

## اندازه‌گیری میزان غلظت نیمه‌کشنده اسانس آویشن باغی در ماهی قزل‌آلا

امیر شفیقی<sup>۱</sup>، مجتبی شکراله زاده طالشی<sup>۱\*</sup>، جلال حسن<sup>۲</sup>، اشکان زرگر<sup>۳</sup>

۱. گروه شیمی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه مازندران، بابلسر

۲. گروه سم‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران

۳. گروه آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۷/۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۳

### چکیده

امروزه اهمیت استفاده از گیاهان دارویی در مبارزه با بیماری‌های عفونی و غیر عفونی کاملاً آشکار بوده و لزوم جایگزینی آنها با داروهای شیمیایی به دلیل خواص چندگانه آنها در پیش‌گیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها به‌ویژه در صنعت آبزی‌پروری ضروری به نظر می‌رسد. این مطالعه با هدف بررسی سمیت حاد (LC<sub>50-96h</sub>) اسانس آویشن باغی در بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان اجرا شد. به منظور مطالعه تأثیرات این اسانس، تعداد ۸۰ بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با میانگین وزنی ۱۰±۰/۵ در تانکرهای ۹ لیتری در معرض غلظت‌های مختلف اسانس آویشن باغی قرار گرفتند و تلفات بصورت روزانه بر اساس روش OECD و در مدت زمان ۹۶ ساعت اجرا شد. سپس سمیت حاد اسانس آویشن باغی با استفاده از نرم‌افزار پروبیت محاسبه و غلظت ۴/۴ ppm تعیین گردید. باتوجه به نمودار تغییرات غلظت اسانس و رفتارهای بالینی ماهی‌ها می‌توان نتیجه گرفت که اسانس آویشن باغی با تغییر خواص فیزیکی آب و کاهش میزان اکسیژن آب، سیستم اکسیژن‌رسانی ماهی را مختل کرده و مرگ آنها را سبب می‌شود.

**واژگان کلیدی:** اسانس آویشن باغی، قزل‌آلای رنگین کمان، غلظت نیمه‌کشنده، سمیت مزمن

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: ms.taleshi@umz.ac.ir

## ۱. مقدمه

شیوع بیماری‌های عفونی یکی از عوامل اصلی ضررهای سنگین در صنعت آبی‌پروری متراکم است. معمولاً کنترل بیماری‌های عفونی توسط آنتی‌بیوتیک صورت می‌گیرد که این خود سبب ایجاد مقاومت در پاتوژن‌ها می‌گردد. یکی دیگر از روش‌های مقابله با بیماری‌های عفونی استفاده از واکسن‌هاست که به دلیل سیستم ایمنی ضعیف ماهی نسبت به سایر مهره‌داران، کاربرد زیادی ندارد. نتیجه تحقیق Dehghan و همکاران (2015) نشان داد که استفاده از محرک‌های ایمنی، رشد ماهیان و مقاومت آن‌ها به بیماری در آبی‌پروری را بهبود می‌بخشد. محرک‌های ایمنی گیاهی سبب افزایش ایمنی ذاتی، آنزیم لیزوزیم، قدرت باکتری‌کشی و تعداد گلبول‌های سفید می‌گردد.

موضوع رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن و اثرات آن‌ها بر سیستم‌های بیولوژیک یکی از مباحث مهم در علوم دامپزشکی و پزشکی است. این‌گونه‌ها سبب تخریب ملکول‌های حیاتی نظیر پروتئین‌ها می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌ها قادرند سیستم بیولوژیک را در برابر این عوامل محافظت نمایند. در این راستا Zarban و همکاران (2004) تحقیق کردند که برخی از گیاهان دارویی که سرشار از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند، می‌توانند فعالیت رادیکال‌های آزاد را خنثی نمایند. بنابراین توصیه می‌شود که این گیاهان به‌عنوان عامل پیش‌گیری از بیماری‌های مختلف یا برای درمان بعضی از بیماری‌ها جایگزین بخشی از داروهای شیمیایی یا کلیه آنها شوند.

