Archive of SID

دوماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2018.122516.2355
جلد ۳۴، شماره ۵، صفحه ۸۵۸- ۸۴۹ (۱۳۹۷)

تعیین غلظت نیمه کشنده (LC_{50}) 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 پژوهش‌محور بهداشت آبزیان، پژوهشکده آبزی‌پروری آبهای داخلی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندر انزلی، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استادیار، پژوهشکده آبزی‌پروری 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 زیست‌فناوری میکروبی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۷ تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۷

چکیده

در این مطالعه، میزان غلظت نیمه کشنده (LC_{50}) 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 به‌صورت 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 به‌طور جداگانه، ماهی‌ها به ۵ گروه تیمار و یک گروه شاهد (هریک با ۳ تکرار شامل ۱۰ ماهی) تقسیم‌بندی شدند. میانگین طولی و وزنی ماهی‌ها به‌ترتیب ۰/۷۸±۹/۸ سانتی‌متر و ۳/۴±۱۵ گرم بود. ۵ گروه تیمار در معرض غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ppm (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 ۱/۷±۱۷ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۰/۴۱±۷/۲۳ میلی‌گرم در لیتر و pH آب ۰/۸۱±۷/۵ بود. نتایج بدست‌آمده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) نشان داد که میزان آلیسین اندازه‌گیری شده در عصاره سیر ۲۰۰mg/g و میزان اولئوروپین اندازه‌گیری شده در برگ زیتون ۱۷۷/۲mg/g بود. مقدار غلظت نیمه کشنده (LC_{50}) ۹۶ ساعته در بچه ماهیان کپور برای عصاره آبی-الکی برگ زیتون ۱۶۸ppm و برای عصاره آبی سیر ۱۰۵۰ppm بدست آمد.

واژه‌های کلیدی: عصاره آبی-الکلی برگ زیتون (*Olea europaea* L.)، عصاره آبی سیر (*Allium sativum* L.)، ماهی کپور معمولی، غلظت نیمه کشنده (LC_{50})، کروماتوگرافی HPLC.

www.SID.ir

Archive of SID

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 استان های 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 eurcpaea* L.) از خانواده Oleaceae است. برگ درخت زیتون ضخیم، باریک، سبزتیره، دائمی و همیشه سبز است. قسمت فوقانی یعنی روی سطح برگ کاملاً صاف و صیقلی است، در صورتی که در سطح زیرین آن دسته های متفرق کرک‌مانند مشاهده می‌شود. گیاه زیتون ازجمله گیاهانی است که از گذشته های بسیار دور به‌عنوان یک گیاه دارویی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می شده 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 پژوهش های 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 مهاری 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 اولین‌بار 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 کربوهیدرات های حاوی فروکتوز با ترکیب های 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

www.SID.ir

Archive of SID

عصاره‌های گیاهی و یا جانوری می‌تواند آثار پیشگیری‌کننده مناسبی بر علیه عوامل بیماری‌زای ماهی داشته باشد و برای کنترل عوامل بیماری‌زا به‌ویژه باکتری‌ها و قارچ‌ها و بهبود ایمنی ماهی کمک کند (Rees *et al*., 1993). اثر ضدمیکروبی 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 به‌دلیل 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 ازجمله موجودات آبزی هستند که به‌دلیل ارزش غذایی و اقتصادی از اهمیت خاصی برخوردارند. ازاین رو به‌منظور 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. ازاین‌رو باتوجه به خواص بسیار زیاد ضد میکروبی و ایمنی‌زایی عصاره‌های سیر و برگ زیتون و نیز اهمیت و ارزش این عصاره‌ها و متعاقب آن تمایل به استفاده از این عصاره‌ها در آبزی 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 عصاره های 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 (ترکیب های فنلی به‌ویژه اولئوروپین) 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. بدین‌منظور 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، بدین‌منظور بعد از جمع‌آوری سیر از یکی از مزارع استان گیلان واقع در شهرستان آستانه اشرفیه، سیرها از مقطع عرضی برش داده شده و به‌مدت ۳۰ دقیقه در هوای آزاد نگهداری شدند؛ سپس با نسبت مساوی با بافر فسفات سالین (PBS) دارای pH=۷/۲ 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.

به‌منظور 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) به‌صورت

www.SID.ir

Archive of SID

ساکن استفاده شد که در آن غلظت‌های عصاره ها در طول دوره آزمایش در آکواریوم ثابت شد. برای هر یک از عصاره‌ها، ۱۸۰ بچه ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی (±SD) ۱۵±۳/۴ 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. ماهی ها در ۱۸ آکوریوم جداگانه نگهداری شدند. در طی انجام آزمایش میزان دمای آب ۱۷±۱/۷ درجه سانتی‌گراد، میزان اکسیژن محلول ۷/۲۳±۰/۴۱ میلی‌گرم در لیتر و pH آب ۷/۵۱±۰/۸۱ اندازه‌گیری شد. در مورد عصاره برگ زیتون، ابتدا از غلظت‌های ۵۰۰ppm و ۷۵۰ عصاره آبی-الکلی برگ زیتون استفاده شد که منجر به تلفات ۱۰۰ درصدی در ماهیان در عرض ۲۴ ساعت شد ($Pre\text{-}LC_{50}$)، سپس از غلظت‌های ۵۰ppm، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ استفاده شد. در مورد عصاره سیر، ابتدا از غلظت‌های ۳۰۰۰ppm و ۴۵۰۰ عصاره سیر استفاده شد که منجر به تلفات ۱۰۰ درصدی در عرض ۲۴ ساعت شد ($Pre\text{-}LC_{50}$)، سپس از غلظت‌های ۴۰۰ppm، 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 تجزیه‌وتحلیل 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 ۲۰۰mg/g و میزان اولئوروپین اندازه‌گیری شده در برگ زیتون ۱۷۷/۲mg/g بود.

