

اثرات ضد انگلی عصاره آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) در مبارزه با انگل تریکودینا و تاثیر آن بر شاخص های خونی تاسماهی ایرانی

سهیل بازاری مقدم^{۱*}، مهدی معصوم زاده^۱، جلیل جلیل پور^۱

۱- موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۲۷

چکیده

امروزه بکارگیری گیاهان دارویی به منظور جایگزینی با مواد شیمیایی در کنترل عوامل ایجاد کننده بیماری از جمله انگل ها بسیار حائز اهمیت می باشد. این مطالعه با هدف بررسی اثربخشی و تعیین دوز تأثیر گذار عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی در مبارزه با انگل تک یاخته- ای خارجی (تریکودینا) انجام پذیرفت. بدین منظور پس از تعیین غلظت های کشنده (LC_{50}) این عصاره بر روی بچه تاسماهی ایرانی، نسبت به انجام مطالعات تعیین غلظت های تأثیر گذار (EC_{50}) اقدام گردید. در این مطالعه اثرات کاربرد عصاره آویشن شیرازی بر روی گلبول های سفید خون نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه شمارش افتراقی گلبول های سفید خون در مطالعات تعیین EC_{50} عصاره ها، نشان دهنده اختلاف معنی- دار آماری در میزان لنفوسیت، نوتروفیل و ائوزینوفیل در تیمارهای مختلف بود ($P < 0.05$). در این بررسی، غلظت مؤثره عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی بر روی انگل تریکودینا در محدوده غلظت ۲۰۰ تا ۶۰۰ میلی گرم در لیتر تعیین گردید و غلظت اثر گذار (EC_{50}) طی مدت یک ساعت حمام برابر ۴۳۷/۶ میلی گرم در لیتر محاسبه شد. دوز مؤثره، در دسته مواد با سمیت کم طبقه بندی شده و جهت جایگزینی با مواد شیمیایی مناسب می باشد. بنابراین این عصاره بمنظور از بین بردن انگل تریکودینا در مزارع پرورش ماهیان خاویاری قابل توصیه خواهد بود.

کلمات کلیدی: عصاره آویشن شیرازی، تاسماهی ایرانی، انگل، تریکودینا.

مقدمه

داروهای طبیعی و گیاهی به دلیل ارزش اقتصادی مناسب و کم هزینه بودن تولید آنها، نداشتن اثرات تخریبی بر محیط زیست، کم بودن عوارض جانبی در مقایسه با داروهای شیمیایی، عدم ایجاد مقاومت نسبی در برابر عوامل بیماری‌زا، منحصر بودن در درمان برخی بیماری‌های خاص و وجود تجربیات مختلف بالینی در این زمینه منجر شده تا این منابع ارزشمند دارویی از جایگاه خاصی در پیشگیری و درمان برخوردار باشند (قاسمی پیر بلوطی و همکاران ۱۳۹۰؛ یادگار و همکاران، ۱۳۸۸). بر اساس بررسی‌های صورت گرفته، از مهمترین عوامل تهدید کننده بچه تاسماهیان در محیط‌های پرورشی، آلودگی آنها به انگل‌های تک یاخته ای خارجی است (بازاری مقدم و همکاران، ۱۳۹۷). این گروه از انگل‌ها قادرند سبب ایجاد بیماری و تلفات در بچه ماهیان انگشت قد گردند (Lyholt and Buchmann, 1995). از مهمترین عوامل انگلی تک یاخته‌ای خارجی شایع در بچه ماهیان خاویاری گونه های تریکودینا هستند که علاوه بر ایجاد جراحات پوستی، می توانند زمینه را برای بروز بیماری‌های باکتریایی و قارچی فراهم نمایند (Mohamed et al., 2012). محل زندگی تریکودینا آبشش و پوست ماهی است و این مسئله از دیدگاه آسیب شناسی بسیار حائز اهمیت است (Lyholt and Buchmann, 1995).

آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora* یکی از شناخته شده ترین گیاهان دارویی در طب سنتی ایران و اروپا است. این گیاه علفی معطر که طول آن حدود ۴۰ سانتی متر است دارای خواص دارویی بسیاری است. روغن سفید آویشن، تنتور و عصاره مایع آن بعنوان ترکیبات معطر در فرآورده های غذایی کاربرد

دارد. بخش های درمانی این گیاه، شامل سرشاخه‌ها و برگ‌های خشک شده آن می باشند (شریف روحانی و همکاران، ۱۳۹۰).

