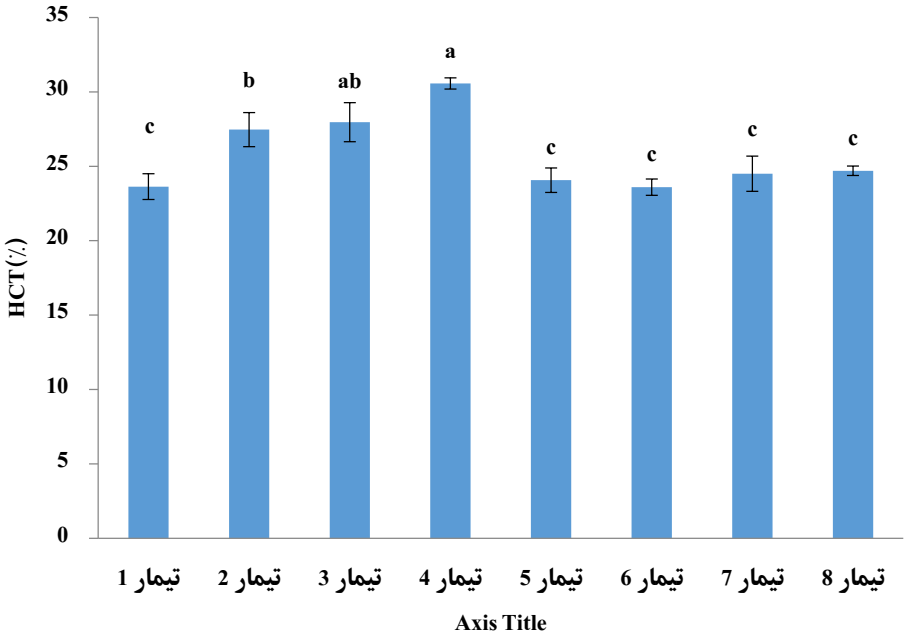


نمودار ۱۵- مقایسه میانگین هموگلوبین خون ماهیان در تیمار های مختلف

تیمار ۱: ۰/۴ ppmنانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۲: ۰/۶ ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۳: ۰/۸ ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۴: ۱ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۵ : ۱۰۰۰ppm عصاره آویشن شیرازی به روش حمام درمانی، تیمار ۶ : ۱۰۰ mg/bwfish عصاره آویشن شیرازی به روش خوراکی، تیمار ۷ : شاهد منفی، تیمار ۸ : شاهد مثبت- حروف غیرهمنام در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار آماری (p<0.05) می باشد.

۳-۵-۸- تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره بر روی هماتوکریت خون

نتایج آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway ANOVA) مقایسه درصد هماتوکریت خون ماهیان در تیمارهای مختلف وجود اختلاف معنی‌دار آماری را نشان داد ($P=0.005$,df= 8 ,$F=4.201$). بر اساس نتایج حاصل از آزمون دانکن میانگین هماتوکریت در تیمار های ۲، ۳ و ۴ به شکل معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود ($p<0.05$) ولی بیشترین آن در تیمار ۴ مشاهده شد. کمترین درصد هماتوکریت در تیمار های ۱، ۵، ۶، ۷ و ۸ مشاهده گردید که اختلاف معنی دار نداشتند ($p>0.05$).

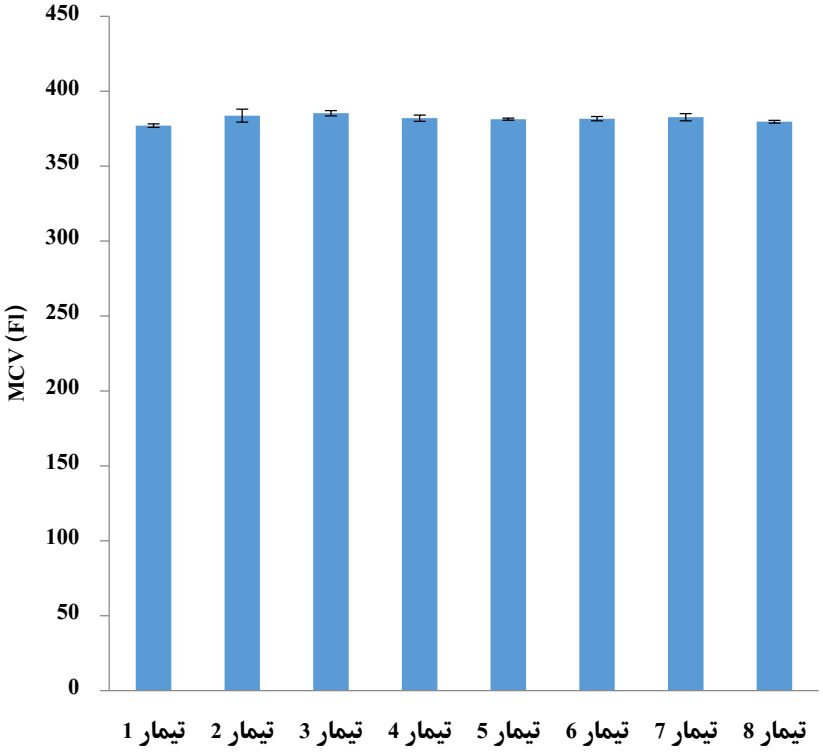


نمودار ۱۶ - مقایسه درصد هماتوکریت خون ماهیان در تیمار های مختلف

تیمار ۱: ۰/۴ ppmنانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۲: ۰/۶ ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۳: ۰/۸ ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۴: ۱ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۵ : ۱۰۰۰ppm عصاره آویشن شیرازی به روش حمام درمانی، تیمار ۶ : ۱۰۰ mg/bwfish عصاره آویشن شیرازی به روش خوراکی، تیمار ۷ : شاهد منفی، تیمار ۸ : شاهد مثبت- حروف غیرهمنام در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار آماری ($p<0.05$) می باشد.

۳-۵-۹- تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره بر میانگین حجم گلبول های قرمز خون MCV

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway ANOVA) در مقایسه MCV خون ماهیان درتیمار های مختلف اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد (P=0.277 ,df= 7 ,F=1.385).

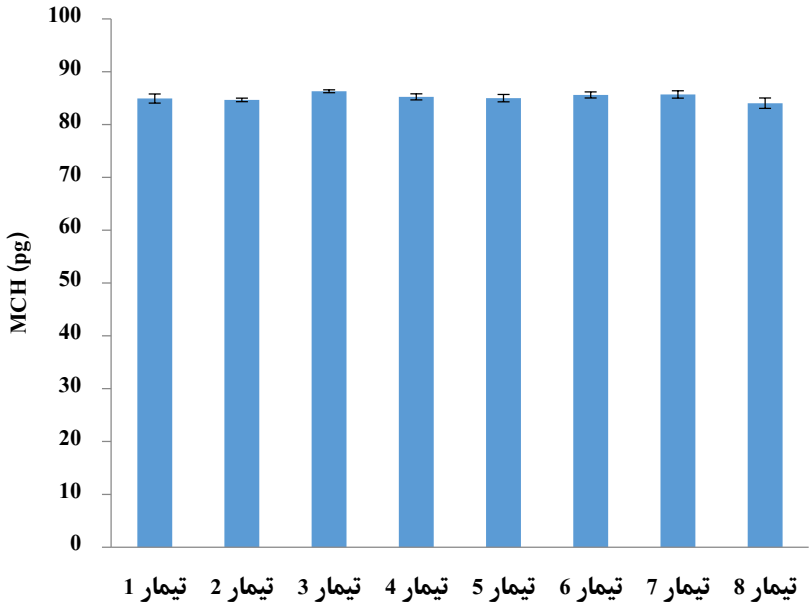


نمودار ۱۷ - مقایسه میزان MCV خون ماهیان شاهد با تیمار های مختلف

تیمار ۱: ۰/۴ ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۲: ۰/۶ ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۳: ۰/۸ ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۴: ۱ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۵ : ۱۰۰۰ppm عصاره آویشن شیرازی به روش حمام درمانی، تیمار ۶ : ۱۰۰ mg/bwfish عصاره آویشن شیرازی به روش خوراکی، تیمار ۷ : شاهد منفی، تیمار ۸ : شاهد مثبت

۳-۵-۱۰- تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره بر میانگین هموگلوبین گلبول قرمز خون MCH

نتایج آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway ANOVA) به منظور مقایسه MCH خون ماهیان در تیمار های مختلف از وجود اختلاف معنی دار آماری حکایت می نماید (P=0.415 ,df= 8 ,F=1.089).

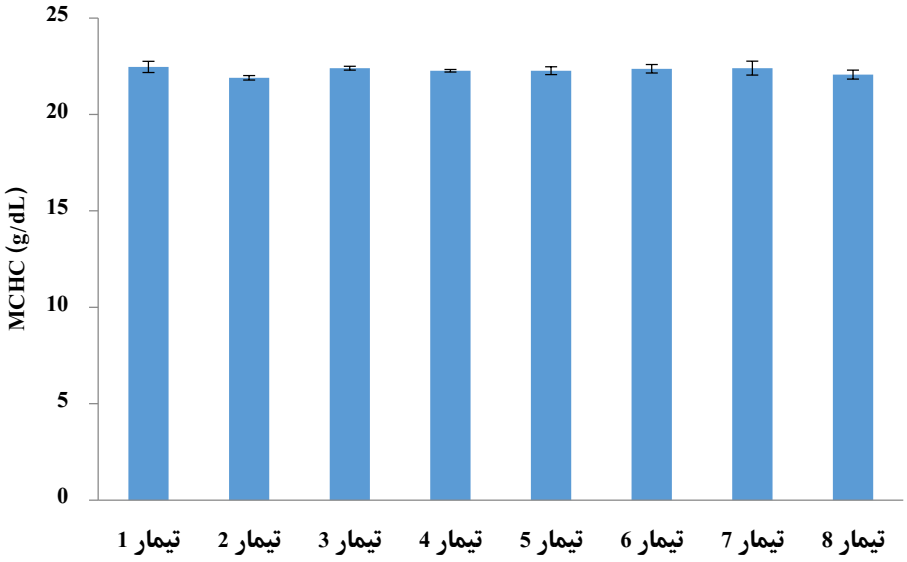


نمودار ۱۸ - مقایسه میزانMCH خون ماهیان در تیمار های مختلف

تیمار ۱: ۰/۴ ppmنانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۲: ۰/۶ ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۳: ۰/۸ ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۴: ۱ppm نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۵ : ۱۰۰۰ppm عصاره آویشن شیرازی به روش حمام درمانی، تیمار ۶ : ۱۰۰ mg/bwfish عصاره آویشن شیرازی به روش خوراکی، تیمار ۷ : شاهد منفی، تیمار ۸ : شاهد مثبت

۳-۵-۱۱- تأثیر عصاره آویشن شیرازی و نانوکلوئیدنقره بر میانگین غلظت هموگلوبین گلبول‌های‌قرمز خون MCHC

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway ANOVA) در مقایسه MCHC خون ماهیان در تیمار های مختلف اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد (P=0.620 ,df= 8 ,F=0.771).



نمودار ۱۹ - مقایسه میزانMCHC خون ماهیان شاهد با تیمار های مختلف

تیمار ۱: ppm ۰/۴نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۲: ppm ۰/۶ نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار ۳: ppm ۰/۸ نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار۴: ppm۱ نانوکلوئید نقره به روش حمام درمانی، تیمار۵ : ppm ۱۰۰۰ عصاره آویشن شیرازی به روش حمام درمانی، تیمار ۶ : mg/bwfish ۱۰۰ عصاره آویشن شیرازی به روش خوراکی، تیمار ۷ : شاهد منفی، تیمار ۸ : شاهد مثبت

۳-۶- بررسی تاثیرات هیستوپاتولوژیک عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره

به منظور بررسی آسیب‌های بافتی مقادیر مختلف عصاره آویشن شیرازی و نانوکلوئید نقره مورد استفاده در تیمار ماهیان ازون برون آلوده شده با باکتری آئروموناس هیدروفیلا نسبت به نمونه برداری و تهیه مقاطع بافتی از آبشش کبد و کلیه ماهیان تیمار و شاهد و بررسی میکروسکوپی آنها اقدام و نتایج ذیل حاصل گردید:

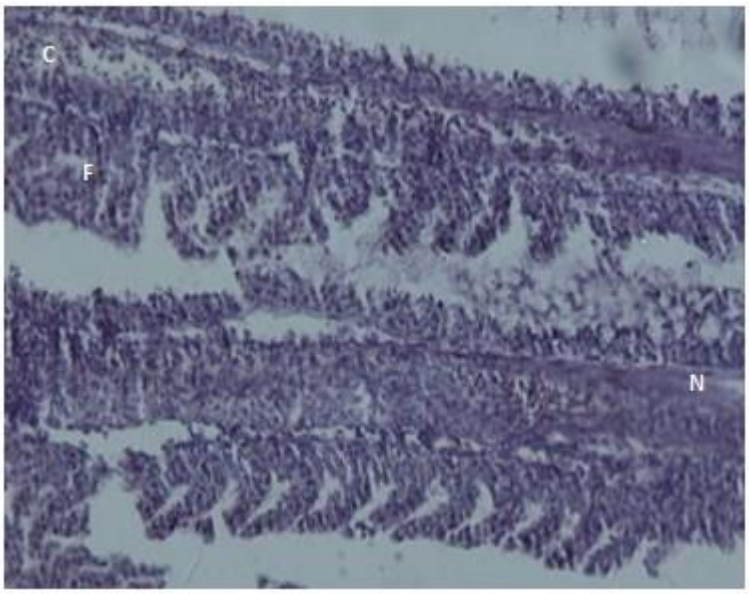
۳-۶-۱- آسیب های بافت آبشش

بررسی مقاطع بافتی تهیه شده از آبشش ماهیان ازون برون مورد بررسی در این مطالعه که طی ۱۰ روز با استفاده از مقادیر مختلف عصاره آویشن شیرازی و محلول نانوکلوئید نقره تحت تیمار قرار گرفته بودند از بروز برخی از آسیب‌های میکروسکوپیک حکایت دارد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه با افزایش غلظت ترکیبات مورد بررسی در گروه‌های تیمار آسیب‌های میکروسکوپیک به شکل گسترده‌تری در آبشش ها ظاهر می گردند.

