13 (2) 217-230, Summer 2021

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Evaluating disinfecting effect of Henna Extract (*Lawsonia inermi*) compared with copper sulfate ($CuSo_4.5H_2o$) and its effect on gill and liver tissues and bacterial and fungal loads on skin and gills of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*)

Rohollah Barzegar [1], Masoud Farokhrouz [*1], Hossein Khara [1], Alireza Shenavar Masouleh [2], Mohaddeseh Ahmadnezhad [3]

[1] *Department of Fisheries, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran*
[2] *International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Iranian Fisheries Sciences research, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran*
[3] *Inland Waters Aquaculture Research Center. Iranian Fisheries Sciences research, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Anzali, Iran*

Key Words

Henna (*Lawsonia inermis*)
Copper sulfate ($CuSo_4.5H_2o$)
Siberian sturgeon
(*Acipenser baerii*)
Histology
Bacterial and fungal loads

Abstract

Introduction: Henna contains various compounds such as carbohydrates, proteins, flavonoids, tannins, phenolic compounds, alkaloids, trinoids, quinone, coumarins, xanthones and fatty acids.

Materials & Methods: In the present study, the disinfectant effects of henna extract compared to copper sulfate ($CuSo_4.5H_2O$) and effects on gill and liver histopathology in Siberian sturgeon were studied (*Acipenser baerii*). 500 fish (15 gr) were selected. At first, the LC_{50} and then the maximum allowable concentration (MAC) of Henna extracts were determined. Then, six treatments were designed, each with 3 repetitions. In treatments 1 to 4, amount of MAC, 25%, 50%, and 75% of the MAC value were used. Also, in treatment 5, copper sulfate at 0.07 mg / l was used to compare its effect with others. Fish were exposed to different concentrations for 4 days (96 hours). The bacterial and fungal loads of gill and skin was counted on TSA and SDA plate agar, respectively. Histology of gill and liver were examined after preparing tissue sections. In the present study, the disinfectant effects of henna extract compared to copper sulfate ($CuSo_4.5H_2O$) and effects on gill and liver histopathology in Siberian sturgeon were studied (*Acipenser baerii*). 500 fish (15 gr) were selected. At first, the LC_{50} and then the maximum allowable concentration (MAC) of Henna extracts were determined. Then, six treatments were designed, each with 3 repetitions. In treatments 1 to 4, amount of MAC, 25%, 50%, and 75% of the MAC value were used. Also, in treatment 5, copper sulfate at 0.07 mg / l was used to compare its effect with others. Fish were exposed to different concentrations for 4 days (96 hours). The bacterial and fungal loads of gill and skin was counted on TSA and SDA plate agar, respectively. Histology of gill and liver were examined after preparing tissue sections.

Result: The results showed that after copper sulfate, the best (lowest) values were observed in treatments 2 (25% MAC value of henna) and 3 (50% MAC value of henna) in terms of bacterial and fungal loads. The least tissue damage was observed in treatments 2 (25% MAC value of henna) and 3 (50% MAC value of henna) in terms of gill and liver lesions and other treatments had the most tissue lesions.

Conclusion: Generally, it can be concluded that treatments 2 (25% MAC value of henna) and 3 (50% MAC value of henna) can be a good alternative to copper sulfate.

* Corresponding Author's email: dr.farokhrouz@gmail.com

Received: 27 June 2020; Reviewed: 13 September 2020; Revised: 3 November 2020; Accepted: 6 December 2020
(DOI): 10.22034/aej.2021.137000

مقاله پژوهشی

ارزیابی اثرات ضدعفونی‌کنندگی عصاره گیاه حنا (*Lawsonia inermis*) در مقایسه با سولفات مس ($CuSo_4.5H_20$) بر بافت آبشش و کبد و میزان بار باکتریایی و قارچی پوست و آبشش تاس‌ماهی سیبری (*Acipenser baerii*)

روح‌الله برزگر[۱]، مسعود فرخ روز[۱]، حسین خارا[۱]، علیرضا شناورماسوله[۲]، محدثه احمدنژاد[۳]*

[۱] گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

[۲] موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

[۳] پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرانزلی، ایران

کلمات کلیدی

گیاه حنا (*Lawsonia inermis*)
سولفات مس ($CuSo_4.5H_2O$)
تاس‌ماهی سیبری (*Acipenser baerii*)
بافت‌شناسی
بار باکتریایی و قارچی

چکیده

مقدمه: گیاه حنا (*Lawsonia inermis*) حاوی ترکیباتی نظیر کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، فنول‌ها، آلکالوئیدها، ترینوئیدها، کوئینون‌ها، کومارین‌ها، گزانتون‌ها و اسیدهای چرب است.

مواد و روش‌ها: در تحقیق حاضر، اثرات ضدعفونی‌کنندگی عصاره گیاه حنا در مقایسه با سولفات مس (CuSo4.5H2O) و تاثیر بر بافت آبشش و کبد تاس‌ماهی سیبری (Acipenser baerii) بررسی شد. ۵۰۰ قطعه تاس‌ماهی سیبری ۱۵ گرمی انتخاب شدند. ابتدا LC50 و سپس میزان حداکثر غلظت مجاز (MAC) عصاره گیاهی حنا تعیین شد. آن‌گاه، ٦ تیمار، هر یک با ۳ تکرار طراحی شدند. در تیمارهای ۱ تا ٤، مقادیر MAC و هم‌چنین، ۲۵٪، ۵۰٪، و ۷۵٪ از MAC و در تیمار ۵ از سولفات مس به‌میزان ۰/۰۷ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. تاس‌ماهیان سیبری برای مدت ٤ روز(۹٦ ساعت) تحت تاثیر ترکیبات با غلظت‌های تعیین شده قرار گرفتند. بار باکتریایی و قارچی آبشش و پوست با کشت نمونه به‌ترتیب در محیط‌های کشتTSA و SDA شمارش شد. بررسی آسیب‌های بافتی پس از تهیه مقاطع بافتی از بافت آبشش و کبد ماهی انجام گردید.

نتایج: نتایج نشان داد که از نظر بار باکتریایی و قارچی پوست و آبشش پس از سولفات مس، بهترین (کم‌ترین) مقادیر در تیمارهای ۲ (۲۵٪ MAC value حنا) و ۳ (۵۰٪ MAC value حنا) مشاهده شد. از نظر ضایعات بافت آبشش و کبد، کم‌ترین آسیب بافتی در تیمارهای ۲ (۲۵٪ MAC value حنا) و ۳ (۵۰٪ MAC value حنا) مشاهده شد و سایر تیمارها دارای بیش‌ترین ضایعات بافتی بودند.

نتیجه‌گیری و بحث: به‌طورکلی، می‌توان نتیجه گرفت که تیمارهای ۲ (۲۵٪ MAC value حنا) و ۳ (۵۰٪ MAC value حنا) می‌توانند جایگزین مناسبی برای سولفات مس باشند.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: dr.farokhrouz@gmail.com

تاریخ دریافت: ۷ تیر ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۲۳ شهریور ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۱۳ آبان ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۱٦ آذر ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/aej.2021.137000

مقدمه

با رشد روزافزون جمعیت جهان، تأمین غذا و استفاده از منابع جدید غذایی یکی از مهم‌ترین دغدغه‌های دولت‌ها گردیده است (فرقاندوست‌حقیقی و همکاران، ۱۳۸۹). آبزی‌پروری سریع‌ترین منبع تولید پروتئین‌های حیوانی می‌باشد که سبب تولید بیش از یک سوم ماهیان مصرفی در جهان می‌شود (FAO، ۲۰۱۲). در این راستا، مراکز تولیدکننده آبزیان مختلف در جهان در حال افزایش می‌باشد و به‌دلیل وجود انواع عوامل بیماری‌زا نظیر انگل‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها در محیط زیست این موجودات، احتمال بروز انواع بیماری‌ها افزایش می‌یابد (ناجی و همکاران، ۱۳۸۶). یکی از شرایط مهم تولید آبزیان در محیط پرورشی حفظ بهداشت و جلوگیری از ابتلای ماهیان به بیماری‌ها به‌ویژه بیماری‌های عفونی و غیرعفونی است (Cho و Lee، ۲۰۱۲). یکی از راهکارهای بالا بردن مقاومت ماهیان در برابر شرایط آلودگی در محیط پرورشی، استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده می‌باشد. انواع مختلفی از مواد ضدعفونی‌کننده شیمیایی نظیر نمک، فرمالین، سولفات مس، هالامید و ... در مزارع پرورش ماهی استفاده می‌گردد (مخیر، ۱۳۸۵) که دارای فواید غیرقابل انکاری هستند. با این‌حال، سبب بروز اثرات منفی می‌گردند. اخیراً، توجه زیادی به استفاده از تولیدات گیاهی به‌عنوان دارو و ضدعفونی‌کننده به‌منظور جایگزینی با داروهای شیمیایی شده است(Saeidi و همکاران، ۲۰۱۲) که می‌توانند در بسیاری از موارد جایگزین مناسبی برای سایر ترکیبات دارویی باشند (Imanipour و Rohe، ۲۰۱۵). با این‌حال، تعیین یک استاندارد برای استفاده از گیاهان‌دارویی در آبزی‌پروری نیاز به‌مطالعات‌بیش‌تری دارد (Gabriel و همکاران، ۲۰۱۵). وجود ترکیبات شیمیایی در این گیاهان سبب بروز خواص ضدباکتری، ضدویروس، ضدقارچ و ضدانگل می‌شود (فتح‌الهی و جوهری، ۱۳۹۴). علاوه بر این، این گیاهان سبب تحریک اشتها و رشد، افزایش وزن، تحریک سیستم ایمنی و خواص ضداسترس می‌شوند (Reverter و همکاران، ۲۰۱۴). به‌نظر می‌رسد که این خواص به‌دلیل وجود آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، تانن‌ها، ساپونین‌ها، گلیکوسیدها، فالنوئیدها، فنولیک‌ها، استروئیدها و اسانس‌های روغنی باشد. حضور فنول‌ها، پلی‌ساکاریدها، پروتئوگلیکان‌ها و فلاونوئیدها در مواد گیاهی سبب پیشگیری یا کنترل عفونت‌های میکروبی می‌شود (Citarasu، ۲۰۱۰). گیاه حنا حاوی ترکیبات مختلفی نظیر کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، ترکیبات فنولی، آلکالوئیدها، ترینوئیدها، کوئینون‌ها، کومارین‌ها، گزانتون‌ها و اسیدهای چرب است (Rajwar و Khatri، ۲۰۱۱) و دارای خواص آنتی‌بیوتیکی و ضدقارچی بوده و در بهبود و ترمیم زخم‌ها موثر است (Santhanamari و همکاران، ۲۰۱۱). آسیب‌شناسی بافتی روشی مفید جهت مطالعه سلامت آبزیان بوده (Hao و همکاران، ۲۰۱۳) و می‌تواند به‌عنوان شاخصی مناسب جهت نشان دادن تغییرات آسیب‌شناسی و فیزیولوژیک استفاده شود (رهبر و همکاران، ۱۳۹۸). باکتری‌های مسبب بیماری در ماهیان، بیش‌تر جز باکتری‌های حقیقی (یو باکتری‌ها)، ری‌باکتری‌ها (اکتینومیست‌ها) و باکتری‌های سرخورنده (سیتوفاگاها) می‌باشند. اغلب این عوامل بیماری‌زا جز باکتری‌های میله‌ای گرم منفی هستند. عوامل بیماری‌زای قارچی در ماهیان نیز متعلق به گروه قارچ‌های گندیده‌خوار اختیاری می‌باشند. عواملی نظیر شرایط محیطی نامطلوب، سوءتغذیه و سایر بیماری‌های اولیه سبب همه‌گیری‌های قارچی می‌شوند (ستاری، ۱۳۸۷). آبشش ماهیان یکی از بافت‌های بازتاب‌دهنده وضعیت سلامت ماهی بوده (Bais و Lokhande، ۲۰۱۲) و چنان‌چه محیط‌زیست ماهی سالم نباشد یا مواد موجود در آب فاقد کیفیت مناسب باشد، بافت آبشش دچار مشکلات جدی می‌شود (ویسی و همکاران، ۱۳۹۳). استفاده از بافت کبد به‌عنوان شاخص سلامت ماهیان بسیار معمول بوده و مهم‌ترین اندام در انجام فرایندهای فیزیولوژیکی و متابولیسمی بدن در زمان مواجهه با آلاینده‌هاست (کامرانزاده و همکاران، ۱۳۹۷). کبد به‌دلیل وجود آنزیم‌های متابولیزکننده و متابولیسم‌های متعدد، در معرض بروز علائمی نظیر نکروز، تغییرات هسته‌ای سلول‌های کبدی، تورم و رقیق شدن سینوزوئیدها می‌باشد (Ashish و Banalata، ۲۰۰۸). پوست نیز از اجزای مهم سیستم‌های دفاعی ماهیان می‌باشد (سلطانی، ۱۳۸۷). در سال‌های اخیر، ذخایر ماهیان خاویاری به‌طور چشمگیری کاهش یافته است (Moghim، ۲۰۱۳) و این امر سبب توجه بیش‌تر به پرورش این ماهیان به‌جای صید بی‌رویه در ایران و سایر کشورها شده است (رئیسی و همکاران، ۱۳۹۳). از طرفی، پرورش ماهیان خاویاری به‌عنوان صنعتی موفق در تولید خاویار و گوشت تلقی می‌شود (Geraylou و همکاران، ۲۰۱۲) و از جایگاه ویژه‌ای در بخش آبزی پروری برخوردار می‌باشد. ماهیان خاویاری به‌دلیل اهمیت بقای نسل و تولید خاویار و گوشت دارای اهمیت بالایی هستند (سلحشوری و همکاران، ۱۳۹۶). بنابراین، بسیاری از مطالعات روی پرورش این ماهیان متمرکز شده است. در این میان، تاس‌ماهی سیبری می‌تواند یک مدل زیستی مناسب جهت مطالعات فیزیولوژی و تغذیه‌ای سایر تاس‌ماهیان بومی در نظر گرفته شود (Fontagne و همکاران، ۲۰۰۶). تاکنون مطالعاتی درباره اثر مواد گیاهی روی بافت و عوامل بیماری‌زای آبزیان مختلف انجام شده است که می‌توان به مطالعات رحیمی‌پردنجانی و همکاران (۱۳۹۴) روی اثرات ضدباکتریایی برخی اسانس‌های گیاهی علیه باکتری‌های *Yersinia ruckeri*، *Lactococcus garvieae* و *Aeromonas hydrophila*، فیروزبخش و همکاران (۱۳۹۴) روی فعالیت ضدقارچی عصاره‌های گیاه گزنه (*Urtica dioica*) و ریحان (*Ocimum basilicum*) بر قارچ *ساپرولگنیا پارازتیکا*، روحی و همکاران (۱۳۹۵) روی اثر مکمل‌های گیاهی زیره سیاه (*Carum carvi*) و شنبلیله

