تأثیر عصاره آبی برگ بادام هندی ، دارچین و بلوط بر زنده‌مانی، بار میکروبی و بیماری های مرفولوژیک زالوی طبی ایرانی (Hirudo orientalis)

سعید صفوی پور\*1، فردین شالویی2، سید محمد توکلی اصفهانی3

*دکتری تغذیه دام و طیور و عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان ایران، دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان، ایران*1

 *استادیار شیلات و عضو هیات علمی گروه شیلات دانشگاه شهرکرد، ایران2*

*کارشناس گروه صنعت زالوی ایران، اصفهان، ایران3*

چکیده:

 ***با توجه به توسعه بخش شیلات در کشور، زالودرمانی تاریخ دیرینه در طب سنتی دارد اما پرورش و تکثیر زالو از علوم نوینی است که قدمتی نوپا در کشور دارد، یک دوره پرورش زالو از لارو تا به بازار عرضه گردد باید بیش از 4 مرتبه از خون تغذیه کند، یکی از بیشترین موارد تلفات در مزرعه بعد از هر تغذیه است که زالوهای بسیاری از فرم سالم به شکل دفرمه تبدیل و نرخ مرگ و میر را افزایش می دهد. امـروزه نقـش ایمنی در مدیریت بیماری های زالوی پرورشـی از طریـق افـزایش قـدرت سیستم ایمنی ذاتی زالو انکارناپذیر است که باید تمرکز بر روي کنترل بیماري ها در محیط آبی با استفاده از سیسـتم ایمنـی غشایی و از طریق مصرف خون بهداشتی و استفاده از مواد طبیعی گیاهی به جای استفاده از آنتی بیوتیک های شیمیایی باشد. در این تحقیق از 100 زالوی بیمار دارای بیماری دفرمه و گروه شاهد در غالب 5 تیمار (شاهد، تیمار حاوی 5/1 میلی لیتر عصاره، تیمار حاوی 3 میلی لیتر عصاره، تیمار حاوی 6 میلی لیتر عصاره، تیمار حاوی 9 میلی لیتر عصاره) و 4 تکرار طی 75روز با وزن پایه میانگین 5/2 گرم در یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. مخلوط یکسان عصاره های گیاهی بادام هندی، دارچین و بلوط در محیط آبی نگهداری زالوها روزانه شارژ و هر روز تعویض آب انجام می گردید و وزن گیری و بار میکروبی سطح بدن زالو و بررسی وضعیت زنده‌مانی و دفرمگی زالوها نیز بررسی گردید، نتایج نشان داد که مصرف عصاره گیاهی تغییرات معنی داری را بر روی وزن زالوها در انتهای دوره نشان نداده است، همچنین بیشترین تیماری که واکنش مثبت نسبت به دوز ها داشته است، تیمار 9 میلی لیتر مصرف کننده عصاره گیاهی است که کمترین میزان بار میکروبی را نشان داده است و با افزایش دوز مصرف عصاره گیاهی میزان واکنش به بیماری بیشتر شده و تلفات کاهش داشته است و زنده‌مانی زالوها افزایش داشته است، همچنین در خصوص پارامتر مرفولوژیکی زالو نتایج نشان داد که غلظت مصرفی 6 و 9 میلی‌لیتر بیشترین تأثیر را در بازگردانی دفرمگی زالوها و بهبود شرایط بدنی و تبدیل آنها به زالوی سالم و صاف داشته است. در کل نتایج نشان داد که مصرف مخلوط عصاره های گیاهی برگ بادام هدف، دارچین و بلوط حاوی فنول و تانن ها که خاصیت آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی دارند، می‌توانند در چرخه زندگی زالوها بدون ایجاد عوارض جانبی شرایط ایمنی و فیزیکیشان را بهبود و سلامتشان را تضمین کنند.***

**کلمات کلیدی :***زالوی طبی، پرورش و تکثیر، گیاهان دارویی، بیماری مرفولوژیک*

مقدمه:

 درصد بالای نرخ مرگ و میر زالوهای طبی در مراکز پرورش و تکثیر باعث هدررفت منابع مالی زیادی در صنعت زالو در کشور می‌شود (Chahardehi et al., 2016). با توجه به اینکه آنتي بيوتيك ها داروهاي ارزشمندي براي درمان بسياري از بیماری‌های انساني و دامی می‌باشند، با اين حال استفاده بيش از حد از اين داروها و وجود مکانیسم‌های پيچيده و هوشمند ايجاد کننده مقاومت در باکتری‌ها سبب شده است که مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتي بيوتيک ها، از جمله معضلاتي که در طي دهه‌های اخير همواره گريبانگير سیستم‌های پزشکي و درماني باشد. اين مسئله باعث می‌شود تا بشر به فکر جايگزين کردن عوامل ضد ميکروبي مؤثر و با عوارض جانبي کمتر به جاي مواد ضد ميکروبي با اثر کمتر و عوارض ناخواسته بيشتر باشد. تركيب بسياري از عصاره‌های گياهي قادر به از بين بردن انواع تركيبات فعال اكسيژن دار و به موجب آن می‌توانند به طور مستقيم از اثرات تنش اكسايشي بكاهند. اين تركيبات همچنين می‌توانند به طور غيرمستقيم و از طريق فعال نمودن سيستم دفاع آنتي اكسيداني نقش حفاظتي خود را اعمال نمايند (پورهاشمی و پناهی، 1391).