سوابق تحقیق در زمینه تأثیرات آویشن شیرازی در آبهیان محدود بوده که از آن جمله می توان به مطالعه آهنگرزاده و همکاران (۱۳۸۶) در ماهی کپور معمولی، شریف روحانی و همکاران (۱۳۹۰) در ماهی قزل آلا، رنگین کمان، سلطانی و همکاران (۱۳۹۱) در ماهی قزل آلا، رنگین کمان، علیشاهی و همکاران (۱۳۹۱) در ماهی برزم، معصوم زاده و همکاران (۱۳۹۵) در تخم تاسماهیان پرورشی، Mousavi و همکاران (۲۰۱۰) بر باکتری های دریا، Lysakowska و همکاران (۲۰۱۱) بر آسه نیتوباکتر و Ghasemi Pirbalouti و همکاران (۲۰۱۱) در ماهی قزل آلا، رنگین کمان اشاره نمود که غالب این مطالعات بر روی اثرات ضد قارچی و ضد باکتریایی و نیز بهبود عملکرد سیستم ایمنی این گیاه بوده است. در این راستا مطالعه‌ای به منظور بررسی تأثیرات ضد انگلی این گیاه در آبهیان انجام نگرفته و تحقیق حاضر، اولین مورد می باشد.

تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) به عنوان تنها گونه خاویاری بومی سواحل جنوبی دریای خزر، از جمله ماهیانی به شمار می آید که دارای ارزش غذایی و اقتصادی خاصی می باشد (Mohseni et al., 2008). امروزه نظر به اهمیت و لزوم جایگزینی گیاهان دارویی بجای مواد شیمیایی بمنظور کنترل و درمان بیماری‌ها ضروری بود که مطالعه تاثیر گذاری عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی در مبارزه با انگل خارجی تریکودینا بر روی این گونه با ارزش آبی انجام گیرد.

مواد و روش ها

صنعت و فرآوری گیاهان دارویی سها جیسا با دارا بودن استانداردهای بین المللی ISO 14001, ISO 9001، HACCP و IQnet (سازمان جهانی کیفیت) تهیه گردید (جدول ۱).

پس از انتقال بچه تاسماهیان ایرانی با میانگین وزن $۸/۹۶ \pm ۰/۵۹$ گرم و میانگین طول کل $۳/۱۴ \pm ۰/۴۷$ سانتی متر از استخرهای پرورشی خاکی به مخازن فایبرگلاس، به منظور تعیین غلظت‌های تاثیر گذار عصاره آویشن شیرازی، ابتدا نسبت به انجام مراحل تعیین غلظت‌های کشنده (LC_{50}) این عصاره اقدام شد. بدین منظور مقادیر مورد نیاز عصاره هیدروالکلی

آویشن شیرازی از شرکت و کشک و	نوع آزمایش	استاندارد	روش آزمایش	نتایج
جدول ۱:	رنگ	قهوه ای روشن تا قهوه ای تیره	ارگانولپتیک	قهوه ای
آنالیز عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی مورد استفاده	عطر و بو	عطر طبیعی	ارگانولپتیک	عطر طبیعی
	ماده خشک (۱۰۰ تا ۱۰۵ درجه سانتیگراد طی ۲ ساعت)	۱/۵ تا ۴ درصد	BP2009	۳/۰۳ درصد
	چگالی	۰/۹۶ تا ۰/۹۹	BP2009	۰/۹۸
	pH	۴/۵ تا ۶/۵	BP2009	۶/۳۶
	مقدار الکل	۱۰ تا ۲۰ درصد	BP2009	۱۹ درصد
	روش شناسایی	بین المللی	TLC	مورد تائید
	مقدار ماده موثره	۸۵ تا ۱۲۰ میلی گرم در ۱۰۰ سی سی	DAB10	۱۱۱/۱ میلی گرم در ۱۰۰ سی سی
	تعداد باکتری	حداکثر $۱۰^۴$ عدد در میلی لیتر	USP32	حداکثر $۱۰^۴$ عدد در میلی لیتر

در مرحله تعیین غلظت موثره عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی طی یک ساعت با استفاده از دستگاه های اندازه گیری صحرانی مدل WTW اندازه گیری شدند.

بر این اساس محدوده دما بین ۲۲/۳-۲۱/۹ درجه سانتی گراد، pH ۷/۸۲-۷/۵۴، اکسیژن محلول (DO) ۷-۷/۹، هدایت الکتریکی (EC) ۷۶۷-۸۸۰ (μs/cm)، سختی کل ۲۸۰-۳۱۰، نیتريت ۰-۰/۰۰۰۲، نترات ۰-۰/۰۱ و آمونیاک ۰/۳۳۴-۰/۲۳۱ میلی گرم در لیتر تعیین گردیدند.

بمنظور ارزیابی تأثیر عصاره آویشن شیرازی بر روی شاخص های خونی در مطالعه تعیین غلظت موثره ضد انگل، خون گیری از طریق قطع ساقه دمی انجام شد. با توجه به مقدار خون بسیار کم جمع آوری شده از هر ماهی، امکان انجام مطالعات سرولوژیک مهیا نگردید و فقط به شمارش افتراقی گلبولهای سفید (عامری مهابادی، ۱۳۷۸) بسنده شد.

پس از انتقال بچه تاسماهیان ایرانی از استخرهای پرورشی خاکی و تخلیه بچه تاسماهیان همراه با آب استخرهای محل پرورش آنها در مخازن ۵۰۰ لیتری، نسبت به نمونه برداری تصادفی از ۵۰ عدد بچه ماهی بمنظور تعیین درصد شیوع و میانگین شدت انگل تریکودینا (بر اساس فرمول های ذیل) اقدام گردید.