همچنین بر اساس بررسی‌های میکروسکوپیک، آسیب‌های مشاهده شده در مقاطع بافتی تهیه شده از آبشش‌های بچه ماهیان ازون برون جوان شامل پرخونی Hyperemia، هیپرپلازی Hyperplasia، چسبندگی رشته های آبششی، نکروز سلولي موضعی Local Necrosis، وجود رنگدانه‌های ملانین در رشته‌های اولیه آبششی می‌باشد.

۳-۶-۱-۱- آسیب های بافت آبشش در تیمار ۱ (حمام نانو کلوئید نقره با غلظت ۰/۴ ppm)

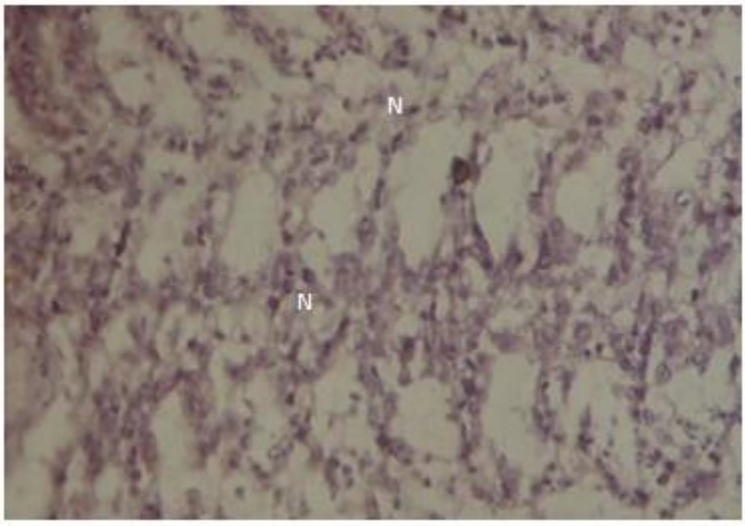
نتایج بررسی آسیب های میکروسکوپیک ایجاد شده در آبشش های بچه ماهیان ازون برون تیمار شده با حمام نانوکلوئید نقره با غلظت ۰/۴ ppm از بروز پرخوني و خونریزي و چسبندگي شدید رشته هاي ثانویه ، هیپرپلازي (زیاد) و انبساط و انقباض لاملاي اولیه و نکروز سلولي(نسبتا زیاد) و تخریب لایه اپي تلیال رشته ثانویه (کم) حکایت می نماید.



شکل۱۳- مشاهده پرخوني (C)،چسبندگی رشته های ثانویه (F) و نکروز سلولی(N) در بافت آبشش تیمار۱ (H&E ،20x)

۳-۶-۱-۲- آسیب های بافت آبشش در تیمار ۲ (حمام نانوکلوئید نقره با غلظت ۰/۶ ppm)

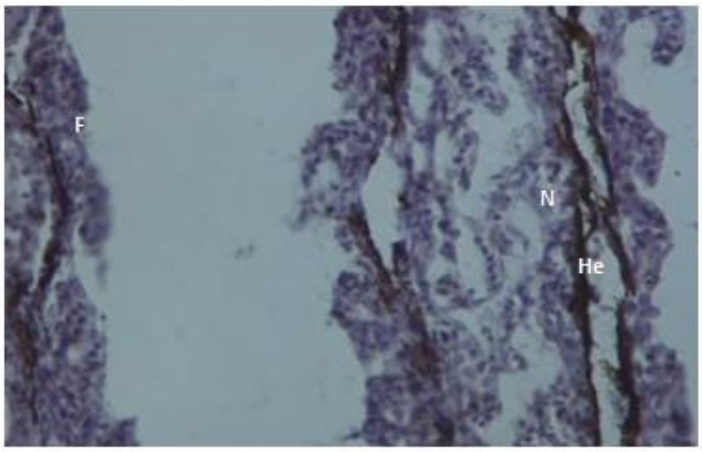
در این مطالعه بررسی میکروسکوپی مقاطع بافتی تهیه شده از آبشش بچه ماهیان ازون برون تیمار شده با حمام نانوکلوئید نقره با غلظت ۰/۶ ppm وجود آسیب های بافتی شامل نکروز سلولي (شدید)، چسبندگي و تخریب لایه اپي تلیال رشته هاي ثانویه(زیاد)، پرخوني و خونریزي (نسبتا زیاد) را نشان داد.



شکل ۱۴- مشاهده نکروز سلولی رشته های اولیه و ثانویه (N) در بافت آبشش تیمار ۲ (H&E ،40x)

۳-۶-۱-۳- آسیب های بافت آبشش در تیمار ۳ (حمام نانوکلوئید نقره با غلظت ۰/۸ ppm)

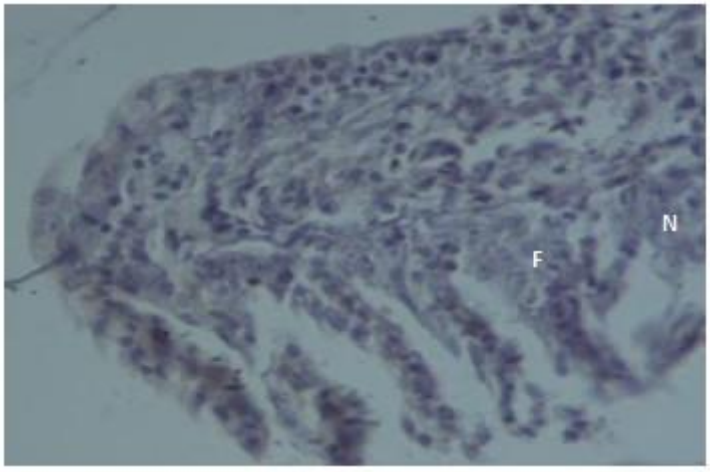
نتایج بررسی آسیب های میکروسکوپیک ایجاد شده در آبشش های بچه ماهیان ازون برون تیمار شده با حمام نانوکلوئید نقره با غلظت ۰/۸ ppm از کوتاه شدن رشته هاي ثانویه و انقباض لاملاي اولیه (زیاد)، نکروز سلولي و چسبندگی تیغه هاي ثانویه (زیاد)، خونریزي (کم) چماقي شدن (نسبتا زیاد) تخریب لایه اپي تلیال رشته های ثانویه (نسبتا زیاد) و (کم) و رسوبات هموسیدرین (نسبتا زیاد)حکایت می نماید.



شکل ۱۵-مشاهده رسوبات هموسیدرین(He)، نکروز سلولی(N)، چسبندگی(F) و کوتاهی رشته‌های ثانویه دربافت آبشش تیمار ۳(H&E،40x)

۳-۶-۱-۴- آسیب های بافت آبشش در تیمار ۴ (حمام نانوکلوئید نقره کلوئیدی با غلظت ۱ ppm)

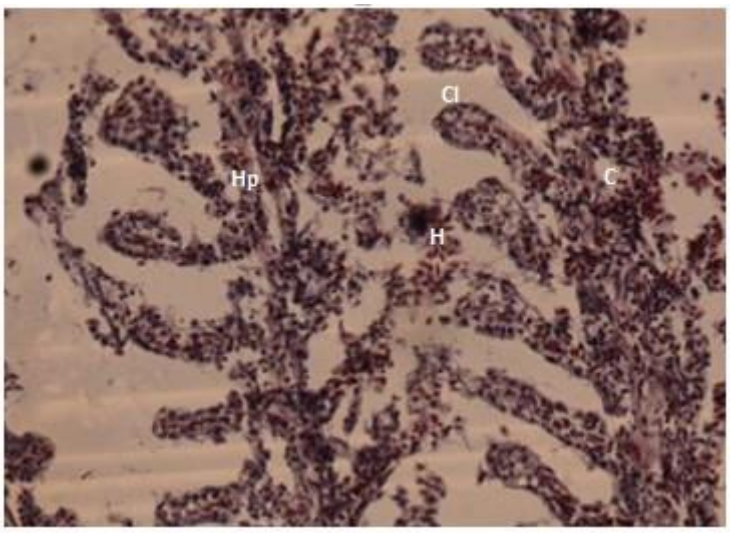
بر اساس نتايج حاصل از بررسی ميكروسكوپی مقاطع بافتی تهيه شده از آبشش بچه ماهيان ازون برون تيمار شده با حمام نانوكلوئيد نقره با غلظت ۱ ppm وجود آسيب های بافتی شامل چسبندگی تيغه هاي ثانويه (خيلي زياد)، نكروز سلولي و انقباض لاملاي اوليه (زياد)، خونريزي (نسبتا زياد)، و تخريب لايه اپي تليال (زياد) مشاهده گرديد.



شکل ۱۶- مشاهده چسبندگی رشته های ثانویه (F) ، نکروز سلولی (N) در بافت آبشش تیمار ۴ (H&E ،20x)

۳-۶-۱-۵- آسیب های بافت آبشش در تیمار ۵ (حمام عصاره آویشن شیرازی با غلظت ۱۰۰۰ ppm)

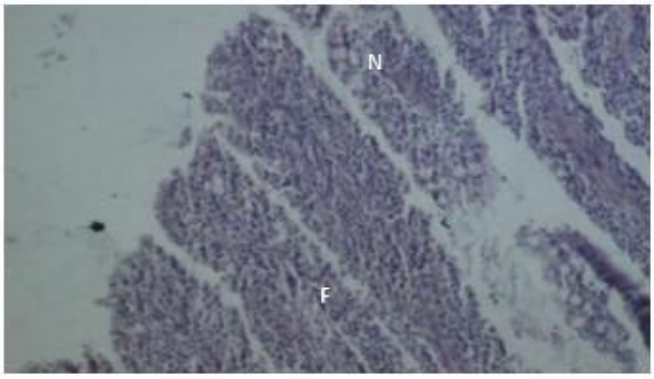
در اين مطالعه بررسی ميكروسكوپی مقاطع بافتی تهيه شده از آبشش بچه ماهيان ازون برون تيمار شده با حمام عصاره آويشن شيرازی با غلظت ۱۰۰۰ ppm وجود آسيب های بافتی شامل هيپرپلازی، چماقی شدن، پرخونی و تخريب لايه اپي تليال رشته هاي ثانويه (زياد)، پرخوني و خونريزي (نسبتا زياد) را نشان داد.



شکل۱۷- هیپرپلازی (Hp)، چماقی شدن (Cl)، پرخونی(C) و خونریزی (H) تیمار۵ (H&E ،10X)

۳-۶-۱-۶- آسیب های بافت آبشش در تیمار ۶ (مصرف خوراکی عصاره آویشن شیرازی با غلظت mg/bwfish ۱۰۰)

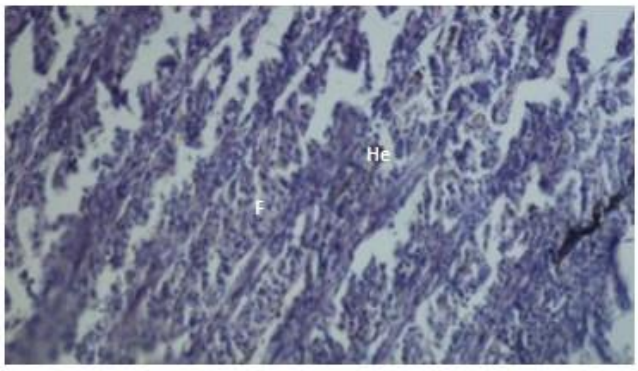
نتایج بررسی آسیب های میکروسکوپیک ایجاد شده در آبشش های بچه ماهیان ازون برون تیمار شده با مصرف خوراکی عصاره آویشن شیرازی با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم از ماهیان از پرخوني و چسبندگي رشته‌هاي ثانويه (شديد)، هيپرپلازي و انبساط و انقباض لاملاي اوليه (زياد)، خونريزي و تخريب لايه اپي تليال رشته ثانويه و نكروز سلولي(نسبتا زياد) حكايت می‌نمايد.



شکل ۱۸- مشاهده چسبندگی رشته های ثانویه(F) ، نکروز سلولی (N)، تخریب لایه اپي تلیال، خونریزی و پرخونی در بافت آبشش تیمار ۶ (H&E ،20x)

۳-۶-۱-۷- آسیب های بافت آبشش در تیمار ۷ (مصرف خوراکی آنتی بیوتیک انروفلوکساسین با غلظت mg/bwfish ۱۰)

بر اساس نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی مقاطع بافتی تهیه شده از آبشش بچه ماهیان ازون برون تیمار شده با مصرف خوراکی آنتی بیوتیک انروفلوکساسین با غلظت ۱۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم از وزن ماهیان وجود آسیب‌های بافتی شامل چسبندگي رشته هاي ثانويه (شديد)، رسوبات هموسيدرين (كم)، خونريزی و كوتاه شدن رشته‌هاي ثانويه و انقباض لاملاي اوليه (زياد)، تخريب لايه اپي‌تليال رشته ثانويه و نكروز سلولي(نسبتا زياد) مشاهده گرديد.



