

تعیین غلظت نیمه کشنده (LC₅₀) دو عصاره برگ درخت زیتون (*Olea europaea* L.) و سیر (*Allium sativum* L.) در بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

عاطفه کریمی پاشاکی^۱، محدث قاسمی^{۲*}، سید جلیل ذریه زهرا^۳، مصطفی شریف روحانی^۴ و سید مسعود حسینی^۵

۱- دانشجوی دکترای پژوهش محور بهداشت آبزیان، پژوهشکده آبی‌پروری آبهای داخلی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندر انزلی، ایران

۲- نویسنده مسئول، استادیار، پژوهشکده آبی‌پروری آبهای داخلی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندر انزلی، ایران، پست الکترونیک: mohades@yahoo.com

۳- دانشیار، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۴- استاد، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۵- استاد، گروه میکروبیولوژی و زیست فناوری میکروبی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۷

تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۷

چکیده

در این مطالعه، میزان غلظت نیمه کشنده (LC₅₀) عصاره آبی-الکلی برگ درخت زیتون (*Olea europaea* L.) و عصاره آبی سیر (*Allium sativum* L.) بر روی بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. آزمایش‌ها به روش استاندارد O.E.C.D و به صورت ساکن طی مدت ۹۶ ساعت انجام گردید. میزان ماده مؤثره عصاره‌ها به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری غلظت نیمه کشنده برای هر یک از عصاره‌ها به طور جداگانه، ماهی‌ها به ۵ گروه تیمار و یک گروه شاهد (هریک با ۳ تکرار شامل ۱۰ ماهی) تقسیم‌بندی شدند. میانگین طولی و وزنی ماهی‌ها به ترتیب ۹/۸±۰/۷۸ سانتی‌متر و ۱۵±۳/۴ گرم بود. ۵ گروه تیمار در معرض غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ ppm (میلی‌گرم بر لیتر) از عصاره آبی-الکلی برگ درخت زیتون و ۵ گروه تیمار دیگر در معرض غلظت‌های ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۲۰۰، ۱۶۰۰ و ۲۰۰۰ ppm از عصاره آبی سیر قرار گرفتند. در طول مدت زمان آزمایش میانگین (±SD) دمای آب ۱۷±۱/۷ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۷/۲۳±۰/۴۱ میلی‌گرم در لیتر و pH آب ۷/۵±۰/۸۱ بود. نتایج بدست‌آمده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) نشان داد که میزان آلیسین اندازه‌گیری شده در عصاره سیر ۲۰۰ mg/g و میزان اولئوروپین اندازه‌گیری شده در برگ زیتون ۱۷۷/۲ mg/g بود. مقدار غلظت نیمه کشنده (LC₅₀) ۹۶ ساعته در بچه ماهیان کپور برای عصاره آبی-الکی برگ زیتون ۱۶۸ ppm و برای عصاره آبی سیر ۱۰۵۰ ppm بدست آمد.

واژه‌های کلیدی: عصاره آبی-الکلی برگ زیتون (*Olea europaea* L.)، عصاره آبی سیر (*Allium sativum* L.)، ماهی کپور معمولی، غلظت نیمه کشنده (LC₅₀)، کروماتوگرافی HPLC.

مقدمه

خانواده کپورماهیان بزرگترین خانواده ماهیان استخوانی را با بیش از ۲۴۰۰ گونه و ۲۲۰ جنس تشکیل می‌دهند. این ماهیان ساکن آفریقای شمالی، آفریقا، اروپا و آسیا هستند. دسته بزرگی از کپورماهیان برای مصارف تغذیه‌ای انسان پرورش داده می‌شوند. این ماهیان مهمترین و بزرگترین ماهیان پرورشی برای تغذیه انسان به‌شمار می‌روند (Sanders et al., 2003). یکی از ماهیان شناخته شده و مهم این خانواده، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) است. پرورش ماهی کپور معمولی از ۱۴۰۰ سال پیش از میلاد در کشور چین آغاز شد و در ایران نیز در بیشتر استان‌های کشور این ماهی پرورش داده می‌شود. در بین ماهیان پرورشی، این ماهی از سهولت زیادی برای پرورش برخوردار است و در مقابل تنگناهای محیطی، مقاومت بیشتری نسبت به سایر ماهیان دارد و با وجودی که یک ماهی آب شیرین است ولی می‌تواند در آبهای لب‌شور هم زندگی کند (Sattari et al., 2003; Vosoughi & Mostajer, 2009).