بدین منظور نسبت به تهیه لام های مرطوب از پوست و آبشش با استفاده از روش های رایج (Stoskope, 1993; Fernando et al., 1972) و مطالعه توسط میکروسکوپ نیکون 50i به همراه مانیتور متصل به آن برای هریک از بچه ماهیان اقدام شد. پس از شمارش تعداد انگل های تریکودینا در لام های مرطوب تهیه شده از پوست و آبشش، نسبت به ثبت تعداد انگل -

در این بررسی، دوزها و غلظت های مؤثر این عصاره طی مدت یک ساعت تعیین گردید، لذا آزمایش تعیین غلظت های کشنده عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی، بعد از طی مراحل آداپتاسیون و انتقال بچه تاسماهیان ایرانی به تشتک های ۳۰ لیتری مجهز به سیستم هوادهی انجام شد. این آزمایشات بر اساس روش استاندارد (TRC, 1984) O.E.C.D صورت گرفت.

بمنظور اجرای آزمایشات تعیین غلظت های مؤثره عصاره آویشن شیرازی در مبارزه با انگل تریکودینا (EC₅₀)، پس از تعیین میزان شیوع و شدت انگل مذکور، بچه تاسماهیان ایرانی به آکواریوم هایی (هر آکواریوم ۲۰ عدد ماهی) که بدین منظور آبرگیری و هوادهی شده بودند، منتقل شدند. سپس نسبت به تیمار بندی بر اساس دوزهای تعیین شده که بصورت لگاریتمی محاسبه شده بودند، اقدام گردید.

EC₅₀ با روش رسم منحنی دوز-پاسخ و با استفاده از روش آماری Probit Analysis محاسبه شد. در این تحقیق، پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب همچون اکسیژن محلول (DO)، دمای آب، pH بطور روزانه و

های شمارش شده هر ماهی در جداول ویژه‌ای اقدام گردید.

بمنظور ارزیابی میزان تأثیرات عصاره با دوزهای مختلف در تیمارها و تعیین درجه تأثیرگذاری ضد انگلی عصاره در هریک از تیمارهای مورد مطالعه، از رابطه زیر استفاده شد (Yao et al., 2011).

$$E = (C - T) \times 100 / C$$

E = درجه تأثیر ضد انگلی

C = میانگین شدت انگل تریکودینا در شاهد

T = میانگین شدت انگل تریکودینا در هر دوز مورد استفاده (هر تیمار)

- هر چقدر مقدار E در بین تیمارهای مختلف بیشتر باشد میزان تأثیرگذاری آن دوز بیشتر خواهد بود.

پس از خاتمه هر مرحله از آزمایشات و بعد از جمع‌آوری داده‌ها، بمنظور تجزیه و تحلیل آماری و رسم شکل‌های مربوطه از نرم افزارهای SPSS ver 20 و Excel 2016 و نیز به منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها در گروه‌ها و تکرارها جهت تشکیل تیمارها از آزمون Kolmogorov-smirnov استفاده شد. در این مطالعه از آزمون‌های One Way Anova، آزمون دانکن، آزمون و ضریب همبستگی پیرسون استفاده گردید. بمنظور انجام محاسبات غلظت‌های موثره عصاره نیز از روش Probit analysis (Finney, 1971) استفاده شد.



شکل ۱: انگل تریکودینا (746X), scale bar 10 μ m

نتایج

در این تحقیق بمنظور یافتن محدوده غلظت کشنده عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی، آزمایشات ابتدایی (pre-LC₅₀) یک ساعته بر روی بچه تاسماهیان ایرانی انجام گرفت و سرانجام محدوده غلظت ۸۵۰۰ تا ۱۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر برای انجام آزمایشات نهایی تعیین گردید. بر اساس محاسبات لگاریتمی ۷ تیمار

(۸۵۰۰، ۸۸۷۰، ۹۲۶۰، ۹۶۶۰، ۱۰۱۰۰، ۱۰۵۵۰ و ۱۱۰۰۰ میلی گرم لیتر) در نظر گرفته شد و نسبت به گروه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۲). بر این اساس میزان LC₅₀ این عصاره طی مدت یک ساعت معادل ۹۹۳۳/۴۴ میلی گرم در لیتر تعیین شد. همچنین معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی (R^2) حاکی از وجود ارتباط مستقیم (همبستگی قوی و مثبت) بین

غلظت‌های مورد بررسی با میزان تلفات بچه تاسماهیان

ایرانی می باشد.

