



## Original Research Paper

## Antiparasitic effects of *Lawsonia inermis*, *Satureja khuzestanica* and *Citrullus colocynthis* on fish parasite: *Ichthyophthirius multifiliis*

Mojtaba Alishahi \*, Saeed Gholami, Farzaneh Feli

Department of Clinical sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

### Key Words

*Ichthyophthirius multifiliis*  
antiparasitic effect  
*Lawsonia inermis*  
*Satureja khuzestanica*  
*Citrullus colocynthis*

### Abstract

**Introduction:** In this study the antiparasitic effect of three herbal extract *Lawsonia inermis*, *Satureja khuzestanica* and *Citrullus colocynthis* on *Ichthyophthirius multifiliis* were investigated.

**Materials & Methods:** Firstly, the hydro alcoholic extract of plants were prepared according to maceration method. Then theront and tomont stages of parasite isolated from heavily infected rainbow trout and were exposed to serial increasing two-fold dilution of each extract. Immobilized (dead) parasites were recorded every 4 hours for 12 hours in each dilution and 12 h LD50 of each extract calculated using probite method. Malachite green used as positive control.

**Result:** Results showed that 12h LD50 of *L. inermis*, *S. khuzestanica* and *C. colocynthis* and Malachite on parasite tomont were 4.68, 2.32, 5.21 and 0.24 mg/l respectively; meanwhile 12 h LD50 of mentioned extract on theront were 0.57, 0.45, 2.37 and 0.121 respectively.

**Conclusion:** According to results it can be concluded that Although *L. inermis*, and *S. khuzestanica* showed mild anti parasitic effects against *Ichthyophthirius*; these effect was insignificant compare to therapeutics such as malachite green. These extracts can be used as a complementary treatment along with chemical treatment.

\* Corresponding Author's email: [alishahimoj@gmail.com](mailto:alishahimoj@gmail.com), [alishahim@scu.ac.ir](mailto:alishahim@scu.ac.ir)

Received: 26 September 2020; Reviewed: 3 November 2020; Revised: 6 January 2021; Accepted: 12 February 2021

(DOI): [10.22034/AEJ.2021.261673.2427](https://doi.org/10.22034/AEJ.2021.261673.2427)

## مقاله پژوهشی

بررسی اثر ضد انگلی عصاره حنا *Lawsonia inermis*، مرزه *Satureja khuzestanica* و هندوانه ابوجهل *Citrullus colocynthis* بر ایکتیوفتریوس مولتی فیلیس عامل بیماری لکه سفید در ماهی

مجتبی علیشاهی\*، سعید غلامی، فرزانه فعلی

گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

## چکیده

## کلمات کلیدی

**مقدمه:** در این تحقیق اثر سه عصاره گیاهی حنا *Lawsonia inermis*، مرزه *Satureja khuzestanica* و هندوانه ابوجهل *Citrullus colocynthis* بر مرحله ترونت و تومونت انگل تک یاخته‌ای ایکتیوفتریوس مولتی فیلیس ارزیابی گردید. **مواد و روش‌ها:** بدین منظور ابتدا عصاره‌های هیدروالکلی تهیه گردید، سپس ترونت و تومونت انگل ایکتیوفتریوس از ماهی قزل‌آلای شدیداً مبتلا جداسازی شد. در مرحله بعد هر دو مرحله انگل در مجاورت غلظت‌های افزایشی هر عصاره قرار گرفتند. میزان بقای انگل در هر غلظت، هر سه ساعت یک‌بار و برای ۱۲ ساعت ثبت گردید و LD50 هر عصاره در این دوره زمانی با استفاده از روش Probit محاسبه گردید. از مالاشیت سبز به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. **نتایج:** نتایج تحقیق نشان داد که LD50 حنا، مرزه و هندوانه ابوجهل بر تومونت به‌ترتیب برابر ۴/۶۸، ۲/۳۲ و ۵/۲۱ میلی‌گرم در لیتر بود. در صورتی که این میزان برای مالاشیت گرین ۰/۲۴ میلی‌گرم در لیتر بود. LD50 عصاره‌های حنا، مرزه و هندوانه ابوجهل بر ترونت نیز به‌ترتیب برابر ۰/۵۷، ۰/۴۵ و ۲/۳۷ میلی‌گرم در لیتر و در مورد مالاشیت سبز برابر ۰/۱۲۱ میلی‌گرم در لیتر بود. **نتیجه‌گیری و بحث:** با توجه به نتایج تحقیق علی‌رغم اثرات نسبی ضدانگلی عصاره حنا و مرزه بر انگل ایکتیوفتریوس، این اثرات در مقایسه با اثرات مالاشیت ناچیز بوده و امکان جایگزینی مالاشیت با این عصاره‌ها وجود ندارد، هرچند می‌توان با توجه به اثرات ضدایکتیوفتریوسی این عصاره‌ها از آن‌ها به‌عنوان کمک درمان در کنار درمان‌های شیمیایی استفاده کرد.

\* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: alishahim@scu.ac.ir, alishahimoj@gmail.com

تاریخ دریافت: ۵ مهر ۱۳۹۹؛ تاریخ داور: ۱۳ آبان ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۱۷ دی ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۲۴ بهمن ۱۳۹۹  
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.261673.2427

