شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۵، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۱
صفحات ۴۱۷-۴۰۵

بررسی اثر عصاره الکلی گیاه *Chelidonium majus L.* بر ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* (*Ichthyophthirius multifiliis*) در شرایط برون تنی (*In vitro*)

زهرا علیجانپور[۱]، هومن رحمتی هولاسو[۴*]، حسینعلی ابراهیم زاده موسوی[۲]، سید سعید میرزرگر[۴]، عقیل شریف‌زاده[۳]، علیرضا نصیری[۱]

۱. دانشجوی دکترای گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲.استاد گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳.دانشیار گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۴.دانشیار گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ ارسال: ۱۴۰۱/۰۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۷

چکیده

ایکتیوفتریازیس که با نام‌های لکه سفید و یا ایک نیز شناخته می شود، توسط انگل تک‌یاخته‌ای مژه‌دار به نام *ایکتیوفتریوس مولتی فیلیئیس* ایجاد می‌شود که از شایع‌ترین و مهمترین بیماری انگلی است و تلفاتی جدی و در سطح وسیعی از ماهیان زینتی و صنعت پرورش ماهیان خوراکی ایجاد می‌کند. مالاشیت گرین، فرمالین، کلرامین-T و سایر ترکیبات شیمیایی را می‌توان علیه این بیماری استفاده کرد اما هر کدام از این ترکیبات به نحوی موجب آسیب به انسان و محیط زیست می‌شوند. لذا یافتن ترکیبات طبیعی جایگزین به منظور درمان این بیماری لازم به نظر می‌رسد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر ضدانگلی عصاره الکلی گیاه مامیران کبیر در غلظت‌های (۶/۴- ۰/۱گرم در لیتر) و زمان مواجهه ۱تا ۳ ساعت در شرایط برون تنی (In vitro) روی انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیئیس* است. داده‌های حاصل از لحاظ آماری با یافته‌های بدست آمده از نمونه کنترل مثبت (۱۵میلی گرم/لیتر فرمالین) و تیمار شاهد مقایسه شدند. نتایج بررسی نشان داد که، نرخ مرگ و میر ترونت‌های انگلی رابطه مستقیم و معنی‌داری با افزایش غلظت عصاره و زمان مواجهه دارد ($p<۰/۰۵$)، و مرگ و میر ترونت‌های انگل ایک با افزایش میزان غلظت عصاره الکلی از ۰/۱ تا ۶/۴ گرم بر لیتر به طور معنی‌داری افزایش یافت. دوز ۶/۴ گرم بر لیتر با قدرت کشندگی ۱۰۰ درصد در مدت زمان ۳ ساعت بهترین عملکرد را داشته و مناسب‌ترین دوز است و با فرمالین (گروه کنترل مثبت)، اختلاف معنی‌داری نداشته است($p>۰/۰۵$). ، هرچند امکان استفاده این دوز برای درمان ماهیان زنده نیاز به بررسی بالینی دارد.

واژگان کلیدی: *ایکتیوفتریوس مولتی فیلیئیس*، عصاره الکلی، مامیران کبیر، ضد انگلی، نرخ کشندگی .

* نویسنده مسئول: هومن رحمتی هولاسو
Email: rahmatih@ut.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 75, No. 3, Autumn 2022
pp. 405-417

In vitro study of effects of alcoholic extract of *Chelidonium majus* L. on *Ichthyophthirius multifiliis* theronts

Zahra Alijanpour[1], Hooman Rahmati-Holasoo[4*], Hosseinali Ebrahimzadeh Mousavi[2], Seyed Saeed Mirzargar[4], Aghil Sharifzadeh[3], Alireza Nasiri[1]

1. DVSc Student, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Professor, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
3. Associate Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
4. Associate Professor, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 05-Apr-2022 **Accepted: 28-Mar-2022**

Abstract

Ichthyophthiriasis, which is also known as white spot or Ich, is caused by a parasitic ciliate called Ichthyophthirius *multifiliis* and it is one of the most important and common parasitic diseases. It may cause high mortality in large scale in ornamental and edible fresh water fish. To control this disease Malachite green, formalin, chloramine-T and other chemical compounds can be used, but each of these compounds may cause serious harm to human population and the environment. Therefore, introducing natural alternative compounds to use against this disease seems necessary. The aim of this study was to evaluate the alcoholic extract of *Chelidonium majus L*. in concentrations (0/1-6/4 gr/l) and exposure time of 1 to 3 hours on *Ichthyophthirius multifilii*s in vitro. The obtained data were statistically compared with the results obtained from the positive control sample (15 ppm formalin) and the control treatment. The results implicated that the mortality rate of parasitic teronts has a direct and significant relationship with increasing the concentration of the extract and the time of exposure and the mortality of the parasites increased significantly ($p<0.05$) with increasing the concentration of alcoholic extract from 0/1 to 6/4 gr/l. dosage 6/4 with 100% lethality had the best performance and is the most appropriate dose. There is no significant difference ($p>0.05$) between obtained data in comparison with formalin (control positive group), although the possibility of using this dose to treat live fish requires clinical examination.

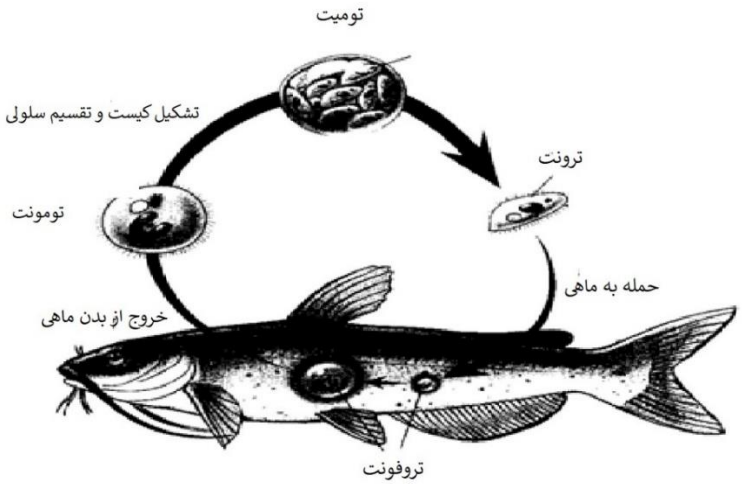
Keywords: *Ichthyophthirius multifiliis*, Alcoholic extract, *Chelidonium majus* L., Antiparasitic effects, Lethality rate.

