# Study on effects of plants extracts of *Thymus vulgaris* and *Lavandula angustifolia* on *Ichthyophthirius multifiliis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

**Abstract:**

*Ichthyophthirius multifiliis* is a ciliated parasite of freshwater fish with global distribution, which causes economically important infection in cold-water fish. The aim of this research was to conduct an experimental study on the effects of hydro-alcoholic extracts of thyme (*Thymus vulgaris*) and lavender (*Lavandula angustifolia*) plants on theronts of *Ichthyophthirius multifiliis* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ingredients of hydro-alcoholic extracts of thyme and lavender were analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Hydro-alcoholic extracts of thyme (0.05 mg/µl) and lavender (0.05 mg/µl) were prepared using methanol and Soxhlet apparatus. In this study, concentrations of 40, 20, 10, 5, 2.5, and 1.25 mg/L were prepared from hydro-alcoholic of thyme and lavender with three replicates for each concentration. The duration of fatality of the extracts was evaluated at 23°C for 4 hours. GC-MS analyses elucidated that there were 36 (25.75%thymol) and 23 (17.04% lavender) components of hydro-alcoholic extracts of thyme and lavender, respectively. Fatality effect of hydro-alcoholic extracts of thyme and lavender had significant association with different concentrations. The highest effect of the extracts was at 40 mg/L of hydro-alcoholic extract of thyme (82.77 ± 1.71) and lavender (62.77 ± 1.79). The numbers of theronts were decreased with increasing concentration and exposure time in different concentrations of aqueous alcoholic hydro-alcoholic extracts of *T. vulgaris* and *L. angustifolia*. The fatality effect of hydro-alcoholic extract of *T. vulgaris* was higher than *L. angustifolia*. This study uncovered that different concentrations of hydro-alcoholic extracts of garden thyme and lavender destroyed *I. multifiliis* theronts under laboratory conditions.

**KEY WORDS:** *Thymus vulgaris, Lavandula angustifolia, Ichthyophthirius multifiliis, Theront, Oncorhynchus mykiss*

مقاله آزاد برای استناد

# مطالعه اثرات برون‌تنی عصاره‌های آویشن باغی و اسطوخودوس بر ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* جدا شده از ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان


## چکیده:

*ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* انگل ماهیان آب شیرین در سیستم‌های پرورشی سردآبی با پراکندگی جهانی است. هدف از این تحقیق، مطالعه اثر عصاره آبی الکلی آویشن باغی و اسطوخودوس بر ترونت *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* بود. عصاره‌های آبی الکلی گیاهان آویشن باغی (غلظت پایه ۰/۰۵ میلی‌گرم در میکرولیتر) و اسطوخودوس (غلظت پایه ۰/۰۵ میلی‌گرم در میکرولیتر) با استفاده از متانول و دستگاه سوکسله تهیه و ترکیبات شان آنالیز کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی گردید. از عصاره‌ها غلظت‌های ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵ و ۱/۲۵ میلی‌گرم در لیتر با ۳ تکرار برای هر غلظت تهیه شد. مدت زمان کشندگی عصاره‌ها بر حسب ثانیه در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد در مدت ۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. در آنالیز کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی, عصاره آبی الکلی آویشن باغی و اسطوخودوس به ترتیب ۳۶ (جزء اصلی تیمول، ۲۵/۷۵٪) و ۲۳ (جزء اصلی کومارین،۱۷/۰۴٪) ترکیب شناسایی شدند. اثر کشندگی عصاره‌های آبی الکلی آویشن باغی و اسطوخودوس رابطه مستقیمی با غلظت آن‌ها داشت. بیشترین اثر عصاره‌ها، در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره آبی الکلی آویشن باغی (۱/۷۱ ± ۸۲/۷۷) و اسطوخودوس (۱/۷۹ ± ۶۲/۷۷) ثبت شد. تعداد ترونت‌ها با افزایش غلظت و زمان مواجهه در غلظت‌های مختلف عصاره آبی الکلی آویشن باغی و اسطوخودوس کاهش یافت. میزان اثر کشندگی عصاره آبی الکلی آویشن باغی در مقایسه با عصاره آبی الکلی اسطوخودوس بیشتر بود. نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت های مختلف عصاره آبی الکلی آویشن باغی و اسطوخودوس ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* را در شرایط آزمایشگاهی غیرفعال نمودند.



**کلید واژه:** آویشن باغی، اسطوخودوس، *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس*، ترونت، قزل‌آلای رنگین‌کمان



غیرقابل استناد

**مقدمه:**

*ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* تک‌یاخته انگلی مژه‌دار ماهیان سردآبی با توزیع جهانی است (Buchmann, 1999; Matthews, 2005; Dickerson and Findly, 2014; Xu *et al.*, 2016). در چرخه‌ی زندگی *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* سه مرحله ترونت عفونت‌زا، تروفونت انگلی و تومونت زایشی وجود دارد (Nigrelli et al., 1976; Noe and Dickerson., 1995; Swennes *et al.*, 2006; Zhang et al., 2013). انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* به اپیدرم آبشش‌ها و اندام‌های سطحی بدن میزبان حمله می‌کند (Matthews, 2005; Dickerson, 2006). نفوذ *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* در اپیدرم پوست و آبشش با آسیب قابل توجهی به اپیدرم همراه است (Matthews, 2005). میزبان‌ها به طور معمول دچار سرکوب سیستم ایمنی می‌شوند و بروز عفونت های فرصت‌طلب تسهیل می‌گردد. ماهی‌های آلوده به *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* حساسیت بیشتری نیز به بیماری‌های باکتریایی پیدا می‌کنند (Xu *et al.*, 2012 a, b). آلودگی با *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* باعث زیان‌های اقتصادی قابل تئجه در صنعت آبزی پروری و ماهیان زینتی شده است (Dickerson & Findly, 2014; Xu *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2012 a, b).

درمان ایکتیوفتیریازیس با استفاده از مالاشیت‌گرین و مخلوط مالاشیت‌گرین و فرمالین به روش غوطه‌وری مطرح بود (Leteux & Meyer 1972; Wahli *et al.*, 1993; Buchmann *et al.*, 2003). با این حال، مالاشیت‌گرین به دلیل سرطان‌زا و ژنوتوکسیک بودن برای مصرف کنندگان گوشت و فرآورده‌های آبزی‌پروری ممنوع گردید (Picón-Camacho *et al.*, 2012; Shinn *et al.*, 2012; Srivastava *et al.*, 2004). اثرات درمانی سایر ترکیبات شیمیایی نظیر سولفات‌مس (Ling *et al.*, 1993; Schlenk *et al.*, 1998; Rowland *et al.*, 2008)، برونوپل (Shinn *et al.*, 2001)، سدیم‌کلراید (Selosse & Rowland., 1990)، فرمالین (Rintamäki-Kinnunen *et al.*, 2005 a,b; Rowland *et al.*, 2008)، کلرامین-T (Rintamäki-Kinnunen *et al.*, 2005a)، پرمنگنات پتاسیم (Straus & Griffin., 2002)، فرات پتاسیم (Ling *et al.*, 2010)، پراکسید هیدروژن (Rintamäki-Kinnunen *et al.*, 2005a)، سدیم پرکربنات (Buchmann *et al.*, 2003)، اسید پراستیک (Straus & Meinelt., 2009; Sudová *et al.*, 2010) نیز گزارش گردیدند. با این حال، استفاده از ترکیبات شیمیایی در آبزی‌پروری تجاری با نگرانی‌های مقاومت ضد انگلی، کارآیی کم، باقیمانده دارویی، آلودگی زیست محیطی و هزینه بالا مواجه شد (Tieman & Goodwin., 2001; Ling *et al.*, 2010; Reverter *et al.*, 2014). گرچه در تحقیقات ایمن‌سازی بر علیه *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* گزارش‌های امیدوارکننده‌ای بود، ولی تاکنون واکسن مطمئنی به صورت تجاری هنوز ارایه نگردیده است (Buchmann *et al.*, 2001; Wang & Dickerson., 2002; Dickerson & Findly., 2014; Jørgensen, 2017; Xu *et al.*, 2009).