در اقتصاد پرورش ماهی این نکته از اهمیت بالایی برخوردار است که در طول زمان کوتاه علاوه بر رشد سریع ماهی و افزایش وزن آن، گونه آبی در برابر عوامل بیماری‌زا مقاومت نشان دهد. در این راستا Firouzbakhsh و همکاران (2015)، Asadi و همکاران (2016) و Salimian و همکاران (2017) به ترتیب اثر گیاهان درمنه شیرین، سیاه دانه و زنجبیل بر روی ماهی را بررسی و تحقیق نمودند. لذا برخی از گیاهان

دارویی علاوه بر افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، نرخ رشد روزانه و ضریب تبدیل غذایی، تقویت سیستم دفاعی را نیز سبب می‌شود.

بروز استرس و درد در طی فرایند‌های مختلف از جمله حمل‌ونقل، عملیات تشخیصی، تکثیر مصنوعی، معاینات بهداشتی و غیره می‌توانند در صنعت آبی‌پروری، آسیب جدی به گونه آبی وارد آورند. لذا قبل از انجام فرایند‌های فوق به منظور آرامش و کاهش استرس بهتر است ماهی در حالت بیهوشی به سر برود. در این راستا استفاده از داروهای شیمیایی نسبتاً گران بوده، دسترسی آسان به آن‌ها در تمامی کشورها امکان پذیر نیست و همچنین این ترکیبات دارای برخی اثرات جانبی طولانی‌مدت نیز هستند. لذا استفاده از داروهای بیهوشی گیاهی مناسب و قابل‌دسترس، ارزان و غیر شیمیایی مورد توجه قرار گرفت. به‌عنوان مثال، تا کنون اثرات بیهوشی قابل قبول عصاره گیاهان سنبل‌الطیب، بادرنجبویه، خشخاش و شقایق بر ماهی قرمز گزارش شده است. در این راستا گروه تحقیقاتی Mousavi و همکاران (2013) به‌صورت عملیاتی سمیت و غلظت نیمه کشندگی ( $LC_{50-96h}$ ) داروی گیاهی اوژنول تهیه شده از عصاره گل میخک بر ماهی بنی را گزارش نمودند. این گیاه در صنعت آبی‌پروری برای کاهش تنش، بیهوشی و آرام بخشی استفاده می‌شود. نتایج تحقیق فوق نشان داد که غلظت‌های ۱ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب موجب آرام بخشی و القای بیهوشی در ماهی می‌گردد. با توجه به اهمیت کاربرد گیاهان دارویی در پزشکی و دامپزشکی برای مبارزه با عوامل بیماری‌زا و نیز لزوم جایگزینی آنها با داروهای شیمیایی، ضرورت دارد که برخی گیاهان دارویی بومی ایران از لحاظ سمیت مورد ارزیابی و سنجش عیار زیستی قرار گیرند چرا که مصرف بیش از حد این گیاهان سبب مسمومیت و حتی مرگ موجود زنده می‌گردد. مثلاً سمیت و غلظت نیمه‌کشنده عصاره هیدروآلکلی سیر بر روی بچه ماهی توسط Moghaddam و همکاران (2015) مورد بررسی

آزمایش دمای آب  $15 \pm 1$  درجه سانتی گراد، اکسیژن محلول  $7.5 \pm 0.2$  میلی گرم در لیتر و میزان pH معادل ۸ بود. در طول دوره آزمایش آب موجود در ترفاها بوسیله یک دستگاه کمپرسور هوا، هوادهی شدند. اسانس آویشن باغی، مایعی روغنی نیمه شفاف با رنگ زرد کم رنگ، از شرکت معتبر تهیه گردید.

غلظت نیمه کشنده ( $LC_{50-96h}$ ) اسانس آویشن باغی با روش استاندارد Cooperation Development Organization Economic and (OECD) ساکن تعیین شد. غلظت های اسانس آویشن باغی در طول دوره آزمایش در محیط تراف ها ثابت بود. استفاده از غلظت ۵ ppm اسانس فوق تلفات ۱۰۰ درصدی ماهیان در دقایق اولیه را موجب گردید. ابتدا برای تعیین محدوده کشندگی این اسانس، غلظت ۱ تا ۵ ppm استفاده شد. سپس غلظت های بین ۴ تا ۵ ppm مورد بررسی قرار گرفتند. در طول دوره آزمایش با هر یک از غلظت های یادشده علائم رفتاری و تعداد تلفات پس از ۹۶ ساعت و نیز پس از ۴ روز مجاروت ماهی با اسانس آویشن باغی ثبت و نتایج با استفاده از نرم افزار Probit Analysis مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (Finney, D. J., 1947).

