مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۶، شماره۲، ۱۴۰۰، ۲۱۴-۲۰۵
مقاله پژوهشی

اثر عصاره اتانولی آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) روی مرحله تومونت و ترونت *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* در ماهی زبرا (*Danio rerio*)

هومن رحمتی‌هولاسو[۱،۳]، مهساسادات جوادی‌موسوی[۲]، حسینعلی ابراهیم‌زاده‌موسوی[۱]، سیدسعید میرزرگر[۱]، علی طاهری‌میرقائد[۱]

[۱] *گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران*
[۲] *دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران*
[۳] *قطب بهداشت و بیماری‌های ماهیان گرمابی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران*

تاریخ دریافت: ۵ اسفند ماه ۱۳۹۹، **تاریخ پذیرش:** ۱۵ اردیبهشت ماه ۱۴۰۰
https://dorl.net/dor/20.1001.1.20082525.1400.76.2.7.7
10.22059/jvr.2019.283809.2946

چکیده

زمینهٔ مطالعه: گیاهان دارویی پیشینه طولانی در درمان بیماری‌ها دارند و معمولاً عاری از عوارض جانبی هستند. حذف و از بین بردن سریع ترونت‌ها و تومونت‌ها می‌تواند مانع از بیماریزایی انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* در ماهیان گردد.

هدف: هدف از این مطالعه بررسی اثر کشندگی و مهارکنندگی عصاره اتانولی آویشن شیرازی روی هر دو مرحله زندگی آزاد و انگلی ایک بود.

روش‌کار: سه شکل محلول از عصاره آویشن شیرازی (۸۰ میلی‌لیتر در لیتر) آماده شد که شامل محلول تازه تهیه شده، محلول نگهداری شده در دمای اتاق به مدت یک ماه و محلول نگهداری شده در یخچال به مدت یک ماه بودند. سپس برای هریک از اشکال محلول‌ها، رقت‌های مختلف تهیه گردید و تومونت‌ها و ترونت‌ها در معرض رقت‌های مختلف عصاره قرار گرفتند.

نتایج: غلظت ۲۰ میلی‌لیتر عصاره آویشن شیرازی بر لیتر در بازه‌ی زمانی ۶/۰۴ تا ۶/۳۷ دقیقه و غلظت ۱۰ میلی‌لیتر عصاره بر لیتر در مدت زمان ۳۱/۲ تا ۳۲/۴ دقیقه می‌تواند تمامی ترونت‌های ایک را نابود کند اما با همین غلظت تنها ۶/۱۱-۳/۴۶ درصد تومونت‌ها پس از ۴ ساعت در معرض‌گذاری از بین رفتند.

نتیجه‌گیری نهایی: تومونت‌ها نسبت به ترونت‌ها مقاومت بیشتری در برابر ویژگی انگل‌کشی عصاره آویشن شیرازی داشتند. استفاده از این عصاره به طور معنی‌داری سبب کاهش تولید و تکثیر تومونت‌ها و کاهش شدت و شیوع عفونت‌زایی ایک شد. عصاره آویشن شیرازی قادر بود مانع از هجوم انگل ایک به ماهیان سالم شده و به طور مؤثری موجب درمان ماهیان مبتلا گردد.

کلمات کلیدی: آویشن شیرازی، بیماری، عفونت‌زایی، کشندگی، مهارکنندگی

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: *هومن رحمتی‌هولاسو، گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران*
پست الکترونیکی: rahmatih@ut.ac.ir

مقدمه

امروزه به دلیل کارایی بالا و خطرات زیست محیطی کم، مطالعات در زمینه استفاده از ترکیبات و عصاره‌های گیاهان دارویی برای کنترل برخی انگل‌ها از جمله *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* جایگاه ویژه‌ای یافته است. گزارش شده است که عصارهٔ آبی گیاه *کاسپیکوس فروتسنس* (۱۲)، عصاره استونی *موروس آلبا* (۸) و همچنین ترکیبات استخراج شده از عصاره‌های گیاهی از قبیل: پنتاگالوی‌لوکوز (۳۰)، سیناتراتوزید-C (۸)، دی هیدروزانگواینارین و دی هیدروکلریترین (۲۸) دارای خواصی با ویژگی فعالیت‌های ضدانگلی در برابر انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* است.

ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس یا ایک عامل بیماری ایکتیوفتیریازیس یا لکه سفید، تک یاخته‌ای مژه دار است که انگل ماهیان آب شیرین هم در محیط‌های آبی گرمسیری و هم مناطق

معتدله در سراسر دنیا می‌باشد (۱۳). این انگل سبب خسارت‌های مالی بسیار زیادی در صنعت آبزی پروری هم در ماهیان پرورشی خوراکی و هم در ماهیان زینتی می‌شود (۲۵). سیکل زندگی این انگل شامل مراحل مختلفی است. فرم عفونت‌زای انگل فرم تومیت یا ترونت می‌باشد که با شنای آزاد در آب حرکت می‌کند و می‌تواند پوست ماهی سالم را در آب مورد حمله قرار دهد، بعد از ورود ترونت به پوست، رشد و از پوست تغذیه می‌کند و مرحله تروفونت تشکیل می‌گردد. تروفونت نقاط جدیدی روی پوست ایجاد می‌نماید. ترونت بعد از تکامل از پوست جدا می‌شود و در محیط آبی آزاد می‌گردد (تومونت). تومونت متحمل تقسیمات متعدد هسته‌ای می‌شود و به کیستی پر از نوزاد عفونت‌زای انگل تبدیل می‌شود، که با منهدم شدن آن ترونت عفونت‌زا به محیط وارد می‌گردد (۱۵). تحقیقات علمی انجام شده نشان داد که ترونت‌ها در قیاس با دیگر مراحل انگل ایک حساسیت بیشتری نسبت به انگل‌کش‌های فعال گیاهی (۶،۱۲،۲۹) و شیمیایی (۵،۲۱) دارند. بنابراین انجام تحقیقات و آزمون‌ها در شرایط آزمایشگاهی برای شناسایی و برگزیدن ترکیبات انگل کش‌های ضد ایک ضروری هستند. در بررسی‌های اخیر، مرگ و میر و تلفات ترونت (۱۱،۱۲،۲۹) به عنوان شاخص‌هایی برای ارزیابی تأثیر و کارایی انگل‌کش در فواصل زمانی مختلف مورد استفاده قرار گرفته است. شاخص دیگری که برای ارزیابی پتانسیل و کارایی انگل‌کش مورد ارزیابی قرار می‌گیرد دوره و مدت زمان در معرض‌گذاری برای کشتن همه ترونت‌ها است (۲۴) که در این تحقیق نیز برای تأثیر ضد ایک گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) مورد استفاده قرار گرفت.