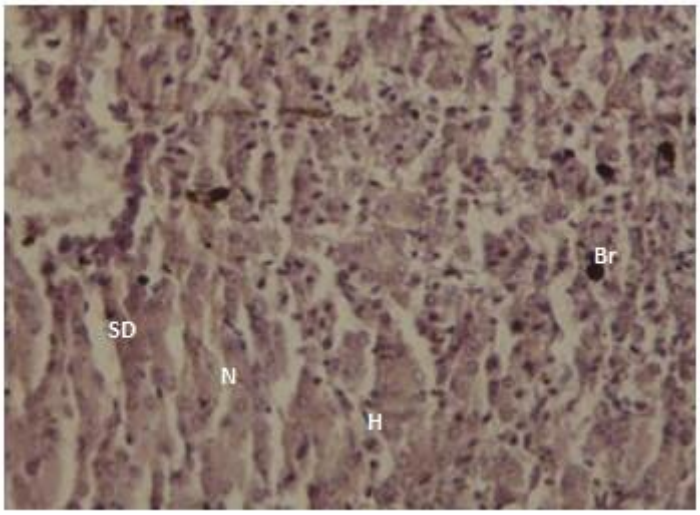
شکل ۱۹- مشاهده چسبندگی رشته های ثانویه (F)، تخریب لایه اپي تلیال، خونریزی و رسوبات هموسیدرین (He) در بافت آبشش تیمار ۷ (H&E ،20x)

۳-۶-۲-آسیب های بافت کبد

بررسی مقاطع بافتی تهیه شده از کبد ماهیان ازون برون مورد بررسی در این مطالعه که طی ۱۰ روز با استفاده از مقادیر مختلف عصاره آویشن شیرازی و محلول نانوکلوئید نقره تحت تیمار قرار گرفته بودند از بروز برخی از آسیب‌های میکروسکوپیک حکایت دارد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه با افزایش غلظت ترکیبات مورد بررسی در گروه‌های تیمار آسیب‌های میکروسکوپیک به شکل گسترده‌تری در کبد ماهیان ظاهر می‌گردند.

۳-۶-۲-۱- آسیب های بافت کبد در تیمار ۱ (حمام نانوکلوئید نقره با غلظت ۰/۴ ppm)

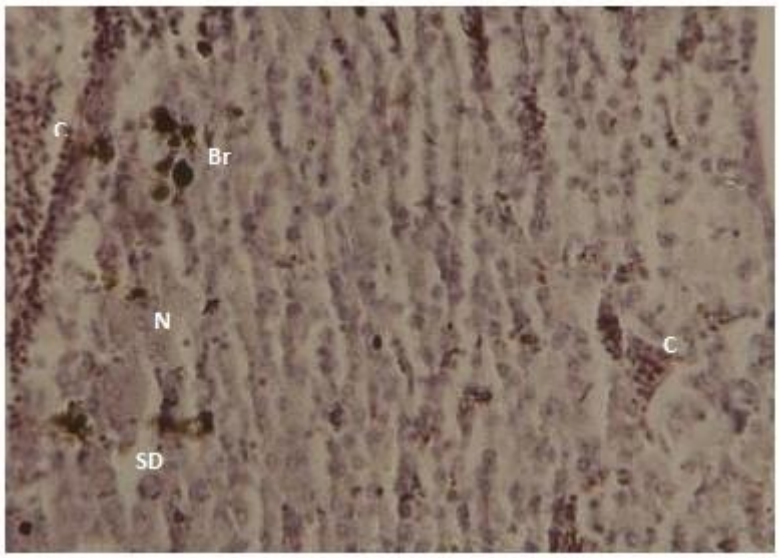
نتایج بررسی آسیب های میکروسکوپیک ایجاد شده در کبد بچه ماهیان ازون برون تیمار شده با حمام نانوکلوئید نقره با غلظت ۰/۴ ppm از بروز عوارضي چون پرخوني (زیاد) رکورد صفراوی و خونریزي و هیپرتروفي و نکروز سلولي (نسبتازیاد) و سلول هاي کوپفر (کم) حکایت می نماید.



شکل ۲۰- اتساع سینوزوئید (SD)، رکورد صفراوی(Br)، خونریزی(H) و نکروز سلولي (N) بافت کبد تیمار ۱ (40x- H&E)

۳-۶-۲-۲- آسیب های بافت کبد در تیمار ۲ (حمام نانوکلوئید نقره با غلظت ۰/۶ ppm)

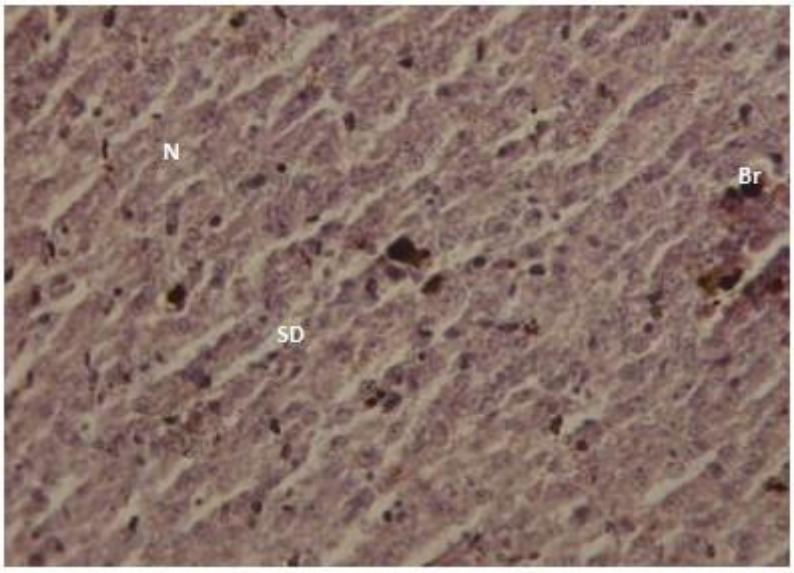
در این مطالعه بررسی میکروسکوپی مقاطع بافتی تهیه شده از کبد بچه ماهیان ازون برون تیمار شده با حمام نانوکلوئید نقره با غلظت ppm۰/۶ وجود آسیب های بافتی شامل پرخوني و رکورد صفراوی (زیاد)، خونریزي و سلول‌هاي کوپفر و نکروز سلولي (نسبتازیاد) و هیپرتروفي (کم) را نشان داد.



شکل ۲۱ - اتساع سینوزوئید (SD)، رکورد صفراوی(Br)، پرخونی (C) و نکروز سلولي(N) بافت کبد تیمار ۲ (40x- H&E)

۳-۶-۲-۳- آسیب های بافت کبد در تیمار ۳ (حمام نانوکلوئید نقره با غلظت ۰/۸ ppm)

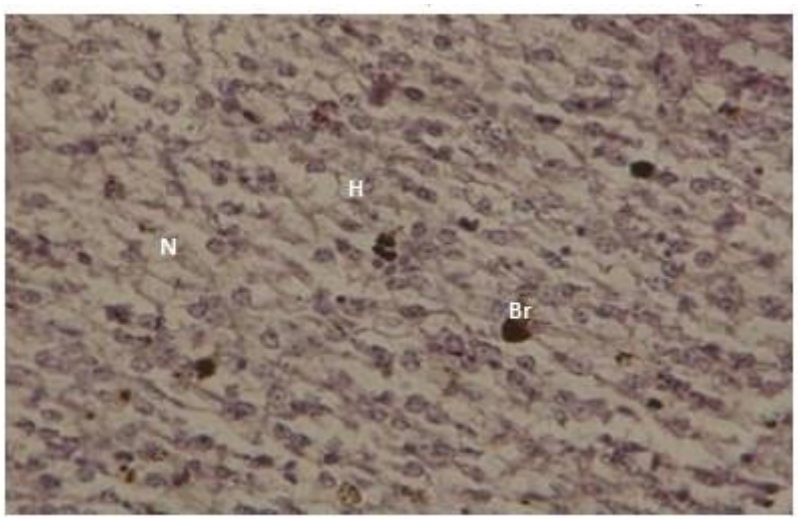
نتايج بررسي آسيب هاي ميكروسكوپيک ايجاد شده در كبد بچه ماهيان ازون برون تيمار شده با حمام نانوكلوئيد نقره با غلظت ۰/۸ ppm از پرخوني (نسبتا زياد)، هيپرتروفي و خونريزي و ركورد صفراوی و سلول هاي كوپفر و آتروفي سلولي و نكروز سلولي (كم) حكايت می نمايد.



شكل ۲۲ - اتساع سينوزوئيد (SD)، ركورد صفراوی (Br) و نكروز سلولي(N) بافت كبد تيمار ۳ (40x- H&E)

۳-۶-۲-۴- آسیب های بافت کبد در تیمار ۴ (حمام نانوکلوئید نقره با غلظت ۱ ppm)

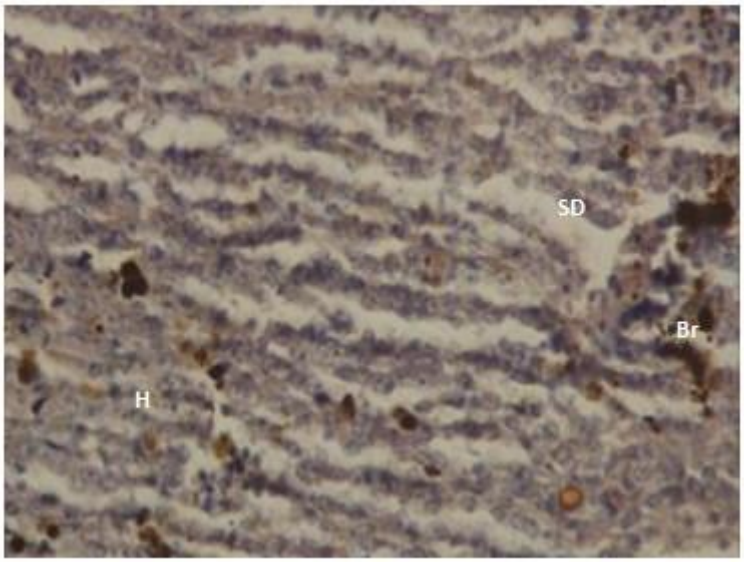
بر اساس نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی مقاطع بافتی تهیه شده از کبد بچه ماهیان ازون برون تیمار شده با حمام نانوکلوئید نقره با غلظت ۱ ppm وجود آسیب های بافتی شامل نکروز سلولي (خیلی زیاد)، هیپرتروفي و خونریزی رکورد صفراوی(نسبتا زیاد)، پرخوني و سلول هاي کوپفر(کم) مشاهده گردید.



شکل ۲۳- مشاهده شدت نکروز سلولي(N)، هیپرتروفی (H) و رکورد صفراوی (Br) بافت کبد تیمار ۴ (40x-H&E)

۳-۶-۲-۵- آسیب های بافت کبد در تیمار ۵ (حمام عصاره آویشن شیرازی با غلظت ۱۰۰۰ ppm)

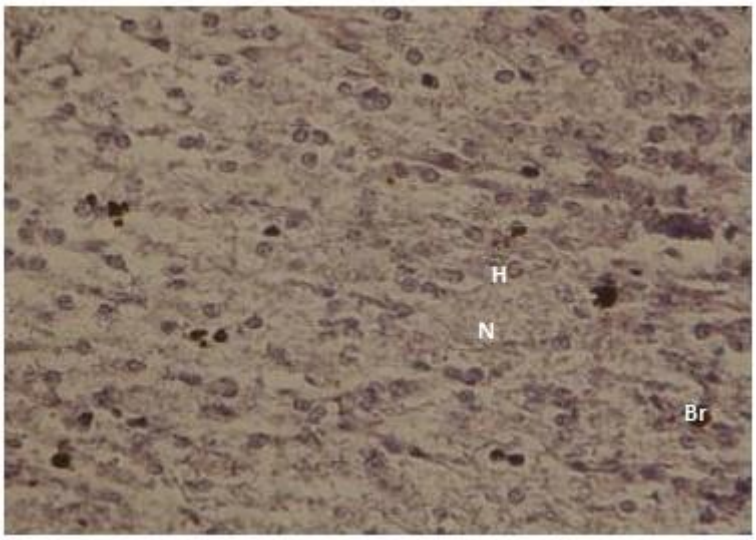
در این مطالعه بررسی میکروسکوپی مقاطع بافتی تهیه شده از کبد بچه ماهیان ازون برون تیمار شده با حمام عصاره آویشن شیرازی با غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر وجود آسیب های بافتی شامل رکورد صفراوی (زیاد)، خونریزی (نسبتا زیاد) پرخوني و سلول هاي كوپفر(كم) نكروز سلولي و هيپرتروفي (كم) را نشان داد.