تحقیقات نشان داده است که عصاره گیاهان دارویی مانند دارچیین و برگ بادام هندی یا میوه بلوط خاصیت ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی می‌باشند. ترکیبات گیاهان فوق معمولاً شامل: عصاره غنی از آزولن ها و دیگر ترکیبات فارنزول، لینالول، آلفا هومولن، کاریوفیلن، ترپینیول، آلفا مورولن و کادینن است. همچنین حاوی مقدار کمی از آلفا توجون است، اسید فرمیک، اسید والرینیک، اسید سالیسیک و استوکسی بنزآلدیید از دیگر ترکیبات است فلاونویید ها و ترکیبات فنلی مانند: آپی ژنین، لوتیولین گلوکوزید، کاسموزین، ویتکسین، ایزو ویتکسین وجود دارد. اسید آمینه و الکالوییدهایی مانند: استاشیدرین، تریگونلین و بتونیسین وجود دارد و همچنین کومارین، استرول‌های گیاهی مثل تانن ها نیز جزو اصلی آن به حساب می‌آیند که وجود دارند (Sweeney et al., 2001). اصطلاح تانن برای اولین بار در سال 1796 توسط سیگوین در تشریح مواد استخراج شده از بعضی از گیاهان كه می‌توانستند در روند تبدیل پوست حیوانات به چرم نقش بسزایی داشته باشند. به كار گرفته شد. تانن ها كه به اسم‌های دیگری چون اسید تانیك، گالوتانن و اسیدگالوتانیك نیز شناخته شده‌اند، تركیبات پیچیده طبیعی هستند كه از مواد شیمیایی پلی فنلی تشكیل شده‌اند و در پوست، برگ و ریشة اكثر گیاهان از جمله چای، دارچین و خصوصاً برگ بادام هندی به وفور یافت می‌شود. این مواد با وزن مولكولی بالا و دارای تعداد قابل ملاحظه‌ای گروه هیدروكسیل فنلیك هستند كه امكان تشكیل ارتباطات تقاطعی بین پروتئین و سایر ماكرومولكول ها را میسر می‌سازد. این مواد همچنین شامل گروهی از فنل های غیرپروتئینی سمی هستند كه گاهی خاصیت قابض بودن دارند (Hagerman et al., 1998).

تانن‌ها از دو گروه تانن‌های قابل هیدرولیز و تانن های متراکم تشکیل شده‌‌اند، تانن‌های قابل هیدورلیز در چوب، برگ‌ها، میوه‌ها و پوست گیاهان یافت می‌شوند. این ترکیبات دارای هسته مرکزی می‌باشند که مرکز تشکیل ساختار آنها تانن‌ها می‌باشند. این ترکیب متعلق به دسته‌ای از مواد به نام گالوتانن ها است. گالوتانن از یک پلی آلال مرکزی همانند گلوکز و چندین واحد اسید گالیک تشکیل شده‌اند که در بادام هندی و و بلوط این خواص نمایانگر تر هستند (Dobre et al., 2011).

تحقیقات نشان داده است که ایمنی زالوها اکثراً وابسته به نوع باکتری همزیست آنها دارد (ملک و خدادوست،1394)، زالوها خون را به سرعت هضم نمی‌کنند و مقدار کمی از آنزیمهای هضمی را خودشان تولید می‌کنند اما در عوض بر آنزیمهای تولید شده توسط فلور میکروبی هم سفرگان داخلی تکیه می کنند. زالوها دارای باکتریهایی در روده هستند که آنزیم های خاصی را تولید می‌کنند. باکتری‌های هم سفره که گونه‌های خاصی دارند آنزیمهای هضمی تخصصی تولید می‌کنند. زالوهای خون خوار مانند هیرودومدیسینالیس (*Hirudo medicinalis*) یک گونه باکتری به نام آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila)* را در روده‌ی خود دارد که دو وظیفه‌ی مهم آن عبارتند از: این باکتری یک ماده آنتی بیوتیک ترشح می‌کند که از رشد سایرباکتریها ممانعت کرده و به دنبال آن تجزیه خون را که به مدت طولانی در سیستم گوارشی آنها باقی می‌ماند به تعویق می‌اندازد و دیگری اینکه این باکتری واجد مواد آنزیمی است که نقش مهمی در هضم و جذب مواد غذایی زالو ایفا می‌کنند (Ceylan et al., 2023). به نظر می‌رسد بخشی از نیاز ویتامینی زالوها به کمک باکتریهای روده‌ی آنها تأمین می‌شود که مصداق دقیقی از رابطه‌ی همسفرگی داخلی است. در زمان تغذیه زالوهای طبی چینه دان آنها را با خون پر می‌کنند. چینه دان زالوها، بزرگ تر و وسیع تر از روده است و محلی است که عمل هضم انجام می گردد. خون می‌تواند در چینه دان زالوها به مدت طولانی باقی مانده و به آرامی و به کمک آنزیم باکتریایی تجزیه شود. آنتی بیوتیک های طبیعی چینه دان مانع از فساد و همولیزخون به وسیله میکروارگانیسم‌های خارجی می‌شوند تا باکتریهای هم سفره ی زالو بتوانند خون را تجزیه کنند همین عمل باعث می شود که زالوها حتی تا یک سال نیاز به غذا در طبیعت نداشته باشند و از ذخایر چینه دان های خود برای برطرف کردن نیاز نگهداری بدن خون استفاده می‌کنند (صفوی پور و همکاران، 1397).

امـروزه نقـش ایمنی در مدیریت بیماری‌های زالو پرورشـی از طریـق افـزایش قـدرت سیستم ایمنی ذاتی زالو انکارناپذیر است که باید تمرکز بر روي کنترل بیماريها با استفاده از سیسـتم ایمنـی زالو و از طریق مواد مؤثر باشد (Chery. , 2015). در این امر رابطه ثابتی بین عامل بیماريزا در جهت حمله و میزبـان در جهت دفع این حمله وجود دارد میباشـد. صنعت زالو در کشور به دلیل نوپا بودن نیاز به شناخت عظیمی از بیماری‌های این موجود و شناسایی آنها به پرورش دهندگان دارد. همواره عـدم وجـود تعـادل بـین میزبـان، عامل بیماريزا و محیط شرایط لازم را براي تهـاجم عامـل بیمـاري فراهم می‌کند و در نهایت سبب برانگیختن پاسخ ایمنی می‌شود. پرورش زالوی طبی در ایران معمولاً به صورت سنتی و در محیط‌های باز و نیمه باز صورت می‌گیرد (Malek et al., 2019).