آویشن شیرازی، یک گیاه متعلق به نعناعیان است که تنها در ایران، پاکستان و افغانستان توزیع شده است (۱۸). ترکیبات عمده تشکیل‌دهنده آویشن شیرازی، شامل کارواکرول (۲۶/۰۸ درصد)، پاراسیمن (۲۰/۳۴ درصد)، تیمول (۱۷/۲۳درصد) می‌باشند (۱۶،۲۳). آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند فلاوونوئیدها، تانین‌ها، کومارین‌ها، کورکومانوئیدها، اگزانتون‌ها، فنولیک‌ها، لیگنان‌ها و ترپنوئیدها در تولیدات گیاهی مختلف (مانند میوه، برگ، دانه، عصاره) یافت می‌شوند (۲۰). تیمول و کارواکرول اجزاء اصلی ترکیبات فنلی و پاراسیمن جزء اصلی ترکیبات غیرفنلی اسانس آویشن شیرازی می‌باشند (۴) و ترکیبات طبیعی هستند که در صنایع غذایی به عنوان یک محرک برای بالا بردن سلامتی ایمنی غذا بکار برده می‌شوند (۱). بنابراین استفاده از ترکیبات ضدانگلی استخراج شده از گیاهان می‌تواند راهکار نوینی برای درمان بیماری ایک باشد.

این بیماری در نقاط مختلف و ماهی‌های مختلف در اثر گونه‌ی *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* ایجاد می‌شود (۱۵). بنابراین ماهی زبرا (*Danio rerio*) می‌تواند بیشترین اطلاعات سیستم شبیه‌سازی سلول را فراهم کند و در مقایسه با سایر موجودات آزمایشگاهی و سایر انواع گونه‌های ماهیان، ماهی زبرا دارای نوزادان زیاد است و هزینه‌های تولید و نگهداری آن نسبتاً کم است. با توجه به توصیه‌های جامعه علمی، موسسه ملی سلامت این ماهی به عنوان مدل زیستی برای مطالعه و بیماری معرفی شده است (۱۹).

مواد و روش کار

در این تحقیق از ماهی زبرا که تقریباً همگی نابالغ و هم سن بوده و تقریباً دو تا دو و نیم ماه سن داشتند، استفاده گردید. این ماهیان در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به مدت یک ماه و نیم در شرایط آزمایشی پرورش یافتند و در این دوره‌ی زمانی ماهی‌ها روزانه به میزان ۵ درصد وزن بدن و در دو نوبت غذادهی شدند.

در طول دوره آزمایش مقادیر مربوط به میانگین دما، pH، شوری و اکسیژن اندازه‌گیری شد (جدول ۱). در طول مدت زمان انجام آزمایش تمامی شرایط محیطی، برای کلیه تیمارها یکسان در نظر گرفته شد.

همچنین در این مطالعه از انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* از ماهیان زبرای آلوده جداسازی شد، استفاده گردید. ماهیان آلوده در آکواریوم‌های ۳۰ لیتری نگهداری و هوادهی از طریق پمپ هوای اکواریومی و سنگ هوا تأمین شد. در این مطالعه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی فراهم شد. ماهیان با شدت آلودگی بیشتر جداشده و با پودر گل میخک بیهوش شدند. در این مطالعه برای دستیابی به تروفونت‌ها، پوست ماهیان مذکور به آرامی خراشیده شده و داخل ظروف پتری نگهداری می‌شد. تروفونت‌های جدا شده به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول برای ارزیابی فعالیت کشندگی عصاره آویشن شیرازی، خریداری شده از شرکت سها جیسا، در برابر تومونت‌ها استفاده شد. گروه دوم تروفونت‌ها در ظروف پتری حاوی آب (فاقد کلر) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از اینکه ترونت‌های گروه دوم از سیست‌های داخل ظرف پتری خارج شدند، ۵ میکرولیتر سوسپانسیون ترونت با ۵ تکرار با استفاده از سلول شمارش در زیر میکروسکوپ نوری شمارش شد. در این مطالعه در مراحل مختلف مطالعه قبل از مواجهه با عصاره، تراکم ترونت‌ها براساس تعداد ترونت در هر میلی‌لیتر محاسبه شد (۳۰).

در طول مطالعه به صورت روزانه پارامترهای کیفی آب از قبیل دما، اکسیژن محلول، شوری و pH به‌صورت روزانه اندازه‌گیری و ثبت می‌شد.

اثر عصاره آویشن شیرازی روی ترونت‌های ایک: سه شکل محلول از عصاره آویشن شیرازی (۸۰ میلی‌لیتر در لیتر) آماده شد که شامل: ۱) تازه تهیه شده، ۲) تهیه شده و نگهداری شده در دمای اتاق (۲۳-۲۵ درجه سانتی‌گراد) برای مدت یک ماه و ۳) تهیه شده و نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال برای مدت یک ماه بودند. این سه محلول، به پلیت‌های میکروتیتر ۹۶ چاهی اضافه شده و رقیق‌سازی‌های متوالی مضاعف (دوگانه) به‌ترتیب غلظت‌های ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵ و ۱/۲۵ میلی‌لیتر عصاره آویشن شیرازی در لیتر را در هر چاه ۵۰ میکرولیتری بوجود آورد. تقریباً ۵۰۰ ترونت در ۵۰ میکرولیتر آب در هر پلیت میکرولیتر ۹۶ چاهی برای حصول غلظت نهایی ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵ و ۰/۶۲۵ میلی‌لیتر عصاره آویشن شیرازی در لیتر در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر در چاه‌ها توزیع شد. برای هر غلظت مورد مطالعه ۵ چاه و ۳ چاه نیز بدون عصاره آویشن شیرازی (تنها حاوی ۵۰ میکرولیتر آب فاقد کلر) به‌عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. آب فاقد کلر (کلرزدایی شده) با استفاده از فیلترهای کربنی برای زدودن کلر از آب شهر تهیه گردید. مطالعه ۵ بار با استفاده از جمعیت‌های مختلف ترونت‌ها در زمان‌های مختلف تکرار شد. ترونت‌های زنده و مرده با میکروسکوپ اینورت در بازه‌های زمانی مختلف تا ۴ ساعت پس از در معرض‌گذاری با عصاره آویشن شیرازی شمارش شدند. طول مدت کشندگی (یعنی عدم حرکت و دفورمه شدن ترونت‌ها) ضمن در معرض‌گذاری با عصاره آویشن شیرازی، برای ترونت‌ها در هر چاه ثبت شد (۳۰). ترونت‌ها با استفاده از یک دوربین دیجیتالی نصب شده روی همان میکروسکوپ عکس‌برداری شدند.