غیر قابل استناد

امروزه، به دلیل استفاده روزافزون از داروهای گیاهی در درمان بیماری‌های انسانی، کارایی بالا و خطرات زیست‌محیطی کم موجب گردید تا مطالعات در زمینه استفاده از ترکیبات و عصاره‌های گیاهان دارویی در درمان برخی از آلودگی‌های انگلی ماهیان جایگاه ویژه‌ای بیابند. مطالعات نشان دادند عصاره‌های گیاهی یا ترکیبات مشتق شده از آن‌ها مانند عصاره گیاهان سیر و بابونه (Gholipour-Kanani, 2012)، شمعدانی، اسطوخودوس و سیر (Valladão *et al.*, 2016; Raisi *et al.*, 2020)، عصاره اتانولی آویشن شیرازی (Rahmati Holasu *et al.*, 2021)، عصاره اتانولی مخلوط گیاهان (Fu *et al.*, 2021)، ترکیبات فعال جدا شده از زنجبیل (Fu *et al.*, 2019)، ترکیبات فعال جدا شده از عصاره متانولی *تودالیا آزیاتیکا* (Shan *et al.*, 2014)، عصاره آبی سیر (Karimi & Parsa., 2021)، عصاره متانولی *موکونا پرورینس* و *پاپایا کاریکا* (Ekanem *et al.*, 2004)، عصاره متانولی *سوفورا آلوپکوروئیدس* و *مگنولیا اوفیسینالیس* (Yi *et al.*, 2012)، عصاره آبی *کپسیکوم فروتسنس* (Ling *et al.*, 2012)، عصاره متانولی *پسورالهآ کوریلیفولیا* (Ling *et al.*, 2013)، عصاره استون و اتیل استات *موروس آلبا* (Fu *et al.*, 2014b)، عصاره خام سیر (Buchmann *et al.*, 2003)، دی هیدروسانگوینارین و دی هیدروکلریترین (Yao *et al.*, 2011)، ترکیبات فعال مانند سانگوینارین (Yao *et al.*, 2010)، پنتاگالویلگلوکوز (Zhang *et al.*, 2013)، سیناتراتوزوئید C (Fu *et al.*, 2014a)، کووانوس G و O (Liang *et al.*, 2015)، پسورالیدین و ایزوپسورالن (Song *et al.*, 2015)، کورکومین (Liu *et al.*, 2017) اثرات ضد انگلی قابل توجهی نشان دادند. آویشن باغی (*نیموس ولگاریس*) گیاهی از تیره نعناعیان با ارتفاع ۱۰ تا ۳۰ سانتی‌متر و دارای خواص ضدباکتریایی، ضد قارچی، و نگهدارنده قوی و آنتی‌اکسیدان است. گیاه آویشن ترکیباتی نظیر فنل، هیدروکربن، مونوترپن و الکل دارد و تیمول ترکیب اصلی آن است. آویشن خواصی از قبیل ضدقارچ، ضدباکتری، ضدکرم، آنتی‌اکسیدان و ضدعفونی کننده دارد (Roby *et al.*, 2013). فعالیت ضدمیکروبی آویشن به ترکیبات فنلی آن مثل تیمول و کارواکرول نسبت داده شده است. تیمول و کارواکرول با نفوذ به دیواره اووسیست کوکسیدیا و آسیب سیتوپلاسم موجب غیرفعال شدن آن می گردند (Molan & Liu, 2009). تیمول بدلیل دارا بودن اثر دفع‌کننده انگلی در بیماری‌های انگلی روده‌ای می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (Prasanth ; Behnam & Aliakbarlou., 2014 Reddy *et al.*, 2014). اسطوخودوس (*لاوندولا انگوستیفولیا*) گیاهی چندساله و همیشه سبز از خانواده نعناعیان است. ارتفاع گیاه بین ۳۰ تا ۶۰ سانتی‌متر و گل‌های آن به صورت خوشه‌ای انتهایی و مجتمع در رأس ساقه می‌باشد (Dadman *et al.*, 2007). گیاه دارای اسانس شامل منوترپن‌ها می‌باشد که مهمترین مواد متشکله آن لینالیل‌استات، لینالول، بتااوسمین، سینئول، کامفر، سزکویی‌ترپن کاریوفیلن اکساید، تانن، مشتقات رزمارینیک اسید، کومارین و فلاونوئید می‌باشد. در گذشته اندام‌های هوایی و گل اسطوخودوس استفاده‌های دارویی متعددی داشته‌اند (Denner, 2009). از اسانس اسطوخودوس

اثرات ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضد آفاتی نظیر جرب‌ها و ضدتک‌یاخته‌ای دارد، گزارش شده است (Cavanagh & Wilkinson., 2002; Moon & Cavanagh, 2006). غربالگری عصاره‌های گیاهی و ترکیبات آن‌ها راهی مطمئن و کاربردی برای تولید داروهای جدید با سمیت کم و کارآمدی بالا برعلیه *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* می‌باشد. بنابراین مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثرات برون تنی عصاره‌های آبی الکلی گیاهان آویشن و اسطوخودوس بر علیه ترونت *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* در ماهی قزل آلای رنگین کمان انجام شد.

## روش‌شناسی پژوهش:

### روش تهیه عصاره‌ی آبی الکلی آویشن باغی و اسطوخودوس:

بوم گیاه شناسی و اصالت گیاهان آویشن باغی و اسطوخودوس تهیه شده در دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه تایید گردید. برای تهیه عصاره‌ی آبی الکلی آویشن باغی و اسطوخودوس، هر گیاه را جداگانه خرد کرده و یک هفته در سایه نگهداری شدند تا خشک شوند. هر گیاه خشک شده با استفاده از مخلوط‌کن تجاری به روش مکانیکی پودر شد. عصاره‌ی آبی الکلی گیاهان با استفاده از دستگاه سوکسله بزرگ در جهاد دانشگاهی ارومیه تهیه گردید.

### روش آنالیز کروماتوگرافی گازی – طیف سنجی جرمی:

برای تعیین ترکیبات موجود در عصاره‌های الکلی، ۱۰ میلی‌لیتر از هر گیاه با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی (GC-MS, Model 6890N; Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) دارای ستون HP-5MS (طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلیمتر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر) آنالیز گردید. برنامه دمای ستون شامل دمای اولیه کوره ۵۰ درجه سانتی‌گراد، دمای محفظه انژکتور ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد و هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت ۱/۵ میلی‌متر در دقیقه بود. همچنین از طیف‌سنج جرمی با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ استفاده شد. شناسایی ترکیبات موجود در هر عصاره براساس مقایسه زمان نگهداری آن‌ها با نمونه‌های معتبر در ستون مویرگی با نمونه‌های معتبر و داده‌های در دسترس صورت گرفت.

