



مقاله علمی - پژوهشی:

اثر عصاره اتانولی چای سبز (*Camellia sinensis* L.) بر درمان بیماری لکه سفید در ماهی گلدفیش (*Carassius auratus*)

مهسا شهبازی^۱، هومن رحمتی هولاسو^{۱،۳*}، حسینعلی ابراهیم زاده موسوی^۱، سید سعید میرزرگر^۱، عقیل شریف زاده^۲

*rahmatih@ut.ac.ir

۱- گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، دانشگاه تهران

۳- قطب بهداشت و بیماری‌های ماهیان گرمابی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۱

چکیده

ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس احتمالاً نسبت به سایر پاتوژن‌های یوکاریوتی آسیب بیشتری به ماهیان آکواریومی آب شیرین می‌زند. به دلیل عوارض جانبی و اثرات زیست‌محیطی گزارش شده، محققین درصدد جایگزینی مواد شیمیایی با عصاره‌های گیاهی برای درمان این انگل هستند. در این مطالعه، اثر عصاره اتانولی چای سبز در درمان ماهی‌های آلوده به انگل یک بررسی شده است. در این مطالعه اثر غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۲، ۰/۱۵، و ۰/۱۲۵ گرم در لیتر از عصاره اتانولی چای سبز بر درمان بیماری لکه سفید به روش شمارش میانگین تعداد نقاط سفید بر بدن هر ماهی و میانگین تعداد انگل‌های مشاهده شده به وسیله میکروسکوپ به ازاء هر ماهی درست قبل، ۲۴ ساعت بعد و نیز ۷ روز پس از مواجهه ماهیان آلوده با عصاره مطالعه شد. پس از مدت ۷ روز درمان ماهی‌های آلوده، تیمارهای ۰/۲، ۰/۱۵ و ۰/۱۲۵ گرم در لیتر چای سبز از نظر میانگین تعداد نقاط سفید به ازاء هر ماهی و میانگین تعداد انگل‌های شمارش شده در ۵ فیلد میکروسکوپی به ازاء هر ماهی تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. از سویی، کمترین میزان تلفات طی ۷ روز در بین سه تیمار مذکور، مربوط به غلظت ۰/۱۲۵ گرم بر لیتر بود (۲۵ درصد مرگ و میر). تمامی ماهیان در تیمار ۰/۲۵ گرم در لیتر و گروه کنترل منفی از بین رفتند. با توجه به این که ۷۵ درصد ماهی‌های آلوده طی دوره درمان با غلظت ۰/۱۲۵ گرم در لیتر زنده ماندند و تاثیر این غلظت در حذف آلودگی انگلی نزدیک به ۱۰۰ درصد بوده است، لذا می‌توان پیشنهاد داد که غلظت ۰/۱۲۵ گرم در لیتر از عصاره اتانولی چای سبز می‌تواند با احتیاط در درمان ماهیان آلوده به ایک به کار رود.

کلمات کلیدی: چای سبز، اکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس، درمان، عصاره الکلی، تروفونت.

مقدمه

ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس^۱ انگل مژه دار ماهیان آب شیرین با گسترش جهانی است. این انگل موجب خسارات اقتصادی وسیعی در صنعت آبزی پروری شده است (Dickerson and Dawe, 2006). اکتیوفتریازیس با نام عمومی لکه سفید، ماهیان آکواریومی و انواع ماهیان خانواده سالمونیده (Wahli and Meier, 1987)، کپورماهیان (Lahsteiner and Weismann, 2007) و مارماهی ها (Hilario et al., 2020) را نیز آلوده می کند.

چرخه زندگی انگل دارای مراحل تروفونت در اپیدرم ماهی، ترک میزبان به شکل تومونت و کیست در محیط آبی است. نهایتاً تومونت در داخل کیست متحمل مراحل سریع تقسیم می شود و سلول های دختری را می سازد که به تومیت ها معروف هستند. هر تومیت پس از تقسیمات متوالی به ترونوت تبدیل می شود که مرحله عفونت زای این انگل است. ترونوت های متحرک به اپیتلیوم سطح پوست، آبشش و باله ماهی ها حمله می کنند و چرخه تکرار می شود (Dickerson and Dawe, 2006). ترونوت ها پس از حمله به اپیتلیوم تبدیل به تروفونت شده که به شکل نقاط سفید رنگ ظاهر می گردند. مطالعات نشان داده است که ترونوت ها نسبت به سایر مراحل زندگی انگل، به ضد انگل های گیاهی (Chu et al., 2010; Ling et al., 2012) و شیمیایی (Buchmann et al., 2003) حساس ترند. بنابراین، یافتن داروهایی که بر مرحله ترونوت اثر می گذارند، از اهمیت بیشتری برخوردار است. اما استفاده از مواد شیمیایی در درمان ماهی ها باید با احتیاط همراه باشد. برای مثال، استفاده از مالاشیت سبز به دلیل تراژدن بودن و ماندگاری زیاد در اکوسیستم منع شده است (Yao et al., 2010). ایمن بودن فرمالین که تنها ماده شیمیایی مورد تأیید FDA است (Bills et al., 1977)، به دمای آب وابسته است. زیرا در آب های گرم موجب کاهش اکسیژن می شود. سایر مواد مؤثر بر مرحله آزادزی ایک شامل پتاسیم پرمنگنات^۲، کلرامین تی^۳، کلروفیلین، سولفات مس،

سدیم کلراید^۴، نیترات نقره، سدیم پرکربنات^۵ و متیلن بلو^۶ است (Van Duijn, 1967; Farley and Heckemann, 1980; Schlenk et al., 1998; Buchmann et al., 2003; Hader et al., 2016; Marchiori et al., 2017; Mamun et al., 2020).