## مقدمه

ایکتیوفتریوس مولتی فیلیس (ایک) یک انگل با گسترش جهانی با حدت بالا در در ماهی می‌باشد که در گونه‌های مختلف ماهیان آب شیرین بیماری‌زایی دارد (۱). چرخه زندگی این انگل به سه مرحله مجزا تقسیم می‌شود: مرحله انگلی (تروفونت)، که از پوست ماهی تغذیه می‌کند، مرحله تولیدمثلی (تومونت)، که تکثیر انجام می‌شود و مرحله عفونی‌زا (ترونت) که آزادانه در آب حرکت کرده و امکان نفوذ به اپیدرم ماهی را دارد. تروفونت‌ها زیر پوست حضور دارند و بعد از بلوغ، بدن ماهی را ترک کرده و وارد آب می‌شوند و به تومونت غیر کیستیک تبدیل می‌شوند که به بستر متصل شده و دیواره کیست را ترشح می‌کنند، این دو مرحله زندگی انگل به داروهای ضدانگلی بسیار مقاومند. تومونت‌های کیستیک به هزاران ترونت عفونی‌زا تبدیل می‌شوند که به مواد ضدانگلی حساسند (۲). این بیماری مهم‌ترین بیماری انگلی در صنعت آبزی پروری کشور بوده و مبارزه با این بیماری در صنعت پرورش ماهیان آب شیرین (گرمابی و سردابی) ضروری است (۳). در گذشته مواد شیمیایی همانند مالاشیت سبز به عنوان یک ترکیب مؤثر برای کنترل یک مورد استفاده قرار می‌گرفت، اما در بسیاری از کشورها به دلیل خواص بالقوه سرطان‌زایی و ترانوژنیک، مصرف آن ممنوع شده است (۴). استفاده از مواد شیمیایی با خطر کم‌تر از قبیل کلرامین-تی (۵)، سولفات مس (۶)، پرمنگنات پتاسیم (۷)، پراستیک اسید و فرمالین (۸) نیز به دلیل کارایی پایین، مشکلات زیست محیطی و سمیت بالا برای ماهی کم‌تر مورد توجه واقع شده‌اند و برخی باعث ایجاد مقاومت دارویی در یک گشته و حتی سلامت انسان را تهدید نموده‌اند. بنابراین معرفی درمان‌های جایگزین مواد شیمیایی در برابر این بیماری ضروری به نظر می‌رسد. کشور ایران به دلیل شرایط جغرافیایی خاص، وسعت زیاد، تنوع آب و هوایی بالا، تنوع گیاهی بالا و نیروی متخصص ارزان، مزیت قابل توجهی در زمینه گیاهان دارویی داراست و دسترسی به گیاهان دارویی آسان و ارزان است. همچنین گیاهان دارویی دارای ترکیبی از مواد مؤثره هستند که امکان ایجاد مقاومت عوامل بیماری‌زا در برابر آن‌ها کم است. از طرفی این مواد زیست تخریب‌پذیر (Biodegradable) و دوست‌دار طبیعت (Environmental friendly) بوده و مشکل زیست محیطی ایجاد نمی‌نمایند (۹). در چند سال اخیر اثر برخی عصاره‌های گیاهان دارویی برای مبارزه با بیماری ایک ارزایی گردیده و اثرات ضدانگلی بسیار مناسبی از برخی از آن‌ها در پیشگیری، کنترل یا درمان این بیماری گزارش شده است (۱۰). هر چند گزارشات مبنی بر اثرات ضدانگلی عصاره‌ها در برابر این انگل معدود است ولی گزارشات امکان استفاده از این محصولات گیاهی در کنترل و افزایش مقاومت در برابر عفونت انگلی با ایکتیوفتریوس مولتی

فیلیس را تایید می‌کند (۲). اثرات ضدانگل ایک به دنبال تجویز Curcumin که ماده مؤثره گیاهی از خانواده زنجبیر Zingiberaceae است در ماهی کپور گزارش شده است (۱۱)، همچنین از عصاره الکلی مگنولیای زمستانه *Magnolia officinalis* نیز در درمان ایک استفاده شده است (۱۲)، Liang و همکاران، نیز اثر عصاره ریشه گیاه توت سفید *Morus alba* را در درمان و کنترل انگل ایک گزارش نمودند (۲). گیاه دارویی حنا *Hena* یا *Lawsonia inermis* گیاهی درختچه‌ای از رده دولپه‌ای‌ها است که جزو گیاهان بومی ایران می‌باشد. اثرات متعدد ضدانگلی، ضدقارچی و ضدباکتریایی از آن گزارش شده است (۱۳)، (۱۴)، اخیراً گزارشاتی از اثرات ضدانگل ایکتیوفتریوس از این گیاه دارویی در ماهی تیلپیا گزارش شده است (۱۵). هندوانه ابوجهل یا سیب تلخ *Citrullus colocynthis* گیاهی بالارونده از سرده سیترولوس (*Citrullus*) بوده که حاوی ماده مؤثره کولوسنتین است که پالپ اسفنجی هندوانه شکل تولید می‌کند و خواص متعدد دارویی مثل اثرات ضدباکتریایی، ضدانگلی، محرک روده و محرک ایمنی در طب سنتی به آن نسبت داده شده است. برخی اثرات ضدانگل‌های ماهی هم به آن نسبت داده شده است (۱۶). همچنین اثر مناسب عصاره الکلی و آبی هندوانه ابوجهل در مقابله با ژیاودیازیس و ترماتود دیژن *Orthocoelium scolicoelium* گزارش شده است (۱۷). گیاه مرزه خوزستانی (*Satureja khuzestanica*) به دلیل ویژگی‌های خاص مثل امکان تولید و کشت آسان و بومی بودن در مناطق جنوب غربی کشور برای اهداف گیاه درمانی مورد توجه فراوان واقع شده است (۱۸) اثرات ضدانگلی این عصاره در شرایط برون تنی بر لیشمانیا *Leishmania major* بارها گزارش شده است. همچنین اثر عصاره خام سیر با غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر بر مرحله ترونت ایک نیز گزارش شده است (۱۹). در تحقیقی مشابه اثرات ضدانگلی گیاه *Polygonum multiflorum* بر ترونت انگل ایکتیوفتریوس گزارش گردید (۲۰). معمولاً تومونت و توموسیست به دلیل دیواره ضخیم به مواد ضدانگلی مقاوم‌تر هستند (۱۲)، لذا باید یا از مواد ضدانگلی قوی‌تر یا غلظت‌های بالاتر مواد ضدایک استفاده کرد تا از تکثیر انگل جلوگیری گردد (۲۱). با توجه به موارد فوق هدف این تحقیق بررسی اثرات ضدانگلی سه عصاره گیاهی بومی کشور شامل عصاره حنا *Lawsonia inermis*، مرزه *Satureja khuzestanica* و هندوانه ابوجهل *Citrullus colocynthis* بر دو مرحله ترونت و توموسیست انگل ایکتیوفتریوس مولتی فیلیس در شرایط آزمایشگاهی و مقایسه این اثرات با مالاشیت گرین است.