Corresponding author: Hooman Rahmati-Holasoo Email: rahmatih@ut.ac.ir

۱. مقدمه

امروزه آبزی پروری در جهت تولید غذا در سراسر جهان رشد بسیار سریعی داشته است، اما بیماری‌های عفونی در آبزی پروری یک عامل بسیار مهم و تاثیرگذار در تولید غذا است (Khater *et al.*, 2017). شیوع بیماری‌های عفونی باعث ضرر اقتصادی قابل توجهی در سیستم‌های پرورشی ماهی‌های آب شیرین، لب شور و شور شده است (Murray and Peeler, 2005). ایکتیوفتیریازیس یا بیماری لکه سفید یکی از مهم‌ترین انگل‌های بیماری‌زا برای ماهی‌ها است که مشکل بزرگی در آبزی‌پروری ایجاد می‌کند (Dickerson and Dawe, 2006). عامل این بیماری یک تک یاخته هولوتریش مژه داری به نام *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* یا ایک است که یکی از رایج‌ترین و جدی‌ترین بیماری‌های انگلی ماهی آکواریومی آب شیرین محسوب می شود. این انگل در اکثر گونه‌های آب شیرین سراسر جهان منجر به مرگ و میر زیاد شده و خسارات اقتصادی زیادی در تولید ماهی آکواریومی و خوراکی ایجاد می‌کند (Elsayed *et al.*, 2006) در واقع به پوست و آبشش حمله می‌کند و عملکرد دستگاه تنفسی و دفعی این ارگان‌ها را بر هم می‌زند (Hines and spira, 1973).

انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* چرخه زندگی مستقیم و بدون میزبان واسط دارد و متشکل از دو مرحله زندگی آزاد و مرحله انگلی است. سیکل زندگی این انگل شامل یک مرحله عفونت زا به نام ترونت و یک فرم فعال و آسیب رسان به نام تروفونت است، که منجر به عفونت انگلی خارجی روی بدن ماهی می‌شود (شکل ۱).



شکل ۱- چرخه زندگی انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* (Dickerson and Clark, 1998)

به علت چرخه خاص انگل و نفوذ آن به پوست ماهی، دارو ها تنها بر فرم آزاد انگل موثر بوده و درمان باید چندین بار در فواصل مختلف (با توجه به دمای آب) تکرار شود. در نتیجه ریشه کنی این بیماری بسیار دشوار است (Matthews, 2005).

برای از بین بردن انگل داروهای ضد انگلی متنوعی مانند سبز مالاشیت، فرمالین، سولفات مس، پرمنگنات پتاسیم و غیره در آکواریوم استفاده می‌شود. سبز مالاشیت علیه مرحله انگلی و آزاد موثر است. با این حال استفاده از سبز مالاشیت برای درمان بیماری ماهی‌های خوراکی به علت خاصیت جهش زایی، سرطان‌زایی، پایداری و ماندگاری بالایی که در اکوسیستم دارد ممنوع شده است (Yao *et al.*, 2010). فرمالین نیز سبب تحریک و افزایش ترشح موکوس و کاهش میزان اکسیژن محلول در آب می‌شود (Buchmann *et al.*, 2005). بنابراین نیاز فوری به عوامل جایگزین موثر، مقرون به صرفه و امن برای

مبارزه با این بیماری است، که هم برای انسان و محیط زیست فاقد عوارض جانبی باشد. به منظور جایگزینی این داروهای سرطان زا، اخیراً Alavinia و همکاران در سال ۲۰۱۸ از ماده اسید تانیک برای از بین بردن انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیئیس* در ماهی زبرا استفاده کردند و نتایج قابل قبولی را به دست آوردند.

از زمان‌های بسیار دور، گیاهان منابع بسیار ارزشمندی از ترکیبات دارویی برای انسان بوده‌اند. معمولا با استفاده مکرر از محصولات با پایه گیاهی در مقایسه با داروهای شیمیایی مقاومتی ایجاد نمی‌شود. در برخی موارد حتی ارزان‌تر بوده، فاقد ویژگی سمیت و انباشتگی زیان‌آور در بافت موجود زنده هستند، قابلیت تجزیه و بازگشت به محیط را دارا هستند و در کل ترکیبات با منشأ گیاهی در مقایسه با سایر مواد سازگاری بیشتری با محیط زیست دارند (Citarasu *et al.*, 2003). امروزه به دلیل کارایی بالا و خطرات زیست محیطی کم، مطالعات در زمینه استفاده از ترکیبات و عصاره‌های گیاهان دارویی برای کنترل برخی انگل ها از جمله *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلییس* جایگاه ویژه‌ای یافته است.

گیاه مامیران کبیر (Greater celandine) با نام علمی *Chelidonium majus L*. متعلق به خانواده Papaveraceae (خشخاش) است (Colombo and Bosisio, 1996). مامیران کبیر گیاهی علفی و پایاست به ارتفاع ۸۰-۳۰ سانتی‌متر که در خاک‌های مرطوب، روی دیوارها، نقاط متروک، اماکن سایه‌دار، حاشیه جاده ها می‌روید (Ghanavi *et al.*, 1394). گیاه حاوی شیرابه نارنجی رنگ در تمام بخش‌هاست. برگ‌ها دارای بریدگی به رنگ سبز آبی و کرک دار بوده، ساقه ترد و شکننده است. این گیاه خاک جنگلی را ترجیح می‌دهد و به طور خودرو در قسمت‌های اروپای مرکزی و جنوبی، آسیا و شمال آمریکا رشد می‌کند (Saglam and Arar, 2003; Tin-Wa *et al.*, 1972). محدوده پراکندگی این گیاه در خاورمیانه، ایران و ترکیه است که محل رویش آن در ایران نواحی شمال و شمال شرقی کشور در استان‌های مازندران، گلستان و گیلان است (Ghanavi *et al.*, 1394).