شکل ۲۴- اتساع سینوزوئید (SD)، پراکندگی رکورد صفراوی(Br) و خونریزی (H) بافت کبد تیمار ۵(40x- H&E)

۳-۶-۲-۶- آسیب های بافت کبد در تیمار ۶(مصرف خوراکی عصاره آویشن شیرازی با غلظت ۱۰۰mg/bwfish)

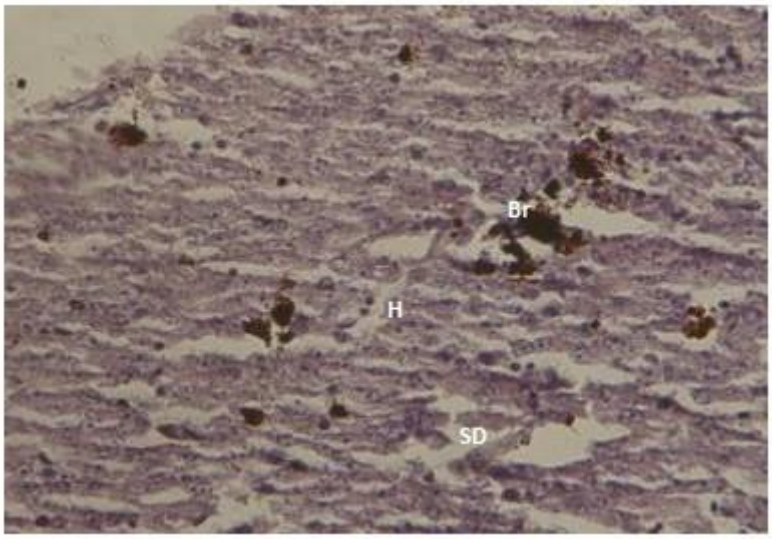
نتایج بررسی آسیب های میکروسکوپیک ایجاد شده در کبد بچه ماهیان ازون برون تیمار شده با مصرف خوراکی عصاره آویشن شیرازی با غلظت ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ماهیان از نکروز سلولي (خیلی زیاد)، سلول‌هاي کوپفر و هیپرتروفي (نسبتا زیاد)، خونریزی (کم) حکایت می‌نماید.



شکل ۲۵- مشاهده شدت نکروز سلولي(N)، هیپرتروفی(H) و رکورد صفراوی(Br) بافت کبد تیمار بافت کبد تیمار ۶ (40x- H&E)

۳-۶-۲-۷- آسیب های بافت کبد در تیمار ۷ (مصرف خوراکی آنتی بیوتیک انروفلوکساسین با غلظت mg/bwfish ۱۰)

بر اساس نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی مقاطع بافتی تهیه شده از کبد بچه ماهیان ازون برون تیمار شده با مصرف خوراکی آنتی بیوتیک انروفلوکساسین با غلظت ۱۰ میلی گرم به ازای وزن ماهیان وجود آسیب های بافتی شامل رکورد صفراوی (نسبتا زیاد)، سلول‌هاي كوپفر و خونریزی و هیپرتروفي و نكروز سلولي(کم) مشاهده گردید.



شکل ۲۶ - اتساع سینوزوئیدی (SD)، رکورد صفراوی(Br)، و خونریزی (H) دربافت کبد تیمار ۷ (40x- H&E)

۴-بحث و نتیجه گیری

کاهش صید و بهره‌برداری ماهیان خاویاری از دریای خزر و رودخانه‌های منتهی به آن و نیز سودآوری نسبتا مناسب سرمایه‌گذاری در پرورش تاسماهیان موجب توسعه پرورش متراکم ماهیان مذکور در نقاط مختلف کشور گردیده است. شرایط پرورشی ماهیان خاویاری مانند تراکم نسبتا زیاد ماهیان در استخرهای پرورشی، دستکاری‌های زیاد و نامناسب، تغییرات فاکتورهای فیزیکی وشیمیایی آب و دیگر عوامل، شرایط بروز انواع بیماری‌ها خصوصا بیماری‌های ناشی از عوامل بیماریزای فرصت‌طلب مانند آئروموناز‌یس که در اثر آلودگی به گونه های مختلف باکتری آئروموناس ایجاد می گردد را در آنها فراهم می‌نماید.

باکتری آئروموناس هیدروفیلا از مهمترین باکتری‌های فرصت طلب محسوب گردیده و بر اساس بررسي‌هاي جامع صورت گرفته باکتری مذکور می‌تواند در طی مراحل مختلف پرورش تاسماهیان را آلوده نموده و بر اساس شدت آلودگی و سن ماهیان مبتلا منجر به بروز علائم بالیني متفاوت و حتی تلفات گردد. با توجه به اینکه باکتری آئروموناس هیدروفیلا بطور طبیعي در اکثر منابع آبي حضور دارد ضروری است به منظور کنترل و حذف باکتری آئروموناس هیدروفیلا در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری اقدامات لازم صورت پذیرد. برای این منظور در حال حاضر از مواد ضدعفونی‌کننده شیمیایی و نیز از انواع آنتی بیوتیک‌ها جهت درمان ماهیان بیمار استفاده می‌گردد که نتایج متفاوتی در ارتباط با هر کدام حاصل گردیده است. تأثیرات سوء زیست محیطی مواد شیمیایی ضد عفونی‌کننده و آنتی‌بیوتیک‌ها در کنار اثرات منفی آنها بر مصرف‌کنندگان از ماهیان تحت درمان مانند ایجاد مقاومت داروئی در برابر عوامل باکتریایی موجب گردیده است امروزه استفاده از مواد طبیعی مانند گیاهان دارویی مورد توجه ویژه قرار گیرد. با توجه به مشکلات و خطرات استفاده از مواد شیمیایی لزوم بررسی امکان جایگزینی آنها با ترکیبات طبیعی برای این مواد ضدعفونی‌کننده بیش از پیش احساس می‌گردد (Yao etal., 2011).

از سوی دیگر با توجه به تأثیرات ضدمیکروبی برخی از نانوذرات فلزی مانند نانوذره نقره در تحقیق صورت پذیرفته نسبت به بررسی تأثیرات عصاره آویشن شیرازی و نانوذره نقره بر روی باکتری آئروموناس هیدروفیلا و نیز ماهیان ازون برون آلوده شده به این باکتری در آزمایش‌های in vitro و in vivo اقدام گردید.

بر اساس نتایج حاصل از آزمون آنتی بیوگرام انجام شده در این تحقیق آنتی بیوتیک های فولوموکئین و انروفلوکساسین با ایجاد هاله عدم رشد باکتری به با قطر ۲۲میلی‌متر مؤثرترین آنتی بیوتیک در نابودی باکتری آئروموناس هیدروفیلا تشخیص داده شدند. نتایج حاصل از این بررسی با نتایج حاصل از مطالعه Ture و همکاران در سال ۸ در بررسی تأثیر آنتی بیوتیک های مؤثر بر باکتری آئروموناس هیدروفیلای جدا شده از تاسماهیان سیبری *Acipenser gueldenstaedtii* و نیز موری بختیاری و همکاران (۱۳۹۵) در ارتباط با تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در آئروموناس هیدروفیلاهای جداشده از ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) پرورشی در استان خوزستان و با مطالعه انجام شده توسط ارزانی و همکاران (۱۳۹۵) تا حدود زیادی مشابه می باشد. با توجه به عدم تولید و عرضه آنتی‌بیوتیک فولوموکئین توسط شرکت‌های تولید کننده داروهای

آبزیان در کشور و نیز عدم ورود آن از خارج از کشور، در این مطالعه به منظور تیمار ماهیان ازون برون آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا از آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین استفاده گردید.

مقادیر غلظت‌های نیمه‌کشنده (LC_{50}) عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی بر روی بچه ماهیان ازون برون ۳ تا ۵ گرمی طی ۹۶ ساعت برابر ۷۶۶/۶۵ میلی‌گرم در لیتر محاسبه گردید. معصوم زاده و همکاران (۱۳۸۹) غلظت نیمه‌کشنده (LC_{50}) اسانس آویشن شیرازی طی ۹۶ ساعت بر روی بچه‌تاسماهی ایرانی را معادل ۱۲/۱۱ میلی‌گرم در لیتر تعیین نمودند که با توجه به نوع ترکیب و میزان ماده مؤثره در اسانس، مقادیر آن با بررسی حاضر متفاوت می‌باشد.

شریف روحانی و همکاران (۱۳۹۰) غلظت نیمه‌کشنده اسانس آویشن‌شیرازی طی ۹۶ ساعت بر روی بچه قزل آلای رنگین کمان برابر ۱۳/۶ میلی‌گرم در لیتر تعیین نمودند.

در این مطالعه مقادیر غلظت‌های نیمه‌کشنده (LC_{50}) نانوذره نقره بر روی بچه ماهیان ازون‌برون طی۹۶ ساعت معادل ۱۰/۱۱ میلی‌گرم در لیتر تعیین گردید. در مطالعه صورت گرفته توسط Ostaszewska و همکاران (۲۰۱۶) غلظت نیمه‌کشنده (LC_{50}) نانوذره نقره بر روی تاسماهی سیبری طی۹۶ ساعت را ۱۵/۰۳ میلی‌گرم در لیتر تعیین نمودند درحالیکه بنان و همکاران (۱۳۹۵) بر اساس مطالعه صورت گرفته غلظت نیمه‌کشنده (LC_{50}) نانوذره نقره بر روی تاسماهی ایرانی با میانگین وزن ۲/۰±۰/۲ را ۰/۸۹ میلی‌گرم در لیتر اعلام نمودند.

مقادیر غلظت‌هاي كشنده هیچگاه يك مقدار ثابت و مطلق نبوده، به اين دليل كه فاكتورهاي زيادي نظير اختلافات فردي، سني، جنسي، وزني، عوامل محيطي، خصوصيات فيزيكی و شيميايي آب، نحوه تجويز و ساير فاكتورهاي ديگر در تعيين LC_{50} موثر مي باشند (ميرستاري، ۱۳۸۱). همچنین از جمله دلایل تفاوت در مقادیر غلظت‌های نیمه‌کشنده (LC_{50}) نانوذرات مربوط به اندازه آنها می‌باشد بطوریکه ذرات کوچک تر سمی‌تر هستند (Huang et al, 2017). با توجه به قوانین اتحادیه اروپا که مواد شیمیایی را بر اساس میزان غلظت های نیمه‌کشنده (LC_{50}) آنها در آزمون‌های سم شناسی ۹۶ ساعته بر روی ماهی در ۳ گروه، گروه مضر (با میزان LC50 بین ۱۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، گروه سمی (با میزان LC_{50} بین ۱ تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر)، گروه خیلی سمی (با میزان LC_{50} کمتر از ۱ میلی‌گرم در لیتر) طبقه بندی می‌نمایند، عصاره آویشن شیرازی جزء ترکیبات کم‌خطر و نانوذره نقره در گروه ترکیبات سمی دسته بندی می‌گردند.

بررسی و مقایسه مقادیر غلظت نیمه‌کشندگیLC_{50} عصاره آویشن شیرازی و نانوذره نقره در این مطالعه از بالا بودن محدوده سلامت عصاره آویشن شیرازی و پایین بودن محدوده سلامت نانوذره نقره حکایت دارد. نتایج حاصل از این مطالعه از کم خطر بودن عصاره آویشن شیرازی نسبت به نانوذره نقره و نیز نسبت به تعداد زیادی از مواد شیمیایی ضد عفونی‌کننده مانند سولفات مس و پرمنگنات پتاسیم حکایت دارد. بر اساس نتایج مطالعات انجام شده LC_{50} سولفات مس و پرمنگنات پتاسیم در بچه تاسماهی ایرانی طی ۹۶ ساعت به ترتیب برابر ۰/۱۵ و ۰/۴۱ میلی‌گرم در لیتر تعیین

گردید (مشتاقی و همکاران، ۱۳۸۹) که نشانگر پایین بودن محدوده سلامت و پر خطر بودن این ترکیبات ضد عفونی‌کننده شیمیایی می باشد.

بررسی نتایج مطالعات محققین مختلف در ارتباط با مقادیر غلظت‌های نیمه‌کشندگی (LC_{50}) فرآورده های گیاهان دارویی و مواد شیمیایی از کم خطر بودن فرآورده‌های گیاهان دارویی نسبت به مواد شیمیایی در اغلب موارد حکایت دارد. رودبارکی (۱۳۹۲) مقادیر LC_{50} عصاره گیاه اکالیپتوس طی ۹۶ ساعت در بچه ماهیان کپور علفخوار(آمور) را معادل ۲۴۷۸/۵۶ppm محاسبه نمود در حالیکه جوینده (۱۳۹۱) LC_{50} سولفات مس و پرمنگنات پتاسیم در ماهی آمور طی ۹۶ ساعت را به ترتیب برابر ۴/۸۹۵ ppm و ۱/۰۵ ppm تعیین نمود که در مقایسه با LC_{50} تعیین شده برای عصاره اکالیپتوس در مقادیر پایینی قرار داشته که این امر از سمی و پر خطر بودن این مواد شیمیایی نسبت به عصاره اکالیپتوس حکایت دارد همچنین Kori-Siakpere در سال ۲۰۰۸ سمیت حاد پرمنگنات پتاسیم بر روی گربه ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) را مورد بررسی قرار داد ، بطوریکه LC_{50} ۹۶ ساعته آن را معادل ۳/۰۲ میلی گرم در لیتر تعیین نمود این مطالعه نشان داد که سمیت $Kmno_4$ مخصوصاً در آب با pH بالا بوسیله ایجاد ذرات ریز منگنز اکسیده، آبشش ماهی را مسدود کرده و اختلال تنفسی ایجاد می‌نماید.

بالا بودن مقادیر نیمه‌کشندگی (LC_{50}) فرآورده‌های گیاهان دارویی از جمله آویشن شیرازی نسبت به مواد شیمیایی را علاوه بر ترکیبات موجود در آنها می‌توان احتمالا به نیمه عمر پایین فرآورده های گیاهان دارویی و تجزیه سریع و عدم تجمع بافتی آنها نسبت داد. با توجه به این امر گیاهان دارویی می‌توانند جایگزین‌های مناسبی برای مواد شیمیایی در کنترل عوامل بیماریزا در آبزیان معرفی گردند. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه غلظت نیمه‌کشندگیLC_{50} نانوکلوئید نقره پایین بوده و از محدوده سلامت پایین برخوردار است. بررسی نتایج سایر محققین در خصوص تعیین مقادیر غلظت نیمه‌کشندگی LC50 نانوذره نقره حکایت از پایین بوده مقادیر مذکور در سایر گونه‌های ماهیان حکایت دارد بطوریکه علیشاهی و مصباح (۱۳۸۹) غلظت نیمه‌کشندگی LC50 نانوذره نقره در بر روی چهار گونه ماهی آمور، شیربت، اسکار و سوروم را به ترتیب ۰/۱۲ ، ۰/۰۸۶ ، ۶/۸۵ و ۷/۸۹ میلی گرم در لیتر گزارش کردند. همچنین در مطالعه دیگری که توسط Wuو Zhou در سال ۲۰۱۳ بر روی ماهی مداکای ژاپنی *Oryzias latipes* انجام گردید غلظت نیمه کشنده گی نانوذرات نقره بعد از ۹۶ ساعت معادل ۰/۸۷ میلی گرم در لیتر تعیین گردید.