اثر عصاره آویشن شیرازی روی تومونت‌های ایک: سه شکل محلول عصاره آویشن شیرازی (۱۶۰ میلی لیتر در لیتر) شامل: ۱) تازه تهیه شده، ۲) تهیه شده و نگهداری شده در دمای اتاق (۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد) برای مدت یک ماه و ۳) تهیه شده و نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال برای مدت یک ماه آماده شد. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از هر محلول به درون چاه‌ها (۴ تا) در اولین ردیف ۲۴ چاهی پلیت کشت بافت (Costar, Cambridge, MA, USA) ریخته شده و رقیق‌سازی‌های متوالی مضاعف (دوگانه) صورت گرفت. تقریباً ۲۰۰ تومونت در ۲۵۰ میکرولیتر آب درون هر چاه پلیت، برای حصول غلظت نهایی ۸۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰ و صفر (شاهد) میلی‌لیتر در لیتر توزیع شدند. مطالعه ۳ بار با جمعیت‌های مختلف از تومونت تکرار شد. پلیت‌ها در دمای ۱ ± ۲۳ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. تومونت‌های زنده و مرده با میکروسکوپ معکوس (اینورت) ۴ و ۲۲ ساعت پس از مطالعه شمارش شدند. مرگ و تولید تومونت‌ها در هر چاه تعیین گردید. میانگین تعداد ترونت‌های آزاد شده از تومونت‌ها در هر چاه از طریق شمارش ترونت‌ها در ۱۰ میکرولیتر از هر چاه (با ۵ بار تکرار) با استفاده از سلول شمارش Sadgewick-Rafter تعیین شد (۳۰).

نفوذپذیری غشای پلاسمای ایک با اکریدین اورنج (acridine orange) و پروپیدیوم یدید (propidium iodide): افزایش نفوذپذیری غشای پلاسمای ترونت‌ها و تومیت‌های تیمار شده با استفاده از روش Xu و همکاران در سال ۲۰۱۵ با مدت زمان رنگ‌آمیزی طولانی‌تر برای تومونت‌ها بررسی شد. ترونت‌های تیمار شده با ۱۰ میلی‌لیتر در لیتر عصاره و تومونت‌های تیمار شده با ۸۰ میلی‌لیتر در لیتر به ۵۰ میکرولیتر تغلیظ شدند. ترونت‌ها و تومونت‌های تیمار نشده به‌عنوان شاهد منفی (کنترل منفی) استفاده شدند. ترونت‌های در تیوپ میکروسانتریوفوژ ۰/۲ میلی‌لیتری با ۲ میکرولیتر اکریدین اورنج (Sigma) در غلظت ۱۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر و ۲ میکرولیتر پروپیدیوم یدید (Sigma) در غلظت ۲۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر برای مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. تومونت‌ها با همان غلظت‌های اکریدین اورنج و پروپیدیوم یدید برای مدت ۴۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. سپس زیر میکروسکوپ فلئورسنس رنگ‌آمیزی سوسپانسیون‌های سلولی روی اسلایدها توزیع (گسترش)، مشاهده و عکس‌برداری شد.

در نهایت داده‌های هر مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۱۷/۰) تجزیه و تحلیل و به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شدند. آزمون Student–Newman–Keuls برای مقایسه مورد استفاده قرار گرفت. احتمالات ۰/۰۵ و کمتر از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

نتایج

همان طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، میانگین طول دوره‌ی زمانی (بر حسب دقیقه) برای از بین رفتن همه ترونت‌ها در خلال ۴ ساعت مواجهه با غلظت‌های مختلف محلول تازه تهیه شده عصاره آویشن‌شیرازی با افزایش غلظت عصاره آویشن‌شیرازی به طور معنی‌داری کاهش یافت. مشابه این روند در محلول عصاره نگهداری‌شده برای یک ماه در دمای اتاق و یا دمای ۴

درجه‌سانتی‌گراد نیز مشاهده شد. به طوری که با افزایش غلظت عصاره، طول دوره زمانی برای نابودی ترونت‌ها کاهش یافت. نتایج مربوط به اثر کشندگی عصاره آویشن شیرازی، در برابر ترونت‌های ایک نشان داد که مدت زمان لازم برای از بین بردن کامل ترونت‌ها در غلظت‌های بالای عصاره آویشن‌شیرازی به طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) کوتاه‌تر از غلظت‌های پایین بود. با افزایش غلظت عصاره آویشن‌شیرازی، طول دوره زمانی نابودی کامل ترونت‌ها کوتاه‌تر شد. در تیمار ۲۰ میلی‌لیتر عصاره بر لیتر کمترین زمان (کمتر از ۷ دقیقه) و در تیمار ۲/۵ میلی‌لیتر عصاره بر لیتر بیشترین زمان (۲۹۷ تا ۳۱۱ دقیق) برای نابودی کامل ترونت گزارش شد.

همچنین در غلظت‌های ۰ (تیمار شاهد)، غلظت ۰/۶۲۵ و ۱/۲۵ میلی‌لیتر عصاره بر لیتر، خاصیت کشندگی ترونت دیده نشد. به عبارت دیگر در غلظت ۱/۲۵ میلی‌لیتر عصاره بر لیتر و کمتر از آن، این ترکیب نتوانست موجب نابودی ترونت‌ها شود. مطالعه حاضر، تأثیر عصاره آویشن‌شیرازی در برابر ترونت‌ها همبستگی مثبت و رابطه مستقیمی با غلظت عصاره آویشن‌شیرازی داشت. نتایج همچنین نشان داد نگهداری محلول عصاره آویشن‌شیرازی برای مدت یک ماه در دمای اتاق یا دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (یخچال) اثر معنی‌داری روی خاصیت ضد ترونت محلول عصاره آویشن شیرازی نداشت.

جدول ۱. میانگین دمای آب، pH، شوری و اکسیژن محلول در طول دوره آزمایش.

فاکتور	میانگین
دما (درجهٔ سانتی‌گراد)	۲۵/۲۰±۰/۵۸
pH	۷/۵۱±۰/۱۶
شوری (ppt)	۰/۴۷±۰/۰۵
اکسیژن (میلی گرم در لیتر)	۸/۳۱±۰/۲۰

جدول۲. میانگین طول دوره زمانی (بر حسب دقیقه) برای از بین رفتن همه ترونت‌ها در خلال ۴ ساعت مواجهه با غلظت‌های مختلف عصاره.

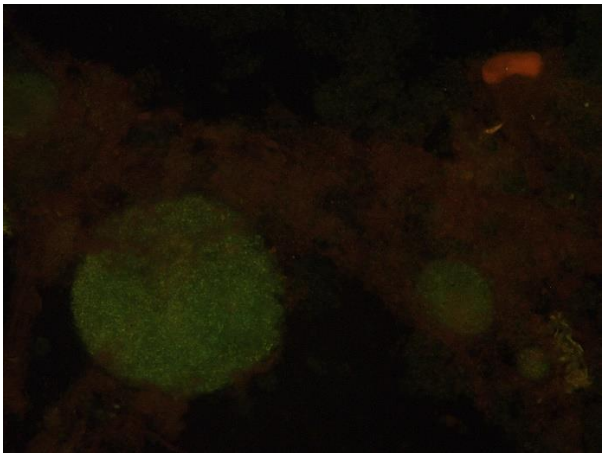
غلظت (میلی‌لیتر در لیتر)	میانگین طول دوره‌ی زمانی تلفات (دقیقه) برای از بین رفتن همه ترونت‌ها (انحراف معیار ± میانگین)		
	محلول تازه	محلول نگهداری شده برای یک ماه	
		دمای اتاق	دمای ۴ درجه سانتی‌گراد
۲۰	۶/۰۴ ± ۰/۱۸^{d}	۶/۸۵ ± ۰/۳۳^{d}	۶/۳۷ ± ۲/۳۰^{d}
۱۰	۳۱/۲ ± ۲/۳۸^{c}	۳۱/۶ ± ۱/۶۷^{c}	۳۲/۴ ± ۲/۳۰^{c}
۵	۱۴۴/۲ ± ۴/۲۰^{b}	۱۵۱/۴ ± ۴/۵۶^{b}	۱۵۶/۶۰± ۵/۷۲^{b}
۲/۵	۳۱۱/۶ ± ۶۴/۸^{a}	۲۹۷/۴ ± ۵/۸۵^{a}	۳۰۳/۶ ± ۹/۸۱^{a}
۱/۲۵	-*	-	-
۰/۶۲۵	-	-	-
۰ (شاهد)	-	-	-

