JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره پانزدهم، شماره اول، ۱۳۹۸، پیاپی ۳۸: ۱۰۷-۹۷

اثرات ضد قارچی عصاره‌های گیاهی بابونه و بومادران در کنترل آلودگی تخم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با قارچ *ساپرولگنیا پارازیتیکا*

حسین امیری[۱]، سعید مشکینی[۲*]

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲-دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت:۱۳۹۷/۱۰/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۹

چکیده

یکی از عوامل مهم ایجاد تلفات تخم‌های ماهیان در تفریخگاه‌ها آلودگی با قارچ ساپرولگنیا پارازیتیکا است. مالاشیت سبز پرکاربرد ترین دارو در مبارزه با این قارچ بوده که امروزه سرطانزا بودن آن تایید شده است. هدف از این پژوهش بررسی اثرات ضد قارچی عصاره‌های بابونه و بومادران در مقایسه با مالاشیت‌سبز در کنترل آلودگی تخم‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان با قارچ ساپرولگنیا است. در این مطالعه با استفاده از روش‌های Micro Broth Dilution Test و کشت قارچ در محیط کشت جامد، حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) و حداقل غلظت کُشنده (MFC) در برابر قارچ *ساپرولگنیا پارازیتیکا* برای عصاره بابونه به ترتیب ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۱۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و برای عصاره بومادران بترتیب ۱۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تعیین شد. سپس تخم‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان در چهار تیمار (شاهد، دو تیمار عصاره گیاهی و یک تیمار مالاشیت‌سبز) تقسیم شدند و در دوره انکوباسیون روزانه یک ساعت تحت تاثیر غلظت‌های MFC هر عصاره و ۱ میلی‌گرم در لیتر مالاشیت‌سبز قرار گرفتند. تلفات تخم‌ها در مراحل لقاح تا چشم‌زدگی، چشم‌زدگی تا تفریخ و کل دوره انکوباسیون مقایسه شدند. نتایج نشان داد تلفات تخم‌ها در هر مرحله در تیمار مالاشیت‌سبز بطور معنی‌داری کمتر از شاهد و بومادران بود ($p>۰/۰۵$) اما با تیمار بابونه تفاوت معنی‌داری نداشت ($p>۰/۰۵$). معنی‌دار نبودن تلفات و درصد تفریخ تخم‌ها در تیمار بابونه (۷۵/۹۰±۰/۲۶٪) نسبت به مالاشیت‌سبز (۷۷/۹۷±۲/۳۲٪)، نشان داد که عصاره بابونه با اثرات ضد قارچی، داروی طبیعی مناسبی برای جایگزینی مالاشیت‌سبز در تفریخگاه‌های تخم ماهیان است.

کلمات کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، عصاره گیاهی، بابونه، بومادران، ساپرولگنیا

*نویسنده مسئول: سعید مشکینی

آدرس: گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. تلفن: ۰۴۴۳۲۷۷۰۵۰۸، همراه: ۰۹۱۴۴۴۳۲۲۹۶

پست الکترونیک: s.meshkiniy@urmia.ac.ir

مقدمه

یکی از مهمترین مشکلات موجود در صنعت تکثیر و پرورش ماهیان در دنیا قارچ زدگی تخم‌ها در روند رشد و نمو تخم‌ها در تفریخگاه‌ها است و سالانه تعداد بسیار زیادی از تخم‌های تولیدی در مراکز تکثیر ماهیان به علت قارچ زدگی از بین می‌روند (۳۴). علاوه بر این خسارت که به صورت مستقیم به کارگاه‌های تکثیر وارد می‌شود، استفاده از داروهای شیمیایی ضد قارچ که در تفریخگاه‌های مراکز تکثیر ماهیان در برابر قارچ زدگی تخم‌ها استفاده می‌شود، موجب بروز مشکلات زیست محیطی و راه یابی این داروهای شیمیایی به چرخه طبیعت شده و مشکلات مربوط به بهداشت عمومی و مصرف‌کنندگان محصولات آبزی پروری را به دنبال دارد (۱۶).