Johari و همکاران (۲۰۱۳) غلظت نیمه کشنده ۹۶ ساعته کلوئید نقره را در مراحل جنینی، لاروی و نوجوانی ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به ترتیب ۰/۲۵ ،۰/۷۱ و ۲/۱۶ میلی گرم در لیتر تعیین نمودند. مزارعی و همکاران (۱۳۹۴) غلظت نیمه کشنده ۹۶ ساعته نانوذرات نقره کلوئیدی را در ماهی گورخری معمولی *Aphanius dispar* ۱۰/۶۳۱ میلی‌گرم در لیتر به دست آوردند. نتایج جاصل از تعیین غلظت نیمه کشندگی نانوذره نقره بر روی گونه های مختلف ماهیان حکایت از پایین بودن محدوده سلامت این نانوذره فلزی در آنها می باشد. مهمترین دلیل در ارتباط با پایین بودن غلظت نیمه‌کشندگی نانوکلوئید نقره را می‌توان مربوط به ماهیت فلزی آن و تجمع فلز نقره در بافت‌های

ماهیان دانست. براساس نتایج این مطالعه و سایر مطالعات انجام شده با توجه به پایین بودن مقادیر غلظت‌های نیمه‌کشندگی LC_{50} نانوذرات فلزی استفاده مستقیم از آنها مانند نانوذره نقره بر روی آبزیان از جمله ماهیان خاویاری مناسب نمی‌باشد و توصیه می گردد با توجه به تاثیرات ضدمیکروبی نانوذرات فلزی از جمله نانوذره نقره از این ترکیبات در ضدعفونی تجهیزات پرورش آبزیان از جمله استخرها و حوضچه های پرورشی در زمان عدم حضور گونه‌های پرورشی استفاده گردد که در این خصوص می‌توان به نتایج حاصل از مطالعه جوهری (۱۳۹۰) و قهرمانی و همکاران (۱۳۹۱) در ارتباط با استفاده از نانوذره نقره در فیلترهای مورد استفاده در پرورش ماهی اشاره نمود.

در این تحقیق حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی و نانوذره نقره کلوئیدی به ترتیب برابر ۰/۲۵ میکروگرم در میلي لیتر و ۰/۲۵ میکروگرم در میلي لیتر تعیین گردید. همچنین مقادیر حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی و نانوذره نقره کلوئیدی به ترتیب برابر ۰/۵ میکروگرم در میلي لیتر و ۰/۲۵ میکروگرم در میلي‌لیتر محاسبه شد. بررسی و مقایسه نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج سایر مطالعات صورت گرفته در ارتباط با گیاهان دارویی نشان می‌دهد عصاره آویشن‌شیرازی دارای تأثیرات مهارکنندگی رشد (Bacteriostatic) و باکتری‌کشی(Bactericid) مناسبی بر روی باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا می‌باشند. مقایسه نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج بررسی تأثیر عصاره ۹ گیاه دارویی بر روی باکتری آئروموناس هیدروفیلا که توسط علیشاهی و همکاران (۱۳۸۹) انجام پذیرفت نشان می‌دهد مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره آویشن شیرازی مشابه می باشد. همچنین بر اساس نتایج علیشاهی و همکاران (۱۳۸۹) عصاره‌های آویشن شیرازی و عصاره پوست انار از بیشترین قدرت باکتری کشی(Bactericid) در مورد باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا در بین ۹ عصاره گیاه دارویی مورد بررسی برخوردار بودند. همچنین بررسی نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج بررسی قدرت ضدباکتری عصاره متانولی آویشن شیرازی بر روی باکتری لاکتوکوکوس گارویه *Lactococcus garvieae* (کوهپایه و همکاران، ۱۳۸۸) و نیز بررسی تأثیر عصاره های آبی و الکلی آویشن شیرازی بر روی باکتری اشرشیاکولی انتروهموراژیک*Enterohemorrhagic E. coli* (گودرزی و همکاران ،۱۳۸۵) مطابقت دارد.

مقایسه اثرات ضدباکتریایی عصاره آویشن با آنتی‌بیوتیک فورازولیدون نشان می‌دهد اگرچه فورازولیدون از نظرحداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا و نیز از نظر هاله ممانعت از رشد باکتری مذکور دارای قدرت مهارکنندگی رشد (Bacteriostatic) و باکتری‌کشی (Bactericid) قوی‌تری نسبت به عصاره آویشن برخوردار می‌باشد اما با توجه به تأثیرات نسبتا مناسب این عصاره می‌توان از آن به عنوان جایگزین گیاهی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها بویژه آنتی‌بیوتیک‌هایی که باکتری‌ها نسبت به آنها مقاومت یافته‌اند استفاده نمود (علیشاهی و همکاران ، ۱۳۸۹).

در این مطالعه مشخص گردید نانوکلوئید نقره دارای حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) پایینی در خصوص باکتری آئروموناس هیدروفیلا در مقایسه با عصاره آویشن شیرازی برخوردار است. نتایج مشابهی از تحقیق Gong و همکاران (۲۰۰۷) و نیز از مطالعات Kim و همکاران (۲۰۰۷) در ارتباط با تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) وحداقل غلظت کشندگی (MBC) بدست آمده است..

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه محلول نانوکلوئید نقره از تأثیرات ضد باکتریایی بیشتری نسبت به عصاره آویشن شیرازی برخوردار می باشد. تأثیرات ضدباکتریایی ترکیبات مورد بررسی در این مطالعه در ارتباط با مواد تشکیل دهنده ترکیبات مذکور می‌باشد. بر اساس آنالیز ترکیبات تشکیل‌دهنده گیاه آویشن تیمول (Thymol) و کارواکرول (Carvacrol) دو ماده اصلی تشکیل دهنده این گیاه می‌باشند. بر اساس نتایج تحقیقات صورت گرفته اثرات ضد باکتریایی گیاه آویشن را بیشتر به ترکیبات تیمول (Thymol) و کارواکرول (Carvacrol) مرتبط می‌دانند (Dababneh., 2008). براساس نتایج مطالعات انجام شده تیمول (Thymol) و کارواکرول (Carvacrol) اثرات سینرژیست (synergist) دارند (Didry et al.,1994).

با توجه به نتایج تعیین مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC) باکتری آئروموناس هیدروفیلا توسط عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره در این مطالعه و نوع ترکیبات ضد باکتریایی آنها می‌توان نتیجه گرفت نقره موجود در محلول نانوذره نقره نسبت به ترکیبات تیمول (Thymol) و کارواکرول (Carvacrol) موجود در آویشن شیرازی از تأثیرات ضد باکتریایی قوی‌تری برخوردار می باشد.

در خصوص تأثیر فرآورده‌های گیاهان (عصاره، اسانس و...) بر روی عوامل بیماریزا علاوه بر نوع ترکیبات تشکیل‌دهنده آنها، روش‌های بکار گرفته شده در استخراج فرآورده گیاهان دارویی از جمله نوع حلال مورد استفاده نیز مي‌توانند در اثرات ضد میکروبی آنها مؤثر باشند. مثلا زمانی که از دي متيل سولفوکساید (DMSO) Dimethyl sulfoxide به عنوان حلال استفاده شود قارچ ها در مقایسه با باکتري‌ها نسبت به اسانس اکالیپتوس حساس‌تر مي‌باشند در حالي که اگر از اتانول به عنوان حلال استفاده شود اثر ضد باکتري اسانس اکالیپتوس از اثر ضدقارچي آن بیشتر مي‌شود (Mahboubi et al.,2007). از سویی دیگر براساس مطالعات انجام شده اندازه مولکول‌های تشکیل دهنده فرآورده‌های گیاهان دارویی و نانوذرات فلزی نیز در قدرت نفوذپذیری آنها به داخل میکروارگانیسم های بیماریزا مانند عوامل باکتریایی و نابودی آنها مؤثر می‌باشد. نتایج مطالعه صورت گرفته توسط Roussis و همکاران در سال ۱۹۹۶ نشان داد تغییر در تأثیر فرآورده‌های گیاهان دارویی بر روي فعالیت میکروارگانیسم‌هاي مختلف به نوع و اندازه مولکول‌هاي ترکیبات مؤثر و قدرت نفوذپذیري آنها به داخل میکروارگانیسم وابسته است.

پس از انجام مطالعات تعیین غلظت‌های کشنده عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره با توجه به نتایج بدست آمده نسبت به انجام مطالعات تعیین غلظت‌های تأثیرگذار آنها در مبارزه با باکتری آئروموناس هیدروفیلا و درمان ماهیان ازون برون آلوده شده به باکتری مذکور اقدام گردید. تعیین غلظت‌های درمانی عصاره آویشن شیرازی و محلول کلوئیدی نانوذره نقره مورد بررسی در این مطالعه بر اساس مقدار غلظت‌های نیمه‌کشنده (LC_{50}) عصاره‌های مذکور طی یک

ساعت صورت پذیرفت. در مطالعه ای که توسط معصوم زاده و همکاران در سال ۱۳۹۴ در خصوص بررسی اثر عصاره آویشن شیرازی در درمان بچه تاس ماهیان ایرانی مبتلا به آئروموناز‌یس انجام گردید از بین غلظت‌های ۴۰۰ ،۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر به عنوان غلظت مناسب در درمان بیماری مذکور قبل از ورود بیماری به مرحله حاد معرفی گردید که در این مطالعه به عنوان غلظت انتخابی تیمار عصاره آویشن شیرازی به روش حمام یک ساعته برای انجام آزمایش‌های نهایی بررسی تأثیر عصاره آویشن شیرازی انتخاب گردید. همچنین غلظت های ۰/۴، ۰/۶ ، ۰/۸ و ۱ میلی‌گرم در لیتر برای انجام آزمایش‌های نهایی تأثیر محلول نانو کلوئید نقره به روش in vivo بر روی ماهیان ازون برون آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا تعیین و نسبت به گروه شاهد مورد ارزیابی قرارگرفتند.

بررسی مطالعات صورت گرفته در خصوص تأثیرات ضد باکتریایی گیاهان دارویی در ماهیان مختلف نشان می‌دهد غالب مطالعات مذکور صرفا به روش آزمایشگاهی (in vitro) تأثیرات ضد باکتریایی گیاهان دارویی را مورد بررسی قرار داده‌اند. Harikrishnan و Balasundaram (۲۰۰۸) اثرات عصاره‌های گیاه دارویی turmeric *Curcuma longa*, Tulsi plant *Ocimum sanctum*, neem *Azadirachta indica*, را بر روی ماهیان گلدفیش *Carassius auratus* آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا به روش in vitro و in vivo مورد بررسی قرار دادند آنها به منظور تیمار ماهیان آلوده شده نسبت به حمام آنها روزانه به مدت ۵ دقیقه در وان‌های محتوی یک لیتر از محلول یک درصد سه عصاره گیاهی مورد بررسی اقدام نمودند نتایج حاصل بیانگر تأثیرات سینرژیستی سه عصاره گیاهی مورد بررسی در بهبود شاخص های هماتولوژی ماهیان آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا داشت. همچنین Sharanu و همکاران در سال ۲۰۰۷ اثرات عصاره های ۱۰گیاه دارویی را بر روی ماهیان *Carassius auratus* آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا به روش in vitro و in vivo مورد بررسی قرار دادند. آنها ماهیان آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا را به مدت ۱۵ روز با استفاده از غذاهای محتوی عصاره های مورد بررسی مورد تغذیه قرار دادند. نتایج حاصل از مطالعه مذکور نشان داد تغذیه ماهیان *Carassius auratus* آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا با غذای محتوی عصاره گیاه *phyllanthus emblicca* به مقدار ۲۵ میلی‌گرم به ازای هر گرم وزن بدن ماهی به مدت ۱۵ روز می‌تواند در بهبود بیماری ناشی از آئروموناس هیدروفیلا مؤثر باشد.

با توجه به اینکه مصرف هر گونه ماده ای به عنوان داروی مؤثر در درمان بیماریهای ناشی از عوامل بیماریزا مستلزم مطالعات هماتولوژی و پاتولوژی می‌باشد لذا در این تحقیق موارد مذکور در ارتباط با تأثیرات مقادیر مختلف عصاره آویش شیرازی و نانو کلوئید نقره در ماهیان ازون برون مورد بررسی قرار گرفت.

شاخص های مربوط به خون مانند گلبول های قرمز و گلبول های سفید از جمله لنفوسیت ها، نورروفیل ها و مونوسیت ها یکی از بخش‌های سیستم ایمنی غیراختصاصی سلولی هستند که نوسان در تعداد آنها می تواند بعنوان یک شاخص مناسب در ارتباط با پاسخ ماهیان به عوامل استرس مطرح باشد (Stoskopf,1993).

