



Original Research Paper

In vitro effects of carbonate and nitrate compounds of water on egg hatching process and the survival larvae of sheep *Fasciola hepatica* (In vitro)

Sara Larki *, Mohammad Hosein Razi Jalali, Saber Zeid Abadi

Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Key Words

Hardness of water
Nitrate solutions
Calcium carbonate
Ammonium nitrate
Fasciola hepatica
Hatching egg

Abstract

Introduction: In addition to the biological and physiological aspects related to parasitic factors that influence egg hatching and transmission of infection, several environmental factors can also affect the growth and development of *Fasciola hepatica* eggs. These factors play a crucial role in determining the epidemiology, prevalence, and distribution of the disease in various climatic regions. In this study, the effect of water containing Ammonium Nitrate and Calcium Carbonate compounds on the hatching process and development of *Fasciola* eggs was investigated.

Materials & Methods: After isolating the adult *Fasciola* worms from the infected sheep in the slaughterhouse, the fertile *Fasciola* eggs were collected and washed. The collected eggs were exposed to different concentrations of Ammonium Nitrate (0, 25, 50, 100, and 200 mg/L) and Calcium Carbonate (0, 75, 150, 300, 600, and 1200 mg/L) in separate groups and were incubated for 16 days under suitable temperature and humidity conditions. The actual mortality rate of eggs was calculated after examining and counting hatched, developing, and dead eggs under a light microscope.

Results: The study demonstrated that water with calcium carbonate can disorder the egg-hatching process with the highest concentration resulting in a decrease from 62.7% (control group) to 41.3% (in 1200 mg/lit concentration). Additionally, the transformation of *Fasciola* egg cells into larval form decreased from 4.3% in the control group to 0%, causing a decrease in the actual mortality rate to 21.6%. While, the culture medium with Ammonium Nitrate caused a notable rise in the number of developing eggs, going from 6.7% in the control group to 16.8% in the highest concentration. So, the real death rate of *Fasciola* eggs decreased by 20.7% in environments containing Ammonium Nitrate due to prevention of egg cells' growth and development during the developing stage.

Conclusion: Based on the findings of the present study, it seems that the pattern of the prevalence of fascioliasis in some parts of the endemic provinces of the country may be linked to the level of underground water hardness and the presence of Ammonium Nitrate salt residues in the surface waters due to the overuse of agricultural fertilizers. This can be considered as a potential approach for the control and prevention method in these areas.

* Corresponding Author's email: s.larki@scu.ac.ir

Received: 24 October 2023; Reviewed: 25 November 2023; Revised: 8 January 2024; Accepted: 10 March 2024

(DOI):10.70102/AEJ.2025.16.4.4

مقاله پژوهشی

بررسی تاثیر ترکیبات کربناته و نیترا ته آب بر روند تخم گشایی و زنده مانى نوزاد گونه فاسیولا هپاتیکا گوسفندی (مطالعه آزمایشگاهی)

سارا لركى*، محمدحسین راضی جاللى، صابر زیدآبادى

گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

کلمات کلیدی

چکیده

آب سخت
کربنات کلسیم
نیترا ت آمونیوم
فاسیولا هپاتیکا
تخم گشایی

مقدمه: علاوه بر نقش بیولوژی و فیزیولوژی عوامل انگلی در فرایند تخم گشایی و انتقال آلودگی، عوامل محیطی مختلف نیز می توانند بر رشد و تکامل تخم های فاسیولا و در نتیجه همه گیر شناسی، بوم شناسی، شیوع و پراکندگی بیماری در مناطق مختلف اقلیمی نقش قابل توجهی داشته باشند. در این مطالعه به تاثیر آب های حاوی ترکیبات نیترا ت آمونیوم و کربنات کلسیم بر روند تخم گشایی و تکامل نوزاد انگل فاسیولا هپاتیکا در محیط کشت آزمایشگاهی پرداخته شد.

مواد و روش ها: پس از جداسازی کرم های بالغ فاسیولا هپاتیکا از گوسفندان آلوده در کشتارگاه، اقدام به جمع آوری تخم های بارور فاسیولا و شستشوی آن ها گردید. سپس تخم ها در گروه های تیمار مجزا در مواجهه با غلظت های مختلف نیترا ت آمونیوم (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر) و کربنات کلسیم (۰، ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۱۲۰۰ میلی گرم در لیتر) در شرایط دمایی و رطوبت مناسب به مدت ۱۶ روز در انکوباتور کشت داده شدند. میزان مرگ و میر واقعی تخم ها پس از بررسی و شمارش تخم های در حال تکامل، مرده و تخم گشایی شده در زیر میکروسکوپ نوری محاسبه گردید.

نتایج: آب های حاوی املاح کربنات کلسیم موجب ممانعت از فرایند تخم ها از ۶۲/۷ درصد در گروه کنترل به ۴۱/۳ درصد در غلظت ۱۲۰۰ میلی گرم بر لیتر و هم چنین کاهش روند تبدیل شدن سلول های تخم فاسیولا در مرحله جنینی از ۴/۳ درصد در گروه کنترل به صفر درصد در بیش ترین غلظت مطالعه شده و موجب کاهش میزان مرگ و میر واقعی به ۲۱/۶ درصد شدند. در حالی که در محیط کشت حاوی نمک نیترا ت آمونیوم کاهش درصد مرگ و میر واقعی تخم های فاسیولا به میزان ۲۰/۷ درصد مشاهده گردید که تاثیر این روند مرگ و میر عمدتاً بر تخم های در حال تکامل بود به نحوی که موجب توقف رشد و تکامل سلول های تخم در این مرحله از ۶/۷ درصد در گروه کنترل به ۱۶/۸ درصد در بیش ترین غلظت مورد مطالعه (۲۰۰ میلی گرم بر لیتر) گردید.

