

مقاله پژوهشی

## بررسی اثر ضدانگلی عصاره گیاهان سیر (*Allium sativum*) و آویشن (*Thymus vulgaris*) بر *Ichthyophthirius multifiliis* عامل بیماری لکه سفید در ماهی

سید رضا حسینی<sup>۱\*</sup>، مجتبی علیشاهی<sup>۲،۳</sup>

DOI: 10.22124/japb.2023.21565.1455

تاریخ پذیرش: فروردین ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۰

### چکیده

در این مطالعه اثر دو عصاره گیاهی سیر و آویشن بر مراحل ترونت و تومونت انگل تک‌یاخته‌ای *Ichthyophthirius multifiliis* ارزیابی شد. بدین منظور ابتدا اقدام به تهیه عصاره هیدروالکلی از این گیاهان شد. در گام بعد هر دو مرحله انگل در مجاورت غلظت‌های متفاوت از دو عصاره قرار گرفتند. میزان بقای انگل در هر غلظت، هر ۳ ساعت یک‌بار و برای ۱۲ ساعت ثبت شد و LD<sub>50</sub> هر عصاره در این دوره زمانی با استفاده از روش Probit محاسبه شد. از مالاشیت گرین به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. نتایج مطالعه نشان داد که LD<sub>50</sub> سیر و آویشن بر تومونت به ترتیب برابر ۱ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر بود. در صورتی که این میزان برای مالاشیت گرین ۰/۲۴ میلی‌گرم در لیتر بود. LD<sub>50</sub> عصاره‌های سیر و آویشن بر ترونت نیز به ترتیب برابر ۱/۶۶ و ۰/۵۷ میلی‌گرم در لیتر و در مالاشیت گرین برابر ۰/۱۲۱ میلی‌گرم در لیتر بود. با توجه به نتایج اثر ضدانگلی عصاره سیر و آویشن در مقایسه با اثرات مالاشیت گرین ناچیز بود و امکان جایگزینی مالاشیت گرین با این عصاره‌ها وجود ندارد. هرچند می‌توان از این عصاره‌ها به عنوان درمان کمکی در کنار درمان‌های شیمیایی استفاده کرد.

**واژگان کلیدی:** *Ichthyophthirius multifiliis*، اثرات ضدانگلی، عصاره سیر، عصاره آویشن.

- ۱- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
  - ۲- استاد گروه بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
  - ۳- استاد قطب بهداشت و بیماری‌های ماهیان گرمابی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
- \* نویسنده مسئول: [dr.s.reza@gmail.com](mailto:dr.s.reza@gmail.com)

## مقدمه

مکرر با استفاده از مواد شیمیایی صورت می‌گیرد (Buchmann et al., 2004).

در گذشته مواد شیمیایی مثل مالاشیت گرین به عنوان یک ترکیب موثر برای کنترل یک مورد استفاده قرار می‌گرفت، اما در بسیاری از کشورها، مصرف آن به دلیل خواص سرطان‌زایی بالقوه و ترانژنیک، ممنوع شده است (Liu et al., 2017). از طرفی درمان با استفاده از مواد شیمیایی مانند فرمالین ممکن است به اپیدرم ماهی آسیب برساند و ماهی را در معرض عوامل بیماری‌زای دیگر قرار دهد (Buchmann et al., 2004). استفاده از مواد شیمیایی کم خطرتر مثل فرمالین (Rowland et al., 2008)، کلرامین-تی (Rintamaki et al., 2005)، سولفات مس (Kinnunen et al., 2005)، پرمنگنات پتاسیم (Straus, 2008)، پرمنگنات پتاسیم (Straus and Griffin, 2002) و پراستیک اسید (Meinelt et al., 2009) برخی باعث پیدایش سویه‌های مقاوم شده‌اند و حتی سلامت انسان را تهدید کرده‌اند (Rico and Van Den Brink, 2014). بنابراین یک درمان جایگزین برای این بیماری ضروری است.

گیاهان دارویی علاوه بر این که معمولا ترکیبی از مواد موثره را دارند، امکان ایجاد

انگل *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet (ایک) یک تک‌یاخته‌ای مژکدار و عامل ایجاد بیماری لکه سفید (White Spot Diseases: WSD) است که به عنوان ایکتیوفتیروزیس در ماهیان آب شیرین در سراسر جهان شناخته می‌شود (Buchmann et al., 2001; Matthews, 2005; Dickerson, 2006; Jorgensen, 2016). سیکل زندگی این انگل شامل چهار مرحله‌ی تروفونت، تومونت، توموسیست و ترونوت است. هنگامی که تروفونت بالغ پوست ماهی را ترک می‌کند و به تومونت تبدیل می‌شود به صورت بدون کیست است. تومونت‌های غیرکیستیک در بستر به کیست تبدیل می‌شوند (توموسیست) که به سرعت تقسیم شده و به هزاران ترونوت (تومایت) تبدیل می‌شوند. ترونوت‌های شناور در آب به اپیتلیوم ماهی نفوذ می‌کنند و دوباره به تروفونت‌های انگلی تبدیل می‌شوند (Dickerson, 2014). در بین مراحل بالا فقط ترونوت به داروهای معمول حساس است و معمولا این مرحله هدف داروهای ضد ایک است. هیچ واکسنی برای پیشگیری از عفونت *I. multifiliis* در دسترس نیست و در حال حاضر، کنترل بر اساس مدیریت و درمان‌های

مقاومت انگل نسبت به آنها وجود ندارد. از طرفی این موارد زیست تخریب پذیر هستند و مشکل زیست محیطی ایجاد نمی کنند (Valladao et al., 2015). همچنین کشور ما به دلیل شرایط جغرافیایی و وسعت و تنوع گیاهی بالا، مزیت نسبی بالایی دارد و دسترسی به گیاهان دارویی آسان و ارزان است. استفاده از داروهای گیاهی می تواند جایگزین عمل پرزحمت استفاده از داروهای سمی در تغذیه عملکردی ماهی ها شود. زیرا نشان داده شده است که افزودنی های مختلف خوراکی، حساسیت قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) را به عفونت *I. multifiliis* کاهش می دهند (Xueqin et al., 2012). اخیراً برخی عصاره های گیاهان دارویی برای مبارزه با یک ارزیابی شده اند و برخی از آنها اثربخشی قابل توجهی در پیشگیری، کنترل یا درمان بیماری اکتیوفتریوزیس داشته اند (Liang et al., 2015). به عنوان مثال اثرات ضدانگل ایک در ایمودین که ماده موثره گیاه *Polygonum cuspidatum* است به اثبات رسیده است. همچنین اثر عصاره خام سیر با غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر بر مرحله ترونت ایک نیز گزارش شده است (Buchmann et al., 2003).

