

مقایسه چند روش درمانی برای مبارزه با ساپروولگنیوزیس در تخم‌های لقاح یافته ماهی قزل آلاهی رنگین کمان

• مصطفی اخلاقی (نویسنده مسئول)

دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز

• علی اصغر بهالدینی

دانش آموزانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون

تاریخ دریافت: اردیبهشت ماه ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: خرداد ماه ۱۳۹۱

تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۷۱۱-۶۱۳۸۷۳۷

Email: akhlaghi@shirazu.ac.ir

چکیده

در این تحقیق از باکتری *Pseudomonas huorescence* به عنوان پروبیوتیک، کلرید سدیم، عصاره گیاهی گیاه بادام هندی، مالاشیت گرین و فرمالین به عنوان مواد ضد قارچ در مقدار و مدت زمان معین جهت پیشگیری از قارچ زدگی تخم‌های لقاح یافته ماهی قزل آلاهی رنگین کمان از زمان لقاح تا چشم زدگی روزانه به مدت ۱۹ روز استفاده شد. گروه کنترل بدون استفاده از مواد فوق در نظر گرفته شد. نتایج به دست آمده نشان داد تخم‌های لقاح یافته درمان شده با پروبیوتیک *Pseudomonas huorescence* (۱۰^۷ در هر میلی لیتر آب)، ۸۱/۳٪ با کلرید سدیم (۲۰۰۰۰ پی پی ام)، ۸۶/۷٪ با عصاره گیاهی (۵ پی پی ام) ۸۲/۹٪ با مالاشیت گرین (۶۶/۷ پی پی ام)، ۸۳/۴٪ و با فرمالین (۲۰۰ پی پی ام)، ۸۹/۲٪ بازماندگی داشتند، در حالی که درصد بازماندگی در گروه کنترل ۷۷/۲٪ بود. بنابراین در گروه‌های آزمایشی که باکتری *Pseudomonas huorescence* به عنوان پروبیوتیک، عصاره گیاهی بادام هندی و دیگر مواد شیمیایی به عنوان ضد قارچ استفاده شده بود در مقایسه با گروه کنترل بطور معنی داری از رشد قارچ ساپروولگنیاز پیشگیری گردید ($P < 0/05$). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد این پروبیوتیک و عصاره گیاهی می‌توانند به عنوان ضد قارچ ساپروولگنیاز و بی‌خطر برای محیط زیست در بازماندگی تخم‌های لقاح یافته مطرح باشند.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، ضد قارچ، بازماندگی تخم‌های لقاح یافته، قزل آلاهی رنگین کمان

Comparison of several treatment methods against saprolegniosis in rainbow trout fertilized eggs

By: M. Akhlaghi, School of Veterinary Medicine, Shiraz University and Bahaooodini A.A. School of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Kazerun Branch

In this research *Pseudomonas fluorescens* as a probiotic, sodium chloride, plant extract (*Terminalia catappa*), malachite green and formalin as antifungal agents were used daily for 19 days on rainbow trout fertilized eggs in order to compare their survival with untreated fertilized eggs in control group. Results showed that the percent of live eggs (eyed) after 19 days treatment with *P. fluorescens* (10^7 bacteria/ml), sodium chloride (20000 ppm), the plant extract (5 ppm), malachite green (66.7 ppm), formalin (200 ppm) and the control group were 81.3%, 86.7%, 82.9%, 83.4%, 89.2%, and 77.2% respectively. Thus *P. fluorescens* as a probiotic, the plant extract and the other anti-fungal agents revealed significant effect in rainbow trout fertilized eggs survival anti-fungal activity as compared with the control group ($P < 0.05$). The plant extracted antifungal agent and also the probiotic as a new agent used in this study compete with the commonly used antifungal in that these are environmentally friendly non-hazardous agents.

Key words: Probiotic, Antifungal, Fertilized eggs survival, Rainbow trout

مقدمه

یکی از مشکلات اساسی تولید در کارگاه های تکثیر و پرورش ماهی قزل آلاي رنگين کمان عارضه قارچ زدگی می باشد که تخم ها، لاروها و ماهیان پرورشی و مولدین را آلوده نموده و باعث ایجاد تلفات در آنها می شود. سالانه هزینه فراوان و مقدار زیادی دارو در جهت مبارزه با این بیماری مصرف شده که می تواند محیط زیست را نیز تحت تأثیر قرار داده و اثرات جبران ناپذیری را از خود بگذارد. به همین دلیل اخیراً توجه خاصی به مواد شیمیایی و بیولوژیکی که اثرات ناچیزی در این جهت از خود بر محیط زیست داشته باشند شده است (۲۱).