گیاه زیتون (*Olea europaea* L.) از خانواده Oleaceae است. برگ درخت زیتون ضخیم، باریک، سبز تیره، دائمی و همیشه سبز است. قسمت فوقانی یعنی روی سطح برگ کاملاً صاف و صیقلی است، در صورتی که در سطح زیرین آن دسته‌های متفرق کرک‌مانند مشاهده می‌شود. گیاه زیتون از جمله گیاهانی است که از گذشته‌های بسیار دور به‌عنوان یک گیاه دارویی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شده است. در طب سنتی از این گیاه به‌عنوان داروی ضد فشارخون، ضد گرفتگی عروق، ملین، تب‌بر، نیروبخش، مؤثر در درمان عفونت‌های مجاری ادراری، برطرف‌کننده سردرد و کاهنده قند خون استفاده شده است (Zargari, 1996). Suntar و همکاران (۲۰۱۰) و Tekieh و همکاران (۲۰۱۲) اثرهای ضد درد، ضد تورم و ضد التهاب را در عصاره برگ درخت زیتون مشاهده کردند. در پژوهش‌های انجام شده توسط Zaslaver و همکاران (۲۰۰۵) و Aytul (۲۰۱۰) برای

برگ درخت زیتون خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی گزارش شد. Markin و همکاران (۲۰۰۳)، Caturla و همکاران (۲۰۰۵) و Waterman و Lockwood (۲۰۰۷) و Lee و همکاران (۲۰۱۰)، اثر مهارى عصاره برگ زیتون نسبت به باکتری‌های گونه‌های مختلف را مشاهده نمودند. Lee-Huang و همکاران (۲۰۰۳)، Micol و همکاران (۲۰۰۵)، Moatari و همکاران (۲۰۰۶)، Zaher (۲۰۰۷) و Afifi saif (۲۰۱۴) نیز خاصیت ضد ویروسی عصاره برگ زیتون را در مطالعات خود مورد بررسی قرار دادند.

سیر نیز با نام علمی *Allium sativum* گیاهی از راسته مارچوبه‌ای‌ها (Asparagales)، از تیره پیازها (Alliaceae) و سرده سیرها (*Allium*) می‌باشد که گیاهی علفی دوساله و چندساله است که اولین بار در آسیای مرکزی کشت شده است و قرن‌ها است که به‌عنوان ادویه، سبزی و داروی گیاهی در مناطق مدیترانه‌ای تا آسیای مرکزی استفاده می‌شود. کارشناسان گیاهان دارویی در سرتاسر جهان سیر را به‌عنوان یکی از مهمترین داروهای گیاهی معرفی می‌کنند. از ۲۰۰۰ سال قبل از میلاد، سیر در چین به‌عنوان قسمتی از رژیم غذایی روزانه مورد استفاده قرار می‌گرفت و در پزشکی قدیم چین سیر برای درمان ناراحتی‌های گوارشی و تنفسی تجویز می‌گردید (Woodward, 1996). در حدود ۶۵٪ وزن سیر را آب تشکیل می‌دهد. وزن جسم خشک سیر از کربوهیدرات‌های حاوی فروکتوز با ترکیب‌های سولفوز، پروتئین، فیبر و آمینواسیدهای آزاد تشکیل شده است (Koch & Lawson, 1996). آلیسین یکی از ترکیب‌های اصلی سیر تازه و خرد شده می‌باشد و دارای طیف وسیعی از خواص ضد توکسیک (Siddique et al., 2010)، ضد آپوپتوز (Zhang et al., 2008)، ضد باکتریایی، ضد ویروسی و ضد انگلی است (Razavi et al., 2006; Cai et al., 2008; Waag et al., 2010). Han و همکاران (۱۹۹۵) اعلام کردند که خواص آنتی‌بیوتیکی یک میلی‌گرم آلیسین (ماده مؤثره سیر)، با نام شیمیایی S-methyl-L-Cystein Sulfoxide برابر ۱۵IU پنی‌سیلین می‌باشد. سیر خرد یا له شده به همراه سایر

از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC: High Efficiency Liquid Chromatography) با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مدل ۱۵۲۵ ساخت شرکت Waters آمریکا مجهز به آشکارساز UV-VI، در آزمایشگاه شیمی دانشکده شیمی دانشگاه گیلان انجام شد.

تعیین غلظت نیمه کشنده دو عصاره برگ زیتون و سیر

ابتدا عصاره‌گیری از برگ زیتون و سیر انجام و بعد غلظت نیمه کشنده عصاره‌ها اندازه‌گیری شد. در این مطالعه برای تهیه عصاره آبی-الکلی برگ درخت زیتون از روش Moatari و همکاران (۲۰۰۶) استفاده شد. بدین منظور ابتدا برگ درخت زیتون از یکی از باغ‌های استان گیلان واقع در شهرستان رودبار تهیه شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در سایه نگهداری گردید و بعد به پودر تبدیل شد. سپس ۱۰۰ گرم پودر حاصل را با ۱۰۰۰ میلی‌لیتر اتانول (۷۰٪ در آب) به مدت ۷۲ ساعت مجاور نموده و بعد از تبخیر عصاره آبی-الکلی در حمام آب خشک و تا زمان استفاده در آزمایش‌ها در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای تهیه عصاره آبی سیر نیز از روش Ghazanfari و همکاران (۲۰۰۶) استفاده شد، بدین منظور بعد از جمع‌آوری سیر از یکی از مزارع استان گیلان واقع در شهرستان آستانه اشرفیه، سیرها از مقطع عرضی برش داده شده و به مدت ۳۰ دقیقه در هوای آزاد نگهداری شدند؛ سپس با نسبت مساوی با بافر فسفات سالین (PBS) دارای $\text{pH}=7/2$ در مخلوط‌کن، مخلوط شدند و بعد از گاز استریل چند لایه عبور داده و خروجی حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور (RPM) ۳۴۰۰ سانتریفوژ شد و تا زمان استفاده در آزمایش‌ها در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