غیر قابل استناد

## روش جداسازی ترونت‌ها:

تروفونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس*، در سه مرحله و پس از ۱۰ روز مجاورت در آکواریوم، با تخریش پوست و آبشش چهار قطعه بچه ماهی انگشت قد قزل‌آلای رنگین‌کمان جدا شدند و به پتری‌دیش حاوی آب بدون کلر منتقل گردیدند (Fu *et al.*, 2014a). تومنت‌های چسبیده به کف پتری‌دیش با آب بدون کلر شستشو داده شدند و در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد یک شبانه روز نگهداری شدند. تعداد ترونت‌های آزادشده *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* با ریختن ۲ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی انگل روی لام و اضافه کردن ۲ میکرولیتر فرمالین ۱٪ شمارش شدند (Zhang *et al.*, 2013).

## روش آزمایش:

از غلظت پایه عصاره‌ی آبی الکلی آویشن باغی و اسطوخودوس (۸۰ میلی‌گرم در لیتر)، رقت های سریالی دو برابری به ترتیب ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵ و ۱/۲۵ میلی‌گرم در لیتر تهیه گردید. در هر چاهک از میکروپلیت ۹۶ چاهکی، ۵۰ میکرولیتر آب بدون کلر حاوی ۳۰۰ ترونت ریخته شد. برای هر غلظت از عصاره‌ی آبی الکلی آویشن باغی و اسطوخودوس ۳ تکرار تهیه شد. برای هر تکرار، یک چاهک کنترل مثبت (۵۰ میکرولیتر مالاشیت سبز از غلظت پایه ۰/۰۵ میلی‌گرم در میکرولیتر) و یک چاهک کنترل منفی (۵۰ میکرولیتر آب بدون کلر و فاقد عصاره) نیز تهیه شد. میزان کشندگی هر عصاره براساس بی حرکتی و بدشکل شدن ترونت‌ها در هر چاهک در نگاه ریزبینی با لوپ در دمای۲۳ درجه سانتی‌گراد مطالعه و تعیین گردید (Zhang *et al.*, 2013).

## روش ارزیابی آماری:

با استفاده از بسته آماری SPSS (نسخه ۲۶) و آزمون ANOVA دو طرفه، تجزیه تحلیل داده‌های مرتبط با میزان کشندگی عصاره‌های آبی الکلی آویشن باغی و اسطوخودس انجام شد. سطح معنی‌داری $p < ۰/۰۵$ بود.

## یافته‌های پژوهش:

در آنالیز کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی, عصاره آبی الکلی آویشن باغی و اسطوخودوس به ترتیب ۳۶ (جزء اصلی تیمول، ۲۵/۷۵ ٪) و ۲۳ (جزء اصلی کومارین،۱۷/۰۴٪) ترکیب شناسایی شدند (جدول‌های ۱ و ۲).

غیر قابل استناد

**جدول شماره ۱: ترکیبات اصلی عصاره متانولی آویشن باغی.**

| ردیف | اسم علمی | RT (دقیقه) | سطح (٪) |
|---|---|---|---|
| ۱ | o –سایمول | ۶/۹۸۲ | ۱/۴۸ |
| ۲ | سینول | ۷/۱۴۸ | ۰/۵۳ |
| ۳ | ترپینن گاما | ۷/۷۲۶ | ۰/۶۹ |
| ۴ | P–متیل–آلفا– متیل استیرن | ۸/۴۵۳ | ۰/۵۲ |
| ۵ | لینالول | ۸/۶۷۶ | ۱/۸۷ |
| ۶ | بورنئول | ۱۰/۲۶۶ | ۲/۵۶ |
| ۷ | تیمول متیل اتر | ۱۱/۷۵۴ | ۱/۱۳ |
| ۸ | تیمول | ۱۳/۲۹۳ | ۲۵/۷۵ |
| ۹ | ایزوتیمول | ۱۳/۵۵۱ | ۳/۴۶ |
| ۱۰ | P–وینیل گایاکول | ۱۳/۷۹۱ | ۰/۹۸ |
| ۱۱ | پیپریتنون | ۱۴/۵۳۵ | ۸/۰۱ |
| ۱۲ | سیرینگول | ۱۴/۵۹۲ | ۰/۷۶ |
| ۱۳ | اوگنول | ۱۴/۶۵۰ | ۰/۴۰ |
| ۱۴ | پاپیریتن اکساید | ۱۴/۹۱۸ | ۱/۵۵ |
| ۱۵ | ال–کاریلوفن | ۱۵/۹۷۷ | ۱/۶۰ |
| ۱۶ | (1R)- ۱،۶،۶- تریمتیل–سیس– بیسیکلو | ۱۶/۶۲۹ | ۱۴/۵۴ |
| ۱۷ | استووانیلون | ۱۷/۴۴۸ | ۰/۵۲ |
| ۱۸ | ترت–بوتیلکارکول | ۱۸/۸۰۹ | ۳/۶۰ |
| ۱۹ | آلفا–کادینول | ۲۰/۳۶۶ | ۰/۶۵ |
| ۲۰ | ترانس–فیتول | ۲۴/۲۴۰ | ۰/۶۰ |
| ۲۱ | متیل بوتیرات | ۲۴/۳۷۷ | ۰/۴۴ |
| ۲۲ | کتن | ۲۵/۰۰۱ | ۰/۶۰ |

غیر قابل استناد

| | | | |
|---|---|---|---|
| ۲۳ | اسید پالمیتینیک | ۲۶/۵۲۳ | ۱/۹۵ |
| ۲۴ | متیل ۱۲،۹، ۱۵–اوکتا دکا تریانووات | ۲۸/۱۵۹ | ۱/۲۲ |
| ۲۵ | دندرالاسین | ۲۸/۵۸۳ | ۰/۵۲ |
| ۲۶ | ترانس–۱۰ متیل–۴–کتوپرهیدروآزول | ۲۸/۶۵۱ | ۰/۸۸ |
| ۲۷ | متیل استات، اسید لینولنیک | ۲۸/۷۸۸ | ۱/۵۹ |
| ۲۸ | کارواکرول | ۳۱/۶۴۴ | ۳/۶۵ |
| ۲۹ | سیس–۳a–۴a، ۵،۶،۷– هگزاهیدرو–۱h–ایندن–ال– ۱–۱ | ۳۲/۱۵۳ | ۰/۶۲ |
| ۳۰ | منوگلیسرید–بتا اسیدپالمیتیک | ۳۲/۳۲۵ | ۱/۱۷ |
| ۳۱ | سیرسیماریتین | ۳۲/۵۹۴ | ۱/۰۱ |
| ۳۲ | بیس (۲–اتیل هگزیل) فتالیت | ۳۲/۷۷۷ | ۲/۹۱ |
| ۳۳ | تری دکانتیال | ۳۴/۶۵۴ | ۰/۷۳ |
| ۳۴ | اسید نانئدیک | ۳۴/۷۹۷ | ۱/۱۱ |
| ۳۵ | اسکوالن | ۳۶/۹۳۷ | ۰/۵۷ |
| ۳۶ | گاماسیتواسترول | ۵۴/۰۱۱ | ۲/۱۴ |

در این تحقیق، میانگین درصد مرگ و میر ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* مواجهه یافته با غلظت‌های مختلف عصاره آبی الکلی آویشن و اسطوخودوس در جدول ۱ ثبت شده است. اثر کشندگی عصاره‌های آبی الکلی آویشن باغی و اسطوخودوس بر ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* رابطه مستقیمی با غلظت آن‌ها داشت. بطوریکه در شرایط آزمایشگاهی با افزایش غلظت و زمان مواجهه با غلظت‌های مختلف عصاره آبی الکلی آویشن باغی و اسطوخودوس به طور معنی‌داری تعداد ترونت‌ها کاهش یافت ($p<۰/۰۵$).