نتایج بدست‌آمده از غلظت نیمه کشنده عصاره ها نشان داد که میزان حداقل و حداکثر غلظت نیمه کشندگی عصاره برگ زیتون برای بچه ماهیان کپور، ۲۵۰ppm-۵۰ و برای عصاره سیر ۲۰۰۰ppm-۴۰۰ 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 به‌ترتیب اثر غلظت‌های مختلف عصاره برگ زیتون و عصاره سیر در بازه زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از مجاورت ماهی ها نشان داد. در مورد عصاره برگ زیتون، مصرف ۵۰ppm از عصاره آبی-الکلی برگ زیتون تا ۹۶ ساعت هیچ‌گونه تلفاتی در ماهی نداشت. غلظت ۱۰۰ppm تا ۴۸ ساعت هیچ‌گونه تلفاتی نداشت، در ۷۲ و ۹۶ ساعت به‌ترتیب ۱ و ۲ تلفات دیده شد. در غلظت ۱۵۰ppm در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به‌ترتیب ۲، ۵، ۷ و ۱۰ ماهی تلف شدند. در غلظت های ۲۰۰ppm در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به‌ترتیب ۶، ۱۰، ۱۵ و ۲۴ ماهی تلف شدند. در غلظت ۲۵۰ppm در همان ۲۴ ساعت اول همه تلف شدند. در آکواریوم‌های حاوی ۲۵۰ppm 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 آکواریوم ها کدر و متمایل به سبز لجنی شده بود. بدن ماهی‌های تلف شده در این آکواریوم‌ها قرمز رنگ بود. در آکواریوم‌های حاوی ۲۰۰ppm 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 ۱۵۰ppm 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 ۱۵۰ppm و ۵۰ عصاره آبی-الکلی برگ زیتون، میزان اکسیژن از روز اول تا چهارم تقریباً ثابت بود و ماهی‌های

www.SID.ir

Archive of SID

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 ۲۰۰۰–۴۰۰ppm بود؛ درواقع محدوده اثر عصاره آبی سیر در غلظتی که هیچ‌گونه تلفاتی نداشت و غلظتی که تلفات ۱۰۰ درصدی برای ماهیان مشاهده شد. مصرف ۴۰۰ppm از عصاره آبی سیر تا ۹۶ ساعت هیچ‌گونه تلفاتی در ماهی نداشت. در غلظت ۸۰۰ppm تا ۷۲ ساعت هیچ‌گونه تلفاتی نداشت ولی در ۹۶ ساعت ۱ عدد تلفات دیده شد. در غلظت ۱۲۰۰ppm در ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب ۱، ۲، ۴ و ۵ ماهی تلف شدند. در غلظت ۱۶۰۰ppm در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب ۶، ۹، ۱۳ و ۲۱ ماهی تلف شدند. در غلظت ۲۰۰۰ppm در همان ۲۴ ساعت اول همه ماهی‌ها تلف شدند. در آکواریوم حاوی ۲۰۰۰ 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 به‌علت اشباع عصاره سیر، سطح آب کاملاً از کف حاصل از حباب‌های هوای خارج شده از سنگ هوا پوشیده شده بود. به‌طوری که در کناره‌های آکواریوم ضخامت این لایه کف به ۳–۱ سانتی‌متر می‌رسید؛ بدن ماهی‌های تلف شده در این آکواریوم‌ها کاملاً قرمز رنگ بود. در آکواریوم حاوی ۱۶۰۰ppm عصاره سیر، میزان اکسیژن از روز اول تا چهارم روند کاهشی داشت و ماهی های 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 آکواریوم های حاوی ۴۰۰ ppm، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ 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 تجزیه‌وتحلیل‌های آماری، غلظت نیمه کشنده (LC_{50}) ۹۶ ساعته برای عصاره آبی–الکلی برگ زیتون و عصاره آبی سیر به‌ترتیب ۱۶۸ppm و ۱۰۵۰ppm تعیین شد. در حقیقت نتایج نشان داد که بچه ماهی کپور معمولی در مجاورت عصاره آبی–الکلی برگ زیتون با غلظت ۱۶۸ppm و کمتر از آن و عصاره آبی سیر با غلظت ۱۰۵۰ppm و کمتر از آن در مدت ۹۶ ساعت هیچ‌گونه تلفاتی نخواهد داشت.