جدول ۲: غلظت‌های کشنده عصاره آویشن شیرازی (mg/l) طی یک ساعت روی بچه تاسماهی ایرانی

مقدار LC/ زمان	۳۰ دقیقه	۴۵ دقیقه	۶۰ دقیقه
LC ₁₀	۹۴۴۴/۹۵	۸۹۱۶/۶۱	۸۵۲۱/۱۸
LC ₅₀	۱۳۱۰۰/۸۶	۱۰۷۶۹/۶۱	۹۹۳۳/۴۴
LC ₉₀	۱۸۱۷۱/۸۸	۱۳۰۰۷/۶۸	۱۱۵۸۲/۴۳

به منظور تعیین غلظت‌های نیمه کشنده عصاره آویشن شیرازی و تعیین MATC value (حداکثر غلظت مجاز) با استفاده از روابط لگاریتمی نسبت به تعیین دوزهای مناسب مطالعات EC₅₀ اقدام گردید. بر اساس محاسبات لگاریتمی ۸ تیمار (۲۰۰، ۲۳۵، ۲۷۵، ۳۲۰، ۳۷۵، ۴۴۰، ۵۱۰ و ۶۰۰ میلی گرم لیتر) و هر تیمار با سه تکرار در نظر گرفته شد و نسبت به گروه شاهد

مورد ارزیابی قرار گرفت. بر این اساس مقادیر EC₁₀، EC₅₀ و EC₉₀ عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی طی مدت زمان ۶۰ دقیقه محاسبه گردید (جدول ۳). نتایج نشان داد که میزان EC₅₀ این عصاره طی مدت یک ساعت حمام برابر ۴۳۷/۶ میلی گرم در لیتر می باشد.

جدول ۳: غلظت‌های مؤثره عصاره آویشن شیرازی (mg/l) بر انگل تریکودینا در بچه تاسماهی ایرانی (طی ۶۰ دقیقه)

مقدار EC	تکرار ۱	تکرار ۲	تکرار ۳
EC ₁₀	۲۱۵/۰۸	۲۴۹/۹۲	۲۴۵/۲۹
EC ₅₀	۳۹۲/۱	۴۲۳/۷۴	۴۱۶/۲۹
EC ₉₀	۷۱۴/۸۳	۷۱۸/۴۶	۷۰۶/۹۷

نتایج حاصل از شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون برای هریک از انواع گلبول‌های سفید (لنفوسیت، مونوسیت، نوتروفیل و ائوزینوفیل) به شرح جدول ۴ بوده است.

مقایسه مقادیر لنفوسیت خون ماهیان مورد بررسی بر اساس آزمون آنالیز واریانس یکطرفه نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد ($P < 0.05$). مقایسه بین گروه‌ها با یکدیگر بر اساس

آزمون دانکن، حاکی از افزایش میزان لنفوسیت خون بچه ماهیان در دوزهای مختلف آویشن شیرازی نسبت به شاهد بوده است. اما میزان مونوسیت خون ماهیان مورد بررسی بین تیمارها، بر اساس آزمون مذکور، اختلاف معنی‌دار آماری را نشان نداد ($P > 0.05$). مقادیر نوتروفیل خون ماهیان نیز بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه مقایسه گردید، بطوریکه اختلاف معنی‌دار آماری مابین تیمارها مشاهده گردید ($P < 0.05$).

بر اساس آزمون دانکن به منظور مقایسه گروه ها با یکدیگر، میزان نوتروفیل در تمامی تیمارها کمتر از شاهد بوده و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار مشاهده گردید ($P<0.05$). میزان ائوزینوفیل خون ماهیان مورد بررسی، حاکی از اختلاف معنی دار آماری بین تیمارها بود ($P<0.05$). بر اساس آزمون دانکن این میزان در شاهد بیش از سایر تیمارها بوده است و به لحاظ آماری اختلاف معنی داری مشاهده گردید ($P<0.05$).

جدول ۴: میانگین شمارش افتراقی گلبول های سفید خون در تیمارهای مختلف در اندازه گیری مقادیر EC_{50}