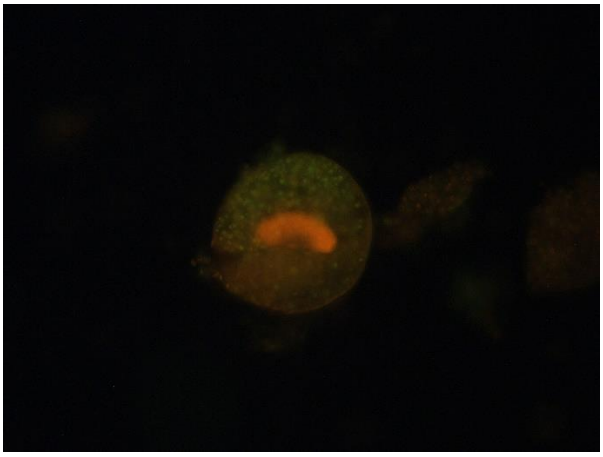
*علامت "-" نشان دهنده این است که بیش از ۸۰ درصد ترونت‌ها پس از ۴ ساعت در معرض‌گذاری با عصاره آویشن شیرازی همچنان زنده مانده‌اند. در هر ردیف و در هر ستون از جدول، معنی‌دار بودن میانگین‌ها با حروف لاتین متفاوت نشان داده شده است.

جدول ۳. نرخ تلفات تومونت و تعداد ترونت‌های آزاد شده از هر تومونت زنده طی مدت ۴ و ۲۲ ساعت مواجهه با غلظت‌های مختلف عصاره.

غلظت (میلی‌لیتر در لیتر)	محلول تازه		محلول نگهداری‌شده برای یک ماه در دمای اتاق		محلول نگهداری‌شده برای یک ماه در ۴ درجه سانتی‌گراد	
	نرخ تلفات تومونت طی ۴ ساعت (درصد)	تعداد ترونت‌های آزاد شده از هر تومونت زنده طی ۲۲ ساعت	نرخ تلفات تومونت طی ۴ ساعت (درصد)	تعداد ترونت‌های آزاد شده از هر تومونت زنده طی ۲۲ ساعت	نرخ تلفات تومونت طی ۴ ساعت (درصد)	تعداد ترونت‌های آزاد شده از هر تومونت زنده طی ۲۲ ساعت
۰ (شاهد)	۰±۰^{d}	۶۵۸/۵۵±۳۱/۲۷^{a}	۰± ۰^{d}	۶۶۴/۳۳±۳۳/۵۶^{a}	۰ ±۰ ^{d}	۶۶۱/۸۸ ± ۲۲/۵۷^{a}
۱۰	۱/۷۷ ±۰/۴۶ ^{d}	۴۶۷±۱۲/۵۴^{b}	۲/۰۳±۰/۴۱^{dc}	۴۶۲/۵۵ ± ۱۵/۱۷^{b}	۱/۷۵ ±۰/۵۸۹^{d}	۴۶۵/۵۵ ±۷/۹۷^{c}
۲۰	۶/۱۱ ±۰/۸۹ ^{c}	۴۲۹/۷۷±۱۹/۷۵^{c}	۳/۴۶±۰/۵۸۹^{c}	۴۴۳/۸۸±۳۳/۵۲^{c}	۵/۲۷ ± ۱/۱۴^{c}	۵۰۳/۷۷ ± ۲۸/۸۶^{b}
۴۰	۸۳/۰۰±۴/۶۴ ^{b}	۰ ± ۰^{d}	۸۰/۸۸ ±۵/۴۴^{b}	۰ ±۰^{d}	۷۹/۳۳±۴/۱۵^{b}	۰ ± ۰^{d}
۸۰	۱۰۰± ۰^{a}	۰ ± ^{d}۰	۱۰۰± ۰^{a}	۰ ±۰ ^{d}	۱۰۰ ± ۰^{a}	۰ ± ۰^{d}

در هر ردیف و در هر ستون از جدول، معنی‌دار بودن میانگین‌ها با حروف لاتین متفاوت نشان داده شده است.





تصویر ۱. مورفولوژی تومونت و ترونت‌های انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* (A: رنگ‌آمیزی با اکریدین اورنج و B: رنگ‌آمیزی با پروپیدیوم یدید ۲۰).