در حال حاضر، هیچ داروی شیمیایی برای درمان ایک در ماهی های خوراکی تأیید نشده است و هر کدام محدودیت های خاص خود را دارند. به طور کلی، اخیراً استفاده از گیاهان در درمان بیماری های آبزیان مورد توجه بوده است زیرا دارای ترکیبات دارویی ارزشمند بوده و مقرون به صرفه هستند و عوارض زیست محیطی به دنبال ندارند. از سوی دیگر، در مقایسه با داروهای شیمیایی موجب مقاومت نمی شوند. تاکنون اثرات گیاهانی از جمله، *Magnolia officinalis* (Song et al., 2018)، برگ به لیمو (Soares et al., 2016)، *Carica papaya* و *Mucuna pruriens* (Ekanem et al., 2004)، عصاره سیر و بابونه (Gholipour-kanani et al., 2012)، *Terminalia catappa* (Yazdani et al., 2021) و *Zataria Multiflora* (Rahmati-Holasoo et al., 2021) و نیز گیاهان شمع دانی و اسطوخدوس (Raissy et al., 2020) و مامیران کبیر (Alijanpour et al., 2022) علیه انگل ایک مطالعه شده اند.

چای، یک گیاه مهم تجاری است که در بیش از ۳۰ کشور دنیا تولید می شود و در تمام دنیا به عنوان یک آشامیدنی تهیه شده از برگ های عمل آوری شده مصرف می شود. آنچه امروزه چای زراعی نامیده می شود با نام علمی *Camellia sinensis* Theaceae (L) O.kuntz و از گیاهان گلدار متعلق به خانواده است. طبق طبقه بندی Barua (۱۹۶۳) چای از لحاظ مورفولوژیک و جغرافیایی به سه دسته چینی، آسامی و کامبوجی تقسیم می شود. چای زراعی چینی (*Camellia sinensis*) بیشتر در چین، ژاپن، ایران و ترکیه کشت می شود و دارای مشخصات ذیل می باشد: حجم بوته متوسط، ساقه های متعدد و منشعب از یک محل، برگ های قائم با طول ۱۰-۱/۵ سانتی متر و عرض ۲/۵-۱ سانتی متر به رنگ سبز روشن که برای تولید چای سبز، سیاه، سفید و اولانگ به کار می رود.

⁴ Sodium chloride

⁵ Sodium percarbonate

⁶ Methylene blue

¹ *Ichthyophthirius multifiliis*

² Potassium permanganate

³ Chloramine-T

اثر غلظت‌های مختلف از عصاره اتانولی چای سبز در کاهش بار آلودگی انگل ایک در ماهیان گلدفیش است.

مواد و روش‌ها

ابتدا به منظور تهیه عصاره الکلی چای سبز، برگ‌های تازه چایی از مزارع لاهیجان تهیه و در دمای اتاق خشک گردید. سپس ۵۰۰ گرم از پودر تهیه شده با ۲/۵ لیتر اتانول ۹۹/۸ درصد به مدت یک‌روز روی شیکر مخلوط شد. مخلوط به‌دست آمده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ رد شد و با دستگاه تبخیر روتاری تحت کاهش فشار و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ گردید. عصاره به‌دست آمده تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد (Batiha et. al., 2019).

سپس ماهیان گلدفیش انگشت‌قد به ظاهر سالم از استخر پرورشی در شهر رشت خریداری شدند. این ماهیان به مدت دو هفته در تانک‌های ۹۰ لیتری دارای پمپ و سنگ هوا قرنطینه شده و از نظر هر نوع بیماری انگلی و غیرانگلی مورد بررسی قرار گرفتند. طی این مدت، گستره دمایی 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و پی‌اچ 6.9 ± 0.4 بود. همچنین از یک مرکز فروش ماهیان زینتی در تهران، تعدادی ماهی گلدفیش با آلودگی شدید به انگل ایک خریداری شدند. آلوده بودن ماهی‌ها با مشاهده نقاط سفید روی بدن آنها و تهیه لام مرطوب و بررسی در زیر میکروسکوپ نوری تأیید شد.

به روش تماس مستقیم بین ماهی‌های آلوده و بیمار، جمعیت ماهیان آلوده افزایش داده شد. وزن و طول کل (از نوک پوزه تا انتهای باله دم) در تمامی ماهی‌ها اندازه‌گیری شد.

برای ارزیابی اثر عصاره در درمان انگل، چهار تیمار درمانی (0.25 ، 0.2 ، 0.15 و 0.125 گرم بر لیتر عصاره چای سبز) و گروه کنترل منفی (فاقد عصاره چای سبز) در نظر گرفته شد. هر تیمار سه بار تکرار شد و در هر تکرار، تعداد هشت عدد ماهی گلدفیش انگشت‌قد آلوده به انگل ایک قرار داده شد. سپس تعداد انگل‌های بالغ و نابالغ در ۵ فیلد میکروسکوپی به‌دست آمده از لام مرطوب سرتاسری در هر ماهی (Suzuki et. al., 2006) و تعداد نقاط سفید روی بدن و باله‌ها، پیش از شروع آزمایش، ۲۴ ساعت پس‌از مواجهه و ۷ روز پس‌از مواجهه با غلظت‌های درمانی شمارش و ثبت گردید. همچنین طی هفت روز، تعداد ماهی‌های مرده و زنده ثبت شد.