(*Trigonella foenum graecum*) بر فعالیت ضدباکتریایی و پروتئین محلول موکوس در بچه‌ماهیان کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*)، عادل و همکاران (۱۳۹۵) روی اثرات ضدباکتریایی برخی از عصاره‌های گیاهی گلپر (*Heracleum persicum*)، رازیانه (*Foeniculum Vulgare*)، اسفرزه (*Plantago psyllium*)، چای سبز (*Camellia sinensis*)، گزنه و سیر (*Allium sativum*) بر باکتری *Yersinia ruckeri* در شرایط آزمایشگاهی، حبیبی و همکاران (۱۳۹۷) روی خاصیت ضدباکتریایی گیاهان دارویی آویشن باغی (*Thymus vulgaris*)، پونه (*Mentha longiflora*) و زیره سیاه بر جدایه‌های بیماری‌زای *استرپتوکوکوس اینیایی*، زارعی‌نوذری و همکاران (۱۳۹۹) روی تأثیر اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و پودر زنجبیل (*Zingiber officinale*) بر شاخص‌های رشد، ایمنی و مقاومت بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مواجه با باکتری *Yersinia ruckeri*، Kumar و Trivedi (۲۰۱۵) روی کارایی عصاره اتانولی برگ گیاه حنا در برابر مسمویت مس القا شده در ماهی *Channa punctatus*، Baba و همکاران (۲۰۱۶) روی اثر عصاره جوی دوسر (*Avena sativa*) در برابر باکتری *Aeromonas hydrophila* در ماهی کپور معمولی، Mansouri Taei و همکاران (۲۰۱۷) روی اثر گیاه مورد بر پارامترهای ایمنی غیراختصاصی و فعالیت باکتری‌کشی در بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین کمان، Masoumian و Zandi (۲۰۱۷) روی فعالیت ضدمیکروبی عصاره هیدروالکلی گیاه مورد در برابر برخی باکتری‌های مقاوم و Kumar Sharma و Goel (۲۰۱۸) روی قدرت بالقوه ضدباکتریایی عصاره برگ گیاه حنا اشاره کرد. با توجه به این که استفاده از گیاهان دارویی اثرات مضر کم‌تری دارد و از آن‌جایی‌که تاس‌ماهی سیبری همانند سایر ماهیان در معرض انواع بیماری‌ها قرار دارد، این پژوهش با هدف ارزیابی اثرات ضدعفونی‌کنندگی عصاره گیاه حنا در مقایسه با سولفات مس بر بافت آبشش و کبد و میزان بار باکتریایی و قارچی پوست و آبشش تاس‌ماهی سیبری انجام گردید تا بتوان گامی در جهت استفاده از مواد غیرشیمیایی جهت مرتفع ساختن نیازهای مزارع پرورش ماهی به‌خصوص ماهیان خاویاری برداشت.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر در سال ۱۳۹۸ انجام شد. جهت انجام این تحقیق ۵۰۰ قطعه تاس‌ماهی سیبری ۱۵ گرمی استفاده شد. مخازن توسط پمپ هوا هوادهی و توسط آب چاه آبگیری شد. فاکتورهایی نظیر درجه حرارت، اکسیژن و pH با استفاده از دماسنج، اکسیژن‌متر و pHمتر (WTW، ساخت آلمان) و فاکتورهای نیتریت، نیترات و سختی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (HACH-LONGE، ساخت آلمان) و هدایت الکتریکی نیز با استفاده از دستگاه Water quality meter اندازه‌گیری شد (رضایی‌تبار و همکاران، ۱۳۹۶). در طول انجام تحقیق، مقادیر درجه‌حرارت،اکسیژن،pH،نیتریت، نیترات، سختی و هدایت الکتریکی به‌ترتیب برابر با ۲۱/۵ درجه سانتی‌گراد، ۶/۶ میلی‌گرم در لیتر، ۷/۴، ۲/۹ میلی‌گرم در لیتر، ۰/۰۴۱ میلی‌گرم در لیتر، ۳۸۰ میلی‌گرم در لیتر و ۱۲۲۸ میکروموس بر سانتی‌متر بود. عصاره گیاه حنا از شرکت کشت و صنعت و داروسازی گیاه اسانس دکتر سلیمانی تهیه گردید. ابتدا اثرات سمیت حاد LC50، ۹۶ ساعته عصاره حنا روی بچه‌ماهیان تاس‌ماهی سیبری تعیین شد و ثبت تلفات هر ۲۴ ساعت یک‌بار انجام شد. بعد از کسب نتایج نهایی، اطلاعات حاصل بر طبق روش آماری Program version Probit 1.5 که به‌وسیله EPA آمریکا طراحی شده است، با سطح اطمینان ۹۵٪ تجزیه و تحلیل شد و مقادیر LC10، LC50 و LC90 طی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به‌دست آمد (Finney، ۱۹۷۱). پس از تعیین مقدار LC50، میزان حداکثر غلظت مجاز (MAC value) با تقسیم میزان LC50 در ۹۶ ساعت بر عدد ۱۰ محاسبه شد (Finney، ۱۹۷۱؛ T.R.C، ۱۹۹۲) و بعد از آن دوزهای مشخصی از عصاره حنا در چهار دوز، یعنی مقادیری برابر با خود MAC و مقادیری به‌اندازه ۲۵٪، ۵۰٪، و ۷۵٪ از MAC برای هر یک از عصاره‌ها مشخص شد. لازم به ذکر است که میزان LC50 عصاره حنا برابر با ۳۶۳/۰ میلی‌گرم در لیتر بود. در ادامه، برای هر عصاره گیاهی ۴ تیمار با ۳ تکرار به‌شرح جدول ۱ تعیین و یک تیمار هم با استفاده از سولفات مس به‌میزان ۰/۰۷ میلی‌گرم در لیتر استفاده گردید و به آب تیمار شاهد نیز هیچ ماده‌ای افزوده نشد. ماهیان پس از ۲ هفته سازگاری در مخازن ۱۰۰ لیتری توزیع شده و به‌مدت ۴ روز (۹۶ ساعت) تحت تاثیر ترکیبات با غلظت‌های معین قرار گرفتند. حین انجام آزمایش، جریان آب قطع و هوادهی به‌طور مداوم صورت پذیرفت. تعویض آب ۱۰۰ درصد با آب هم دما با محیط و حاوی غلظت موردنظر عصاره حنا، سولفات مس و یا آب فاقد افزودنی (تیمار شاهد) به‌صورت روزانه انجام شد (شاملوفر و همکاران، ۱۳۹۴). جهت بررسی میزان بار باکتریایی و قارچی پوست و آبشش، بچه‌ماهیان به صورت تصادفی از هر تکرار در هر تیمار انتخاب شده و پس از انجام عملیات ضدعفونی در شرایط استریل، ۱ سانتی‌مترمربع از پوست و ۱ گرم از آبشش نمونه‌برداری گردید. به‌منظور بررسی باکتری‌شناسی، نمونه‌ها ۳ بار با سرم فیزیولوژی استریل (۰/۹٪) شستشو شده و محلول هموژنی در ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد. پس از تهیه رقت‌های لازم (از ۱۰-۱ تا ۱۰-۷)، ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت‌ها به وسیله سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط کشت تریپتیک سوی آگار (TSA) به‌روش کشت سطحی تلقیح انجام شد و پلیت‌ها در دمای ۲۰

درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷۲-۴۸ ساعت انکوبه شدند. سپس، کلنی‌ها براساس CFU (Forming Unit Colony) مورد شمارش قرار گرفتند (Ringo و Gatesoup، ۱۹۹۸).هم‌چنین،به‌منظور بررسی قارچ‌شناسی، نمونه‌ها ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو و به ظروف استریل حاوی ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل منتقل شد. پس از تهیه محلول سوسپانسیون جهت شمارش کلی، اقدام به‌رقیق‌سازی(۱-۱۰ تا ۱۰-۲) درلوله‌های آزمایش استریل گردیدو ۰/۵ میلی‌لیتر از رقت‌های به‌دست آمده توسط سمپلر روی محیط‌های کشت SDA حاوی کلرامفنیکل ۰/۱٪ و جنتامایسین ۸۰ میلی‌گرم کشت داده شد. پلیت‌های کشت شده به‌مدت ۳ تا ۵ روز به‌منظور شمارش کلی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. شمارش‌ها براساس میانگین حسابی دو شمارش که در ضریب رقت ضرب شده بود محاسبه گردیدند (شادزی، ۱۳۸۳).