بحث و نتیجه گیری: براساس یافته های مطالعه حاضر، به نظر می رسد الگوی شیوع فاسیولیازیس در برخی نقاط استان های اندمیک بیماری در کشور را بتوان با میزان سطح سختی آب های زیر زمینی و هم چنین باقی مانده های املاح نیترا ت آمونیوم ناشی از مصرف بی رویه کودهای کشاورزی در آب های سطحی منطقه مرتبط دانست. این امر می تواند به عنوان یک روش بالقوه کنترل و پیشگیری از بیماری در این مناطق مورد توجه قرار گیرد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: s.larki@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۲ آبان ۱۴۰۲؛ تاریخ داوری: ۴ آذر ۱۴۰۲؛ تاریخ اصلاح: ۱۸ دی ۱۴۰۲؛ تاریخ پذیرش: ۲۰ اسفند ۱۴۰۲

(DOI):10.70102/AEJ.2025.16.4.4

مقدمه

نیتروژن، مهم‌ترین و پرکاربردترین عنصر در بین عناصر غذایی و از اجزای اصلی رشد و نمو گیاهان محسوب می‌شود که از طریق کود منجر به تغییر در وضعیت حاصلخیزی خاک می‌شود. کود اوره به عنوان یک منبع غنی از نیتروژن شناخته می‌شود که استفاده گسترده‌ای در بین کشاورزان در زمین‌های زراعی دارد. در سی سال گذشته در ایران مصرف کودهای نیتروژنه به دلیل عملکرد و کارایی بالای نیتروژن، قیمت پایین و دسترسی بیش تر کشاورزان به آن‌ها افزایش قابل توجهی داشته است (۱). از آن‌جا که قابلیت حل شدن این آلاینده‌های محیط زیست در آب بالا می‌باشد، این ترکیبات پس از آبیاری زمین، حل شده و مقداری از آن‌ها با آب مازاد آبیاری از خاک کشاورزی خارج می‌شوند. بنابراین آب مازاد زمین‌هایی که به آن‌ها کودشیمیایی داده شده محتوی مقدار قابل توجهی نترات، فسفات و کربنات پتاسیم می‌باشند. با خروج این آب‌های آلوده از مزارع و پیوستن آن‌ها به آب‌های سطحی مانند رودخانه‌ها و نه‌رها، آلودگی در محیط پراکنده می‌شود و با ورود مداوم رودخانه‌های آلوده به دریاچه‌ها و دریاها، غلظت این مواد در منابع آب رو به افزایش می‌باشد. به علت محلول بودن این ترکیبات در آب، آلودگی می‌تواند همراه آب به اعماق خاک نفوذ کند و حتی سبب آلودگی منابع آب زیرزمینی به این املاح گردد (۲). بیش‌ترین غلظت نترات ایمن برای سلامتی انسان و دام مورد تایید سازمان بهداشت جهانی تا میزان ۴۵ میلی‌گرم در لیتر در آب آشامیدنی اعلام شده است (۳)، درحالی‌که براساس مطالعات صورت گرفته در منابع آبی کشور، بیش‌ترین میزان نترات در استان اصفهان (۳۱۸ میلی‌گرم بر لیتر) و سپس در شهر زاهدان استان سیستان و بلوچستان (۲۹۵ میلی‌گرم بر لیتر) گزارش شده است (۴) که قسمت اعظم آن از منابع آبی زیرزمینی هر منطقه تامین می‌شود. هم‌چنین در اواخر پاییز و اوائل زمستان از سال که میزان بارندگی نسبت به تبخیر بیش‌تر است، جذب نترات در زمین‌های فاقد پوشش گیاهی توسط گیاه ناچیز می‌باشد. بنابراین کارایی کودهای ازته افزوده شده به خاک کم بوده و نیتروژن اضافه شده به صورت نترات وارد آب‌های تجمع یافته سطحی و یا زیرزمینی می‌شوند و علاوه بر در معرض خطر قرار دادن سلامتی انسان و محیط زیست (۵)، موجب تغییر در نسبت املاح و یون‌های محیطی شده و آب‌های سطحی را به سمت بی‌هوازی شدن پیش می‌برد. بنابراین می‌تواند بر چرخه زیست بسیاری از میکروارگانیسم‌های وابسته به محیط تاثیرگذار باشد. علاوه بر آن کلسیم محلول (Ca^{++}) و منیزیم (Mg^{++}) تنها دو کاتیون دو ظرفیتی هستند که در سطوح قابل ملاحظه‌ای در اکثر آب‌ها یافت می‌شوند که تحت عنوان سختی آب یا TDS (Total dissolved solid)

اندازه‌گیری می‌شوند. طبق استاندارد شماره ۱۰۵۳ موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ویرایش ۵ مورخه ۱۳۸۸/۱۲/۱۱ میزان حداکثر مطلوب سختی در آب ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر برحسب کربنات کلسیم و حداکثر مجاز آن ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر بر حسب کربنات کلسیم می‌باشد. سختی آب می‌تواند به صورت قابل توجهی از یک منطقه به منطقه دیگر و متناسب با منابع آبی آن منطقه و مواد معدنی موجود در آب، تغییر کند. براساس گزارشات و ارزیابی سازمان آب و فاضلاب کشور و وزارت نیرو بر کیفیت آب در مناطق مختلف کشور در نیمه اول سال ۱۴۰۱، میزان سختی آب در محدوده ۷۰۰ تا ۲۱۰ واحد در میلیون (ppm) متغیر است که نسبت مستقیم با میزان کلسیم آن داشته که به میزان ۵۰ تا ۶۷ میلی‌گرم بر لیتر متفاوت است. به طوری‌که میزان سختی آب در منطقه ارومیه با ۹۲ واحد در میلیون (ppm)، اهواز ۵۴۹ واحد در میلیون (ppm)، تهران تا ۷۰۰ واحد در میلیون (ppm) در نواحی مختلف آن، گرگان ۳۹۷ واحد در میلیون (ppm) و زاهدان ۸۷۴ واحد در میلیون (ppm) گزارش شده است. بر این اساس کیفیت آب تامین شده هر منطقه به عوامل ژئومورفولوژی منطقه مانند شیب، ارتفاع و جهت کانال‌های لوله کشی و کیفیت آهکی بودن خاک منطقه جغرافیایی بستگی دارد (۶). این عوامل محیطی در مراحل مختلف چرخه زندگی موجودات زنده از جمله میکروارگانیسم‌هایی که بخشی از چرخه زندگی تکاملی شان وابسته به محیط‌های آبی طبیعی است از اهمیت به سزایی برخوردار است. گونه‌های فاسیولا از انگل‌های رایج نشخوارکنندگان هستند که خسارات اقتصادی قابل توجهی در صنعت دامپروری کشور وارد می‌سازند. گونه‌های فاسیولا در یک الگوی چرخه زندگی مشابه رشد و تکامل در مجاری صفراوی پستانداران مختلف استقرار یافته و تخم‌گذاری می‌کنند. پس از دفع تخم‌ها همراه با مدفوع میزبان، در شرایط محیطی مناسب سلول‌های جنینی موجود در تخم رشد کرده و به مرحله اول نوزادی یا میراسیدیوم تبدیل می‌شوند. در طی مکانیسم تخم‌گشایی، نور موجب رشد میراسیدیوم و تحریک خروج آن از تخم می‌شود. این نوزاد مژه‌دار می‌تواند به طور فعال در بدن حلزون میزبان واسط مناسب خود نفوذ کرده و در بدن حلزون به سایر مراحل نوزادی نظیر اسپوروسیست، ردی و سرکر تبدیل شود. در نهایت، سرکرهای متحرک از حلزون خارج شده و روی پوشش گیاهی یا اجسام ثابت محیط مرطوب اطراف خود کیسه‌دار شده و به متاسرکر عفونت‌زا تبدیل می‌شوند که می‌تواند همراه علوفه یا آب آلوده به بدن میزبان خود انتقال یابد. شیوع فاسیولوزیس به حضور میزبان‌های نهایی و حلزون‌های میزبان واسط که شایع‌ترین گونه آن لیمنه آ گدروزیانا با بیش‌ترین فراوانی در اطراف چشمه‌ها (۷)، شرایط آب و هوایی و هم‌چنین عادات غذایی میزبان بستگی دارد. از عوامل محیطی تأثیرگذار در زیست

آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی شهید چمران اهواز منتقل شدند. سپس جهت جدا کردن تخم‌های بارور در کیده‌های آلوده، مجاری صفراوی و کیسه صفرای حیوانات آلوده توسط اسکالپل برش داده شد و محتویات آن به کمک الک ۱۰۰ (Mesh number: 100) جهت جداسازی ذرات درشت از تخم چندین مرتبه با نرمال سالین ۰/۹ درصد شست و شو داده شدند. در مواردی که امکان دسترسی به کیسه صفراوی دام‌های آلوده نبود، پس از مشاهده و شناسایی فاسیولا هپاتیکا بالغ، محل انتهایی رحم کرم (ناحیه یک سوم قدامی بدن ترمانود) از مابقی قسمت‌های بدن جداسازی گردید و به درون پتری‌دیش انتقال داده شد. سپس به آرامی بافت‌های نرم بدن ترمانود با حرکات چرخشی در هاون چینی سابیده و له گردید به نحوی که تخم‌های درون رحم کرم بر حسب امکان بدون آسیبی آزاد گردند. مقداری نرمال سالین استریل به بافت له شده کرم اضافه گردید. سپس محتویات هاون از الک ۱۰۰ عبور داده شد تا بافت‌های و مواد زائد جدا گردد و تخم‌های فاسیولا هپاتیکا در بشرهای استریل جمع‌آوری گردند. محتویات بشر به لوله‌های فالكون ۱۵ میلی لیتری انتقال داده شد. سپس حجم لوله‌های حاوی نمونه با نرمالین سالین ۰/۹ درصد به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد و درون سانتریفیوژ جهت جداسازی و شستشوی تخم‌ها قرار داده شد. سانتریفیوژ با ۲۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه چندین مرتبه صورت گرفت تا به خوبی تخم‌های فاسیولا هپاتیکا مواد زائد بافتی زدوده گردد. مایع رویی با احتیاط دور ریخته شد و سوسپانسیون غنی از تخم جهت کشت در ظروف استریل مناسب به دور از نور و در گروه‌های مختلف مجزا با حجم یکسان (۱۰۰۰ میکرولیتر) منتقل گردید.

کشت تخم‌های فاسیولا هپاتیکا در محلول‌های نیترا ته و

کربناته: در محفظه درون انکوباتور پس از استریل کردن با محلول آب الک و گاز استریل، جهت تامین رطوبت مورد نیاز محیط کشت یک ظرف آب در آن قرار داده شد و بر روی دمای مناسب کشت (26 ± 2 درجه سانتی گراد) است، تنظیم گردید. ظروف کشت جهت کشت مطلوب تخم‌های فاسیولا هپاتیکا آماده‌سازی شد. بدین ترتیب که بر روی درب این ظروف برای اکسیژن‌رسانی و هوادهی مناسب سوراخ‌هایی تعبیه گردید. هم‌چنین هریک از ظروف کشت درون فویل آلومینیومی به خاطر عدم دسترسی به نور محیط در حین جابجایی پوشانده شد. سپس سوسپانسیون تغلیظ شده تخم با حجم یکسان (حدود ۲۰۰۰ عدد تخم فاسیولا) در ۱۰۰۰ میکرولیتر به هریک از ظروف شماره‌گذاری شده انتقال داده و سپس محلول‌های تهیه‌شده نمک نیترا ته آمونیوم و کربنات کلسیم با غلظت و سختی آب مشخص در گروه‌های مختلف به ظروف کشت افزوده شدند. برای هر غلظت، سه تکرار کشت داده شد. برای گروه‌های کنترل مثبت از آلبندازول

و بیولوژی حلزون‌های میزبان واسط می‌توان محیط مناسب، درجه حرارت و رطوبت مطلوب را نام برد که در شیوع فاسیولوزیس نقش بالقوه‌ای دارند (۸). علاوه بر نقش بیولوژی و فیزیولوژی عوامل انگلی در فرایند تخم‌گذاری و انتقال آلودگی، عوامل محیطی مانند نور، دما، pH، غلظت کلرید سدیم، مواد مغذی و مدت زمان تخم‌گذاری بر رشد و تفریح تخم‌های فاسیولا تأثیرگذار می‌باشد (۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴). ارزیابی آزمایشگاهی تأثیر نیترا ته محلول و درجه سختی آب بر میزان تخم‌گذاری (Hatching eggs)، زنده‌مانی و رشد و تکامل میراسیدیوم فاسیولا در زیستگاه‌های آبی و بررسی نقش بازدارندگی این عوامل محیطی در روند چرخه تکاملی و بیولوژی و فیزیولوژی انگل، همه گیرشناسی و بوم‌شناسی انگل را تحت تأثیر قرار دهد به نحوی که بتوان شیوع و پراکنش جغرافیایی بیماری در مناطق مختلف اقلیمی کشور را بر این اساس در انگل‌های وابسته به زیستگاه‌های آبی تفسیر کرد. در این مطالعه به بررسی نقش یون‌های نیترا ته و کلسیم محلول در آب بر روند تخم‌گذاری و تکامل نوزاد انگل فاسیولا در محیط کشت آزمایشگاهی پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه محلول‌ها

محلول کربنات کلسیم: برای تهیه آب‌باجات متفاوت سختی،

پس از خرید نمک کربنات کلسیم (CaCO_3) از شرکت‌های تجاری معتبر (شرکت دکتر مجللی، ایران)، میزان ۰، ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۱۲۰۰ میلی گرم کربنات کلسیم را توسط ترازوی دیجیتال (مدل ADN، ژاپن) وزن کرده و در یک لیتر آب مقطر با pH ۷-۷/۲ در دمای آزمایشگاه (۲۶-۲۸ درجه سانتی‌گراد) حل گردید، سپس علاوه بر میزان سختی آب، دما، pH و میزان هدایت الکتریکی محلول‌های کربنات کلسیم تهیه شده توسط دستگاه TDS meter (Total Dissolved Solid) (مدل EZ-9908، تایوان) برای هر غلظت اندازه‌گیری گردید.