چای سبز، سیاه، سفید و اولانگ پردازش متفاوتی دارند و در نتیجه، میزان اکسیداسیون در آنها متفاوت است. چای سبز نوع غیرتخمیری چای است که نسبت به چای سیاه و اولانگ کاتکین‌های بیشتری دارد. همچنین برخی از مواد معدنی و ویتامین‌های موجود در چای سبز، موجب افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانتی آن شده است. به طور کلی، برگ‌های تازه چایی حاوی کافئین (۳/۵ درصد از وزن خشک)، تئوبرومین ($15/2 - 0/0$ درصد)، تئوفیلین ($0/04 - 0/02$ درصد)، متیل‌گزانتین‌ها، لیگنین (۶/۵ درصد)، اسیدهای ارگانیک (۱/۵ درصد)، کلروفیل (۰/۵ درصد)، تانن (۴ درصد) و آمینواسیدهای آزاد (۱-۵/۵ درصد) است. فلاون‌ها، اسیدهای فنولیک، کربوهیدرات‌ها، آلکالوئیدها، مواد معدنی، ویتامین‌ها و آنزیم‌ها از سایر مواد موجود در برگ چای هستند (Sena et. al., 2020; Boudou et. al., 2021). چای همچنین دارای فلاونول‌هاست که اساساً شامل کورستین، کامفرول، میریستین و گلیکوزیدهای آنها می‌باشد. خواص ضدویروس، آنتی‌اکسیدانت، ضدقارچ و ضدتومور چای سبز (Suganuma et. al., 2016; Olson et. al., 2020; Brindha et. al., 2021; Hurst et. al., 2021) به طور عمده مربوط به پلی‌فنول‌هاست که عمده‌ترین آنها کاتکین‌ها هستند. کاتکین‌ها ۲۵-۳۵ درصد از وزن خشک برگ چای را تشکیل می‌دهند و شامل (+) کاتکین، (-) اپی‌کاتکین، (+) گالوکاتکین، (-) اپی‌کاتکین‌گالات، (-) اپی‌گالوکاتکین، و (-) اپی‌گالوکاتکین‌گالات (EGCG) است (Wanasundara and Shahidi, 2005). مطالعات نشان داد، چای سبز و مشتقات آن همچون EGCG در درمان انگل‌های آبزیان مثل *Cryptocaryon irritans* (Picon-Camacho et. al., 2011)، *Ichthyobodo necator* (Suzuki et. al., 2006)، و *Kodua septempunctata* (Shin et. al., 2020) مؤثر بوده است. از سویی، تانن‌ها که جزئی از مواد تشکیل‌دهنده چای سبز هستند (۴ درصد)، به طور جداگانه بر انگل ایک اثرگذار می‌باشند (Alavinia et. al., 2018; Alavinia et. al., 2019).

از آنجایی که تاکنون اثر ترکیبات چای سبز بر انگل ایک در ایران و جهان بررسی نشده است، هدف مطالعه حاضر بررسی

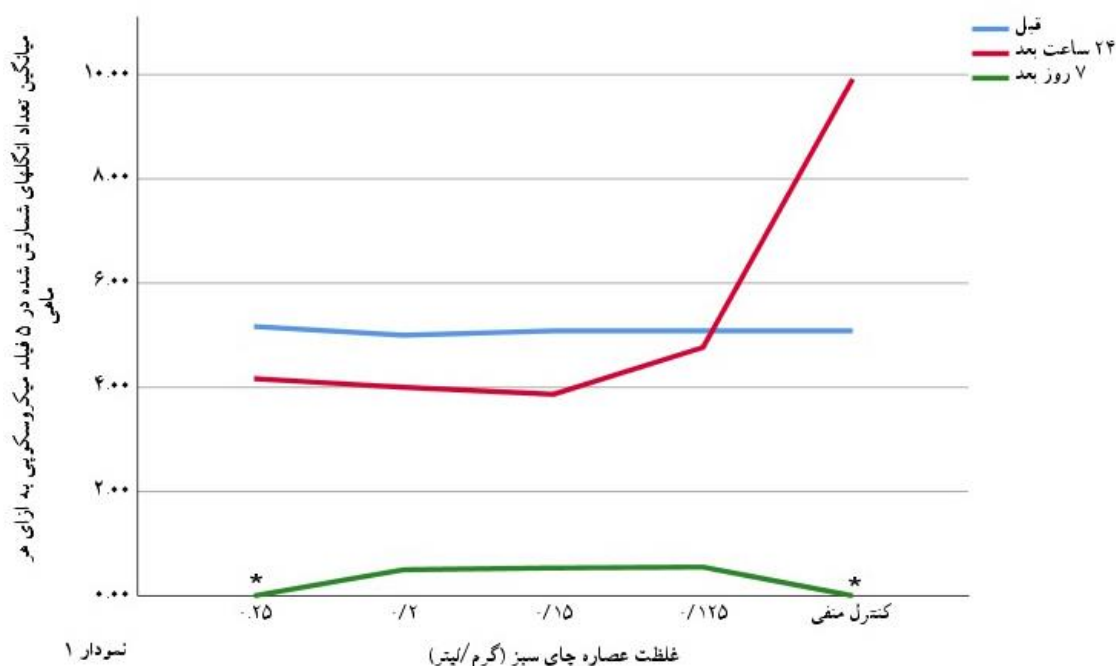
در نهایت داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ تجزیه و تحلیل و به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شدند. احتمالات ۰/۰۵ درصد و کمتر از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

نتایج

وزن ماهی‌ها به طور میانگین $2/228 \pm 0/472$ گرم و طول کل به طور میانگین $5/296 \pm 2/096$ سانتی‌متر بود. پیش از شروع آزمایش، تعداد انگل‌های یک به ازاء هر ماهی زیر میکروسکوپ در تمامی گروه‌ها $5/375 \pm 1/375$ عدد و تعداد نقاط سفید روی بدن هر ماهی نیز $8/187 \pm 2/187$ عدد بود.

پس از گذشت ۲۴ ساعت مواجهه ماهی‌های آلوده با غلظت‌های مختلف چای سبز، میانگین تعداد انگل‌های شمارش شده در ۵ فیلد میکروسکوپی به ازاء هر ماهی به طور معنی‌داری کمتر از

گروه کنترل بود (شکل ۱ و جدول ۱). همچنین میانگین تعداد انگل‌های شمارش شده در ۵ فیلد میکروسکوپی به ازاء هر ماهی در گروه کنترل نسبت به پیش از آزمایش افزایش داشت. دوز ۰/۱۲۵ گرم در لیتر نیز با سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌دار داشته و میانگین تعداد انگل‌ها در این تیمار پس از ۲۴ ساعت، بیشتر از سایر تیمارها بوده است. در همین زمان، میانگین تعداد نقاط سفید به ازاء هر ماهی در تیمار ۰/۲۵ گرم در لیتر کمترین عدد و در گروه کنترل منفی بیشترین عدد را نشان می‌دهد (شکل ۲).