نتایج مربوط به اثر عصاره آویشن شیرازی روی تومونت‌های ایک در جدول ۳ آمده است. نتایج نشان داد با افزایش غلظت عصاره آویشن شیرازی سبب افزایش اثر ضد تومونت شد ($P<۰/۰۵$). درصد تلفات تومونت‌ها طی ۴ ساعت مواجهه با محلول تازه‌ی عصاره آویشن شیرازی در غلظت‌های ۴۰ و ۸۰ میلی‌لیتر عصاره بر لیتر به طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) بیشتر از سایر غلظت‌ها بود. درصد تلفات تومونت در تیمار شاهد صفر درصد گزارش شد. در حالی که درصد تلفات در تیمار با غلظت ۸۰ میلی‌لیتر عصاره بر لیتر هر سه حالت (محلول عصاره تازه، نگهداری شده به مدت یک ماه در دمای معمولی و ۴ درجه سانتی‌گراد) ۱۰۰ درصد بود که این اختلاف معنی‌دار گزارش شد ($P<۰/۰۵$). طی۴ ساعت مواجهه با عصاره آویشن شیرازی با غلظت ۴۰ میلی‌لیتر در لیتر به صورت محلول عصاره تازه، نگهداری شده به مدت یک ماه در دمای معمولی و ۴ درجه سانتی‌گراد، به ترتیب ۸۳، ۸۰ و ۷۹ درصد تلفات تومونت مشاهده گردید. اما پس از ۲۲ ساعت در معرض‌گذاری، تعداد ترونت‌های آزاد شده از تومونت زنده در این غلظت (۴۰ میلی‌لیتر در لیتر)، صفر بود. در غلظت ۲۰ میلی‌لیتر بر لیتر، درصد تلفات تومونت طی۴ ساعت مواجهه با محلول عصاره آویشن شیرازی، نسبت به غلظت‌های ۸۰ و ۴۰ میلی‌لیتر عصاره بر لیتر به شدت کاهش یافت و به ۶/۱ درصد در محلول تازه، ۳/۴ درصد در محلول نگهداری شده به مدت یک ماه در دمای اتاق و ۵/۲ درصد در محلول نگهداری شده به مدت یک ماه در دمای۴ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت. مشابه با این نتایج، در غلظت ۱۰ میلی‌لیتر عصاره در لیتر نیز مشاهده شد به طوری که درصد تلفات تومونت طی ۴ ساعت مواجهه با عصاره آویشن شیرازی، به ۱/۷ تا ۲ درصد کاهش یافت. اما به موازات کاهش درصد تلقات تومونت در غلظت‌های ۲۰ و ۱۰ میلی‌لیتر عصاره بر لیتر، تعداد ترونت آزاد شده از هر تومونت زنده طی ۲۲ ساعت مواجهه با محلول عصاره آویشن شیرازی، به طور معنی‌داری در مقایسه با غلظت‌های ۴۰ و ۸۰ میلی‌لیتر عصاره بر لیتر افزایش یافت ($P< ۰/۰۵$). اما با این وجود در تیمارهای با غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی‌لیتر بر لیتر نیز تعداد ترونت‌های آزاد شده به ازای هر تومونت طی ۲۲ ساعت مواجهه، نسبت به تیمار شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P>۰/۰۵$). مطالعه حاضر غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آویشن شیرازی، پس از ۴ ساعت مواجهه موجب از بین رفتن کمتر از ۷ درصد تومونت‌ها شد و تومونت‌های زنده مانده طی ۲۲ ساعت در معرض‌گذاری، ترونت‌ها را تولید کردند. همچنین پس از ۲۲ ساعت مواجهه، تعداد ترونت‌های آزاد شده از تومونت زنده از میزان ۶۵۸-۶۶۴ ترونت در تیمار شاهد به میزان صفر در غلظت‌های ۴۰ و ۸۰ میلی‌لیتر در لیتر کاهش یافت. به علاوه مطالعه حاضر، اگرچه محلول عصاره آویشن شیرازی در غلظت ۴۰ میلی‌لیتر در لیتر قادر به از بین بردن همه تومونت‌ها نبود (طی ۴ ساعت مواجهه، ۸۳–۷۹ درصد تلفات تومونت گزارش شد)، با این حال هیچ ترونتی تولید و آزاد نشد. مشابه مرحله قبل نگهداری محلول عصاره آویشن شیرازی برای مدت یک ماه در دمای اتاق (۲۵-۲۳ درجهٔ سانتی‌گراد) یا دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال نتوانست اثر ضد تومونت این عصاره را تحت تأثیر قرار دهد. در مجموع در میان سه شکل محلول عصاره آویشن شیرازی، هیچ تفاوت معنی‌داری در تلفات تومونت‌ها و تولید ترونت‌ها مشاهده نشد.

بررسی و تشخیص نفوذپذیری غشای پلاسمای ایک با اکریدین اورنج و پروپیدیوم یدید: اکریدین‌اورنج و پروپیدیوم‌یدید هر دو (خاصیت درون‌گذاری/ نفوذ به درون) intercalating و nucleic acid-specific fluorochromes را دارا هستند که هنگام اتصال با DNA ایک تحت نور UV، فلئورسانس سبز و یا نارنجی را ساطع می‌کنند. اکریدین اورنج قادر است از غشای پلاسمای

سلول‌های زنده عبور کرده و درون DNA قرار گرفته و به رنگ سبز ظاهر شود (تصویر ۱: A). پروپیدیوم یدید تنها وارد سلول‌هایی می‌شود که نفوذپذیری غشای پلاسمایی افزایش یافته است و رنگ صورتی یا قرمز را نشان می‌دهد (تصویر ۱: B).

بحث

انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* که با نام انگل ایک شناخته می‌شود بیماریزاترین انگل تک‌یاخته‌ای ماهیان به شمار می‌آید که ضررهای اقتصادی سنگینی را در آبزی‌پروری موجب می‌شود. سیکل زندگی این انگل شامل مراحل مختلفی است. ترونت مرحله عفونت‌زای چرخه زندگی انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* است. بنابراین از بین بردن ترونت‌ها به منظور کنترل انگل تک‌یاخته ایک امری ضروری است.

Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مطالعه‌ای بر روی کنترل انگل ایک گزارش کردند که در معرض‌گذاری با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر ترکیب پنتاگالول‌گلوکز (استخراج شده از گیاه *Galla chinesis*) برای مدت ۶/۸-۵/۶ دقیقه و غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر برای مدت ۱۳/۱-۱۱/۶ دقیقه قادر است کلیه ترونت‌ها را از بین ببرد (۳۰). Yi و همکاران در سال ۲۰۱۲ نیز نشان دادند که غلظت‌های ۱۰ میلی‌گرم عصاره‌های دو گیاه *Magnolia officinalis* و *Sophora alopecuroides* می‌تواند مدت در بازه زمانی ۳ تا ۴ ساعت در معرض‌گذاری کلیه ترونت‌های انگل ایک را نابود کند (۲۹). همچنین Buchmann و همکاران در سال ۲۰۰۳ گزارش کردند غلظت ۶۲/۵ میلی‌گرم عصاره سیر در لیتر می‌تواند کلیه ترونت‌های ایک را در طول ۱۵ ساعت نابود کند (۵). Ling و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که در معرض‌گذاری ترونت ایک با غلظت ۲۴ میلی‌گرم در لیتر فرات پتاسیم به مدت ۳۰ دقیقه منجر به نابودی کامل ترونت‌ها می‌شود (۱۱). در مطالعاتی که اخیراً انجام شد یک رابطه معنی‌دار و مستقیم بین غلظت اسید تانیک و زمان مواجهه به منظور افزایش نرخ کشندگی ترونت‌های *ایکتیو فتیریوس مولتی فیلیس* وجود داشت. میزان کشندگی با افزایش غلظت و زمان مواجهه اسید تانیک به طور معنی‌داری تشدید شد. تانن مورد استفاده منجر به کاهش معنی‌داری در شمار ترونت‌های انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* بیش از ۸۰ درصد در طی یک ساعت شد (۲،۳). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که غلظت ۲۰ میلی‌لیتر عصاره آویشن شیرازی بر لیتر در بازه زمانی ۶/۰۴ تا ۶/۳۷ دقیقه و غلظت ۱۰ میلی‌لیتر عصاره بر لیتر در مدت زمان ۳۱/۲ تا ۳۲/۴ دقیقه می‌تواند تمامی ترونت‌های ایک را نابود کند (جدول ۲). بنابراین عصاره آویشن شیرازی قادر است در مقایسه با ترکیبات فوق به طور مؤثری ترونت‌های ایک را نابود کند.