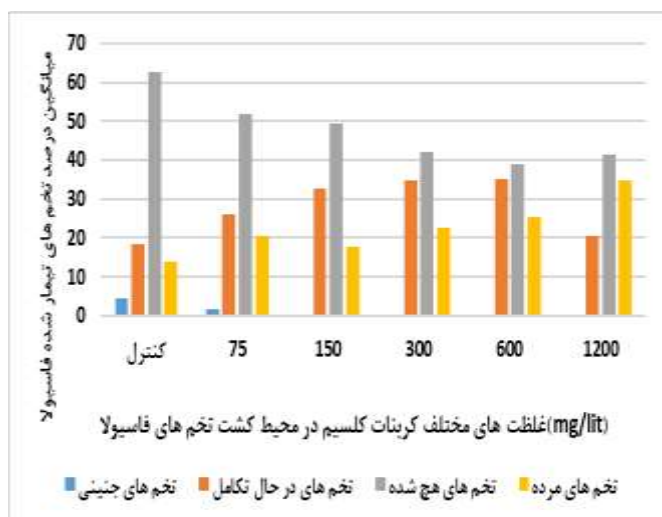
محلول نیترا ته آمونیوم: پس از تهیه نمک نیترا ته آمونیوم

(NH_4NO_3) از شرکت‌های تجاری معتبر (کیمیانون، ایران)، میزان ۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم آن را روی ترازوی دیجیتال وزن کرده و در یک لیتر آب مقطر با pH ۷-۷/۲ در دمای آزمایشگاه (۲۶-۲۸ درجه سانتی‌گراد) حل شد و جهت آزمون بر روی گروه‌های تیمار استفاده شد.

جمع‌آوری نمونه‌های فاسیولا هپاتیکا: در این مطالعه تعداد

۲۰ کبد آلوده به فاسیولا هپاتیکا گوسفندی از کشتارگاه‌های سطح استان خوزستان به‌صورت تازه طی ۶ ماه (بازه زمانی ۲۵ مهر ماه سال ۱۴۰۱ تا تاریخ ۲۵ فروردین ماه ۱۴۰۲) جمع‌آوری گردید و به

فاسیولا گردید که این کاهش در مقایسه با گروه کنترل معنی دار دیده شد ($p < 0.05$). در مقابل درصد تخم‌های مرده فاسیولا هپاتیکا با افزایش غلظت کربنات کلسیم محیط کشت افزایش چشمگیری نشان داد، به عبارتی میزان مرگ و میر واقعی تخم‌ها از ۲ درصد در گروه کنترل تا ۲۳/۶ درصد در غلظت ۱۲۰۰ میلی گرم بر لیتر افزایش داشت که این افزایش از نظر آماری نیز معنی دار ارزیابی گردید ($p < 0.05$) (جدول ۱). بر این اساس مشاهده شد که آب‌های حاوی املاح کربنات کلسیم عمدتاً با اختلال و ممانعت از فرآیند تخم‌گذاری (هچ شدن) از ۶۲/۷ درصد گروه کنترل به ۴۱/۳ درصد در بیش‌ترین غلظت ۱۲۰۰ میلی گرم بر لیتر و هم‌چنین کاهش روند تبدیل شدن سلول‌های تخم فاسیولا هپاتیکا در مرحله جنینی تخم‌های فاسیولا از ۴/۳ درصد در گروه کنترل به صفر درصد در بیش‌ترین غلظت مورد ارزیابی کربنات کلسیم موجب مرگ و میر درصد بیش‌تری از تخم‌های فاسیولا شدند (شکل ۱).



شکل ۱: نمودار مقایسه میزان انواع تخم‌های تیمار شده فاسیولا هپاتیکا در مواجهه با غلظت‌های مختلف محلول کربنات کلسیم پس از ۱۶ روز کشت آزمایشگاهی

۰/۵ درصد و کنترل منفی از آب مقطر با pH ۷/۷ به جای نمک کربناته و نمک نیترا ته در ظروف کشت استفاده گردید. تمامی ظروف کشت در شرایط یکسان دمایی ۲۶ الی ۲۸ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن‌رسانی و رطوبت ۷۰ درصد، به مدت ۱۶ روز در انکوباتور نگه‌داری گردیدند. پس از طی این دوره تکاملی هریک از ظروف کشت گروه‌های تیمار و کنترل جهت تحریک نوزاد به خروج از تخم به مدت ۶-۴ ساعت در معرض نور قرار گرفتند. سپس از رسوب ظروف کشت میزان مشخص (۳۰ میکرولیتر) روی لام مدرج قرار داده و پس از قرار دادن لام بروی آن، در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ مشاهده و شمارش گردیدند. نتایج به صورت تعداد تخم‌های هچ شده، در حال تکامل (مرحله تشکیل سلول‌های تقسیم شده مورولا و رشد نوزاد واجد لکه چشمی)، مرده و پاره شده ثبت گردید.

آنالیز آماری: پس از محاسبه میانگین و انحراف معیار نمونه‌ها، داده‌های به دست آمده از مقایسه تخم‌های در حال تکامل و تخم‌های مرده در محلول‌های کربناته و نیترا ته، به کمک نرم افزارهای آماری SPSS نسخه ۱۶ و آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تکمیلی Tukey بین گروه‌های آزمایش و کنترل، تجزیه و ارتباط معنی دار بین داده‌های با $p < 0.05$ تعیین گردید. برای محاسبه میزان مرگ و میر واقعی تخم‌ها از فرمول آبت که تاثیر هم زمان پارامترهایی از قبیل مرگ و میر و عدم توانایی تخم‌های سالم در تبدیل شدن به لارو را در بر می‌گیرد، استفاده گردید (۱۵).

= درصد واقعی مرگ و میر

$[(\% \text{ مرگ و میر کنترل} - 100) / (\% \text{ مرگ و میر تست} - \% \text{ مرگ و میر کنترل})] \times 100$

نتایج

تاثیر درجات مختلف آب سخت بر تخم‌گذاری و مرگ و

میر تخم فاسیولا هپاتیکا: در بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۱۲۰۰ میلی گرم نمک کربنات کلسیم در یک لیتر آب مقطر با pH مطلوب ۷/۷، هدایت الکتریکی ۱۷۸ زیمنس بر سانتی متر و TDS ۹۱ واحد در میلیون (ppm) در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید که تعداد تخم‌های جنینی در مواجهه با غلظت ۷۵ میلی گرم بر لیتر محلول کربنات کلسیم کاهش چشمگیری نشان دادند و با افزایش غلظت محلول کربنات کلسیم تعداد تخم‌های جنینی به صفر درصد رسیدند که این کاهش در مقایسه با گروه کنترل معنی دار بود ($p < 0.05$). در حالی که با افزایش غلظت کربنات کلسیم تخم‌های در حال تکامل افزایش یافت که در غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ در مقایسه با گروه کنترل معنی دار دیده شد ($p < 0.05$). افزایش غلظت کربنات کلسیم موجب کاهش روند تخم‌گذاری تخم‌های