www.SID.ir

Archive of SID

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)	۲۴ ساعت		۴۸ ساعت		۷۲ ساعت		۹۶ ساعت		تغییرات نسبت به گروه شاهد				لگاریتم غلظت عصاره برگ زیتون
		مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت	
شاهد	۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱	۵۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۰	۰	۰	۱/۶۹
۲	۱۰۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۱	۲۹	۲	۲۸	۰	۰	-۳/۳۳	-۶/۶۶	۲
۳	۱۵۰	۲	۲۸	۵	۲۵	۷	۲۳	۱۰	۲۰	-۶/۶۶	-۱۶/۶۶	-۲۳/۳۳	-۳۳/۳۳	۲/۱۷۶
۴	۲۰۰	۶	۲۴	۱۰	۲۰	۱۵	۱۵	۲۴	۶	-۲۰	-۳۳/۳۳	-۵۰	-۸۰	۲/۳۰
۵	۲۵۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	-۱۰۰	-۱۰۰	-۱۰۰	-۱۰۰	۲/۳۹۷

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

تیمار	غلظت عصاره آبی (ppm)	۲۴ ساعت		۴۸ ساعت		۷۲ ساعت		۹۶ ساعت		تغییرات نسبت به گروه شاهد				لگاریتم غلظت عصاره سیر
		مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت	
شاهد	۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱	۴۰۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۰	۰	۰	۲/۶۰
۲	۸۰۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۳۰	۲۹	۰	۰	۰	-۳/۳۳	۲/۹۰
۳	۱۲۰۰	۱	۲۹	۲	۲۸	۴	۲۶	۵	۲۵	-۳/۳۳	-۶/۶۶	-۱۳/۳۳	-۱۶/۶۶	۳/۰۷
۴	۱۶۰۰	۵	۲۵	۹	۲۱	۱۳	۱۷	۲۱	۹	-۱۶/۶۷	-۳۰	-۴۳/۳۳	-۷۰	۳/۲۰
۵	۲۰۰۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	۳۰	۰	-۱۰۰	-۱۰۰	-۱۰۰	-۱۰۰	۳/۳۰۱

www.SID.ir

Archive of SID

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 به‌دلیل 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 (LC_{50}) 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 اندازه گیری شد که نسبت به مطالعه ما میزان کمتری بود که می‌تواند به‌دلیل نوع ترکیب سیر و نیز وزن پایین‌تر بچه ماهیان در مقایسه با مطالعه ما باشد (میانگین وزنی ماهیان در پژوهش ما ۳/۴±۱۵ 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 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 تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) انجام شد، میزان LC_{50} روغن سیر برابر ۶۱۸۶۰ میلی‌گرم در لیتر تعیین گردید که خیلی بیشتر از این مطالعه بوده که می‌تواند به‌دلیل 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 *Ichthyopthirius multifilus* مؤثر گزارش شد. همچنین Kazemipour و همکاران (۲۰۰۴) اثر عصاره سیر بر ترمیم ظاهری زخم‌های سطحی ماهی کپور معمولی را مورد بررسی قرار دادند؛ در این تحقیق ماهی های کپور معمولی در معرض غلظت‌های ۲gr/lit و ۰/۶ و ۰/۱ از عصاره سیر قرار گرفتند. در آکواریوم حاوی ۲gr/lit سیر ماهی ها 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، به‌دلیل اینکه فاکتور های زیادی مانند اختلافات فردی، سنی، جنسی، وزنی، عوامل محیطی، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب، نحوه تجویز و سایر فاکتورهای دیگر در تعیین LC_{50} 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

www.SID.ir

Archive of SID

عدد گزارش شده برای غلظت نیمه کشنده عصاره آبی سیر بر بچه ماهی کپور معمولی در مدت زمان ۹۶ ساعت، ۱۰۵۰ppm گزارش شد؛ ازاین‌رو 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.

سپاسگزاری

از رئیس محترم پژوهشکده آبزی‌پروری 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.
- Azizzadeh Deshad, 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 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 zwiterionic 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 activaties of ALT and AST of Rainbow trout intempreture 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.
- Kazemipour, 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.

www.SID.ir

Archive of SID

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-inflamatory 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-drived 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 derivates are cysteine protease inhibitors with antiparasitic activity. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters Jouranl, 15(18): 5541-5543.
- Waterman, E. and Lockwood, B., 2007. Active compomemts and clinical application of olive oil. Alternative Medicine Review Jouranl, 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 Jouranal, 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 Immnunology 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 Universit, 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 *Ichthyophtiriasis multifilus* 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 antiiciceptic

www.SID.ir

Archive of SID

Determination of semi-lethal concentration (LC_{50}) of olive leaf (*Olea europaea* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) extracts in common carp (*Cyprinus carpio*)

A. Karimi Pashaki[1], M. Ghasemi[2*], S.J. Zorriehzahra[3], M. Sharif Rohani[3] and S.M. Hosseini[4]

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 (LC_{50}) 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 Oleoropein measured in olive leaf was 177.2 mg/g. The 96h LC_{50} 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 (LC_{50}), HPLC.

www.SID.ir