نتایج تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که خواص دارویی و درمانی مامیران کبیر به دلیل آلکالوئید ها، فلاونوئیدها موجود در اندام‌های این گیاه است (Ganan *et al.*, 2016). شیره گیاهی و اندام‌های مامیران غنی از آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین اند که به سه گروه عمده بنزوفنانتریدین (مانند کلیدونین، سانگوئینارین و کلریترین)، پروتوپین و مشتقات آن (کوپتیسین) و پروتوبربرین (بربرین) تعلق دارند. نتیجه تحقیقات انجام شده روی گیاه مامیران نشان می‌دهد که این گیاه دارای خاصیت ضدباکتریایی (Zuo *et al.*, 2008) ، ضدویروسی، ضد قارچی (Parvu *et al.*, 2008; Monavari *et al.*, 2012)، ضدانگلی، ضد توموری و ضد التهابی است (Colombo and Bosisio, 1996).

مطالعات متعدد نشان دادند که عصاره گیاهان قادرند مراحل شناگر آزاد (شناور) انگل ایک را از بین ببرند (Buchman *et al.*, 2003; ekanem e*t al.*, 2004; Yao *et al.*, 2010, 2011; Ling *et al.*, 2012; Yi *et al.*, 2012). این مطالعات اظهار کردند که برخی گیاهان، از جمله گیاهان طب سنتی، دارای ویژگی‌های انگل‌کش موثری هستند. این ترکیبات در ماهی و آب، دژنره (دژنراسیون) شده و هیچ اثرات زیانباری را در سلامت انسان و محیط زیست ایجاد نمی‌کنند. استفاده از ترکیبات ضدانگلی استخراج شده از گیاهان می‌تواند راهکار نوینی برای درمان بیماری ایک باشد. از آنجا که تاکنون اثر ترکیبات عصاره گیاه مامیران کبیر روی انگل ایک در ایران و جهان مورد مطالعه قرار نگرفته است، بنابراین هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر ضدانگلی مامیران کبیر، در شرایط برون تنی (*In vitro*) بر روی انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلییس* است.

۲. مواد و روش کار

۲.۱. تهیه گیاه *Chelidonium majus* L.

گیاه مامیران کبیر (*Chelidonium majus L.*) از جنگل‌های استان مازندران جمع‌آوری شدند (شکل ۲) سپس، به منظور تأیید گیاه مورد نظر، نمونه‌ها به هرباریوم

داندشکده دارو سازی دانشگاه تهران ار سال و شنا سایی قطعی گیاه انجام شد.

شکل ۲- تصویرگیاه *Chelidonium majus L.* جمع آوری شده از جنگل‌های استان مازندران.

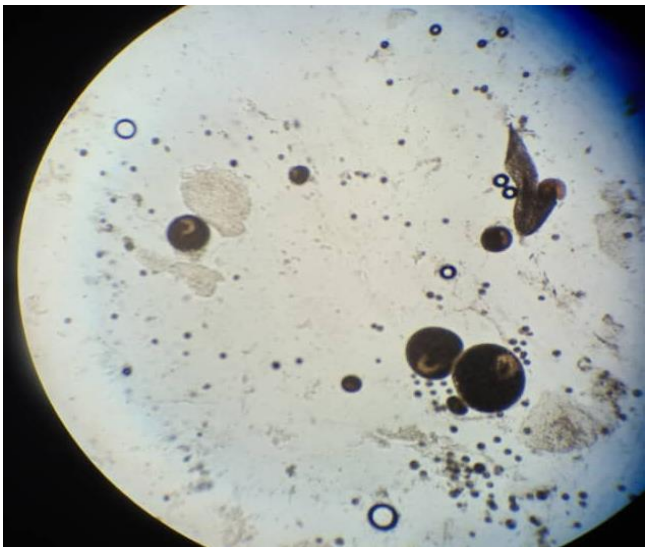
۲.۲. تهیه عصاره الکلی گیاه *Chelidonium majus L*

جهت عصاره‌گیری ۱۷۵ گرم از پودر برگ‌های کاملاً خشک شده این گیاه با ۹۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۶٪ کاملاً خیس شد و محلول حاضر به مدت ۲ ساعت در شیکر انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در ادامه نمونه فوق به مدت ۱۸ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. پس از آن مخلوط را با استفاده از کاغذ صافی واتمن صاف کرده و محلول رویی از رسوب جدا گردید و به رسوب باقی مانده ۷۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد اضافه شد. این روال تا ۴ روز تکرار و تمامی محلول‌های رویی جدا شده با هم مخلوط و بعد از صاف شدن با دستگاه تقطیر در خلاء تقطیر شد (شکل ۳).

شکل ۳- تصویرجداسازی عصاره الکلی گیاه مامیران کبیر توسط دستگاه روتاری اواپراتور (تقطیر در خلاء).

۲.۳. تهیه ماهی

۵ قطعه ماهی Green terror (*Andinoacara rivulatus*) آلوده به انگل ایک از از یک مرکز معتبر فروش ماهیان آکواریومی در شهر تهران تهیه شد. پس از خریداری، بلافاصله ماهیان به آکواریوم‌های از پیش فراهم شده در آزمایشگاه گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انتقال داده شد و با تهیه لام مرطوب و بررسی میکروسکوپی آلودگی به انگل ایک تایید شد (شکل ۴). جهت افزایش شمار انگل‌ها، عفونت تجربی با تک یاخته *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* به روش مجاور سازی یا اضافه نمودن ماهیان به شدت آلوده به انگل به چند آکواریوم حاوی ماهی حساس به انگل انجام گرفت.



شکل ۴- مشاهده تروفونت بالغ انگل ایک با هسته نعل اسبی شکل در لام مرطوب ماهیان آلوده در زیر میکروسکوپ نوری (بزرگ‌نمایی ۴۰x).

۲.۴. جداسازی انگل ایک

بعد از طی چند روز از بدن ماهیان آلوده به دقت لام مرطوب تهیه شد و همه محتویات داخل پتری دیش شستشو شدند. سپس ماهی‌ها با روش کشتار با ترحم کشته و در یک بشر کوچک حاوی آب مشابه با آب اکواریوم اولیه قرار داده شدند. زیر استریو میکروسکوپ بررسی شدند. با گذشت حدود یک ساعت، تومونت‌های جدا شده از بدن ماهی به آرامی با شنای آزاد حرکت کرده و در کف بشر قرار گرفتند. سپس محتویات بشر به پتری دیش‌های مجزا انتقال داده شدند. تومونت‌ها در نهایت با سمپلر و در زیر استریومیکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰ برابر جدا شدند (Buchmann, 2003).