جدول ۱: تیمارهای مورد استفاده در آزمایش

نام تیمار	نام دیگر	مقدار سولفات مس (میلی‌گرم/لیتر)	مقدار عصاره حنا (میلی‌گرم/لیتر)
تیمار شاهد	LC_0– شاهد	۰	۰
تیمار ۱	MAC value حنا	۰	۳۶/۳
تیمار ۲	MAC value٪۲۵ حنا	۰	۹/۰۷۵
تیمار ۳	MAC value٪۵۰ حنا	۰	۱۸/۱۵
تیمار ۴	MAC value٪۷۵ حنا	۰	۲۷/۲۵
تیمار ۵	سولفات مس	۰/۰۷	۰

جهت بررسی آسیب‌های بافتی آبشش و کبد ماهیان، یک سانتی‌متر از بافت برداشته شد و در محلول بوئن تثبیت گردید. سپس، نمونه‌ها در الکل ۷۰ درصد قرار داده شدند و پس از انجام مراحل آبگیری، شفاف‌سازی و قالب‌گیری، برش‌هایی با ضخامت ۶-۴ میکرون از بافت‌ها تهیه شد (پوستی و همکاران، ۱۳۸۲؛ شریف‌پور و حلاجیان، ۱۳۹۴) و با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین-هماتوکسیلین برش‌های بافتی رنگ‌آمیزی شدند. در ادامه، از میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین و متصل به کامپیوتر برای بررسی نمونه بافت‌ها استفاده شد (حلاجیان و همکاران، ۱۳۹۰). تجزیه و تحلیل کلیه داده‌ها با نرم‌افزار SPSS ۲۲ و رسم نمودارها با برنامه Excel ۲۰۱۳ انجام شد. اطمینان از نرمال بودن داده‌ها نیز با استفاده از آزمون Shapiro-wilk صورت پذیرفت. در صورت نرمال بودن توزیع داده‌ها، از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و برای جداسازی گروه‌های همگن از آزمون توکی در سطح احتمال ۵٪ استفاده شد.

نتایج

با توجه به آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه‌وتوکی بین تیمارها از نظر تعداد باکتری‌های آبشش و پوست در محیط TSA اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد ($P<0/05$). به‌طوری‌که کم‌ترین تعداد باکتری‌های آبشش در محیط TSA در تیمار ۵ (سولفات مس) و کم‌ترین تعداد باکتری‌های پوست درمحیط TSA در تیمار ۲ (MAC value ٪۲۵ حنا) مشاهده گردید(جدول ۲). باتوجه به آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و توکی بین تیمارها از نظر تعداد قارچ‌های آبشش و پوست در محیط SDAاختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد($P<0/05$).به‌طوری‌که کم‌ترین تعدادقارچ‌های آبشش در محیط SDAدر تیمارهای شاهد(LC_0– شاهد)، ۱ (MAC value حنا)، ۳(MAC value ٪۵۰ حنا)، ۴ (MAC value٪۷۵ حنا) و ۵ (سولفات مس) و کم‌ترین تعداد قارچ‌های پوست در محیط SDA در تیمارهای ۳ (MAC value ٪۵۰ حنا) و ۵ (سولفات مس) مشاهده گردید (جدول ۳).

جدول ۲: نتایج اندازه‌گیری تعداد باکتری‌های آبشش و پوست تاس‌ماهی سیبری در تیمارهای مختلف

شاخص‌ها	تیمارها	تیمار شاهد (LC_0– شاهد)	تیمار ۱ (MAC value حنا)	تیمار ۲ (٪۲۵ MAC value حنا)	تیمار ۳ (٪۵۰ MAC value حنا)	تیمار ۴ (٪۷۵ MAC value حنا)	تیمار ۵ (سولفات مس)
تعداد باکتری‌های آبشش در محیط TSA (CFU/g)		۱۰/۶۷±۱/۵۳ [b]	۱۵۷/۶۷±۱/۵۳ [d]	۵۲۱/۶۷±۱/۵۲ [e]	۱۱/۶۷±۱/۵۳ [b]	۳۵/۳۳±۱/۵۳ [c]	۳/۶۷±۱/۵۳ [a]
تعداد باکتری‌های پوست در محیط TSA (CFU/cm^2)		۵۷۵/۶۷±۱/۵۳ [c]	۴۱۱/۶۷±۲/۵۲ [b]	۱۷۰/۶۷±۲/۵۲ [a]	۲۴۲۹/۶۷±۲/۵۲[f]	۱۱۵۹/۶۷±۱/۵۳[e]	۷۳۱/۶۷±۱/۵۳[d]

حروف لاتین غیرمشترک در هر ردیف، نشان‌دهنده اختلاف بین تیمارها است ($P<0/05$).

جدول ۳: نتایج اندازه‌گیری تعداد قارچ‌های آبشش و پوست تاس‌ماهی سیبری در تیمارهای مختلف

شاخص‌ها	تیمارها	تیمار شاهد (LC_0– شاهد)	تیمار ۱ (MAC value حنا)	تیمار ۲ (٪۲۵ MAC value حنا)	تیمار ۳ (٪۵۰ MAC value حنا)	تیمار ۴ (٪۷۵ MAC value حنا)	تیمار ۵ (سولفات مس)
تعداد قارچ‌های آبشش در محیط SDA(CFU/g)		۰/۴۴±۰/۵۳ [a]	۰/۲۲±۰/۴۴ [a]	۱۶۸/۵۶±۴۰/۶۵[b]	۰/۲۲±۰/۴۴ [a]	۱/۳۳±۱/۳۲ [a]	۰/۲۲±۰/۴۴ [a]
تعداد قارچ‌های پوست در محیط SDA (CFU/cm^2)		۱۶۶/۶۷±۷/۸۱ [b]	۳۱۱±۱۶/۶۳ [c]	۱۸۲/۶۷±۲۵/۶۸[b]	۸۲/۷۸±۵/۶۵ [a]	۹۷۵±۶۱/۰۸ [d]	۵۴/۳۳±۵/۶۶ [a]

حروف لاتین غیرمشترک در هر ردیف، نشان‌دهنده اختلاف بین تیمارها است ($P<0/05$).

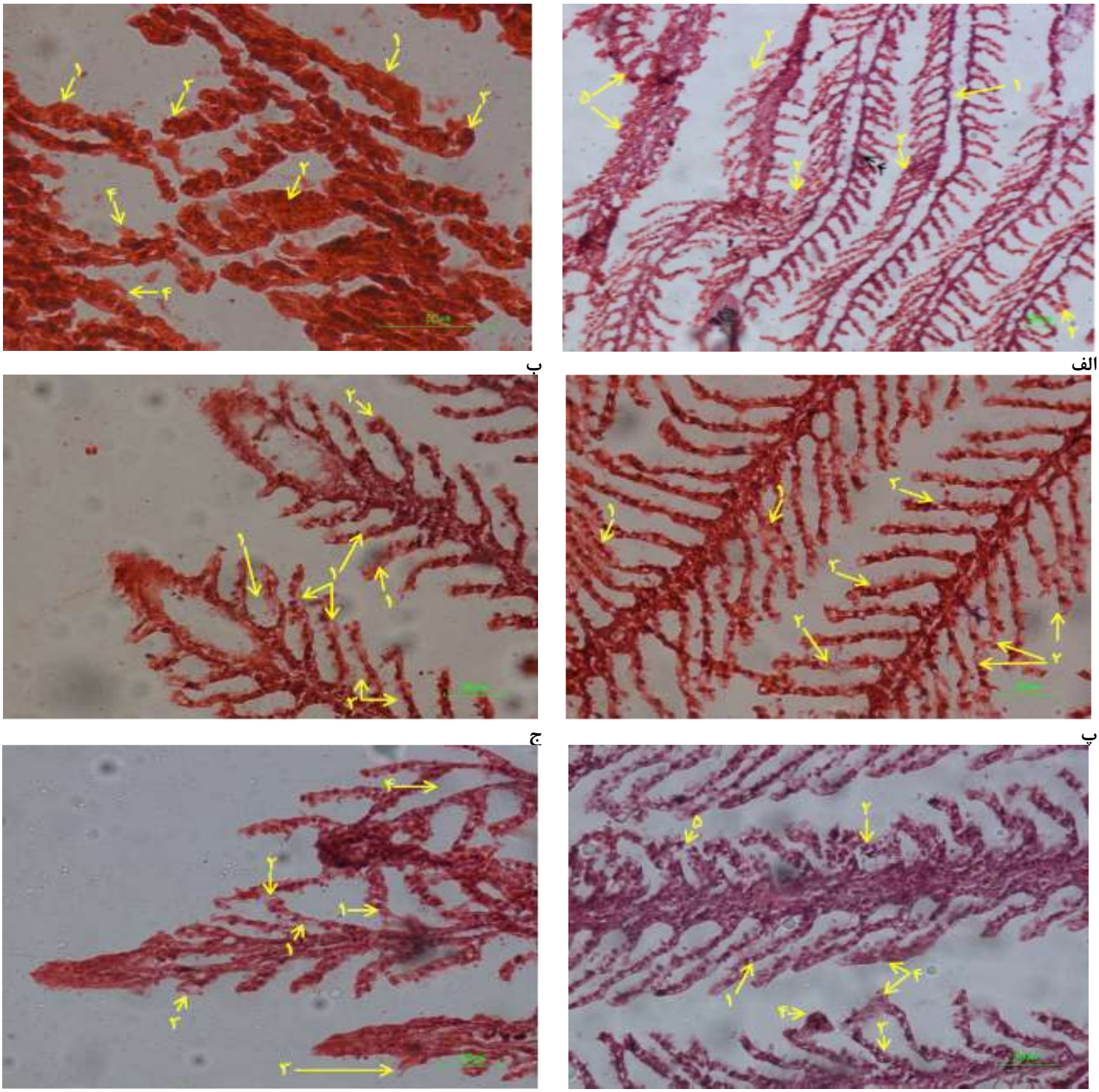
نتایج بررسی میکروسکوپی اسلایدهای تهیه شده از بافت آبشش تاس‌ماهی سیبری در معرض تیمارهای مختلف نشان داد که در تیمار شاهد(LC0- شاهد) ۶ ضایعه مشاهده شد که از بین آن‌ها ادم و پوسته پوسته شدن اپیتلیوم لاملا و گشادشدگی مویرگ داخلی فیلامنت‌ها به‌شدت وجود داشتند، درحالی‌که به‌هم چسبیدگی و پیچ‌خوردگی در لاملاها و گرزی شدن نوک لاملا به‌صورت خفیف وجود داشت. در تیمار ۱ (MAC value حنا)، ۱۰ ضایعه مشاهده شد که ضایعه گشادی مویرگ داخلی تیغه‌های اولیه یا فیلامنت‌ها با شدت زیاد، ۵ ضایعه پوسته پوسته شدن اپیتلیوم لاملا، پیچ‌خوردگی و به‌هم چسبیدگی لاملاها، هایپرتروفی اپیتلیوم لاملا و گرزی شدن نوک لاملا به‌طور متوسط و ۴ ضایعه ادم در اپیتلیوم لاملا، تلانژکتازی، خونریزی و هایپرپلازی موضعی در اپیتلیوم لاملا، به‌طور خفیف وجود داشت. در تیمار ۲ (۲۵٪ MAC value حنا)، ۹ ضایعه مشاهده گردید که از بین آن‌ها ۱ ضایعه پوسته پوسته شدن اپیتلیوم لاملاها با شدت زیاد، ۳ ضایعه ادم در اپیتلیوم لاملا، پیچ‌خوردگی و به‌هم چسبیدگی لاملاها به‌طور متوسط و ۵ ضایعه جداشدن اپیتلیوم از لاملا، تخریب دستگاه پیلار و اپیتلیوم لاملا، گرزی شدن نوک لاملا، گشادی مویرگ داخلی فیلامنت‌ها و خونریزی به‌طور خفیف وجود داشت. در تیمار ۳ (۵۰٪ MAC value حنا)، ۸ ضایعه مشاهده گردید که از بین آن‌ها ۱ ضایعه پوسته پوسته شدن اپیتلیوم لاملاها با شدت زیاد، ۲ ضایعه ادم در اپیتلیوم لاملا و تخریب دستگاه پیلار و اپیتلیوم لاملا به‌طور متوسط و ۵ ضایعه جداشدن اپیتلیوم از لاملا، پیچ‌خوردگی لاملا، گرزی شدن نوک لاملا، هایپرتروفی اپیتلیوم لاملا و گشادی مویرگ داخلی فیلامنت‌ها به‌طور خفیف وجود داشت. در تیمار ۴ (۷۵٪ MAC value حنا)، ۱۲ ضایعه مشاهده گردید که از بین آن‌ها ۴ ضایعه ادم و پوسته پوسته شدن اپیتلیوم لاملاها، پیچ‌خوردگی لاملا و تخریب دستگاه پیلار و اپیتلیوم لاملا با شدت زیاد، ۳ ضایعه گرزی شدن نوک لاملا، به‌هم چسبیدگی لاملاها و گشادی مویرگ داخلی تیغه‌های اولیه یا فیلامنت‌ها به‌طور متوسط و ۵ ضایعه جداشدن اپیتلیوم از لاملا، هایپرتروفی و هایپرپلازی اپیتلیوم لاملا، تلانژکتازی و نکروز به‌طور خفیف وجود داشت. در تیمار ۵ (سولفات مس)، ۱۱ ضایعه در بافت آبشش مشاهده گردید که از بین آن‌ها ۴ ضایعه ادم و پوسته پوسته شدن اپیتلیوم لاملا، پیچ‌خوردگی لاملا و تخریب در دستگاه پیلار و اپیتلیوم لاملا به‌طور متوسط و ۷ ضایعه جداشدن اپیتلیوم از لاملا، گرزی شدن نوک لاملا، به‌هم چسبیدگی لاملاها، هایپرتروفی و هایپرپلازی در اپیتلیوم لاملا، گشادی مویرگ داخلی فیلامنت‌ها و خونریزی به‌طور خفیف وجود داشت (جدول ۴ و شکل ۱).