گلبول سفید	لنفوسیت	منوسیت	نوتروفیل	ائوزینوفیل
خطای استاندارد $\pm$	خطای استاندارد $\pm$	خطای استاندارد $\pm$	خطای استاندارد $\pm$	خطای استاندارد $\pm$
میانگین	میانگین	میانگین	میانگین	میانگین
شاهد (۰)	۶۲/۲۵ $\pm$ ۶/۹۴ ^a	۸/۵ $\pm$ ۱/۸۴ ^a	۱۹/۷۵ $\pm$ ۲/۱۷ ^c	۹/۵ $\pm$ ۱/۰۷ ^b
۲۰۰	۷۸/۸۷ $\pm$ ۲/۵۵ ^{bc}	۵/۲۵ $\pm$ ۰/۹۴ ^a	۱۲/۵ $\pm$ ۱/۹۷ ^{abc}	۳/۳۷ $\pm$ ۱/۱۴ ^a
۲۳۵	۷۷ $\pm$ ۲/۱۱ ^{bc}	۶/۵ $\pm$ ۰/۹۵ ^a	۹/۲۸ $\pm$ ۱/۲۲ ^{ab}	۴/۴۳ $\pm$ ۱/۰۴ ^a
۲۷۵	۸۳/۲۳ $\pm$ ۱/۵ ^c	۶/۴۵ $\pm$ ۰/۸۷ ^a	۵/۶ $\pm$ ۱/۱۸ ^a	۵/۲ $\pm$ ۱/۰۶ ^a
۳۲۰	۸۰ $\pm$ ۱/۷۸ ^{bc}	۵/۵ $\pm$ ۰/۴۴ ^a	۵ $\pm$ ۱/۱۲ ^a	۶/۵۸ $\pm$ ۱/۱ ^{ab}
۳۷۵	۷۵/۲۵ $\pm$ ۷/۲۷ ^{bc}	۶/۵ $\pm$ ۰/۸۴ ^a	۱۱/۲۵ $\pm$ ۲/۲ ^{abc}	۷۰ $\pm$ ۱/۱۲ ^{ab}
۴۴۰	۷۹ $\pm$ ۱/۳۵ ^{bc}	۵ $\pm$ ۰/۴ ^a	۱۲ $\pm$ ۱/۰۸ ^{abc}	۴۰ $\pm$ ۱/۵۷ ^a
۵۱۰	۷۳/۵ $\pm$ ۲/۰۹ ^{bc}	۷/۵ $\pm$ ۰/۳ ^a	۱۳/۵ $\pm$ ۱/۳۲ ^{abc}	۵۰ $\pm$ ۱/۰۴ ^a
۶۰۰	۷۱/۵ $\pm$ ۳/۵۲ ^b	۷/۷۵ $\pm$ ۰/۵۴ ^a	۱۶/۵ $\pm$ ۱/۵۵ ^{bc}	۴/۲۵ $\pm$ ۱/۰۳ ^a

مقادیر لنفوسیت، نوتروفیل و ائوزینوفیل در خون بچه ماهیان بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی دار آماری نشان داد ($P<0.05$).

بحث

اثرات انگل ها در ماهیان با ایجاد عوارضی نظیر کاهش وزن، لاغری، کاهش بازده تولید مثلی یا عقیمی، کوری، رفتارهای غیر طبیعی، زخم های جلدی و نارسایی آبششی می تواند امنیت سرمایه گذاری در حوزه آبرزی پروری را به مخاطره انداخته و بدنبال آن ضرر و زیان اقتصادی زیادی را برای پرورش دهندگان به همراه داشته باشد. مهمترین انگل تک یاخته خارجی شایع در ماهیان خاویاری، انگل تریکودینا بوده که می تواند علاوه بر ایجاد آسیب های مستقیم، در ایجاد عفونت های ثانویه نیز نقش داشته باشند (Lyholt and Buchmann, 1995 ; Dahbi et al., 2010). افزایش

مواد آلی محلول در آب، رشد بیش از حد گیاهان در استخر و غذادهی بیش از حد از جمله عواملی هستند که شرایط فیزیکی و شیمیایی آب را به هم زده و رشد و تکثیر این مـژده داران را افزایش می دهند (پیغان، ۱۳۸۰).

امروزه مواد ضد عفونی کننده شیمیایی به منظور کنترل و حذف عوامل بیماری زا در آبزیان مورد استفاده قرار می گیرند لذا انتقال ترکیبات شیمیایی به محیط زیست و نیز لزوم خروج ارز از کشور به منظور واردات و در نهایت تاثیرات سوء بر مصرف کنندگان از جمله مسائلی هستند که کاربرد این مواد را با مسائل و مشکلات جدی روبرو ساخته است. این در حالی

شریف روحانی و همکاران (۱۳۹۰)، Mitchell (۱۹۸۴) و Jegede (۲۰۰۷) مطابقت دارد.

پس از انجام مطالعات تعیین غلظت‌های کشنده عصاره آویشن شیرازی، نسبت به انجام مطالعات تعیین غلظت‌های تأثیرگذار (EC_{50}) عصاره مذکور در مبارزه با انگل تک یاخته‌ای تریکودینا اقدام گردید. بر این اساس میزان EC_{50} عصاره مذکور طی مدت یک ساعت معادل $۴۳۷/۶$ میلی گرم در لیتر تعیین شد.

با توجه به اینکه مطالعه‌ای در خصوص تأثیرات آویشن شیرازی بر انگل تریکودینا انجام نگرفته بود لذا امکان مقایسه نتایج غلظت مؤثره آویشن شیرازی بر تریکودینا با نتایج دیگران امکانپذیر نگردید.

در مطالعه حاضر، شمارش افتراقی گلوبول‌های سفید خون در مبارزه با تریکودینا نشان داد که میزان لنفوسیت در تیمارهای مختلف عصاره آویشن شیرازی نسبت به شاهد تا حدودی روند افزایشی داشته، بطوریکه استفاده از این عصاره بعنوان عاملی در کاهش میزان استرس عمل نموده و بعنوان فاکتوری مثبت تلقی می‌گردد (Berlin et al., 2008; Roberts, 1989).