بسیاری از گونه های ساپروولگنیا به عنوان مهاجمان ثانویه فرصت طلب بدنبال عفونت ناشی از یک عامل اولیه ماهی ها و تخم های لقاح یافته ماهیها را مورد حمله قرار می دهند (۱۸). هر گونه تغییر در شرایط فیزیولوژیکی ماهی که معمولاً به دنبال شرایط استرس زای حاکم از جمله جمعیت زیاد ماهی در استخر، حمل و نقل و دستکاری ها صورت می گیرد زمینه ساز حمله عوامل عفونی از جمله قارچ ساپروولگنیا می شود (۲۱). می توان اذعان داشت که تاکنون موفق ترین روش برای کنترل ساپروولگنیوزیس و عفونت های مشابه، مدیریت بهداشتی صحیح و استفاده از مواد شیمیایی مناسب بوده است.

ملاشیت گرین، فرمالین، پراکسید هیدروژن، کلرید سدیم و کلسیم، سولفات مس، یدوفورها، پرمنگنات پتاسیم، آبی متیلن و تانن از جمله مواد شیمیایی مورد استفاده برای درمان تخم های لقاح یافته و ماهی ها بوده اند (۱۳). اثرات مخرب تعدادی از مواد شیمیایی ذکر شده از جمله ملاشیت گرین کاربرد آنها را تا حد زیادی متوقف ساخته و سایر مواد یا دارای ملاحظات محیط زیستی بوده و یا از خاصیت قارچ کشی مؤثری برخوردار نبوده اند (۲۱). فلذا جایگزین های دیگری که علاوه بر داشتن اثر مفید، به محیط زیست هم آسیب نرسانند. از جمله استفاده از رقیب باکتریایی همچون سودوموناس علیه قارچ ساپروولگنیا به عنوان کنترل کننده طبیعی قارچ در محیط آبی مورد توجه خاصی قرار گرفته است (۸) که به نظر

می رسد این مکانیزم به واسطه تولید متابولیت های مهار کننده علیه قارچ باشد (۱، ۱۴). امروزه کاربرد عصاره های گیاهی ضد قارچ به دلیل منشأ طبیعی برای مهار عوامل قارچی مورد توجه قرار گرفته اند. در یک تحقیق عصاره های تهیه شده از قسمت های مختلف بیست گیاه علیه قارچ ساپروولگنیا پارازیتیکا مورد استفاده قرار گرفت که عصاره گیاه یوجینا آروماتیکا رشد قارچ را بطور مؤثری متوقف ساخت. عصاره پیازهای آلوم سپا، برگ های اوکالیپتوس و عصاره میوه های کاپسیکوم فروتنس نیز رشد این قارچ را متوقف ساختند (۹، ۱۲). عصاره برگ بادام هندی که به عنوان ترکیبی ضد قارچی (۴، ۵)، ضد تورمی (۷) و دارای خواص آنتی اکسیدانی (۶) معرفی گردیده برای مبارزه با قارچ ساپروولگنیا مورد استفاده قرار گرفته است (۵). اخیراً نقش مؤثر اسانس شمعدانی در کنترل آلودگی های قارچی تخم ماهی قزل آلاي رنگين کمان نشان داده شده است (۲). هدف از انجام این تحقیق مقایسه اثر ضد قارچی پروبیوتیک *P. fluorescens*، کلرید سدیم، عصاره برگ گیاه بادام زمینی، ملاشیت گرین و فرمالین بر بازماندگی تخم های لقاح یافته ماهی قزل آلاي رنگين کمان به منظور شناخت بیشتر جایگزین های بی خطر و اقتصادی برای معرفی به صنعت پرورش ماهی بود.

مواد و روش کار**بررسی آزمایشگاهی**

باکتری سودوموناس فلورسنس قبل از انجام آزمایش ها، از آب کارگاه تکثیر و پرورش ماهی مورد آزمایش جدا شده و در آزمایشگاه ابتدا بروش بیوشیمیایی مورد شناسایی دقیق باکتریولوژیک قرار گرفت (۳). با استفاده از پرایمرهای

‘F (۵’ AAGTCGTAACAAGGTAG۳)

و ‘R(۵’ GACCATATATA ACCCCAAG ۳)

در پی سی آر به منظور تولید باند ۴۴۰ جفت باز در شناسایی این باکتری استفاده گردید (۱۶). برای تعیین مقدار 10^7 باکتری، از لام نئوبار استفاده شد و با سرم فیزیولوژی رقیق گردید.