## مواد و روش‌ها

گیاهان دارویی مورد استفاده و عصاره‌گیری: در این مطالعه جهت تهیه عصاره هیدروالکلی، از روش Maceration استفاده گردید

**تعیین حساسیت مرحله توموسیست انگل به عصاره‌ها:**

برای بررسی اثر عصاره‌ها بر تومونت (تروفونت جدا شده از پوست) انگل ایکتیوفتریوس، یک میلی‌لیتر آب حاوی ۴۰ عدد تومونت به پلیت‌های ۱۲ گوده‌ای مخصوص محیط کشت سلولی اضافه گردید، تومونت‌ها قبل از تبدیل شدن به توموسیست و تروننت (که حدود ۱۸ ساعت طول می‌کشد) در مجاورت غلظت‌های متوالی عصاره‌ها (طبق جدول ۲) قرار داده شدند و در دمای ۲۳ درجه به مدت ۱۲ ساعت انکوبه شدند. بقای تومونت‌ها در تمام پلیت‌ها هر سه ساعت بررسی، شمارش و ثبت گردید (۲۴). نتایج نسبت تلفات و بقای تومونت‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و روش تعیین میانه تلفات LC50 (Probit) آنالیز گردیدند (۲۰).

**تعیین حساسیت مرحله تروننت انگل به عصاره‌ها: به این**

منظور از پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای مخصوص محیط کشت سلولی استفاده گردید، در هر خانه پلیت میزان ۳۰۰ میکرولیتر از آب استریل اضافه شده و ۳۰۰ میکرولیتر از عصاره به گوده ردیف اول اضافه گردید تا غلظت به ۱۰ میلی‌گرم در لیتر برسد. به روش معمول غلظت‌های متوالی بر مبنای دو از هر عصاره (طبق جدول ۳) در گوده‌های بعدی تا ۶ رقت و در سه تکرار تهیه گردید. به هر خانه پلیت بعد از رقت‌سازی عصاره میزان ۳۰۰ میکرولیتر از استوک تروننت آماده شده در مرحله قبل (که تعداد تروننت آن مشخص شده بود) اضافه گردید. بعد از مجاورت با عصاره، سه مرحله در فواصل ۴ ساعته، تعداد تروننت‌های زنده و مرده (غیرمتحرک immobilized) شمارش گردید (۲۰). نتایج تلفات تروننت‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و روش تعیین میانه تلفات LC50 (Probit) آنالیز گردیدند (۲۰).

**نتایج**

همان‌طور که در جدول ۱ مشخص است، با افزایش غلظت عصاره‌ها اثرات کشنده آن‌ها بر تروننت افزایش یافته و تقریباً تمام غلظت‌های بالای ۰/۰۸ میلی‌گرم در لیتر عصاره‌ها برای تروننت یک اثر کشنده داشته‌اند. همچنین عصاره حنا و مرزه اثرات قابل رقابتی با مالاشیت نشان دادند. با توجه به جدول ۱، هرچند غلظت‌های بالای عصاره، در حد ۱۰ میلی‌گرم در لیتر باعث از بین رفتن ۹۵٪ تومونت انگل شده‌اند ولی با کاهش غلظت عصاره این اثر کاهش یافته و اکثر عصاره‌ها در غلظت کم‌تر از ۰/۶۲۵ میلی‌گرم در لیتر فاقد اثر کشنده روی تومونت بوده‌اند. در بین سه عصاره مورد بررسی که براساس منابع دارای اثرات ضدباکتریایی و ضدتک‌یاخته‌ای هستند، عصاره مرزه و عصاره حنا اثرات ضدانگلی مناسب‌تری داشته و کم‌ترین غلظت ایجاد کننده ۵۰٪ تلفات در ۱۲ ساعت (LC50) ۱۲ ساعته آن برای نوزاد

(۲۲). بدین‌صورت که یک‌صد گرم از هر گیاه را بعد از خشک نمودن کامل در سایه، با آسیاب برقی به خوبی آسیاب کرده و با نسبت ۱:۵ (حجم الکل / وزن ماده خشک) الکل اتیلیک ۸۰٪ مخلوط گردید و به مدت ۷۲ ساعت بر روی دستگاه شیکر به آرامی مخلوط گردید، تا استخراج عصاره بهتر انجام گیرد. سپس مخلوط حلال و پودر گیاه توسط صافی و قیف بوختر صاف شد تا عصاره اولیه به دست آید. عصاره اولیه وارد دستگاه تقطیر دوار Rotator گردیده و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حلال آن‌ها به مدت ۳ ساعت و به آرامی تبخیر گردید و عصاره تغلیظ شده به دست آمد. جهت استاندارد نمودن روش و تکرارپذیری آن وزن خشک عصاره تعیین گردید. بدین‌صورت که سه پلیت شیشه ساعت شکل توسط ترازوی دیجیتالی حساس وزن شد، سپس ۲ میلی‌لیتر عصاره به هر شیشه ساعت اضافه گردیده و به مدت ۴۸ ساعت در ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. بعد از خشک شدن کامل عصاره و توزین مجدد، درصد ماده خشک عصاره محاسبه گردید.

**آماده‌سازی تومونت و تروننت انگل: برای به دست آوردن**

استوک توموسیست و تروننت انگل، ابتدا در یک آکواریوم تعداد ده قطعه ماهی قزل‌آلای ۴۰ گرمی معرفی گردید، به این گروه دو ماهی شدیداً آلوده به ایکس‌تروما معرفی شد تا ایجاد عفونت تجربی به روش مجاورت مستقیم با ماهی بیمار (Cohabitation) گردد. دمای آب بین ۱۸ تا ۲۰ درجه تنظیم شده و هر دو روز یک‌بار نمونه لام مرطوب از پوست و آبشش چند ماهی گرفته شده و وضعیت آلودگی بررسی شد. بعد از آلوده شدن کامل و شدید ماهی‌ها به انگل ایکس‌تروما تهیه استوک اولیه تومونت، دو ماهی با آلودگی بالا با ضربه به محل اتصال سر به نخاع، آسان‌کنشی شده و به یک بشر حاوی آب (آب آکواریوم فیلتر شده با کاغذ صافی و استریل شده با اتوکلاو) معرفی گردید. بعد از یک ساعت تومونت‌ها از پوست، آبشش و باله ماهی جدا شده و وارد آب می‌شدند. تومونت‌های آزاد شده با پیپت پاستور به بشر دیگری حاوی آب استریل منتقل گردیدند. تومونت‌ها شمارش شده برای مرحله اثر عصاره‌ها بر مرحله تومونت انگل، مورد استفاده قرار گرفت. برای تولید استوک (توماپت) در یک بشر جداگانه ۱۰۰ میلی‌لیتری، آب استریل ریخته شده و تعداد ۳۰ عدد تومونت متوسط انگل اضافه شده و به مدت ۱۸ ساعت بشر در دمای ۲۲-۲۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. زیر میکروسکوپ نگاره (لوپ) وضعیت تبدیل تومونت به توموسیست و تروننت ارزیابی گردید. بعد از تکامل حدود ۸۰ درصد تومونت به تروننت، آب حاوی تروننت‌ها به بشر دیگری منتقل شده و با استفاده از لام نوبار غلظت تروننت در میکرولیتر مشخص و برای تعیین اثر عصاره‌ها بر مرحله تروننت استفاده گردید (۲۳).