مهمترین داروی ضد قارچ که در بسیاری از مراکز تکثیر ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد، مالاشیت‌سبز (Malachite Green) است. مالاشیت‌سبز از فرآورده‌های رنگی آنیلین است و قابلیت ذخیره شدن در بافت‌های بدن آبزیان و پستانداران را دارد. این ماده به عنوان یک ماده سرطان‌زا و عامل برخی نا هنجاری‌های شکلی در اندام‌های موجودات زنده معرفی شده‌است (۲۸). امروزه با توجه به عواقب خطرناک و مشکلات استفاده از مالاشیت‌سبز در تفریخگاه‌های مراکز تکثیر ماهیان، مطالعات مختلفی برای دستیابی به داروهای جایگزین بی خطر یا کم خطر انجام گرفته است (۹، ۱۹ و ۲۱).

ترکیبات طبیعی مانند عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی از مهمترین گزینه‌های مورد توجه پژوهشگران برای استفاده به عنوان جایگزین داروهای شیمیایی ضد قارچ می‌باشند. به دلیل ویژگی‌های مطلوبی مانند توان ضدمیکروبی و ضد قارچی مناسب، تجزیه سریع و آسان و ماندگاری کم آنها در محیط، عدم ایجاد مسمومیت برای مصرف کنندگان، قیمت نسبی بسیار کمتر و عدم ایجاد مقاومت در عوامل بیماریزا، استفاده از این مواد طبیعی در کنترل آفات و بیمار ی‌ها، یکی از راهکارهای مهم در کاهش خطرات بهداشتی و زیست محیطی است (۱). در این راستا، پژوهشگران زیادی در سال‌های اخیر به مطالعه اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی و حشره‌کشی اسانس‌ها و عصاره‌های بسیاری از گیاهان دارویی پرداخته‌اند و گزارش‌های امیدوار کننده ای مبنی بر امکان استفاده از گیاهان دارویی به عنوان عوامل ضد میکروبی و ضد قارچی منتشر کرده‌اند (۱۲ و ۱۷).

بابونه (*Matricaria chamomilla*) و بومادران (*Achillea officinolis*) دو نمونه از گیاهان دارویی هستند که خواص ضد میکروبی و ضد قارچی ترکیبات موجود در عصاره آنها در مطالعات پژوهشگران گزارش شده‌است (۸، ۲۳ و ۳۱). بابونه گیاهی از تیره کاسنی‌ها (Asteraceae) بوده و به دلیل داشتن مواد فعال بیولوژیکی مانند فلاونوئیدها (Flavonoids) و کامفن (Camphene) دارای خواص ضد قارچی می‌باشد (۳۱ و ۳۳). بومادران گیاهی دارویی است که تاکنون ۸۵ گونه از آن در دنیا شناسایی شده که ۷ گونه آن فقط در ایران یافت می شود. در این گیاه ترکیبات آلی موثری مانند فنولیک اسید (Phenolic acids)، فلاونوئیدها (Flavonoid) و ترپنوئیدها (Terpenoids) وجود دارند که همگی دارای خواص دارویی مختلف از جمله خاصیت ضد قارچی هستند (۲۳). خواص و اثرات ضد میکروبی اسانس و عصاره‌های آبی و الکلی برگ، گل و میوه گونه‌های مختلف بومادران روی میکروارگانیسم‌های گوناگون از مناطق جغرافیایی مختلف گزارش شده‌است (۱۰ و ۱۸).