Sahandi و همکاران در سال ۲۰۱۲ تأثیر دو گیاه سیر (*A. sativum*) و بابونه (*M. chamomilla*) در افزایش مقاومت ماهی زینتی مولی باله بلند (*P. latipinna*) علیه تک یاخته ایک را بررسی کردند. نتایج نشان داد ماهیان باقی‌مانده پس از ۵ روز درمان شدند. این محققان گزارش کردند عصاره‌های گیاهی می‌توانند به عنوان عوامل طبیعی مؤثر و ایمن برای درمان انگل‌های خارجی ماهیان به کار روند و نسبت به مواد شیمیایی نظیر فرمالین که برای مصرف‌کنندگان و محیط زیست بسیار مضرند ارجحیت دارند (۲۲). نتایج این تحقیقات با مطالعات Sahandi و همکاران در سال ۲۰۱۲ مبنی بر اینکه عصاره گیاه آویشن شیرازی می‌تواند به عنوان عامل طبیعی مؤثر و ایمن برای درمان انگل‌های خارجی ماهیان به‌کار رود و نسبت به سایر مواد شیمیایی ارجحیت دارد مطابقت داشت.

Xu و همکاران در سال ۲۰۱۱ به مقایسه مقاومت گربه ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*)، گربه ماهی آبی (*Ictalurus furcatus*) و گربه ماهی هیبریدی (ماده گربه ماهی کانالی و نر گربه ماهی آبی) در سطوح متفاوت انگل و مرگ و میر آن‌ها پرداختند (۲۷). نتایج این مطالعه با مطالعات Xu و همکاران در سال ۲۰۰۹ مبنی بر اینکه با افزایش تعداد ترونت به ازای هر ماهی، ماهیان دچار عفونت سنگین‌تری می‌شدند و مرگ و میر تجمعی افزایش می‌یافت مطابقت داشت.

Gleason در سال ۱۹۹۹ در مطالعه‌ای بر روی دوزیستان آن‌ها را با ۲۰۰ عدد ترونت مقابله داد و مشاهده کرد که هیچ‌کدام از آن‌ها دچار ایک نشدند و بیان کرد که غلظت‌های پایین این تک‌یاخته اثری بر روی آبزیان ندارد (۹) که با نتایج حاضر مطابقت دارد. همچنین در این مطالعه، وقتی دوزیستان را در معرض ۲۰۰۰ عدد ترونت مقابله داد، شاهد ابتلای ۱۰۰ درصد آن‌ها به ایک بودکه با نتایج حاضر مبنی بر اینکه با با افزایش تعداد ترونت، شیوع این بیماری افزایش می‌یابد مطابقت داشت.

تومونت‌ها مرحله دیگری از زندگی آزاد چرخه زندگی انگل ایک هستند و هر تومونت قادر است صدها و هزاران ترونت عفونت‌زا ایجاد کند (۷،۱۳). هر چند تومونت‌ها مستقیماً ماهیان را مورد حمله قرار نمی‌دهند با این حال خاتمه دادن و توقف تکثیر و تولید تومونت‌ها برای جلوگیری از ابتلا به انگل ایک امری حائز اهمیت است. قابلیت تکثیر و تولید تومونت‌ها می‌تواند از طریق شمارش تعداد ترونت‌های موجود در تومونت مورد ارزیابی قرار گیرد. به علاوه تلفات و مرگ و

میر تومونت‌ها در مراحل اولیه می‌تواند برای تعیین کارایی و بازده ضد انگلی ترکیبات انگل‌کش مورد استفاده قرار گیرد.

بنابراین در مطالعه حاضر مدت زمان ۴ ساعت در معرض‌گذاری برای از بین بردن تومونت‌ها در نظر گرفته شد. همچنین تعداد ترونت‌های آزاد شده از هر تومونت زنده طی ۲۲ ساعت پس از در معرض‌گذاری با عصاره آویشن شیرازی، برای ارزیابی و سنجش بازدهی و اثر ضد تومونت عصاره آویشن شیرازی به کار گرفته شد. عصاره آویشن شیرازی در غلظت ۲۰ میلی‌لیتردر لیتر توانست در مدت زمان کوتاه (حدود ۶ دقیقه) همه ترونت‌ها را نابود سازد اما با همین غلظت (غلظت ۲۰ میلی‌لیتر عصاره بر لیتر) تنها ۳/۴۶-۶/۱۱ درصد تومونت‌ها پس از ۴ ساعت در معرض‌گذاری از بین رفتند (جدول ۳). نتایج نشان داد که تومونت‌ها نسبت به ترونت‌ها مقاومت بیشتری در برابر ویژگی انگل‌کشی عصاره آویشن شیرازی داشتند. که این مسئله در مطالعات گوناگون به اثبات رسیده است (۵،۱۴،۲۶،۲۹).

Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مطالعه‌ای که روی انگل ایک در گربه‌ماهی‌کانالی انجام دادند نشان دادند که یک ساعت در معرض‌گذاری با غلظت ۵ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر پنتاگالول‌گلوکز نتوانست سبب کشته شدن کلیه ترونت‌ها شود اما، توانایی عفونت‌زایی ترونت را به طور معنی‌داری کاهش داد و به میزان اندکی نیز موجب محافظت از ماهیان در برابر عفونت ناشی از ترونتها گردید (۳۰). به طور مشابه Shinn و همکاران در سال ۲۰۱۲ نیز نشان دادند که استفاده از غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر ترکیب شیمیایی برونوپول طی یک دوره ۱۲ ساعته نتوانست کلیه ترونت‌ها را از بین ببرد اما به طور معنی‌داری موجب کاهش قدرت عفونت‌زایی ترونت‌ها در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان شد (۲۴). Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که غلظت‌های پایین ترکیب پنتاگالول‌گلوکز مانند ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نمی‌تواند از عفونت‌زایی ترونت‌ها ممانعت به عمل آورد به نحوی که درصد شیوع عفونت ۱۰۰ درصد گزارش شد اما در مقایسه با گروه شاهد، به طور معنی‌داری شدت عفونت‌زایی کاهش یافت (۳۰). همچنین گزارش شده است که مدت زمان و طول دوره طولانی در معرض‌گذاری با غلظت‌های پایین برونوپول نیز منجر به کاهش تراکم تروفونت در قزل‌آلای رنگین‌کمان شد (۱۷). مشابه نتایج تحقیقات ذکر شده، در مطالعه حاضر عصاره آویشن شیرازی اثر مثبتی روی کنترل انگل ایک داشت.

Hines در سال ۱۹۷۳ اثر دو دوز تومیت را بر روی ماهی کپور به مدت ۲۵-۲۲ روز بررسی کردند. در این مطالعه ماهیان با ۴۰ و ۴۰۰ عدد تومیت بالغ به ازای هر ماهی مقابله داده شدند دمای آب بین ۲۰-۱۸ درجه‌سانتی‌گراد بود (۱۰). نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه Hines مبنی بر اینکه گیاه مرگ و میر در ماهیانی که با دوز پایین‌تر ترونت به ازای هر ماهی مقابله داده شده بودند گزارش نشد، این ماهیان بهبود یافتند و در این گروه ماهیان دستخوش یک عفونت سبک قرار گرفتند و در ماهیانی که با دوز بیشتر مقابله داده شده بودند میزان تلفات آن‌ها افزایش یافت و دوز بالاتر ایک باعث افزایش مرگ و میر در ماهی می‌شود، مطابقت داشت.