۲.۵. تهیه ترونت‌های انگل ایک

پتری‌دیش‌های حاوی تومونت، در دمای ۲۵/۵درجه سانتی گراد به مدت ۲۲ ساعت گرمخانه گذاری (انکوباتور) شدند. ترونت‌های ریز با ویژگی شنای سریع در آب بعد از طی ۲۲ ساعت قابل تشخیص بودند. تراکم ترونت‌ها را به وسیله سانتریفیوژ (با دور ۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه) در هر سی سی به ۶۰۰۰ عدد رسید. به منظور شمارش ترونت‌ها از لام توما و نئوبار استفاده شد (Ling *et al.*, 2010; Schlenk *et al.*, 1998).

۲.۶. تهیه و آماده سازی غلظت‌های عصاره الکلی *Chelidonium majus L.*

با توجه به آزمایش‌های اولیه و بررسی منابع، ۷ غلظت مختلف از عصاره الکلی گیاه (۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸ ، ۱/۶، ۳/۲ و ۶/۴ گرم/لیتر)، غلظت فرمالین (۱۵ میلی گرم در لیتر، کنترل مثبت) و همچنین یک گروه شاهد بدون عصاره (حاوی آب اکواریوم) تهیه شد. نه تیمار مورد بررسی

در این پژوهش به شرح زیرند: تیمار ۱) شاهد، فقط آب آکواریوم فاقد کلر و عصاره الکلی گیاه، تیمار ۲) کنترل مثبت حاوی فرمالین با غلظت ۱۵ میلی گرم در لیتر ، تیمار ۳) غلظت ۰/۱گرم/لیتر عصاره الکلی گیاه، تیمار۴) غلظت ۰/۲ گرم/لیتر عصاره الکلی گیاه، تیمار ۵) غلظت ۰/۴گرم/لیتر عصاره الکلی گیاه، تیمار ۶) غلظت ۰/۸ گرم/لیتر عصاره الکلی گیاه تیمار، ۷) غلظت ۱/۶ گرم/لیتر عصاره الکلی گیاه، تیمار ۸) غلظت ۳/۲ گرم/لیتر عصاره الکلی گیاه تیمار۹) غلظت ۶/۴ گرم/لیتر عصاره الکلی

۲.۷. شرایط مواجه ترونت‌ها با غلظت‌های عصاره الکلی *Chelidonium majus L.*

ابتدا، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ترونت (۶۰۰ ترونت) در۳ تکرار (۳ گوده) در پلیت های ۹۶ گوده ای مطابق تیمارهای نه گانه فوق ریخته شده. سپس تیمار غلظت‌ها مطابق اعداد مشخص شده در بخش قبل و با حجم ۵۰ میکرولیتر اعمال شد و میزان مرگ و میر طبق مطالعات پیشین که توسط Yao و همکاران (۲۰۱۱)، Alavinia و همکاران (2019) و Yazdani و همکاران (2021) صورت گرفت در زمان‌های ۱، ۲ و ۳ ساعت محاسبه و ثبت شد.

۲.۸. محاسبه میزان بازماندگی و مرگ و میر ترونت‌ها

با اتمام زمان مواجهه ترونت‌ها، میزان تلفات آنها با روش زیر تعیین گردید. به طور خلاصه، ۱۰ میکرولیتر از محتویات هر چاهک زیر لامل و روی لام توما قرار داده شد. سپس تعداد ترونت‌های زنده در نه مربع بزرگ لام توما شمارش شده و۱۰در صد به تعداد آنها اضافه شد تا تعداد ترونت زنده در میلی متر مکعب به دست آمد. تعیین مرگ ترونت‌ها بر اساس تغییر مورفولوژی ترونت‌های انگلی، از تقریبا استوانه‌ای به حالت گردی-بیضی شکل و به واسطه لیز سلولی، تعیین شد (Buchmann *et al.*, 2003).

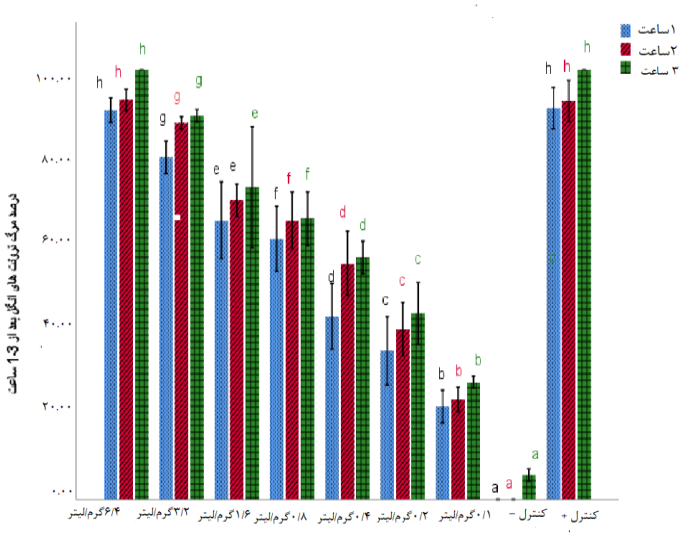
۲.۹. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

مقایسه میانگین داده‌های هر آزمایش با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه ANOVA، و سطح معنی‌دار بودن بین تیمارها با تست Duncan ($p<۰/۰۵$) و در نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۵) انجام شد.