**جدول شماره ۲: ترکیبات اصلی عصاره آبی الکلی اســطوخودوس.**

| ردیف | اسم علمی | RT (دقیقه) | سطح (٪) |
|---|---|---|---|
| ۱ | o –سایمول | ۶/۹۸۲ | ۱/۴۸ |
| ۲ | سینول | ۷/۱۴۸ | ۰/۵۳ |
| ۳ | ترپینن گاما | ۷/۷۲۶ | ۰/۶۹ |
| ۴ | P–متیل–آلفا– متیل استیرن | ۸/۴۵۳ | ۰/۵۲ |
| ۵ | لینالول | ۸/۶۷۶ | ۱/۸۷ |
| ۶ | بورنئول | ۱۰/۲۶۶ | ۲/۵۶ |
| ۷ | تیمول متیل اتر | ۱۱/۷۵۴ | ۱/۱۳ |
| ۸ | تیمول | ۱۳/۲۹۳ | ۲۵/۷۵ |
| ۹ | ایزوتیمول | ۱۳/۵۵۱ | ۳/۴۶ |
| ۱۰ | P–وینیل گایاکول | ۱۳/۷۹۱ | ۰/۹۸ |
| ۱۱ | پیپریتنون | ۱۴/۵۳۵ | ۸/۰۱ |
| ۱۲ | سیرینگول | ۱۴/۵۹۲ | ۰/۷۶ |
| ۱۳ | اوگنول | ۱۴/۶۵۰ | ۰/۴۰ |

غیر قابل استناد

| | | | |
|---|---|---|---|
| ۱۴ | پاپیریتن اکساید | ۱۴/۹۱۸ | ۱/۵۵ |
| ۱۵ | ال-کاریلوفن | ۱۵/۹۷۷ | ۱/۶۰ |
| ۱۶ | (1R)- ۱،۶،۶- تریمتیل-سیس- بیسیکلو | ۱۶/۶۲۹ | ۱۴/۵۴ |
| ۱۷ | استووانیلون | ۱۷/۴۴۸ | ۰/۵۲ |
| ۱۸ | ترت-بوتیلکارکول | ۱۸/۸۰۹ | ۳/۶۰ |
| ۱۹ | آلفا-کادینول | ۲۰/۳۶۶ | ۰/۶۵ |
| ۲۰ | ترانس-فیتول | ۲۴/۲۴۰ | ۰/۶۰ |
| ۲۱ | متیل بوتیرات | ۲۴/۳۷۷ | ۰/۴۴ |
| ۲۲ | کتن | ۲۵/۰۰۱ | ۰/۶۰ |
| ۲۳ | اسید پالمیتینیک | ۲۶/۵۲۳ | ۱/۹۵ |
| ۲۴ | متیل ۱۲،۹، ۱۵-اوکتا دکا تریانووات | ۲۸/۱۵۹ | ۱/۲۲ |
| ۲۵ | دندرالاسین | ۲۸/۵۸۳ | ۰/۵۲ |
| ۲۶ | ترانس-۱۰ متیل-۴-کتوپرهیدروآزول | ۲۸/۶۵۱ | ۰/۸۸ |
| ۲۷ | متیل استات، اسید لینولنیک | ۲۸/۷۸۸ | ۱/۵۹ |
| ۲۸ | کارواکرول | ۳۱/۶۴۴ | ۳/۶۵ |
| ۲۹ | سیس-۳a-۵،۶،۷، ۴a- هگزاهیدرو-۱h-ایندن-ال- ۱-۱ | ۳۲/۱۵۳ | ۰/۶۲ |
| ۳۰ | منوگلیسرید-بتا اسیدپالمیتیک | ۳۲/۳۲۵ | ۱/۱۷ |
| ۳۱ | سیرسیماریتین | ۳۲/۵۹۴ | ۱/۰۱ |
| ۳۲ | بیس (۲-اتیل هگزیل) فتالیت | ۳۲/۷۷۷ | ۲/۹۱ |
| ۳۳ | تری دکانتیال | ۳۴/۶۵۴ | ۰/۷۳ |
| ۳۴ | اسید نانئدیک | ۳۴/۷۹۷ | ۱/۱۱ |
| ۳۵ | اسکوالن | ۳۶/۹۳۷ | ۰/۵۷ |
| ۳۶ | گاماسیتواسترول | ۵۴/۰۱۱ | ۲/۱۴ |

غیر قابل استناد

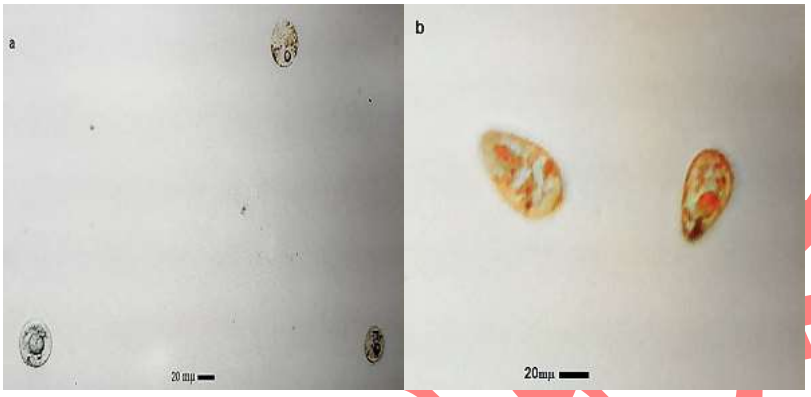
در شرایط آزمایشگاهی غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره آبی الکلی آویشن باغی در بازه‌ی زمانی ۴ ساعته توانست ۱/۷۱ ± ۸۲/۷۷ درصد ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* را از بین ببرد. در حالی‌که ۱/۷۹ ± ۶۲/۷۷ ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* در مواجهه با غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره آبی الکلی اسطوخودوس را از بین برد. البته غلظت‌های ۵، ۲/۵ و۱/۲۵ میلی‌گرم در لیتر عصاره آبی الکلی آویشن باغی و ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵ و ۱/۲۵ میلی‌گرم در لیتر عصاره آبی الکلی اسطوخودوس نتوانست بیش از ۵۰٪ ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* را در ۴ ساعت مواجهه از بین ببرند (جدول۳).