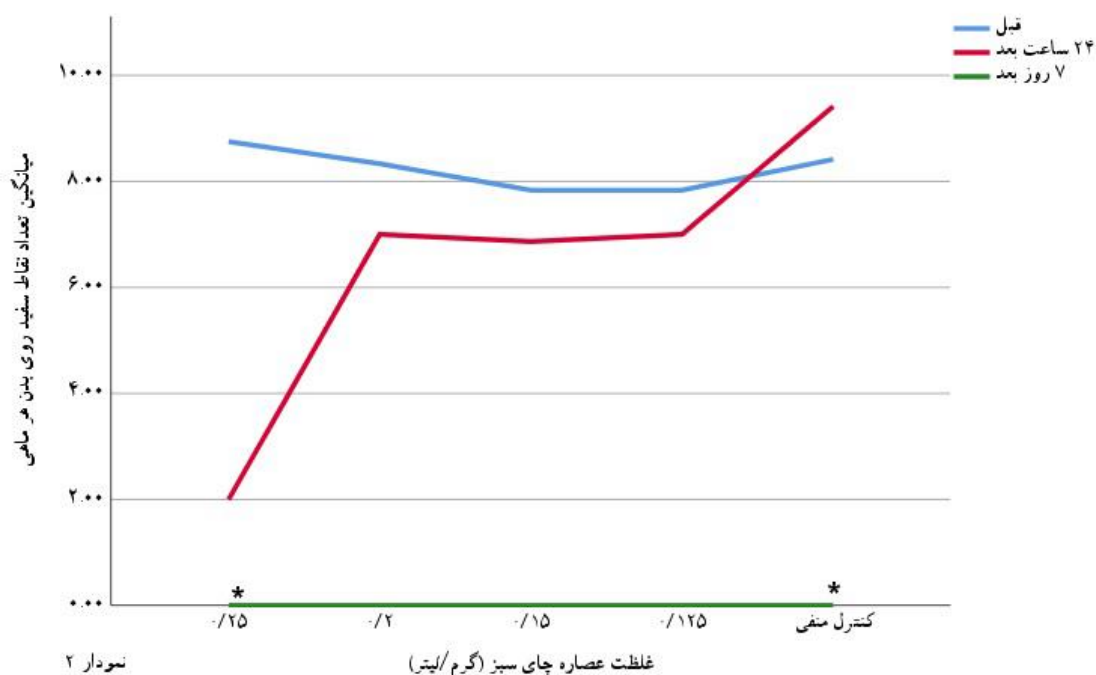


شکل ۱: میانگین تعداد انگل‌های شمارش شده در ۵ فیلد میکروسکوپی در هر لام مرطوب به ازاء هر ماهی در قبل، ۲۴ ساعت بعد و ۷ روز پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف چای سبز. * به علت مرگ تمامی ماهی‌ها پس از ۷ روز در این گروه‌ها، تعداد انگل‌ها بررسی نشد.

جدول ۱: میانگین تعداد دانه‌های سفید روی بدن هر ماهی، میانگین تعداد انگل‌های مشاهده شده در ۵ فیلد میکروسکوپی در لام مرطوب اخذ شده از هر ماهی، و میزان مرگ و میر ماهیان پس از ۲۴ ساعت.

میزان مرگ و میر ماهی ها (به درصد)	میانگین تعداد انگل در بررسی ۵ فیلد میکروسکوپی هر ماهی	میانگین تعداد دانه های سفید شمارش شده روی بدن هر ماهی	غلظت های مورد آزمایش چای سبز (گرم / لیتر)
۵۰	$4/16 \pm 0/16^a$	2 ± 0^a	۰/۲۵
۴۱/۶۶	4 ± 0^a	7 ± 0^b	۰/۲
۲۵	$3/86 \pm 0/13^a$	$6/86 \pm 0/13^b$	۰/۱۵
۲۵	$4/76 \pm 0/23^b$	7 ± 0^b	۰/۱۲۵
۳۳/۳۳	$9/91 \pm 0/22^c$	$9/4 \pm 3^c$	کنترل منفی

^a، ^b، ^c اعداد با حروف متفاوت، نسبت به یکدیگر معنی‌دار می‌باشند ($p < 0.05$).



شکل ۲: میانگین تعداد نقاط سفید شمارش شده در سطح بدن به ازاء هر ماهی در قبل، ۲۴ ساعت بعد و ۷ روز پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف چای سبز.

* به علت مرگ تمامی ماهی‌ها پس از ۷ روز در این گروه‌ها، تعداد نقاط سفید بررسی نشد.

روز هفتم، در تیمارهای ۰/۲، ۰/۱۵ و ۰/۱۲۵ با یکدیگر تفاوت معناداری نداشت. همچنین هیچ نقطه سفیدی در سطح بدن ماهی‌های تحت تیمارهای مذکور مشاهده نشد. از سویی، کمترین درصد تلفات در تیمار ۰/۱۲۵ گرم بر لیتر ثبت شد.