معمولاً تومونت و توموسیست به دلیل دیواره ضخیم به مواد ضدانگلی مقاوم تر هستند (Yi et al., 2012; Zhang et al., 2013). از این رو، باید یا از مواد ضدانگلی قوی تر یا غلظت های بالاتر مواد ضدانگل استفاده کرد تا از تکثیر انگل جلوگیری شود. در مطالعه ای دیگر اثرات ضدانگلی گونه ای از گیاه علف هفت بند (*Polygonum multiflorum*) بر ترونت انگل *Ichthyophthirius* گزارش شد (Anna et al., 2016). علاوه بر آن، چنین گزارشی از عصاره گیاه *Cassia obtusifolia* در کنترل بیماری اکتیوفتریوزیس وجود دارد. نشان داده شده است که افزودن پونه کوهی (*Origanum vulgare*) به خوراک باعث ایجاد مقاومت در برابر *Lactococcus garvieae* (Diler et al., 2017) و عفونت توسط انگل های *Trichodina* و *Ichthyobodo salmonis* (*truttae*) (Mizuno et al., 2018) می شود. گزارش شده است که سیر (*Allium sativum*) به عنوان یک افزودنی خوراکی باعث افزایش رشد، ایمنی، اشتها و پاسخ به عوامل بیماری زای باکتریایی از جمله *Aeromonas hydrophila* (Mahfouz et al., 2009; Nya and Inoue, 2009)، آلودگی های مونوژن (Shakya and Labh, et al., 2016) و قارچی

(2014) می‌شود. ماده موثره ایمودین در گیاه سیر، علت اثرات ضدانگلی این گیاه معرفی شد و ادعا شد ۱ میلی‌گرم در لیتر از ایمودین در مدت یک ساعت، کلیه ترون‌های ایک را از بین می‌برد (Shakya and Labh, 2014).

بررسی‌های مختلف نشان داده‌اند که هر چند تجویز غلظت‌های پایین‌تر عصاره‌ها به مدت طولانی‌تر خاصیت کشندگی را برای تمام ترون‌های ایک ندارد، ولی به میزان زیادی شیوع عفونت را کاهش می‌دهد و موجب کنترل بیماری می‌شود (Picon-Camacho et al., 2012a,b). نتایج مطالعات Liu و همکاران (۲۰۱۷) نشان داد که درمان طولانی مدت با غلظت کم داروهای گیاهی قادر به کاهش شدت بیماری *I. multifiliis* است. ثابت شده است که هر چند غلظت‌های پایین‌تر از  $LC_{50}$ ، کمتر باعث مرگ انگل می‌شوند، ولی عفونت‌زایی انگل را کاملاً از بین می‌برند؛ به عنوان مثال کورکومین (Curcumin) استخراج شده از گیاه زردچوبه (*Curcuma longa*) با غلظت ۰/۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر باعث مرگ انگل نمی‌شود ولی قدرت تکثیر و تزايد انگل را از بین می‌برد. حتی ترون‌های خارج شده از تومونت‌های در معرض عصاره‌های گیاهی، فاقد قدرت بیماری‌زایی برای انگل و فاقد قدرت نفوذ به پوست میزبان هستند (Liu et al., 2017). همچنین در مطالعه‌ای که روی گربه‌ماهی (*Ictalurus punctatus*) صورت گرفت، مجاورت ترون انگل با *Galla chinensis* در غلظت ۵ یا ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۱ ساعت، باعث کاهش قابل ملاحظه‌ای در قدرت عفونت‌زایی انگل شد (Zhang et al., 2013). گزارش‌های مشابهی در ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) از عدم قدرت عفونت‌زایی ایک مجاورت داده شده با عصاره گیاهی، قبل از مجاورت با ماهی وجود دارد (Liang et al., 2015). Fu و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر ضدانگلی عصاره ریشه گیاه *Morus alba* در برابر ایک را بر ماهی کپور علفخوار گزارش کردند. در این گزارش به بررسی اثرات ضدانگلی این عصاره بر تومونت انگل را در شرایط برون‌تنی (In vitro) و درون‌تنی (In vivo) پرداخته شد. آنها تاثیر پنج روش عصاره‌گیری از گیاه را، در تاثیر عصاره روی انگل بررسی کردند که عصاره استنی بهترین اثر ضدانگلی را نشان داد. همچنین نتیجه گرفتند که مقادیر تحت کشنده این ماده در شرایط برون‌تنی نیز قادر به جلوگیری از تکثیر و بیماری‌زایی انگل در شرایط درون‌تنی هستند (Fu et al., 2014). یکی از مهم‌ترین مواد موثره ضدانگلی عصاره حنا (*Lawsonia inermis*)

Babar و همکاران (۲۰۱۲) اثرات گیاه هندوانه ابوجهل را بر برخی انگل‌های تک یاخته‌ای انسانی گزارش کردند. عصاره گیاه هندوانه ابوجهل دارای مواد موثره رزین، آلکالوئید با اثرات لاکساتیو است که الاتیریزین (Elatyrisin) و A و B، پکتین و گلیکوزیدی به نام کالوسینتیدین (Calocynthidin) است. اثرات ضدانگلی عصاره این گیاه نیز به همین مواد نسبت داده می‌شود. در تجویز خوراکی و مخاطی این عصاره، اثرات ضدانگلی قابل انتظار است (Al-Ardi, 2020). هدف این پژوهش نیز بررسی اثرات ضدانگلی دو عصاره گیاهی سیر (*Allium sativum*) و آویشن (*Thymus vulgaris*) بر دو مرحله ترونوت و توموسیست انگل *Ichthyophthirius multifiliis* و مقایسه آن با مالاشیت گرین است.

#### مواد و روش‌ها

گیاهان دارویی مورد استفاده و عصاره‌گیری برای تهیه عصاره‌های هیدروالکلی آویشن (*Thymus vulgaris*) و سیر (*Allium sativum*) از شیوه Macerations استفاده شد. به این ترتیب که ۱۰۰ گرم از گیاه مورد نظر بعد از خشک شدن کامل در سایه، با آسیاب برقی آسیاب شد، با نسبت ۵ حجم الکل اتیلیک ۸۰

لوتئولین (Luteolin) است که بیشترین اثر را در بین مواد موثره گیاه حنا بر روی لیشمانیا (*Leishmania major*) دارد (Iqbal et al., 2017). همچنین در مطالعه‌ای دیگر، اثرات ضدکوکسیدیایی عصاره گیاه حنا در تجویز خوراکی طیور مورد بررسی قرار گرفت و نتیجه آن کاهش معنی‌دار تلفات طیور و کاهش ضایعات روده‌ای در پرندگان تغذیه شده با خوراک غنی شده با عصاره حنا بود (Anna et al., 2016).