به منظور تعیین غلظت نیمه کشنده (LC_{50}) عصاره آبی-الکلی برگ درخت زیتون و عصاره آبی سیر از روش استاندارد (O.E.C.D (TRC., 1984) Organization Economic Cooperation and Development) به صورت

عصاره‌های گیاهی و یا جانوری می‌تواند آثار پیشگیری‌کننده مناسبی بر علیه عوامل بیماری‌زای ماهی داشته باشد و برای کنترل عوامل بیماری‌زا به ویژه باکتری‌ها و قارچ‌ها و بهبود ایمنی ماهی کمک کند (Rees et al., 1993). اثر ضد میکروبی این ماده مربوط به واکنش شیمیایی آن با گروه‌های تیول و آنزیم‌هایی از قبیل الکل دهیدروژناز، تیوردوکسین ردوکتاز و RNA پلی‌مراز و غیرفعال کردن آنها می‌باشد (Ankri & Mirelman, 2001). سیر همچنین به دلیل وجود آلیسین، خواص ضد سرطانی دارد (Sowjanya et al., 2009; Tsubura et al., 2011; Azizzadeh Deshad, 2010). آلیسین موجود در سیر خاصیت آنتی‌اکسیدانی و تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی نیز دارد (Shalaby et al., 2006; Fazlollahzadeh et al., 2011; Ndong & Fall, 2011). ماهیان از جمله موجودات آبی هستند که به دلیل ارزش غذایی و اقتصادی از اهمیت خاصی برخوردارند. از این رو به منظور جلوگیری از مسمومیت آنها به هنگام استفاده از هر نوع مواد طبیعی دارویی یا شیمیایی، ضروری است که آزمایش‌های زیست‌سنجی (Bioassay) روی آنها انجام شود. از این رو با توجه به خواص بسیار زیاد ضد میکروبی و ایمنی‌زایی عصاره‌های سیر و برگ زیتون و نیز اهمیت ارزش این عصاره‌ها و متعاقب آن تمایل به استفاده از این عصاره‌ها در آبی پروری، لازم است ابتدا آزمایش‌های زیست‌سنجی روی این عصاره‌ها در ماهیان گونه‌های مختلف انجام شود. هدف از این تحقیق، تعیین غلظت نیمه کشنده ۹۶ ساعته عصاره‌های آبی-الکلی برگ زیتون و آبی سیر بر روی بچه ماهیان کپور پرورشی (*Cyprinus carpio*) بود.

مواد و روش‌ها

تعیین میزان ماده مؤثره موجود در عصاره‌های سیر و برگ زیتون

برای تعیین میزان ماده مؤثره موجود در عصاره سیر (آلیسین) و برگ زیتون (ترکیب‌های فنلی به ویژه اولئوروپین)

ساکن استفاده شد که در آن غلظت‌های عصاره‌ها در طول دوره آزمایش در آکواریوم ثابت شد. برای هر یک از عصاره‌ها، ۱۸۰ بچه ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی $(\pm SD) 15 \pm 3/4$ گرم در نظر گرفته شد. برای هر یک از عصاره‌ها، ماهیان در ۵ گروه تیمار و ۱ گروه شاهد (هریک با سه تکرار و هر تکرار شامل ۱۰ ماهی) قرار داده شدند. ماهی‌ها در ۱۸ آکواریوم جداگانه نگهداری شدند. در طی انجام آزمایش میزان دمای آب $17 \pm 1/7$ درجه سانتی‌گراد، میزان اکسیژن محلول $7/23 \pm 0/41$ میلی‌گرم در لیتر و pH آب $7/51 \pm 0/81$ اندازه‌گیری شد. در مورد عصاره برگ زیتون، ابتدا از غلظت‌های ۵۰۰ ppm و ۷۵۰ عصاره آبی-الکلی برگ زیتون استفاده شد که منجر به تلفات ۱۰۰ درصدی در ماهیان در عرض ۲۴ ساعت شد (Pre-LC₅₀)، سپس از غلظت‌های ۵۰ ppm، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ استفاده شد. در مورد عصاره سیر، ابتدا از غلظت‌های ۳۰۰۰ ppm و ۴۵۰۰ عصاره سیر استفاده شد که منجر به تلفات ۱۰۰ درصدی در عرض ۲۴ ساعت شد (Pre-LC₅₀)، سپس از غلظت‌های ۴۰۰ ppm، ۸۰۰، ۱۲۰۰، ۱۶۰۰ و ۲۰۰۰ استفاده شد. در طول مدت زمان انجام آزمایش با هر یک از غلظت‌های یادشده علائم رفتاری ماهی و تعداد تلفات در ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از مجاورت ماهی با عصاره‌ها به‌طور جداگانه ثبت گردید. داده‌های حاصل توسط نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۹ و با استفاده از روش محاسباتی Probit Analysis مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (Finney, 1971).

نتایج

نتایج بدست‌آمده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) در مورد مواد مؤثره دو عصاره سیر و برگ زیتون نشان داد که میزان آلیسین اندازه‌گیری شده در عصاره سیر 200 mg/g و میزان اولئوروبین اندازه‌گیری شده در برگ زیتون $177/2 \text{ mg/g}$ بود.