جدول ۴: اثرات تیمارهای مختلف گیاه حنا در مقایسه با سولفات مس و تیمار شاهد بر بافت آبشش تاس‌ماهی سیبری

تیمارها / ضایعه	تیمار شاهد (LC_0– شاهد)	تیمار ۱ (MAC value حنا)	تیمار ۲ (۲۵٪ MAC value حنا)	تیمار ۳ (۵۰٪ MAC value حنا)	تیمار ۴ (۷۵٪ MAC value حنا)	تیمار ۵ (سولفات مس)
ادم در اپیتلیوم لاملا	+++	+	++	++	+++	++
جداشدن اپیتلیوم از لاملا	–	–	+	+	+	+
پوسته پوسته شدن اپیتلیوم لاملاها	+++	++	+++	+++	+++	++
به‌هم چسبیدگی لاملاها	+	++	++	–	++	+
پیچ‌خوردگی لاملا	+	++	++	+	+++	++
گشادی مویرگ داخلی تیغه‌های اولیه یا فیلامنت‌ها	+++	+++	+	+	++	+
تخریب دستگاه پیلار و اپیتلیوم لاملا	–	–	+	++	+++	++
تلانژکتازی	–	+	–	–	+	–
خونریزی	–	+	+	–	–	+
نکروز	–	–	–	–	+	–
هایپرتروفی اپیتلیوم	–	++	–	+	+	+
هایپرپلازی موضعی و منتشر	–	+	–	–	+	+
چماقی شدن یا گرزی شدن نوک لاملا (curling)	+	++	+	+	++	+

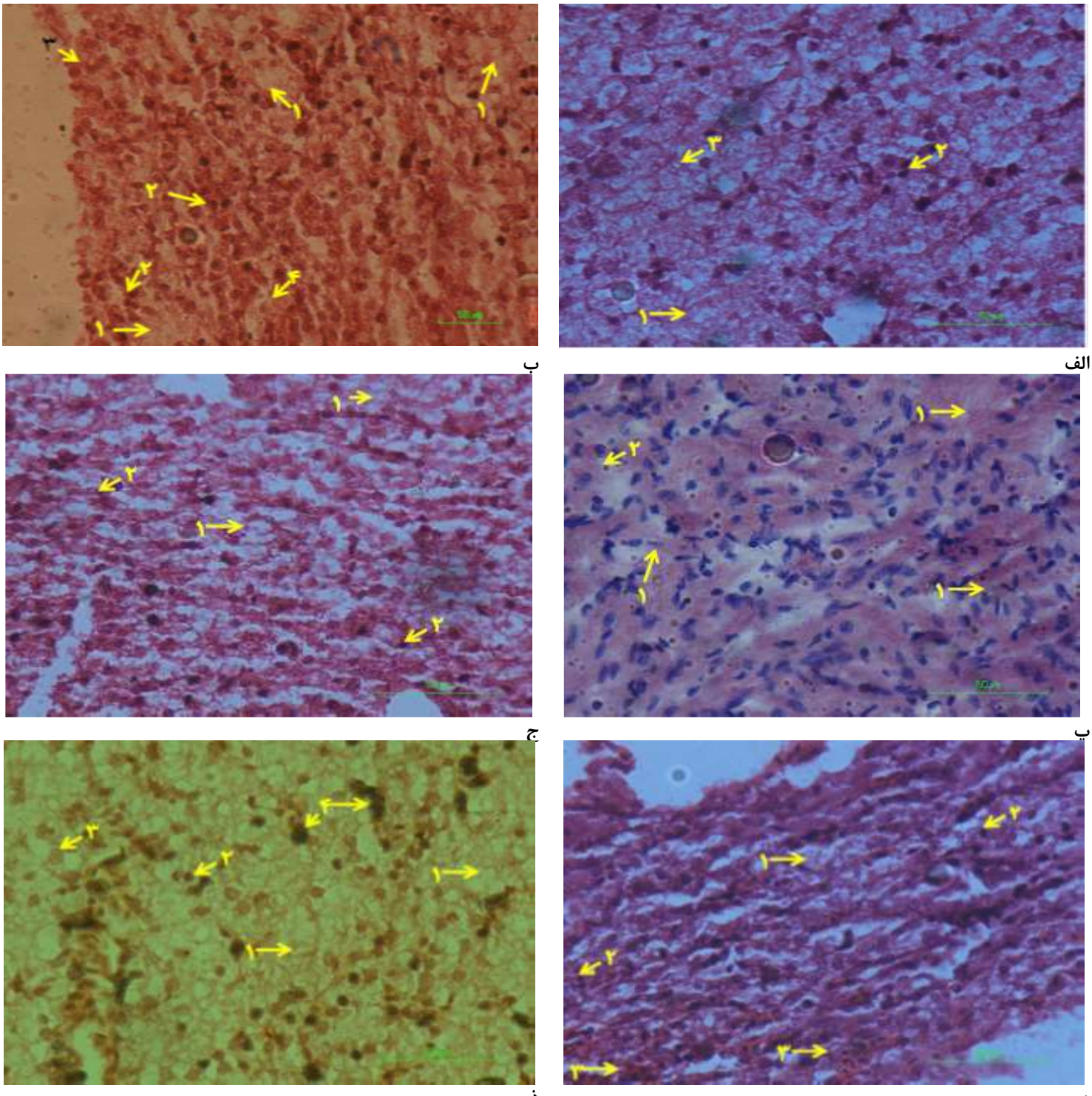
فقدان ضایعه بافتی (–)، کم (+)، متوسط (++)، زیاد (+++)

نتایج بررسی میکروسکوپی اسلایدهای تهیه شده از بافت کبد تاس‌ماهی سیبری در معرض تیمارهای مختلف نشان داد که در تیمار شاهد (LC_0– شاهد)، تخریب شدید سلول‌های کبدی به‌صورت نکروز همراه با تحلیل سینوزوئیدها، پیکنوز هسته، جمع شدن کروماتین و نیز تخریب و دژنره شدن هسته سلول‌ها مشاهده شد. در تیمار ۱ (MAC value حنا)،سلول‌ها به‌شدت آتروفی‌شده و میزان قابل توجهی دچار پیکنوز، کاریولیز و نهایتا نکروز شده بودند. در تیمار ۲ (۲۵٪ MAC value حنا)، سیروز شدید در نتیجه رشد و تکثیر زیاد بافت همبند مشاهده شد. هم‌چنین، آثار پیکنوزه شدن هسته در برخی سلول‌های کبدی نیز وجود داشت.



الف ب پ ج د ذ

شکل ۱: آبشش تاس‌ماهی سیبری. الف. تیمار شاهد (LC_0– شاهد): (۱- گشادی مویرگ داخلی تیغه‌های اولیه یا فیلامنت‌ها، ۲-ادم پوسته پوسته شدن وسیع در اپیتلیوم لاملاها، ۳- بههم چسبیدن لاملا، ۴- پیچ‌خوردگی لاملاها، ۵- گرزی شدن نوک لاملا و بههم چسبیدن لاملاها: بزرگ‌نمایی ۱۰۰×)، ب. تیمار ۱ (MAC value حنا): (۱- هایپرتروفی اپیتلیوم لاملا و بههم چسبیدگی لاملاها، ۲- هایپرپلازی اپیتلیوم لاملا و پیچ‌خوردگی لاملا، ۳- پیچ‌خوردگی نوک لاملا، ۴- پوسته پوسته شدن اپیتلیوم لاملا و بههم چسبیدگی لاملاها: بزرگنمایی ۴۰۰×)، پ. تیمار ۲ (٪۲۵ MAC valueحنا): (۱- ادم و بههم چسبیدگی لاملاها ۲- تحلیل اپیتلیوم و دستگاه پیلار در لاملا، ۳- پوسته پوسته شدن وسیع در اپیتلیوم لاملاها: بزرگ‌نمایی ۲۰۰×)، ج. تیمار ۳ (٪۵۰MAC value حنا): (۱- ادم اپیتلیوم لاملا، ۲- پیچ‌خوردگی نوک لاملا، ۳- پوسته پوسته شدن در اپیتلیوم لاملاها: بزرگ‌نمایی ۲۰۰×)، د. تیمار ۴ (٪۷۵ MAC valueحنا): (۱- ادم وسیع و پاره شدن سلول‌های اپیتلیومی در لاملاها، ۲- پیچ‌خوردگی و بههم چسبیدن لاملا، ۳- پوسته پوسته شدن وسیع در اپیتلیوم لاملاها، ۴- گرزی شدن نوک لاملا، ۵-پارگی در دستگاه پیلار و اپیتلیوم لاملا: بزرگ‌نمایی ۲۰۰×)، ذ. تیمار ۵ (سولفات مس): (۱- ادم و پوسته پوسته شدن در اپیتلیوم لاملاها، ۲- پیچ‌خوردگی نوک لاملا، ۳- پارگی در لاملا، ۴- گشادی مویرگ داخلی تیغه‌های اولیه یا فیلامنت‌ها: بزرگ‌نمایی ۲۰۰×) (رنگ‌آمیزی ائوزین–هماتوکسیلین).