اوتوزینوفیل نیز در تیمارهای مختلف اختلاف معنی دار آماری را نشان داد ($P < 0.05$). بطوریکه در مقایسه با شاهد دارای مقادیر کمتری بود. نظر به اینکه مقادیر نوتروفیل و اوتوزینوفیل در مطالعه تعیین غلظت‌های مؤثر بر حذف انگل تریکودینا نسبت به شاهد کاهش یافته، لذا می‌تواند بعنوان شاخصی مثبت و ایجاد کننده آرامش در این ماهیان محسوب گردد. در مطالعه Alishahi و Mesbah (۲۰۱۰) بر روی شاخص‌های ایمونولوژی *Astronatus ocellatus* نتایج بدست آمد که تا حد زیادی با نتایج شمارش گلوبول‌های سفید

است که بمنظور مبارزه با انگل تریکودینا مواد شیمیایی مختلفی از جمله فرمالین، کلر و پرمنگنات پتاسیم معرفی گردیده اند (Madsen et al., 2000a and b; Eissa, 2004). لذا با توجه به مشکلات و خطرات استفاده از مواد شیمیایی لزوم بررسی جایگزین‌های طبیعی برای این مواد ضد عفونی کننده بیش از پیش احساس می‌گردد (Yao et al., 2011).

مطالعه حاضر نشان داد که غلظت کشنده (LC_{50}) عصاره آویشن شیرازی بر روی بچه تاسماهی ایرانی طی ۹۶ ساعت معادل $۷۶۶/۶۵$ میلی گرم در لیتر بوده است. با توجه به اینکه در نظر بوده تأثیرات این عصاره در حمام کوتاه مدت بمنظور حذف انگل خارجی تریکودینا ارزیابی گردد، لذا تعیین غلظت‌های کشنده این عصاره طی مدت یک ساعت نیز ضروری می‌نمود بر این اساس و با توجه به نتایج آزمایشات، مقدار LC_{50} یک ساعته عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی معادل $۹۹۳۳/۴۴$ میلی گرم در لیتر محاسبه گردید. در مطالعاتی، معصوم زاده و همکاران (۱۳۸۹) و شریف روحانی و همکاران (۱۳۹۰) به تعیین غلظت نیمه کشنده اسانس آویشن شیرازی طی ۹۶ ساعت به ترتیب بر روی بچه تاسماهی ایرانی و بچه قزل آلائی رنگین کمان پرورشی پرداختند که مقادیر LC_{50} آنها بترتیب $۱۲/۱۱$ و $۱۳/۶$ میلی گرم در لیتر تعیین گردید که با توجه به نوع ترکیب و میزان ماده مؤثره در اسانس، مقادیر آن با بررسی حاضر متفاوت می‌باشد.

طی انجام مطالعات تعیین غلظت‌های کشنده عصاره آویشن شیرازی (LC_{50})، مشاهده رفتارهای غیرطبیعی شامل افزایش تحریک پذیری، تعادل کم، انقباض شدید عضلات و انحنای ستون فقرات در غلظت‌های زیاد این عصاره کاملاً مشهود بوده که با یافته‌های

تعیین غلظت مؤثره عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی مطابقت دارد.

طی انجام مطالعه تعیین غلظت‌های مؤثره (EC_{50}) عصاره آویشن شیرازی، هیچگونه رفتار غیرطبیعی در بچه تاسماهیان ایرانی مشاهده نگردید که خود حاکی از عدم وجود شرایط استرس زا و تحریک کننده بوده است.

با توجه به اینکه عملکرد یک ماده ضد عفونی کننده تابع پیچیده‌ای از چندین متغیر، همچون نوع و مقدار ماده مورد نظر، نوع و غلظت میکروارگانیزم‌ها، مدت زمان تماس و کیفیت آب است، بنابراین در بسیاری از موارد بهترین روش برای انتخاب ماده ضد عفونی کننده مناسب، مطالعات آزمایشگاهی بوده که در آن کیفیت آب نیز کنترل شده باشد (چالکشی امیری، ۱۳۷۶). با توجه به نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر، تمامی فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی اندازه گیری شده در محدوده مناسب آزمایشات بوده‌اند.

بر اساس نتایج بدست آمده، در مقایسه با سایر ترکیبات ضد عفونی کننده به منظور حذف انگل تریکودینا، با توجه به اینکه که میزان غلظت مؤثره (EC_{50}) عصاره آویشن شیرازی در محدوده ۴۰۰ میلی-گرم در لیتر بوده، لذا در دسته ترکیبات با سمیت کم برای آبزیان قرار گرفته و در مقایسه با سایر ترکیبات شیمیایی، استفاده از این ترکیب بی خطر خواهد بود (Carty et al., 1998). اصولاً تعیین شاخص درمانی (Therapeutic index) می‌تواند مبنایی برای قضاوت سلامت مواد محسوب گردد (ابطحی و همکاران، ۱۳۸۴). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که شاخص درمانی عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی معادل ۷۳/۱۵ بوده که در مقایسه با مطالعه انجام شده توسط