برابر تومونت انگل در مقایسه با مالاشیت گرین به ترتیب ۹/۶ و ۱۹/۶ برابر کم تر است. هر چند دو عصاره مرزه و حنا اثرات ضدانگلی بهتری نسبت به هندوانه ابوجهل روی ایکتیوفتریوس مولتی فیلیس نشان دادند، ولی LD50 مالاشیت گرین در مقایسه با عصاره حنا و مرزه و هندوانه ابوجهل به طور معنی داری کم تر از این دو عصاره بود.

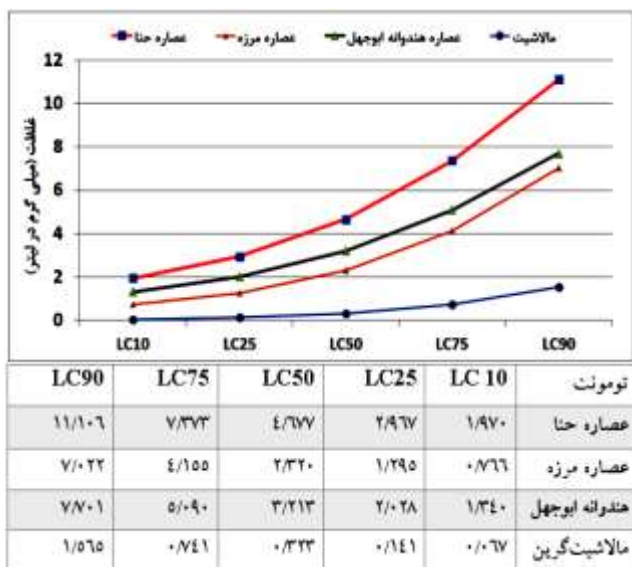
عفونی زای انگل یا ترون (به ترتیب برابر ۰/۴۵۴ و ۰/۵۶۷ میلی گرم در لیتر و برای تومونت انگل به ترتیب برابر ۲/۳۲ و ۴/۶۷ میلی گرم در لیتر بود. البته میزان اثرات ضدانگلی این دو ماده در مقایسه با مالاشیت گرین در برابر ترون به ترتیب ۳/۷۵ و ۴/۶۸ برابر کم تر می باشد. به همین ترتیب اثرات ضدانگلی این دو عصاره در

**جدول ۱: درصد تلفات تومونت ها در غلظت های متوالی عصاره ها و مالاشیت گرین، بعد از مجاورت به مدت ۱۲ ساعت**

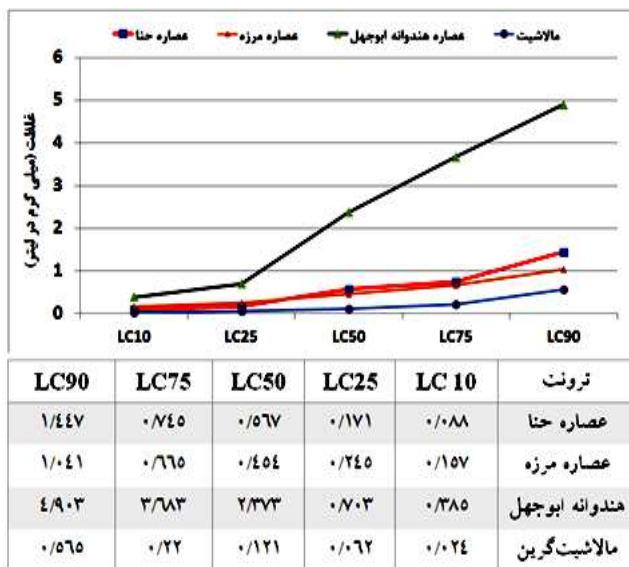
غلظت عصاره (ppm)	۱۰	۵	۲/۵	۱/۲۵	۰/۶۲۵	۰/۳۲	۰/۱۶	۰/۰۸
درصد تومونت تلف شده	۹۵	۵۵	۲۲	۱۱	۶	.	.	.
حنا	۱۰۰	۷۰	۶۰	۲۱	۱۰	.	.	.
مرزه	۸۷	۴۷	۲۶	۹	.	.	.	.
هندوانه ابوجهل	۱	۰/۵	۰/۲۵	۰/۱۲۵	۰/۰۶۳	۰/۰۳۳	۰/۰۱۶	۰/۰۰۸
غلظت ppm	۱۰۰	۸۲	۶۸	۴۴	۲۱	۱۳	.	.
مالاشیت	۱۰۰	۸۲	۶۸	۴۴	۲۱	۱۳	.	.
درصد تومونت تلف شده	۱۰۰	۸۲	۶۸	۴۴	۲۱	۱۳	.	.
کنترل منفی	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰

**جدول ۲: درصد تلفات تومونت ها در غلظت های متوالی عصاره ها و مالاشیت گرین، بعد از مجاورت به مدت ۱۲ ساعت**

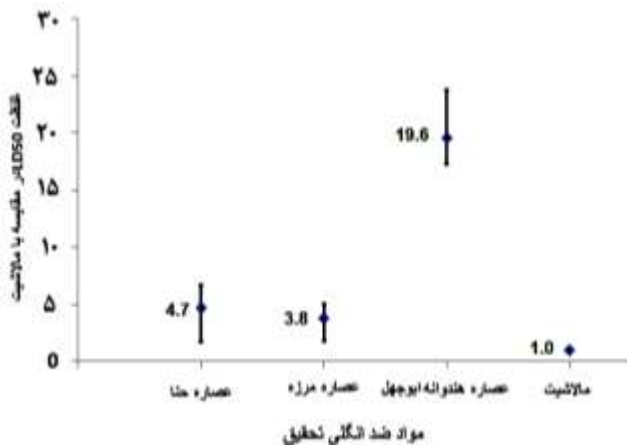
غلظت عصاره (ppm)	۱۰	۵	۲/۵	۱/۲۵	۰/۶۲۵	۰/۳۲	۰/۱۶	۰/۰۸
درصد	۱۰۰	۱۰۰	۹۰	۸۵	۵۵	۴۰	۵	.
حنا	۱۰۰	۱۰۰	۹۰	۸۰	۶۵	۴۵	۱۰	.
ترون تلف شده	۹۵	۸۵	۶۵	۴۵	۱۵	۵	.	.
مرزه	۱	۰/۵	۰/۲۵	۰/۱۲۵	۰/۰۶۳	۰/۰۳۳	۰/۰۱۶	۰/۰۰۸
هندوانه ابوجهل	۱۰۰	۸۹	۷۶	۵۷	۲۵	۱۵	.	.
غلظت ppm	۱۰۰	۸۹	۷۶	۵۷	۲۵	۱۵	.	.
مالاشیت	۱۰۰	۸۹	۷۶	۵۷	۲۵	۱۵	.	.
درصد ترون تلف شده	۱۰۰	۸۹	۷۶	۵۷	۲۵	۱۵	.	.
کنترل منفی	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰



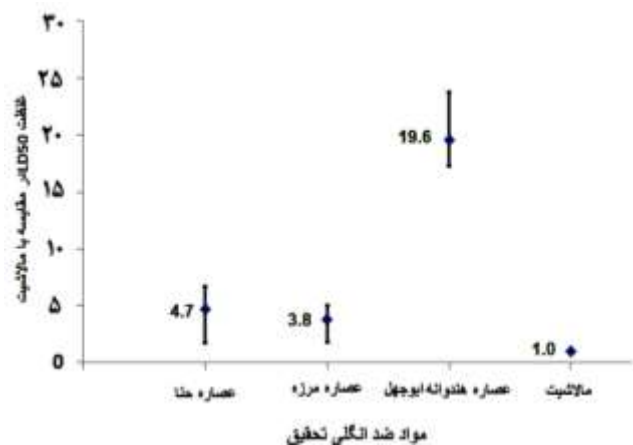
شکل ۲: مقایسه روند تاثیر مواد ضدانگلی مورد بررسی در تحقیق بر اساس غلظت های ایجاد کننده ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۹۰ درصد تلفات بر تومونت انگل ایکتیوفتریوس مولتی فیلیس



شکل ۱: مقایسه روند تاثیر مواد ضدانگلی مورد بررسی در تحقیق بر اساس غلظت های ایجاد کننده ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۹۰ درصد تلفات بر ترون انگل ایکتیوفتریوس مولتی فیلیس



شکل ۴: مقایسه میزان کارایی ضدانگلی عصاره‌های تحقیق بر ترونت انگل ایکتیوفتریوس در مقایسه با مالاشیت گرین. LD50 مالاشیت گرین ۱ در نظر گرفته شده و LD50 عصاره‌ها با آن مقایسه شده‌اند. (محدوده بالایی و محدوده پایینی نیز برای هر داده در نمودار مشخص شده است)



شکل ۳: مقایسه میزان کارایی ضدانگلی عصاره‌های تحقیق بر تومونت انگل ایکتیوفتریوس در مقایسه با مالاشیت گرین. LD50 مالاشیت گرین ۱ در نظر گرفته شده و LD50 عصاره‌ها با آن مقایسه شده‌اند. (محدوده بالایی و محدوده پایینی نیز برای هر داده در نمودار مشخص شده است)

نسبتاً بالایی به مواد شیمیایی داشته و عفونی‌زا نیست، برای عفونت‌زایی باید با گذشت زمان (وابسته به دمای آب ۶ تا ۱۲ ساعت) هسته کوچک انگل شروع به تکثیر کرده تشکیل توموسیست را بدهد، نوزاد عفونی‌زای ترونت از توموسیست خارج می‌شود. ترونت یا نوزاد عفونی‌زای انگل حساسیت بالایی به مواد شیمیایی و درمانی دارد (۲). لذا دو مرحله تومونت و ترونت که مقاومت متفاوتی در برابر مواد شیمیایی درمانی دارند، هدف بررسی در این تحقیق قرار گرفت. در مرحله بررسی اثر عصاره‌ها بر تومونت نتایج نشان داد که عصاره مرزه با LD<sub>50</sub> ۱۲ ساعته (میان غلظت ایجاد کننده ۵۰٪ تلفات بعد از ۱۲ ساعت مجاورت) ۲/۳۲ میلی‌گرم در لیتر، دارای بیش‌ترین اثر ضدانگلی بوده و عصاره حنا و هندوانه ابوجهل به ترتیب با LD<sub>50</sub> ۱۲ ساعته ۴/۶۸ و ۵/۲۱ میلی‌گرم در لیتر اثر کم‌تری روی تومونت انگل ایکتیوفتریوس داشتند. LD<sub>50</sub> مالاشیت گرین در برابر تومونت و ترونت به ترتیب ۰/۲۳۸ و ۰/۲۱۲ میلی‌گرم در لیتر محاسبه شد. مقایسه نتایج نشان می‌دهد که علی‌رغم اثرات ضدانگلی این عصاره‌ها در برابر ایکتیوفتریوس، این توانایی قابل رقابت با مالاشیت گرین نبوده و توانایی ضد ایکتیوفتریوس مالاشیت سبز در مقایسه با عصاره مرزه، حنا و هندوانه ابوجهل به ترتیب ۹/۷، ۱۹/۷ و ۲۲ برابر است. در بین عصاره‌های مورد بررسی اثرات ضدانگلی مرزه نسبت به دو عصاره حنا و هندوانه ابوجهل بیش‌تر (بیش از ۲ برابر) بود. گزارشات متعددی از اثرات ضدانگلی و ضدباکتریایی عصاره مرزه وجود دارد (۲۶). Mirzaei و همکاران، اثرات برون تنی عصاره مرزه را بر لیشمانیا *Leishmania major* گزارش کردند، آن‌ها LD<sub>50</sub> ۷۲ ساعته عصاره مرزه در برابر این انگل را ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش نمودند، علاوه بر