روش استفاده از اتانول ۸۰٪، مالاشیت گرین و فرمالین، تخم های لقاح یافته در سینی‌ها روزانه به طور مجزا بمدت ده دقیقه در معرض مواد نام برده شده قرار می‌گرفتند (جدول ۱).

نحوه استفاده از باکتری سودوموناس و مواد شیمیایی فوق به این ترتیب بود که میزان محاسبه شده هر ماده (بر اساس یافته های آزمایشگاهی در این تحقیق) آماده شده در یک عدد بطری سرمی یک لیتری در ورودی هر ترفاق قرار داده می‌شد و سرعت تخلیه آن بنحوی تنظیم می‌شد که تخم های لقاح یافته به مدت ۱۰ دقیقه در معرض باکتری سودوموناس و مواد اشاره شده در جدول ۱ قرار گیرند. تخم های مرده از مرحله چشم زدگی بعد روزانه جمع‌آوری شده و تعداد آنها ثبت می‌گردید. از دیواره تعدادی از این تخم ها جهت تشخیص نوع قارچ نمونه برداری شده و توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار می‌گرفت. در پایان دوره پس از ۱۹ روز از شروع آزمایش مجموع تعداد تخمهای مرده در کل دوره محاسبه و یادداشت گردید. به منظور مقایسه نتایج حاصل، بررسی آماری توسط تست آنوا ۳ با استفاده از نرم افزار اس پی اس ۴ انجام شد. تفاوت معنی دار در سطح $P > 0.05$ نشان داده شد.

نتایج

یافته‌های آزمایشگاهی

در آزمایش اثر بازدارندگی رشد قارچ ساپروولگنیا توسط باکتری *P. fluorescens* (به تعداد ۱۰۷ از این باکتری بروش پورپلیت به ازای هر میلی لیتر محیط کشت ساپارود دکستروز آگار) که به روش کیفی صورت گرفت، نشان داد قارچ ساپروولگنیا کشت شده بروی محیط حاوی باکتری پروبیوتیک نتوانست رشد و توسعه یابد در حالی که در پلیت کنترل، قارچ در تمام پلیت رشد نمود (شکل ۱). به همین شکل مقادیر بیست هزار پی پی ام کلرید سدیم؛ ۵ پی پی ام عصاره گیاهی؛ ۶۶/۷ پی پی ام مالاشیت گرین و ۲۰۰ پی پی ام فرمالین در کمترین میزان موجب بازدارندگی از رشد قارچ ساپروولگنیا در محیط کشت شدند.

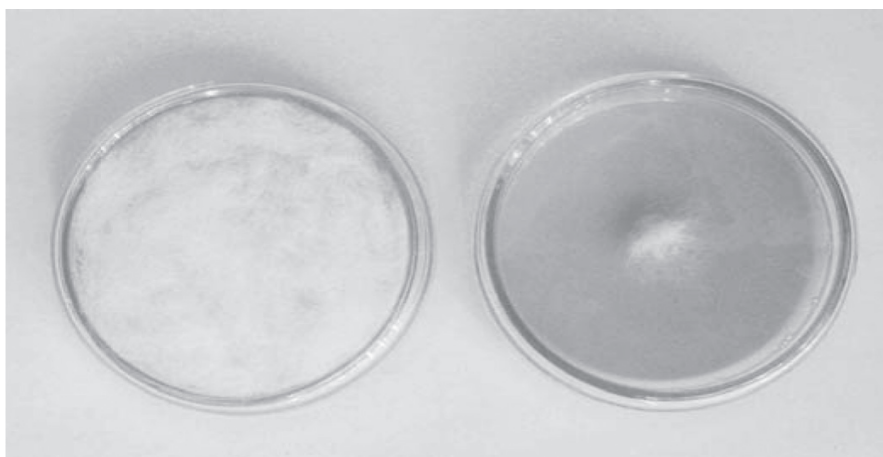
قارچ *Saprolegnia parasitica* جدا شده از تخم های چشم زده در این تحقیق به روش شهنازیان و همکاران شناسایی و سپس مورد استفاده قرار گرفت (۱۸). برای تعیین اثر بازدارندگی رشد این قارچ توسط باکتری *P. fluorescens*، تعداد $10^6 - 10^9$ از این باکتری به روش پورپلیت^۱ به ازای هر میلی لیتر محیط کشت ساپارود دکستروز آگار اضافه شد و قارچ مزبور بر روی آن کشت گردید. همچنین مقادیر ده هزار، بیست هزار و سی هزار پی پی ام کلرید سدیم؛ ۵، ۱۰ و ۱۵ پی پی ام عصاره گیاهی؛ ۵۰، ۶۶/۷ و ۱۰۰ پی پی ام مالاشیت گرین و ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ پی پی ام فرمالین پس از فیلتر با کاغذ صافی ۰/۲۲ میکرون با روش پورپلیت به محیط اضافه و برای هر مقدار سه پلیت اختصاص داده شد. سپس قارچ ساپروولگنیا به روش فوق بر روی محیط کشت داده شد. اثر بازدارندگی از رشد بروش کیفی مورد بررسی قرار گرفت به این ترتیب که یا قارچ قرار داده در محیط رشد توسعه پیدا نمی‌کند یا اینکه رشد یافته و یا در محیط کشت رشد نموده و سطح پلیت را فرا می‌گیرد. بهترین میزان بازدارندگی از رشد برای مواد فوق ثبت و در بررسی مزرعهای مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی مزرعهای