ابطحی و همکاران (۱۳۸۴) در خصوص شاخص درمانی فرمالین، سبز مالاشیت و پرمنگنات پتاسیم (بترتیب ۰/۹۹، ۲/۲۵ و ۵/۳۷)، این عصاره از سلامتی بسیار بالاتری برای ماهی برخوردار است. بر اساس نتایج این مطالعه، می‌توان جایگزینی این گیاه دارویی را با سایر ترکیبات شیمیایی توصیه نمود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مساعدت کارشناسان محترم موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر در انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

۱. ابطحی، ب.، نظری، ر.، رسولی، ع.، شفیع زاده، پ.، ۱۳۸۴. مقایسه شاخص‌های درمانی داروهای ضد قارچی فرمالین، سبز مالاشیت و پرمنگنات پتاسیم در تاسماهی ایرانی. مجله پژوهش و سازندگی. ۶۷، ۴۹-۴۲.
۲. آهنگرزاده، م.، شریف روحانی، م.، سید مرتضایی، س. ر.، هوشمند، ح.، کر، ن. م.، ۱۳۸۶. بررسی اثر اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر روی تعداد کل باکتری و قارچ در مرحله انکوباسیون تخم ماهی کپور. پنجمین گردهمایی دامپزشکان علوم بالینی ایران. صفحه ۱۲۷.
۳. بازاری مقدم، س.، جلیل پور، ج.، معصوم زاده، م.، عزیززاده، م.، ۱۳۹۷. کاربرد عصاره هیدروالکلی سیر در مبارزه با انگل تک یاخته ای خارجی در بچه

۱۰. قاسمی پیر بلوطی، ع.، پیر علی. ا.، پیشکار. غ. ر.، جلالی، س. م. ع.، رئیسی. م.، جعفریان دهکردی. م.، حامد. ز. ب.، ۱۳۹۰. اثر اسانس چند گیاه دارویی بر سیستم ایمنی ماهی قزل آلاي رنگین کمان فصلنامه داروهای گیاهی. ۲، ۱۴۹-۱۵۵.
۱۱. معصوم زاده، م.، شریف روحانی، م.، شناورماسوله، ع.، بازاری مقدم، س.، جلیل پور، ج.، علیزاده، م.، حقیقی، س.، پوردهقانی، م.، حلاجیان، ع.، ۱۳۸۹. بررسی کاربرد اسانس آویشن شیرازی در کنترل آلودگی‌های قارچی تاسماهی ایرانی. گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی، موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۹۴ صفحه.
۱۲. معصوم زاده، م.، شریف روحانی، م.، شناورماسوله، ع.، علیزاده، م.، جلیل پور، ج.، بازاری مقدم، س.، ۱۳۹۵. تاثیرات ضد باکتریایی عصاره های سیر و آویشن شیرازی بر باکتری آئروموناس هیدروفیلا جداسازی شده از تاسماهیان پرورشی. نشریه توسعه آبی پروری، ۱۰(۴)، ۱۳۲-۱۲۵.
۱۳. یادگار، ع.، ستاری، م.، یگدلی، م.، بختیاری، ف.، ۱۳۸۸. بررسی و مقایسه اثرات ضد باکتریایی عصاره الکلی برگ، گل و ریشه آویشن شیرازی بر روی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین. فصلنامه گیاهان دارویی. ۶۵-۵۸.
14. Alishahi, M., Mesbah, M., 2010. Comparison of the effect of some immunostimulants and herbal extracts on hematological parameters of *Astronatus* tasmaهی ایرانی. دوفصلنامه ترویجی ماهیان خاویاری. ۱(۱)، ۴۵-۵۵.
۴. پیغان، ر.، ۱۳۸۰. انگلها و بیماریهای انگلی ماهی، انتشارات نوربخش، صفحات ۳۶-۳۵.
۵. چالکشی امیری، م.، ۱۳۷۶. اصول تصفیه آب. نشر ارکان. ۴۲۸ صفحه.
۶. سلطانی، م.، ظریف منش، ط.، ذریه زهرا، ج.، ۱۳۹۱. مطالعه تاثیر اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر میزان فعالیت سیستم عامل مکمل و لیزوزیم خون ماهی قزل آلاي رنگین کمان. مجله علمی شیلات ایران. ۲۱(۲)، ۲۳-۱۳.
۷. شریف روحانی، م.، حقیقی، م. و عصایان، ح.، ۱۳۹۰. غلظت نیمه کشنده اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) در بچه ماهی قزل آلاي رنگین کمان پرورشی. مجله علمی شیلات ایران. ۲۰(۲)، ۸۹ تا ۹۵.
۸. عامری مهابادی، م.، ۱۳۷۸. روش های آزمایشگاهی هماتولوژی دامپزشکی. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، شماره ۲۴۴۷. ۱۲۶ صفحه.
۹. علیشاهی، م.، پور مهدی بروجنی، م.، عبدی، ا.، ۱۳۹۱. مقایسه اثر برخی محرک های ایمنی و عصاره های گیاهی بر فاکتورهای رشد و مقاومت ماهی بزرزم در برابر استرس های محیطی. مجله دامپزشکی ایران. ۸، ۶۷-۵۹.