## بحث

به جرات می‌توان گفت که ایکتیوفتریوزیس یکی از مهم‌ترین بیماری‌های انگلی در آبزیان پرورشی در آبی‌پروری جهانی است. درمان شیمیایی این بیماری با موادی مثل مالاشیت گرین و فرمالین، علاوه بر مشکلات زیست‌محیطی، برای بهداشت عمومی و سلامت انسان مصرف‌کننده ماهی نیز بسیار خطرناک است. لذا یافتن جایگزین مناسب که این معایب را نداشته و اثر موثری نیز بر انگل داشته باشد، ضروری است (۲۵). علاوه بر مزایای فوق، مواد طبیعی درمانی بیماری‌های انگلی، قابلیت تجزیه‌پذیری بالایی در محیط زیست داشته و هیچ‌گونه تجمع بافتی خاصی در ماهی و محیط زندگی ماهی ایجاد نمی‌کنند. عصاره‌های گیاهی مواد بیولوژیک و دوست‌دار محیط زیست و زیست تخریب‌پذیر بوده و برای بهداشت عمومی هم اثر منفی ندارند (۱۰)، علاوه بر این مشکلات ایجاد مقاومت در برابر آن‌ها بسیار غیرمحمول است، لذا در این تحقیق اثر ضدانگلی سه عصاره حنا *Lawsonia inermis*، مرزه خوزستانی *Satureja khuzestanica* و هندوانه ابوجهل *Citrullus colocynthis* برای اولین بار در برابر انگل ایکتیوفتریوس مولتی‌فیلیس ارزیابی گردید. نتایج این تحقیق اثرات متوسط و ملایم ضدانگلی عصاره حنا و مرزه را نشان داد ولی عصاره هندوانه ابوجهل اثرات ضدانگلی چندانی در برابر ایکتیوفتریوزیس نداشت. در این تحقیق اثرات ضدانگلی عصاره‌ها بر دو مرحله زیستی انگل یعنی تومونت و ترونت ارزیابی گردید. تومونت مرحله‌ای از زندگی انگل است که مرحله رویشی انگل (که در زیر پوست انگل رشد کرده و تشکیل تروفونت را داده) از بدن ماهی جدا شده و داخل آب غوطه‌ور می‌شود. این مرحله مقاومت



کاهش دهد. Liu و همکاران، ثابت کردند که هرچند غلظت‌های پایین‌تر از LC50 باعث مرگ انگل نمی‌شوند، ولی عفونت‌زایی انگل کاملاً از بین می‌رود، مثلاً غلظت ۰/۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر کورکومین استخراج شده از گیاه زنجبیر باعث مرگ انگل نشده ولی امکان تکثیر و تزايد را از انگل می‌گیرد (۶). حتی ترون‌های خارج‌شده از تومونت‌های مجاور شده با عصاره گیاهی بیماری‌زایی برای انگل نداشته و امکان نفوذ به پوست میزبان را ندارند. هم‌چنین مجاورت ترون‌های انگل با *G. chinensis* در غلظت ۵ یا ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۱ ساعت، کاهش قابل ملاحظه‌ای را در عفونت‌زایی آن‌ها در گربه ماهی نشان داد (۲۶). گزارشات مشابهی از عدم عفونت‌زایی انگل یک مجاور شده با عصاره گیاهی قبل از مجاورت با ماهی کپور علف‌خوار گزارش شده است (۲). Fu و همکاران، اثر ضدانگلی عصاره ریشه گیاه *Morus alba* در برابر ایکتیوفتریوس مولتی فیلیس را در ماهی امور گزارش کردند (۲۳). آن‌ها علاوه بر گزارش ضدانگلی این عصاره بر تومونت انگل در شرایط برون تنی (in-vitro)، به اثر عصاره در شرایط درون تنی (in-vivo) نیز پرداختند. آن‌ها تاثیر پنج روش عصاره‌گیری از گیاه را، در اثر روی انگل مقایسه کردند که عصاره استنی بهترین اثر ضدانگلی را نشان داد. آن‌ها نتیجه گرفتند که حتی دوزهای تحت کشنده این عصاره در شرایط برون تنی، قادرند تکثیر و بیماری‌زایی انگل در شرایط درون تنی را کاملاً متوقف کنند. هر چند اثر عصاره حنا بر تومونت انگل ایکتیوفتریوس مناسب نبود، ولی گزارشات از اثرات ضدانگلی عصاره حنا وجود دارد. لوتولین *Luteolin* یکی از مهم‌ترین مواد موثره ضدانگلی عصاره حنا *Lawsonia inermis* می‌باشد (۱۳) که این ماده را موثرترین ماده موثره گیاه حنا در برابر لیشمانیا *Leishmania major* دانستند. هم‌چنین Anna و همکاران، اثرات ضدکوکسیدیایی عصاره حنا را در طیور در تجویز خوراکی مورد بررسی قرار دادند که کاهش معنی‌دار تلفات طیور و کاهش ضایعات روده‌ای را در طیور تغذیه شده با خوراک حاوی عصاره حنا گزارش کردند (۱۴). در مورد هندوانه ابوجهل که یک گیاه علفی چند ساله خزنده است و پالپ اسفنجی هندوانه مانند تولید می‌کند، اثرات مختلف از جمله اثرات ضدانگلی نسبت داده شده است (۱۶). البته گزارشات از بهبود رشد طیور به‌دنبال تجویز این عصاره نیز در منابع به‌چشم می‌خورد. (۲۵) اثرات برون تنی عصاره مرزه را بر لیشمانیا *Leishmania major* گزارش کردند، آن‌ها علاوه بر LD50 ۷۲ ساعته ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای این عصاره، ارتباط مستقیم افزایش غلظت با کاهش تعداد و حدت انگل را گزارش نمودند. در تحقیقی دیگر اثر مناسب عصاره الکلی و آبی هندوانه ابوجهل در مقابله با زیاردیازیس و ترماتود دیژن *Orthocoelium scolicoelium* نیز گزارش شده است (۱۷). هم‌چنین Babar و همکاران، هم اثرات