در آزمایش مزرعهای این تحقیق ۶ ترفاق حاوی ۱۱ سینی تخم‌های لقاح یافته ماهی قزل آلا رنگین کمان کارگاه تکثیر و پرورش ماهی قزل کمان واقع در منطقه شش پیر شهرستان سپیدان (درجه متوسط آب ۱۰ درجه سانتی گراد، اکسیژن ۹ پی پی ام و پی اچ ۷/۸ که قبل و بعد از اضافه نمودن مواد به آب اندازه گیری می‌شد) مورد استفاده قرار گرفت. تخم‌ها از ماهی‌های ۴ ساله استحصال و پس از لقاح، شمارش و در گروه های آزمایشی تقسیم شدند. ابتدا دبی آب به ترفاق‌ها تعیین و یادداشت می‌گردید (۱۵ لیتر در دقیقه برای هر ترفاق) و روزانه با اضافه کردن سودوموناس فلورسنس به عنوان پروبیوتیک، کلرید سدیم، عصاره گیاهی تهیه شده از برگ گیاه بادام هندی (*Terminlia catappa*) به

جدول ۱- تعداد سینی‌ها و تخم‌های لقاح شده سالم مورد استفاده در هر سینی در هر گروه آزمایشی، مقدار باکتری سودوموناس فلورسنس و مواد ضد قارچی دیگر استفاده شده برای درمان روزانه تخم‌های لقاح یافته تا زمان چشم‌زدگی آنها

گروه های آزمایشی	تعداد سینی‌ها	تعداد تخم‌های لقاح یافته سالم در روز اول		مقدار هر ماده (پی پی ام)	مقدار هر ماده (متناسب با مقدار آب)
		سینی ۱	سینی ۲		
باکتری سودوموناس	۲	۳۷۰۰	۴۹۱۷	۱۰۷	۱۰۷ باکتری در یک میلی لیتر آب
کلرید سدیم	۲	۵۲۸۸	۴۸۹۶	۲۰۰۰۰	۱ گرم در ۵۰ میلی لیتر آب
عصاره گیاهی	۲	۶۷۲۵	۶۵۲۶	۵	۱ گرم در ۲۰۰۰۰۰ میلی لیتر آب
مالاشیت گرین	۲	۴۶۱۰	۵۲۹۹	۶۶/۷	۱ گرم در ۱۵۰۰۰ میلی لیتر آب
فرمالین	۲	۵۹۹۹	۵۶۲۰	۲۰۰	۱ میلی لیتر در ۵۰۰۰ میلی لیتر آب
کنترل	۱	۴۶۱۴	-	-	-



شکل ۱- (پلیت سمت راست) اثر بازدارندگی پروبیوتیک *P. fluorescens* در جلوگیری از رشد و توسعه قارچ ساپروولگنیا پارازیتیکا بر روی محیط سابارود دکستروز آگار، (پلیت سمت چپ) پلیت کنترل بدون پروبیوتیک که قارچ ساپروولگنیا پارازیتیکا در تمام پلیت رشد نموده است.