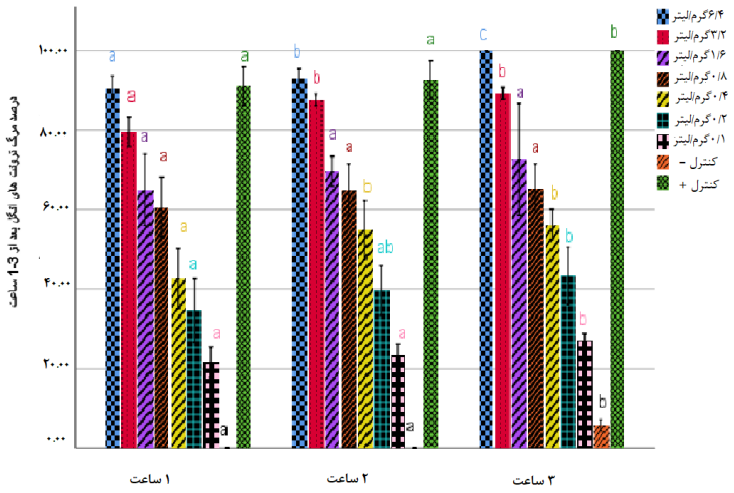
۳. نتایج

شکل ۵ و ۶ نتایج حاصل از بررسی آزمایشگاهی عصاره الکلی ماميران کبیر در غلظت‌های مختلف (۶/۴-۰/۱گرم / لیتر) در زمان‌های مختلف آزمایش (۱ و ۲، ۳ ساعت) بر میزان مرگ و میر ترونت‌های انگل *ایکتیوفتریوس مولتی فیلیس* را نشان می‌دهد. نتایج بررسی نشان داد که نرخ مرگ و میر ترونت‌های انگلی رابطه مستقیم و معنی‌داری با افزایش غلظت عصاره و زمان مواجهه دارد. مطابق با شکل ۵ شمار مرگ و میر ترونت‌های انگل ایک با افزایش میزان غلظت عصاره الکلی از ۰/۱ تا ۶/۴ گرم بر لیتر به طور معنی‌داری افزایش خواهد یافت ($p<۰/۰۵$)، در بین غلظت‌های استفاده شده از این عصاره الکلی در این مطالعه دوز ۶/۴ گرم بر لیتر با قدرت کشندگی ۱۰۰ درصد در مدت زمان ۳ ساعت بهترین عملکرد را داشت و غلظت ۳/۲ گرم بر لیتر بعد از آن با قدرت کشندگی ۸۹ در صد در همین بازه زمانی در رده ی بعدی قرار گرفت. کوتاهترین بازه زمانی برای از بین بردن بیش از ۹۰ درصد ترونت‌ها متعلق به غلظت ۶/۴ است. غلظت ۶/۴ گرم در لیتر توانست در مدت زمان ۱ ساعت ۹۰ درصد از ترونت‌های انگل را از بین ببرد و در مقایسه با دوز ۳/۲ که توانسته ۷۹ درصد از انگل‌ها را از بین ببرد اختلاف معنی‌داری داشته است ($p<۰/۰۵$)، اما در مقایسه با فرمالین (گروه کنترل مثبت) با ۹۱ درصد قدرت کشندگی، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد($p>۰/۰۵$). پس از مدت زمان ۲ ساعت قرار گیری ترونت انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* در معرض عصاره الکلی گیاه ماميران دوز ۶/۴ گرم بر لیتر ۹۳ درصد از ترونت‌ها را از بین برده که بین بازه زمانی ۱ و ۲ ساعت

در این غلظت اختلاف معنی‌دار مشاهده شد($p<۰/۰۵$)، اگرچه نسبت به فرمالین (گروه کنترل مثبت) در این زمان اختلاف معنی‌داری نداشته است ($p>۰/۰۵$). مطابق با شکل ۶ در نحوه عملکرد غلظت ۳/۲ بین مدت زمان مواجهه ۲ و ۳ ساعت اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($p>۰/۰۵$) هرچند در بازه ۳ ساعته عملکرد بهتری داشته است و توانسته ۸۹ درصد از انگل‌ها را نابود کند. در مدت زمان ۳ ساعت دوز ۶/۴ همانند فرمالین بهترین عملکرد خود را داشته و توانسته ۱۰۰ درصد از ترونت ها را از بین ببرد و در مقایسه با بازه زمانی ۲ ساعت اختلاف معنی‌داری مشاهده شد.



شکل ۵- نمودار درصد مرگ و میر ترونت‌های انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* تابعی از غلظت عصاره الکلی (۶/۴- ۰/۱گرم/لیتر)، فرمالین۱۵ میلی گرم/لیتر (گروه کنترل مثبت) و آب آکواریوم فاقد هر گونه عصاره الکلی (گروه شاهد) در نظر گرفته شد. حروف آماری متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.



شکل ۶- نمودار درصد مرگ و میر ترونتهای انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* تابعی از زمان مواجه ۳-۱ ساعت عصاره الکلی، فرمالین ۱۵ میلی گرم/لیتر (گروه کنترل مثبت) و آب آکواریوم فاقد هر گونه عصاره الکلی (گروه شاهد) در نظر گرفته شد. حروف آماری متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

غلظت ۱/۶ گرم نیز پس از مدت ۳ ساعت توانست بیش از ۷۰ درصد ترونت‌ها را از بین ببرد که اختلاف معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) با عملکرد غلظت ۰/۸ گرم بر لیتر از این عصاره که توانسته حدودا ۶۵ درصد ترونت‌ها را در این بازه زمانی ازبین ببرد وجود داشته است. به علاوه غلظت ۰/۸ گرم بر لیتر در مقایسه با دوزهای پایینتر یعنی ۰/۴ و ۰/۲ گرم نیز اختلاف معنی‌داری را نشان داده است ($p<۰/۰۵$).

۴. بحث و نتیجه گیری نهایی

در این مطالعه، اثر عصاره الکلی *Chelidonium majus L.* در غلظت‌های مختلف (۰/۱ -۶/۴ gr/l) و در زمان‌های مختلف (۱، ۲ و ۳ ساعت) در شرایط آزمایشگاهی بر میزان مرگ و میر ترونت‌های انگل *ایکتیوفتریوس مولتی فیلیس* بررسی شد. نرخ مرگ و میر و درصد زنده مانی ترونت‌های انگلی به عنوان شاخص‌های تعیین کننده میزان تأثیر انگل کش‌ها در طی دوره زمانی متفاوت بود. از دیگر شاخص‌هایی که جهت ارزیابی پتانسیل انگل کش‌ها در این مطالعه همانند سایر مطالعات دیگر به کار گرفته شد، زمان مواجه برای کشتن تمام ترونت‌ها است. به طور کلی بیشتر ترونت‌ها (۹۵/۳در صد) می‌توانند تا ۴۸ ساعت یا حتی بیشتر زنده بمانند و طی این مدت منتظر چسبیدن به میزبان می‌مانند، به خصوص زمانی که ماهیان تحت استرس تراکم هستند که حذف سریع و کامل ترونت‌ها می‌تواند از بروز عفونت در ماهیان میزبان جلوگیری کند (Ling *et al*.,2012).