نتایج بدست‌آمده از غلظت نیمه کشنده عصاره‌ها نشان داد که میزان حداقل و حداکثر غلظت نیمه کشندگی عصاره برگ زیتون برای بچه ماهیان کپور، $250-50 \text{ ppm}$ و برای عصاره سیر $2000-400 \text{ ppm}$ بود؛ در واقع محدوده اثر عصاره‌ها در غلظتی که هیچ‌گونه تلفاتی نداشتند و نیز در غلظتی که تلفات ۱۰۰ درصدی برای ماهیان مشاهده شد. جدول‌های ۱ و ۲ به ترتیب اثر غلظت‌های مختلف عصاره برگ زیتون و عصاره سیر در بازه زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از مجاورت ماهی‌ها نشان داد. در مورد عصاره برگ زیتون، مصرف 50 ppm از عصاره آبی-الکلی برگ زیتون تا ۹۶ ساعت هیچ‌گونه تلفاتی در ماهی نداشت. غلظت 100 ppm تا ۴۸ ساعت هیچ‌گونه تلفاتی نداشت، در ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب ۱ و ۲ تلفات دیده شد. در غلظت 150 ppm در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب ۲، ۵، ۷ و ۱۰ ماهی تلف شدند. در غلظت‌های 200 ppm در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب ۶، ۱۰، ۱۵ و ۲۴ ماهی تلف شدند. در غلظت 250 ppm در همان ۲۴ ساعت اول همه تلف شدند. در آکواریوم‌های حاوی 250 ppm عصاره آبی-الکلی برگ زیتون، که همه ماهی‌ها در ۲۴ ساعت اول تلف شدند، میزان اکسیژن محلول در آب بعد از ۲۴ ساعت، نزدیک به صفر اندازه‌گیری شد؛ رنگ آب در این آکواریوم‌ها کدر و متمایل به سبز لجنی شده بود. بدن ماهی‌های تلف شده در این آکواریوم‌ها قرمز رنگ بود. در آکواریوم‌های حاوی 200 ppm عصاره آبی-الکلی برگ زیتون، مقدار اکسیژن از روز اول تا چهارم روند کاهشی داشت و ماهی‌های زنده مانده در این آکواریوم‌ها پس از پایان روز ۴، خونریزی سطحی و زیر پوستی داشتند. در آکواریوم‌های حاوی 150 ppm عصاره آبی-الکلی برگ زیتون، میزان اکسیژن از روز اول تا چهارم روند کاهشی کندی داشت ولی در ماهی‌های زنده مانده این آکواریوم‌ها، علائم بالینی خاصی مشاهده نشد. در آکواریوم‌های حاوی 150 ppm و 50 ppm عصاره آبی-الکلی برگ زیتون، میزان اکسیژن از روز اول تا چهارم تقریباً ثابت بود و ماهی‌های

لايه کف به ۳-۱ سانتی متر می‌رسید؛ بدن ماهی‌های تلف شده در این آکواریوم‌ها کاملاً قرمز رنگ بود. در آکواریوم حاوی ۱۶۰۰ ppm عصاره سیر، میزان اکسیژن از روز اول تا چهارم روند کاهشی داشت و ماهی‌های زنده مانده در این آکواریوم‌ها در پایان روز ۴، دارای باله‌های کمی سرخ رنگ بودند و کمی خونریزی سطحی نیز بر روی بدن آنها مشاهده شد، همچنین آبشش‌ها نیز قرمز تیره شده بود و ترشح موکوس سطح بدن آنها کمی بیش از حد طبیعی بود. در آکواریوم‌های حاوی ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ ppm عصاره آبی سیر، علائم بالینی خاصی مشاهده نشد و میزان اکسیژن در پایان روز ۴، تقریباً در حد نرمال و اولیه در تمامی آکواریوم‌ها باقی ماند. بعد از تجزیه و تحلیل‌های آماری، غلظت نیمه کشنده (LC₅₀) ۹۶ ساعته برای عصاره آبی-الکلی برگ زیتون و عصاره آبی سیر به ترتیب ۱۶۸ ppm و ۱۰۵۰ ppm تعیین شد. در حقیقت نتایج نشان داد که بچه ماهی کپور معمولی در مجاورت عصاره آبی-الکلی برگ زیتون با غلظت ۱۶۸ ppm و کمتر از آن و عصاره آبی سیر با غلظت ۱۰۵۰ ppm و کمتر از آن در مدت ۹۶ ساعت هیچ‌گونه تلفاتی نخواهد داشت.