یافته فوق آن‌ها ارتباط مستقیم افزایش غلظت با کاهش تعداد و حدت انگل را گزارش نمودند (۲۷). گزارشات از اثر ضدانگلی ایکتیوفتریوس برای سایر گیاهان دارویی نیز وجود دارد، مثلاً در گزارشی از گیاه زردچوبه *Curcuma longa* از خانواده Zingiberaceae در آسیا اثرات ضدانگلی یک گزارش شده است. ماده موثره این گیاه به نام کورکومین Curcumin نام‌گذاری شد و دارای اثرات وسیعی است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به اثرات ضدانگلی اشاره کرد (۱۱). علاوه بر این اثرات کشنده بر روی انگل‌های لشمانیا، زیاردیا و پلاسمودیوم نیز برای این دارو گزارش شده است. اثرات ضد ترون‌های کورکومین قابل رقابت با مواد شیمیایی ضدانگلی مثل مالاویت‌گرین گزارش شده است (۲۶). در همین راستا عصاره سیر garlic extract با غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم در لیتر بعد از ۳ ساعت تمامی ترون‌ها را از بین می‌برد (۱۹). عصاره الکلی *Magnolia officinalis* و *Sophora alopecuroides* در غلظت ۱۰ برای کشتن تمامی ترون‌ها به ۴-۳ ساعت زمان نیاز دارند (۱۲). هم‌چنین عصاره الکلی *P. corylifolia* در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر دارای اثرات کشندگی ۱۰۰٪ بعد از ۴ ساعت مجاورت با این انگل است (۲۷). اثرات ضدانگلی این گیاهان را می‌توان به مواد موثره گیاهی مثل فنول‌ها، پلی‌فنول‌ها، آلکالوئیدها، کواینون‌ها، ترپنوئیدها، لکتین‌ها و پلی‌پپتیدها نسبت داد که گزینه جایگزین مناسبی در برابر مواد شیمیایی ضدانگلی می‌باشند (۲۹). هم‌چنین، اثر مثبت مشخص ضد انگلی برخی عصاره‌های گیاهی را به دلیل بهبود شاخص‌های ایمنی مخاطی و جلوگیری از جایگزین شدن و رشد اولیه ترون‌های انگل در پوست ماهی نسبت داده‌اند، چه این عصاره در آب و به شکل حمام به ماهی برسد یا ترکیب شده با خوراک در اختیار ماهی قرار گیرد (۲۸). تروفونت بالغ میزبان را به‌صورت تومونت ترک می‌کند که پس از آن، روی بستر قرار گرفته و تبدیل به کیست دارای دیواره می‌شود. کیست‌ها قادر به تولید صد تا هزاران ترون عفونی‌زا هستند. از بین بردن مرحله کیست انگل مژه‌دار باعث قطع چرخه زندگی آن و جلوگیری از آلودگی ماهی می‌شود. گزارشات قبلی نشان می‌دهد که کیست نسبت به داروها از ترون‌ها و تومونت مقاوم‌تر است (۲۶، ۲۸). از عصاره علف هفت‌بند ژاپنی *Polygonum cuspidatum* برای درمان ایکتیوفتریوزیس استفاده کردند. آن‌ها ماده موثره ایمودین گیاه را علت اثرات ضدانگلی گیاه دانستند و ادعا کردند ۱ میلی‌گرم در لیتر از این ماده موثره به مدت یک‌ساعت کلیه ترون‌های انگل را از بین می‌برد. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که تجویز دوزهای پایین‌تر عصاره‌ها به مدت طولانی‌تر، هرچند همه ترون‌های انگل را نمی‌کشد، ولی به‌میزان زیادی امکان شیوع عفونت را کم می‌کند و بیماری کنترل می‌شود (۲۹). نتایج این تحقیق نشان داد که درمان طولانی مدت با داروهای با دوز کم می‌تواند شدت بیماری *I. multifiliis* را

3. Zheng, W., Yan, C.M., Zhang, Y.B., Li, Z.H., Li, Z., Li, X.Y., Wang, Z.W., Wang, X., Chen, W.Q. and Yu, X.H., 2015. Antiparasitic efficacy of gracillin and zingibernsis newsaponin from *Costus speciosus* (Koen ex. Retz) Sm. against *Ichthyophthirius multifiliis*. Parasitology 142: 473-479.
4. Liu, Y.M., Zhang, Q.Z., Xu, D.H., Fu, Y.W., Lin, D.J. and Zhou, S.Y., 2017. Antiparasitic efficacy of commercial curcumin against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Aquaculture. 480: 65-70.
5. Rintamäki-Kinnunen, P., Rahkonen, M., Mannermaa Keränen, A.L., Suomalainen, L.R., Mykrä, H. and Valtonen, E.T., 2005. Treatment of ichthyophthiriasis after malachite green. I. Concrete tanks at salmonid farms. Diseases of aquatic organisms. 64(1): 69-76.
6. Liu, Y.M., Zhang, Q.Z., Xu, D.H., Fu, Y.W., Lin, D.J., Zhou, S.Y. and Li, J.P., 2017. Antiparasitic efficacy of curcumin from *Curcuma longa* against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp. Veterinary parasitology. 236: 128-136.
7. Straus, D.L. and Meinelt, T., 2009. Acute toxicity of peracetic acid formulations to *Ichthyophthirius multifiliis* theronts. Parasitology research. 104(5): 1237-1241.
8. Rowland, S.J., Mifsud, C., Nixon, M., Read, P. and Landos, M., 2008. Use of formalin and copper to control ichthyophthiriosis in the Australian freshwater fish silver perch (*Bidyanus bidyanus* Mitchell). Aquaculture research. 40(1): 44-54.
9. Valladão, G.M.R., Gallani, S.U. and Pilarski, F., 2015. Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics. 38(5): 417-428.
10. Song, K.G., Ling, F., Huang, A.G., Dong, W.J., Liu, G.L., Jiang, C., Zhang, Q.Z. and Wang, G.X., 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: 58-64.
11. Goel, A., Kunnumakkara, A.B. and Aggarwal, B.B., 2008. Curcumin as "curecumin": from kitchen to clinic. Biochem. Pharmacol. 75: 787-809.
12. Yi, Y.L., Lu, C., Hu, X.G., Ling, F. and Wang, G.X., 2012. Antiprotozoal activity of medicinal plants against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish (*Carassius auratus*). Parasitol. Res. 111: 1771-1778.
13. Anna, T., Harikrishnan, T.J., Meenakshisundaram, A., Arunachalam, K., Suriya, K. and Narendran, R.R., 2016. Anticoccidial effects of *Lawsonia inermis* against caecal coccidiosis in broilers. 2: 246.
14. Ameen, F., Al-Niaeem, K., Taher, M.M. and Sultan, F.A., 2018. Potential of plant extracts to inhibit the *Ichthyophonus* sp. infection in blue tilapia: A preliminary study in vitro. National Academy science letters. 41(2): 129-132.
15. Swarnakar, G. and Kumaw, A., 2014. In vitro anthelmintic effect of *Citrullus colocynthis* on tegument of amphistome *Orthocoelium scolicoelium* (Trematoda: Digenea). Int.J.Curr. Microbiol. App. Sci. 3(6): 571-582.
16. Gurudeeban, S., Rajamanickam, E., Ramanathan, T. and Satyavani, K., 2010. Antimicrobial activity of *Citrullus colocynthis* in gulf of Mannar. International Journal of Current Research. 2: 078081.
17. Alishahi, M., Halimi, M., Khansari, A. and Yavari, V., 2016. Extracts of *O liviera decumbens* and *S atureja khuzestanica* as immunostimulants affect some innate