نتایج این مطالعه نشان داد که، عصاره الکلی *Chelidonium majus L.* دارای اثر ضدانگلی روی انگل *ایکتیوفتریوس مولتی فیلیس است. با* افزایش میزان غلظت و زمان مواجهه این عصاره افزایش معنی‌داری در ویژگی‌های ضد انگلی این عصاره مشاهده شد. بیشترین اثر ضد انگلی این عصاره مربوط به غلظت ۶/۴ گرم /لیتر بود که منجر به کاهش ۱۰۰ درصدی ترونت‌ها در مدت زمان ۳ ساعت شد. بنابراین می‌توان گفت اثر ضد انگلی آن در مقابله با انگل *ایکتیوفتریوس مولتی فیلیس* مناسب است.

پیش از این Yao و همکاران (۲۰۱۱) اثرات ضد انگلی عصاره اتانولی گیاه مامیران‌کبیر و ترکیبات آلکالوئیدهای ایزوکوینولین فعال حاصل از آن از جمله کلیدونین، کلریترین و سانگوئینارین را علیه انگل *تریکودینا* در ماهی سیم سفید آمور (*Parabramis pekinensis*) مورد ارزیابی قرار دادند و نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که این ترکیبات در غلظت ۱ ، ۰/۸ و ۰/۷ میلی گرم بر لیتر به ترتیب می‌توانند برای از بین بردن تریکودینا ۱۰۰ درصد موثر باشد. در این مطالعه عامل ضد انگلی این عصاره وجود این سه ترکیب آلکالوئیدی گزارش شد.

در بررسی به عمل آمده توسط Yao و همکاران (۲۰۱۱)، عصاره اتانولی گیاه مامیران فعالیت ضدانگلی معنی‌داری علیه انگل *داکتیلوژیروس اینترمدیوس* در ماهی قرمز (*Carassius auratus*) نشان داد و ترکیب کلیدونین حاصل از این گیاه با غلظت ۰/۹ میلی گرم بر لیتر بعد از ۴۸ ساعت مواجهه، تاثیر ۱۰۰ درصدی علیه انگل *داکتیلوژیروس اینترمدیوس* داشته است، که بسیار موثرتر از گروه کنترل مثبت حاوی ترکیب ضدانگلی مبندازول با میانگین غلظت موثر ۱/۳ میلی گرم بر لیتر بوده است. در واقع این مطالعه نشان داده که ممکن است الکالوئید کلیدونین موجود در این عصاره تا حدی مسئول ضد انگلی آن عصاره باشد.

در مطالعه Li و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی آلکالوئید کلریترین جدا شده از گیاه مامیران روی انگل *داکتیلوژیروس اینترمدیوس* در شرایط درون تنی روی ماهی کپور علف خوار (*Ctenopharyngodon idella*) نشان داده شد که، در غلظت ۱/۶۰ میلی گرم بر لیتر در مدت زمان ۴۸ ساعت اثر ضد انگلی ۱۰۰ درصد است. غلظت موثره (EC_{50}) عصاره اتانولی گیاه مامیران ۷۱/۵۰ میلی گرم بر لیتر بود. اخیرا مشخص شده است که کلریترین، خاصیت سایتوتوکسیک علیه سلول‌های سرطانی مانند سلول OCM-1 ملانومای انسانی،

سلول‌های H-60 لوسمی پرومیلوسیتیک انسانی و حتی چندین سلول طبیعی مانند سلول کبدی انسان و میوسیت قلبی موش دارد (Yamamoto *et al.*, 2001). در واقع گفته می‌شود قدرت بالای سایتوتوکسیک کلریترین موجود در گیاه مامیران می‌تواند مسئول ضد انگلی این ماده علیه *داکتیلوژیروس اینترمدیوس* نیز باشد.

Yao و همکارن (۲۰۱۰) اثر سانگوینارین حاصل از عصاره اتانولی برگ گیاه *ماکلیا کوردا تا* علیه انگل *ایکتیوفتریوس مولتی فیلیئیس* را در شرایط برون‌تنی بررسی کردند، نتایج نشان داد که سانگوینارین در غلظت ۰/۷ میلی گرم بر لیتر بعد از مدت زمان ۴ ساعت تمامی انگل‌ها را از بین برده و علیه انگل ایک اثر ۱۰۰ درصدی داشته است. در این مطالعه ماده سانگوینارین یک منبع بالقوه برای کنترل انگل ایک گزارش شد و نشان داده شد که آسیب‌های وارد شده به انگل مشابه با درمان از طریق مالاشیت گرین عمل می‌کند، به صورتی که در هر دو مورد منجر به تخریب غشای سلول خارجی انگل شده و تجزیه کامل ماکرونوکلئوس را سبب می‌شود که در واقع ممکن است، مکانیزم اصلی برای فعالیت ضد انگلی سانگوینارین علیه انگل ایک باشد.

نتایج مطالعات اخیر نشان داده که سه ترکیبات آلکالوئیدی موجود در گیاه مامیران کبیر (کلیدونین، کلریترین و سانگوئینارین) اثرات ضد انگلی قابل توجه داشته است. این ترکیبات جزء آلکالوئیدهای بنزوفنانترین چهارتایی هستند و طیف وسیعی از فعالیت بیولوژیکی را نشان می‌دهند و به عنوان عوامل ضد میکروبی، ضد قارچی و ضد التهابی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Yao *et al.*, 2011). تحقیقات اخیر نشان داده است که میتوکندری هدف سلولی اصلی آلکالوئیدهای ایزوکینولین در القای آپوپتوز به روش‌های مختلفی است. میتوکندری‌ها نقش کلیدی در سلول ها دارند و آپوپتوز را کنترل و تنظیم می‌کنند. اختلال عملکرد میتوکندری ممکن است هم منجر به مرگ سلولی از نوع آپوپتوز و هم نکروز شود (Lemasters *et al.*, 1999). مکانیسم سانگوینارین و کلریترین در میتوکندری ممکن است به دلیل القای تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) باشد که منجر به اختلال در یکپارچگی غشای پلاسمایی انگل و توسعه سریع فرآیندهای نکروزه می‌شود که ممکن است مسئول فعالیت ضد انگلی آلکالوئیدهای فعال در این گیاه باشد. با توجه به مطالعات صورت گرفته می‌توان اثرات ضد انگلی گیاه مامیران را به علت حضور این ترکیبات آلکالوئیدی دانست.