براساس جدول ۲، پس از گذشت ۷ روز مواجهه با غلظت‌های مختلف عصاره الکلی چای سبز، تمامی ماهیانی که در معرض غلظت ۰/۲۵ گرم در لیتر بودند و تمامی ماهیان در گروه شاهد (بدون عصاره) تلف شدند. همچنین میانگین تعداد انگل‌های شمارش شده به ازاء هر ماهی زیر میکروسکوپ در

جدول ۲: میانگین تعداد دانه‌های سفید روی بدن هر ماهی، میانگین تعداد انگل‌های مشاهده شده در ۵ فیلد میکروسکوپی در لام مرطوب اخذ شده از هر ماهی، و میزان مرگ و میر ماهیان پس از ۷ روز

میزان مرگ و میر ماهی‌ها طی مدت آزمایش (به درصد)	تعداد انگل در بررسی میکروسکوپی	تعداد دانه های سفید	غلظت های مورد آزمایش چای سبز (گرم / لیتر)
۱۰۰	-*	-*	۰/۲۵
۵۸/۳	۰.۵±۰.۳ ^a	۰.±۰.۳ ^a	۰/۲
۳۳/۳۳	۰/۵۳±۰/۳ ^a	۰.±۰.۳ ^a	۰/۱۵
۲۵	۰/۵۵±۰/۱۱ ^a	۰.±۰.۳ ^a	۰/۱۲۵
۱۰۰	-*	-*	کنترل منفی

^a، ^b و ^c اعداد با حروف متفاوت، نسبت به یکدیگر معنی‌دار می‌باشند (p<0.05).

* به علت مرگ تمامی ماهی‌ها پس از ۷ روز در این گروه‌ها، تعداد نقاط سفید و انگل‌ها بررسی نشد.

بافت‌های گیاهی هستند. تانن‌ها که گزارش شده بر مرگ‌ومیر ترون‌های انگل ایک در آزمایشگاه اثر دارند (Alavinia et. al., 2018)، در چای سبز حضور دارند (Boudou et. al., 2021). همچنین طبق مطالعات، عمده خواص چای سبز مربوط کاتکین‌های موجود در آن است که متعلق به فلاونوئیدها هستند (Musial et. al., 2020).

بنابراین، در این مطالعه، اثر حمام با عصاره اتانولی چای سبز بر درمان ماهی‌های گلدفیش آلوده به انگل ایک طی ۷ روز بررسی شد. میانگین تعداد نقاط سفید روی بدن هر ماهی و میانگین تعداد انگل‌های شمارش شده در ۵ فیلد میکروسکوپی (Suzuki et. al., 2006) به ازاء هر ماهی در ۲۴ ساعت و ۷ روز پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف عصاره و نیز درصد مرگ‌ومیر ماهی‌ها پس از اتمام طول دوره درمان، به عنوان شاخص‌های تعیین‌کننده در اثربخشی عصاره در نظر گرفته شدند. نتایج مطالعه نشان داد، کمترین غلظت عصاره که توانست طی ۷ روز ماهی‌ها را درمان کند، غلظت ۰/۱۲۵ گرم در لیتر بود. در این تیمار کمترین میزان مرگ و میر ماهیان مشاهده شد.

Suzuki و همکاران (۲۰۰۶) که اثر حمام چای سبز بر *Ichthyobodo necator* در ماهی سالمون را بررسی کردند،

بحث و نتیجه‌گیری

گرچه تاکنون مطالعه‌ای در زمینه بررسی اثر حمام با عصاره اتانولی چای سبز در درمان ماهی‌های گلدفیش آلوده به انگل ایک انجام نشده است، اما مقالات موجود نشانگر مؤثر بودن چای سبز بر سایر انگل‌های آبزیان از جمله *Ichthyobodo necator* (Suzuki et. al., 2006)، *Cryptocaryon irritans* (Picon-Camacho et. al., 2011)، *Kudoa septempunctata* (Shin et. al., 2020) و همچنین *Babesia* در موش (Batiha et. al., 2019)، *Trypanosoma cruzi* (Rehman et. al., 2022) و *Mugil* (Paveto et. al., 2004) می‌باشد. از سویی، افزودن چای سبز به خوراک موجب افزایش ایمنی در ماهی *Wuhang cephalus* (Kakoolaki et. al., 2016) و *bream* شده است (Guo et. al., 2020). چای سبز بسیار در تقویت سیستم ایمنی ماهی کفشک زیتونی و مقاومت آن در برابر *Edwardsiella tarda* مؤثر است (Cho et. al., 2006).

فنول‌ها، مجموعه‌ای از پلیمرهای محلول (تانن‌ها) و مونومرها (اسیدهای فنولی و فلاونوئیدها) در عصاره‌های استخراجی از

نشان داد کاهش انگل روی آبشش‌ها وابسته به دوز است. در واقع، همانند نتایج حاصل از ۲۴ ساعت درمان با چای سبز در مطالعه حاضر، افزایش دوز عصاره موجب کاهش تعداد انگل‌ها شد. بیشترین کاهش نسبت به گروه کنترل در مطالعه چای سبز طی ۲۴ ساعت، مربوط به دوز ۰/۲۵ گرم در لیتر و در مطالعه *Macleaya cordata* مربوط به غلظت ۰/۹ میلی گرم در لیتر بود. گرچه در مطالعه آنها، برخلاف مطالعه حاضر، هیچ یک از غلظت‌های انتخابی گیاه مورد نظر موجب مرگومیر ماهی‌ها نشده بود.

محققان دیگری اثر سایر عصاره‌های گیاهی بر گونه‌های آلوده دیگری، به جز گلدفیش را نیز مورد مطالعه قرار داده‌اند. برای مثال، درمان ماهی‌های *Piaractus mesopotamicus* آلوده به ایک با عصاره *Melaleuca alternifolia* در غلظت ۵۰ میکرولیتر بر لیتر طی ۵ روز مؤثر بوده و موجب کاهش تعداد انگل در پوست و آبشش شده است (Valladão et. al., 2016). اثرگذاری این عصاره نزدیک به ۱۰۰ درصد بوده است. در این غلظت، ۵۳/۳۳ درصد ماهی‌ها زنده ماندند درحالی‌که همه ماهی‌ها در گروه کنترل منفی از بین رفتند. در مطالعه حاضر نیز ۷۵ درصد ماهی‌های در معرض غلظت ۰/۱۲۵ گرم در لیتر چای سبز، زنده ماندند و اثرگذاری این غلظت طی ۷ روز نزدیک به صد درصد بوده است. گرچه طول دوره درمان با چای سبز طولانی‌تر (۷ روز) از *Melaleuca alternifolia* بوده است.