طبق گزارش‌های پیشین، عصاره هندوانه ابوجهل (*Citrullus colocynthis*) در بهبود رشد طیور به دنبال تجویز این ماده در جیره آنها نیز موثر است. Mirzaei و همکاران (۲۰۱۶) اثرات برون‌تنی عصاره مرزه (*Satureja hortensis*) را بر انگل *Leishmania major* گزارش کردند. آنها علاوه بر تعیین مقدار LD<sub>50</sub> ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای ۷۲ ساعته این عصاره، ارتباط مستقیم افزایش غلظت با کاهش تعداد و حدت انگل را گزارش کردند. در مطالعه دیگری اثر مناسب عصاره الکی و آبی هندوانه ابوجهل در مقابله با ژیاوردیازیس و ترماتود دیژن *Orthocoelium scolicoelium* نیز گزارش شده است (Gurudeeban et al., 2010). همچنین

در دمای ۱۲ تا ۱۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

#### آماده‌سازی تومونت و ترونات انگل

بر اساس روش توصیه شده توسط Alishahi و Buchmann (۲۰۰۶) برای به دست آوردن استوک تومونت و ترونات انگل، در ابتدا به یک آکواریوم تعداد ۱۰ قطعه ماهی قزل‌آلای ۴۰ گرمی معرفی شد. به گروه ماهی‌ها دو ماهی شدیداً آلوده به انگل یک اضافه شد تا عفونت تجربی به روش مجاورت مستقیم با ماهی بیمار (Cohabitation) ایجاد شود. دمای آب آکواریوم بین ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. فواصل بین نمونه‌گیری‌ها هر دو روز یکبار بود نمونه به صورت تهیه لام مرطوب از پوست و آبشش چند ماهی انجام شد و وضعیت آلودگی بررسی شد. بعد از آلودگی کامل و شدید ماهی‌ها به انگل، به منظور تهیه استوک اولیه تومونت، دو ماهی با آلودگی بالا آسان‌کشی شد (با ضربه به محل اتصال سر به نخاع) و به یک بشر دارای آب آکواریوم فیلتر شده با کاغذ صافی و استریل شده با اتوکلاو اضافه شد. بعد از یک ساعت تومونت‌های جدا شده از پوست، آبشش و باله ماهی وارد آب شدند. تومونت‌های جدا شده با پیپت پاستور به بشری دیگر، حاوی آب استریل

درصد و ۱ وزن ماده خشک، مخلوط شد و به مدت ۷۲ ساعت بر روی دستگاه شیکر به آرامی مخلوط شد تا استخراج عصاره بهتر انجام گیرد. سپس مخلوط الکل و پودر گیاه، توسط صافی و قیف بوختر صاف شد تا عصاره اولیه به دست آید. عصاره اولیه وارد دستگاه تقطیر دوار (Himura، ایران) شده و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حلال به مدت ۳ ساعت و به آرامی تبخیر شد و عصاره تغلیظ شده به دست آمد. برای استاندارد کردن روش و تکرارپذیری آزمایش، وزن خشک عصاره تعیین شد. بدین صورت که سه پلیت شیشه ساعت شکل (Watch Glass) در ابتدا توسط ترازوی دیجیتالی حساس وزن شد، سپس ۲ میلی‌لیتر عصاره به هر شیشه ساعت اضافه و به مدت ۴۸ ساعت در ۵۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از خشک شدن کامل عصاره و توزین مجدد، درصد ماده خشک عصاره محاسبه شد.

#### نحوه تهیه ترونات و تومونت انگل ایک

نمونه آزمایشگاهی *Ichthyophthirius multifiliis* از یک مزرعه پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) دانمارکی جدا شد و در محیط کشت

زمان می‌برد، در مجاورت غلظت‌های متوالی عصاره‌ها قرار داده شدند و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. زنده بودن تومونت‌ها در تمام پلیت‌ها هر ۳ ساعت بررسی، شمارش و ثبت شد (Fu et al., 2014). بررسی نسبت تلفات و زنده‌مانی تومونت‌ها و تعیین میانه تلفات ( $LC_{50}$ ) با روش Probit با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ انجام شد (Zhou et al., 2018).

#### تعیین حساسیت مرحله ترونت انگل به عصاره‌ها و مالاشیت گرین

به این منظور از پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای مخصوص کشت سلولی استفاده شد. به هر خانه پلیت ۳۰۰ میکرولیتر آب استریل اضافه شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از هر یک از عصاره‌های سیر و آویشن (به طور جداگانه) به گوده ردیف اول اضافه شد تا غلظت به ۱۰ میلی‌گرم در لیتر برسد. و به روش معمول غلظت‌های متوالی بر مبنای دو از هر عصاره در گوده‌های بعدی تا ۶ رقت و در سه تکرار تهیه شد. به هر خانه پلیت بعد از رقیق‌سازی عصاره میزان ۳۰۰ میکرولیتر از استوک ترونت آماده شده در مرحله قبل (که تعداد ترونت آن مشخص شده بود) اضافه شد. بعد از مجاورت با عصاره، در سه مرحله در فواصل

منقل شدند. تومونت‌ها پس از شمارش برای بررسی اثر عصاره‌ها بر مرحله تومونت انگل مورد استفاده قرار گرفتند.

برای تولید استوک ترونت طبق روش Alishahi و Buchmann (۲۰۰۶)، در یک بشر ۱۰۰ میلی‌لیتر آب استریل ریخته و به آن تعداد ۳۰ عدد تومونت متوسط انگل اضافه شد و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۳-۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از آن زیر استریومیکروسکوپ (ZSM1001، صایران، ایران) وضعیت تبدیل تومونت به توموسیست و ترونت ارزیابی شد. بعد از تبدیل حدود ۸۰ درصد تومونت‌ها به ترونت، آب حاوی ترونت‌ها به بشر دیگری منتقل شد. سپس با استفاده از لام نشو بار غلظت ترونت‌ها در میکرولیتر مشخص شد. این استوک برای تعیین اثر عصاره‌ها بر مرحله ترونت استفاده شد.