قارچ زدگی با یکدیگر اختلاف معنی داری نداشتند (جدول ۲). مالاشیت گرین، عصاره گیاهی و استفاده از باکتری *P. fluorescens* توانستند به ترتیب ۸۳/۴، ۸۲/۹ و ۸۱/۳ درصد بازماندگی را داشته باشند در حالی که درصد بازماندگی در گروه کنترل ۷۷/۲ درصد و بطور معنی داری با گروه کنترل متفاوت بود. مقایسه تأثیر ۶۶/۷ پی پی ام مالاشیت گرین، ۵ پی پی ام عصاره گیاهی و تعداد ۱۰۷ باکتری *P. fluorescens* در پیشگیری از رشد میسلیموم های قارچ ساپروولگنیا به لحاظ آماری با یکدیگر تفاوت معنی داری را نشان ندادند ($p < 0.05$). مقایسه آماری گروه های مختلف، گروه های تخم های لقاح یافته درمان شده با فرمالین و کلرید سدیم با گروه های مشابه حمام داده شده با مالاشیت گرین، عصاره گیاهی و باکتری *P. fluorescens* بطور معنی داری متفاوت و این گروه ها با گروه کنترل از تفاوت معنی داری برخوردار بودند ($p < 0.05$) (شکل ۲). مقایسه میزان اکسیژن و پی ایچ آب ورودی به ترفاها قبل و بعد از اضافه نمودن مواد مورد استفاده تفاوت معنی داری را نشان ندادند ($p < 0.05$).

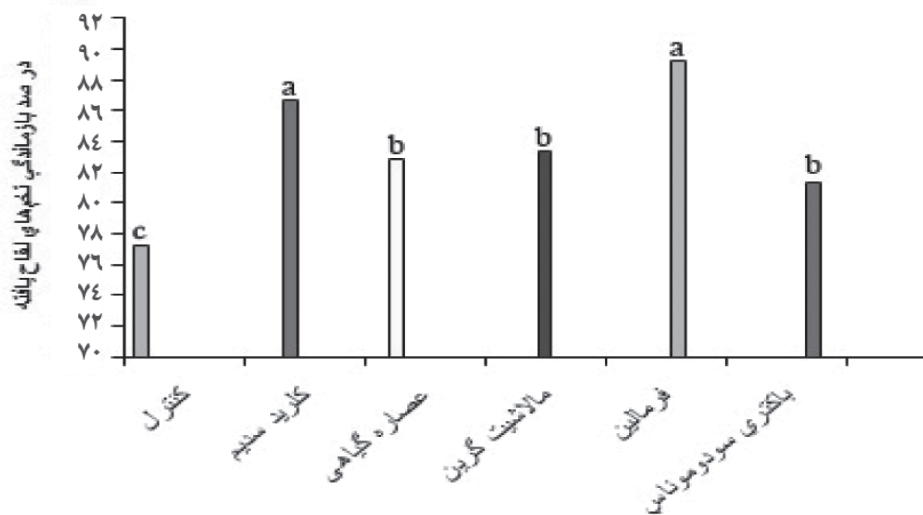
یافته های مزرعه ای

مواد ضد قارچی شامل باکتری *P. fluorescens*، کلرید سدیم، عصاره گیاهی ضد قارچ، مالاشیت گرین، و فرمالین برای پیشگیری از قارچ زدگی تخم های لقاح یافته ماهی قزل آلا رنگین کمان از زمان لقاح تا زمان چشم زدگی به مدت ۱۹ روز در میزان های بکار رفته مؤثر بودند. بررسی میکروسکوپی نمونه های تهیه شده از دیواره تخم ها حاکی از وجود میسلیموم های قارچ ساپروولگنیا پارازیتیکا بود. تخم های لقاح یافته ضد عفونی شده با فرمالین و کلرید سدیم به طور روزانه به ترتیب ۸۹/۲ و ۸۶/۷ درصد بازماندگی داشتند در حالی که درصد بازماندگی در گروه کنترل ۷۷/۲ درصد بود. میانگین تعداد تخم ها از شمارش ۱۹ روزه در این دو گروه به ترتیب ۱۰۸۷۶ و ۹۴۷۹ تخم زنده بود که به همین ترتیب انحراف معیار ۱۴۳ و ۱۵۴ را نشان می داد و بطور معنی داری با گروه کنترل متفاوت بود ($p < 0.05$) لیکن فرمالین با دوز ۲۰۰ پی پی ام و کلرید سدیم به میزان ۱ گرم در ۵۰ میلی لیتر بر کنترل

جدول ۲- میانگین تعداد و درصد تخم های لقاح شده زنده در گروه های مختلف در طول آزمایش

انحراف معیار از میانگین های تعداد شمارش شده روزانه بمدت ۱۹ روز	درصد بازماندگی تخم های چشم زده پس از ۱۹ روز از شروع آزمایش	میانگین تعداد تخم های لقاح شده زنده در طول آزمایش	تعداد تخم های چشم زده پس از ۱۹ روز از شروع آزمایش	تعداد تخم های لقاح شده زنده در شروع آزمایش	گروه های آزمایشی
۱۷۵	۸۱/۳ b	۷۶۹۳b	۷۰۰۵	۸۶۱۷	سودوموناس فلورسنس
۱۵۴	۸۶/۷ a	۹۴۷۹a	۸۸۲۸	۱۰۱۸۴	کلرید سدیم
۲۶۸	۸۲/۹ b	۱۲۰۱۵b	۱۰۹۸۵	۱۳۲۵۱	عصاره گیاهی
۱۹۵	۸۳/۴ b	۹۱۹۰b	۸۲۶۶	۹۹۰۹	مالاشیت گرین
۱۴۳	۸۹/۲ a	*۱۰۸۷۶a	۱۰۲۶۳	۱۱۶۱۹	فرمالین
۱۲۷	۷۷/۲ c	۴۲۲۱c	۳۵۶۰	۴۶۱۴	کنترل