به دلیل طولانی بودن طول دوره پرورش زالوهای طبی (6 تا 8 ماه) و طول دوره تکثیر (10 الی 12 ماه)، بازدهی تولید پایین بوده و با استفاده از این روش، تولید در سطح انبوه از توجیه اقتصادی مناسبی برخوردار نیست. امروزه روش پرورش، اعمال مدیریت بر میزان، زمان تولید و همچنین تعداد دفعات تغذیه و طول دوره رشد و تولیدمثل از سطح قابل قبولی برخوردار نخواهد بود. وجود تلفات زیادی در مزارع پرورش و تکثیر زالو به یک معضل بزرگ برای تولید کنندگان و پرورش دهندگان تبدیل شده است که ناشی از مدیریت نامناسب و تغذیه غلط و عدم استفاده از یک خون بهداشتی و استریل و کمبود دانش فنی در این زمینه می‌باشد (Ceylan et al., 2015)، که هدف و نوآوری ما هم در این موضوع، حل همین مسئله است، بررسی بالینی اثرات این گیاهان دارویی بر زنده مانی، بار میکروبی سطحی بدن زالو و بیماری ناهنجاریهای مرفولوژیکی زالوها برای اولین بار در سطح کشور می باشد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در پاییز و زمستان 1402 در آزمایشگاه گروه شیلات دانشگاه شهرکرد به مدت 75 روز انجام شد. در این آزمایش با 100 قطعه زالوی طبی بیمار (بیماری دفرمگی) با وزن تقریبی 5/2 گرم (سایز 7 الی 10سانتیمتر) در قالب طرح کاملاً تصادفي با 5 تیمار، 4 تکرار و 5 قطعه زالوی طبی در هر تکرار انجام گرفت، زالوها از مجموعه دانش بنيان صنعت زالوی ایران واقع در پارک علم و فناوری شهرکرد خريداري شد. قبل از شروع آزمايش محوطه سالن كاملاً تميز وکف جایگاه سیمانی تسطیح شده است كه تمامي سطل های نگهداری از نظر تهويه و نور در شرايط يكساني قرار گرفتند و همچنین سیستم خنک کننده نیز بصورت (فن) وجود داشت. تانک آب مورد استفاده در تمام طول دوره شرایط یکسانی داشت و مشخصات فیزیکوشیمایی آب (از قبیل آمونیاک و سختی آب و کلر) روزانه چک و بررسی می‌شد.

## شرایط و نحوه­ی نگهداری از زالوها در شرایط ازمایشگاهی

شرايط استانداردي که زالوها بايد در آن قرار بگيرند شامل شرايط دمايي و آبي ویژه ای است. طول زمان از آخرین تغذیه و نگهداری زالوها 20 روز گذشته که زالو­ها در دمای 25 درجه سانتی گراد نگهداري شده اند. در پت­هاي پلاستيکي به حجم 500 میلی‌لیتر تعداد 5 زالوي طبی قرار داده شد و به منظور اينکه زالوها فرار نکنند درب سطل ها (پت ها) با استفاده از تور و کش بسته شد تا جريان هوا نيز برقرار باشد. تعويض آب بعد از مصرف مکمل عصاره‌های گیاهی هر روز در ساعت مشخص با چک کردن و سورت بندی روزانه و جدا کردن تلفات و زالوهای سالم از زالوهای بیمار انجام گرفت و در نهایت دوز مصرفی در هر تیمار و تکرار تزریق شد و کلیه مشاهدات عینی ثبت گردید.

عصاره گیری گیاهی و بررسی‌های آن در شرایط ***INVITRO***

تهیه این عصاره گیاهی با نام تجاری «کاتالیچ» از شرکت زیست دانه ایرانیان مستقر در مرکز رشد پارک علم و فناوری شهرکرد با حجم 10 لیتر برای این آزمایش تهیه شد. روش کار تهیه این عصاره به نقل از منبع مذکور به شرح زیر است:

گیاهانی به ترتیب برگ بادام هندی، میوه ی بلوط، پوست درخت دارچین جمع آوری و شناسایی شده و عصاره گیری از هر کدام توسط روش هریکیریشنان (Harikrishnan et al., 2009) انجام شد. در این روش از هر گیاه صد گرم پودر شده برای عصاره گیری با اتانول 70 درصد و آب مقطر استفاده شد. جداسازی حلال با استفاده از روتاری تبخیرکننده انجام و عصاره باقیمانده در 80- درجه سانتیگراد تا زمان استفاده نگهداری شدند، سپس به میزان لازم رقیق سازی با آب مقطر انجام گرفت، در ادامه با استفاده از روش چاهک (*(Method well*که توسط (Magiorakos et al., 2012) ارائه شد، ابتدا میزان 60 میکرولیتر از هریک از عصاره‌ها به گوده‌های میلیمتری ایجاد شده در روی محیط کشت بلاد آگار اضافه و محیط‌ها در دمای 30 تا 37 درجه به مدت 24 ساعت نگهداری و سپس میزان قطر هاله ایجاد شده (عدم رشد) باخط کش درحد میلیمتر اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که عصاره آبی مصرفی توانسته است فعالیت ضد باکتریایی داشته باشد و انتخاب آنها در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفت و طی نسبت های یکسان با یکدیگر مخلوط شدند که این مخلوط آبی «کاتالیچ» نام دارد.

تیمارهای آزمایشی

A: گروه کنترل زالوی بیمار بدون استفاده از مخلوط عصاره گیاهی (کاتالیچ) (شاهد)

B: گروه با افزودن مخلوط عصاره گیاهی (کاتالیچ) به آب ظرف به میزان 5/1 میلی‌لیتر روزانه

C: گروه با افزودن مخلوط عصاره گیاهی (کاتالیچ) به آب ظرف به میزان 3 میلی‌لیتر روزانه

D: گروه با افزودن مخلوط عصاره گیاهی (کاتالیچ) به آب ظرف به میزان 6 میلی‌لیتر روزانه

E: گروه با افزودن مخلوط عصاره گیاهی (کاتالیچ) به آب ظرف به میزان 9 میلی‌لیتر روزانه

 در طول این آزمایش تغذیه زالوها صورت نگرفت. در این آزمایش وزن زالوهای هر تکرار به صورت گروهی پس از اعمال 4 ساعت از بدو ورود به سطل ها و در سه مرحله تعیین و گزارش نویسی انجام شد. در بدو ورود زالوها به مزرعه یک آزمایش کشت باکتریایی از سطح مقطع زالوها (پوست) آن‌ها انجام و گزارشات آن ثبت شد و همچنین برنامه نوردهي سالن بصورت متناوب با 10 ساعت روشنايي و 14 ساعت تاريکي بود.