**جدول۳. میانگین مرگ و میر ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* در غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی الکلی آویشن باغی و اسطوخودوس (میانگین± انحراف معیار).**

| غلظت (میلی گرم در لیتر) | میزان مرگ و میر ترونت (٪) | |
|---|---|---|
| | آویشن | اسطوخودوس |
| ۱/۲۵ | ۱۲/۷۷ ± ۲/۴۲ | ۶/۱۱ ± ۱/۷۱ |
| ۲/۵ | ۳۰/۵۵ ± ۱/۹۳ | ۸/۸۸ ± ۲/۲۲ |
| ۵ | ۴۵/۵۵ ± ۱/۷۹ | ۱۵/۰۰ ± ۱/۸۵ |
| ۱۰ | ۶۱/۱۱ ± ۱/۵۵ | ۳۲/۲۲ ± ۱/۵۹ |
| ۲۰ | ۷۲/۲۲ ± ۱/۰۴ | ۴۷/۷۷ ± ۱/۵۱ |
| ۴۰ | ۸۲/۷۷ ± ۱/۷۱ | ۶۲/۷۷ ± ۱/۷۹ |
| کنترل مثبت (مالاشیت سبز) | ۱۰۰±۰۰ | ۱۰۰±۰۰ |
| کنترل منفی (آب فاقد کلر) | ۰۰±۰۰ | ۰۰±۰۰ |

غیر قابل استناد

ترونت‌های زنده در گروه شاهد دوکی شکل و به سرعت در جهت طولی بدون تغییر در حرکت بودند. ولی ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* در گروه‌های درمانی آبی الکلی آویشن باغی و اسطوخودوس به تدریج توانایی شنا را از دست داده و کروی شدند و تا مدتی در همان محل چرخیدند (شکل ۱).




**شکل شماره ۱. ترونت مواجهه نیافته (b، بزرگنمایی ۱۰۰×) و مواجهه یافته *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* با عصاره‌آبی الکلی آویشن و اسطوخودوس (a، بزرگنمایی ۱۰۰×) جدا شده از ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان.**

## بحث:

ایکتیوفتیریازیس بیش از سایر پاتوژن‌های یوکاریوت به جمعیت ماهی‌های آب شیرین در سراسر جهان آسیب وارد کرده است (Matthews, 2005). تحقیقات اخیر پتانسیل عصاره‌های گیاهی، اسانس ها و ترکیبات جدا شده از گیاهان را برای کنترل بیماری‌ها در آبزی پروری بررسی نشان داده‌اند (Valladão *et al.*, 2016). ترونت مرحله عفونت‌زای در چرخه زندگی *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* است که ۹۵/۳ ٪ آن‌ها ۴۸ ساعت در آب زنده مانده و تمایل بیشتری به آلوده کردن ماهیان در پرورش متراکم دارند (Shinn *et al.*, 2012). ترونت به ضدانگل‌های فعال گیاهی و یا مواد شیمیایی نسبت به سایر مراحل ایک حساس‌تر است (Buchmann *et al.*, 2003; Rowland *et al.*, 2008; Chu *et al.*, 2010; Ling et al., 2012; Yi *et al.*, 2012). درمان با هدف قطع چرخه زندگی با از بین بردن مراحل زندگی آزاد انگل به عنوان یک ابزار مؤثر برای کنترل عفونت‌ها در نظر گرفته می‌شود (Matthews, 2005; Zhang *et al.*, 2013). بنابراین شناسایی ترکیبات ضدانگلی مؤثر به منظور از بین بردن انگل در مراحل زندگی آزاد راه با اهمیتی در محافظت از ماهیان در برابر عفونت است.

در مطالعه حاضر، اثر کشندگی عصاره‌های آبی الکلی آویشن باغی و اسطوخودوس بر ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* رابطه مستقیمی با غلظت آن‌ها داشت و تعداد ترونت‌ها با افزایش غلظت و زمان مواجهه با غلظت‌های مختلف به طور معنی‌داری کاهش یافت. به علاوه، غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره آبی الکلی آویشن باغی در ۴ ساعت تا ۸۰٪ ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* را از بین برد. در حالی‌که همین غلظت از عصاره آبی الکلی اسطوخودوس تا ۶۰٪ از ترونت ها را در ۴ ساعت از بین برد. Alavinia *et al.* (2019) گزارش کردند که غلظت‌های ۴/۵ و ۷ میلی‌گرم در لیتر اسیدتانیک بیش از ۹۰ ٪ ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* را در یک ساعت از بین می‌برد ولی غلظت ۷۵/. میلی‌گرم در لیتر ۲۵ درصد ترونت‌ها در ۳ ساعت از بین رفتند. در مطالعه‌ی برون‌تنی اثر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی گیاه مامیران‌کبیر بر ترونت *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس*، غلظت ۶/۴ گرم در لیتر و ۳/۲ گرم در لیتر به ترتیب ۱۰۰٪ و ۸۹٪ ترونت‌ها را در ۳ ساعت از بین برد (Alijanpour *et al*, 2022). در مطالعه‌ی Yazdani Anaraki *et al.* (2021) غلظت‌های ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر و ۸۵۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره الکلی گیاه *ترمینالیا کاتپا* ۱۰۰٪ ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس را* در ۳ ساعت از بین بردند. Alavinia *et al.* (2018) نیز در مطالعه ی دیگری غلظت‌های ۳/۵ پی پی ام در کمتر از ۱۸۰ دقیقه، ۵ پی پی ام در کمتر از ۹۰ دقیقه و ۸ پی پی ام اسید تانیک در کمتر از ۴۵ دقیقه ۱۰۰ درصد ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* را از بین بردند. در گزارش Buchmann *et al.* (2003) غلظت ۶۲/۵میلی‌گرم در لیتر عصاره آبی سیر کلیه ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* را در ۱۵ساعت از بین برد. در مطالعه Gholipour-Kanani *et al.*(2012) عصاره سیر و بابونه به صورت حمام درمانی در ۵ روز آلودگی *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* در ماهی زینتی مولی باله بادبانی را از بین برد. در مطالعه‌ای Raisi *et al.* (2020) در حمام درمانی بیشترین اثر عصاره‌ها در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر سیر، اسطوخودوس و شمعدانی به ترتیب باعث کاهش ۴۶/۰۱، ۴۱/۰۱ و ۱۶/۸۱ درصد تروفونت *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* در سیاه ماهی ریز فلس پس ۴ ساعت مواجهه شد. در مطالعه Rahmati-Holasoo *et al.* (2021) در غلظت های ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر عصاره اتانولی آویشن شیرازی میانگین طول دوره زمانی از بین رفتن ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* به ترتیب۶/۰۴، ۳۱/۲، ۱۴۴/۲ و ۳۱۱/۶ دقیقه گزارش شد و در غلظت‌های ۱/۲۵ و ۰/۶۲۵ میلی‌گرم در لیتر این عصاره پس از طی ۴ ساعت بیش از ۸۰ درصد ترونت‌ها زنده ماندند. Karimi & Parsa (2021) در دو غلظت ۱۷۷ و۵۷۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره آبی سیر در کنترل *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* در ماهی گلدفیش به ترتیب در ۴۸ و ۹۶ ساعت اثر نمود. Zhang *et al.* (2013) در مطالعه‌ای کنترل *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* در گربه‌ماهی کانالی غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر ترکیب پنتاگالویل گلوکز استخراج شده از گیاه *گالا چاینسیس* در ۵/۶ - ۶/۸ دقیقه و غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر در ۱۳/۱ – ۱۱/۶ دقیقه و غلظت ۲/۵