### ۳. نتایج

اسانس آویشن باغی توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی (GC/MS) (شکل ۱) و ۱۵ ترکیب عمده ای فرار در آن شناسایی شد (جدول ۱). بیشترین درصد نسبی ترکیبات فرار به تیمول<sup>۱</sup> (۷۲٪) و سیمین (۱۱.۵۲٪) اختصاص داشت. سایر ترکیبات عمده شامل گاما ترپینن، لینالول، کامفور، ایزوبورنیول، کاریوفیلین و غیره بودند. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان حداقل و حداکثر غلظت کشندگی برای ماهیان ۵-۱ ppm بود؛ در واقع محدوده اثر اسانس آویشن باغی در غلظتی که هیچ تلفاتی نداشت و در غلظتی که تلفات ۱۰۰ درصدی را

و تحقیق قرار گرفت. اگرچه این گیاه به دلیل وجود گروه عمده سولفور و غیر سولفور که سبب تولید آنزیم خاصی به نام الیسین می کند که یک ماده دارویی قدرتمند است که در برابر عوامل پاتوژن مقاومت می کند. علاوه بر این سیر در زمینه اثرات ضد میکروبی، اثرات ضد سرطان، کاهش میزان قندخون، تحریک سیستم ایمنی و اثرات ضدالتهابی و آنتی-اکسیدانی موثر است، اما چنانچه مقادیر زیادی از این گیاه در ماهی مورد مصرف قرار گیرد، سبب کم تعادلی، انقباض شدید عضلات و انحنای ستون فقرات در ماهی و مسمومیت و نهایتاً سبب مرگ ماهی خواهد شد.

از جمله گیاهان دارویی میتوان به آویشن باغی اشاره نمود که در این تحقیق به منظور کنترل و درمان بیماری های ماهیان و بهبود رشد و پرورش آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. در این راستا ضروری است عیار زیستی (Bioassay) اسانس آویشن باغی بر گونه های آبی بررسی شود. بنابراین، تحقیق حاضر با هدف تعیین غلظت های کشنده ( $LC_{50-96h}$ ) با اسانس آویشن باغی روی بچه ماهی قزل آلا و بررسی تأثیرات غلظت کشنده آن بر بافت های این ماهیان انجام شد.

### ۲. مواد و روش ها

آنالیز اسانس آویشن باغی با دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی (GC/MS) صورت گرفت. دستگاه GC از مدل Agilent 6890 و دستگاه MS از مدل Agilent 5973 با ستونی به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰.۲۵ میلی متر و ضخامت ۰.۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS استفاده شدند. ماهی و شرایط تحقیق: در مرحله اول پژوهش برای تعیین غلظت نیمه کشنده اسانس آویشن باغی ( $LC_{50-96h}$ ) ابتدا ۹۰ عدد بچه ماهی قزل آلا رنگین کمان با میانگین وزنی  $1 \pm 10$  گرم در ۵ گروه تیمار و یک گروه شاهد و هر گروه با ۳ تکرار و هر تکرار با ۵ عدد ماهی بصورت تصادفی قرار داده شدند. در طول مدت