با توجه به پیشینه تحقیقاتی و گزارش‌های ارائه شده مبنی بر وجود خاصیت ضد قارچی گیاهان بابونه و بومادران، این مطالعه با هدف بررسی فعالیت ضد قارچی عصاره‌های آبی- الکلی این گیاهان در برابر قارچ *ساپرولگنیا پارازیتیکا* طراحی و اجرا شد تا در صورت امکان از این گیاهان به عنوان داروهای ضد قارچ در تفریخگاه‌های مراکز تکثیر آبزیان استفاده شده و گامی‌در مسیر کاهش استفاده از داروهای شیمیایی که دارای عوارض نامطلوب برای انسان و محیط زیست هستند، برداشته شود.

مواد و روش کار

روش کار در شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*)

تهیه گیاهان دارویی و عصاره گیری

گیاهان بومادران (*Achillea officinolis*) و بابونه دارویی (*Matricaria chamomilla*) که هر دو از گیاهان بومی ایران هستند از شرکت داروسازی ابن ماسویه تهیه و در این شرکت به روش خیساندن در حلال (Maceration) عصاره گیری شدند. در این روش پس از پودر کردن ۹۰ گرم ازاندام هوایی گیاهان (گل و سرشاخه) بوسیله آسیاب برقی و ریختن آنها در ارلن‌های جداگانه، روی هر نمونه ۱۰۰۰ میلی‌لیتر حلال آب-الکل (اتانول ۹۶٪ و آب به نسبت برابر) اضافه شد. سپس دهانه ارلن‌ها به وسیلهٔ ورقه آلومینیومی پوشانده شده و به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر، با سرعت ۹۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. محلول حاصل از کاغذ صافی واتمن ۰/۵ میلی‌متری عبور داده شد و محلول صاف شده با دستگاه روتاری اواپراتور (Rotary Evaporator) در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد غلیظ گردید (۲۹).

جداسازی قارچ *ساپرولگنیا پارازیتیکا* و تهیه سوسپانسیون قارچی

برای تهیه قارچ *ساپرولگنیا پارازیتیکا* مورد نیاز، تعدادی تخم قارچ زده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با پوار استریل از انکوباتورهای کالیفرنیایی مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان ارومیه انتخاب نموده و در لوله‌های درب دار ۵ میلی‌لیتری محتوی آب مقطر استریل به آزمایشگاه قارچ شناسی پژوهشکده آرتمیا و آبزیان دانشگاه ارومیه منتقل شدند. برای جلوگیری از رشد باکتری در این لوله‌ها از آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین و کلرامفنیکل استفاده شد. تخم‌ها در شرایط استریل در محیط آزمایشگاه به پتری دیش منتقل شده و تجمعات رشته ای و پنبه ای شکل اطراف تخم‌ها توسط آنس استریل به محیط کشت اختصاصی گلوکز پپتون (GP) و سابرو دکستروز آگار (SDA) تلقیح شدند و به مدت ۱ هفته در دمای ۲۲-۱۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. برای بررسی و شناسایی دقیق قارچ *ساپرولگنیا پارازیتیکا*، از کلونی‌های قارچی پدیدار شده در محیط‌های کشت، گسترش مرطوب بر روی لام تهیه شد و با لاکتوفنل رنگ آمیزی و زیر میکروسکوپ اقدام به بررسی و شناسایی قارچ‌های رشته ای جدا شده بر اساس کلیدهای شناسایی گردید.

برای تهیه سوسپانسیون قارچی نمونه‌ای از کلونی‌های قارچی درون محیط کشت، توسط آنس استریل برداشته و به محیط کشت مایع مخمر آگار (GY agar) (۱۵ گرم آگار، ۲/۵ گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم گلوگز و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) تلقیح شد و به مدت ۳ هفته در انکوباسیون و در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. برای جدا سازی زئوسپورهای قارچ، ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل به محیط کشت مخمر آگار حاوی قارچ اضافه شد و پس از چند بار تکان

دادن و مخلوط شدن آن، محلول حاوی زئوسپور به یک لوله استریل دیگر منتقل گردید. شمارش تعداد زئوسپورها توسط لام‌نئوبار و میکروسکوپ نوری به روش شمارش کلی (Total Count) انجام شد و بر اساس تعداد زئوسپور شمارش شده، سوسپانسیون قارچی معادل ۱×۱۰^{۶} سلول به ازای هر میلی‌لیتر تهیه گردید (۲۵ و ۳۲).