میلی گرم در لیتر در ۴ ساعت ترونت‌ها را از بین بردند. Valladão *et al.* (2016) اسانس‌های روغنی *ملالوکا آلترنیفولیا*، *لاوندولا آنگوستیفولیا* و *منتا پیپریتا* تروفونت *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* را در غلظت ۵۷ میکرولیتر در لیتر به ترتیب ۸۰ ٪، ۶۶/۳۴ ٪ و۶۸/۵۲ ٪ و در غلظت ۱۱۴میکرولیتر در لیتر، به ترتیب ۹۳/۳۲٪، ۷۳/۲۸٪ و ۸۴/۳۴٪ در ۴ ساعت از بین بردند. حلال‌های مورد استفاده در استخراج گیاهان آب، اتانول، متانول، اتیل‌استات، کلروفرم، اتر و استون است. بنابراین عصاره‌های گیاهی استخراج شده با حلال‌های مختلف اثرات ضدانگلی متفاوتی نشان می‌دهند (Ling *et al.*, 2012; Yi *et al.*, 2012; Ling *et al.*, 2013; Fu *et al.*, 2014b). علاوه براین، اختلاف‌ها در نتایج مطالعات مختلف به شرایط آزمایش، دوز و میزان خلوص عصاره و مدت زمان مجاورت بستگی دارد (Direkbusarakom *et al.*, 2004).

در این تحقیق، ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* زنده دوکی شکل و به سرعت در جهت طولی بدون تغییر در حرکت بودند. ولی ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* در گروه‌های درمانی آبی الکلی آویشن باغی و اسطوخودوس به تدریج توانایی شنا را از دست داده و کروی شدند. این یافته با توصیف Zhang *et al.* (2013) در مورد پنتاگالوئیل‌گلوکز استخراج شده از *گالا چاینسیس* مشابهت داشت. این یافته نشان داد مکانیسم سمیت سلولی عصاره‌ها و سایر داروهای گیاهی در مواجهه با مراحل مختلف چرخه‌ی زندگی *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* یکسان می‌باشد.

## نتیجه‌گیری و پیشنهادها:

نتایج این مطالعه نشان داد غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی الکلی آویشن باغی و اسطوخودوس ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* جدا شده از ماهی قزل آلای رنگین کمان را در شرایط برون‌تنی از بین بردند. با توجه به یافته‌های فوق، استفاده از این عصاره‌های گیاهی در شرایط پرورشی به عنوان جایگزینی برای ترکیبات شیمیائی رایج پس از مطالعات تکمیلی درون تنی و گسترده اثرات عصاره‌ها و اسانس‌های آویشن باغی و اسطوخودوس بر انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* قابل توصیه می‌باشند. زیرا این ترکیبات در غلظت کم اثر مناسبی نشان دادند و از سوی دیگر به دلیل عدم به جا گذاشتن باقی‌مانده در بدن ماهی فاقد آثار زیست محیطی نیز می‌باشند.

غیر قابل استناد

## سپاسگزاری:

بدین وسیله نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه که با تصویب و حمایت مالی از پایان نامه به شماره ۱-۱۴۰۰ امکان انجام مطالعه را فراهم آوردند و نیز همکاران سازمان آرتمیای کشور و اداره کل دامپزشکی استان آذربایجان‌غربی، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

## منابع:

۱- رئیسی، م.، کیهانی، خ و خداکرم، پ. ۱۳۹۹. مقایسه اثر عصاره گیاهان شمعدانی، اسطوخدوس و سیر بر آلودگی طبیعی با *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* در سیاه ماهی ریز فلس (*Capoeta damascina*). *فصلنامه محیط زیست جانوری*. ۱۲(۴) صفحات ۱۲۳-۶.

۲- رحمتی هولاسو، ه.، جوادی موسوی ، م.س.، ابراهیم زاده، ح. میرقاید، ط. ۱۴۰۰. اثر عصاره اتانولی آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) روی مرحله تومونت و تروونت *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس* در ماهی زبرا (*Danio rerio*). *مجله تحقیقات دامپزشکی*. ۷۶ (۲) صفحات ۲۱۴-۲۰۵.

## References

1- Alavinia, S. J., Mirzargar, S. S., Rahmati-Holasoo, H., & 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.

2- Alavinia, S. J., Mirzargar, S. S., Rahmati-Holasoo, H., & 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.

3- Alijanpour, Z., Rahmati-Holasoo, H., Ebrahimzadeh Mousavi, H., Saeed Mirzargar, S., Sharifzadeh, A., & Nasiri, A. (2022). In vitro study of effects of alcoholic extract of *Chelidonium majus L.* on *Ichthyophthirius multifiliis* theronts. *Journal of Fisheries*, 75(3), 405-417.

4- Buchmann, K. (1999). Immune mechanisms in fish skin against monogeneans-a model. *Folia Parasitologica*, 46(1), 1-8.

5- Buchmann, K., Sigh, J., Nielsen, C. V., & Dalgaard, M. (2001). Host responses against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. *Veterinary Parasitology*, 100(1-2), 105-116.

6- Buchmann, K., Jensen, P. B., & Kruse, K. D. (2003). Effects of sodium percarbonate and garlic extract on *Ichthyophthirius multifiliis* theronts and tomocysts: *in vitro* experiments. *North American Journal of Aquaculture*, 65(1), 21-24.

7- Behnam, B., & Aliakbarlou, J. (2014). Antioxidant effects of *Zataria multiflora* and *Mentha longifolia* essential oils on chicken meat stored at 4°C. *Journal of Food Research*, 23(4), 533-543.