زنده مانده علائم بالینی خاصی نداشتند. در مورد عصاره سیر، نتایج این تحقیق نشان داد که میزان حداقل و حداکثر غلظت نیمه کشندگی برای بچه ماهیان کپور ۲۰۰-۴۰۰ ppm بود؛ در واقع محدوده اثر عصاره آبی سیر در غلظتی که هیچ‌گونه تلفاتی نداشت و غلظتی که تلفات ۱۰۰ درصدی برای ماهیان مشاهده شد. مصرف ۴۰۰ ppm از عصاره آبی سیر تا ۹۶ ساعت هیچ‌گونه تلفاتی در ماهی نداشت. در غلظت ۸۰۰ ppm تا ۷۲ ساعت هیچ‌گونه تلفاتی نداشت ولی در ۹۶ ساعت ۱ عدد تلفات دیده شد. در غلظت ۱۲۰۰ ppm در ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب ۱، ۲، ۴ و ۵ ماهی تلف شدند. در غلظت ۱۶۰۰ ppm در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب ۶، ۹، ۱۳ و ۲۱ ماهی تلف شدند. در غلظت ۲۰۰ ppm در همان ۲۴ ساعت اول همه ماهی‌ها تلف شدند. در آکواریوم حاوی ۲۰۰ ppm عصاره آبی سیر، که همه ماهی‌ها در ۲۴ ساعت اول تلف شدند، اکسیژن محلول در آب بعد از ۲۴ ساعت، نزدیک صفر اندازه‌گیری شد؛ رنگ آب در این آکواریوم شیری رنگ شده بود و به علت اشباع عصاره سیر، سطح آب کاملاً از کف حاصل از حباب‌های هوای خارج شده از سنگ هوا پوشیده شده بود. به طوری که در کناره‌های آکواریوم ضخامت این

جدول ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی-الکلی برگ زیتون بر میزان بازماندگی بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

تیمار	غلظت عصاره برگ زیتون (ppm)	تغییرات نسبت به گروه شاهد				۹۶ ساعت		۷۲ ساعت		۴۸ ساعت		۲۴ ساعت	
		۹۶ ساعت	۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده
شاهد	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰
۱	۵۰	۰	۰	۰	۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰
۲	۱۰۰	-۶/۶۶	-۳/۳۳	۰	۰	۲۸	۲	۲۹	۱	۳۰	۰	۳۰	۰
۳	۱۵۰	-۳۳/۳۳	-۲۳/۳۳	-۱۶/۶۶	-۶/۶۶	۲۰	۱۰	۲۳	۷	۲۵	۵	۲۸	۲
۴	۲۰۰	-۸۰	-۵۰	-۳۳/۳۳	-۲۰	۶	۲۴	۱۵	۱۵	۲۰	۱۰	۲۴	۶
۵	۲۵۰	-۱۰۰	-۱۰۰	-۱۰۰	-۱۰۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰

جدول ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی سیر بر میزان بازماندگی بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

تیمار	غلظت عصاره آبی (ppm)	تغییرات نسبت به گروه شاهد				۹۶ ساعت		۷۲ ساعت		۴۸ ساعت		۲۴ ساعت	
		۹۶ ساعت	۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده
شاهد	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰
۱	۴۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰
۲	۸۰۰	-۳/۳۳	۰	۰	۰	۲۹	۳۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰
۳	۱۲۰۰	-۱۶/۶۶	-۱۳/۳۳	-۶/۶۶	-۳/۳۳	۲۵	۵	۲۶	۴	۲۸	۲	۲۹	۱
۴	۱۶۰۰	-۷۰	-۴۳/۳۳	-۳۰	-۱۶/۶۷	۹	۲۱	۱۷	۱۳	۲۱	۹	۲۵	۵
۵	۲۰۰۰	-۱۰۰	-۱۰۰	-۱۰۰	-۱۰۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰

بحث

عصاره برگ زیتون

با توجه به اثرهای ضد میکروبی و ایمنی‌زایی برگ زیتون و نظر به اهمیت و کاربرد این گیاه از یکسو و از سوی دیگر به دلیل اینکه تاکنون مطالعه‌ای در مورد تعیین غلظت نیمه کشنده عصاره برگ درخت زیتون بر روی بچه ماهی کپور معمولی انجام نشده بود، مطالعه و شناسایی غلظت نیمه کشندگی و سمیت آن بر روی بچه ماهی کپور (به‌عنوان یکی از گونه‌های رایج پرورشی در دنیا) انجام شد و نتایج نشان داد که میزان غلظت نیمه کشنده (LC₅₀) عصاره آبی-الکلی برگ زیتون بر بچه ماهی کپور معمولی در مدت زمان ۹۶ ساعت، ۱۶۸ppm بود.

عصاره سیر

با توجه به اثرهای مؤثر گیاه سیر در طب سنتی انسانی و دامی، مطالعه و شناسایی غلظت نیمه کشنده آن بر روی بچه ماهی کپور انجام شد. نتایج نشان داد که میزان غلظت نیمه کشنده (LC₅₀) عصاره آبی سیر بر بچه ماهی کپور معمولی در مدت زمان ۹۶ ساعت، ۱۰۵۰ppm بود. در مطالعه Syngai و همکاران (۲۰۱۶) که به بررسی غلظت نیمه کشنده عصاره آبی سیر در بچه ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی ۲/۴۱ گرم پرداخته شد، میزان غلظت نیمه کشنده ۹۶ ساعته ۲۵۳/۱۹ میلی‌گرم در لیتر اندازه‌گیری شد که نسبت به مطالعه ما میزان کمتری بود که می‌تواند به دلیل نوع ترکیب سیر و نیز وزن پایین‌تر بچه ماهیان در مقایسه با مطالعه ما باشد (میانگین وزنی ماهیان در پژوهش ما ۱۵±۳/۴ گرم بود که با توجه به اعداد گزارش شده، به نظر می‌رسد در برابر غلظت‌های بالاتر عصاره سیر تا ۱۰۵۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به ماهیان با میانگین وزنی ۲/۴۱ مقاومت بیشتری داشتند). در مطالعه Bazari و Moghaddam و همکاران (۲۰۱۳) که به بررسی غلظت نیمه کشنده عصاره آبی-الکلی سیر بر روی بچه تاس ماهی