جدول ۱: تاثیر غلظت های مختلف محلول کربنات کلسیم بر مرگ و میر و هج شدن تخم های فاسیولا هیاتیکا پس از ۱۶ روز کشت آزمایشگاهی

غلظت کربنات کلسیم (mg/lit)	کیفیت شیمیایی آب (۲۲°C)		نمونه	تخم های جنینی		تخم های در حال تکامل		تخم های هج شده		تخم های مرده		درصد مرگ و میر واقعی	میانگین درصد مرگ و میر واقعی ± انحراف معیار
۰ (کنترل)	pH	۷/۷	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	EC (μs/cm)	۱۷۸	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	TDS (ppm)	۹۱	۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۷۵	pH	۸/۵	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	EC (μs/cm)	۱۸۲	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	TDS (ppm)	۹۰	۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱۵۰	pH	۸/۵	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	EC (μs/cm)	۱۸۰	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	TDS (ppm)	۸۸	۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۳۰۰	pH	۸/۵	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	EC (μs/cm)	۱۸۰	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	TDS (ppm)	۹۵	۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۶۰۰	pH	۸	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	EC (μs/cm)	۲۴۰	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	TDS (ppm)	۱۲۰	۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱۲۰۰	pH	۸/۶	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	EC (μs/cm)	۲۵۰	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	TDS (ppm)	۱۳۰	۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰

جدول ۲: تاثیر غلظت های مختلف محلول نیترات آمونیوم بر مرگ و میر و هج شدن تخم های فاسیولا هیاتیکا پس از ۱۶ روز کشت آزمایشگاهی

غلظت نیترات آمونیوم (mg/lit)	نمونه		تخم های جنینی		تخم های در حال تکامل		تخم های هج شده		تخم های مرده		درصد مرگ و میر واقعی	میانگین درصد مرگ و میر واقعی ± انحراف معیار
۰ (کنترل)	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۲۵	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۵۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱۰۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۲۰۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰

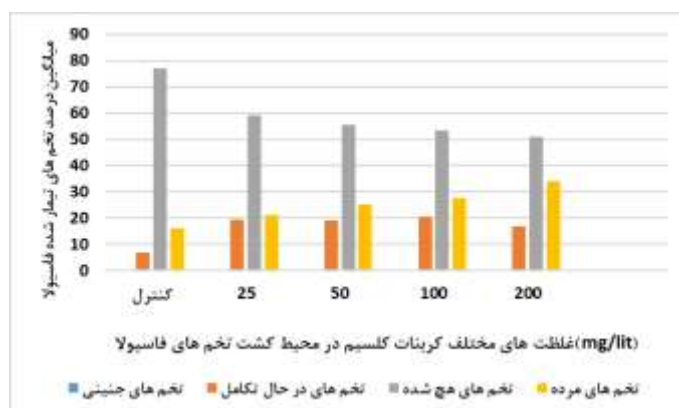
۲/۳ درصد +) و هچ شدن (کاهش ۲۱/۴ درصد -) موجب افزایش مرگ و میری تخم‌های فاسیولا هیپاتیکا گردید.

بحث

کیفیت آب تأمین شده هر منطقه به عوامل ژئومورفولوژی منطقه مانند شیب، ارتفاع و جهت کانال‌های لوله‌کشی و کیفیت آهکی بودن خاک منطقه جغرافیایی بستگی دارد (۶) که تابلوی کیفی خاک یا آب هر منطقه یا هر گونه تغییر در نسبت‌های املاح آن‌ها می‌تواند نقش بالقوه‌ای بر بیولوژی و فیزیولوژی، همه‌گیرشناسی و بوم‌شناسی انگل‌هایی که بخشی از سیر تکاملی شان وابسته به محیط می‌باشد داشته باشد و بنابراین می‌تواند به شکل غیرمستقیم شیوع و پراکندگی بیماری‌ها در مناطق مختلف اقلیمی کشور را تحت تأثیر خود قرار دهد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نمک‌های نیترات آمونیوم و کربنات کلسیم در یک‌روند وابسته به غلظت با افزایش تعداد تخم‌های در حال تکامل در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری موجب تأخیر در فرآیند تکامل جنین و کاهش میزان هچ شدن تخم‌ها (تخم‌گشایی) و افزایش میزان مرگ و میر تخم‌های فاسیولا هیپاتیکا در هر دو گروه تیمار شدند. Munir و همکاران به بررسی اثرات کلرید سدیم (NaCl) و کربنات کلسیم (CaCO₃) بر تخم‌های نماتود همونکوس کونتورتوس و بقای آن پرداختند که کاهش تدریجی میزان تخم‌گشایی با افزایش غلظت کربنات کلسیم و کلرید سدیم را مشاهده کردند. در گروه‌های تیمار شده در غلظت ۲/۵ و ۱۰ درصد کربنات کلسیم و کلرید سدیم در مقایسه با گروه کنترل تخم‌های کم‌تری به مراحل نوزادی L1، L2 و L3 تبدیل شدند. این نشان‌دهنده اثرات مخرب کربنات کلسیم و کلرید سدیم در تخم‌گشایی و پوست‌اندازی به L2 و L3 در مقایسه با گروه کنترل بود. در این پژوهش نتیجه‌گیری شد که کربنات کلسیم و کلرید سدیم را می‌توان در مزارع به میزان مناسب استفاده کرد (۱۶). در مطالعه‌ای که توسط Yakhchali و همکاران در ارومیه بر روی اثر مهاری pH بر قابلیت هچ شدن تخم‌های فاسیولا تحت شرایط آزمایشگاهی انجام شد، مشاهده شد که حداکثر میزان هچ‌شدگی در pH ۷ (۶/۱۴±۵/۹۳) درصد و توقف آن در pH ۳ و ۹-۹/۵ گزارش گردید. تفاوت بین میزان هچ‌شدگی تخم‌ها در گروه تیمار و کنترل قابل توجه بودند. هم‌چنین ثابت شد که pH آب یک عامل بسیار مهم در چرخه زندگی فاسیولا و اپیدمیولوژی آن می‌باشد (۱۰). در پژوهشی که Moazeni و همکاران در شیراز بر روی اثر کشندگی دمای بالا بر روی تخم فاسیولا هیپاتیکا انجام دادند، مشاهده گردید که میزان مرگ و میر تخم‌های انکوبه شده در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در مدت زمان ۱، ۳ و ۵ ساعت به ترتیب ۳۹/۹، ۴۲/۴ و ۵۱/۴ درصد و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در مدت زمان ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ ساعت به ترتیب ۱/۹۶، ۰/۵۷، ۰/۰۷، ۰ و ۰ درصد گزارش گردید. بنابراین نتایج تخم‌های فاسیولا نسبت به دمای بالا حساس بوده و انکوباسیون تخم‌ها در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت برای غیرفعال کردن تخم‌ها کفایت می‌کند (۹). در