8- Cavanagh, H. M. A., & Wilkinson, J. M. (2002). Biological activities of lavender essential oil. *Phytotherapy Research*, 16(4), 301-308.
9- Chu, C., Zhang, Q. Z., & Luo, F. (2010). Effect of twenty Chinese herbal medicines on killing trophonts, cysts and theronts of *Ichthyophthirius multifiliis* in vitro. *Freshwater Fishery*, 40, 55-60.
10- Direkbusarakom, S. (2004). Application of medicinal herbs to aquaculture in Asia. *Journal of Science and Technology* (WJST) 1.1: 7-14.
11- Dickerson, H. W. (2006). *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (phylum Ciliophora). Fish diseases and disorders: Protozoan and metazoan infections, Vol. 1, pp. 116-153.
12- Dickerson, H. W., & Findly, R. C. (2014). Immunity to *Ichthyophthirius infections* in fish: a synopsis. *Developmental & Comparative Immunology*, 43(2), 290-299.
13- Dadman, B., Omidbeygi, R., Sefidkan, F. (2007). Effect of nitrogen on essential oil of *Mexican parsley*. *Journal of Medicinal Plants*, 23(4), 38, 484 – 91.
14- Denner, S.S., 2009. *Lavandula angustifolia* miller: English lavender. *Holistic Nursing Practice* 23(1), 57-64.
15- Ekanem, A. P., Obiekezie, A., Kloas, W., & Knopf, K. (2004). Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitology Research*, 92, 361-366.
16- Fu, Y. W., Zhang, Q. Z., Xu, D. H., Liang, J. H., & Wang, B. (2014a). Antiparasitic effect of cynatratoside-C from *Cynanchum atratum* against *Ichthyophthirius multifiliis* on grass carp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(29), 7183-7189.
17- Fu, Y., Zhang, Q., Xu, D. H., Xia, H., Cai, X., Wang, B., & Liang, J. (2014b). Parasiticidal effects of *Morus alba* root bark extracts against *Ichthyophthirius multifiliis* infecting grass carp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 108(2), 129-136.
18- Fu, Y. W., Wang, B., Zhang, Q. Z., Xu, D. H., Liu, Y. M., Hou, T. L., & Guo, S. Q. (2019). Efficacy and antiparasitic mechanism of 10-gingerol isolated from ginger Zingiber officinale against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp. *Veterinary Parasitology*, 265, 74-84.
19- Fu, Y. W., Guo, S. Q., Luo, J. J., Sang, C. G., Lin, D. J., Liu, Y. M., & Zhang, Q. Z. (2021). Effectiveness assessment of plant mixtures against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp Ctenopharyngodon idella. *Aquaculture*, 530, 735742.
20- Gholipour-Kanani, H., Sahandi, J., & Taheri, A. (2012). Influence of garlic (*Allium sativum*) and Mother worth (*Matricaria chamomilla*) extract on *Ichthyophtirius multifilus* parasite treatment in Sail Fin Molly (*Poecilia latipinna*) ornamental fish. *APCBEE Procedia*, 4, 6-11.
21- Jørgensen, L. (2017). The fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis* host immunology, vaccines and novel treatments. *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 586-595.
22- Karimi, O., & Parsa, A. (2021). Effect of aqueous extract of garlic (*Allium sativum*) in the treatment of *Ichthyophthirius* in goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Animal Environment*, 13(1), 331-336.
23- Leteux, F., & Meyer, F. P. (1972). Mixtures of malachite green and formalin for controlling *Ichthyophthirius* and other protozoan parasites of fish. *The Progressive Fish-Culturist*, 34(1), 21-26.
24- Ling, K. H., Sin, Y. M., & Lam, T. J. (1993). Effect of copper sulphate on ichthyophthiriasis (white spot disease) in goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture*, 118(1-2), 23-35.
25- Ling, F., Wang, J. G., Liu, Q. F., Li, M., Ye, L. T., & Gong, X. N. (2010). Prevention of *Ichthyophthirius multifiliis* infestation in goldfish (*Carassius auratus*) by potassium ferrate (VI) treatment. *Veterinary Parasitology*, 168(3-4), 212-216.

26- 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.
27- Ling, F., Lu, C., Tu, X., Yi, Y., Huang, A., Zhang, Q., Wang, G. (2013). Antiprotozoal screening of traditional medicinal plants: evaluation of crude extract of *Psoralea corylifolia* against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish. *Parasitolgy Research*, 112, 2331–2340.
28- Liang, J. H., Fu, Y. W., Zhang, Q. Z., Xu, D. H., Wang, B., & 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.
29- Liu, Y. M., Zhang, Q. Z., Xu, D. H., Fu, Y. W., Lin, D. J., Zhou, S. Y., & Li, J. P. (2017). Antiparasitic efficacy of curcumin from *Curcuma longa* against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp. *Veterinary Parasitology*, 236, 128-136.
30- Matthews, R. A. (2005). *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet and ichthyophthiriosis in freshwater teleosts. *Advances in Parasitology*, 59, 159-241.
31- Molan, A. L., Liu, Z., & De, S. (2009). Effect of pine bark (*Pious radiata*) extracts on sporulation of coccidian oocysts. *Folia Parasitologica* (Prague), 56(1), 1.
32- Moon, T., Wilkinson, J. M., & Cavanagh, H. M. A. (2006). Antibacterial activity of essential oils, hydrosols and plant extracts from Australian grown *Lavandula* spp. *International Journal of Aromatherapy*, 16(1), 9-14.
33- Nigrelli, R. F., Pokorny, K. S., & Ruggieri, G. D. (1976). Notes on *Ichthyophthirius multifiliis*, a ciliate parasitic on fresh-water fishes, with some remarks on possible physiological races and species. *Transactions of the American Microscopical Society*, 607-613.
34- Noe, J. G., & Dickerson, H. W. (1995). Sustained growth of *Ichthyophthirius multifiliis* at low temperature in the laboratory. *The Journal of Parasitology*, 1022-1024.
35- Picon-Camacho, S. M., Marcos-Lopez, M., Bron, J. E., & Shinn, A. P. (2012). An assessment of the use of drug and non-drug interventions in the treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876, a protozoan parasite of freshwater fish. *Parasitology*, 139(2), 149-190.
36- Prasanth Reddy, V., Ravi Vital, K., Varsha, P. V., & Satyam, S. (2014). Review on *Thymus vulgaris* traditional uses and pharmacological properties. *Medicinal and Aromatic Plants*, 3(164), 2167-0412.
37- Rahmati-Holasoo, Homan, Javadi Mousavi, Mahsassadat, Ebrahimzadeh Mousavi, Mirzargar, S., & Mirquaid, T., 2021. The effect of ethanolic extract of Shirazi thyme (*Zataria multiflora*) on the tomont and tront stage of *Ichthyophthirius multifiliis* in zebra fish (Danio rerio). *Journal of Veterinary Research*, 76(2), 205-214. (In Persian).
38- Raisi, Kihani, Khodakarm, Pir Ali, & Khodadad. (2020). Comparison of the effects of extracts of geranium, lavender and garlic plants on natural infection with *Ichthyophthirius multifiliis* in small-scale black fish (Capoeta damascina). *Animal Environment Quarterly*, 12(4), 307-310. (In Persian).
39- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., & Sasal, P. (2014). Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives. *Aquaculture*, 433, 50-61.
40- Rintamäki-Kinnunen, P., Rahkonen, M., Mannermaa-Keränen, A. L., Suomalainen, L. R., Mykrä, H., & Valtonen, E. T. (2005a). Treatment of ichthyophthiriasis after malachite green. I. Concrete tanks at salmonid farms. *Diseases of Aquatic Organisms*, 64(1), 69-76.