#### تعیین حساسیت مرحله توموسیست انگل به عصاره‌ها و مالاشیت گرین

برای بررسی اثر عصاره‌ها بر تومونت انگل *I. multifiliis* یک میلی‌لیتر آب حاوی ۴۰ عدد تومونت به پلیت مخصوص کشت سلول ۱۲ حفره، اضافه شد. تومونت‌ها قبل از تبدیل شدن به توموسیست و ترونت که حدود ۱۸ ساعت

۴ ساعته تعداد ترونت‌های زنده و مرده (غیرمتحرک Immobilized) شمارش شد (Zhou et al., 2018). بررسی تلفات ترونت‌ها و تعیین میانه تلفات (LC<sub>50</sub>) با روش Probit با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ انجام شد (Zhou et al., 2018).

در همه آزمایش‌ها از مالاشیت گرین به عنوان شاهد مثبت با غلظت‌های توصیه شده درمانی استفاده شد و تیمار فاقد عصاره یا مالاشیت گرین که در آن ترونت یا تومونت بدون هیچگونه افزودنی در آب نگهداری می‌شد، به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد.

### نتایج

نتایج مربوط به درصد تلفات ترونت در مجاورت با غلظت‌های افزایشی عصاره‌های مورد بررسی در این پژوهش در جدول ۱ آورده شده است. همان طور که در این جدول مشخص است، با افزایش غلظت عصاره‌ها اثرات کشنده آنها بر ترونت افزایش یافت و تقریباً تمام غلظت‌های بالای ۰/۱۶ میلی‌گرم در لیتر عصاره‌ها برای ترونت یک اثر کشنده داشتند. همچنین عصاره‌های سیر و آویشن اثرات قابل رقابتی با مالاشیت گرین نشان ندادند.

جدول ۱: درصد تلفات ترونت‌های انگل *Ichthyophthirius multifiliis* در غلظت‌های متوالی عصاره‌ها و مالاشیت گرین بعد از مجاورت

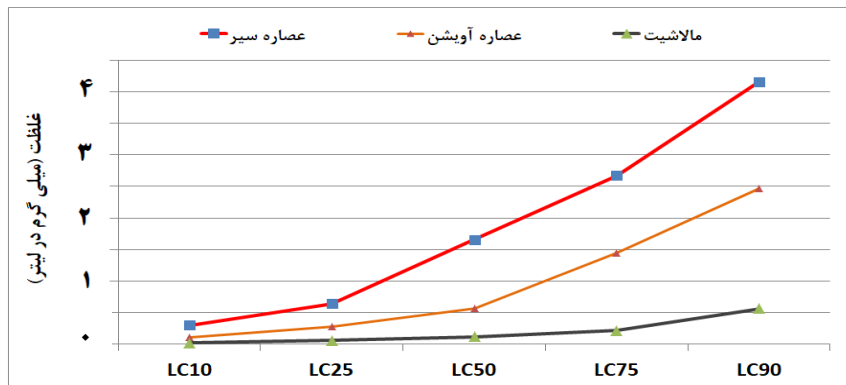
عصاره‌ها							
۰/۱۶	۰/۳۲	۰/۶۴۵	۱/۲۵	۲/۵	۵	۱۰	غلظت (ppm)
۰	۰	۱۱	۴۱	۷۲	۱۰۰	۱۰۰	درصد تلفات در مقابل عصاره سیر
۰	۶۵	۸۲	۹۱	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	درصد تلفات در مقابل عصاره آویشن
مالاشیت گرین							
۰/۰۱۶	۰/۰۳۳	۰/۰۶۳	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	غلظت (ppm)
۰	۱۳	۲۱	۴۴	۶۸	۸۲	۱۰۰	درصد تلفات در مقابل مالاشیت گرین
شاهد منفی							
۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	درصد تلفات در شاهد منفی



نتایج مربوط به درصد تلفات تومونت در مجاورت با غلظت‌های افزایشی عصاره‌های بررسی شده در این پژوهش در جدول ۲ آورده شده است. با توجه به این جدول هر چند غلظت‌های بالای عصاره، در حد ۵ میلی‌گرم در لیتر باعث از بین رفتن ۱۰۰ درصد تومونت انگل شد ولی با کاهش غلظت عصاره این اثر کاهش یافت و بیشتر عصاره‌ها در غلظت کمتر از ۰/۳۲ میلی‌گرم در لیتر فاقد اثر کشنده روی تومونت بودند. در بین دو عصاره مورد بررسی، عصاره آویشن اثرات ضدانگلی مناسب‌تری داشت و کمترین غلظت ایجاد کننده ۵۰ درصد تلفات در ۱۲ ساعت ( $LC_{50}$  ۱۲ ساعته) برای نوزاد عفونت‌زای انگل یا ترونت برابر ۰/۵۶۵ میلی‌گرم در لیتر و برای تومونت انگل برابر ۱/۵۶ میلی‌گرم در لیتر بود (شکل ۱). البته میزان اثرات ضدانگلی سیر و آویشن در مقایسه با مالاشیت گرین در برابر ترونت به ترتیب ۱۶/۲ و ۴/۶۷ برابر کمتر بود. به همین ترتیب اثرات ضدانگلی این دو عصاره در برابر تومونت انگل در مقایسه با مالاشیت گرین به ترتیب ۱۰/۶ و ۴/۴ برابر کمتر بود (شکل ۲).

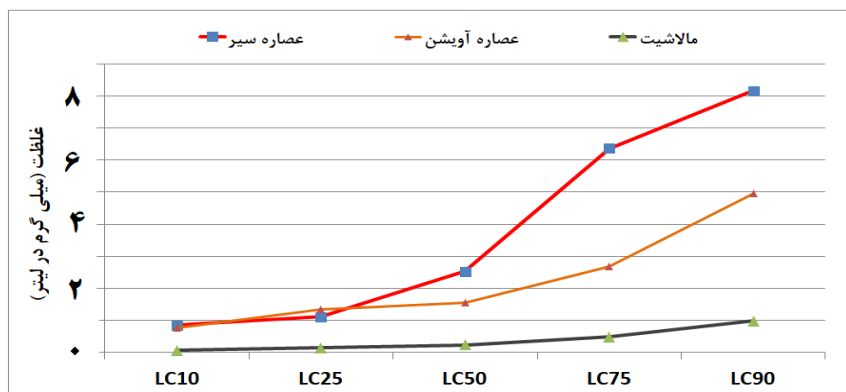
جدول ۲: درصد تلفات تومونت‌های انگل *Ichthyophthirius multifiliis* در غلظت‌های متوالی عصاره‌ها و مالاشیت گرین بعد از ۱۲ ساعت مجاورت