گیاه هندوانه ابوجهل بر برخی انگل‌های تک یاخته‌ای انسانی را گزارش نمودند (۲۹). عصاره گیاه هندوانه ابوجهل دارای موثره رزین، آلکالوئید با اثرات لاکساتیو است که الاتیروزین (Elatyrisin) A و B و پکتین و گلیکوزیدی به نام کالوسینتیدین calocynthidin است. اثرات ضدانگلی این ماده نیز به این مواد نسبت داده می‌شود. در تجویز خوراکی و مخاطی این عصاره، اثرات ضدانگلی قابل انتظار است (۲۹). اثر عصاره‌های مورد مطالعه بر روی ترونت انگل ایکتیوفتریوس مولتی فیلیس، با اثر آن‌ها روی تومونت انگل متفاوت بود به طوری که LC50 محاسبه شده در مورد عصاره مرزه، حنا و هندوانه ابوجهل به ترتیب ۰/۵۶۷، ۰/۴۵۴ و ۲/۳۷ میلی‌گرم در لیتر بود، در صورتی که این میزان در مورد مالاشیت‌گرین برابر ۰/۱۲۱ گزارش شد. یعنی تاثیر مالاشیت‌گرین در برابر این انگل نسبت به عصاره حنا، عصاره مرزه و هندوانه ابوجهل، به ترتیب ۴/۶۸، ۳/۷۵ و ۱۹/۶ برابر بود. یعنی می‌توان گفت اثر عصاره‌های حنا و مرزه اثر مناسب‌تری روی ترونت انگل نسبت به تومونت در مقایسه با مالاشیت‌گرین دارند. انگل ایکتیوفتریوس به‌عنوان مهم‌ترین بیماری انگلی در ماهیان پرورشی اهمیت ویژه‌ای داشته و روش‌های درمانی فعلی با مواد شیمیایی نیاز به اصلاح و تغییر دارند که در این تحقیق عصاره سه گیاه حنا، مرزه و هندوانه ابوجهل، علی‌رغم اینکه اثرات ضدانگلی نسبتاً خوبی به‌ویژه روی ترونت انگل داشتند، ولی این اثرات در مقایسه با اثرات مالاشیت‌گرین ناچیز بوده و امکان جایگزینی این عصاره‌ها با مالاشیت‌گرین وجود ندارد. هر چند می‌توان با توجه به اثرات ضدایکتیوفتریوسی این عصاره‌ها از آن‌ها به‌عنوان کمک درمان در کنار درمان‌های شیمیایی استفاده کرد.

## تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی قطب بهداشت و بیماری‌های ماهیان گرمابی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گرفت.

## منابع

1. Lin, D.J., Hua, Y.N., Zhang, Q.Z., Xu, D.H., Fu, Y.W., Liu, Y.M. and Zhou, S.Y., 2016. Evaluation of medicated feeds with antiparasitical and immune-enhanced Chinese herbal medicines against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Parasitology research. 115 (6): 2473-2483.
2. Liang, J.H., Fu, Y.W., Zhang, Q.Z., Xu, D.H., Wang, B. and Lin, D.J., 2015. Identification and effect of two flavonoids from root bark of *Morus alba* against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp. Journal of agricultural and food chemistry. 63(5): 1452-1459.



- immunity indices of *Cyprinus carpio* against *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture research*. 47(9):2909-2916.
18. **Buchmann, K., Jensen, P.B. and Kruse, K.D., 2003.** Effects of sodium percarbonate and garlic extract on *Ichthyophthirius multifiliis* theronts and tomocysts: in vitro experiments. *N. Am. J. Aquacult.* 65: 21-24.
  19. **Zhou, S.Y., Liu, Y.M., Zhang, Q.Z., Fu, Y.W. and Lin, D.J., 2018.** Evaluation of an antiparasitic compound extracted from *Polygonum cuspidatum* against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp. *Veterinary parasitology*. 253: 22-25.
  20. **Dickerson, H.W. and Findly, R.C., 2014.** Immunity to *Ichthyophthirius* infections in fish: a synopsis. *Developmental & Comparative Immunology*. 43(2): 290-299.
  21. **Shariat, S., 1992.** Extracting and extracting the effective substances of medicinal plants and their identification and evaluation methods. Mani Publications, first edition. 8-20
  22. **Rahuman, A.A., Gopalakrishnan, G., Venkatesan, P. and Geetha, K., 2008.** Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 102: 867-873.
  23. **Alishahi, M. and Buchmann, K., 2006.** Temperature-dependent protection against *Ichthyophthirius multifiliis* following immunisation of rainbow trout using live theronts. *Diseases of aquatic organisms*. 72(3): 269-273.
  24. **Zhang, Q.Z., Xu, D.H. and Klesius, P.H., 2013.** Evaluation of an antiparasitic compound extracted from *Galla chinensis* against fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Veterinary Parasitology*. 198(1-2): 45-53.
  25. **Ling, F., Lu, C., Tu, X., Yi, Y.L., Huang, A.G., Zhang, Q.Z. and Wang, G.X., 2013.** Antiprotozoal screening of traditional medicinal plants: evaluation of crude extract of *Psoralea corylifolia* against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish.
  26. **Picon-Camacho, S.M., Taylor, N.G.H., Bron, J.E., Guo, F.C. and 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.
  27. **Mirzaei, F., Bafghi, A.F. and Mohaghegh, M., 2016.** In vitro anti-leishmanial activity of *Satureja hortensis* and *Artemisia dracunculoides* extracts on *Leishmania major* promastigotes. *J Parasit Dis.* 40: 1571-1574. <https://doi.org/10.1007/s12639-015-0730-9>
  28. **Wasim, B., Iqbal, Z., Nisar Khan, M. and Muhammad, Gh., 2012.** An Inventory of the Plants Used for Parasitic Ailments of Animals. *Pakistan Veterinary Journal*. 32(2).
  29. **Al-Ardi, M.H., 2020.** The uses of gold nanoparticles and *Citrullus colocynthis* L. nanoparticles against of *Giardia lamblia* in vivo. *Clinical Epidemiology and Global Health*, 8: 1282-1286. <https://doi.org/10.1016/j.cegh.2020.04.028>.