* حروف مشابه اختلاف معنی داری ندارند ($p < 0.05$).



ترکیبات مختلف را نشان می‌دهد. حروف مشابه اختلاف معنی داری ندارند ($p < 0.05$).

را ۸۱/۳ درصد که بطور معنی داری از گروه کنترل بیشتر بود بهبود بخشید. در آزمایشگاه نیز اثر بازدارندگی رشد قارچ ساپروولگنیا پارازیوتیکا توسط باکتری *P.fluorescence* در محیط کشت ساپارود دکستروز آگار در این مطالعه مشخص گردید به طوری که قارچ مزبور در محیط حاوی این باکتری پروبیوتیک بخوبی توسعه نمی‌یابد و هیف‌های آن، پلیت را پر نمی‌کنند. یعقوبی و همکاران (۱۳۸۰) نشان دادند که سویه باکتری *P.fluorescence* قادر است رشد *S.diclina* نوع ۱ در شرایط آزمایشگاهی را متوقف سازد. آزمایش‌های قبلی انجام شده توقف رشد *Sparasitica* زمانی که از باکتری *P.fluorescence* در محیط آزمایشگاهی استفاده شده است را نشان می‌دهد (۱۱). این باکتری فلور آب کارگاه پرورش ماهی محسوب شده و استفاده از آن هیچ گونه زبانی برای موجودات زنده در آب و محیط زیست منطقه ندارد.

کلرید سدیم در کنترل عفونت‌های قارچی و بهبود درصد تفریح در تخم‌های لقاح یافته ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بسیار مؤثر گزارش شده است (۱۳). میزان استفاده ۳۰۰۰ پی پی ام به مدت ۱۵ دقیقه باعث کنترل عفونت قارچی در تخم‌های ماهی آزاد چینوک شد (۱۹). در تحقیق جاری میزان ۲۰۰۰ پی پی ام کلرید سدیم توانست بازماندگی تخم‌ها را ۸۶/۷ درصد که به طور معنی داری از گروه کنترل بیشتر بود ارتقاء بخشد. کلرید سدیم که ماده مؤثر علیه قارچ ساپروولگینوزیز محسوب شده و با محیط زیست نیز سازگار است بایستی به مقدار زیاد مورد استفاده قرار گیرد فلذا مشکلاتی را در زمان استفاده ایجاد می‌نماید به همین دلیل محققین داروها و ترکیبات جایگزین دیگر را دنبال می‌نمایند.

عصاره برگ بادام هندی که ترکیبی ضد باکتریایی (۴) معرفی شده، توانسته است رشد قارچ‌ها را روی تخم‌های لقاح یافته ماهی تیلاپیا کاهش دهد (۵) به همین دلیل در این تحقیق به میزان ۵ پی پی ام مورد استفاده قرار گرفت و توانست به طور معنی داری به میزان ۸۲/۹ درصد بازماندگی تخم‌ها را به دنبال داشته باشد در حالی که در گروه کنترل ۷۷/۲ درصد بازماندگی تخم‌ها مشاهده شد. این ترکیب و ترکیبات

بحث

قارچ زدگی تخم‌های لقاح شده قزل‌آلای رنگین کمان از مشکلات عمده کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهی مناطقی است که از درجه حرارت آب سرد (معمولاً ۱۲-۹ درجه سانتی‌گراد) برخوردار هستند. این درجه حرارت مناسب رشد قارچ ساپروولگینا می‌باشد. عواملی از جمله گل‌الوده شدن آب پس از بارش باران و برف در فصول پائیز و زمستان که همراه با تکثیر ماهی‌های فوق می‌باشد و کمک به تکثیر قارچ‌های ساپروولگینا در اطراف تخم‌های لقاح شده می‌نماید. فلذا در یک برنامه مدیریت بهداشتی ضد عفونی روزانه تخم‌ها علیه قارچ ساپروولگینا از اهمیت فراوانی برخوردار است.