تعیین MIC و MFC عصاره‌های گیاهی بابونه و بومادران در برابر قارچ *ساپرولگنیا پارازیتیکا*

بررسی اثرات ضد قارچی عصاره‌های گیاهی بر روی قارچ *ساپرولگنیا پارازیتیکا* با روش Micro Broth Dilution و بر اساس پروتکل M-38 A، CLSI انجام شد (۱۳). این آزمایش برای هر عصاره به صورت جداگانه و به شرح زیر انجام گردید: پس از آماده سازی و اتوکلاو کردن محیط کشت مایع سابرو دکستروز براث (SD Broth) ۹۰ میکرولیتر از این محیط کشت درون چاهک‌های میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استریل ریخته شد. با استفاده از آب مقطر استریل غلظت‌های متوالی شامل ۴۵۰، ۴۰۰، ۳۵۰، ۳۰۰، ۲۵۰، ۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های بابونه و بومادران تهیه شد و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آنها به چاهک‌های حاوی محیط کشت اضافه شد (هر سه ردیف از چاهک‌های میکروپلیت به غلظت‌های یک عصاره و تکرارهای آن اختصاص یافت). سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی *ساپرولگنیا پارازیتیکا* که قبلا تهیه شده بود، به چاهک‌ها اضافه شد. برای مقایسه نتایج از دو گروه شاهد استفاده شد. چاهک‌هایی که به عنوان شاهد منفی برای تعیین کدورت در هر ردیف در نظر گرفته شد، فقط حاوی محیط کشت و غلظت‌های متوالی سوسپانسیون قارچی بود و برای گروه شاهد مثبت بجای عصاره‌های گیاهی از غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مالاشیت‌سبز استفاده شد (۱۴). بر اساس میزان رشد قارچ در روی محیط‌های کشت در مقایسه با شاهدهای مثبت و منفی، اولین چاهکی که به میزان ۵۰ درصد کاهش رشد و میزان کلونی‌های قارچی را بطور مشخص و واضح نشان می‌داد به عنوان MIC و اولین چاهکی که هیچ گونه رشد قارچی را نشان نمی‌داد، بیانگر MFC یا حداقل غلظت کشندگی قارچی نامگذاری گردید (۱۵).

روش کار در شرایط کارگاهی (*In vivo*)

تهیه مولدین، تخم گیری و تیماربندی

برای تهیه تخم ماهی، تعداد ۶ مولد نر و ۲۸ مولد ماده ۴ ساله قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن متوسط ۲۱۰۰ گرم از یکی از مراکز تکثیر و پرورش ماهیان سردابی ارومیه تهیه شده و عملیات تخم و اسپرم گیری و مخلوط کردن تخم‌ها با اسپرم با روش لقاح خشک انجام گرفت. تخم‌های لقاح یافته در سالن تکثیر به چهار تیمار (هر تیمار شامل ۳ تکرار و هر تکرار شامل یک تراف حاوی سه سینی و هر سینی حاوی ۳۰۰ گرم تخم) تقسیم شدند. برای جلوگیری از آلودگی تخم‌ها با قارچ *ساپرولگنیا پارازیتیکا* و بررسی اثرات ضد قارچی عصاره‌های گیاهی تهیه شده، از روز سوم تا روز ۲۲ دوره انکوباسیون (مرحله تخم‌های چشم زده)، تخم‌ها روزانه به مدت یک ساعت و تا ۲۰ روز در قالب تیمار اول به عنوان شاهد (بدون استفاده از عصاره گیاهی یا مالاشیت‌سبز)، تیمار دوم، سوم و چهارم به ترتیب با مقدارهای MFC عصاره بابونه (۱۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، مقدار MFC عصاره بومادران (۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و ۱ میلی‌گرم در لیتر مالاشیت‌سبز مورد تیمار قرار گرفتند.