عصاره‌ها							
۰/۱۶	۰/۳۲	۰/۶۲۵	۱/۲۵	۲/۵	۵	۱۰	غلظت (ppm)
۰	۰	۱۵	۳۵	۴۵	۶۵	۹۵	درصد تلفات در مقابل عصاره سیر
۰	۰	۵	۲۵	۵۰	۶۰	۸۵	درصد تلفات در مقابل عصاره آویشن
مالاشیت گرین							
۰/۰۱۶	۰/۰۳۳	۰/۰۶۳	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	غلظت (ppm)
۰	۰	۰	۱۱	۲۱	۵۶	۶۸	درصد تلفات در مقابل مالاشیت گرین
شاهد منفی							
۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	درصد تلفات در شاهد منفی



	LC <sub>10</sub>	LC <sub>25</sub>	LC <sub>50</sub>	LC <sub>75</sub>	LC <sub>90</sub>	
سیر	۰/۳	۰/۶۴	۱/۶۶	۲/۶۷	۴/۱۶	
آویشن	۰/۱۱	۰/۲۸	۰/۵۶۵	۱/۴۴	۲/۴۷	
مالاشیت گرین	۰/۰۲۴	۰/۰۶۲	۰/۱۲۱	۰/۲۲	۰/۵۶۵	

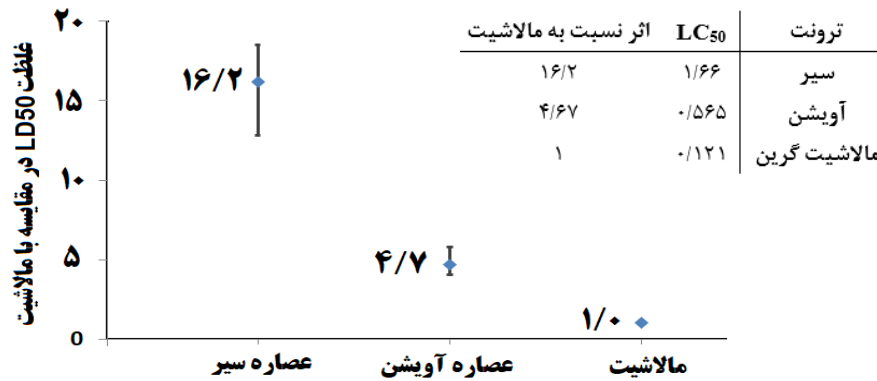
شکل ۱: مقایسه روند تاثیر مواد ضدانگلی مورد بررسی بر اساس غلظت‌های ایجاد کننده ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۹۰ درصد تلفات بر ترونت انگل *Ichthyophthirius multifiliis*



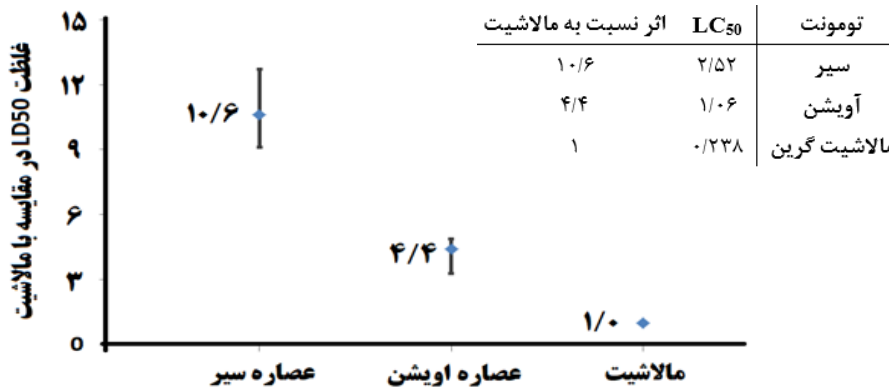
	LC <sub>10</sub>	LC <sub>25</sub>	LC <sub>50</sub>	LC <sub>75</sub>	LC <sub>90</sub>	
سیر	۰/۸۶	۱/۱۲	۲/۵۲	۶/۳۷۳	۸/۱۶	
آویشن	۰/۷۶۶	۰/۹۷	۱/۰۶	۲/۶۸	۴/۹۷	
مالاشیت گرین	۰/۰۶۷	۰/۱۴۱	۰/۲۳۸	۰/۴۹۳	۰/۹۸۵	

شکل ۲: مقایسه روند تاثیر مواد ضدانگلی مورد بررسی بر اساس غلظت‌های ایجاد کننده ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۹۰ درصد تلفات بر تومونت انگل *Ichthyophthirius multifiliis*

در بین دو عصاره مورد بررسی، عصاره آویشن اثرات ضدانگلی مناسبی داشت و  $LC_{50}$  ۹۶ ساعته آن برای ترونت انگل برابر ۴/۶۷ میلی گرم در لیتر و برای تومونت انگل ۴/۴ میلی گرم در لیتر بود که اثر آن روی ترونت در مقایسه با عصاره سیر بیش از ۴/۴۷ برابر و اثر آن روی تومونت نیز ۲/۴۱ برابر بیشتر بود (شکل‌های ۳ و ۴).



شکل ۳: مقایسه میزان کارایی ضدانگلی عصاره‌ها بر ترونت انگل *Ichthyophthirius multifiliis* در مقایسه با مالاشیت گرین.  $LD_{50}$  مالاشیت گرین ۱ در نظر گرفته شده است و  $LD_{50}$  عصاره‌ها با آن مقایسه شده‌اند. (محدوده بالایی و محدوده پایینی نیز برای هر داده در نمودار مشخص شده است).



شکل ۴: مقایسه میزان کارایی ضدانگلی عصاره‌ها بر تومونت انگل *Ichthyophthirius multifiliis* در مقایسه با مالاشیت گرین.  $LD_{50}$  مالاشیت گرین ۱ در نظر گرفته شده است و  $LD_{50}$  عصاره‌ها با آن مقایسه شده‌اند. (محدوده بالایی و محدوده پایینی نیز برای هر داده در نمودار مشخص شده است).

## بحث

گرفته نشان می‌دهد که کیست نسبت به داروها از ترونت و تومونت مقاوم‌تر است (Ling et al., 2013; Zhang et al., 2013).

نتایج بررسی اثر عصاره‌ها بر تومونت انگل نشان داد که عصاره آویشن با LD<sub>50</sub> ۱۲ ساعته (میان‌ه غلظت ایجاد کننده ۵۰ درصد تلفات بعد از ۱۲ ساعت مجاورت) ۱/۵۶ میلی‌گرم در لیتر، دارای اثر ضدانگلی بیشتری بود و عصاره سیر با LD<sub>50</sub> ۱۲ ساعته ۲/۵۲ میلی‌گرم در لیتر اثر کمتری روی تومونت انگل *I. multifiliis* داشت. 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 با وجود اثرات ضدانگلی این عصاره‌ها در برابر *I. multifiliis*، این توانایی کمتر از مالاشیت گرین بوده و توانایی ضد ایکتیوفتریوزیس مالاشیت گرین در مقایسه با عصاره سیر و آویشن به ترتیب ۱۰/۶ و ۴/۴ برابر است.