همچنین نتیجه تحقیقات انجام شده روی گیاه مامیران نشان می‌دهد که این گیاه دارای خاصیت ضدباکتریایی (Zuo *et al.*, 2008) ، ضدویروسی، ضدقارچی (Parvu *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2009; , Monavari *et al.*, 2012) ، ضدانگلی، ضد توموری و ضد التهابی است (Colombo and Bosisio, 1996). در مطالعه Yazdani و همکاران (۲۰۲۱) عصاره الکلی گیاه *Terminalia catappa* L. در غلظت (۸۵۰- ۵۰ میلی گرم/لیتر) و زمان‌های مواجهه (۳-۱ ساعت) مختلف تحت شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شد. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان اثر بخشی عصاره الکلی *Terminalia catappa L.* بر ترونت‌های انگل *ایکتیوفتریوس مولتی فیلیس* تابعی از زمان و غلظت است و با افزایش غلظت و گذر زمان تاثیر آن بیشتر خواهد شد که نتیجه آن هم سو با مطالعه حاضر است. نتیجه این تحقیق نشان داد که دوز ۸۵۰ میلی‌گرم بر لیتر پس از دو ساعت ۱۰۰در صد ترونت‌ها را کشته و مناسب‌ترین دوز محسوب می‌شود. Rahmati-Holasoo و همکاران (2021) با بررسی اثر عصاره اتانولی آویشن شیرازی روی مرحله تومونت و ترونت *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* در ماهی زبرا، هم جهت با مطالعه حاضر به این نتیجه رسیدند که، ۲۰ میلی لیتر عصاره آویشن شیرازی در بازه زمانی ۶/۰۴ تا ۶/۳۷ دقیقه و غلظت ۱۰ میلی لیتر عصاره بر لیتر در مدت زمان ۳۱/۲ تا ۳۲/۴ دقیقه می‌تواند تمامی ترونت‌های ایک را نابود کند. همچنین استفاده از این عصاره به طور معنی‌داری سبب کاهش تولید و تکثیر تومونت‌ها و کاهش شدت و شیوع عفونت زایی ایک شد. عصاره آویشن شیرازی مانع از هجوم انگل ایک به ماهیان

سالم شده و به طور مؤثری موجب درمان ماهیان مبتلا گردید. در مطالعه Alavinia و همکاران (2019) با بررسی اثر ضد انگلی اسید تانیک بر ترونت‌های ایک در شرایط آزمایشگاهی غلظت‌های ۷-۰/۷۵ میلی گرم بر لیتر در زمان‌های مختلف ۱تا ۳ ساعت، نتایجی مشابه با نتایج مطالعه حاضر را بیان کردند که نشان داده شمار مرگ و میر ترونت‌های انگل رابطه مستقیم و معنی‌داری با غلظت ترکیب داشت و شمار مرگ و میر انگل با افزایش میزان غلظت اسید تانیک از صفر تا ۷ میلی گرم بر لیتر به طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین افزایش زمان مواجهه از ۱ الی ۳ ساعت منجر به کاهش معنی‌دار ترونت‌های انگل گردید.

نتیجه گیری نهایی

نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش غلظت عصاره الکلی *Chelidonium majus L.* ویژگی‌های ضد انگلی آن به میزان معنی‌داری افزایش خواهدیافت به طوری که دوز ۶/۴ گرم بر لیتر بهترین دوز علیه انگل ایک در شرایط آزمایشگاهی است که توانسته ۱۰۰ درصد از ترونت‌ها را ازبین ببرد. بنابراین، می‌تواند به عنوان یک داروی جایگزین و مناسب علیه ایکتیوفتریوزیس استفاده شود. با اینحال بررسی آزمایش‌های تکمیلی سمیت در سطوح کشندگی در ماهی‌ها شرط لازم و پیش‌نیاز آن برای طراحی و ساخت ترکیبی قابل اعتماد جهت کنترل ایکتیوفتیریازیس در صنعت آبزی پروری است.

۵. منابع

References

Alavinia, S.J., Mirzargar, S.S., Rahmati-Holasoo, H. and Mousavi, H.E., 2018. The in vitro and in vivo effect of tannic acid on *Ichthyophthirius multifiliis* in zebrafish (*Danio rerio*) to treat ichthyophthiriasis. *Journal of Fish Diseases 41*(12), 1793-1802.

Alavinia, S.J., Mirzargar, S.S., Rahmati-Holasoo, H. and Mousavi, H., 2019. In vitro Investigation of Short-Term Antiparasitic Effect of Tannic Acid on *Ichthyophthirius multifiliis* Theronts. *Journal of Veterinary Research 74*(2), 219-227. (in Persian)

Buchmann, K., Bresciani, J., Jappe, C., 2005. Effects of formalin treatment on epithelial structure and mucous cell densities in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), skin. *Journal of Fish Diseases* 27(2), 99-104.

Citarasu, T., Venkatramalingam, K., Micheal Babu, M., Raja Jeya Sekar, R. and Petermarian, M., 2003. Influence of the antibacterial herbs, *Solanum trilobatum*, *Andrographis paniculata* and *Psoralea corylifolia* on the survival, growth and bacterial load of *Penaeus monodon* post larvae. *Aquaculture International 11*(6), 581-595.

Citarasu, T., Venket Ramalingam, K., Raja Jeya Sekar, R., Micheal Babu, M., Marian, M.P., 2003. Influence of the antibacterial herbs, *Solanum trilobatum*, *Andrographis paniculata* and *Psoralea corylifolia* on the survival, growth and bacterial load of *Penaeus monodon* post larvae. *Aquaculture International* 11, 583-595.

Colombo, M.L., Bosisio, E., 1996. Pharmacological activities of C*helidonium majusl* papaveraceae). *Pharmacological research 33*(2), 127-134.

Dickerson, H., Clark, T., 1998. *Ichthyophthirius multifiliis*: a model of cutaneous infection and immunity in fishes. *Immunological Reviews* 166,377- 384.