شاخص‌های مورد اندازه گیری

بررسی حیات و وضعیت مرفولوژیکی زالوها

در هنگام ورود زالوها به سالن تمامی آنها وزن کشی شده و تعداد 5 عدد در هر پت با شرایط قرنطینه‌ای و میانگین وزن یکسان قرار داده شد. دمای سالن در بدو ورود زالوها روی 18 درجه تنظیم گردید و پس از 24 ساعت دما روزانه افزایش و به دمای اتاق (25 درجه) رسید. زالوی بیمار در این طرح زالویی می‌باشد که به بیماری دفرمگی یا تغییر شکل ظاهری زالو دچار است و در بازار مصرف به آن بیماری سوسیسی نیز می گویند. جهت ارزیابی زنده­مانی زالوها، هر روزه همه‌ی تکرارهای آزمایشی مورد بازرسی و به محض مشاهده تلفات، لاشه زالوهای تلف شده جمع آوری و ثبت گردید. یکی از پارامترهای مهم بازار فروش زالوها علاوه بر گیرایی آنها خصوصیات مرفولوژیکی زالوی زنده است که باید عاری از نقص باشد، برای این کار هر روزه خصوصیات مرفولوژیک زالوها (شکل ظاهری آنها که بایستی سالم و صاف و بدون تورفتگی و تغییر شکل باشد) مورد بررسی قرار می‌گیرد (صفوی پور و همکاران،1397) و به محض مشاهده بهبودی در زالوهای طرح آن زالو سریعاً جدا می‌گردد و به ظرف قرنطینه بیست روزی منتقل خواهد شد. در نهایت زنده­مانی و دفرمگی آن ها بر اساس درصد بیان شد.

بررسی توزیع بار میکروبی زالوها

در ابتدا جهت بررسی توزیع بار میکروبی و کشت نوع باکتری‌ها موجود در سطح پوست زالوهای بیمار، چند نمونه از آنها به آزمایشگاه معتمد سازمان دامپزشکی استان اصفهان (آرین دام) ارسال شد. که نتایج نشان داد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) و پروتئوس اس پی پی (*Proteus s.p.p*) و ای کلای (*Escherichia coli*) در تمام نمونه ها مشترک است. سپس جهت بررسی توزیع بار میکروبی در طول دوره از روش توتال کانت (*Total Count*) یا شمارش کلونی که سال 1381 توسط موسسه استاندارد و تحقیقات ایران ارائه شد، استفاده شده است. در این روش برای آماده سازی نمونه از سطح بدن زالو سوآپ تهیه می شود و سپس رقیق و آماده کشت شدند. در ادامه نمونه بر روی محیط کشت مناسب پخش یا تلقیح شد. در ادامه انکوباسیون پلیت‌های کشت در شرایط دمایی و زمانی مناسب انجام گرفت تا میکروارگانیسم‌ها رشد کنند و کلونی تشکیل دهند. سپس از انکوباسیون، کلونی‌های قابل مشاهده روی پلیت‌ها با چشم غیرمسلح یا ابزارهای شمارش کلونی شمارش شدند و نتایج آن گزارش گردید. این بررسی در طی آزمایش در سه مرحله انجام و نتایج آن گزارش گردید.

3-5- تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آنالیز آماری داده‌ها به صورت طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم افزاری آماری SAS9.2انجام و با استفاده از مقدار pvalue، انجام و سطح معنی داری 5 درصد در نظر گرفته شد.

نتایج :

نتایج نشان داد بررسی تغییرات وزنی زالوها در مدت انجام آزمایش در جدول (1) آمده است، تغییرات وزن زالو در 75روز نشان داد که با گذشت زمان سرعت هضم غذا در زالوهای بیمار با شیب ملایم انجام می‌شود و زالوها خیلی کند وزن خود را از دست می‌دهند و تغییرات معنی داری در پایان دوره در خصوص کاهش وزن زالوها مشاهده نگردید. در کل تغییرات وزن نشان می‌دهد با گذشت زمان دستگاه گوارش زالوها خون داخل چینه دان ها را مصرف کرده و وزن خود را تقریباً به یک سوم وزن روز اول آزمایش رسانده‌اند و مصرف عصاره گیاهی تغییرات معنی داری را بر روی وزن زالوها در انتهای دوره ثبت نکرده است. اما بیشترین گروه وزنی زالوها در گروه شاهد مشاهده شده است که با تیمار مصرف کننده 9 میلی‌لیتر عصاره تغییرات معنی داری داشته است (05/0P<).

جدول 1 : بررسی تغییرات وزن بدن زالوها در طول دوره (گرم)

|  |  |
| --- | --- |
| تیمار | صفت وزن بدن زالو |
| روز اول | روز 40 | روز 75 |
| شاهد | 25/0±ab905/2 | 13/0± 638/1 |  07622/0±0273/1 |
| عصاره گیاهی 5/1 میلی‌لیتر | 25/0±b81/2 | 13/0± 380/1 | 07622/0±0235/1 |
| عصاره گیاهی 3 میلی‌لیتر | 25/0±ab99/2 | 13/0± 742/1 | 07622/0±0236/1 |
| عصاره گیاهی 6 میلی‌لیتر | 25/0±b78/2 | 13/0± 208/1 | 07622/0±0227/1 |
| عصاره گیاهی 9 میلی‌لیتر | 25/0±c14/2 | 13/0± 682/1 | 07622/0±02051/1 |

a-c: در هر ستون میانگین­های دارای حروف متفاوت اختلاف معنی­داری در سطح 5 درصد از یکدیگر دارند (05/0>P).