ایرانی (*Acipenser persicus*) پرداختند، میزان غلظت نیمه کشنده ۹۶ ساعته این عصاره ۱۲۷۹/۹۷ میلی‌گرم در لیتر محاسبه شد که به عدد محاسبه شده غلظت نیمه کشنده در مطالعه ما نزدیک بود. در مطالعه دیگری که توسط Abd El-Galil و Aboelhadid (۲۰۱۲) بر روی ماهی تیلایبی نیل (*Oreochromis niloticus*) انجام شد، میزان LC₅₀ روغن سیر برابر ۶۱۸۶۰ میلی‌گرم در لیتر تعیین گردید که خیلی بیشتر از این مطالعه بوده که می‌تواند به دلیل نوع ترکیب سیر مورد استفاده، گونه ماهی و شرایط محیطی در تحقیق مذکور باشد. در مطالعه Sahandi و همکاران (۲۰۱۲) نیز اثر ۰/۱ گرم در لیتر عصاره سیر در ماهی زینتی *Poecilia latipinna* به صورت حمام و به‌عنوان درمان بر ضد *Ichthyophthirius multifiliis* مؤثر گزارش شد. همچنین Kazempour و همکاران (۲۰۰۴) اثر عصاره سیر بر ترمیم ظاهری زخم‌های سطحی ماهی کپور معمولی را مورد بررسی قرار دادند؛ در این تحقیق ماهی‌های کپور معمولی در معرض غلظت‌های ۲gr/lit و ۰/۶ و ۰/۱ از عصاره سیر قرار گرفتند. در آکواریوم حاوی ۲gr/lit سیر ماهی‌ها بعد از ۲ ساعت به طور کامل تلف شدند. در آکواریوم حاوی ۰/۶gr/lit از سیر، اثرهای کمبود اکسیژن و تیرگی رنگ آبشش و خونریزی اندک سطحی بر روی پوست ماهی مشاهده شد ولی ماهی‌ها تلفاتی نداشتند. در آکواریوم حاوی ۰/۱gr/lit عصاره سیر، هیچ‌گونه علائم ظاهری غیرطبیعی در ماهی‌ها مشاهده نشد.

شایان ذکر است که مقادیر غلظت‌های نیمه کشنده هیچ‌گاه یک مقدار ثابت و مطلق نمی‌باشد، به دلیل اینکه فاکتورهای زیادی مانند اختلافات فردی، سنی، جنسی، وزنی، عوامل محیطی، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب، نحوه تجویز و سایر فاکتورهای دیگر در تعیین LC₅₀ مؤثرند (Mirsattari, 2002). با توجه به غلظت‌های مورد استفاده عصاره برگ زیتون در تیمارهای مختلف و نتایج حاصل از مرگ و میر بچه کپور ماهیان، استفاده از غلظت‌های کمتر از ۱۵۰ppm می‌تواند مناسب باشد، ولی در مورد عصاره سیر و

- ciprofloxacin. International Journal of Antimicrob Agents, 31(2): 179-180.
- Caturla, N., Perez-fons, L., Estepa, A. and Micol, V., 2005. Differential effect of oleuropein, a biophenol from *Olea europaea*, on anionic and zwitterionic phospholipid model membranes. Chemistry and Physics Lipids Journal, 137: 2-17.
 - Fazlollahzadeh, F., Keramati, K., Nazifi, S., Shiriani, S. and Seifi, S., 2011. Effect of garlic on hematological parameters and plasma activities of ALT and AST of Rainbow trout intempreature stress. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5(9): 84-90.
 - Finney, D.J., 1971. Statistical Methods in Biological Assay. Hafner Publishing Company, New York, 688p.
 - Ghazanfari, T., Hassan, Z.M. and Khamesipour, A., 2006. Enhancement of peritoneal macrophage phagocytic activity against *Leishmania major* by garlic (*Allium sativum*) treatment. Journal of Ethnopharmacology, 103(3): 333-337.
 - Han, J., Lawson, L., Han, G. and Han, P., 1995. A spectrophotometric method for quantitative determination of allicin and total garlic thiosulfinates. Biochemical Journal, 225: 157-160.
 - Kazempour, J., Rashai M. and Kiwani, Y., 2004. Qualitative comparison of the effect of garlic and chamomile extract on the removal of surface wounds of common carp (*Cyprinus carpio*). Pajouhesh & Sazandegi, 66: 93-97.
 - Koch, H.P. and Lawson, L.D., 1996. Garlic: The Science and Therapeutic Application of *Allium sativum* L. and Related Species. Williams & Wilkins, Baltimore, 329p.
 - Lee, O.H. and Lee, B.Y., 2010. Antioxidant and antimicrobial activity of individual and combined phenolic in *Olea europaea* leaf extract. Bioresource Technology Journal, 101(10): 3751-3754.
 - Lee-Huang, S., Zhang, L., Lin Huang, P., Young-Tae, C. and Huang, P., 2003. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. Biochemical and Biophysical Research Communications Journal, 307: 1029-1032.
 - Markin, D., Duek, L. and Berdicevsky, I., 2003. In-vitro antimicrobial activity of olive leaves. Mycoses Journal, 46: 132-136.
 - Micol, V., Caturla, N., Peterz, L. and Mas, V., 2005. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against haemorrhagic septicemia rhabdovirus (VHS). Antiviral Rresearch Journal, 66: 129-136.
 - Mirsattari, A., 2002. Principles of Poisoning. University of Tehran, 220p.