<sup>۱</sup> Thymol

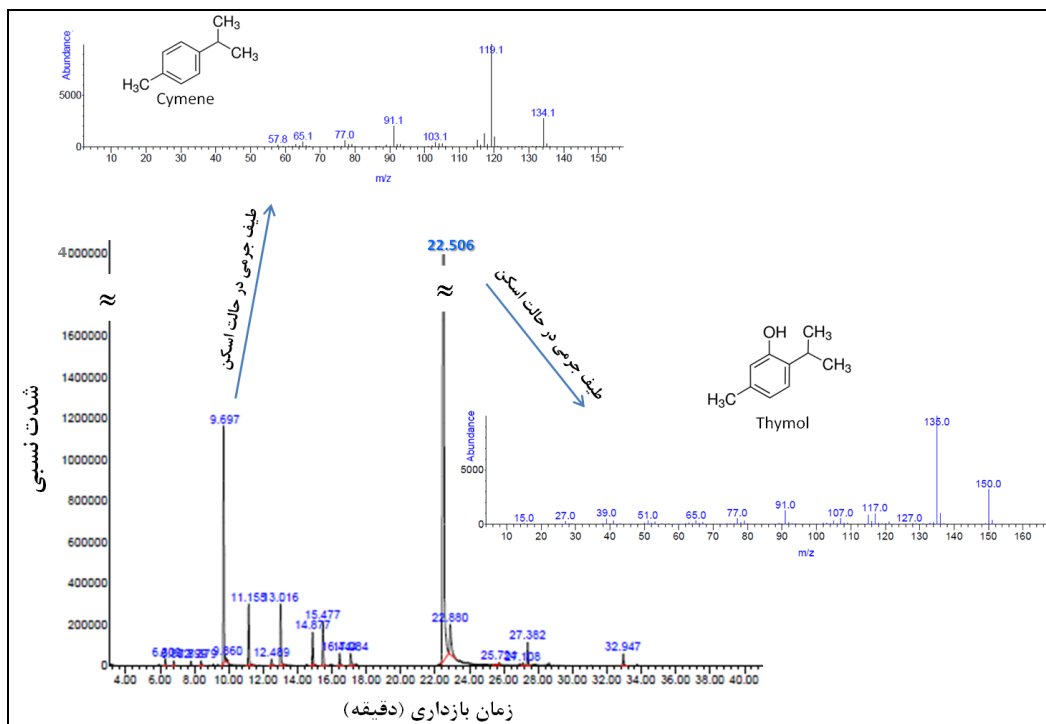
بیشترین تجمع بچه ماهی‌ها در کف تانکر (گاهی بصورت وارونه) و تشکیل موکوس روی پوست به ویژه در تانکرهای با غلظت ۴-۵ ppm مشاهده گردید.

جدول ۱- آنالیز اسانس آویشن باغی توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی

مقدار نسبی (%)	نام ترکیب شیمیایی	زمان بازداری (دقیقه)	رتبه
۰٫۱	alpha-Pinene	۶٫۳	۱
۰٫۲	Camphene	۶٫۸	۲
۰٫۲	β-Pinene	۷٫۸	۳
۰٫۳	beta-Myrcene	۸٫۴	۴
۱۱٫۵	Cymene	۹٫۷	۵
۰٫۲	Limonene	۹٫۹	۶
۳٫۳	gamma-Terpinene	۱۱٫۲	۷
۳٫۹	Linalol	۱۳٫۰	۸
۱٫۸	Camphor	۱۴٫۹	۹
۲٫۵	Isoborneol	۱۵٫۵	۱۰
۰٫۸	p-Menth-1-en-4-ol	۱۶٫۴	۱۱
۰٫۹	alpha-Terpineol	۱۷٫۱	۱۲
۷۲٫۰	Thymol	۲۲٫۵	۱۳
۰٫۲	alpha-Copaene	۲۵٫۷	۱۴
۱٫۲	Caryophyllene	۲۷٫۴	۱۵
۰٫۸	Caryophyllene oxide	۳۲٫۹	۱۶