بررسی نتایج نمونه‌های خونی تهیه شده از تیمارهای مطالعاتی، وجود اختلاف معنی‌دار آماری در تعداد گلبول های سفید در تیمارهای مختلف را نشان داد($P<0.05$) بر اساس نتایج مذکور با افزایش غلظت عصاره آویشن شیرازی و نانو کلوئید نقره تعداد گلبول های سفید افزایش یافته است. بررسی تأثیر غلظت های مختلف ترکیبات مورد بررسی در این مطالعه نشان می دهد افزایش تعداد گلبول های سفید در مقادیر بالای ترکیبات مورد بررسی مربوط به افزایش تعداد نوتروفیل ها می باشد. مقایسه میزان نوتروفیل خون ماهیان ازون برون، حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارها بوده است ($P<0.05$). بطوریکه با افزایش غلظت ترکیبات مورد بررسی، میزان نوتروفیل نیز افزایش یافت.

با توجه به اینکه وظیفه نوتروفیل ها دفاع بر علیه عفونت‌ها و حرکت به سمت نواحی آسیب دیده بافتی اشد لذا با افزایش آسیب‌های بافتی در غلظت‌های بالاتر ترکیبات مورد بررسی در این مطالعه ، بالطبع می‌توان شاهد افزایش میزان نوتروفیل‌ها در خون بود (تاکاشیما و هیبایا، ۱۳۷۸).

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه با افزایش غلظت ترکیبات مورد بررسی در میزان لنفوسیت‌ها کاهش مشاهده می گردد. نظر به اینکه کاهش لنفوسیت‌ها در ماهیان می‌تواند به دنبال عوامل استرس زا ایجاد گردد و از آنجا که افزایش غلظت ترکیبات مورد بررسی به عنوان یک عامل استرس‌زا محسوب می شود لذا در این حالت سطوح لوکوسیت‌ها با زمان تغییر کرده و منجر به کاهش تعداد لنفوسیت‌ها نسبت به تعداد گلبولهای سفید می‌شود (Roberts,1989; Berlin et al., 2008). البته باید توجه نمود در موارد نقص سیستم ایمنی ماهیان نیز میزان لنفوسیت ها که شاخص تولید پادتن‌ها در ماهیان می‌باشند نیز کاهش می‌یابد که باید آنرا با تأثیر مواد استرس‌زا مانند تأثیر ترکیبات دارویی که موجب تغییرات فیزیکی و شیمیایی آب و ایجاد استرس و کاهش لنفوسیت‌ها می‌شوند تفکیک نمود. مقایسه نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج مطالعه Alishahi و Mesbah (۲۰۱۰) که بر روی شاخص‌های ایمونولوژی *Astronatus ocellatus* انجام گردید نشان داد نتایج حاصل از این مطالعه تا حدودی با نتایج شمارش گلبول‌های سفید تعیین غلظت مؤثره عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی مطابقت دارد.

ابرقویی و همکاران (۱۳۹۶) با بررسی شاخص‌های خونی ماهیان قرمز تحت تیمار با نیترات نقره نتیجه گرفتند که غلظت‌های نیترات نقره بر روی فاکتورهای اریتروسیتی خون ماهی قرمز معنی دار بود بطوریکه موجب کاهش تعداد گلبول‌های قرمز گردید اما بر روی اغلب فاکتورهای لوکوسیتی خون تاثیر چندانی نداشت که امر ممکن است به دلیل مقاوم بودن این ماهی نسبت به ماهیان دیگر باشد.کاهش تعداد گلبول های سفید در پاسخ به استرس‌های موجود در محیط آبی، می‌تواند بیانگر سرکوب ایمنی و افزایش میزان آنها نشان دهنده پاسخ به استرس عفونت باشد (Adams, S. M. 2002).

بر اساس‌نتایج مطالعات صورت گرفته مقایسه تأثیر سمیت نانو ذرات نقره در ماهیان نشان می‌دهد ماهیان آکواریومی در برابر نانو ذرات نقره مقاومت بیشتري نسبت به ماهیان پرورشی و ماهیان وحشی دارند.

نتایج حاصل از بررسي ميكروسكوپي مقاطع بافتی تهیه شده از بافت‌های آبشش و کبد ماهیان ازون برون تیمار شده با مقادیر مختلف عصاره آویشن شیرازی از بروز برخی از آسیب های بافتی حکایت می نماید بطوریکه در بافت آبشش آسیب‌های بافتی نظیر پرخونی, چسبندگی در رشته های آبششی، نکروز سلولي, وجود رنگدانه های ملانین در رشته‌های اولیه آبششی و در مقاطع بافتی‌کبد در تیمارهای مختلف عوارضی نظیر تورم سلولی در هپاتوسیت‌ها، نکروزسلولي، مشاهده پرخونی، افزایش رنگدانه‌های ملانین و مراکز ملانو ماکروفاژها مشاهده می‌گردد. نتایج حاصل از بررسی با مطالعات معصوم زاده و همکاران در سال ۱۳۸۹ که تأثیرات اسانس آویشن شیرازی را در بچه تاسماهیان ایرانی مطالعه نمودند تا حد زیادی مطابقت دارد. همچنین آسیب‌های بافتی مشاهده شده در این مطالعه با نتایج گزارش شده توسط بازاری مقدم و همکاران در سال ۱۳۹۲ مطابقت دارد.

نتایج بررسی مقاطع بافتی تهیه شده از ماهیان ازون برون تیمار شده با مقادیر مختلف نانو کلوئید نقره ، بروز آسیب‌های گسترده حتی در مواجه با مقادیر پایین نانو کلوئید نقره را نشان داد. شدیدترین آسیب‌های بافتی در ماهیان خصوصا پس از مواجه با غلظت هاي بالاي نانو كلوئيد نقره مشاهده گرديد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه پرخونی، ادم و هايپرپلازي از جمله عوارض شایع در بافت آبشش ماهیان ازون برون پس از در معرض قرارگيري با سطوح بالاي نانوذرات نقره بوده همچنین کوتاه شدن تیغه‌های ثانویه، تورم سلول پوششی سنگفرشی و همجوشی تیغه‌های ثانویه نیز از آسیب‌های ایجاد شده دیگر در آبشش های ماهیان مذکور بوده است . در بافت کبد ماهیان تیمار شده با مقادیرمختلف نانو کلوئید نقره در این مطالعه آسیب‌های بافتی شامل آتروفی هپاتوسیت‌ها، نکروز، تورم سلولی، پرخونی، خونریزی، رکود صفرا و واکوئله شدن کبد مشاهده گردید. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه با افزایش مقادیر نانو کلوئید نقره آسیب‌های بافتی از شدت بیشتری برخوردار بودند. بررسی نتایج حاصل از مطالعات اثر نانو کلوئید نقره در گونه‌های دیگر ماهیان از بروز آسیب‌های بافتی مشابه ضایعات ایجاد شده در ماهیان ازون برون در اثر تیمار با محلول نانو کلوئید نقره در این مطالعه حکایت می‌نماید. آزادی و همکاران (۱۳۹۴) آسیب های بافتی مشابه این مطالعه از بررسی آبشش ماهی دانیو گورخری(*Danio rerio*) در مواجه با نانو کلوئید نقره گزارش نمودند. راکی و همکاران (۱۳۹۵) با بررسی تأثیر نانوذره نقره و نیترات نقره بر بافت‌های آبشش و کبد عروس ماهی زاینده رود *Petroleuciscus esfahani* آسیب‌های بافتی مشابه ماهیان ازون برون در این مطالعه را گزارش نمودند. همچنین Ostaszewska و همکاران (۲۰۱۶) نسبت به بررسی آسیب‌های بافتی ایجاد شده در آبشش و کبد تاسماهی سیبری در مراحل لاروی اقدام نمودند و آسیب‌های بافتی شامل ساختار نامنظم و هسته پیکنوتیک اپیدرم، جوش خوردگی تیغه آبششی ، نکروز و جداشدگی اپیتلیالی آبشش و در کبد کاریوپیکنوز، وجود اجسام ائوزینوفیلی، اتساع فضای سینوسی، تجمع سلول‌های خونی در عروق خونی، واکوئلیزاسیون کبدی و کوچک شدن سلولهای کبدی را از تاسماهیان سیبری تیمار شده با نانوذره نقره گزارش نمودند که مشابه نتایج حاصل از این مطالعه می‌باشد. کاکاوند و همکاران (۱۴۰۰) آسیب‌های بافتی مشابه آسیب‌های بافتی ایجاد شده در ماهیان ازون برون در این مطالعه را از بچه ماهیان تیلاپیای نیل(*Oreochromis niloticus*) مواجهه یافته با نانوذرات نقره گزارش

نمودند. بررسی Mervat Naguib و همکاران در سال ۲۰۲۰ در خصوص آسیب‌های بافتی ناشی از تأثیر نانو کلوئید نقره در کبد گربه‌ماهی آفریقایی (*Clarias garepinus*) تکثیر سلول‌های کبدی، نفوذ سلول‌های التهابی، وجود هسته پیکنوتیک، تخلیه سیتوپلاسمی ، تجمع ملانوماکروفاژها، اتساع رگ خونی ، نکروز و پارگی دیواره ورید مرکزی را گزارش نمودند. با توجه به نتایج بررسی میکروسکوپی اسلایدهای تهیه شده از مقاطع بافتی در گروه‌های تیمار افزایش مقادیر عصاره آویشن شیرازی و نانوذره نقره کلوئیدی موجب افزایش شدت آسیب‌های بافتی می‌گردد لذا به نظر می‌رسد استفاده از حمام ترکیبات مورد بررسی بر روی ماهیان ازون برون انگشت قد با اهداف درمانی باید به کمترین مقادیر ممکن و نیز کمترین مدت زمان جهت تیمار ماهیان محدود گردد (معصوم زاده و همکاران، ۱۳۸۹).

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می توان در نتیجه گیری کلی عنوان نمود اگرچه نانو کلوئید نقره دارای تأثیرات ضد باکتریایی بیشتری نسبت به عصاره آویشن شیرازی بر روی باکتری آئروموناس هیدروفیلا به عنوان عامل ایجاد کننده آئروموناز‌یس دارد اما با توجه به پایین بودن غلظت نیمه‌کشندگی LC_{50} این نانوذره فلزی و نیز آسیب های بافتی ناشی از بکارگیری آن بر روی ماهیان تحت تیمار و افزایش تعداد تلفات ماهیان با افزایش غلظت این نانوذره، استفاده مستقیم از محلول نانوذره نقره بر روی ماهیان آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا می تواند موجب بروز تلفات در ماهیان تحت درمان گردیده لذا باید از انجام این امر اجتناب نمود.

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات انجام شده توسط سایر محققین، عصاره آویشن شیرازی با توجه به تأثیرات ضدباکتریایی مناسب و با توجه به داشتن غلظت نیمه‌کشندگی LC_{50} بالا می‌تواند جهت پیشگیری و درمان ماهیان مبتلاء به آئروموناز‌یس در مراحل ابتدایی بیماری در هر دو شکل حمام و خوراکی جایگزین ترکیبات ضدعفونی کننده شیمیایی و آنتی بیوتیک ها گردد. بر اساس نتایج حاصل از این بررسی در صورت تغذیه ماهیان مبتلاء به آئروموناز‌یس، استفاده از شکل خوراکی آویشن شیرازی نتایج بهتری نسبت به شکل حمام عصاره مذکور در نابودی باکتری آئروموناس هیدروفیلا و درمان ماهیان آلوده شده به این باکتری به همراه خواهد داشت.

پیشنهادها

۱- با توجه به توسعه پرورش ماهیان خاویاری در کشور و در نتیجه امکان بروز آئرومونازیس به منظور جلوگیری از تأثیرات سوء مواد ضد عفونی کننده شیمیایی و آنتی بیوتیکها جایگزینی این مواد توسط گیاهان دارویی بومی کشور از جمله عصاره آویشن شیرازی توصیه می‌گردد.

۲- با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، استفاده از عصاره آویشن شیرازی به مقدار ۱۰۰ میلی گرم به ازای ۱ کیلوگرم وزن ماهاهیان به همراه غذای مصرفی ماهیان جهت نابودی باکتری آئروموناس هیدروفیلا همزمان با گرم شدن دما و افزایش فعالیت باکتری مذکور توصیه می گردد.

۳- با توجه به اینکه غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره هیدروالکلی آویش شیرازی می‌تواند درکاهش تلفات و بهبود علائم ناشی از آلودگی ماهیان ازون برون به باکتری آئروموناس هیدروفیلا طی ۱۰ روز با استفاده از حمام روزانه به مدت یکساعت موثر باشد لذا استفاده از آن در پیشگیری و درمان آلودگی ماهیان ازون برون به باکتری آئروموناس هیدروفیلا توصیه می‌گردد.

۴- ضروری است با توجه به تفاوت‌های بین گونه‌ای ماهیان خاویاری نسبت به بررسی تأثیرات مقادیر مختلف عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی بر عوامل خونی و نیز آسیب های بافتی در آنها تحقیقات جامعی صورت پذیرد.

۵- توصیه می‌گردد با توجه به تنوع زیاد گونه های گیاهان دارویی در اکثر نقاط کشور، تأثیر گیاهان مذکور بر روی عوامل باکتریایی ماهیان مورد بررسی و مطالعه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله ضمن تشکر ویژه از همکار ارجمندم جناب آقای مهندس جلیل جلیل پور، از مساعدت های ریاست و معاونین محترم پژوهشی و برنامه ریزی انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری جناب آقای دکتر علیرضا شناور ماسوله و جناب آقای دکتر محمود محسنی و جناب آقای علیرضا علیپور و نیز مشاوران و همکاران محترم پروژه آقایان دکتر عیسی شریف پور، دکترمصطفی شریف روحانی ، دکتر سهیل بازاری مقدم، مهندس مهدي علیزاده، دکتر ذبیح ا... پژند، دکتر علي حلاجیان، خانم دکتر فروزان باقرزاده، مهندس مجید پورصفر، مهندس هوشنگ یگانه و دکتر علی حسین پور زلتی و نیز مساعدت های سرکار خانم یکتایی مدیر مالی انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری صمیمانه تشکر و قدرداني نموده توفیقات روز افزون عزیزان را از خداوند متعال خواستارم.