در بین عصاره‌های مورد بررسی اثرات ضدانگلی آویشن نسبت به عصاره سیر بیشتر (بیش از ۲ برابر) بود. گزارش‌های متعددی از اثرات ضدانگلی و ضدباکتریایی عصاره آویشن وجود دارد (Mathiessen et al., 2021).

Mathiessen و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که آزمایش بی‌حرکتی آزمایشگاهی سیر و

کنترل بیماری‌های عفونی در آبی‌پروری باید به طور مطلوب به اصول پیشگیری متکی باشد، اما در بسیاری از موارد درمان ماهی آلوده ضروری است. دسترسی به داروهای شیمیایی موثر محدود است و استفاده از آنها سمیت و نگرانی‌های زیست‌محیطی را افزایش می‌دهد. عوامل کنترل پایدار از جمله عصاره‌های گیاهی از گیاهان طبیعی می‌توانند از این نظر مفید باشند. مجموعه‌ای از مطالعات نشان داده‌اند که این محصولات گیاهی بر عفونت باکتریایی و انگلی تاثیر دارند (Mahfouz et al., 2009; Nya and Austin, 2009; Zheng et al., 2009; Amar et al., 2012; Kim et al., 2012; Yilmaz et al., 2013; Breyer et al., 2015 Inoue et al., 2016; Diler et al., 2017; Jorgensen 2017; Mizuno et al., 2018; Skov et al., 2018).

در انگل *Ichthyophthirius multifiliis*

تروفونت بالغ میزبان را به صورت تومونت ترک می‌کند که پس از آن، در روی بستر مستقر شده و تبدیل به کیست دیواره‌دار می‌شود. کیست‌ها قادر به تولید صدها تا هزاران ترونت عفونت‌زا هستند. از بین بردن مرحله کیستی این انگل مژه‌دار، باعث قطع چرخه زندگی آن و جلوگیری از آلودگی ماهی می‌شود. بررسی‌های صورت

در مطالعه حاضر اثرات ضدانگلی عصاره‌ها بر دو مرحله زیستی انگل یعنی تومونت و ترون‌ت ارزیابی شد. تومونت مرحله‌ای از زندگی انگل است که طی آن مرحله رویشی انگل (در زیر پوست انگل رشد می‌کند و تروفونت تشکیل را می‌دهد) از بدن ماهی جدا شده و داخل آب غوطه‌ور می‌شود. این مرحله مقاومت نسبتاً بالایی به مواد شیمیایی دارد و عفونت‌زا نیست. برای عفونت‌زایی باید با گذشت زمان (وابسته به دمای آب ۶ تا ۱۲ ساعت) هسته کوچک انگل شروع به تکثیر کند، توموسیست را تشکیل بدهد و نوزاد عفونت‌زا یا ترون‌ت از توموسیست خارج شود. ترون‌ت یا نوزاد عفونت‌زای انگل حساسیت بالایی به مواد شیمیایی و درمانی دارد (Liang et al., 2015). از این رو، دو مرحله تومونت و ترون‌ت که مقاومت متفاوتی در برابر مواد شیمیایی درمانی دارند، هدف بررسی در این مطالعه قرار گرفت. در بررسی‌های صورت گرفته توسط Buchmann و همکاران (۲۰۰۳)، عصاره سیر با غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم در لیتر بعد از ۳ ساعت تمامی ترون‌ت‌ها را از بین برد. در مورد گیاهان دیگر نیز گزارش‌هایی درباره اثر ضدانگل *Ichthyophthirius* وجود دارد، مثلاً در مطالعه‌ای روی گیاه زردچوبه (*Curcuma longa*) از خانواده Zingiberaceae در آسیا،

آویشن، اثر آنها را بر بی‌حرکتی این انگل در محیط برون‌تنی نشان داد ترکیبات فعال موجود در مواد افزودنی گیاهی به طور واضح مشخص نشده‌اند، اما به احتمال زیاد در یک مطالعه تا مطالعه دیگر متفاوت هستند. در مطالعه Mathiessen و همکاران (۲۰۲۱) سیر بیشترین اثر بی‌حرکتی را بر ترون‌ت داشت. آنها دریافتند که در شرایط آزمایشگاهی تحریک لکوسیت‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با عصاره‌های گیاهی منجر به تنظیم قابل توجهی در چندین ژن ایمنی بدن شد که ممکن است بر عفونت انگلی تاثیر بگذارد. این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره‌های سیر و آویشن، به طور بالقوه مانع رشد اولیه تروفونت‌های *I. multifiliis* در پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود. در آزمایش تحریک لکوسیت در شرایط برون‌تنی، یک اثر مثبت مشخص از بسیاری از مواد افزودنی خوراک مشاهده شد که نشان می‌دهد واکنش‌های ایمنی فعال شده در سطح بدن ماهی، ممکن است از رشد اولیه تروفونت‌ها پس از حمله جلوگیری کند (Mathiessen et al., 2021). ترکیبات سیر و آویشن ممکن است سیستم ایمنی میزبان را نیز تحریک کند (Nya and Austin, 2009; Gulec et al., 2013).