همچنین Sahandi و همکاران در سال ۲۰۱۲ ماهی زینتی مولی بلند باله (*P. latipinna*) را در معرض ترونت ایک قرار دادند و سپس با دوزهای مشخصی از دو عصاره گیاهی سیر (*A. sativum*) و بابونه (*M. chamomilla*) حمام دادند. نتایج نشان داد ماهیان باقی‌مانده پس از ۵ روز درمان شدند (۲۲). پس این محققان گزارش کردند عصاره‌های گیاهی می‌توانند به عنوان عوامل طبیعی مؤثر و ایمن برای درمان انگل‌های خارجی ماهیان به کار روند.

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره آویشن شیرازی توانست به طور مؤثری موجب ریشه‌کن شدن ترونت‌ها و تومونت‌های انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* در آب شود. در مجموع، استفاده از این عصاره توانست به طور معنی‌داری سبب کاهش تولید و تکثیر تومونت‌ها و کاهش شدت و شیوع عفونت‌زایی ایک شود. عصاره آویشن‌شیرازی قادر بود مانع از هجوم انگل ایک به ماهیان سالم شده و به طور مؤثری موجب درمان ماهیان مبتلا گردد. این ترکیب برای ماهی زبرا ایمن بود با این وجود تحقیقات بیشتری برای ارزیابی اثر این عصاره روی کنترل بیماری ایک در شرایط واقعی مزارع پرورش ماهیان مورد نیاز است.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، جهت همکاری در اجرای این پژوهش تقدیر و تشکر به عمل می‌آورند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Ahmadifar, E., Akrami, R., Pouralimotlagh, S., Ghelichi, A., Noori, S. (2011). Growth performance, body composition, survival and haematological changes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, juveniles following dietary administration of NEXT Enhance150 (Thymol and Carvacrol). J Fish, Islamic Azad University, Azadshahr Branch, 4(4), 83-91.
2. Alavinia, S.J., Mirzargar, S.S., Rahmati-Holasoo, H., Ebrahimzadeh Mousavi, H. (2018). The in vitro and in vivo effect of tannic acid on *Ichthyophthirius multifiliis* in zebrafish (Danio rerio) to treat ichthyophthiriasis. J Fish Dis, 41(12), 1793-1802. https://doi.org/10.1111/jfd.12886
3. Alavinia, S.J., Mirzargar, S.S., Rahmati-Holasoo, H., Ebrahimzadeh Mousavi, H. (2019). *In vitro* Investigation of Short-Term Antiparasitic Effect of Tannic Acid on *Ichthyophthirius multifiliis* Theronts. J Vet Res, 74(2), 223-231.
4. Behnam, B., Aliakbarlou, J. (2014). Antioxidant effects of *Zataria multiflora* and *Mentha longifolia* essential oils on chicken meat stored at 4 °C. J Food Res, 23(4), 534-543.
5. Buchmann, K., Jensen, P.B., Kruse, K.D. (2003). Effects of sodium percarbonate and garlic extract on *Ichthyophthirius multifiliis* theronts and tomocysts: In vitro experiments. North Am J Aquac, 65(1), 21-24. https://doi.org/10.1577/1548-8454(2003)065<0021:EOSPAG>2.0.CO;2
6. Chu, C., Zhang, Q.Z., Luo, F. (2010). Effect of twenty Chinese herbal medicines on killing trophonts, cysts and theronts of *Ichthyophthirius multifiliis* in vitro. Freshw Fish, 40(1), 55-60. (In Chinese with English abstract).
7. Dickerson, H.W., Dawe, D.L. (2006). *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (phylum Ciliophora). In: Fish Diseases and Disorders. Dickerson H. W (ed.). Cabi, UK. p. 116-153.
8. Fu, Y., QiZhong Z., De-Hai X., Huan X., XinXing C., Bin W. (2014). Parasiticidal effects of *Morus alba* root bark extracts against *Ichthyophthirius multifiliis* infecting grass carp. Dis Aquat Org, 108(2), 129-136. https://doi.org/10.3354/dao02708
9. Gleeson, D.J. (1999). Experimental infection of striped marshfrog tadpoles (*Limnodynastes peronii*) by *Ichthyophthirius multifiliis*. J Parasitol, 85(3), 568-570. https://doi.org/10.2307/3285799 PMID: 10386457
10. Hines, R.S., Spira, D.T. (1973). *Ichthyophthirius multifilis* (Fouquet) in the mirror carp, *Cyprinus carpio L.: I.* Course of infection. J Fish Biol, 5(3), 385-392. https://doi.org/10. 1111/j.1095-8649.1973.tb04466.x
11. Ling, F., Wang, J.G., Liu, Q.F., Li, M., Ye. L.T., Gong, X.N. (2010). Prevention of *Ichthyophthirius multifiliis* infestation in goldfish (*Carassius auratus*) by potassium ferrate (VI) treatment. Vet Parasitol, 168(3-4), 212-216. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.11.009
12. Ling, F., Wang, J.G., Lu, C., Wang, G.X., Lui, Y.H., Gong, X.N. (2012). Effects of aqueous extract of *Capsicum frutescens* (*Solanaceae*) against the fish ectoparasite *Ichthyophthirius multifiliis*. Parasitol Res, 111(2), 841-848. https://doi.org/10.1007/s00436-012-2907-9 PMID: 22526288
13. Matthews, R.A. (2005). *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet and *ichthyophthiriosis* in freshwater teleosts. Adv Parasitol, 59, 159-241. https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)59003-1
14. Meinelt, T., Matzke, S., Stüber, A., Pietrock, M., Wienke, A., Mitchell, AJ. (2009). Toxicity of peracetic acid (PAA) to tomonts of *Ichthyophthirius multifiliis*, Dis Aquat Org, 86, 51-56. https://doi.org/10.3354/dao02105
15. Mikkelsen, H., Lindenstorm, T., Nielsen, M.E. (2006). Effects of temperature on production and specificity of antibodies in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). J World Aquacult Soc, 37(4), 522-518. https://doi.org/10.1111/j. 1749-7345.2006.00065.x
16. Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z., Naghdibadi HA. (2007). Antifungal activity of thyme, summer sarvory and clove essential oils against Aspergillus flavus in liquid medium and tomato paste. Food Control, 18(12), 1518-23. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.12.003
17. Picón-Camacho, S.M.., Taylor, N.G., Bron, J.E., Guo, F.C., Shinn, A.P. (2012). Effects of long duration, low dose bronopol exposure on the control of *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora), parasitising rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Vet Parasitol, 186, 237-244. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.022
18. Ramezani, M., Hosseinzadeh, H., Samizadeh, SH. (2004). Antinociceptive effects of *Zataria multifliora* Boiss fractions in mice. J Ethnopharmacol, 91(1), 167-170. https://doi.org/ 10.1016/j.jep.2003.12.016
19. Rasooly, R. S., Henken, D., Freeman, N., Tompkins, L., Badman, D., Briggs, J., Hewitt, A. T. (2003). Genetic and genomic tools for zebrafish research: the NIH zebrafish initiative. Dev Dynam: an official publication of the American Association of Anatomists, 228(3), 490-496. https://doi.org/10.1002/dvdy.10366
20. Roby, M.H.H, Sarhan, M.H., Selim, K.A.H. (2013). Evaulation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris L.*), sage (*Salvia officinalis L.*), and marjoram (*Origanum majorana L.*) extracts. Ind Crop Prod, 43, 827-831. https://doi.org/10. 1016/j.indcrop.2012.08.029
21. Rowland, S.J., Mifsud, C., Nixon, M., Read, P., Landos, M. (2009). Use of formalin and copper to control *ichthyophthiriosis* in the Australian freshwater fish silver perch (*Bidyanus bidyanus Mitchell*). Aqua Res, 40, 44-54. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02061.x
22. Sahandi, J., Gholipour Kanani, H., Rahmani Asgarabad, F. (2012). Influence of garlic (*Allium sativum*) and mother worth (sic) (*Matricaria chamomilla*) extract effects on *Ichthyophtirius mutilfilus* (sic) parasite treatment in sail fin molly (*Poecilia latipinna*) ornamental fish. Glob Vet, 9(3). 362-366. https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2012.9.3.6462
23. Sharififar, F., Moshafi, M.H., Mansouri, S.H., Khodashenas, M., Khoshnoodi, M. (2007). In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methaol extract of endemic Zataria multiflora. *Boiss*. *Food Control*, 18(7), 800-805. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.04.002
24. Shinn, Picón-Camacho, A.P., Bron, S.M., Conway, J.E., Yoon, D., Guo, G.H.., Taylor, F.C. (2012). The anti-protozoal activity of bronopol on the key life-stages of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 (Ciliophora), Vet Parasitol, 186, 229-236. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.025
25. Song, K., Ling, F., Huang, A., Dong, W., Liu, G., Jiang, C., Zhang, Q., Wang, G. (2015). In vitro and in vivo assessment of the effect of antiprotozoal compounds isolated from *Psoralea corylifolia* against *Ichthyophthirius multifiliis* in fish. Int J Parasitol Drugs Drug Resist, 5(2), 58-64. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.04.001