منابع

- آزادی ، ن.، منصوری ، ب.، جوهری ، س ع.، ملکی ، ا.، داوری ، ب.، پردل ، م ا.، **۱۳۹۴**. اثر ترکیبی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و فلز نیکل بر بافت آبشش ماهی گورخری(*Danio rerio*) . نشریه علمی فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان. دوره ۳، شماره ۱، خرداد ۱۳۹۴، صفحه ۲۹-۴۷.
- آذری تاکامی، قباد.۱۳۷۶. مدیریت بهداشتی و روشهای پیشگیری و درمان بیماریهای ماهی. انتشارات طاها-پریور. ۳۰۴ صفحه.
- ابرقویی، ص.، هدایتی، س ع.، قربانی، ر.، کلنگی میاندره، ح.، باقری ، ط. **۱۳۹۶**. بررسی سمیت غلظت‌های تحت کشنده نیترات نقره بر برخی شاخص های هماتولوژی و ایمونولوژی ماهی قرمز(*Carassius auratus*) . فصلنامه علوم و تکنولوژی محیط زیست. دوره ۱۹، (ویژه نامه شماره ۵) . شماره پیاپی ۵..صفحه ۴۲۹-۴۳۸.
- ارزانی، ن.، درویشی، ح.، شریفیان توتکله،ق.، ربیع پورا. **۱۳۸۶**. بررسی میزان حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری آئروموناس هیدروفیلا در استخرهای پرورش ماهی شهرستان تنکابن. فصلنامه علوم و فنون دریایی، شماره ۷۹، ص ۷۵-۶۵ .
- بازاری مقدم، س.، شریف روحانی، م.، شریف پور، ع.، حقیقی، ع.، مهرابی، م.، معصوم زاده، م.، جلیل پور، ج.، علیزاده، م.، شناور ماسوله، ع.، پژند، ذ.، پوردهقانی، م. حلاجیان، ع.، صادقی، م.،یزدانی، م.،پورعلی، ح. **۱۳۹۲**. بررسی تاثیر عصاره‌های سیر و آویشن شیرازی درکنترل انگل‌های خارجی بچه تاسماهی ایرانی. موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۱۴۴ صفحه.
- بنان، ا.، کلباسی مسجدشاهی، م. ر.، بهمنی،م.، یزدانی ساداتی م.ع. **۱۳۹۵**.سمیت نانوذرات نقره در مراحل ابتدایی تکامل تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و ازون برون (*Acipenser stellatus*). فصلنامه علمی- پژوهشی علوم و فنون شیلات. دوره ۵. شماره ۱. صفحه ۱۵-۲۶.
- تاکاشیما، اف.، هیبایا ، تی. **۱۳۷۸**. اطلس بافت‌شناسی ماهی، ترجمه ایرج پوستی و عبدالحمید صدیق مروستی .دانشگاه تهران، موسسه چاپ و انتشارات ، ۳۲۸ صفحه
- جوهری، س. ع . **۱۳۶۶**. کاربرد نانوذرات نقره در کاهش عفونت های قارچی تخم در دوره انکوباسیون و اثرات احتمالی رهایش آن ها بر تغییرات برخی شاخص های فیزیولوژیکی و ژنومیکی ماهی قزل آلای رنگین کمان. پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات. وزارت علوم، تحقیقات و فناوری - دانشگاه تربیت مدرس - دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی.
- جوینده ف.**۱۳۹۱**. تعیین حد کشندگی و دز درمانی، پرمنگنات پتاسیم ($KMno_4$) و سولفات مس($_4OSCu$) و تاثیر آنها بر وضعیت میکروبی پوست و آبشش و هیستوپاتولوژیکي بافت آبشش بچه ماهي آمور یا کپور علفخوار (*Ctenopharingodon idella*) .پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد لاهیجان .

- راکی، م.، پیکان حیرتی، ف.، درافشان ، س. ۱۳۹۵. تغییرات آسیب شناسی بافت آبشش و کبد عروس ماهی زاینده رود *Petroleuciscus esfahani* پس از مواجهه با نانو ذرات نقره و نیترات نقره محلول در آب. نشریه پژوهش هاي ماهی شناسی کاربردي، دوره چهارم، شماره چهارم، صفحات ۷۹-۹۵.
- رحیمی پردنجانی، م.، رییسی، م.، علیشاهی، م. ۱۳۹۴. مطالعه اثرات ضد باکتریایی برخی اسانس های گیاهی علیه باکتریهای *Lactococcus garvieae*، *Yersinia ruckeri* و *Aeromonas hydrophila* . مجله علمی شیلات ایران، دوره۲۴، شماره ۴، صفحات ۵۵-۶۴.
- رودبارکی، ص. ۱۳۹۲. بررسی تاثیر عصاره اکالیپتوس بر روی باکتری آئروموناس هیدروفیلا در ماهی آمور ، پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات دانشگاه آزاد اسلامی لاهیجان.
- زرین مهر، م. ۱۳۹۳. کاربرد فیلترهای محتوی نانوذرات نقره در کاهش عفونت ناشی از باکتری آئروموناس هیدروفیلا و ارزیابی اثرات رهایش احتمالی نانوذرات بر بازماندگی و تغییرات فیزیولوژیک ماهی زینتی گورخری(*Danio rerio*)، پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات دانشگاه تربیت مدرس - دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی.
- سلطانی م.۱۳۷۵. بیماری های باکتریایی ماهی.انتشارات سازمان دامپزشکی کشور با همکاری مؤسسه نشر جهاد.۲۷۹-۲۸۰.
- سلطانی، م. ۱۳۷۹. طرح ایمن سازی تاسماهی ایرانی بر علیه عفونت های باکتریایی (آئروموناس هیدروفیلا). گزارش نهایی. موسسه تحقیقات شیلات ایران .
- سلطانی، م. ، اسفندیاری ، م.، خضرایی نیا، س.، ساجدی ، م .۱۳۸۸. ارزیابی اثرات اسانس آویشن شیرازی بر میزان تفریخ تخم قزل آلای رنگین کمان و درصد بقائ لارو آن در مقایسه با آب اکسیژنه و مالاشیت گرین . مجله تحقیقات دامپزشکی دانشگاه تهران ، دوره ۶۴ ، شماره ۲ ، ص ۱۳۴-۱۲۷.
- شریف روحاني، م . ۱۳۸۳. بررسی کاربرد برخی اسانس ها گیاهی در کنترل آلودگیهای قرچی تخم ماهیان قزل آلای رنگین کمان بعنوان جایگزین احتمالی مالاشیت گرین در شرایط کارگاهی ، پایان نامه دکترای تخصصی بهداشت و بیماری های آبزیان دانشگاه تهران . شماره ۱۹۳.
- شریف روحانی، م.، حقیقی، م. و عصاییان، ح. ۱۳۹۰. غلظت نیمه کشنده اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) در بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان پرورشی. مجله علمی شیلات ایران. سال بیستم. شماره ۲. تابستان ۱۳۹۰. صفحات ۸۹ تا ۹۵.
- شناور ماسوله، ع. پورکاظمي، م. ستاري، م . جليل‌پور، ج. معصوم زاده ، م. ۱۳۸۲. گزارش نهايي پروژه بررسي كمي و كيفي بچه ماهيان خاوياري (بخش كنترل كيفي)، موسسه‌تحقيقات شيلات ايران. ۹۶ صفحه.

- شناور ماسوله، ع. سعيدي، ع. رستمی، ح. پورکاظمی، م. بازاری مقدم، س. جلیل پور، ج. معصوم زاده، م. علیزاده، م. پوردهقان، م. کاظمی، ر. صادقی راد، م. حقیقی، س. ۱۳۸۸. گزارش نهايي طرح ملی بررسی وضعیت بهداشتی مراکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری ، موسسه‌تحقیقات شیلات ایران. ۳۹۰ صفحه.
- عادل، م. سعیدی، ع. ا. صفری، ر. ۱۳۹۳. بررسی علل تلفات ماهیان خاویاری پرورشی (فیل ماهی و ماهی شیپ) در استان مازندران طی سال‌های ۹۰-۱۳۸۸. مجله شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحدآزادشهر.سال هشتم، شماره سوم،پاییز، ص۴۶-۳۹.
- عليشاهي، .م مصباح، و.، ۱۳۸۹.مقایسه سمیت نانو ذرات نقره ماهیان در آمور (*Ctenopharyngodon idella*) شیربت (*Barbus grypus*)، اسکار (*Astronorus ocellatus*) و سوروم (*Cichlosoma severums*) مجله بیولوژي دريا، دانشگاه آزاد اسلامي واحد اهواز، سال دوم، شماره هفتم، ص ۴۵-۵۱.
- علیشاهی ،م . مصباح ،م.۱۳۸۹ . اثر لوامیزول ، عصره اکیناسه و آویشن بر بازماندگی . برخی فاکتورهای رشد در ماهی اسکار ، نخستین همایش ماهیان زینتی ایران .
- عليشاهي، م . حيدري، م. پشم فروش، م. نجف زاده، ح. ۱۳۸۹: مطالعه اثرات ضد باکتریايي برخي عصاره هاي گياهي عليه استرپتوکوکوس اینیانی ، یرسینیا راکری و آئروموناس هیدروفیلا، مجله دامپزشكي ايران، دور ششم، شماره۲،
- عليشاهي، م. پشم فروش، م. عنایتی، آ. دادار، م. کرمی فر، م. ۱۳۸۹: مقایسه اثر ضدباکتریایی برخی نانوذرات علیه دو باکتری بیماریزای ماهی آئروموناس هیدروفیلا و یرسینیا راکری. اولین کنگره نانوداروها. ص ۷۶-۷۸.
- قهرماني، م. كلباسي، م. سلطاني ، م. جوهری، ع. ۱۳۹۱. استفاده از گرانول و الیاف زئولیت نقره (زئومیک) در سیستم فیلتراسیون آب به منظور کاهش عفونت ناشی از باکتری استرپتوکوکوس اینیائی در بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان. مجله ايران دامپزشكي دور، هشتم شماره ۴، ص ۹۳-۸۳
- کوهپایه عابد، مژدگانلو زهره، انصاری مهسا،عزتخواه مجید .۱۳۸۸. بررسی اثر عصاره متانولی گیاهان دارویی آویشن شیرازی و اوکالیپتوس بر روی باکتری لاکتوکوکوس گارویه در شرایط آزمایشگاهی، اولین همایش ملی بیماریهای اقتصادی صنعت پرورش قزل آلای رنگین کمان، کتابچه خلاصه مقالات ، صفحه ۴۰ .
- کاکاوند، ف. هدایتی، س ع. رضایی شادگان، م. جافرنوده ، ع. ۱۳۹۱ .تأثیر پیش تیمار پره بیوتیکی بر آسیب های بافتی در بچه ماهیان تیلاپیای نیل(*Oreochromis niloticus*) ، مواجهه یافته با نانو ذرات نقره. آسیب شناسی درمانگاهی دامپزشکی. دوره ۱۵، شماره ۲ پیاپی۵۸، ص ۱۱۳-۱۲۷.
- گودرزی منصور، ستاری مرتضی، نجار پیرایه شهین، بیگدلی محسن.۱۳۸۵. بررسی تاثیر عصاره های آبی و الکلی گیاه آویشن شیرازی بر روی اشرشیاکولی انتروهموراژیک، یافته، دور هشتم، شماره ۳ ، صفحات ۷۰- ۶۳.