یکی از مکانیسم‌های احتمالی تأثیر چای سبز بر مرگومیر انگل تریپانوزما، کاهش فعالیت آنزیم آرژنین‌کیناز به وسیله عصاره آبی *C. sinensis* بوده است (Paveto et. al., 2004). این آنزیم در متابولیسم انرژی انگل مؤثر است. همچنین مطالعات میکروسکوپی و رنگ‌آمیزی فلئورسنت انگل یک نشان داده است که تانن می‌تواند موجب تغییرات مورفولوژیک و تخریب غشاء پلاسمایی انگل یک شود (Alavinia et. al., 2018). همان‌طوری‌که پیشتر گفته شد، تانن‌ها ۴ درصد از وزن خشک چای سبز را تشکیل می‌دهند و این نیز به نوبه خود می‌تواند دلیلی برای از بین رفتن انگل یک به وسیله عصاره اتانولی چای سبز باشد.

با توجه به اینکه ۷۵ درصد ماهی‌های آلوده طی دوره درمان با غلظت ۰/۱۲۵ گرم در لیتر زنده ماندند و تأثیر این غلظت در

این ماده بر تعداد انگل‌ها روی باله‌ها و بدن ماهی‌ها اثر معنی‌دار داشت. همچنین حمام ماهی‌های بیمار با غلظت ۰/۰۳ درصد طی ۳۰ دقیقه موجب مرگومیر ۰/۰۸ درصد ماهی‌ها و حمام ۰/۶ درصد به مدت ۲/۵ دقیقه موجب مرگومیر ۰/۱۴ درصد آنها شد. بنابراین، حمام طولانی، ایمن‌تر بود. گرچه کارایی حمام کوتاه در کاهش تعداد انگل‌ها در سطح بدن بهتر بود. آنها به این نتیجه رسیدند که چای سبز برای درمان ماهی‌های سالمون آلوده به *I. necator* ایمن و مؤثر است. غلظت‌های انتخابی و طول مدت درمان در آنها کمتر از مطالعه حاضر بود. اما در بررسی حاضر نیز غلظت‌های زیاد چای سبز موجب مرگومیر بیشتری در ماهی‌های گلدفیش بیمار شد به‌طوری‌که تمام ماهی‌ها در تیمار ۰/۲۵ گرم در لیتر طی ۷ روز تلف شدند.

در مطالعه Ekanem و همکاران (۲۰۰۴) از عصاره‌های *Mucuna pruriens* (حمام ۷۲ ساعته) و *Carica papaya* (حمام ۹۶ ساعته) به میزان ۲۰۰ میلی گرم در لیتر علیه ایک در گلدفیش استفاده کردند و تعداد انگل‌ها ۹۰ درصد کاهش یافت. غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر (۰/۲ گرم در لیتر) از عصاره چای سبز در مطالعه حاضر طی ۷ روز ۱۰۰ درصد دانه‌های سفید روی بدن ماهی‌ها را از بین برد و میانگین تعداد انگل‌های میکروسکوپی به ازاء هر ماهی را به $0.5 \pm$ عدد رساند. گرچه نتایج این گروه در انتهای آزمایش، با نتایج غلظت‌های ۰/۱۵ و ۰/۱۲۵ تفاوت معنی‌داری نداشت. اما درصد مرگومیر ماهی‌ها در این گروه، بیش از دو گروه دیگر بود.

همچنین دو ماده به نام‌های chelerythrine و chloroxylinone را از گیاه *Toddalia asiatica* استخراج و اثر آن بر انگل ایک در گلدفیش بررسی کردند (Shan et. al., 2014). آنها ماهی‌های آلوده را به مدت ۷۲ ساعت در معرض غلظت‌های مختلف قرار دادند. هیچ یک از این دو ماده، بر خلاف مطالعه حاضر، موجب مرگومیر ماهیان نشد. میانگین تعداد تروفونت‌ها در هر ماهی آلوده در تیمار ۱/۸ میلی گرم بر لیتر chelerythrine و ۸ میلی گرم بر لیتر chloroxylinone کمترین عدد را نسبت به گروه کنترل نشان داد.

در مطالعه Yao و همکاران (۲۰۱۰) تعداد مرگومیر ماهی‌های کپور و تعداد انگل‌های ایک روی آبشش آنها پس از ۴۸ ساعت درمان با عصاره *Macleaya cordata* را بررسی کردند. نتایج

Batiha, G.E.S., Beshbishy, A.M., Tayebwa, D.S., Shaheen, H.M., Yokoyama, N., Igarashi, I., 2019. Inhibitory effects of *Syzygium aromaticum* and *Camellia sinensis* methanolic extracts on the growth of *Babesia* and *Theileria* parasites. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(5): 949-958.

Bills, T.D., Marking, L.L. and Chandler, J.H., 1977. Malachite green: its toxicity to aquatic organisms, persistence, and removal with activated carbon. *Investigation in Fish Control*, 75: 1-6.

Boudou, F., Belakredar, A., Zaoui, O., Sehmi, A. and Ghomid, K., 2021. Phytochemical, antioxidant and antibacterial properties of *Camellia sinensis*. *Journal of Experimental Research*, 9(4).

Brindha, T., Ramasamy, R., Sivakumar, D., 2021. Antibacterial, Antifungal and Anticorrosion Properties of Green Tea Polyphenols Extracted Using Different Solvents. *Asian Journal of Biological Sciences*, 10(1): 63.

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

Cho, S.H., Lee, S.M., Park, B.H., Ji, S.C., Kwon, M.G., Kim, Y.C., Lee, J.H., Park, S.E. and Han, H.K., 2006. Effect of dietary inclusion of various sources of green tea on the immune system and challenging test of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Aquaculture*, 19(2): 84-89.