عدد گزارش شده برای غلظت نیمه کشنده عصاره آبی سیر بر بچه ماهی کپور معمولی در مدت زمان ۹۶ ساعت، ۱۰۵۰ ppm گزارش شد؛ از این رو به نظر می‌رسد که دامنه تغییرات تأثیرگذاری این عصاره نسبتاً کم باشد. بنابراین در صورت استفاده از این عصاره با توجه به خواص درمانی مناسب سیر، دامنه خطرپذیری کمی را برای بچه کپورماهیان پرورشی می‌توان متصور بود.

سیاسگزاری

از رئیس محترم پژوهشکده آبی‌پروری آبهای داخلی و رئیس و کارکنان بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان پژوهشکده که شرایط انجام پروژه را فراهم کردند، سپاسگزاری می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Abd El-Galil, M.A.A. and Aboelhadid, S.M., 2012. Trials for the control of trichodinosis and gyrodactylosis in hatchery reared *Oreochromis niloticus* fries by using garlic. Veterinary Parasitology, 185(2-4): 57-63.
- Afifi saif, M., 2014. Studies on the effect of olive leaf extract on a model of DNA or RNA virus. Ph.D. thesis, Veterinary Medicine, Kafrelsheikh University.
- Ankri, S. and Mirelman, D., 2001. Antimicrobial properties of allicin of garlic. Journal of Microbes and Infection, 341-357.
- Aytul, K.K., 2010. Antimicrobial and antioxidant activities of olive leaf extract and its food applications. Master of Science Degree thesis, Izmir Institute of Technology, Turkey.
- Azzadeh Dshad, A., Heshmati, M. and Ghaini M.H., 2010. Garlic extract can induce apoptotic cell death in the human colon adenocarcinoma HT29 cell line. Iranian Journal of Pathology, 5(3): 126-131.
- Bazari Moghaddam, S., Sharif Rohani, M., Sharifpour, I., Pajand, Z., Jalilpour, J. and Masoumzadeh, M., 2013. Determination of lethal concentration of hydroalcoholic extract (*Allium sativum* L.) and its effect on gill tissue of *Persicus sturgeon* (*Acipenser persicus*) fingerlings. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 30(6): 915-922.
- Cai, Y., Wang, R., An, M.M., Liang, B.B. and Fang, Y., 2008. In-vitro bacteriocidal activity of allicin combined with ceefoperazone, tobramycin and