برای تماس تخم‌های هر تیمار با عصاره‌های گیاهی، بر اساس میزان آب ورودی تراف‌ها (۵۴۰ لیتر در ساعت) و با توجه به میزان MFC هر عصاره و مقدار مالاشیت سبز مورد نیاز (۱ میلی‌گرم در لیتر)، مقدار لازم از هر عصاره و مالاشیت‌سبز در ظرف سرم‌های جداگانه حاوی یک لیتر از آب تراف حل شده و تمام محلول دارویی به صورت روزانه در مدت یک ساعت به روش جریان یکنواخت (Constant Flow) در محل ورودی تراف‌ها وارد شد (۳).

بررسی تلفات، زنده مانی تخم‌ها و تعیین درصد چشم‌زدگی و درصد تفریخ تخم‌ها

پس از ۲۴ ساعت از لقاح تا مرحله چشم‌زدگی تخم‌ها اقدام به جمع‌آوری تخم‌های تلف شده شد. در طول این دوره هیچ گونه جابجایی و دست کاری جدی در تخم‌ها صورت نگرفت. با آغاز مرحله چشم‌زدگی، تخم‌ها روزانه بررسی و موارد آلوده به قارچ، شمارش و حذف شدند. این روند تا روز تخم گشایی ادامه داشت و در پایان دوره انکوباسیون میزان درصد چشم‌زدگی تخم‌ها و درصد تفریخ تخم‌ها با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد (۳۰).

درصد چشم‌زدگی = (تعداد تخم‌های چشم زده ÷ تعداد تخمک‌های لقاح یافته) ×۱۰۰

درصد تفریخ = (تعداد لاروها ÷ تعداد تخم‌های چشم زده) × ۱۰۰

روش‌های آماری

آنالیز آماری داده‌های این پژوهش با نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. نرمال بودن داده‌ها با آزمون Kolmogorov-Smirnov مورد بررسی قرار گرفت. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون One Way ANOVA، تست Tukey و در سطح معنی داری ($p<0.05$) استفاده شد. جداول با نرم افزار Word 2013 ترسیم گردید.

نتایج

تعیین MIC و MFC عصاره‌ها به روش میکرو براث دایلوشن

نتایج نشان دهنده اثرات ضد قارچی قابل توجه عصاره-های بابونه و بومادران بود. همانگونه که در جدول ۱ نشان داده شده‌است حداقل غلظت مهارکننده رشد و همچنین حداقل غلظت کُشندگی عصاره بابونه در برابر قارچ *ساپرو لگنیا پارازیتیکا* کمتر از عصاره بومادران بوده و بنابراین تاثیر ضد قارچی عصاره بابونه در برابر *ساپرولگنیا پارازیتیکا* بیشتر از عصاره بومادران است (جدول ۱).

جدول ۱- حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) و حداقل غلظت کُشندگی قارچ (MFC) عصاره‌های بابونه و بومادران در برابر *ساپرولگنیا پارازیتیکا*

عصاره‌های گیاهی	غلظت عصاره‌ها (بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر)									
	۴۵۰	۴۰۰	۳۵۰	۳۰۰	۲۵۰	۲۰۰	۱۵۰	۱۰۰	۵۰	
بابونه	+	+	+	+	+	+	MFC	MIC	-	
بومادران	+	+	+	+	+	MFC	MIC	-	-	

علامت + به معنی تاثیر و علامت – به معنی عدم تاثیر عصاره بر رشد قارچ می‌باشد.