تأثیر درجات مختلف آب نیترا ته بر تخم‌گشایی و مرگ و

میر تخم فاسیولا هیپاتیکا: در بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف ۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم نمک نیترات آمونیوم در یک لیتر آب مقطر با pH مطلوب ۷/۷، هدایت الکتریکی ۱۷۸ زیمنس بر سانتی‌متر و TDS ۹۱ واحد در میلیون (ppm) در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید میزان تخم‌های در حال تکامل فاسیولا هیپاتیکا در مواجهه با غلظت‌های تصاعدی محلول نیترات آمونیوم افزایش قابل توجهی را نشان داد که این افزایش در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار ارزیابی گردید ($p < 0.05$). در حالی که با افزایش غلظت آب‌های حاوی نیترات آمونیوم در محیط کشت تخم فاسیولا میزان تخم‌گشایی از ۷۷٪ در گروه کنترل به ۵۱/۱٪ در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کاهش یافت که این کاهش معنی‌دار بود ($p < 0.05$). هم‌چنین میزان مرگ و میر تخم‌های فاسیولا هیپاتیکا با افزایش غلظت نیترات آمونیوم محیط کشت افزایش چشمگیری نشان داد به عبارت دیگر میزان مرگ و میر واقعی تخم‌ها از ۰/۶ درصد در گروه کنترل تا ۲۱/۳ درصد در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش داشت که این افزایش از نظر آماری نیز معنی‌دار بود ($p < 0.05$). لازم به ذکر است که در تعداد تخم‌های جنینی فاسیولا هیپاتیکا در مواجهه با غلظت‌های صعودی آب‌های حاوی املاح نیترات آمونیوم در مقایسه با گروه کنترل تغییری مشاهده نگردید (جدول ۲).



شکل ۲: نمودار مقایسه میزان انواع تخم‌های تیمار شده فاسیولا هیپاتیکا در مواجهه با غلظت‌های مختلف محلول نیترات آمونیوم پس از ۱۶ روز کشت آزمایشگاهی

همان‌طور که داده‌های به دست آمده نشان دادند میزان مرگ و میر واقعی محلول‌های کربنات کلسیم با اختلاف کاهشی ۲۱/۶ درصد و نیترات آمونیوم ۲۰/۷ درصد و تقریباً به یک میزان ارزیابی گردید. به نظر می‌رسد تأثیرات تخریبی نیترات آمونیوم بیش‌تر بر مراحل تخم‌های در حال تکامل (افزایش ۱۰/۱ درصد +) و هم‌چنین هچ شدن (کاهش ۲۵/۹ درصد -) موجب مرگ و میر تخم‌های فاسیولا هیپاتیکا گردید. در حالی که تأثیرات مخرب کربنات کلسیم عمدتاً با تمرکز بر مراحل تخم‌های جنینی (کاهش ۴/۳٪ -)، تخم‌های در حال تکامل (افزایش

۴۰٪، ۲۱٪، ۲۵٪ و ۲۰٪ بالاتر از حد مجاز قابل مصرف شرب پیشنهادی سازمان جهانی بهداشت است که شامل اکثر منابع آب زیرزمینی مناطق مرکزی، جنوبی و شرقی ایران می باشد (۲۱). تولید مواد و محصولات سمی مانند آمونیاک (۲۴، ۲۵، ۲۶) و نیترات و نیتريت (۲۷) از اوره باعث مرگ و میر نوزادان انگل می شود. هنگامی که نوزادان انگلی در معرض کودهای شیمیایی قرار می گیرند، تغییر در فشار اسمزی باعث از دست دادن آب از سلول های لاروی و مرگ سلولی می شود (۲۷). هم چنین تغییر pH خاک و شوری به دلیل مصرف کود اوره یا فسفره به شدت بر تخم گشایی و تکامل لاروهای همونکوس کونتورتوس (۲۸) و هم چنین نماتودهای گره ریشه، ملوئیدوزن اینکو گنیتا و ملوئیدوزن جاونیکا تاثیرگذار می باشد (۲۹). در مطالعات دیگر مشاهده شده است که اوره می تواند برای مرحله جوان، نابالغ و بالغ کرم خاکی ایسینیا فویتایدا با مکانیسم نفوذپذیری در پوست کشنده (۳۰) و برای پشه ناقل فیلاریوزیس، کولکس پیپینس سمی باشد (۳۱). برخی از محققان مشاهده کردند که کودهای معدنی N.P.K. که غنی از سه عنصر مهم نیتروژن، فسفر و پتاسیم هستند و گیاهان نیاز بیش تری به این مواد مغذی جهت رشد خود در مقایسه با سایر مواد معدنی دارند، پتانسیلی برای سرکوب نماتودهای کیست غلات، جمعیت هتروورا اوهنائه (۳۲) و هم چنین جمعیت نماتودهای گره ریشه دارند (۳۳، ۳۴، ۳۵، ۳۶، ۳۷). با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر در محیط آزمایشگاهی، به نظر می رسد که الگوی بالا بودن میزان آلودگی به گونه های فاسیولا در استان های فارس، کهگیلویه و بویراحمد، چهارمحال و بختیاری، خوزستان و گیلان می تواند با سطح TDS آب های زیرزمینی این منطقه مربوط باشد. یافته های مطالعه حاضر نیز در محیط کشت آزمایشگاهی می تواند در ارزیابی شاخص خطر شیوع فاسیولیدوزیس نقش تعیین کننده ای داشته باشد. بدیهی است علاوه بر منابع زیرزمینی که براساس جنس خاک منطقه، میزان املاح معدنی مشخصی دارد، عوامل آب و هوایی مانند میزان بارندگی و تبخیر سالیانه هر منطقه در فصول مختلف سال و عوامل محیطی ناشی از دخالت و دستکاری انسان در طبیعت به صورت مصرف بی رویه کودهای شیمیایی کشاورزی نیز می تواند موجب تغییر در غلظت و تناسب یون های آنیون و کاتیونی مانند سدیم، کلسیم، کلرید و سولفات خاک و آب منطقه شده و در برخی مناطق بر شاخص های کیفی آب آشامیدنی تاثیرگذار باشد. علاوه بر این، تغییر در تناسب و غلظت یون های مورد مطالعه در آب می تواند بر زیستگاه و بیولوژی حلزون های میزبان واسطه لیمنه آ و هم چنین رشد گیاهان منطقه، اثر خود را بر شیوع فاسیولوزیس اعمال می کند که نیاز به مطالعات همه جانبه و جامع دارد. امروزه استفاده از فرم لاروی مگس های حلزون کش (Sciomyzidae: Diptera) در مبارزه بیولوژیک فاسیولیدوزیس نقش قابل توجهی در کنترل شیوع آلودگی می تواند داشته باشد (۳۸). یافته های این مطالعه و تاثیر قابل توجه در غلظت املاح کربنات کلسیم و نیترات آمونیوم بر ممانعت از رشد و تکامل تخم های فاسیولا در