- activities of *Olea europaea* L. Journal of Medicine of Food, 13(2): 352-356.
- Syngai, G.G., Dey, S. and Bharali, R., 2016. Evaluation of toxicity levels of the aqueous extract of *Allium sativum* and its effects on the behavior of Juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758). Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 9(3): 417-421.
 - Tekieh, E., Moghadam Kia, S., Eidi, A., Taghizad Farid, R., Ferdosi, R. and Zaringhalam, J., 2012. Investigation on the anti-inflammatory and analgesic effect of *Olea europaea* L. metanolic extract on male NMRI mouse. Iranian South Medical Journal, 1: 13-23.
 - TRC, 1984. O.E.C.D. Guideline for Testing of Chemicals, Section 2. Effects on Biotic Systems: 1-39.
 - Tsubura, A., Lai, Y.C., Kuwata, M., Uehara, N. and Yoshizawa, K., 2011. Anticancer effect of garlic and garlic-derived compounds for breast cancer control. Anticancer Agents Medicinal Chemical Journal, 11(3): 249-253.
 - Vosoughi, Gh.H. and Mostajer, B., 2009. Freshwater Fish. Tehran University Press, 317p.
 - Waag, T., Gelhaus, C., Rath, J., Stich, A., Leippe, M. and Schirmeister, T., 2010. Allicin and derivatives are cysteine protease inhibitors with antiparasitic activity. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters Journal, 15(18): 5541-5543.
 - Waterman, E. and Lockwood, B., 2007. Active components and clinical application of olive oil. Alternative Medicine Review Journal, 12(4): 331-342.
 - Woodward, P.W., 1996. Garlic and Friends: The History, Growth and Use of Edible Alliums. Hyland House, 248p.
 - Zaher, K.S., 2007. In-vitro studies on the antiviral effect of olive leaf against infectious Laryngotracheitis virus. Global Veterinaria Journal, 1(1): 24-30.
 - Zargari, A., 1996. Medicinal Plants (Vol. 3). Tehran University Press and Publishing, 930p.
 - Zaslaver, M., Offer, S. and Kerem, Z., 2005. Natural compounds derived from foods modulate nitric oxide production and oxidative status in epithelial lung cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 9934-9939.
 - Zhang, Y., Yao, H.P., Huang, F.F., Wu, W., Gao, Y. and Chen, Z.B., 2008. Allicin, a major component of garlic, inhibits apoptosis in vital organs in rats with trauma/hemorrhagic shock. Critical Care Medicine Journal, 36(12): 3226-3232.
 - Moatari, A., Nekooeian, A. and Motamedifard, M., 2006. The anti-influenza virus activity of hydroalcoholic extract of olive leaves. Iranian Journal of Pharmaceutical Science, 2(3): 163-168.
 - Ndong, D. and Fall, J., 2011. The effect of garlic (*Allium sativum*) on growth and immune responses of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*). Journal of Clinical Immunology and Immunopathology Research, 3: 1-9.
 - Razavi, S.M., Azizzadeh, B. and Rahimi, H., 2006. An investigation on antiviral effect of Garlic extract on herpes simplex virus via cell culture. Journal of Dental Medicine Shaid Beheshti University, 24(1): 86-93.
 - Rees, L.P., Minney, S.F., Plummer, N.T., Slater, J.H. and Skyrme, D.A., 1993. A quantitative assessment of the antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum*). World Journal of Microbiology and Biotechnology, 9(3): 303-307.
 - Sahandi, J., Gholipour-Kanani, H. and Taheri, A., 2012. Influence of garlic (*Allium sativum*) and mother worth (*Matricaria chamomilla*) extract on *Ichthyophthiriasis multifiliis* parasite treatment in sail fin molly (*Poecilia latipinna*) ornamental fish. Global Veterinaria, 9(3): 362-366.
 - Sanders, G.E., Batts, W.N. and Winton, J.R., 2003. Susceptibility of zebra fish (*Danio rerio*) to a model pathogen, spring viraemia of carp virus. Comparative Medicine Journal, 53(5): 21-514.
 - Sattari, M., Shahsooni, D. and Shafiei, Sh., 2003. Systematic Fisheries (2). Haghshenas Publishing, 502p.
 - Shalaby, A.M., Khattab, Y.A. and Abdolrhahman, A.M., 2006. Effect of garlic (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Disease, 12(2): 172-201.
 - Siddique, Y.H., Beg, T., Ara, G., Gupta, J. and Afzal, M., 2010. Antigenotoxic effect of allicin against estradio-17beta-induced genotoxic damage in cultured mammalian cells. National Product Research Journal, 24(12): 1087-1094.
 - Sowjanya, B.L., Devi, K.R. and Madhavi, D., 2009. Modulatory effect of garlic extract against the cyclophosphamide induced genotoxicity in human lymphocytes in-vitro. Journal of Environmental Biology, 30(5): 663-666.
 - Suntar, I.P., Akkol, E.K. and Baykal, T., 2010. Assessment of anti inflammatory and antiiceptic

Determination of semi-lethal concentration (LC₅₀) of olive leaf (*Olea europaea* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) extracts in common carp (*Cyprinus carpio*)

A. Karimi Pashaki¹, M. Ghasemi^{2*}, S.J. Zorriehzahra³, M. Sharif Rohani³ and S.M. Hosseini⁴

1- Ph.D by-Research student in Aquatic Health, Inland Water Aquaculture Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Anzali, Iran

2*- Corresponding author, Inland Water Aquaculture Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Anzali, Iran

3- Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

4- Department of Microbiology & Micorbiotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, University of Shahid Beheshti, Tehran, Tehran, Iran

Received: July 2018

Revised: May 2018

Accepted: July 2018

Abstract

In this study, the semi-lethal concentration (LC₅₀) of aqueous-alcoholic extract of olive (*Olea europaea* L.) leaf and aqueous extract of garlic (*Allium sativum* L.) in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings was investigated. Experiments were carried out using standard O.E.C.D within 96h. The amount of active ingredient of the extracts was measured by high performance liquid chromatography (HPLC). To measure the semi-lethal concentration for each extract, the fish were divided into five treatment groups and one control group (each with three replicates including 10 fish). Mean length and weight of fish were 9.8±0.78 cm and 15±3.4 g, respectively. Five treatments were exposed to concentrations of 50, 100, 150, 200 and 250 ppm (mg/l) of aqueous-alcoholic extract of olive leaf and five other treatments were exposed to concentrations of 400, 800, 1200, 1600 and 2000 ppm of aqueous extract of garlic. During the test period, the average (±SD) temperature was 17±1.7 °C, the dissolved oxygen was 7.23±0.41 mg/l and the pH was 7.5±0.81. The results of high performance liquid chromatography (HPLC) showed that the amount of Allicin measured in garlic extract was 200 mg/g and the amount of Oleuropein measured in olive leaf was 177.2 mg/g. The 96h LC₅₀ value in common carp for the aqueous-alcoholic extract of olive leaf was calculated to be 168 ppm and for the aqueous extract of garlic, 1050 ppm.

Keywords: aqueous-alcoholic extract of olive leaf (*Olea europaea* L.), aqueous extract of garlic (*Allium sativum* L.), common carp, semi-lethal concentration (LC₅₀), HPLC.