بررسی تلفات تخم‌ها در مراحل مختلف انکوباسیون

نتایج نشان داد که در تمام مراحل انکوباسیون تلفات تخم‌ها در گروه شاهد به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) بیشتر از تیمارهای مورد آزمایش بود. از مرحله لقاح تا تخم‌های چشم زده کمترین میزان تلفات در تیمار مالاشیت‌سبز مشاهده شد که با تیمار عصاره بابونه تفاوت معنی‌داری ($p>۰/۰۵$) نداشت. اما میزان تلفات در تیمار عصاره بومادران به طور

معنی‌داری (p<۰/۰۵) بیشتر از تیمار مالاشیت‌سبز بود (جدول ۲).

از مرحله تخم‌های چشم زده تا مرحله تفریخ تخم‌ها، مانند مرحله قبل بیشترین میزان تلفات مربوط به گروه شاهد بود. در این مرحله تعدادتلفات تیمار عصاره بابونه با تیمار مالاشیت‌سبز تفاوت معنی‌داری نشان نداد (p>۰/۰۵) ولی میزان تلفات آن نسبت به تیمار عصاره بومادران و گروه شاهد به طور معنی‌داری کمتر بود (p<۰/۰۵) (جدول ۲).

در پایان مرحله انکوباسیون، کمترین میزان تخم‌های هچ شده مربوط به گروه شاهد بود و بیشترین بازماندگی (تعداد تخم‌های تفریخ شده) بین تیمارها T مربوط به گروه مالاشیت‌سبز بود اما این تیمار نسبت به تیمار عصاره بابونه اختلاف معنی‌دار نداشت (p>۰/۰۵).

جدول ۲- مقایسه تعداد تلفات تخم‌ها در مراحل مختلف انکوباسیون و تعداد تخم‌های سالم و هچ شده

تیمارها	تعداد تخم اولیه	تعداد تلفات تخم‌ها در مراحل انکوباسیون		تعداد تخم‌های تفریخ شده (پایان انکوباسیون)
		از لقاح تا چشم‌زدگی	از چشم‌زدگی تا تفریخ	
شاهد	۱۱۷۹۳/۳۳۳±۴۸۶/۷۸۵^{a}	۲۲۶۱/۰۰۰±۱۶۳/۳۷۶^{c}	۲۸۵۴/۳۳۳±۱۱۴/۲۳۳^{c}	۶۶۷۸/۰۰۰±۶۰۰/۵۱۵^{a}
بابونه	۱۱۶۵۹/۰۰۰±۳۲۰/۱۶۸^{a}	۱۳۲۸/۶۶۷±۱۱۹/۸۳۴^{ab}	۱۵۵۳/۶۶۷±۱۲۳/۰۲۱^{a}	۸۷۷۶/۶۶۷±۷۵۰/۸۹۵^{bc}
بومادران	۱۱۷۷۶/۰۰۰±۲۲۲/۷۰۳^{a}	۱۵۴۸/۳۳۳±۲۱۷/۵۰۹^{b}	۲۳۴۵/۰۰۰±۱۱۰/۲۹۳^{b}	۷۸۷۳/۶۶۷±۴۷۷/۰۷۴^{b}
مالاشیت‌سبز	۱۱۷۴۸/۶۶۷±۱۷۳/۱۰۲^{a}	۱۰۳۴/۶۶۷±۱۶۵/۶۰۷^{a}	۱۳۷۶/۳۳۳±۱۱۲/۵۰۰^{a}	۹۳۳۷/۶۶۷±۲۱۸/۲۷۵^{c}

حروف لاتین متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین تیمارها است.