برای ماهیان به همراه داشت تعیین شد. جدول ۲، تاثیر غلظت‌های مختلف از ۱-۵ ppm در زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت را پس از مجاورت با ماهی نشان می‌دهد، و جدول ۳ نیز غلظت‌های مختلف ۴-۵ ppm در مدت ۹۶ ساعت را نشان می‌دهد. مصرف غلظت ۱ ppm اسانس آویشن باغی تا ۹۶ ساعت هیچ گونه تلفاتی را به همراه نداشت، اما در ۵ ppm در زمان اولیه آزمون تمام ماهی‌ها تلف شدند. بنابراین در این آزمون غلظت نیمه کشنده ( $LC_{50-96h}$ ) اسانس آویشن باغی برای بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی مورد آزمایش ۴٫۴ ppm تعیین شد. نتایج بدست آمده نشان داد که مجاورت بچه ماهی‌های قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی با غلظت کمتر از ۱ ppm اسانس آویشن باغی برای مدت ۹۶ ساعت هیچ‌گونه عوارضی برای ماهی نداشت. همچنین معادله خط رگرسیون حکایت از وجود ارتباط مستقیم (همبستگی قوی و مثبت) بین غلظت‌های مورد بررسی با میزان تلفات بچه ماهی‌های قزل‌آلای رنگین کمان داشت (شکل ۲).

ماهیان مورد مطالعه در طول اجرای آزمایش تعیین غلظت‌های کشنده اسانس آویشن باغی از لحاظ رفتاری علائمی نظیر افزایش تعداد دفعات باز و بسته شدن سرپوش آبششی در مراحل آزمایش از خود نشان می‌دانند (به ویژه در غلظت‌های ۴-۵ ppm). ضمناً



شکل ۱. کروماتوگرام گازی-طیف سنج جرمی اسانس آویشن باغی

جدول ۲- تاثیر غلظت های مختلف اسانس آویشن باغی بر میزان بازماندگی ماهی قزل آلابی رنگین کمان

لگاریتم غلظت اسانس آویشن باغی	۹۶ ساعت		۷۲ ساعت		۴۸ ساعت		۲۴ ساعت		غلظت اسانس آویشن باغی (ppm)	تیمار
	تعداد ماهی زنده	تعداد ماهی مرده	تعداد ماهی زنده	تعداد ماهی مرده	تعداد ماهی زنده	تعداد ماهی مرده	تعداد ماهی زنده	تعداد ماهی مرده		
-	۵	۰	۵	۰	۵	۰	۵	۰	۰	شاهد
۰.۳	۵	۰	۵	۰	۵	۰	۵	۰	۱	۱
۰.۴۷۷	۵	۰	۵	۰	۵	۰	۵	۰	۲	۲
۰.۶	۴	۱	۵	۰	۵	۰	۵	۰	۳	۳
۰.۶۹	۰	۵	۰	۵	۰	۵	۰	۵	۴	۴
									۵	۵

جدول ۳- تاثیر غلظت های محدوده کشنده اسانس آویشن باغی (ppm) بر میزان بازماندگی ماهی قزل آلابی رنگین کمان

۶۰	۲	۳	۴.۶	۴
۸۰	۱	۴	۴.۸	۵
۱۰۰	۰	۵	۵	۶

تیمار	اسانس آویشن باغی	۹۶ ساعت		٪ مرگ و میر در ساعت
		تعداد ماهی مرده	تعداد ماهی زنده	
شاهد	۰	۰	۵	۰
۱	۴	۱	۴	۲۰
۲	۴.۲	۱	۴	۲۰
۳	۴.۴	۲	۳	۴۰

نتایج حاصل از این آزمایش با نتایج تحقیقات Dügenci و همکاران (2003) که نشان میدهد استفاده از عصاره گیاهان دارویی نظیر داروش، گزنه و زنجبیل منجر به افزایش سطح ایمنی بدن در ماهی گردید، مطابقت دارد. تیمول از ترکیبات فنلی و مهم موجود در آویشن باغی است. نتایج مطالعات متعددی در