ترکیباتی همچون مالاشیت گرین، فرمالین، کلرید سدیم و آب اکسیژنه فراوانی مورد استفاده تکثیرکنندگان ماهی قرار گرفته است که با درجات مختلف اثراتی را از خود بجای می‌گذارند (۱۷). مالاشیت گرین که به دلیل سرطان‌زایی به تدریج از لیست دارویی بخصوص در آبری پروری حذف شده است به مقدار ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر در نابودی زئوسپورها و جلوگیری از رشد هیف‌های ساپروولگینا مؤثر است (۲۰). در این تحقیق مالاشیت گرین به میزان ۶۶/۷ پی پی ام توانست بازماندگی تخم‌های لقاح یافته را از ۷۷/۲ درصد در گروه کنترل به ۸۳/۴ ارتقاء بخشد که به طور معنی داری از گروه کنترل متفاوت است ($p < 0.05$). استفاده از مالاشیت گرین در این بررسی، مقایسه اثر آن با سایر موارد مورد استفاده بود و هدفی برای معرفی مجدد آن به عنوان داروی ضد قارچی نبود.

باکتری *P.fluorescence* جدا شده از کارگاه تکثیر و پرورش ماهی مورد آزمایش که به عنوان پروبیوتیک در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت به میزان ۱۰^۷ باکتری در حمام دادن روزانه تخم‌های لقاح یافته استفاده شد و با تولید ترکیبات ضد قارچی یا بدلیل استقرار در روی تخم و جلوگیری از قرار گرفتن زئوسپورهای قارچ ساپروولگینا و همچنین ترمیم بخشیدن به فلور باکتریایی طبیعی سطح تخم‌ها لقاح یافته کمک نمود. باکتری *P.fluorescence* توانست بازماندگی تخم‌ها

Chichester, UK.

- 4- Burapadaja, S., Tuntiwechuttikul P. and Bunchoo. A. (1994) A constituent with antibacterial action from *Terminalia catappa*. *Thai. J. Pharm. Sci.* 18: 42-46.
- 5- Chitmanat, C., Tongdonmuan K. and Nunsong. W. (2003) *Antimicrobial activity derived from Terminalia catappa solution against some Tilapia pathogens*. The 3rd world congress on medicinal plant and aromatic plants for human welfare, 3-7 Feb 2003, Chiang mai, Thailand.
- 6- Chyau, C., Tsai, S. Ko P. and Mau. J. (2002) Antioxidant properties of solvent extracts from *Terminalia catappa* leaves. *Food Chem.* 78: 483-488.
- 7- Fan, Y.M., Xu, L.Z. Gao, J. Wang, Y. Tang, X.H. Zhao X.N. and Zhang. Z.X. (2004) Phytochemical and anti-inflammatory studies on *Terminalia catappa*. *Fitoterapia* 75: 253-260.
- 8- Ghiasi, M., Zahedi, A., Safari, R., Aghaei Moghadam, A.A and Binaii, M. (2010) *Inhibitory effect of bacteria like Pseudomonas anguileptica on in vitro Saprolegnia sp.* Growth. 2nd International Congress on Aquatic Animal Health Management and Diseases. October 26-27, Tehran, Iran.
- 9- Gibbons, S., Ohlendorf B. and Johnsen. I. (2002) The genus *Hypericum*-a valuable resource of Anti-Staphylococcal leads. *Fitoterapia* 73: 300-304.
- 10- Gurusiddaiad, S., Weller., D. M. Sarkar A. and Cook, R. J. (1986) Characterization of an antibiotic produced by a strain 4 *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Geaumannomyces graminis* var. *tritici* and *Pythium* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 488-495.
- 11- Hatai, K. and Willoughby. L. G. (1988) *Saprolegnia parasitica* from the rainbow trout inhibited by the bacterium, *pseudomonas ferax*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 83: 257-263.
- 12- Khallil, A. R. M. (2001) Phytofungitoxic properties in the aqueous extracts of some plants. *Assiut J. Agri. Sci.* 32: 135—143.
- 13- Khodabande, S. and Abtahi. B. (2006) Effects of sodium chlororide, formalin and iodine on the hatching success of common carp, *Cyprinus carpio*, eggs. *J. Appl. Ichthyol.* 22:54-56.
- 14- Kim, D. H. and Austin. B. (2006) Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, walbauns) induced by probiotics. *Fish & Shellfish Immunol.* 21: 513-524.
- 15- Marking, L. L., Raoh J. J. and Schreier. T. M. (1994) Evaluation of antifungal agents for fish culture. *Prog. fish cult.* 56: 225 -231.
- 16 - Ramesh Kumar, N., Thirumalai Arsu, V. and Gunasekaran, P., (2002) Genotyping of antifungal compounds producing plant growth promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens*. *Cur.*