حذف آلودگی انگلی نزدیک به ۱۰۰ درصد بوده است، لذا می‌توان پیشنهاد داد که غلظت ۰/۱۲۵ گرم در لیتر از عصاره اتانولی چای سبز می‌تواند با احتیاط در درمان ماهیان آلوده به ایک به کار رود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از آقای دکتر علیرضا نصیری بابت مساعدت‌های ایشان در انجام تجزیه و تحلیل آماری این مقاله تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

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 Disease*, 41(12): 1793-1802. doi: 10.1111/jfd.12886

Alavinia, S.J., Mirzargar, S.S., Rahmati-Holasoo, H. and Ebrahizadeh Mousavi, H.A., 2019. In vitro investigation of short-term antiparasitic effect of Tannic acid on *Ichthyophthirius multifiliis* theronts. *Journal of Veterinary Research*, 74(2): 219-227. doi: 10.22059/JVR.2019.244686.2720

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.

Barua, P.K., 1963. Classification of the tea plant. *Two Bud*, 10: 3-11.

- Chu, C., Zhang, Q.Z. and Luo, F., 2010. Effect of twenty Chinese herbal medicines on killing trophonts, cysts and theronts of *Ichthyophthirius multifiliis* in vitro. *Freshw Fish*, 40(1): 55-60.
- Dickerson, H.W. and Dawe, D., 2006. *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans*. In: 2nd ed. *Fish disease and disorders*. pp. 116-153, CABI, Oxfordshire, UK.
- Ekanem, A.P., Obiekezie, A., Kloas, W. and Knopf K., 2004. Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabacea) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitology Research*, 92(5): 361-366.
- Farley, O.G. and Heckemann, R., 1980. Attempts to control *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet (Ciliophora: Ophryoglenidae) by chemotherapy and electrotherapy. *Journal of Fish Disease*, 3(3): 203-212.
- Gholipour-Kanani, H., Sahandi, J. and Taheri, A., 2012. Influence of Garlic (*Allium sativum*) and Mother worth (*Matricaria chamomilla*) Extract on *Ichthyophthirius multifiliis* Parasite Treatment in Sail Fin Molly (*Poecilia latipinna*) Ornamental Fish. *APCBEE Procedia*, 6-11.
- Guo, H., Lin, W., Wang, L., Zhang, D., Wu, X., Li, L., Li, D., Tang, R., Yang, L. and Qiu, Y., 2020. The supplementation of dietary selenium yeast and green tea-derived polyphenols improves antioxidant capacity and immune response in juvenile Wuchang bream under ammonia stress. *Aquaculture*, 51(9): 3790-3803.
- Häder, D.P., Schmidl, J., Hilbig, R., Oberle, M., Wedekind, H. and Richter, P.R., 2016. Treatment of ichthyophthiriasis with photodynamically active chlorophyllin. *Parasitology Research*, 115(4): 1509-1517.
- Hilario, J.A., Choresca, Jr C.H., Danting, M.J.C., Ca-as, C.G.P., Gente, A.A., Magbanua, F.L.T. and Oclo, M. T.T., 2020. A case report of *Ichthyophthirius multifiliis* infection causing mortality on tank-cultured tropical freshwater eels, *Anguilla marmorata* and *Anguilla bicolor pacifica*. *Aquaculture*, 51(11): 4814-4818.
- Hurst, B.L., Dickinson, D. and Hsu, S., 2021. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits SARS-CoV-2 infection in primate epithelial cells:(a short communication). *Microbiology and Infectious Diseases*, 5(2).
- Kakoolaki, S., Akbary, P., Zorriezhahra, M.J., Salehi, H., Sepahdari, A., Afsharnasab, M., Mehrabi, M.R. and Jadgal, S., 2016. *Camellia sinensis* supplemented diet enhances the innate non-specific responses, haematological parameters and growth performance in *Mugil cephalus* against *Photobacterium damsela*. *Fish and Shellfish Immunology*, 57: 379-385.
- Lahnsteiner, F. and Weismann, T., 2007. Treatment of ichthyophthiriasis in rainbow trout and common carp with common and alternative therapeutics. *Journal of Aquatic Animal Health*, 19(3): 186-94.
- Ling, F., Wang, J.G., Lu, C., Wang, G.X., Lui, Y.H. and Gong, X.N., 2012. Effects of aqueous extract of *Capsicum frutescens* (Solanaceae) against the fish ectoparasite

- Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitology Research*, 111(2): 841-848.
- Mamun, M.A.A., Nasren, S., Srinivasa, K.H., Rathore, S.S., Abhiman, P.B. and Rakesh, K., 2020.** Heavy infection of *Ichthyophthirius multifiliis* in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*, Sauvage 1878) and its treatment trial by different therapeutic agents in a control environment. *Journal of Applied Aquaculture*, 32(1): 81-93.
- Marchiori, N.D.C., Silva, F.M., Martins, M.L., Amaral, H. and Silva, B.C.D., 2017.** Hydrogen peroxide and chlorine dioxide against parasite *Ichthyophthirius multifiliis* (Protozoa, Ciliophora) in jundiá fingerlings. *Ciênc Rural*, 47.
- Musial, C., Kuban-Jankowska, A. and Gorska-Ponikowska, M., 2020.** Beneficial properties of green tea catechins. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5): 1744.
- Olson, K.R., Briggs, A., Devireddy, M., Iovino, N.A., Skora, N.C., Whelan, J. and Feelisch, M., 2020.** Green tea polyphenolic antioxidants oxidize hydrogen sulfide to thiosulfate and polysulfides: A possible new mechanism underpinning their biological action. *Redox Biology*, 37: 101731.
- Paveto, C., Güida, M.C., Esteva, M.I., Martino, V., Coussio, J., Flawiá, M.M. and Torres, H.N., 2004.** Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of Green Tea (*Camellia sinensis*) Catechins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1): 69-74.
- Picón-Camacho, S.M., De Ybáñez, M.R., Holzer, A.S., Arizcun, M. and Muñoz, P., 2011.** in vitro treatments for the theront stage of the ciliate protozoan *Cryptocaryon irritans*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 94(2): 167-172.
- Rahmati-Holasoo, H., Javadi Musavi, M.S., Ebrahimzadeh Musavi, H.A., Mirzargar, S.S. and Taheri Mirghaed, A., 2021.** Effect of ethanol extract of *Zataria Multiflora* on *Ichthyophthirius multifiliis* tomons and theronts in *Danio rerio*. *Journal of Veterinary Research*, 76(2): 205-214. doi: 10.22059/jvr.2019.283809.2946
- Raissy, M., Keyhani, K. and Pirali, K., 2020.** Comparison of the effects of geranium, lavender and garlic extracts on *Ichthyophthirius multifiliis* in naturally infected *Capoeta damascina*. *Journal of Animal Environment*, 12(4): 123.
- Rehman, H., Shah, M., Shinwari, Z.K., Ali, W., Zaman, N., Khan, Z.N., AAsim, M., Bibi, N.S. and Ayaz, M., 2022.** total phenolic-flavonoid contents, anti-Leishmanial, antimicrobial, and antioxidant potentials of Pakistani tea brands and tea plant *Camellia sinensis*. *Pakistan Journal of Botany*, 54(2): 667-673.
- Schlenk, D., Gollon, J.L. and 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.
- Sena, G., Nath, M., Sarkar, N. and Maity, S., 2020.** Bioactive components of tea. *Archive of Food and Nutritional Sciences*, 4(1): 001-009.
- Shan, X.F., Kang, Y.H., Bian, Y., Gao, Y.H., Wang, W.L. and 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.
- Shin, S.P., Hong, H.K., Jin, C.N., Sohn, H., Choi, K.S. and Lee, J., 2020.** Effect of Epigallocatechin Gallate on Viability of *Kudoa septeppunctata*. *Korean Journal of Parasitology*, 58(5): 593.
- Soares, B.V., Neves, L.R., Oliveira, M.S.B., Chaves, F.C.M., Dias, M.K.R. and Chagas, E.C., 2016.** Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. *Aquaculture*, 452: 107-114.
- Song, C., Song, K., Wu, X., Tu, X., Qi, X., Wang, G. and Ling, F., 2018.** Antiparasitic efficacy and safety assessment of magnolol against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish. *Aquaculture*, 486: 9-17.
- Suganuma, M., Takahashi, A., Watanabe, T., Iida, K., Matsuzaki, T., Yoshikawa, H.Y. and Fujiki, H., 2016.** Biophysical approach to mechanisms of cancer prevention and treatment with green tea catechins. *Molecules*, 21(11): 1566.
- Suzuki, k., Misaka, N. and Sakai, D.K., 2006.** Efficacy of green tea extract on removal of the ectoparasitic flagellate *Ichthyobodo necator* from chum salmon, *Oncorhynchus keta*, and masu salmon, *O. masou*. *Aquaculture*, 295(1-4): 17-27.
- Valladão, G.M.R., Gallani, C.V., Ikefuti, C., Da Cruz, N., Levy-Pereira, M.V.N. and Rodrigues, F. Pilarski., 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
- Van Duijn, C. Jnr., 1967. Diseases of Fishes. 2nd ed.** Illiffe Books, London, UK. 270P.
- Wahli, T. and Meier, W., 1987.** The occurrence and significance of *Ichthyophthirius multifiliis* in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 129(4): 205-213.
- Wanasundara, P.K.P.D. and Shahidi, F., 2005.** Antioxidants: science, technology, and applications in Bailey's Industrial Oil and Fat Products. In: Edible Oil and Fat Products Chemistry Properties and Health Effects. (Ed.by Shahidi, F.), John Wiley & Sons, New Jersey. USA. pp. 431-489
- Yao, J.Y., Shen, J.Y., Li, X.L., Xu, Y., Hao, G.J., Pan, X.Y., Wang, G.X. and Yin, W.L., 2010.** Effect of sanguinarine from the leaves of *Macleaya cordata* against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Parasitology Research*, 107(5): 1035-1042.
- Yazdani Anaraki, E., Mirzargar, S.S., Rahmati-Holasoo, H., Sharifzadeh, A. and Ebrahimzadeh 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. doi: 10.22092/ijfs.2021.124565

Study of ethanolic extract of green tea (*Camellia sinensis*) on the treatment of white spot disease in goldfish (*Carassius auratus*)

Shahbazi M.¹; Rahmati-Holasoo H.^{1,3*}; Ebrahimzadeh Mousavi H.¹; Mirzargar S.S.¹; Sharifzadeh A.²

*rahmatih@ut.ac.ir

1- Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

2- Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

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

Abstract

Ichthyophthirius multifiliis (Ich) is likely to cause more damage to freshwater aquarium fish than other eukaryotic pathogens. Due to the reported side effects and environmental effects, scientists are trying to replace chemicals with plant extracts to treat this parasite. In this study, the effect of ethanolic extract of green tea (*Camellia sinensis*) in the treatment of fish infected with the Ich parasite was investigated. In this study, the effect of different dilutions (0.25, 0.2, 0.15, and 0.125 gr / l) of ethanolic extract of green tea on the average number of white spots on the body of each fish and also the average number of microscopic parasites per fish before, 24 hours later and also 7 days after exposure of infected fish to the extract was studied. After 7 days of treatment, the average number of white spots on the body per fish and the average number of parasites counted in 5 microscopic fields per fish, were not significantly different in 0.2, 0.15, and 0.125 gr/l groups. Among the three treatments, the lowest percentage of mortality during 7 days was related to the concentration of 0.125 gr/l (25 percent). Also, all fish died at 0.25 gr/l and the negative control groups. The results revealed that 75 percent of infected fish survived during treatment with 0.125 gr/L of green tea ethanolic extract, and the efficacy of the mentioned concentration for removal of parasites from fins and skin was near 100 percent. Therefore, it can be concluded that this concentration can be used with caution for the treatment of fish infected with *Ichthyophthirius multifiliis*.

Keywords. Green tea, *Ichthyophthirius multifiliis*, Treatment, Alcoholic extract, Trophont.