باشد، به همان نسبت میزان ترشح موکوس و عوارض ناشی از آن کمتر مشاهده می‌گردد. چنین نتیجه‌ای نیز در مطالعه Rohani و همکاران (2011) در بررسی تاثیر غلظت‌های اسانس آویشن شیرازی بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به منظور تعیین غلظت نیمه کشنده بدست آمد. مشاهده‌ی رفتارهای غیر طبیعی شامل شنای با شتاب و بی‌هدف در جهات مختلف و در مسیرهای کوتاه، عدم تعادل، افزایش تحریک پذیری، تعادل کم، انقباض شدید عضلات و انحنای ستون فقرات در غلظت‌های زیاد این اسانس کاملاً مشهود بوده که با هوادهی و اکسیژن‌رسانی آب به تاخیر افتاد، که با یافته‌های سایر محققان مطابقت دارد (Mitchell, 1984; Jegede, 2007; Rohani et al., 2011). مقادیر غلظت‌های کشنده هیچگاه یک مقدار ثابت و مطلق نبوده، به دلیل اینکه فاکتورهای زیادی نظیر اختلافات فردی، سنی، جنسی، وزنی، عوامل محیطی، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب، نحوه تجویز و سایر فاکتورهای دیگر در تعیین  $LC_{50}$  موثر می‌باشد (Mirsattari, 2002). با توجه به غلظت‌های مختلف مورد استفاده این اسانس در تیم‌های مختلف و نتایج حاصل از میزان مرگ و میر بچه‌های ماهی قزل‌آلا به نظر می‌رسد که دامنه تغییرات تاثیرگذاری این اسانس زیاد است. بنابراین در صورت استفاده از این اسانس با توجه به خواص درمانی مناسب آویشن باغی دامنه خطر پذیری زیادی را برای بچه‌ماهی‌ها متصور بود. لذا برای جلوگیری از ایجاد مسمومیت، لازم است که در بکارگیری اسانس آویشن باغی در صنعت پرورش ماهی به مقدار و مدت زمان مصرف آن توجه کافی نمود.

خصوصاً تاثیر تیمول و کارواکرول<sup>۱</sup> که هر دو ترکیبات فتلی هستند، نشان می‌دهد که این دو ترکیب اثرات ضد میکروبی قوی دارند مثلاً در مورد اسانس مرزه خوزستانی که دارای دو ترکیب تیمول و کارواکرول می‌باشد، اثرات ضد میکروبی آن به اثبات رسیده است. نتایج نشان داد، هر قدر که بر غلظت اسانس آویشن باغی افزوده شود، میزان ترشح موکوس در سطح بدن ماهی افزایش می‌یابد. این افزایش ترشح موکوس با غلظت‌های بالای ۵ ppm اسانس آشکارتر بود. نتایج این تحقیق نشان داد که غلظت نیمه کشنده در مدت زمان ۹۶ ساعت معادل ۴/۴ ppm بود. در مطالعه‌ای که توسط Rohani و همکاران (2011) بر روی بچه ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد، میزان غلظت نیمه کشنده برابر ۱۳/۶ ppm تعیین گردید، که بیشتر از مقادیر مطالعه حاضر بوده که خود می‌تواند بدلیل نوع ترکیب آویشن باغی مورد استفاده باشد. ترکیب تیمول که نوعی فنل است در آویشن باغی ۷۲ درصد می‌باشد ولی در آویشن شیرازی حدود ۳۹ درصد گزارش شده است، در نتیجه تاثیرگذاری گروه هیدروکسیل در آویشن باغی شدیدتر بوده و سبب مسمومیت حاد در آبزیان شده است. هم چنین، تفاوت در گونه ماهی از لحاظ وزن، قد و نیز شرایط محیطی در تحقیق مذکور باشد. در زمانهای اولیه و غلظت‌های کم اسانس، تعداد ماهی‌های زنده بیشتر بوده، و هرچه غلظت اسانس افزایش می‌یابد تعداد تلفات نیز افزایش می‌یابد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مقاومت ماهی در مدت زمان کوتاه بیشتر بوده و توانایی تحمل غلظت‌های بالاتری از اسانس را دارا می‌باشد. ولی با گذشت زمان مقاومت بچه ماهی قزل‌آلا کاهش می‌یابد و میزان ترشح موکوس در سطح پوست بدن بچه ماهی قزل‌آلا نیز با افزایش غلظت اسانس افزایش یافت، بطوری که این افزایش ترشح در تیم‌های انتهایی آشکارتر بود. این مطالعه نشان داد که هرچقدر غلظت اسانس و نیز زمان مجاورت بچه ماهی با آن، کمتر