گیاهی دیگر (۱۲) از جمله عصاره های گیاهی که با صرفه اقتصادی بیشتر تهیه می شوند برای مثال اسانس شمعدانی (۲) که اثرات مخرب محیط زیستی در آنها کمتر احتمال داده می شود می توانند به عنوان ضد قارچ برای درمان روزانه تخم های لقاح یافته قزل لای رنگین کمان در کارگاه های تکثیر و پرورش ماهیان سرد آبی مورد استفاده قرار گیرند. فرمالین از مواد مورد استفاده فراوان بعنوان یک ضد عفونی کننده و ضد قارچ در پرورش ماهی مطرح بوده است که چنانچه در تعیین میزان و استفاده از آن دقت شود به عنوان داروی مفیدی علیه قارچ ساپروولگینا مورد استفاده قرار می گیرد. مقدار فرمالین مؤثر علیه قارچ ساپروولگینا در تخم های لقاح شده ۲۵۰ پی پی ام عنوان شده است (۱۵). در این تحقیق فرمالین با مقدار ۲۰۰ پی پی ام توانست بیشترین بازماندگی را در تخم های لقاح یافته به دنبال داشته باشد و بطور معنی داری از قارچ زدگی تخم ها جلوگیری نماید.

از آنجا که استفاده از ضد عفونی کننده ها در محیط آبی با احتیاط فراوان صورت می پذیرد و مواد مورد استفاده ضد قارچی بایستی کمترین خطر را متوجه محیط زیست نمایند، لازم است تحقیقات بیشتری در خصوص شناسایی و معرفی پروبیوتیک های مؤثر ضد قارچی و همچنین ترکیبات ضد قارچی با منشأ گیاهی در تکثیر و پرورش ماهی مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از همکاری های علمی آقایان دکتر رجاییان و دکتر معتضدیان در انجام این تحقیق همچنین مدیریت و کارکنان کارگاه تکثیر و پرورش قزل کمان شش پیر سپیدان و کارشناسان اداره کل شیلات فارس که در طول این تحقیق نهایت همکاری را مبذول داشتند تقدیر و تشکر بعمل می آید.

پاورقی ها

- 1- Pour-plate
- 2- Terminalia catappa
- 3- Anova
- 4- Spss version 11.5

منابع مورد استفاده

- ۱- یعقوبی، آ، یوسفی، ج، مهرابی، م. (۱۳۸۰) مهار رشد ساپروولگینا دیکلینا نوع ۱ جدا شده از تخم ماهیان قزل آلا با استفاده از باکتری *P.fluorescence* در شرایط آزمایشگاهی. دوازدهمین گردهمایی جامعه دامپزشکی ایران. تهران ۱۵-۱۲ اسفند. ص ۲۳۴.
- ۲- شریف روحانی، م و همکاران. (۱۳۸۵) ارزیابی کاربرد اسانس شمعدانی (*Geranium herbarum*) در کنترل آلودگی های قارچی تخم ماهی قزل لای رنگین کمان. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. دوره ۶۱. شماره ۳ صفحات ۲۶۹-۲۷۲.

- 3- Austin B and Austin. D.A (2007) *Bacterial fish pathogens: diseases of farmed and wild fish*. 3rd edition, Praxis Publishing,

19- Waterstrat, P. R. and Marking, L.L. (1995) Clinical evaluation of formalin, hydrogen peroxide and sodium chloride for the treatment of *Saprolegnia parasitica*. *Prog. fish Cult.* 57: 287-291.

20- Willoughby, L. G. and Roberts, R. J. (1992) Towards strategic use of fungicides against *Saprolognia prasitica* in salmonid fish hatcheries. *J. fish Dis.* 15: 1-13.

21- Woo, P.T.R. and Bruno, D.W. (2011) *Fish diseases and disorders*, Vol. 3: viral bacterial and fungal infections. CAB international publication, London.

Sci. 82: 1463-1466.

17- Schreier, T. M., Rach, J. J. and Howe, G. E. (1996) Efficacy of formalin, hydrogen peroxide and sodium chloride on fungal infected rainbow trout eggs. *Aquaculture*. 140: 323-331.

18- Shahbazian N., Ebrahimzadeh Mousavi H.A., Soltani M., Khosravi A.R., Mirzargar S. and Sharifpour I. (2010) Fungal contamination in rainbow trout eggs in Kermanshah province propagations with emphasis on Saprolegniaceae. *Iranian J. Fish. Sci.* 9: 151-160.