- مشتاقی، ب. نظامی بلوچی، ش. پژند، ذ. شناورماسوله، ع. ۱۳۸۹. تعیین حد کشندگی سولفات مس و پرمنگنات پتاسیم و تأثیر آنها بر وضعیت میکروبی پوست و آبشش و بررسی هیستوپاتولوژیکی بافت آبشش بچه تاسماهیان ایرانی. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان. ۱۵۹ صفحه.
- مخیر، بابا. ۱۳۸۵. بیماریهای ماهیان پرورشی. انتشارات دانشگاه تهران.
- مزارعی، س. سوری نژاد، ا. جوهری، س.ع. اسدی، م.۱۳۹۴. تعیین غلظت کشنده نانونقره در ماهی گورخری معمولی *Aphanius dispar*. مجله بوم شناسی آبزیان دوره چهارم، شماره ۴، ص ۱۱۰-۱۱۵ .
- معصوم زاده، م. شریف روحانی، م. شناورماسوله، ع. بازاری مقدم، س. جلیل پور، ج. علیزاده، م. حقیقی، س. پوردهقانی، م. حلاجیان، ع. ۱۳۸۹. بررسی کاربرد اسانس آویشن شیرازی در کنترل آلودگیهای قارچی تاسماهی ایرانی. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۹۴ صفحه.
- معصوم زاده، م. شریف روحانی، م. شناورماسوله، ع. بازاری مقدم، س. جلیل پور، ج. علیزاده، م. پژند، ذ. مهرابی، م. حلاجیان، ع. عزیز زاده، ل. پوردهقاني، م. یگانه، ه. ۱۳۹۴. بررسی تاثیر عصاره های سیر (*Allium sativum*) و آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر روی باکتری آئروموناس هیدروفیلا در بچه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۹۷ صفحه.
- موری بختیاری،ن. پیغان، ر. منزوی، ف. ۱۳۹۵. تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در آئروموناس هیدروفیلای جدا شده از ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) پرورشی در استان خوزستان. مجله علمی شیلات ایران، سال بیست و پنجم، شماره۵، ص ۵۱-۴۱.
- Adams, S.M. 2002. Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress. CABI. 720 pages.
- Alishahi, M. and Mesbah, M. 2010. Comparison of the effect of some immunostimulants and herbal extracts on hematological parameters of Astronatus ocellatus. 1st Conference on Ornamental fish. Iran. Tehran. July 2010.
- Aoki, T. 1999. Motile Aeromonads (Aeromonas hydrophila). In: Fish Diseases and Disorders. Edited by PTK Woo and D.W Bruno. CABI Publishing, USA.pp.427-453.
- Baker, C. Pradhan, A. Pakstis, L.Pochan, Darrin J., Ismat Shah, S. 2005. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. J Nanosci Nanotechnol. 2005 Feb; 5(2):244-9.
- Brelin, D. 2008.stress coping strategics in brown trout (Salmo trutta): ecological significance aranching, Acta Universitatis Upsaliensis Upsala.68P.
- Dababneh, B.F. 2008. Antimicrobial activity of selected Jordanian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms.journal of Food, Agriculture and Environment, 6, (2)134-139.
- Didry, N. Dubreuil, L. Pinkas, M.1994. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenole on oral bacterial. Pharm. Acta. Helv. 69: 25-8.
- Esmaeli, F.Peighan,R.(1997) Infection of grass carp with the motile Aeromonas-like bacteria.Iranian Sci.Fish.J.6:1-8.
- Fuller R. 1989. A review: probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, 66: 365-378.
- Finney, D.J. 1971. Statistical methods in biological assay, 2nd Ed Hafner Publishing Company, New York; N. Y. Cambridge University Press, London, England, p. 68.
- Gong, P. Li, H. He, X. Wang, K. Hu, J. Tan, W. Tan, S. and Zhang, X.Y. 2007. Preparation and antibacterial activity of Fe3O4@Ag nanoparticles. *Nanotechnology* 18, 604– 611.
- Huang, Y. W. Cambre, M. Lee, H. Jung. 2017. The Toxicity of Nanoparticles Depends on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms. International Journal of Molecular Sciences. 18, 2702; doi:10.3390/ijms18122702.

- Imani, P. Akhlaghi, M. 2004. Immunogenicity of hemolysin, protease and Lipoplysaccharide extracted from *Aeromonas hydrophila* in common carp *Cyprinus carpiol*. Arch. Razi Ins. 57: 55-66.
- Iwama G. 1996. Innate Immunity in fish, in Iwama G. and Nakanishi T. The fish immune system. Academic Press, London, PP: 73-114.
- Johari, S.A., M. R. Kalbassi, M.R., Soltani,M., Yu, I.J. 2013. Toxicity comparison of colloidal silver nanoparticles in various life stages of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Iranian Journal of Fisheries Sciences. Volume 12, Issue 1 (2013) pp.76-95.
- Kim, J.S., Kuk, E., Yu, K.N., Kim, J.H., Park, S.J., Lee, H.J., Jeong, D.H. and Cho, M.H. (2007) Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomed Nanotechnol Biol Med 3, 95– 101.
- 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.

- Kori-Siakpere, O .2008. Acute toxicity of potassium permanganate to fingerlings of the Aferican catfish, Clarias gariepinus (Burchell,1822) African Journal of Biotecnology Vol.7(14), pp.2514-2520.
- Li, H. Liu, B. Guo, Y. Li, C. Zhang, Z. Jiao, C. 2011. Production of Nano Silver Sol Particle by Biological Reduction Process. Journal for Manufacturing Science & Production. 1(1-3).
- Mahboubi M, Akbari M, Haghi G and Kazempour N. 2007. Comparison of antimicrobial activity of Respitol-B with mentofin containing menthol, eucalyptus oil. Iranian J. of medical Microbiol. 2007; 1 (1): 39 – 45.
- Mesalhy Aly S., Abd-El-Rahman A.M., John G. and Mohamed M.F .2008. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. Aquaculture, 277: 1-6.
- Mühling, M., Bradford, A., Readman, J. W., Somerfield P. J., Handy R. D. 2009. An investigation into the effects of silver nanoparticles on antibiotic resistance of naturally occurring bacteria in an estuarine sediment. Mar Environ Res. 2009 Dec; 68(5):278-83.
- Naguib, M. Mahmoud, U. M. Mekkawy, I. A. Sayed. A. D. H. 2020. Hepatotoxic effects of silver nanoparticles on Clarias gariepinus; Biochemical, histopathological, and histochemical studies. Toxicology Reports 7 (2020) 133-141.
- Nanda, A. Saravanan, M. 2009. Biosynthesis of silver nanoparticles from Staphylococcus aureus and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. Nanomedicine. 2009 Dec;5(4):452-6.
- Nowack, B. Harald F. Krug, H.F. Height, M. 2011. 120 Years of Nanosilver History. Environ. Sci. Technol. 2011, 45, 1177–1183.
- Omima, A.E. Aboud. 2010. Application of some Egyptian medicinal Plants to eliminate Trichodina sp. and Aeromonas hydrophila in tilapia (Oreochromis niloticus). Researcher. 2(10). Pp: 12-16.
- Ostaszewska, T. Chojnacki M., KamaszewskiA .M. Sawosz-Chwalibóg E .2016. Histopathological effects of silver and copper nanoparticles on the epidermis, gills, and liver of Siberian sturgeon. Environmental Science and Pollution Research. 23(2):1621-33.
- Raa J.1996.The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming.Review of Fish Sciences,4:229-288.
- Ramasamy Harikrishnan, Chellam Balasundaram . 2008. In vitro and in vivo studies of the use of some medicinal herbals against the pathogen Aeromonas hydrophila in goldfish.J Aquat Anim Health. 2008;20(3):165-76.
- Rasooli, Rezvani, MB. 2001.Antimicrobial effects of Anicillin and essential oil of *zataria multiflora. Hakim*4:219-25.
- Razavilar, V., Hasani, A., Azari-Takami, Gh .1981. The role of *Aeromonas hydrophila* in some fish diseases.J. Fac. Vet. Vet. Med. Univ. Tehran. 27: 21-33.
- Roberts,R.J. Fish pathology .1989. Secend ed., Baillier tinndal, 467p.
- Roussis V., Chinou I., Perdetzoglou D. and Loukis A., 1996. Identification and bacteriostatic activity of the essential oil of Lamium graganicum L. spp. laevigatum Arcangeli. Journal of Essential Oil Research, 8: 291-93.
- Sanarelli, G. 1891, Ueber einen neuen Mikroorganismus des Wassers, welcher fur Thiere mit veraenderlicher und konstanter Temperatur pathogen ist, Zentralbl. Bakteriol. 9:193–199; 222–228.
- Shan, Q. Wang, Jingxin. Wang, Jing. Ma, L. Yang, F. Yin, Y. Huang, R. Liu, S. Li, L. Zheng, G. 2018. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship of enrofloxacin against *Aeromonas hydrophila* in crucian carp (*Carassius auratus* gibelio). J vet Pharmacol Therap. 2018;1–7.
- Sharif Rohani, M. Masoumzadeh, M. Ebrahimzadeh Mousavi, H. A. Sharifpour, I. Jalilpoor, J. ; Pourdehghani M. ; Shenavar Masouleh A. ; Alizadeh M. ; Bazari Moghaddam . S. 2013. The effects of oral

administration of different doses of *Zataria multiflora* essential oil on some blood and serum parameters in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). Iranian Journal of Fisheries Sciences. 12(2) 713-723.

- Sharanu, S. Biradar, N. Rajendara, Goud. Ujjwal Neogi and Ruchi Saumya .2007. In vitro and in vivo Antibacterial Studies of Medicinal Plant on Aeromonad Septicemia in Fish Caused by Aeromonas hydrophila.Journal of Fisheries and Aquatic science 2 (6): 417- 421.
- Sindambiwe, J.B. Calomme, M. Cos, P. Totte, J. Pieters, L. Vlietinck, A. 1999. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activites. J Ethnopharmacol. 1999 Apr; 65(1): 71-77.
- Stoskopf, M.K. (1993) Fish medicine. W.B. Saunders Company, 882 pages.
- Sugita, H. Tanaka, K. Yoshinami, M. and Deguchi, Y .1995. Distribution of aeromnas species in the intestinal tracts of river fish. Appl. Environ. Microbiol. 61: 4128-4130.
- T.R.C . 1984. OECD guidelines for testing of chemicals. Section 2. Effects on biotic systems. Pp. 1-39.
- Ture, M. Ozcelep, T. Akbulut, B. and Kutlu, I. 2018. Disease of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) caused by Aeromonas sp. Genetics of Aquatic Organisms 2: 43-47.
- Vanden DA, Vlietinck AJ. In: Dey PM, Harborne JB. (Eds.), Methods in plant biochemistry: screening medthods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. London: Academic Press; 1991. p: 47-69.
- Wu, Y. and Zhou, Q., 2013. Silver nanoparticles cause oxidative damage and histological changes in medaka (*Oryzias latipes*) after 14 days of exposure. Environmental Toxicology and Chemistry, 32 (1): 165–173.
- Yao, J.Y., Shen, J.Y., Li, X.L., Xu, Y., Hao, G.J., Pan, X.Y., Wang, G.X., Yin, W.L .2011. Isolation of bioactive components from Chelidonium majus L. with activity against Trichodina sp. Aquaculture. Journal. 318, 235–238.
- Yuan C., Li D., Chen W. and Sun F .2008. Administration of herbal immunoregulation mixture enhances some immune parameters in carp (Cyprinus carpio). Fish Physiology and Biochemistry, 10: 1007-1120.

Abstract:

In this study, after preparing the bacterium Aeromonas hydrophila using a antibiogram test The effect of disks containing different antibiotics on the bacterium was investigated. Based on the results, the maximum diameter of the growth inhibition zone of Aeromonas hydrophila was related to the disc containing the antibiotic fulmokine with 22 mm. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of Aeromonas hydrophila by Zataria multiflora extract and colloidal silver nanoparticles and also the determination of lethal concentrations (LC50) of thm in external stellate sturgeon (Acipenser stellatus) as well as the effectiveness and determination of the effective amounts of the mentioned compounds on infected fish with Aeromonas hydrophila were studied. Based on in vitro studies, the minimum inhibitory concentration (MIC) of Aeromonas hydrophila by Zataria multiflora extract and colloidal silver nanoparticles was 0.25 mg/l and 0.5 mg/l, and the minimum bactericidal concentration (MBC) of Aeromonas hydrophila were determined by Zataria multiflora extract and colloidal silver nanoparticles 0.25mg/l and 0.25mg/l, respectively.The study on lethal concentration (LC50) of Zataria multiflora hydroalchoholic extract and silver nanoparticles on fingerlings of stellate sturgeon showed that during 96h, the LC50 was 766.65 and 11.10 mg /l respectively.After conducting studies to determine the lethal concentrations of hydroalcoholic extract of Zataria multiflora and colloidal silver nanoparticles, according to the obtained results, studies were performed to determine the effective concentrations of these compounds in the treatment of stellate sturgeon fry infected by Aeromonas hydrophila. In this study, the concentrations of hydroalcoholic extract of Zataria multiflora extract were calculated from 400 to 1000 mg/l and the concentrations of colloidal silver nanoparticles were 0.1 to 0.5 mg/l for the treatment of Acipenser stellatus infected with Aeromonas hydrophila. In this study, the results of differential white blood cell counts of blood samples prepared from fish treated with different amounts of Zataria multiflora extract and colloidal silver nanoparticles showed a statistically significant difference in lymphocyte, neutrophil, and eosinophil levels between treatments and controls ($P<0.05$).
Examination of slides prepared from gill, liver and skin of stellate sturgeon fry tissue sections sampled from the treatment groups that were affected by different concentrations of hydroalcoholic extract of Zataria multiflora and colloidal silver nanoparticles. Showed the adhesion in gill fibers, cell necrosis, presence of melanin pigments in primary fibers in gills, complications such as cloudy swelling in hepatocytes, cell necrosis, hyperemia and increased melanin pigments in the liver, as well as changes such as hyperemia, dilatation of glomerular space and showed Bowman's occlusion, bleeding, cell necrosis, cloud swelling, and hypertrophy in the kidney.

Keywords: *Zataria multiflora* hydroalchoholic extract, Colloidal silver nanoparticles, *Acipenser stellatus*, Minimum inhibitory concentration (MIC), Minimum bactericidal concentration (MBC)

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

---

Project Title: Replacement of *Zataria multiflora* extract and silver nanoparticles instead of selective antibiotic for treat of Aeromonasis in *Acipenser stellatus*
Approved Number: 2-32-32-010-961143
Author: Mehdi Masoumzadeh
Project Researcher: Mehdi Masoumzadeh
Provincial Researchers: -
Collaborator(s): Jalil Jalilpour, Soheil Bazari Moghaddam, Mehdi Alizadeh, Zabih Ollah Pajand, Alireza Shenavar Masouleh, Ali Hallajian, Ali Hosseinpour Zelti, Foroozan Bagherzadeh, Houshang yeganeh, Majid Poursafar
Advisor(s): Issa Sharif pour, Mostafa Sharif Rohani
Supervisor: -
Location of execution: Guilan Province
Date of Beginning: 2018
Period of execution: 4 Years & 2 Months
Publisher: Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing: 2023

All Right Reserved. No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference.

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute - International Sturgeon Research Institute

Project Title:

Replacement of *Zataria multiflora* extract and silver nanoparticles instead of selective antibiotic for treat of Aeromonasis in *Acipenser stellatus*

Project Researcher:

Mehdi Masoumzadeh

Register NO.

64298