<sup>۱</sup> Carvacrol

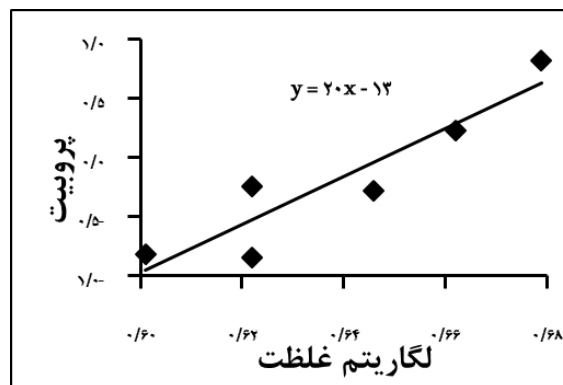
از جمله اهداف تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بهبود شاخص‌های رشد و ایمنی به منظور کاهش میزان تلفات در جهت اقتصادی نمودن تولید این گونه ارزشمند است. داروهای گیاهی از جمله محرک‌های سیستم ایمنی هستند، که با تاثیرگذاری بر سیستم ایمنی ماهیان موجب فعال‌شدن سلول‌های موثر در ایمنی می‌شوند. اسانس آویشن باغی منشاء طبیعی دارد لذا سازگار با محیط زیست است و ایجاد آلودگی نمی‌کند. همچنین، این گیاه جهت مصارف دارویی و غذایی در انسان استفاده می‌شود و لذا مصرف آن در صنعت پرورش ماهی مشکلی را برای مصرف کنندگان ماهی به همراه نخواهد داشت. در مجموع با توجه به نتایج بدست آمده استفاده از غلظت‌های کمتر از ۳ ppm اسانس آویشن باغی برای ضدعفونی نمودن آب و کاهش بار میکروبی سطح بدن ماهی و نیز ایجاد آرامش قبل از هرگونه عمل تنش‌زا در ماهی مفید می‌باشد.

### سپاسگزاری

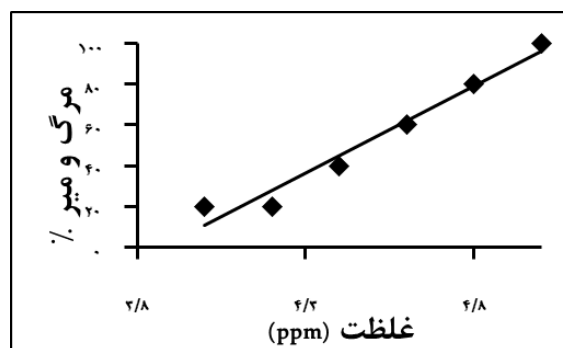
نویسندگان این مقاله، از آقای دکتر هادی تبرایی به دلیل راهنمایی بی دریغ و مستمر در انجام بعضی از آزمایشات کمال تشکر را دارند.

### منابع

- Alishahi, M. 2004. Immune stimulant role in aquaculture. Journal of Veterinary Organization of Iran. 3: 33-38. (in persian).
- Asadi, T., Zanguee, N., Mousavi, S.M. and Yavari, V. 2016. Effects of ginger extract on some hematological and serological parameters and growth performance in *Barbus sharpeyi*. Journal of Marine Science and technology. 15(1): 100-110. (in persian).
- Dehghan, F., Vazirzadeh, A. and Karami, A. 2015. Effects of medicinal plants on growth rate, immune enhancement and diseases-resistance in cultured fish. The Third Iranian Conference of Ichthyology. May 6-7- 2015. Shiraz University. 194p.
- Düğenci, S.K., Arda, N. and Candan, A. 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for



شکل ۲- غلظت نیمه کشندگی پس از ۹۶ ساعت با استفاده از منحنی پروبیت مرگ و میر و لگاریتم غلظت آویشن باغی بر حسب ppm.