در ادامه نتایج نشان داد زنده‌مانی و وضعیت ظاهری زالوها مطابق با جدول (2) می‌باشد که نشانگر این است که گروه شاهد و گروه مصرف کننده 9 میلی‌لیتر عصاره گیاهی به ترتیب کمترین و بیشترین وضعیت زنده‌مانی را در طی آزمایش از خود نشان داده‌اند. گزارشات بیان نمودند که با افزایش دوز مصرف عصاره گیاهی میزان واکنش به بیماری بیشتر شده و تلفات کاهش داشته است و زنده‌مانی زالوها افزایش داشته است، همچنین در خصوص پارامتر مرفولوژیکی زالو نتایج نشان داد که غلظت مصرفی 6 و 9 میلی‌لیتر بیشترین تأثیر را در بازگردانی دفرمگی زالوها و بهبود شرایط بدنی و تبدیل آنها به زالوی صاف داشته است تا بتواند به دوره قرنطینه ورود نماید. همچنین گروه شاهد نیز که هیچ گونه عصاره گیاهی دریافت نکرده بود دارای بدترین حالت دفرمگی و بیشترین تغییرات مرفولوژیکی و تشدید بیماری زالوها بوده است به طوری که اکثراً آنها نتایج نشان داده به تلفات رسیده و حذف شدند.

**جدول(2): بررسی تغییرات مرفولوژی و زنده‌مانی زالوها در طی دوره آزمایش**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | گروه‌های آزمایشی |  |  |  |  |
| عصاره 9% | عصاره 6% | عصاره 3 % |  عصاره 5/1% | شاهد | پارامتر |  |
| 79 | 54 | 41 | 38 | 27 | %زنده% مرده | روز 75 |
| 21 | 46 | 59 | 62 | 73 |
| 86\*  | 70  | 51 | 63 | 41 | % مورفولوژی طبیعی% مورفولوژی غیر طبیعی |  |
| 14 | 30 | 49 | 37 | 59 |   |

اعداد زنده مانی، تلفات و بیان مرفولوژیکی ها در هر تیمار در جدول فوق بر اساس درصد بیان شده است



شکل 1: تصویر سمت راست زالوهای بیمار با ظاهر بیمار و تصویر سمت چپ زالوهای سالم شده آخر دوره

در ادامه در روز 75 آزمايش، يک زالو در هر تکرار انتخاب و نمونه گیری انجام شد، برای جداسازی و شمارش فلور میکروبی پوست زالو، نمونه در هر بخش در شرايط کاملاً استريل انجام شد. برای لاكتوباسیلها از آگار MRS و برای باکتری‌های گرم منفی از محیط کشت EMB استفاده شد. محیط کشت‌های آگارهای مرتبط با باکتری‌های بی هوازی و لاكتوباسیل ها در انکوباتور بی هوازی CO2 دار (حاوی 5 درصد) و بقیه آگارها در انکوباتور هوازی قرار داده شدند. دمای انکوباسیون برای تمام محیط كشتها C 32° تنظیم شد. شمارش باكتريايی به عنوان واحدهای تشکیل دهنده كلنی در هر گرم(بر اساس لگاریتم بر مبنای 10) نمونه بیان شد. نتایج بار میکروبی زالوها در جدول (3) نتایج نشان می دهد میزان میکروارگانسیم ها در روز اول آزمایش متفاوت بوده است و میزان باکتری موجود در سطح بدن زالوهای بیمار تیمار 9 میلی‌لیتر نسبت به سایر تیمارها بیشتر بوده و بیشترین میزان جمعیت میکروبی تفاوت معنی داری در روز اول آزمایش با سایر تیمارها داشته است (05/0P<). در دوره دوم بررسی بار میکروبی (روز 40 آزمایش) تیمار 5/1 میلی‌لیتر مصرف کننده عصاره گیاهی توانسته است کمترین میزان بار میکروبی را از خود نشان دهد ولی هیچ گونه تفاوت معنی داری بین سایر تیمارها وجود ندارد. در روز آخر دوره (روز 75) نیز نتایج نشان داد که بیشترین تیماری که واکنش مثبت نسبت به دوز مصرفی عصاره گیاهی داشته است، تیمار 9 میلی‌لیتر مصرف کننده عصاره گیاهی است که کمترین میزان بار میکروبی را ثبت کرده است اما نسبت به سایر تیمارها هیچ گونه تغییرات معنی داری نداشته است.

جدول 3 : بررسی جمیت میکروبی سطح پوست زالوها در طی دوره آزمایش

|  |  |
| --- | --- |
| تیمار | صفت بار میکروبی |
| روز اول | روز 40 | روز 75 |
| شاهد | 18/0±bc84/0 | 17/0± 79/0 | 12/0± 48/0 |
| عصاره گیاهی 5/1 میلی‌لیتر | 18/0±b54/0 | 17/0± 47/0 | 12/0± 44/0 |
| عصاره گیاهی 3 میلی‌لیتر | 18/0±bc78/0 | 17/0± 58/0 | 12/0± 53/0 |
| عصاره گیاهی 6 میلی‌لیتر | 18/0±bc79/0 | 17/0± 52/0 | 12/0± 48/0 |
| عصاره گیاهی 9 میلی‌لیتر | 18/0±a59/1 | 17/0± 64/0 | 12/0± 43/0 |

a-c: در هر ستون میانگین­های دارای حروف متفاوت اختلاف معنی­داری در سطح 5 درصد از یکدیگر دارند (05/0>P).

بحث

یکی از رایج ترین مشکلات در تولید و پرورش زالو مشکل تغییر شکل مورفولوژیکی است که به عنوان بیماری سوسیسی شکل در بازار نیز توصیف می‌شود. متاسفانه ممکن است برخی از تولیدکنندگان به دلیل این مشکل تمام زالوهای خود را از دست بدهند. مهم ترین بازتاب این مشکل از دست دادن روحیه و انگیزه و آسیب بزرگ به کار است. گزارشات نشان داده است که روده میانی زالو فاقد آنزیم‌های مانند کربوهیدرازها، لیپازها و پروتئازها و به ویژه اندوپپتیدازها می باشد. گرچه در گونه‌های همه چیز خوار ممکن است برخی آنزیم‌های فوق به میزانی جزئی حضور داشته باشند ولی وجود آنزیم اگزوپپتیداز در اغلب گونه‌های مطالعه شده اثبات شده است. بدیهی است که کمبود برخی از آنزیمهای فوق که حضورشان برای گوارش غذا ضروری است به وسیله میکروفلور هم سفره‌ی داخلی تأمین می‌شود(Petrauskiene., 2004). نتایج تحقیقات سایرین اثبات کرده‌اند که باکتری آئروموناس هیدروفیلا قادر به تولید پروتئازها، لیپازها و آمیلاز ها می‌باشد. مهم‌ترین آنها سینتاز می‌باشد که در تخریب گویچه‌های سرخ موجود در غذای خورده شده نقش مهمی دارد. همولیزین پروتئازی است که به تجزیه هموگلوبین کمک می‌کند. مقدار بسیار کمی از خون هضم نشده در روده باقی می‌ماند که از طریق مخرج دفع می‌شود (Ceylan et al., 2020). بنابراین نوع تغذیه یا کیفیت آبی که در آن زالو شنا می کند، می‌تواند حامل باکتری‌های خاصی باشد که فلور میکروبی مفید زالو را تغییر دهد و بیماری ایجاد کند و با تشکیل کلنی موجب مرگ دسته جمعی زالوها خواهد شد، حال می‌توان تببین کرد استفاده از عصاره گیاهان دارویی در آب محیط زیست زالوها طی مکانیسم‌های چقدر می‌تواند تأثیر گذار بر سلامتی آنها باشد.