گزارشات منتشر شده از کشورهای آسیایی در طول ۲۵ سال اخیر، ایران با حدود ۸۱ میلیون جمعیت بیش ترین موارد درگیری فاسیولیزیس انسانی گزارش شده را داشته است. در استان های مختلف ایران مانند کردستان، زنجان، کرمانشاه، مازندران، تهران، آذربایجان و گیلان بیماری فاسیولیزیس دیده شده است. حتی با وجود این که بیش از ۳۰ سال پیش فاسیولیزیس انسانی از نقاط مختلف ایران گزارش شده است، شهرهای کنار دریای خزر از دیرباز به عنوان بالاترین میزان شیوع فاسیولیزیس در انسان و حیوان شناخته شده اند (۱۸). در ایران زیان اقتصادی فاسیولیزیس ناشی از ضبط کبد آلوده ۸/۲ میلیون دلار آمریکا در سال است (۱۹). در سال ۱۹۸۹، اولین شیوع بزرگ فاسیولیزیس انسانی در جهان در استان گیلان رخ داد که بیش از ۱۰۰۰ نفر در دو منطقه استان گیلان یعنی بندرانزلی و رشت درگیر شدند. ۱۰ سال بعد، در سال ۱۹۹۹، دومین شیوع بزرگ رخ داد که تخمین زده می شود ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰ نفر صدها مورد فاسیولیزیس انسانی قبل و بعد از شیوع دوم رخ داد که استان گیلان را به عنوان یک منطقه بسیار بومی برای فاسیولیزیس انسانی معرفی کرد (۱۸). هم چنین در مطالعه ای بر روی حیوانات اهلی مشاهده گردید که بیش ترین میزان شیوع آلودگی در شمال کشور ۱۱/۸ درصد (۱۵/۱-۸/۴ درصد) و کم ترین میزان آلودگی دامی به فاسیولیزیس در مرکز ایران با ۱/۸ درصد (۲/۳-۱/۳ درصد) می باشد (۲۰). همانند موارد انسانی، دام های مستقر در شمال ایران، به ویژه استان گیلان، و هم چنین استان های مازندران و گلستان، شرایط بهینه را برای تداخل حلزون و انگل در این منطقه کانونی نشان می دهند، آلودگی بالایی را به خود اختصاص دادند. Ghanimatdan و همکاران، کانون های فاسیولوزیس گوسفندی در ایران استان های گیلان، اردبیل، فارس، کهگیلویه و بویراحمد، چهارمحال و بختیاری و هم چنین سیستان و بلوچستان گزارش کردند. علاوه بر این، بزها در مناطق جغرافیایی شمال غربی و جنوب شرقی کشور توسط گونه های فاسیولا بیش تر انگلی شدند. هم چنین آلودگی دام در استان های فارس، کهگیلویه و بویراحمد، چهارمحال و بختیاری، خوزستان و گیلان غالب بود (۲۰). براساس مطالعات Maghrebi و همکاران که به بررسی هیدروشیمیایی زیرزمینی (نمونه برداری از آب چاه) نقاط مختلف ایران پرداخته اند مشخص گردید که محدوده مقادیر TDS آب حدود ۳۲۶۹۵-۱۰۱ و با میانگین 16227 ± 2134 میلی گرم در لیتر است (۲۱). با توجه به TDS، منابع آب زیرزمینی به ترتیب در حدود ۱۴ درصد و ۱۵ درصد از خاک ایران به عنوان مطلوب (TDS < 500 mg/lit) و مجاز (TDS > 500 mg/lit) (۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر) که مناسب برای مصارف شرب طبقه بندی می شوند (۲۳). سایر نقاط کشور که حدود ۷۱٪ از مساحت کشور را تشکیل می دهند و عمدتاً در بخش های شرقی، جنوبی و مرکزی ایران قرار دارند، میزان TDS زیرزمینی شان به بیش از ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر می رسد (۲۳). Maghrebi و همکاران مشاهده کردند که غلظت سدیم، کلسیم، کلرید و سولفات آب های زیرزمینی مناطق مختلف ایران به ترتیب در حدود