شکل ۳- نمودار درصد مرگ و میر ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان پس از ۹۶ ساعت در غلظت‌های محدوده کشنده

### ۴. بحث و نتیجه گیری

- fish. Journal of Ethnopharmacology. 88(1): 99-106.
- Finney, D.J. 1947. Probit Analysis. Cambridge University Press.
- Firouzbakhsh, F., Nosrati, A. and Rahmati, N. 2015. Evaluation of *Artemisia annua* essential oils on growth performance in *Astronotus ocellatus*. The Third Iranian Conference of Ichthyology. 6-7 May 6-7- 2015. Shiraz University. 29p.
- Jegade, T. 2007. Acute-toxicity of Sodium chloride (NaCl) on *Oreochromis niloticus* fingerlings. Journal of Fisheries International. 2(4): 292-294.
- Mirsattari, G. 2002. Essentials of Toxicology. University of Tehran. Iran. 292p.

- Mitchell, A.J. 1984. Parasites and Diseases of Striped Bass. University of Maryland, USA. 177p.
- Moghaddam, S.B., Rohani, M.S., Sharifpour, I., Pajand, Z., Jalilpour, J. and Masoumzadeh, M. 2015. Determination of lethal concentration (LC96h) of hydroalcoholic extract of garlic (*Allium sativum L.*) and its effects on gill tissue of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fingerlings. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 30(6): 915-922. (in persian).
- Mousavi, S.M., Nasab, E.M., Yavari, V., Ghatarami, E.R. and Jalali, M.R. 2013. Determination of toxicity and mean lethal concentration (LC50) of Eugenol on *Barbus sharpeyi*. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 29(3): 551-560. (in persian).
- Rohani, M.S., Haghighi, M. and Assaeian, H. 2011. The lethal concentration (LC50) of *Zataria multiflora* essential oil in fries of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iranian Scientific Fisheries Journal. 20(2): 89-96.
- Salimian, F., Fattollahi, M., Nematollahi, A., Nikookhah, F. and Kharazian, N. 2017. Antifungal activity in vitro of aqueous and total flavonoids extracts of plant myrtus communis against two pathogenically important fungi, saprolegnia and fusarium isolated from rainbow trout eggs. Journal of Marine Science and technology. 16(1): 16-28. (in persian).
- Zarban, A., Malekaneh, M., Pourmohammad, H., Najari, M.T. and Abad, M. 2004. Evaluation of antioxidant properties of 28 Iranian medicinal plants. Journal of Birjand University of medical science. 11(1): 9-15. (in persian).



## Measurement of the lethal concentration of thyme essential oils in Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*)

Amir Shafighi<sup>1</sup>, Mojtaba Shokrollah Zadeh Taleshi<sup>1\*</sup>, Jalal Hassan<sup>2</sup>, Ashkan Zargar<sup>3</sup>

1. Marine Chemistry, Faculty of Marine & Oceanic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar
2. Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran
3. Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran

### Abstract

The importance of the use of medicinal plants against infectious and non-infectious diseases is completely obvious. The replacement of synthetic drugs due to their multiple properties in the prevention and treatment of many diseases, particularly in the aquaculture industry seems to be very important. This study was performed with the aim of assessing the acute toxicity ( $LC_{50-96}$ ) of thyme essential oil on rainbow trout.

To study the effect of the essential oils, 80 premature rainbow trout with an average weight of  $10 \pm 0.5$  in 9-liter tanks were exposed to different concentrations of essential oils of thyme and daily losses based on OECD protocol were calculated during 96 hours. All the physical and chemical factors such as water temperature, dissolved oxygen, pH, nitrite, nitrate, ammonium levels, electrical conductivity and water hardness were measured in different treatments. The acute toxicity of the essential oil of thyme was calculated using Probit analysis and a concentration of 4.4 ppm was determined.

**Keywords:** Thyme essential oil, Rainbow trout, Median lethal concentration, Toxicity

Table 1. Analysis of thyme essential oil by gas chromatography mass spectrometer

Table 2. The effect of different concentrations of thyme essential oil on the survival rate of Rainbow trout

Table 3. The effect of lethal concentration of thyme essential oil (ppm) on the survival rate of Rainbow trout

Figure 1. GC-MS chromatogram of thyme essential oil

Figure 2. Median lethal concentration (after 96 hours) using probit of mortality versus log concentration of thyme essential oil in ppm

Figure 3. Diagram of the percent mortality of rainbow trout after 96 hours at lethal concentration

---

\*Corresponding author, E-mail: ms.taleshi@umz.ac.ir