تحقیقات نشان داده است که مکانیسم جذب املاح آب یا مواد داخل آب برای زالوها را می توان این طور نیز بیان نمود که در زالوها سه نوع ابزار حسی وجود دارد: فیبر عصبی با انتهای آزاد در اپیدرم،سلول‌های حسی اپیدرمال و سلول‌های حسی حساس به نور فیبرهای عصبی با پایانه آزاد هستند. پایانه عصبی منشأ گرفته از عصب اصلی هستند که در اغلب موارد شامل حلقه‌های عصبی درون عضله‌ای یا زیر اپیدرمی هستند که نقش مهمی در جذب پوستی خواهند داشت. این مکانیسم کنترل پمپ کردن مواد در زالوی هیرودواورینتالیس از هر گانگلیون بخشی دو عصب به هر طرف حرکت می‌کنند و شاخه‌هایی به دیوارهای سینوس جانبی می‌فرستند (Manav et al., 2019). اعصاب بخش قدامی سرعت پمپ کردن تسریع می‌کنند درصورتی‌که اعصاب پشتی باعث تأخیرمی‌شوند. بعد از این که همه اعصاب شوند انقباضات برای مدت طولانی ادامه می‌یابند، نشان می‌دهد که محرک انقباض در ماهیچه‌های دیواره‌های سینوس منشأمی‌گیرد. چنین مکانیسمی میوژنیک نامیده می‌شودکه برای تشخیص آن از حالتی که در محرک منشأ گرفته از سیستم عصبی وجود دارد، نروژنیک نامیده می‌شود. سازمان‌بندی موجود در زالو را می‌توان با سازمان‌بندی موجود در قلب پستانداران مقایسه کرد (Baranzini et al., 2020) ، جایی که ضربان میوجنیک است و توسط فیبرهای سیمپاتیک ثانویه شدت می‌یابد اما توسط شاخه‌ای از عصب واگ به تأخیر می‌افتد. بنابراین می توان نتیجه گرفت استفاده از عصاره‌ها توانسته بر سیستم عصبی و ماهیچه ای زالوها موثر واقع شود و با انقباضات متعدد خود دفرمگی را از بین ببرد و مشکل بیماری تغییرات مورفولوژیک آن‌ها را بهبود دهد.

روغن‌های اسانسی یا اسانس‌ها مواد فرار عمدتاً مستخرج از گیاهان دارویی هستند که غالباً با استفاده از تقطیر با بخار آب و یا هیدرولیز آنزیمی و سپس تقطیر با بخار آب حاصل می‌شوند. آن‌ها دامنه گسترده‌ای از ترکیبات همچون ترپنوئیدها، الکل‌ها، آلدهیدها و استرهای غیرحلقوی را در خود جای می‌دهند (خوب،1391). در واقع، این اجزای فعال هستند که خواص متعدد اسانس‌ها شامل فعالیت‌های ضدقارچی مضاف همینطور اسانس‌ها در پیوند با اثرات ضدمیکروبی، ضداکسیدانی و ضدالتهابی خود پتانسیل بالایی برای تنظیم ایمنی دارند (Abd El-Hacket al., 2016) و اثرات آنها در تقویت پاسخ‌های ایمنی پرنده‌های گوشتی و آبزیان وجود داشته است (Abdelrazek et al., 2015). این تنوع در سنجش اثرات ضدباکتریایی و ضداکسیدانی اسانس‌ها در شرایط برون‌تنی نیز به خوبی انعکاس پیدا کرده است. آنالیز تقریبی میوه‌ی بلوط نشان می‌دهد که، ترکیب شیمیایی بلوط مشابه غلات است. میوه‌ی بلوط به علت داشتن مقادیر بالایی کربوهیدرات که به طور عمده نشاسته می‌باشد (80 تا 90 درصد مواد قندي آن)، داراي انرژي بالایی است. میوه‌ی بلوط حاوي مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنولی و تانن می‌باشد که این ترکیبات از ترکیبات ضد تغذیه اي گیاهان براي حیوانات هستند. میوه‌ی بلوط حاوي 91 درصد ماده‌ی خشک، 75/4 درصد پروتئین و 5 درصد چربی می‌باشد، همچنین دانه ي بلوط حاوي 8/8 درصد تانن بوده که 57 درصد آن قابل هیدرولیز بوده و اصلی ترین ماده‌ی تاننی آن اسید تانیک است (خوب،1391). تانن ها به دلیل اثراتی که روي میکروارگانیسم و تعداد پروتوزوآها دارند، باعث تغییر در بیوهیدروژناسیون دستگاه گوارش می‌شود. این اثرات مثبت می‌توان اینجور استناباط نمود که تانن ها با حفظ پروتئین‌های خوراک زالو از تجزیه شدن در چینه دان و عبور دادن آنها به انتهای دستگاه گوارش سبب افزایش جریان اسیدهاي آمینه ضروري به روده و افزایش جذب این اسیدآمینه‌ها شده که نتیجه‌ی آن تولید پروتئین بیشتر و افزایش رشد بدن زالو در دوره پرورش است که باعث بهبود در عملکرد زالو می‌شوند (Dhifi et al., 2016). دانشمندان رفتار رشد تعداد مشخصی از جدایه های باکتری های استرپتوکوکوس اینیایی(*Streptococcus iniae*) و لاکتوکوکوس گارویه(*Lactococcus garvieae*)، در غلظتهای 80 ،10 ،20، 260 و 980 میکرولیتر بر میلی لیتر، از اسانسهای اوکالیپتوس کامالدولنسیس(*Eucalyptus camaldulensis*) ، پونه معطر(*Mentha pulegium*) و آلوئه‌ورا (*Aloe vera)* و غلظتهای 02/0 ،28/0 ،2/0 2 و 8 میلی گرم بر میلی لیتر از داروی کلرآمین T در دمای 82 درجه سانتیگراد و نیز حداقل غلظت مهارکنندگی آنها مشخص کردند که نتایج نشان داد اثر ضدباکتریایی 8 گونه گیاه بومی ایران را علیه باکتری های پاتوژن وجود دارد (El-Baroty et al., 2010).