شکل ۲: مقطع بافت کبد تاس‌ماهی سیبری. الف. تیمار شاهد (LC_0– شاهد): (۱- وجود نکروز وسیع و شدید در سلول‌های کبدی و شروع دژنره در سلول‌های باقی‌مانده، ۲- پیکنوز هسته در سلول‌های کبد، ۳- دژنره شدن هسته سلول کبد: بزرگ‌نمایی ۴۰۰×)، ب. تیمار ۱ (MAC value حنا): (۱- نکروز سلول‌های کبدی، ۲- پیکنوز هسته در سلول‌های کبد، ۳-آتروفی سلول‌های کبد، ۴- دژنره شدن هسته سلول کبد: بزرگ‌نمایی ۴۰۰×)، پ. تیمار ۲ (۲۵٪ MAC value حنا): (۱- سیروز کبدی وسیع در نتیجه رشد و تکثیر بافت همبند، ۲- پیکنوز شدید و وسیع هسته در سلول‌های کبد: بزرگ‌نمایی ۴۰۰×)، ج. تیمار ۳ (۵۰٪ MAC value حنا): (۱- وجود نکروز وسیع و شدید در سلول‌های کبدی و سلول‌های باقی‌مانده هم در حال دژنره شدن هستند، ۲- پیکنوز هسته در سلول‌های کبد: بزرگ‌نمایی ۴۰۰×)، د. تیمار ۴ (۷۵٪ MAC value حنا): (۱- وجود نکروز وسیع و شدید در سلول‌های کبدی، ۲- پیکنوز هسته در سلول‌های کبد، ۳- پرخونی در سینوزوئید: بزرگ‌نمایی ۴۰۰×)، ذ. تیمار ۵ (سولفات مس): (۱- وجود نکروز وسیع و شدید در سلول‌های کبدی و سلول‌های باقی‌مانده هم درحال دژنره شدن هستند، ۲- پیکنوز هسته در سلول‌های کبد، ۳- دژنره شدن هسته سلول کبد، ۴– تجمع ملانوماکروفاژها: بزرگ‌نمایی ۴۰۰×) (رنگ‌آمیزی ائوزین–هماتوکسیلین).

در تیمارهای ۳ (۵۰٪ MAC value حنا) و ۴ (۷۵٪ MAC value حنا)، پیکنوز شدید و کاریولیز در سلول‌های کبدی مشاهده شد. وجود نکروز بسیار وسیع و شدید نشان می‌دهد که بیش‌تر بافت کبد تخریب شده است. علاوه بر این، در تیمار ۴، پرخونی و تجمع گلبول‌های قرمز خون در سینوزوئیدها قابل مشاهده بود. در تیمار ۵ (سولفات مس)، آن‌چه بسیار مشهود است نکروز بسیار شدید و وسیع در بافت کبد می‌باشد. هم‌چنین، آثار پیکنوز و کاریولیز هسته سلول‌های کبد نیز مشاهده شد. در ضمن، تجمع ملانوماکروفاژی نیز در این تیمار به وضوح نمایان بود (جدول ۵ و شکل ۲).

جدول ۵: اثرات تیمارهای مختلف گیاه حنا در مقایسه با سولفات مس و تیمار شاهد بر بافت کبد تاس‌ماهی سیبری

ضایعه / تیمارها	تیمار شاهد (LC_0– شاهد)	تیمار ۱ (MAC value حنا)	تیمار ۲ (۲۵٪ MAC value حنا)	تیمار ۳ (۵۰٪ MAC value حنا)	تیمار ۴ (۷۵٪ MAC value حنا)	تیمار ۵ (سولفات مس)
آتروفی	–	+++	–	–	–	–
پیکنوز هسته	+++	++	++	++	+++	++
کاریولیز	++	++	–	++	++	++
نکروز	+++	++	–	+++	+++	+++
پرخونی در سینوزوئیدها	–	–	–	–	++	–
تجمع ملانوماکروفاژها	–	–	–	–	–	++
سیروز	–	–	+++	–	–	–

فقدان ضایعه بافتی (–)، کم (+)، متوسط (++)، زیاد (+++)

بحث

محیط پرورش آبزیان جهت رسیدن به بهترین وضعیت بهداشتی و سلامت،به یک ضدعفونی‌کننده فراگیر و چندکاره نیاز دارد. بنابراین، این مطالعه در درجه اول جهت تعیین حد مجاز قابل استفاده گیاه حنا، LC_{50} و Mac value آن و با هدف ارزیابی اثرات ضدعفونی کنندگی این گیاه بر بافت آبشش و کبد و میزان بار باکتریایی و قارچی پوست و آبشش تاس‌ماهی سیبری انجام گردید.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان LC_{50} عصاره گیاه حنا برابر با ۳۶۳/۰ میلی‌گرم در لیتر بود. در مطالعات مختلف، مقادیر LC_{50} اسانس اکالیپتوس برابر با ۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر در ماهی کپورمعمولی (شیخ‌زاده و همکاران، ۱۳۸۸)، مقادیر LC_{50} عصاره هیدروالکلی سیر برابر با ۱۸۰۰/۵۲ میلی‌گرم در لیتر در تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) (بازاری‌مقدم و همکاران، ۱۳۹۷) و مقادیر LC_{50} عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس برابر با ۷۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر در ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*) مبتلا شده به *Aeromonas hydrophila* (رودبارکی و همکاران، ۱۳۹۷) تعیین شده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از نظر بار باکتریایی و قارچی پوست و آبشش تاسماهی سیبری پس از سولفات مس، بهترین (کم‌ترین) مقادیر در تیمارهای ۲ (۲۵٪ MAC value حنا) و ۳ (۵۰٪ MAC value حنا) مشاهده شد و تنها این دو تیمار می‌توانند جایگزین مناسبی برای سولفات مس باشند. شاید علت کاهش بار باکتریایی و قارچی پوست و آبشش در تیمارهای فوق را این گونه توجیه کرد که احتمالاً غلظت‌های متوسط ترکیبات موجود در گیاه حنا از اعتدال بیش‌تری برخوردار بوده و در دوزهای پایین احتمالا اثرگذاری این ترکیبات روی قارچ و باکتری کم بوده و ماده موثره به‌مقدار لازم نرسیده و در دوزهای بالایی نیز احتمالاً ترکیبات مضر موجود در گیاه فعال شده و مانع از اثرگذاری مناسب گردد. در نتیجه، احتمال حضور باکتری‌ها و قارچ‌هادر تیمارهای با دوز بالاتر و پایین‌تر بیش‌تر می‌باشد.

سعیدی و همکاران(۱۳۹۱) با بررسی فعالیت ضدمیکروبی اسانس و عصاره گیاه مورد علیه سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی بیان کردند که غلظت‌های بالای این مواد دارای اثر ضدباکتریایی می‌باشد. مطالعه محمدی و همکاران (۱۳۹۷) روی خواص ضدقارچی و ضدباکتریایی عصاره اکالیپتوس روی پوست و آبشش بچه‌ماهیان کپورمعمولی نشان داد که تعداد باکتری‌ها و قارچ‌های آبشش و پوست در تیمارهای حاوی عصاره اکالیپتوس به‌طور معنی‌داری کم‌تر از تیمار شاهد بود و مقادیر بالاتر عملکرد بهتری در مهار عوامل باکتریایی و قارچی داشتند. عصاره الکلی حنا با ممانعت از بروز التهاب، سبب جلوگیری از عفونت‌های ثانویه پوستی می‌شود (رضایی و همکاران، ۱۳۹۳). فعالیت آنتی‌باکتریایی عصاره متانول برگ حنا نشان‌دهنده فعالیت قابل توجه آن در برابر عوامل باکتریایی نسبت به عصاره‌های هگزانی و کلروفرمی می‌باشد (Mastanaiah و همکاران، ۲۰۱۱) که می‌تواند ناشی از تاثیر بهتر آن در کنترل آلودگی باکتریایی و نیز عملکرد بهتر سیستم ایمنی بدن بچه‌ماهیان در این تیمار باشد. عصاره گیاه حنا حاوی آنزیم‌های پروتئولیتیک بوده و مهارکننده قوی تریپسین است که این ماده را علیه انواع میکروب‌ها استفاده‌می‌کند(Padul و همکاران، ۲۰۱۲). افزایش‌غلظت این آنزیم‌ها

سبب آسیب‌های شدید سلولی می‌گردد. هم‌چنین، در بعضی آلودگی‌های انگلی، این آنزیم‌ها به‌منظور توسعه آسیب توسط انگل ترشح می‌شود (Meyer-Hoffert و همکاران، ۲۰۰۴). احتمال دارد که اجزای موثر گیاه حنا دارای اثرات ضدقارچی و ضدباکتریایی باشند (شیروی و همکاران، ۱۳۹۰) و مطالعات نشان‌دهنده اثر فعالیت آنتی‌باکتریال نسبی عصاره برگ حنا در برابر انواع باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است (Pasandi Pour و همکاران، ۲۰۱۶). عصاره برگ حنا به عنوان آنتی‌بیوتیک طبیعی عمل کرده و می‌تواند بدون ایجاد اثرات جانبی یا مقاومت باکتریایی، گروه وسیعی از باکتری‌ها را نابود کند (Khatri، ۲۰۱۱). وجود لوتئین در روغن حنا که دارای اثر ضدباکتریایی می‌باشد (Khazaeli و همکاران، ۲۰۱۹) و نیز ترکیباتی نظیر کربوهیدرات‌ها، گلیکوزیدها، کوئینون‌ها، استروئیدها و فنول‌ها در عصاره برگ حنا (Kumar Sharma و Goel، ۲۰۱۸) به اثبات رسیده است. هم‌چنین، فلاونوئید موجود در گیاه حنا با افزایش فعالیت ویتامین C و با اثر ضدباکتریایی خود سبب تقویت سیستم ایمنی و تولید آنتی‌بادی می‌شود (Catoni و همکاران، ۲۰۰۸). ترکیبات ضدمیکروبی گیاهان با تاثیر روی غشای پلاسمایی و سلولی میکروارگانیسم‌ها و یا مهار آنزیم‌های ساختاری غشای سلولی آن‌ها عمل می‌کنند (Soltani و همکاران، ۲۰۱۳). عادل و همکاران (۱۳۹۵) نیز با بررسی تاثیر عصاره چند گیاه دارویی بیان کردند که عصاره گیاهان رازیانه، گزنه و سیر دارای اثرات ضدباکتریایی مناسبی بر باکتری *یرسینیا راکری* می‌باشند. حبیبی و همکاران (۱۳۹۷) با بررسی اثرات ضدباکتریایی اسانس‌های آویشن باغی، پونه و زیره سیاه در برابر دو جدایه بیماری‌زای *استرپتوکوکوس اینیایی* در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین و انروفلوکساسین بیان کردند که روند رشد جدایه‌های باکتری با افزایش غلظت اسانس‌ها کاهش یافت و حتی در غلظت‌های بالاتر تقریباً رشد آن‌ها متوقف شد. هم‌چنین، اثرات مفید عصاره اتانولی پرسیکا (ترکیبی از سه گیاه دارویی مسواک، بو مادران و نعناع) بر کنترل بار قارچی پوست و آبشش ماهی طلایی (*Carassius auratus*) گزارش شده است (نیکنام و همکاران، ۱۳۹۵). به احتمال زیاد، مواد موجود در عصاره‌های گیاهی اثرات مهاری روی رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها داشته و با پاره شدن و افزایش نفوذپذیری دیواره سلولی و خروج محتویات آن، تخریب یکپارچگی غشاء و نابودی کامل قارچ‌ها و باکتری‌ها رخ می‌دهد. مطالعات نشان می‌دهد که نفتوتیازول بالاترین فعالیت قارچ‌کشی را در بین ترکیبات مشتق شده از گیاه حنا دارد (Brahmeshwari و همکاران، ۲۰۱۲). مطالعه روی تیمارهای تحت درمان با حمام عصاره گزنه در مواجهه با قارچ ساپرولگنیا نشان داد که این تیمارها علائم قارچزدگی کم‌تری نسبت به تیمار شاهد داشته و خواص بازدارندگی این گیاهان به متابولیت‌های ثانویه آن مرتبط می‌باشد (عالیشاه و همکاران، ۱۳۹۸). به‌نظر می‌رسد که ترکیبات گیاهی به‌دلیل داشتن ترکیبات مفید و عدم وجود ترکیبات خطرناک شیمیایی عملکرد مناسب‌تری نسبت به داروهای شیمیایی داشته و داروهای شیمیایی علی‌رغم کاهش بار باکتریایی و قارچی سبب مشکلات جانبی در ماهیان می‌گردند. در بیش‌تر مطالعات فوق، تیمارهای حاوی مواد گیاهی همانند مطالعه حاضر توانسته‌اند از میزان بار باکتریایی و قارچی بکاهند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اثرات گیاه حنا و سولفات مس بر بافت آبشش و کبد تمام تیمارها وجود دارد. در بین نمونه‌های بافت آبشش، تیمارهای ۳ (۵۰٪ MAC value حنا) و تا حدودی ۲ (۲۵٪ MAC value حنا) دارای کم‌ترین آسیب بافتی در آبشش بودند. در کبد نیز، تیمار ۲ (۲۵٪ MAC value حنا) و پس از آن تیمار ۳ (۵۰٪ MAC value حنا) دارای کم‌ترین ضایعات بافتی‌بودند. سایر تیمارها دارای بیش‌ترین ضایعات بافتی بودندو به‌نظر می‌رسد که ترکیبات مضر موجود در سولفات مس و تیمارهای حنا با دوز بالاتر و پایین‌تر سبب بروز ضایعات بیش‌تر می‌شود. علائمی مانند ادم در اپیتلیوم لاملا، جداشدن اپیتلیوم از لاملا، پوسته پوسته شدن اپیتلیوم لاملاها، به‌هم چسبیدگی لاملاها، پیچ‌خوردگی لاملا، گشادی مویرگ داخلی تیغه‌های اولیه یا فیلامنت‌ها، تخریب دستگاه پیلار و اپیتلیوم لاملا، تلانژکتازی، خونریزی، نکروز، هایپرتروفی اپیتلیوم، هایپرپلازی موضعی و منتشر و چماقی شدن یا گرزی شدن نوک لاملا در آبشش مشاهده شد. علاوه بر این، بافت‌شناسی کبد نشان‌دهنده وجود علائمی نظیر آتروفی، پیکنوز هسته، کاریولیز، نکروز، پرخونی در سینوزوئیدها، تجمع ملانوماکروفاژها و سیروز می‌باشد. شاید علت کاهش ضایعات بافتی در تیمارهای فوق را این گونه توجیه کرد که احتمالاً در این دو دوز اثرات ترکیبات مفید این گیاه نمایان‌تر و احتمال اثرگذاری این ترکیبات بیش‌تر می‌باشد. مظفری و فرخ‌روز (۱۳۹۲) به تأثیرات مخرب فرمالین و سولفات مس بر بافت‌های آبشش بچه‌ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) و بروز ضایعات شدید اشاره کرده‌اند. استفاده از سولفات مس در مدت زمان طولانی سبب بروز عوارض زیادی به‌خصوص در آبشش می‌شود که شامل پرياختگی، پرخونی، چماقی شدن تیغه‌ها و تحلیل تیغه اولیه آبششی می‌باشد. به‌دلیل اهمیت آبشش در تبادل گازها، لزوم استفاده از غلظت مناسب سولفات مس برای ماهیان توصیه می‌شود (عبدالله‌زاده و همکاران، ۱۳۹۷). هم‌چنین، سولفات مس ممکن است سبب بروز نقص در اعمال سلولی یا تداخل متقابل با ساختمان‌های سلولی شود (رستمی بشمن و همکاران، ۱۳۷۹). بررسی کارایی عصاره اتانولی برگ گیاه حنا در برابر مسمویت مس القا شده در ماهی *Channa punctatus* نشان‌دهنده پتانسیل محافظت‌کنندگی آن می‌باشد (Kumarو Trivedi، ۲۰۱۵) و وجود ترکیباتی مانند ۲-هیدروکسی ۱ و ۴ نفتاکوئینون در