26. Straus, D.L., Meinelt, T. (2009). Acute toxicity of peracetic acid (PAA) formulations to *Ichthyophthirius multifiliis* theronts. Parasitol Res, 104, 1237-1241. https://doi.org/10.1007/s00436-009-1361-9 PMID: 19221794
27. Xu, D.H., Klesius, P.H., Shoemaker, C.A. (2009). Effect of immunization of channel catfish with inactivated trophonts on serum and cutaneous antibody titers and survival against *Ichthyophthirius multifiliis*. Fish Shellfish Immun, 26(4), 614-618. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.09.015
28. Yao, J., Zhi-ming Z., Xi-lian L., Wen-lin Y., Hong-shun R., Xiao-yi P. (2011). Antiparasitic efficacy of dihydrosanguinarine and dihydrochelerythrine from *Macleaya microcarpa* against *Ichthyophthirius multifiliis* in richadsin (*Squaliobarbus curriculus*). Vet Parasitol, 18(1-2), 8-13. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.021
29. Yi, Y.L., Lu, C., Hu, X.G., Ling, F., Wang, G.X. (2012). Antiprotozoal activity of medicinal plants against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish (*Carassius auratus*). Parasitol Res, 111, 1771–1778. https://doi.org/10.1007/s00436-012-3022-7 PMID: 22864919
30. Zhang, Q., Xu, D.H., Klesius, P.H. (2013). Evaluation of an antiparasitic compound extracted from *Galla chinensis* against fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*, Vet Parasitol, 198(1-2), 45-53. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.08.019

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 76, Number 2, 2021
Original Article

Effect of Ethanol Extract of *Zataria Multiflora* on *Ichthyophthirius Multifiliis* Tomonts and Theronts in *Danio rerio*

Hooman Rahmati-Holasoo[1], Mahsa Sadat Javadi Moosavi[2], Hosseinali Ebrahimzadeh Mousavi[1], Seyed Saeed Mirzargar[1], Ali Taheri Mirghaed[1]

[1] *Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[2] *Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[3] *Centre of Excellence for Warm Water Fish Health and Disease, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*

10.22059/jvr.2019.283809.2946
Received: *23 February 2021*, ***Accepted:*** *5 May 2021*

Abstract

BACKGROUND: Medicinal plants have a long history in the treatment of parasitic diseases and are usually free of side effects. Removing and killing tomonts and theronts of this parasite can prevent the parasite pathogenicity in fish**.**

OBJECTIVES: The present study aimed to investigate the inhibitory effect of ethanolic extract of *Zataria multiflora* on both free and parasitic life stages.

METHODS: Three soluble forms of *Zataria multiflora* extract (80 ml/L) were prepared, which contained freshly prepared solution, stored solution at room temperature for one month and stored solution at refrigerator for one month. Afterwards, different dilutions were prepared for each of the solutions and the tomonts and Theronts were treated with different dilutions of the extract.

RESULTS: *Zataria multiflora* extract can kill all theronts at concentrations of 20 ml/L during 6.04 to 6.37 min and concentration of 10 ml/L during 31/2 to 32.4 min, respectively. However, at these concentrations, only 3.46-6.11 % of tomonts were killed herein after 4 hours.

CONCLUSIONS: Tomonts were found to be more resistant to the parasiticides than theronts. The use of *Zataria multiflora* extract significantly reduced tomont reproduction and decreased Ich infectivity prevalence and intensity. *Zataria multiflora* extract prevented Ich infestation in naive fish and effectively treated infected fish**.**

Keywords: *Zataria multiflora*, Disease, Infectivity, Killing, Inhibitory

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: rahmatih@ut.ac.ir Tel/Fax: 021-66933222/021-61117194

How to cite this article:

Rahmati-Holasoo, H., Javadi Moosavi, M., Ebrahimzadeh Mousavi, H., Mirzargar, S., Taheri Mirghaed, A. (2021). Effect of Ethanol Extract of *Zataria Multiflora* on *Ichthyophthirius Multifiliis* Tomonts and Theronts in *Danio rerio*. J Vet Res, 76(2), 205-214. https://doi.org/10.22059/jvr.2019.283809.2946

Figure Legends and Table Captions

Table 1. The mean of water temperature, Ph, salinity, and dissolved oxygen during the experiment.
Table 2. The mean mortality duration (MMD) of all theronts in various concentrations of the extract during the 4-h exposure (mean ± SD).
Table 3. The tomont mortality rate (TMR) and number of theronts released from each live tomont in various concentrations of the extract during the 4 and 22-h exposures (mean ± SD).
Figure 1. Morphology of theronts stained with acridine orange and propidium iodid (A: stained with acridine orange and B: stained with propidium iodid).