Dickerson, H.W., Dawe, D., 2006. *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora). *Fish Disease and Disorders*, 1, 116-153.

Ekanem, A.P., Obiekezie, A., Kloas, W., Knopf, K., 2004**.** Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabacea) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis. Parasitology Research* 92(5), 361-366.

Elsayed, E.E., Dien, N.E., Mahmoud, M.A., 2006. Ichthyophthiriasis: various fish Susceptibility or presence of more than one Strain of the parasite. *Nature and Science* 4 (3), 5-13.

Ganan, N.A., Dias, A.M., Bombaldi, F., Zygadlo, J.A., Brignole, E.A., de Sousa, H.C., Braga, M.E., 2016. Alkaloids from *Chelidonium majus* L.: fractionated supercritical CO2 extraction with co-solvents. *Separation and Purification Technology 165*, 199-207.

Ghanavi, Z., Mollayi, S., A.R. Babaei., A.R., 2015. Ghassempour. Quantitative measurements of alkaloids in *Chelidonium majus* at different altitudes of north Iran. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 31(2), 307-314. (In Persian)

Hines, R.S. and Spira, D.T., 1973. *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet) in the mirror carp, *Cyprinus carpio* L. I. Course of infection. *Journal of Fish Biology* 5,385-392.

Khater, H., Govindarajan, M. Benelli, G., 2017. Natural Remedies in the Fight Against Parasites. InTech, Croatia. p. 120-133.

Lemasters, J.J., Qian, T., Bradham, C.A., Brenner, D.A., Cascio, W.E., Trost, L.C., Nishimura, Y., Nieminen, A.L., Herman, B., 1999. Mitochondrialdysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *Journal Bioenerg Biomembr* 31:305–319.

Li, X.L., Yao, J.Y., Zhou, Z.M., Shen, J, Y., 2011. Activity of the chelerythrine, a quaternary benzo[c] phenanthridine alkaloid from *Chelidonium majus L*. on *Dactylogyrus intermedius. Parasitology Research 109, 247-252.*

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*. *Parasitology Research* 111, 841-848.

Matthews, R.A., 2005. *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet and ichthyophthiriosis in freshwater teleosts. *Advances in Parasitology* 59, 159-241.

Monavari, S.H., Shahrabadi, M.S., Keyvani, H. and Bokharaei-Salim, F., 2012. Evaluation of in vitro antiviral activity of *Chelidonium majus* L. against herpes simplex virus type-1. *African Journal of Microbiology Research 6*(20), 4360-4364.

Murray, A.G., Peeler, E.J., 2005. A framework for understanding the potential for emerging diseases in aquaculture. *Preventive Veterinary Medicine* 67, 223-235.

Parvu, M., Pârvu, A.E., Crăciun, C., Barbu-Tudoran, L., Tămaș, M., 2008. Antifungal activities of *Chelidonium majus* extract on Botrytis cinerea in vitro and ultrastructural changes in its conidia. *Journal of Phytopathology 156*(9), 550-552.

Rahmati-Holasoo, H., Javadi Moosavi, M.S., Ebrahimzadeh Mousavi, H., Mirzargar, S.S., Taheri Mirghaed, A., 1400. Effect of Ethanol Extract of *Zataria Multiflora* on *Ichthyophthirius Multifiliis* Tomonts and Theronts in *Danio rerio*. *Journal of Veterinary Research 76*(2), 205-214. (In Persian)

Saglam, H., Arar, G., 2003. Cytotoxic activity and quality control determinations on *Chelidonium majus*. *Fitoterapia 74*(1-2), 127-129.

Schlenk, D., Gollon, J.L., Griffin, B.R., 1998. Efficacy of copper sulfate for the treatment of ichthyophthiriasis in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health* 10, 390-396.

Tin-Wa, M., Kim, H.K., Fong, H.H.S., Farnsworth, N.R., Trojanek, J., Abraham, D.J., 1972. Structure of chelidimerine. a new alkaloid from *Chelidonium majus*. *Lloydia*.

Yamamoto, S., Seta, K., Morisco, C., Vatner, SF., Sadoshima, J., 2001. Chelerythrine rapidly induces apoptosis through generation of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Journal of Molecular Cellular Cardiology* 33:1829–1848.

Yao, J.Y., Shen, J.Y., Li, X.L., Xu, Y., Hao, G.J., Pan, X.Y., Wang, G.X., Yin, W.L., 2010. Effect of sanguinarine from the leaves of *Macleaya cordata* against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Parasitology Research* 107, 1035-1042.

Yao, J.Y., Li, X.L., Shen, J.Y., Pan, X, Y., Hao, G.J., Xu, Y., 2011. Isolation of bioactive components from *Chelidonium majus L*. with activity against *Trichodina sp*. *Aquaculture* 318, 235–238.

Yao, J.Y., Zhou, Z.M., Pan, X.Y., Hao, G.J., Li, X.L., 2011. In vivo anthelmintic activity of chelidonine from *Chelidonium majus L. against Dactylogyrus* i*ntermedius* in *Carassius auratus*. *Parasitology Research* 109, 1465–1469.

Yao, J.Y., Zhou, Z.M., Li, X.L., Yin, W.L., Ru, H.S., Pan, X.Y., Hao, G.J., Xu, Y. and Shen, J.Y., 2011. Antiparasitic efficacy of dihydrosanguinarine and dihydrochelerythrine from *Macleaya microcarpa* against *Ichthyophthirius multifiliis* in richadsin (*Squaliobarbus curriculus*). *Veterinary Parasitology 183*(1-2), 8-13.

Yazdani Anaraki, E., Mirzargar, S.S., Rahmati Holasoo, H., Sharif zadeh, A., Ebrahimzadeh Mousavi, H., 2021. *In vitro* study of short-term antiparasitic effect of alcoholic extract of *Terminalia catappa* L. leaves on *Ichthyophthirius multifiliis* theronts. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 20(4), 1138-1148.

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*(4), 1771-1778.

Zuo, G.Y., Meng, F.Y., Hao, X.Y., Zhang, Y.L., Wang, G.C. and Xu, G.L., 2008. Antibacterial alkaloids from *Chelidonium majus* Linn (Papaveraceae) against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences 11*(4), 90-94.