برگ حنا سبب ایجاد خواص درمانی نظیر خاصیت ضدالتهابی می‌شود (Chaudhary و همکاران، ۲۰۱۰). مطالعه رضایی و همکاران (۱۳۹۳) با بررسی عصاره الکلی حنا در التیام آسیب جلدی تجربی ایجاد شده در پوست ماهی ماکرو (*Labidochromis caeruleus*) نشان دادند که اثرگذاری حنا روند التهاب شدید را متوقف کرده و از صدمات پوستی جلوگیری کرده که این حالت در ترمیم زخم‌های جلدی به‌طور سریع‌تر و موثرتری از حمام نمک دخیل است. در هنگام استفاده از نمک و حنا، اپیدرم و درم ساختار طبیعی داشته اما در تیمار حنا فلس‌ها بلندتر و سازمان‌یافته‌تر از سایر تیمارها بوده و تعداد سلول‌های التهابی کم‌تر بود. تریپسین باعث زخم پوست، التهاب و افزایش تکثیر اپیدرم می‌گردد و گیاه حنا جز گیاهانی است که مهارکننده قوی تریپسین می‌باشدو از این سیستم دفاعی علیه حمله میکروب‌ها استفاده می‌کند (Khatri، ۲۰۱۱). مطالعه روی زخم‌های پوستی نشان داد که متوسط زمان ترمیم کامل زخم در گروه‌های تحت تیمار حنا از دو گروه کنترل و شاهد کم‌تر بود و گروه‌های تحت تیمار بهترین اثر را در ترمیم زخم پوستی داشتند. احتمال می‌رود که گیاه حنا موجب کاهش التهاب، خونریزی و ادم زخم شده و نیز باعث تحریک ساخت کلاژن و انقباض سریع‌تر زخم، رگ‌زایی و اتساع عروقی شود (شیروی و همکاران، ۱۳۹۰). ماده لاوسون موجود در گیاه حنا دارای خاصیت ضدالتهابی بوده و وجود گلیکوزیدها تولید واسطه‌های شیمیایی التهابی را مهار کرده و التهاب را کاهش می‌دهد. هم‌چنین، وجود آلکالوئیدها دلیل دیگری برای تاثیر این گیاه در التیام زخم‌های پوستی است (Malekzadeh، ۱۹۸۶). مطالعات نشان داد که حمام عصاره گزنه باعث بهبود زخم‌های ایجاد شده در محل فلس‌برداری ماهیان تحت تیمار در مقایسه با تیمار شاهد شد که این تأثیر مثبت می‌تواند به‌دلیل ترکیبات موجود در گیاه گزنه باشد (عالیشاه و همکاران، ۱۳۹۸).

علاوه بر این، مطالعه روی ضایعات بالینی ناشی از اسانس نعناع فلفلی هیچ‌گونه تأثیر نامطلوبی را نشان نداد (رخشانی و همکاران، ۱۳۹۶).مطالعات روی ترکیبات شیمیایی نشان‌دهنده عوارض زیاد این مواد روی بافت می‌باشد. تغییرات دما و شوری بر سمیت سایپرمترین در ماهی گورخری(*Aphanius sophiae*)نشان‌دهنده‌آتروفی، پیکنوزیز، نکروز کانونی، کاریولیز، تجمع سلول‌های کوپفر و نکروز هپاتوسیت‌ها می‌باشد (نصراله‌پورمقدم و همکاران، ۱۳۹۴). پیکان‌حیرتی و همکاران (۱۳۹۵) با مطالعه ماهی نازک (*Chondrostoma regium*) بیان کردند که کلرید کادمیوم سبب بروز هایپرپلازی، چماقی شدن و هم‌جوشی در آبشش و پرخونی، پیکنوزیس هسته‌ای و نکروز کانونی در کبد می‌شود. تاس‌ماهی سیبری در معرض نیتریت محیطی حاد (Gisberta و همکاران، ۲۰۰۴) و ماهی توربوت جوان (*Psetta maxima*) در معرض غلظت تحت‌کشنده اکسیدانت‌های حاصل از ازن موجود در آب (Reiser و همکاران، ۲۰۱۱) چماقی شدن لاملا را بروز دادند که یکی از عوارض آبششی مشاهده شده در تحقیق حاضر می‌باشد. هایپرپلازی آبشش از دیگر علائم مشاهده شده نیز می‌تواند منجر به کاهش سطح تنفس (Cengiz، ۲۰۰۶) و هم‌جوشی لاملار ثانویه (Saber، ۲۰۱۱) گردد. آبشش ماهیان در مواجهه با استرس شدید دچار تجمع خون و آسیب به سلول‌های پیلار می‌شود (Martinez و همکاران، ۲۰۰۴). ادم، بلند شدن اپیتلیال و هم‌جوشی لاملار نیز سبب کاهش ناحیه سطحی آبشش می‌شود (Van Heerden و همکاران، ۲۰۰۴). به‌نظر می‌رسد که داروهای شیمیایی علی‌رغم بسیاری از فواید اما سبب بروز ضایعات بافتی در بسیاری از اندام‌ها شده و عاقلانه می‌باشد که از دوزهای مناسب این مواد استفاده شده یا به‌طور کامل با ترکیبات گیاهی جایگزین شوند. در بیش‌تر مطالعات فوق، مواد گیاهی همانند مطالعه حاضر نسبت به مواد شیمیایی سبب ضایعات بافتی کم‌تری شده‌اند.

در یک نتیجه‌گیری کلی، می‌توان گفت که از نظر بار باکتریایی و قارچی پوست و آبشش تاس‌ماهی سیبری، پس از سولفات مس تنها تیمارهای ۲ (۲۵٪ MAC value حنا) و ۳ (۵۰٪ MAC value حنا) می‌توانند جایگزین مناسبی برای سولفات مس باشند. هم‌چنین، از نظر ضایعات بافت آبشش و کبد تاس‌ماهی سیبری، کم‌ترین آسیب بافتی‌در تیمارهای ۲ (۲۵٪ MAC value حنا) و ۳ (۵۰٪ MAC value حنا) مشاهده شدو سایر تیمارها دارای بیش‌ترین ضایعات بافتی بودند. هم‌چنین، پیشنهاد می‌شود که اثرات ضدعفونی‌کنندگی عصاره گیاه حنا روی فاکتورهای خونی و سایر موارد فیزیولوژیک بررسی گردد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نگارندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاری صمیمانه مسئولین محترم موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر و آزمایشگاه ویرومد ابراز می‌دارند.

منابع

۱. **پوستی، ا.؛ ادیب‌مرادی، م. و فضیلی، آ.، ۱۳۸۲.** بافت‌شناسی مقایسه‌ای و تکنیک‌های بافت‌شناسی. انتشارات دانشگاه تهران. ۵۴۶ صفحه.

۲. **پیکان‌حیرتی، ف.؛ خلجی، م.؛ محبوبی‌صوفیانی، ن. و درافشان، س.، ۱۳۹۵.** اثرات هیستوپاتولوژیک کلرید کادمیوم بر بافت کبد و آبشش ماهی نازک (*Chondrostoma regium*). مجله علمی شیلات ایران. دوره ۲۵، شماره ۲، صفحات ۱۰۷ تا ۱۱۸.

۳. **حلاجیان، ع.؛ کاظمی، ر.؛ محسنی، م.؛ دژندیان، س.؛ یوسفی جوردهی، آ.؛ بهمنی، م.؛ پوردهقانی، م.؛ یزدانی، م.ع. و یگانه، ه.، ۱۳۹۰.** تکه‌برداری به‌روش جراحی و مطالعه بافت‌شناسی گناد تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) پرورشی. مجله تحقیقات دامپزشکی. شماره ۳، صفحات ۲۲۹ تا ۲۳۳.

۴. **رحیمی‌پردنجانی، م.؛ رئیسی، م. و علیشاهی، م.، ۱۳۹۴.** مطالعه اثرات ضدباکتریایی برخی اسانس‌های گیاهی علیه باکتری‌های *Lactococcus garvieae, Yersinia ruckeri* و *Aeromonas hydrophila*. مجله علمی شیلات ایران. سال ۲۴، شماره ۴، صفحات ۵۵ تا ۶۵.