تاکنون طرح آزمایشی بر روی بیماری مرفولوژیک زالوی ایرانی در کشور انجام نشده است ولی در کل نتایج نشان می‌دهد با افزایش دوز مصرف عصاره گیاهی (غلظت 9 میلی‌لیتر) توانسته است عملکرد بهتری بر زالوها نسبت به سایر گروهای آزمایشی داشته باشد. همچنین مواد مؤثره موجود در عصاره گیاهی با قدرت ِمهار باکتری‌ها، جلوگیری از التهاب، بازسازی بافت و غشای مخاطی شناخته شده‌اند که باعث انعطاف پذیری بیشتر می‌شود. همچنین باعث تقویت تمایلاتِ (تولید مثل، تغذیه، فعالیت‌های جسمانی و...) زالوها می‌شود و آنها را در مقابل عفونت‌های میکروبی مقاوم می‌سازد و در صورت وجود عفونت‌های باکتریایی یا قارچی، تاثیرات بسیار مثبتی در سیستم ایمنی آنها دارد که حتی قادرند به فلزات سنگین موجود در آب متصل شوند و آنها را بی خطر سازند(Elliott JM., 2008)، که این موضوع باعث افزایش کیفیت آب می‌شود که می تواند در توزیع بار میکروبی سطح بدن زالو دخالت مستقیم داشته باشد. اگرچه بیماريها رخدادي طبیعی در انواع موجودات می‌باشد اما پرورش متراکم و فوق متراکم زالوها در مراکز طبیعی و برکه‌ها و مراکز صنعتی و مصنوعی سبب شیوع انـواع بیمــاريهــاي غیرمنتظــره شــده اســت کــه در نهایــت منجــر بــه محدودسازي میزان تولید و افزایش ضرر و زیان اقتصادي می‌گردد. ایـن موضـوع از سـوي دیگر باعث کاهش مصرف انواع آنتی بیوتیک ها در آبزیان گردیده کـه در نتیجه از اثرات جانبی این ترکیبات بر بدن انسان در حوزه درمانی و در دراز مدت بر محیط زیست به شدت می‌کاهد.

اهمیت آبزی پروری در حوزه زالو امروزه به شدت تقویت شده است، گرم شدن کره زمین و خشک شدن کامل زیستگاه های طبیعی، کاهش جمعیت زالوی صیدی و افزایش تقاضا باعث افزایش نرخ جهانی زالو شده است که این سناریو را تایید می کند که پرورش و تکثیر زالو در افق بلند مدت می توانند مفید و سودآور باشد که الان یک رشته نسبتا ناشناخته است که نیاز به علمی گسترده دارد تا ترویج و توسعه یابد. اما با توجه به اینکه امروز در کشور ما و حتی جهان دارو و مکمل خاصی برای بیماری‌های زالو وجود ندارد، استفاده از مکمل‌های گیاهی توانسته تا حدی وضعیت زالوهای بیمار را بهبود بخشد و مانع تلفات گسترده در مزارع این موجود گرانبها شود، بنابراین به جای مصرف آنتی بیوتیک های شیمیایی که روی فلور هضمی دستگاه گوارش زالو تاثیر مستیم دارد و باعث ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی می‌گردد، نیاز به تحقیقات گسترده روی دیگر گیاهان دارویی در حوزه آبزیان بر روی بیماری‌های زالو انجام پذیرد تا چراغ راهگشای صنعت شود البته با مطالعه مکانیزم هاي دفاعی زالو و آگـاهی از نحـوه عملکـرد مـواد مغذي در بهینه سازي کارایی سیستم ایمنی در جلوگیري، درمـان و کنترل بیماريهاي زالو با گیاهان دارویی بسیار می‌تواند مفید باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از پرسنل مزرعه و آزمایشگاه گروه شیلات دانشگاه شهرکرد، ریاست پارک علم و فناوری استان چهارمحال و بختیاری و کارشناسانی که بخاطر فراهم نمودن شرایط انجام این تحقیق ما را یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را ابراز می‌نماییم.

منابع

1. پور هاشمی، م.، پناهی، پ.، 1391. ارزش های دارویی بلوط بومی و محصولات غیر چوبی همایش ملی محیط زیست و تولیدات گیاهی تهران، 93: ص 3-1.
2. خوب، ا.، 1391. استفاده از میوه بلوط در تغذیه ماهی کپور دانشگاه شیراز، ص 45-52.
3. صفوی پور، س.، مدرسی، م.، عمادی نیا، ا.،1396. زالوشناسی، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان، ش 120-125.
4. ملک، م., خدادوست، م.،1394. زالوی طبی ایرانی، شگفتی خلقت در گذر زمان. نشریه نشاء علم، 6:ص 80-73.
5. مؤسسه استاندارد و تحقیقات ایران.، 1381. میکروبیولوژی مواد غذایی و  خوراک دام، شمارش استافیلو کوکوس اورئوس کواگولار و سایر گونه‌ها، چاپ اول، ش 6806.

6. Abd El-Hack, M.E., Alagawany, M., Ragab Farag, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., Zorriehzahra, J., Adel., 2016. Beneficial impacts of thymol essential oil on health and production of animals, fish and poultry: a review. Journal of Essential Oil Research, 28: 365-382.