17. Bagheri Torbehbar, E. and Houshmand E., 2021. Fascioliasis in Iran. Clin Microbiol. 10(9): 218.
18. Rokni, M.B., Lotfy, M.W., Ashrafi, K. and Darwin Murrell, K., 2014. Fasciolosis in the MENA region. Neglected Tropical Disease. In: McDowell, M.A. and Rafati, S., 2014. editors. Middle East and North Africa. Wien: Springer-Verlag. 59-90.
19. Khademvatan, S., Majidani, H., Khalkhali, H., Taghipour, A., Asadi, N. and Yousefi, E., 2019. Prevalence of fasciolosis in livestock and humans: A systematic review and meta-analysis in Iran. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 65: 116-123.
20. Ghanimatdan, M., Chalechale, A., Rezaei, F., Rokni, M.B. and Shahrokh, S.R., 2019. Bioclimatic Analysis and Spatial Distribution of Livestock Fascioliasis in Iran. Iran J Parasitol. 14(1): 41-51.
21. Maghrebi, M., Noori, R., Partani, S., Araghi, A., Barati, R., Farnoush, H. and Haghighi, A.T., 2021. Iran's groundwater hydrochemistry. Earth Space Sci. 8: eA001793.
22. WHO (World Health Organization). 1993. Guidelines for drinking-water quality. Geneva (Switzerland): World Health Organization.
23. Foulk, D., 2013. Parasite Control is an Important Component of All Equine Health Care Programs. (Internet). Pennsylvania: Penn State.
24. Mankau, R. and Mankau, S.K., 1975. The effect of NH₄⁺ concentration on selected nematodes in vitro. Nematropica. 5: 25.
25. Walker, J.T. and Post, A., 1969. Reduction of lesion nematode population by decomposing nitrogenous amendments. J Phytopathol. 59: 1055.
26. Siddique, I.A. and Taylor, D.P., 1970. Histopathogenesis of galls induced by Meloidogyne naasi in wheat roots. J Nematol. 2: 239-247.
27. Iqbal, Z., Munir, A.M. and Khan, M.N., 2000. Effect of urea on the development and survival of *Haemonchus contortus* eggs and larvae. Int J Agric Biol. 3: 192-194.
28. Habash, S. and Al-Banna, L., 2011. Phosphonate fertilizers suppressed root knot nematodes *Meloidogyne javanica* and *M. incognita*. J Nematol. 43(2): 95-100.
29. Rai, N., Ashiya, P. and Rathore, D.S., 2014. Comparative study of the effect of chemical fertilizers and organic fertilizers on *Eisenia foetida*. Int J Innov Res Sci Eng Technol. 3(5): 12991-12998.
30. Olayemi, I.K., Maduegbuna, E.N., Ukubuiwe, A.C. and Chukwuemeka, V.I., 2012. Laboratory studies on developmental responses of the filarial vector mosquito *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae), to urea fertilizer. J Med Sci. 12(6): 175-181.
31. Al-Hazmi, A.S. and Dawabeh, A.A.M., 2014. Effect of urea and certain NPK fertilizers on the cereal cyst nematode (*Heterodera avenae*) on wheat. Saudi J Biol Sci. 21(2): 191-196. doi: 10.1016/j.sjbs.2013.10.002.
32. Abolusoro, S.A., Abolusoro, P.F., Mathew, F.O. and Izuogu, N.B., 2013. Effects of organic and inorganic manures on the growth attributes of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) infected Ethiopian egg plant (*Solanum aethiopicum*). World J Agric Res. 1(6): 104-107.
33. Karajeh, M.R. and Al-Nasir, F., 2014. Field utilization of nitrogen fertilizers for controlling root-Knot nematode and improving growth and yield of cucumber. Int J Agric Forestry. 4(1): 34-40.
34. El-Neהל, S. and Abdel-Kader, M.M., 2014. Integration of urea fertilizer and Trichoderma harzianum for controlling Rhizoctonia solani root rot disease of lupine under field conditions. Int J Eng Innov Technol. 4(2): 213-217.
35. Shraf, R., Abbas, H. and Akhtar, A., 2014. Combined effect of biofertilizers and fertilizer in the management of *Meloidogyne incognita* and also on the growth of red kidney bean. Int J Plant Pathol. 5: 1-11.
36. Ramezani, H. and Khaniki, G.B., 2015. Evaluation efficacy of fertilizer and bio-agents on field pea against root-knot nematode. Res J Fish Hydrobiol. 10(9): 195-197.
37. Bali, P. and Belgehszadeh, H. 2016. Distribution and diversity study and distribution of the snail killing flies in noor city, central part of mazandaran province. J Anim Environ. 8 (3): 71-80. (In Persian)

محیط، به خوبی با الگوی شیوع آلودگی فاسیولا در مناطق مختلف کشور با غلظت های متفاوت املاح در آب های زیرزمینی منطبق و هم خوانی دارند. بنابراین می توان از نتایج این مطالعه در راستای جلوگیری از رشد و روند تخم گشایی میراسیدیوم های فاسیولا هیاتیکا به عنوان یکی از دلایل مهم اختلاف شیوع فاسیولیوزیس در موارد بروز اپیدمی های فراگیر در کشور بهره برد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز در انجام این تحقیق پژوهانه شماره (SCU.VP) 1402.26535 تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

1. Malakouti, M.J. and Tehrani, M.M., 1999. The role of micronutrients in increasing the yield and improving the quality of agricultural products Tehran: Tarbiyat Modarress University Press. (In Persian)
2. Irfeey, A.M.M., Najim, M.M.M., Alotaibi, B.A. and Traore, A., 2023. Groundwater Pollution Impact on Food Security. Sustainability. 15: 4202. doi: 10.3390/su15054202.
3. Sparks, D.L., 2003. Environmental Soil Chemistry. Cambridge, MA. Academic Press, Elsevier Science.
4. Akhavan, S., Abyaneh, H.Z. and Varkeshi, M.B., 2014. A Systematic Review on Nitrate Concentration in Water Resources of Iran. Iran. J Health Environ. 7(2): 205-228. (In Persian)
5. Jalali, M. and Kolahchi, Z., 2006. Nitrate Concentration in Groundwater of Bahar Area, Hamadan. Soil and Water Sci. 19(2): 193-200. (In Persian)
6. Hossienifar, F., Entezari, M. and Hosseini, S., 2019. Water hardness zoning of Isfahan Province, Iran, and its relationship with cardiovascular mortality, 2013-2015. ARYA Atheroscler. 15(6): 275-280.
7. Dehghani, A., 2021. A study on faunistic and geographical distribution of freshwater snails (Gastropoda) in northwest of Iran. J Anim Environ. 13(4): 293-300. doi: 10.22034/AEJ.2020.259988.2421.
8. Sabourin, E., Alda, P., Vázquez, A., Hurtrez-Boussès, S. and Vittecoq, M., 2018. Impact of human activities on fasciolosis transmission. Trends Parasitol. 34(10): 891-903. doi: 10.1016/j.pt.2018.08.004.
9. Moazeni, M., Ansari Lari, M., Masoodfar, M., Hosseinzadeh, S. and Mootabi Alavi, A., 2010. Lethal effect of high temperatures on the eggs of *Fasciola hepatica*. Iran J Vet Res. 11(2): 168-173.
10. Yakhchali, M. and Bahrarnnejad, K., 2016. Inhibition effect of pH on the hatchability of *Fasciola* miracidia under laboratory conditions. Iran J Parasitol. 11(1): 30-34.
11. Behrens, A.C. and Nollen, P.M., 1993. Hatching of *Echinostoma aproni* miracidia from eggs derived from adults grown in hamsters and mice. Parasitol Res. 79(1): 28-32. doi: 10.1007/BF00931214.
12. Ashad, F.A., Anisuzzaman, M., Begum, N., Dey, A. and Mondal, M.M., 2013. Factors Affecting the Development and Hatching of Eggs and the Survival of Infective Larvae of *Haemonchus contortus* in Laboratory Condition. Progress agric. 22(1-2): 75-83.
13. Rowcliffe, S.A. and Ollerenshaw, C.B., 1960. Observations on the bionomics of the egg of *Fasciola hepatica*. Ann Trop Med Parasitol. 54: 172-181.
14. Hurtrez-Boussès, S., Meunier, C., Durand, P. and Renaud, F., 2001. Dynamics of host-parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke. Microbes Infect. 3(10): 841-849.
15. Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J Econ Entomol. 18(2): 265-267.
16. Munir, M.A., Iqbal, Z. and Nisar Khan, M., 2001. In vitro Effects of Sodium Chloride and Calcium Carbonate on the Development and Survival of *Haemonchus contortus*. Int J Agric Biol. 1560-8530/03-1-125-128.