۵. **رخشانی، م.؛ میردارهریجانی، ج. و قرایی، ا.، ۱۳۹۶.** بررسی قدرت بی‌هوشی و آسیب‌های بافتی اسانس نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله علمی شیلات ایران. دوره ۲۷، شماره ۱، صفحات ۱ تا ۱۱.

۶. **رستمی‌بشمن، م.؛ سلطانی، م. و ساسانی، ف.، ۱۳۷۹.** اثرات هیستوپاتولوژی برخی فلزات سنگین (سولفات مس، سولفات روی، سولفات جیوه و کلرور کادمیم) بر بافت‌های کپور معمولی. مجله دامپزشکی دانشگاه تهران. شماره ۴، صفحات ۱ تا ۳.

۷. **رضایی، آ.؛ پیغان، ر.؛ طولابی‌دزفولی، ز. و افتخارمعنوی، ش.، ۱۳۹۳.** بررسی ماکروسکوپیک و میکروسکوپیک عصاره الکلی حنا (*Lawsonia inermis*) در التیام آسیب جلدی تجربی ایجاد شده در پوست ماهی ماکرو (*Labidochromis caeruleus*). مجله علمی شیلات ایران. سال ۲۳، شماره ۲، صفحات ۴۵ تا ۵۶.

۸. **رضایی‌تبار، س.؛ اسماعیلی‌ساری، ع.؛ بهرامی‌فر، ن. و رمضانپور، ز.، ۱۳۹۶.** ارزیابی کیفیت آب استخرهای پرورش ماهی در شمال ایران (مطالعه موردی: شهر رشت). فصلنامه علوم تکثیر و آبزی‌پروری. سال ۴، شماره ۱۳، صفحات ۲۳ تا ۴۴.

۹. **روحی، ز.؛ ایمانپور، م.ح.؛ حاجی‌مرادلو، ع. و سلمانیان فهدریجانی، م.، ۱۳۹۵.** اثر مکمل‌های گیاهی زیره سیاه (*Carum carvi*) و شنبلیله (*Trigonella foenum graecum*) بر فعالیّت ضد باکتریایی و پروتئین محلول موکوس در بچه‌ماهیان کپور معمولی. مجله بوم‌شناسی آبزیان. دوره ۶، شماره ۱، صفحات ۱۲۸ تا ۱۳۶.

۱۰. **رودبارکی، م.ص.؛ ارشاد، ه.؛ خارا، ح. و معصوم‌زاده، م.، ۱۳۹۷.** تاثیر مقادیر مختلف عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس بر فراسنجه‌های خونی ماهیان آمور (*Ctenopharyngodon idella*) آلوده شده به باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*). مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران). دوره ۳۱، شماره ۱، صفحات ۷۹ تا ۹۲.

۱۱. **رهبر، .م.؛ ستاری، م.؛ علاف‌نویریان، ح.؛ احمدنژاد، م.؛ خارا، ح. و صفری، ر.، ۱۳۹۸.** اثر سم مالاتیون بر فعالیت برخی از آنزیم‌های گوارشی و آسیب‌شناسی بافت روده در بچه تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus* Borodin 1987). فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان. سال ۷، شماره ۲، صفحات ۱۰۷ تا ۱۲۹.

۱۲. **رئیسی، م.؛ فخریان، م.؛ جعفریان، م. و ورشوئی، ح.، ۱۳۹۳.** مطالعه تاثیر اسانس برخی گیاهان بر ایمنی غیراختصاصی ماهی استرلیاد. مجله زیست‌شناسی دریا. دوره ۶، شماره ۱، صفحات ۲۳ تا ۲۸.

۱۳. **زارعی‌نوذری، ع.؛ قلی‌پورکنعانی، ح.؛ جعفریان، ح.ا. و هرسیج، م.، ۱۳۹۹.** بررسی تأثیر اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و پودر زنجبیل (*Zingiber officinale*) به‌صورت مجزا بر شاخص‌های رشد، ایمنی و مقاومت بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مواجه با باکتری یرسینیا راکری (*Yersinia ruckeri*). فصلنامه محیط زیست جانوری. دوره ۱۲، شماره ۳، صفحات ۲۹۲ تا ۲۸۳.

۱۴. **ستاری، م.، ۱۳۸۷.** بهداشت و بیماری‌های آبزیان. جلد اول. چاپ اول. انتشارات حق‌شناس. صفحات ۲۵۹ تا ۳۹۱.

۱۵. **سعیدی، س.؛ صباغ، س.ک. و صبوری‌رباط، ا.، ۱۳۹۱.** بررسی فعالیت ضدمیکروبی اسانس و عصاره گیاه مورد (*Myrtus communis*) علیه سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی. دانشگاه علوم پزشکی زابل. دوره ۴، شماره ۳، صفحات ۲۱ تا ۳۲.

۱۶. **سلحشوری، ا.؛ فلاحتکار، ب. و عفت‌پناه، ا.، ۱۳۹۶.** تاثیر سطوح پروتئین جیره بر عملکرد رشد و شاخص‌های خونی بچه فیل‌ماهی (*Huso huso*). نشریه توسعه آبزی‌پروری. سال ۱۱، شماره ۱، صفحات ۵۱ تا ۶۲.

۱۷. **سلطانی، م.، ۱۳۸۷.** ایمنی‌شناسی ماهیان و سخت‌پوستان. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۶۴ صفحه.

۱۸. **شادزی، ش.، ۱۳۸۳.** قارچ‌شناسی پزشکی و روش‌های تشخیص آزمایشگاهی و درمان. انتشارات جهاد دانشگاهی اصفهان. صفحات ۹۳ تا ۲۷۹.

۱۹. **شاملوفر، م.؛ جرجانی، س. و قلیچی، ا.، ۱۳۹۴.** تعیین LC_{50} و بررسی ضایعات بافتی ناشی از سم سوین در بچه ماهیان سفید (*Rutilus frisii kutum*). نشریه توسعه آبزی‌پروری. سال ۹، شماره ۱، صفحات ۴۳ تا ۵۱.

۲۰. **شریف‌پور، ع. و حلاجیان، ع.، ۱۳۹۴.** روش‌های آزمایشگاهی بافت‌شناسی آبزیان. موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور. ۳۵۶ صفحه.

۲۱. **شیخ‌زاده، ن.؛ سلطانی، م.؛ ابراهیم‌زاده‌موسوی، ح.ع.؛ خسروی، ع.ر.؛ باقری، ه.؛ فتحی، ع.ا. و زرگر، ا.، ۱۳۸۸.** مطالعه اثر اسانس اوکالیپتوس (*Eucalyptus globules*) بر برخی فاکتورهای ایمنی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). فصلنامه تحقیقات دامپزشکی. دوره ۶۴، شماره ۱، صفحات ۴۷ تا ۵۴.

۲۲. **شیروی، ع.ح.؛ آل‌بویه، م.؛ حجتی، و.؛ اکبری، ح. و قرایی، ا.، ۱۳۹۰.** بررسی تأثیر عصاره برگ گیاه حنا (*Lawsonia inermis*) بر ترمیم زخم پوستی رت نژاد ویستار. فصلنامه زیست‌شناسی جانوری. دوره ۳، شماره ۴، صفحات ۴۵ تا ۵۱.

۲۳. **حبیبی، س.ع.؛ سلطانی، م.؛ احمدی‌وند، س. و طاهری میرقائد، ع.، ۱۳۹۷.** بررسی خاصیت ضدباکتریایی (in vitro) برخی گیاهان دارویی بر جدایه‌های بیماری‌زای *استرپتوکوکوس اینیایی*. دوفصلنامه تازه‌ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی. دوره ۱، شماره ۲، صفحات ۳۶ تا ۴۶.

۲۴. **عادل، م.؛ صفری، ر.؛ ذریه‌زهرا، ج. و الهی، ر.، ۱۳۹۵.** مطالعه اثرات ضدباکتریایی برخی از عصاره‌های گیاهی بر باکتری *یرسینیا راکری* در شرایط آزمایشگاهی. مجله علمی شیلات ایران. سال ۲۵، شماره ۳، صفحات ۴۱ تا ۵۱.

۲۵. **عالیشاه، ن.؛ فیروزبخش، ف. و محرابی، ز.، ۱۳۹۸.** اثرات حمام عصاره هیدروالکلی گزنه (*Urtica dioica*) بر شاخص‌های ایمنی و خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) آلوده شده با قارچ ساپرولگنیا. مجله علمی شیلات ایران. دوره ۲۸، شماره ۴، صفحات ۵۵ تا ۶۷.

۲۶. **عبدالله‌زاده، ف.؛ خیاط‌زاده، ج. و قاسم‌زاده، ف.، ۱۳۹۷.** بررسی اثر مقایسه‌ای نانو ذرات اکسید مس و سولفات مس بر شاخص‌های رشد و آسیب‌شناسی بافت آبشش بچه ماهیان آمور. مجله علمی شیلات ایران. دوره ۲۷، شماره ۲، صفحات ۸۱ تا ۹۰.

۲۷. **فتح‌اللهی، ت. و جوهری، ع.، ۱۳۹۴.** مروری بر کاربردهای گیاهان دارویی در تکثیر و پرورش آبزیان. همایش بین‌المللی پژوهش‌های کاربردی در کشاورزی.

۲۸. **فرقاندوست‌حقیقی، ک.؛ هدایتی‌فرد، م. و مهدوی، ا.، ۱۳۸۹.** ارائه الگوی مناسب بهای تمام شده برای مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان. مجله شیلات دانشگاه آزاد اسلامی. سال ۴، شماره ۳، صفحات ۲۷ تا ۳۹.

۲۹. **فیروزبخش، ف.؛ ذولفقاری، آ.؛ محرابی، ز. و خالصی، م.ک.، ۱۳۹۴.** بررسی فعالیت ضدقارچی عصاره‌های گیاه گزنه (*Urtica dioica*) و ریحان (*Ocimum basilicum*) بر قارچ *ساپرولگنیا پارازتیکا* در شرایط آزمایشگاهی. فصلنامه محیط زیست جانوری. دوره ۷، شماره ۳، صفحات ۲۱۱ تا ۲۱۶.

۳۰. **کامرانزاده، ف.؛ سلامات، ن.؛ سالاری، م.ع. و موحدی‌نیا، ع.، ۱۳۹۷.** مطالعه آسیب‌شناسی بافتی کبد ماهی بیاح (*Liza abu*) و شوریده (*Otolithes ruber*) خلیج فارس. مجله زیست‌شناسی جانوری تجربی. سال ۷، شماره ۲، پیاپی ۲۶، صفحات ۱۱ تا ۲۲.

۳۱. **محمدی، م.؛ وهاب‌زاده، ح. و زمینی، ع.، ۱۳۹۷.** بررسی اثرات ضدقارچی و ضدباکتریایی عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس (*Eucalyptus globulus labill*) بر پوست و آبشش بچه ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله آبزیان و شیلات. سال ۴، شماره ۲، صفحات ۶۳ تا ۷۱.

۳۲. **مخیر، ب.، ۱۳۸۵.** بررسی آلودگی آبششی ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*) تالاب شادگان به ترماتودهای مونوژن و تعیین محل اتصال و تراکم جمعیتی آن‌ها بر روی صفحات آبششی. مجله دامپزشکی ایران. سال ۲، شماره ۲، صفحات ۴۸ تا ۵۷.

۳۳. **مظفری، ا. و فرخ‌روز، م.، ۱۳۹۲.** بررسی تأثیرات فرمالین و سولفات مس بر بافت‌های آبشش بچه‌ماهی سفید دریای خزر. فصلنامه فیزیولوژی و تکوین جانوری. شماره پیاپی ۲۳، جلد ۶، شماره ۴، صفحات ۲۷ تا ۳۵.

۳۴. **ناجی، ط.؛ صفائیان، ش.؛ رستمی، م. و صبرجو، م.، ۱۳۸۶.** بررسی اثرات سولفات روی بر بافت آبشش بچه‌ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). علوم و تکنولوژی محیط زیست. دوره ۹، شماره ۲۵، صفحات ۲۹ تا ۳۶.