به اثرات ضدانگل یک این گیاه پی برده شد. کورکومین که ماده موثره این گیاه است، دارای اثرات بسیاری است که از مهم‌ترین آنها، اثرات ضدانگلی است (Goel et al., 2008). علاوه بر این اثر سمیت این ماده بر روی انگل‌های لشمانیا، ژیا ردیا و پلاسمودیوم نیز گزارش شده است. اثرات ضد تروننت این ماده، قابل رقابت با ضدانگل‌های شیمیایی مانند مالاشیت گرین گزارش شده است (Zhang et al., 2013). عصاره‌های الکلی *Magnolia officinalis* و *Sophora alopecuroides* با غلظت ۱۰ درصد، در مدت ۳-۴ ساعت قادر به از بین بردن تمامی تروننت‌ها بودند (Yi et al., 2012). همچنین عصاره الکلی *Psoralea corylifolia* در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر در یک دوره مجاورت ۴ ساعته دارای اثرات کشندگی ۱۰۰ درصدی بر این انگل بود (Ling et al., 2013). اثرات ضدانگلی این گیاهان را می‌توان مربوط به مواد موثره گیاهی مثل فنول‌ها، پلی‌فنول‌ها، آلکالوئیدها، کواینون‌ها، ترپنوئیدها، لکتین‌ها و پلی‌پتیدها دانست که جایگزین مناسبی برای مواد شیمیایی ضدانگلی هستند (Mathiessen et al., 2021). مشاهدات به دست آمده از تاثیر عصاره‌های سیر و آویشن را می‌توان مربوط به اثر ضدانگلی مستقیم و یا اثر تحریک کننده ایمنی مرتبط دانست. نتایج، حاکی از یک اثر حاد و کوتاه مدت است. در مطالعات قبلی نیز عصاره‌های آبی سیر و آویشن اثر انگل‌کشی مستقیم را نشان دادند (Mathiessen et al., 2021) که می‌تواند مشاهدات مطالعه حاضر را حداقل تا حدی توضیح دهد. همچنین دلیل اثر ضدانگلی مثبت و قابل توجه بعضی از عصاره‌های گیاهی را به بهبود شاخص‌های ایمنی مخاطی و جلوگیری از جایگزین شدن و رشد اولیه تروننت انگل در پوست نسبت داده‌اند و روش استفاده از عصاره یعنی به شکل حمام یا ترکیب شده با خوراک در نتیجه به دست آمده تاثیری ندارد (Mathiessen et al., 2021).

به جرات می‌توان گفت ایکتیوفتریوزیس یکی از مهم‌ترین بیماری‌های انگلی در آبریان پرورشی در جهان است. درمان شیمیایی این بیماری با موادی مثل مالاشیت گرین و فرمالین، علاوه بر مشکلات زیست‌محیطی، برای بهداشت عمومی و سلامت انسان مصرف کننده ماهی نیز بسیار خطرناک است. از این رو، یافتن جایگزین مناسب که این معایب را نداشته باشد و اثر موثری نیز بر انگل داشته باشد، ضروری است (Rahuman et al., 2008). عصاره‌های گیاهی مواد زیستی، دوست‌دار محیط زیست و زیست‌تخریب‌پذیر هستند و برای بهداشت

عمومی نیز اثر منفی ندارند (Song et al., 2015)، علاوه بر این، مشکلات ایجاد مقاومت در برابر آنها بسیار غیرمحمتمل است، از این رو، در این مطالعه اثر ضدانگلی دو عصاره گیاه سیر و آویشن برای اولین بار در برابر انگل *I. multifiliis* ارزیابی شد. نتایج این مطالعه اثرات نسبتاً ملایم ضدانگلی عصاره آویشن و سیر را بر این انگل نشان داد.

## منابع

- 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.
- Alishahi M. and K. Buchmann 2006.** Temperature-dependent protection against *Ichthyophthirius multifiliis* following immunisation of rainbow trout using live theronts. *Diseases of Aquatic Organisms*, 72: 269–273.
- Amar E.C., Kiron V., Akutsu T., Satoh S. and Watanabe T. 2012.** Resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) experimental infection following ingestion of natural and synthetic carotenoids. *Aquaculture*, 330-333:148–155.
- 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.
- Babar W., Iqbal Z., Nisar Khan M. and Muhammad G. 2012.** An inventory of the plants used for parasitic ailments of animals. *Pakistan Veterinary Journal*, 32(2): 183–187.
- Breyer K.E., Getchell R.G., Cornwell E.R., Wooster G.A., Ketola H.G. and Bowser P.R. 2015.** Efficacy of an extract from garlic, *Allium sativum*, against infection with the furunculosis bacterium, *Aeromonas salmonicida*, in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 46: 273–282.
- Buchmann K., Bresciani J. and Jappe C. 2004.** Effects of formalin treatment on epithelial structure and mucous cell densities in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), skin. *Journal of Fish Diseases*, 27: 99–104.
- 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. *North American Journal of Aquaculture*, 65: 21–24.
- Buchmann K., Sigh J., Nielsen C.V. and Dalgaard M. 2001.** Host responses against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. *Veterinary Parasitology*, 100: 105–116.
- Dickerson H.W. 2006.** *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora). P: 116–153. In: Woo



- P.T.K. (Ed.). Fish Diseases and Disorders, Vol. 1: Protozoan and Metazoan Infections. CAB International, U.K.
- Dickerson H.W. 2014.** *Ichthyophthirius multifiliis*. P: 55–72. In: Woo P.T.K. and Buchmann K. (Eds.). Fish Parasites: Pathobiology and Protection. CAB International, U.K.
- Diler O., Gormez O., Diler I. and Metin S. 2017.** Effect of oregano (*Origanum onites* L.) essential oil on growth, lysozyme and antioxidant activity and resistance against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Nutrition, 23: 844–851.
- Fu Y.W., Zhang Q.Z., Xu D.H., Liang J.H. and Wang B. 2014.** Antiparasitic effect of cynaratoside-C from *Cynanchum atratum* against *Ichthyophthirius multifiliis* on grass carp. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62: 7183–7189.
- Goel A., Kunnumakkara A.B. and Aggarwal B.B. 2008.** Curcumin as “curecumin”: From kitchen to clinic. Biochemical Pharmacology, 75: 787–809.
- Gulec A.K., Danabas D., Ural M., Seker E., Arslan A. and Serdar O. 2013.** Effect of mixed use of thyme and fennel oils on biochemical properties and electrolytes in rainbow trout as a response to *Yersinia ruckeri* infection. Acta Veterinaria Brno, 82: 297–302.
- 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: 78–81.
- Inoue L.A.K.A., Oliveira Maciel P., Gusmao Affonso E., De Lima Boijink C. and Tavares Dias M. 2016.** Growth, parasitic infectio and hematology in *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 fed diets containing *Allium sativum*. Journal of Applied Ichthyology, 32: 901–905.
- Iqbal K., Iqbal J., Staerk D. and Kongstad K.T. 2017.** Characterization of antileishmanial compounds from *Lawsonia inermis* L. leaves using semi-high resolution antileishmanial profiling combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR. Frontiers in Pharmacology, 8: 1–7 (337).
- Jorgensen L.V.G. 2016.** Infection and immunity against *Ichthyophthirius multifiliis* in zebrafish (*Danio rerio*). Fish and Shellfish Immunology, 57: 335–339.
- Jorgensen L.V.G. 2017.** The fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*- host immunology, vaccines and novel treatments. Fish