23. Jegede, T., 2007. Acute- toxicity of Sodium chloride (NaCl) on *Oreochromis niloticus* fingerlings. Journal of Fisheries International, 2(4), 292-294.
24. Lysakowska, M., Denys, A., Sienkiewicz, M., 2011. The activity of thyme essential oil against *Acinetobacter* spp., Cent. Euro. Journal of Biology, 6(3), 405-413.
25. Lyholt, H.C.K., Buchmann, K., 1995. Infestations with the skin parasite *Trichodina jadranica* Raabe, 1958 (Ciliophora: Trichodinidae) in Danish ell farms. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. 5 (2), 97.
26. Madsen, H.C.K., Buchmann, K., Møllergaard, S., 2000a. Association between trichodiniasis in eel (*Anguilla anguilla*) and water quality in recirculation. Aquaculture, 187, 275-281.
27. Madsen, H. C. K., Buchmann, K., Møllergaard, S. 2000b. Treatment of Trichodiniasis in eel (*Anguilla anguilla*) reared in recirculation systems in Denmark; alternatives to formaldehyde. Journal of Aquaculture, 186: 221-231.
28. Mitchell, A. J., 1984. Parasites and diseases of Striped Bass. In: J.P.Mc Craren (Ed.), the aquaculture of Striped Bass: A proceeding. UMSGM P8401. University of Maryland, College Park. 177-204.
29. Mohseni, M., Ozório, R.O.A., Pourkazemi, M., Bai, S.C., 2008. Effects of dietary L-Carnitine supplements on growth and body composition in beluga, *H. huso*, juveniles. Journal of Applied Ichthyology, 24, 646-649.
30. Mohamed A. A., Abd El-Galil, Shawky, Aboelhadidb, M., 2012. Trials for the control of trichodinosis and gyrodactylosis in hatchery reared *Oreochromis niloticus* fries by using garlic . Veterinary Parasitology, 185, 57-63.
31. Mousavi, S. M., Wilson, G., Raftos, D., Mirzargar, S. S., Omidbaigi, R., 2011. *ocellatus*. 1st Conference on Ornamental fish. Iran. 185-192.
15. Brelin, D., 2008. Stress coping strategies in brown trout (*Salmo trutta*): ecological significance aranching, Acta Universitatis Upsaliensis Upsala. 68 p.
16. Carty, G., O'Leary, G., Donlon, B., Henry, M. 1998. Waste water treatment manuals. Characferisation of industrial waste water environmental protection agency. Wexford, Ireland. 61p.
17. Dahbi, A., Bellete, B., Flori, P., Hssaine, A., Elhachimi, Y., Raberin, H., Chait, A., Tran Manh Sung, R., Hafid, J., 2010. The effect of essential oils from *Thymus broussonetii* Boiss on transmission of *Toxoplasma gondii* cysts in mice, Parasitology Researches, 107, 55-58.
18. Eissa, I. A. E., 2004. Parasitic Fish Diseases in Egypt. Dar El-Nahdda El-Arabia. Publishing, 32 Abd El-Khalek Thrwat St., Cairo, Egypt. 13-18.
19. El-Deen, A. E. N., 2010. Green tea extract role in removing the *Trichodina* sp. On *Oreochromis niloticus* fry in the Egyptian fish hatcheries. Report and Opinion, 2(8), 77-81.
20. Fernando, CH; Furtado, JI., Gussev, AV., Hanek, G., Kakong, SA., 1972. Methods for the study of freshwater fish parasites. 1st Edn., University of Waterloo, Biology Series. 76 p.
21. Finney, D. J., 1971. Statistical methods in biological assay, 2nd Ed Hafner Publishing Company, New York; N. Y. Cambridge University Press, London, England. 68 p.
22. Ghasemi Pirbalouti, A., Nikobin Broujeni, V., Momeni, M., Poormalek, F. Hamed, B., 2011. Antibacterial activity of Iranian medicinal planets against *Streptococcus iniae* isolated from rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*), Archives of Biological Science, 63, 59-66.

- Venomous Animals and and Toxins including Tropical Diseases. 12, 172-201.
34. Stoskope, M. K., 1993. Fish Medicen. W. B. Saunders Company, London, England. 132-148.
 35. TRC, 1984. O.E.C.D. Guideline for testing of chemicals, section 2. Effects on biotic systems. 1-39.
 36. Yao, J.Y., Shen, J.Y., Li, X.L., Xu, Y., Hao, G.J., Pan, X.Y., Wang, G.X., Yin, W.L., 2011. Isolation of bioactive components from *Chelidonium majus* L. with activity against *Trichodina* sp. Journal of Aquaculture, 318, 235–238.
 - Antibacterial activities of a new combination of essential oils against marine bacteria, Aquaculture. International, 19, 205-214.
 32. Roberts, R.J., 1989. Fish pathology. Secend ed., Baillier tinndal, 467p.
 33. Shalaby, A.M., Khattab, Y.A., Abdel Rahman, A.M., 2006. Effects of Garlic (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of