۳۵. **نصراله‌پورمقدم، م.؛ پورباقر، ه. و ایگدری، س.، ۱۳۹۴.** تاثیر دما و شوری بر سمیت سایپرمترین در بافت کبد ماهی گورخری (*Aphanius sophiae*). علوم و فنون شیلات. دوره ۴، شماره ۱، صفحات ۱۰۵ تا ۱۱۴.

۳۶. **نیکنام، م.؛ محسنی، م.؛ زمینی، ع. و وهاب‌زاده، ح.، ۱۳۹۵.** اثرات عصاره گیاهی پرسیکا و نمک طعام در کنترل بار قارچی پوست و آبشش ماهی طلایی (*Carassius auratus*). چهارمین همایش ملی شیلات و آبزیان ایران. بندرعباس، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرعباس.

۳۷. **ویسی، ا.؛ وثوقی، ع. و دادگر، ش.، ۱۳۹۳.** مطالعه بافت‌شناسی ماهیان فلاورهورن تغذیه شده با سطوح مختلف هیدرولیز پوست گاو. مجله پژوهش‌های علوم و فنون دریایی. سال ۹، شماره ۲، صفحات ۹ تا ۱۴.

38. **Ashish, K.M. and Banalata, M., 2008.** Acute toxicology impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of freshwater fish, Bloch (*Channa punctatus*). Environmental Toxicology and Pharmacology. Vol. 26, pp: 136-141.

39. **Baba, E.; Acar, U.; Ontas, C.; Kesbic, O.S. and Yilmaz, S., 2016.** The use of Avena sativa extract against *Aeromonas hydrophila* and its effect on growth performance, hematological and immunological parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). Italian Journal of Animal Science. Vol. 2, pp: 325-333.

40. **Bais, U.E. and Lokhande, M.V., 2012.** Effect of cadmium chloride on histopathological changes in the fresh water fish *Ophiocephalus striatus* (Channa). International Journal of Zoology Research. Vol. 8, No. 1, pp: 23-32.

41. **Brahmeshwari, G.; Surekha, M. and Saini, K., 2012.** Antifungal activity of naphthothiazoles derived from Lawsone (*Lawsonia inermis*). African Journal of Biotechnology. Vol. 11, No. 78, pp: 14405-14409.

resistance to salt stress in Kutum (*Rutilus frisii kutum*). New findings in life sciences. Vol. 2, pp: 130-122.

55. **Khatri, P., 2011.** Pharmacognostic and phytochemical studies on various plant parts of *Lawsonia inermis* (henna). Asian Journal of Pharmaceutical Sciences and Clinical Research. Vol. 1, pp: 22-40.

56. **Khazaeli, P.; Mehrabani, M.; Mosadegh, A.; Bios, S.; Zareshahi, R. and Moshafi, M.H., 2019.** Identification of Luteolin in Henna (*Lawsonia inermis*) Oil, a Persion Medicine Product, by HPTLC and Evaluating Its Antimicrobial Effects. Research journal of pharmacogosy. Vol. 6, No. 1, pp: 51-55.

57. **Kumar, V. and Trivedi, S.P., 2015.** Efficacy of *Lawsonia inermis* leaves extract against copper (Cu^{++}) toxicity induced in fish *Channa punctatus* (Bloch): a study based on chromosomal aberrations. Journal of Environment and Bio Sciences. Vol. 29, No. 1, pp: 87-92.

58. **Kumar Sharma, R. and Goel, A., 2018.** Identification of Phytoconstituents in *Lawsonia inermis* Linn. Leaves Extract by GC-MS and their Antibacterial Potential. Pharmacognosy Journal. Vol. 10, No. 6, pp: 1101-1108.

59. **Malekzadeh, F., 1986.** Antimicrobial activity of *Lawsonia intermis* L. Applied Microbiology. Vol. 16, No. 4, pp: 663- 664.

60. **Mansouri Taei, H.; Hajimoradloo, A.; Hoseinifar, S.H. and Ahmadvand, H., 2017.** Dietary Myrtle (*Myrtus communis* L.) improved non-specific immune parameters and bactericidal activity of skin mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. Journal of Fish and shellfish immunology. Vol. 64, pp: 320-324.

61. **Martinez, C.B.R.; Nagae, M.Y.; Zaia, C.T.B.V. and Zaia, D.A.M., 2004.** Morphological and physiological acute effects of lead in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus.* Brazilian Journal of Biology. Vol. 64, No. 4, pp: 797-807.

62. **Masoumian, M. and Zandi, M., 2017.** Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plant Extracts against Multidrug Resistant Bacteria. Zahedan Journal of Research in Medica. Vol. 19, No. 11, pp:10080.

63. **Mastanaiah, J.; Prabhavathi, N.B. and Bobbarala, V., 2011.** In vitro antibacterial activity of leaf extracts of *Lawsonia inermis.* International Journal of PharmTech Research. Vol. 3, No. 2, pp: 1045-1049.

64. **Meyer-Hoffert, U.; Rogalski, C.; Seifert, S.; Schmeling, G.; Wingerts Zahn, J.; Proksch, E. and Wiedow, O., 2004.** Trypsin induces epidermal proliferation and inflammation in murine skin. Experimental Dermatology. Vol. 13, pp: 234-241.

65. **Moghim, M., 2013.** Isolation, characterization and application of micro-satellite markers in Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. Ph.D. Thesis. University of Putra, Malaysia. 277 p.

66. **OECD. 1992.** OECD guidelines for testing of chemicals. Fish Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris. No. 210, 18 p.

42. **Catoni, C.; Schaefer, H.M. and Peters, A., 2008.** Fruit for health: the effect of flavonoids on humoral immune response and food selection in a frugivorous bird. Functional Ecology. Vol. 22, No. 4, pp: 649-654.

43. **Cengiz, E.I., 2006.** Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. Environmental Toxicology and Pharmacology. Vol. 22, pp: 200-204.

44. **Chaudhary, G.; Goyal, S. and Poonia, P., 2010.** *Lawsonia inermis Linnaeus*: A phytopharmacological review. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research. Vol. 2, No. 2, pp: 91-98.

45. **Cho, H.C. and Lee, S.M., 2012.** Onion powder in the diet of the Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*): Effects on the growth, body composition and lysozyme activity. World Aquaculture Society. Vol. 43, No. 1, pp: 30-38.

46. **Citarasu, T., 2010.** Herbal biomedicines a new opportunity for aquaculture industry. Aquaculture International. Vol. 18, pp: 403-414.

47. **FAO. 2012.** The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome. 209 p.

48. **Finney, D.J., 1971.** Probit analysis. 3rd Ed. Cambridge University Press. London. 333 p.

49. **Fontagne, S.; Bazina, D.; Brequea, J.; Vachota, C.; Bernardea, C.; Rouaultb, T. and Bergot, P., 2006.** Effects of dietary oxidized lipid and vitamin A on the early development and antioxidant status of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) larvae. Aquaculture. Vol. 257, No. 1-4, pp: 400-411.

50. **Gabriel, N.N.; Qiang, J.; Kpundeh, M.D. and Xu, P., 2015.** Use of herbal extracts in controlling reproduction in tilapia culture: Trends and prospects - A review. The Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh. Vol. 67, pp: 1178-1097.

51. **Geraylou, Z.; Souffreau, C.; Rurangwa, E.; D'Hondt, S.; Callewaert, L.; Courtin, C.M. and Ollevier, F., 2012.** Effects of Arabinoxylan Oligosaccharides (AXOS) on Juvenile Siberian Sturgeon (*Acipenser Baerii*) Performance, Immune Responses and Gastrointestinal Microbial Community. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 33, pp: 718-724.

52. **Gisberta, E.; Rodriguezb, A.; Cardonac, L.; Huertasa, M.; Gallardod, M.A.; Sarasquetee, C., Sala Rabanald, M.; Ibarzd, A.; Sanchezd, J. and Castello Orvayb, F., 2004.** Recovery of Siberian sturgeon yearlings after an acute exposure to environmental nitrite: changes in the plasmatic ionic balance, Na+–K+ ATPase activity, and gill histology. Aquaculture. Vol. 239, pp: 141-154.

53. **Hao, L.; Chen, L.; Hao, J. and Zhong, M., 2013.** Bioaccumuulation and sub-acute toxicity of zinc nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*): A comparative study with its bulk counterparts. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 91, pp: 52-60.

54. **Imanipour, M. and Rohe, Z., 2015.** Sngrout effect on growth performance, blood biochemical factors, survival and

67. **Padul, M.V.; Patil, M.T.; Chougale, A.D.; Zambare, V.P.; Patil, R.M.; Ghule, R.B.; Naik wade, S.V.; Garad, A.S.; Shaikh, F.K.; Gadge, P.P.; Shinde, K.D.; Dama, L.B. and Salve, A.N., 2012.** In vitro screening of proteinase inhibitors (Trypsin, Chymotrypsin and helicoverpa gut proteinase inhibitors) in different plant tissue extracts. Trends in Biotechnology Research. Vol. 1, pp: 7-14.

68. **Pasandi Pour, A.; Farahbakhsh, H. and Moradi, R., 2016.** Antibacterial and antioxidant activity of henna (*Lawsonia inermis* L.) leaf extract. 5th National congress on medicinal plants. Isfahan, Iran.

69. **Rajwar, S. and Khatri, P., 2011.** Pharmacognostic and phytochemical studies on various plant parts of *Lawsonia inermis* (henna). Asian Journal of Pharmaceutical Sciences and Clinical Research. Vol. 1, pp: 22-40.

70. **Reiser, S.; Wuertz, S.; Schroeder, J.P.; Kloas, W.R. and Hanel, W., 2011.** Risks of seawater ozonation in recirculation aquaculture. Effects of oxidative stress on animal welfare of juvenile turbot (*Psetta maxima*, L.). Aquatic Toxicology. Vol. 105, pp: 508-517.

71. **Reverter, M.; Bontemps, N.; Lecchini, D.; Banaigs, B. and Sasal, P., 2014.** Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspective. Aquaculture. Vol. 433, pp: 50-61.

72. **Ringo, E. and Gatesoup, F.J., 1998.** Lactic acid bacteria in fish: A Review. Aquaculture. Vol. 160, pp: 177-203.

73. **Saber, T.H., 2011.** Histological Adaptation to Thermal Changes in Gills of Common Carp Fishes *Cyprinus carpio*. Rafidain journal of science. Vol. 22, No. 1, pp: 46-55.

74. **Saeidi, S.; Sabagh, S.K. and Sabori Robat, E., 2012.** A Studyof antibacterial activity of plant extract and essential oil of *Myrtuscommunis* against resistant strains of *Staphyloccocus aureus* bacteriato selective antibiotics. Journal of Zabol University of Medical Sciences and Health Services. Vol. 4, pp: 21-32.

75. **Santhanamari, T.; Meenakshi, P.R. and Velayutham, S., 2011.** In vitro antibacterial activity of extracts of *Lawsonia inermis* and *Punica granatum* against clinically isolated antibiotic resistant *pseudomonas aeruginosa* and *staphylococcus aureus*. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. Vol. 4, pp: 62-65.

76. **Soltani, M.; Ghodratnama, M.; Taheri Mirghaed, A.; Zargar, A. and Rooholahi, Sh., 2013.** The effect of *Zataria multiflora* Boiss and *Rosmarinus officinalis* essential oil on *Streptococcus iniae* isolated from Rainbow trout farms. Journal of Veterinary Microbiology. Vol. 9, pp: 1-11.

77. **Van Heerden, D.; Vosloo, A. and Nikinmaa, M., 2004.** Effects of short-term copper exposure on gill structure, methallothionein and hypoxia-inducible factor-1á (HIF 1á) levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology. Vol. 69, pp: 271-280.