- and Shellfish Immunology, 67: 586–595.
- Kim S., Song J. and Kim K. 2012.** Effects of dietary astaxanthin on innate immunity and disease resistance against *Edwardsiella tarda* in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. The Israeli Journal of Aquaculture, 64: 1–6.
- 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: 1452–1459.
- 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. Parasitology Research, 112: 2331–2340.
- 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.
- Mahfouz N.B., Fathi M., Zead M.Y.A. and Mesalhy S. 2009.** Effect of garlic and yeast in the culture of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Abbassa International Journal for Aquaculture Special Issue for Global Fisheries and Aquaculture Research Conference, P: 453–465.
- Mathiessen H., Jaafar R.M., Al-Jubury A., Von Gersdorff Jorgensen L., Kania P.W. and Buchmann K. 2021.** Comparative in vitro and in vivo effects of feed additives on rainbow trout response to *Ichthyophthirius multifiliis*. North American Journal of Aquaculture, 83(2): 67–77.
- Matthews R.A. 2005.** *Ichthyophthirius multifiliis* fouquet and ichthyophthiriosis in freshwater teleosts. Advances in Parasitology, 59: 159–241.
- Meinelt T., Matzke S., Stuber A., Pietrock M., Wienke A., Mitchell A.J. and Straus D.L. 2009.** Toxicity of peracetic acid (PAA) to tomites of *Ichthyophthirius multifiliis*. Diseases of Aquatic Organisms, 86: 51–56.
- Mirzaei F., Bafghi A.F., Mohaghegh M.A. Zarei Jaliani H., Faridnia R. and Kalani H. 2016.** In vitro anti-leishmanial activity of *Satureja hortensis* and *Artemisia dracunculoides* extracts on *Leishmania major* promastigotes. Journal of Parasitic Diseases, 40(4): 1571–1574.
- Mizuno S., Urawa S., Miyamoto M., Hatakeyama M., Sasaki Y., Koide N., Tada S. and Ueda H. 2018.** Effects of dietary

- supplementation with oregano essential oil on prevention of the ectoparasitic protozoans *Ichthyobodo salmonis* and *Trichodina truttae* in juvenile chum salmon *Oncorhynchus keta*. Journal of Fish Biology, 93: 528–539.
- Nya E.J. and Austin B. 2009.** Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases, 32: 963–970.
- Picon-Camacho S.M., Marcos-Lopez M., Beljean A., De Beaume S. and Shinn A.P. 2012a.** In vitro assessment of the chemotherapeutic action of a specific hydrogen peroxide, peracetic, acetic, and peroctanoic acid-based formulation against the free-living stages of *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora). Parasitology Research, 110: 1029–1032.
- Picon-Camacho S.M., Taylor N.G.H., Bron J.E., Guo F.C. and Shinn A.P. 2012b.** Effects of long duration, low dose bronopol exposure on the control of *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora), parasitising rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Veterinary Parasitology, 186: 237–244.
- 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). Parasitology Research, 102: 867–873.
- Rico A. and Van Den Brink P.J. 2014.** Probabilistic risk assessment of veterinary medicines applied to four major aquaculture species produced in Asia. Science of the Total Environment, 468: 630–641.
- Rintamaki-Kinnunen P., Rahkonen M., Mannermaa-Keranen A.L., Suomalainen L.R., Mykra H. and Valtonen E.T. 2005.** Treatment of ichthyophthiriasis after malachite green. I. Concrete tanks at salmonid farms. Diseases of Aquatic Organisms, 64: 69–76.
- 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: 44–54.
- Shakya S.R. and Labh S.N. 2014.** Medicinal uses of garlic (*Allium sativum*) improves fish health and acts as an immunostimulant in aquaculture. European Journal of Biotechnology and Bioscience, 2: 44–47.
- Skov J., Chettri J.K., Jaafar R.M., Kania P.W., Dalsgaard I. and Buchmann K. 2018.** Effects of soluble immunostimulants on mucosal immune responses in

- rainbow trout immersion-vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *Aquaculture*, 492: 237–246.
- 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. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 5: 58–64.
- Straus D.L. 2008.** Comparison of copper sulfate concentrations to control ichthyophthiriasis in fingerling channel catfish. *Journal of Applied Aquaculture*, 20: 272–284.
- Straus D.L. and Griffin B.R. 2002.** Efficacy of potassium permanganate in treating ichthyophthiriasis in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 14: 145–148.
- Valladao 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: 417–428.
- Xueqin J., Kania P.W. and Buchmann K. 2012.** Comparative effects of four feed types on white spot disease susceptibility and skin immune parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 35: 127–135.
- 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*). *Parasitology Research*, 111: 1771–1778.
- Yilmaz S., Ergun S. and Soytaş N. 2013.** Herbal supplements are useful for preventing streptococcal disease during first-feeding of tilapia fry, *Oreochromis mossambicus*. *Israeli Journal of Aquaculture*, 65: 1–5.
- 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.
- Zheng Z.L., Tan J.Y.W., Liu H.Y., Zhou X.H., Xiang X. and Wang K.Y. 2009.** Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 292: 214–218.
- 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.



Research Paper

**Antiparasitic effect of garlic (*Allium sativum*) and thyme (*Thymus vulgaris*) on *Ichthyophthirius multifiliis*, the cause of white spot disease**

Seyed Reza Hosseini<sup>1\*</sup>, Mojtaba Alishahi<sup>2,3</sup>

DOI: 10.22124/japb.2023.21565.1455

Received: January 2022

Accepted: April 2023

**Abstract**

In this study, the effect of two plant extracts, garlic and thyme, on the theront and tomont stages of the parasitic protozoa *Ichthyophthirius multifiliis* was evaluated. For this purpose, first, hydroalcoholic extracts of these plants were prepared. In the next step, both stages of the parasite were exposed. The parasite survival rate at each concentration, every 3 hours and for 12 hours were recorded and LD<sub>50</sub> of each extract in this time period was calculated using Probite method. Malachite green was used as a positive control. The results showed that the LD<sub>50</sub> of garlic and thyme on tomont were 1 and 2.5 mg/L, respectively. While this amount was 0.24 mg/L for malachite green. LD<sub>50</sub> of garlic and thyme extracts on theront were 1.66 and 0.57 mg/L, respectively, and in the case of malachite green was 0.121 mg/L. According to the results, the antiparasitic effect of garlic and thyme extracts is insignificant compared to the effects of malachite green and it is not possible to replace malachite green with these extracts. Although these extracts can be used as adjunctive therapy along with chemical treatments.

**Key words:** *Ichthyophthirius multifiliis*, *Antiparasitic Effects*, *Garlic Extract*, *Thyme Extract*.

1- Associate Professor in Department of Veterinary Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2- Professor in Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

3- Professor in Centre of Excellence for Warm Water Fish Health and Disease, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

\*Corresponding Author: [dr.s.reza@gmail.com](mailto:dr.s.reza@gmail.com)