41- Rintamäki-Kinnunen, P., Rahkonen, M., Mykrä, H., & Valtonen, E. T. (2005b). Treatment of ichthyophthiriasis after malachite green. II. Earth ponds at salmonid farms. *Diseases of Aquatic Organisms*, 66(1), 15-20.
42- Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. H., & Khalel, K. I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43, 827-831.
43- Rogers, W. A., & Gaines, J. L. (1975). Lesions of protozoan diseases in fish. *The pathology of Fishes*, 3, 117-150.
44- Rowland, S. J., Mifsud, C., Nixon, M., Read, P., & 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.
45- 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(4), 390-396.
46- Selosse, P. M., & Rowland, S. J. (1990). Use of common salt to treat ichthyophthiriasis in Australian warmwater fishes. *The Progressive Fish-Culturist*, 52(2), 124-127.
47- Shinn, A., Wootten, R., Sommerville, C., & Conway, D. (2001). Putting the squeeze on White Spot. *Trout News*, 20-24.
48- Shinn, A. P., Picón-Camacho, S. M., Bron, J. E., Conway, D., Yoon, G. H., Guo, F. C., & Taylor, N. G. (2012). The anti-protozoal activity of bronopol on the key life-stages of *Ichthyophthirius multifiliis Fouquet*, 1876 (Ciliophora). *Veterinary Parasitology*, 186(3-4), 229-236.
49- Shan, X. F., Kang, Y. H., Bian, Y., Gao, Y. H., Wang, W. L., & Qian, A. D. (2014). Isolation of active compounds from methanol extracts of *Toddalia asiatica* against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish (Carassius auratus). *Veterinary Parasitology*, 199(3-4), 250-254.
50- Song, K., Ling, F., Huang, A., Dong, W., Liu, G., Jiang, C., & Wang, G. (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(2), 58-64.
51- Srivastava, S., Sinha, R., & Roy, D. (2004). Toxicological effects of malachite green. *Aquatic Toxicology*, 66(3), 319-329.
52- Straus, D. L., & Griffin, B. R. (2001). Prevention of an initial infestation of *Ichthyophthirius multifiliis* in channel catfish and blue tilapia by potassium permanganate treatment. *North American Journal of Aquaculture*, 63(1), 11-16.
53- Straus, D. L., & Meinelt, T. (2009). Acute toxicity of peracetic acid (PAA) formulations to *Ichthyophthirius multifiliis* theronts. *Parasitology Research*, 104(5), 1237-1241.
54- Sudová, E., Straus, D. L., Wienke, A., & Meinelt, T. (2010). Evaluation of continuous 4-day exposure to peracetic acid as a treatment for *Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitology Research*, 106(2), 539-542.
55- Swennes, A. G., Noe, J. G., Findly, R. C., & Dickerson, H. W. (2006). Differences in virulence between two serotypes of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 69(2-3), 227-232.
56- Tieman, D. M., & Goodwin, A. E. (2001). Treatments for ich infestations in channel catfish evaluated under static and flow-through water conditions. *North American Journal of Aquaculture*, 63(4), 293-299.
57- Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., Ikefuti, C. V., Da Cruz, C., Levy-Pereira, N., Rodrigues, M. V. N., & Pilarski, F. (2016). Essential oils to control ichthyophthiriasis in pacu, *Piaractus*

*mesopotamicus* (Holmberg): special emphasis on treatment with *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Fish Diseases*, 39(10), 1143-1152.

58- Wahli, T., Schmitt, M., & Meier, W. (1993). Evaluation of alternatives to malachite green oxalate as a therapeutant for ichthyophthiriosis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Applied Ichthyology*, 9(3-4), 237-249.

59- Wang, X., & Dickerson, H. W. (2002). Surface immobilization antigen of the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* elicits protective immunity in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Clinical and Vaccine Immunology*, 9(1), 176-181.

60- Xu, D. H., Pridgeon, J. W., Klesius, P. H., & Shoemaker, C. A. (2012a). Parasitism by protozoan *Ichthyophthirius multifiliis* enhanced invasion of *Aeromonas hydrophila* in tissues of channel catfish. *Veterinary Parasitology*, 184(2-4), 101-107.

61- Xu, D. H., Shoemaker, C. A., & Klesius, P. H. (2012b). *Ichthyophthirius multifiliis* as a potential vector of Edwardsiella ictaluri in channel catfish. FEMS *Microbiology Letters*, 329(2), 160-167.

62- Xu, D. H., Klesius, P. H., & Shoemaker, C. A. (2009). Effect of immunization of channel catfish with inactivated trophonts on serum and cutaneous antibody titers and survival against *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(4), 614-618.

63- Xu, D. H., Zhang, Q. Z., & Zhang, D. (2016). Two in vitro methods for screening potential parasiticides against *Ichthyophthirius multifiliis* using *Tetrahymena thermophila*. *Journal of Fish Diseases*, 39(3), 285-294.

64- 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*). *Parasitolgy Research*, 107, 1035–1042.

65- Yao, J. Y., Zhou, Z. M., Li, X. L., Yin, W. L., Ru, H. S., Pan, X. Y., ... & 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.

66- Yazdani Anaraki, E., Mirzargar, S. S., Rahmati Holasoo, H., Sharifzade, A., & Ebrahimzade Musavi, H. A. (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.

67- Yi, Y.L., Lu, C., Hu, X.G., Ling, F., Wang, G.X. (2012). Antiprotozoal activity of medicinal plants against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitol. Res*. 111, 1771–1778.

68- Zhang, Q., Xu, D. H., & 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.

# Study on effects of plants extracts of *Thymus vulgaris* and *Lavandula angustifolia* on *Ichthyophthirius multifiliis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)


## Abstract:

**Introduction:** *Ichthyophthirius multifiliis* is a ciliated parasite of cold-water fish with global distribution. *Ichthyophthirius multifiliis* infection has caused significant economic losses in the aquaculture industry and ornamental fish. The use of chemical compounds in commercial aquaculture faces some concerns, *e.i* eanti-parasitic resistance, low efficacy, tissue drug residue, environmental pollution and economic losses. Studies on usees of compounds and extracts of herbal drugs in treatment of some internal and external fish parasites infections assigned special ranking due to their high efficiency and low environmental polution. The aim of the present study was to conduct an experimental study on the effect of hydro-alcoholic extracts of thyme (*Thymus vulgaris*) and lavender (*Lavandula angustifolia*) plants on the infective stage of theront of *I. multifiliis* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran.

**Materials and Methods:** Ingredients of hydro-alcoholic extracts of thyme and lavender were analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Hydro-alcoholic extracts of thyme (0.05 mg/µl) and lavender (0.05 mg/µl) were prepared using methanol and Soxhlet apparatus. In this study, concentrations of 40, 20, 10, 5, 2.5, and 1.25 mg/L were prepared from hydro-alcoholic of thyme and lavender plants with three replicates for each concentration. Throphonts of *Ichthyophthirius multifiliis* were isolated from rainbow trout and kept at 23°C overnight to release the theronts. Then, the duration of fetality of the extracts on the theronts was evaluated in seconds at 23°C for 4 hours.

**Results:** GC-MS analyses elucidated that there were 36 (25.75%thymol) and 23 (17.04% lavender) components of hydro-alcoholic extracts of thyme and lavender, respectively. Fetality effect of hydro-alcoholic extracts of thyme and lavender had significant association with different concentrations. *Ichthyophthirius multifiliis* theronts in the hydro-alcoholic treatment groups of garden thyme and lavender gradually lost the ability to swim and became spherical and rotated in the same place until death. The highest effect of the extracts was at 40 mg/L of hydro-alcoholic extract of thyme (82.77 ± 1.71) and lavender (62.77 ± 1.79). The number of theronts were decreased with increasing concentration and exposure time in different concentrations of aqueous alcoholic hydro-alcoholic extracts of *T.vulgaris* and *L. angustifolia*. The fetality effect of hydro-alcoholic extract of *T.vulgaris* was higher than *L. angustifolia*.

**Conclusions:** This study uncovered that different concentrations of hydro-alcoholic extracts of garden thyme and lavender destroyed *I. multifiliis* theronts under laboratory conditions. According to obtained data, these extracts may be helpful as an alternative pathway to apply instead of chemical compounds against *I. multifiliis* due to their appropriate effects and not leaving any medicinal residue in the body of fish and the environment.



**KEY WORDS:** *Thymus vulgaris*, *Lavandula angustifolia*, *Ichthyophthirius multifiliis*, *Theront*, *Oncorhynchus mykiss*