7. Abdelrazek, H., Yusuf, M.S., Hassan, M.A., Soliman, M.T.T., El Nabtiti, A., 2015. Ameliorative effect of oregano essential oil on mycotoxins-induced immune impair­ments in growing Japanese quail. Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, C, Physiology and Molecular Biology, 7: 101-114.

8. Baranzini, N., de Vito, A., Orlandi, V.T., Reguzzoni, M., Monti, L., de Eguileor, M., Rosini, E., Pollegioni, L.,Tettamanti, G., Acquati, F., Grimaldi, A., 2020.Antimicrobial role of RNASET2 protein duringinnate immune response in the medicinal leech Hirudo verbana. Frontiers in Immunology 11: 1–18.

9. Ceylan, M. N., Cetinkaya, O. T., Küçükkara, R., Akçimen, U., 2015. Reproduction Efficiency of the Medicinal Leech Hirudo verbana Carena, 1820.Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 15: 411-418.

10. Ceylan, M., 2020. Effects of maternal age on reproductive performance of the southern medicinal leech, Hirudo verbana Carena, 1820. Animal Reproduction Science, 218, 1-6.

11. Ceylan, M., Küçükkara, R., Karataş, E., 2023. Effects of cocoon incubation angle on hatching success of medicinal leeches (Hirudo spp.). Invertebr Reprod Dev. 67(3–4):121–128.

12. Cheryl, M., 2015. Those Amazing Leeches, Publisher Scholastic.

13. Chahardehi, M. Y., Nikishov, A. A., Abtahi, B., 2016.Effects of different maintenance systems and density on behavioral responces of young european medicinal leeches, Hirudo medicinalis. Journal of plasma and biomarkers, 9(2), 33-38.

14. Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., Mnif, W., 2016. Essential oils’ chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. Medi­cines, 3: e25.

15. Dobre, A.A., Gagiu, V., Petru, N., 2011. Antimicrobial activity of essential oils against food-borne bacteria evaluated by two preliminary methods. Romanian Biotechnolo­gical Letters, 16: 119-125.

16. El-Baroty, G.S., Abd El-Baky, H.H., Farag, R.S., Saleh, M.A., 2010. Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils. African Journal of Biochemistry Research, 4: 167-174.

17. Elliott, J.M., 2008. Population size, weight distribution and food in a persistent population of the rare medicinal leech,Hirudo medicinalis, Freshw Biology, 53(8):1502–1512.

18. Hagerman, A.E., M.E. Rice., Ritchard, N.T., 1998. Mechanisms of protein precipitation for the tannins, Journal of Agricaltural and Food Chemestry, 46: 2590-2595.

19. Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Kim, M.C., Kim, J.S., Han, Y.J., Heo, M.S.,2009. Innate immune response and disease resistance in Carassius auratus by triherbal solvent extracts. Fish Shellfish Immunol, 27, 508-515.

20. Malek, M., Jafarifar, F., Roohi E., Aminjan, A., Salehi, H., Parsa, H., 2019. Culture of a new medicinal leech: Growth, survival and reproduction of Hirudo orientalis Utevsky and Trontelj, 2005 under laboratory conditions. Journal of Nat Hist, 53(11– 12):627–637.

21. Manav, M., Ceylan, M., Buyukcapar, H.M., 2019. Investigation of reproductiveefficiency, growth performance and survival of the southern medicinal leech,Hirudo verbana Carena, 1820 fed withmammalian and poultry blood. AnimalReproduction Science, 206, 27-37.

22. Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R., Carmeli, Y., Falagas, M., Giske, C., 2012.Multidrug‐resistant, extensivelydrug‐resistant and pandrug‐resistant bacteria: aninternational expert proposal for interim standard definitionsfor acquired resistance. Clinical Microbiologyand Infection,18(3):268-281.

23. Petrauskiene, L., 2004. Medicinal leech as a convenient tool for water toxicity assessment. Environ. Toxicol, 19: 336-341.

24. Sweeney, M.C., Palmer, B., McNeil, D.M., Krause, D.O., 2001.Microbial interactions with use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants, Animal Feed Science and Thenology, 91: 69-81.

**The effect of aqueous extract of cashew, cinnamon and oak leaves on the survival, microbial load and morphological diseases of Iranian medicinal leech (Hirudo orientalis)**

*According to the development of the fisheries sector in the country, leech therapy has a long history in traditional medicine, but leech breeding and propagation is a new science that has a young history in the country. A period of leech breeding from larvae to market must feed on blood more than 4 times. One of the most frequent cases of losses in the farm is after each feeding, which causes many leeches to transform from a healthy form to a deformed form, increasing the mortality rate.* *today, the role of immunity in the management of farmed leech diseases by increasing the strength of the leech's innate immune system is undeniable, which should focus on controlling diseases in the aquatic environment using the membrane immune system and through the consumption of healthy blood and the use of natural plant materials instead of chemical antibiotics.* *in this study, 100 leeches from patients with deforming disease and a control group were divided into 5 treatments (control, treatment containing 1.5 ml of extract, treatment containing 3 ml of extract, treatment containing 6 ml of extract, treatment containing 9 ml of extract) and 4 replications over 75 days with an average base weight of 2.5 g in a completely randomized design.* *the same mixture of herbal extracts of cashew, cinnamon and oak was kept in an aquatic environment and were charged daily and the water was changed every day. The weight and microbial load on the body surface of the leeches and the survival and deformity status of the leeches were also examined.* *The results showed that the consumption of herbal extract did not show significant changes in the weight of the leeches at the end of the period. Also, the treatment that had the most positive response to the doses was the 9 ml treatment of herbal extract, which showed the lowest microbial load. with increasing the dose of herbal extract, the response to the disease increased, the mortality decreased, and the survival of the leeches increased.* *Also, regarding the morphological parameter of the leech, the results showed that the consumption concentration of 6 and 9 ml had the greatest effect on restoring the deformity of the leeches and improving their physical condition and transforming them into healthy and smooth leeches. Overall, the results showed that consuming a mixture of herbal extracts of sweet almond leaves, cinnamon, and oak containing phenols and tannins, which have antioxidant and antibacterial properties, can improve the immune and physical conditions of leeches and ensure their health without causing side effects during their life cycle.*

***Key words****: medical leech, cultivation and propagation, medicinal plants, morphological disease*