با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۳، در همه مراحل انکوباسیون تخم‌ها، کمترین درصد تلفات تخم‌ها به ترتیب مربوط به تیمار مالاشیت‌سبز، عصاره بابونه، عصاره بومادران و گروه شاهد بود. بالاترین درصد چشم‌زدگی تخم‌ها به ترتیب مربوط به تیمار مالاشیت‌سبز (٪ ۹۱/۲)، تیمار بابونه (٪ ۸۸/۶) و کمترین درصد چشم‌زدگی تخم‌ها متعلق به گروه شاهد (٪ ۸۰/۸) بود. همچنین بالاترین درصد تفریخ تخم‌ها متعلق به مالاشیت‌سبز (٪ ۷۹/۵)، تیمار بابونه (٪ ۷۵) و کمترین درصد تفریخ متعلق به تیمار شاهد (٪ ۵۶/۶) بود (جدول ۳).

جدول ۳- درصد تلفات، درصد چشم‌زدگی و درصد تفریخ تخم‌ها در مراحل مختلف انکوباسیون

تیمارها	درصد تلفات تخم‌ها در مراحل مختلف انکوباسیون			درصد چشم‌زدگی تخم	درصد تفریخ تخم
	از لقاح تا چشم‌زدگی	از چشم‌زدگی تا تفریخ	از لقاح تا تفریخ (کل دوره انکوباسیون)		
شاهد	۱۹/۱۰±۰/۱۰^{c}	۲۴/۱۶±۰/۱۵^{c}	۴۳/۴±۰/۰۵^{c}	۸۱/۱۷±۰/۷۳^{a}	۵۶/۱±۰/۵۰^{a}
عصاره بابونه	۱۰/۳±۰/۹۱^{a}	۱۲/۱۳±۰/۱۱^{a}	۲۳/۶۷±۰/۷۶^{a}	۸۸/۴۲±۱/۵۴^{c}	۷۵/۹۰±۰/۲۶^{c}
عصاره بومادران	۱۳/۰۷±۰/۰۶^{b}	۱۵/۴±۰/۱۰^{b}	۲۸/۶±۰/۰۵^{b}	۸۷/۴۰±۱/۰۴^{b}	۷۱/۲۸±۰/۳۰^{b}
مالاشیت‌سبز	۹/۱۷±۰/۱۵^{a}	۱۱/۸۰±۰/۱۸^{a}	۲۳/۰۱±۰/۵۲^{a}	۹۰/۹۲±۰/۵۳^{c}	۷۷/۹۷±۲/۳۲^{c}

حروف لاتین متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین تیمارها است.

بحث

یکی از عوامل مهم تهدید کننده صنعت تکثیر و پرورش آبزیان قارچ‌زدگی تخم‌های ماهیان در تفریخگاه‌ها است و متاسفانه بسیاری از داروهای ضدقارچی که برای مبارزه با این تهدید در مراکز تکثیر آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرند، دارای تاثیرات جانبی منفی بر تخم‌ها و محیط زیست هستند و سلامت انسان را نیز به خطر می‌اندازند (۲۴). آلودگی تخم‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان توسط قارچ *ساپرولگنیا پارازیتیکا* تلفات و ضررهای زیادی به صنعت تکثیر

ماهیان سردآبی وارد کرده است و با توجه به ممنوعیت استفاده از برخی از موثرترین داروهای ضد قارچ شیمیایی مانند مالاشیت‌سبز، چالش‌ها در روند مبارزه با این مشکل چند برابر شده‌است. از این رو جایگزینی داروهای ضد قارچ شیمیایی با مواد طبیعی موثر، بسیار ضروری به نظر می‌رسد و پژوهشگران در این زمینه مطالعاتی را انجام داده و در برخی موارد گزارش‌های امیدوار کننده‌ای ارائه داده‌اند (۷، ۲۲). بر اساس گزارش‌های پژوهشگران، برخی منابع گیاهی از جمله بلوط (*Quercus persica*) (۲)، تُرشک (*Rumex obtusifolius*) و تلخ بیان (*Sophora flavescens*) (۱۱) و بسیاری از گیاهان دارویی دیگر دارای خاصیت ضد میکروبی و ضد قارچی هستند و احتمالا قابلیت استفاده در تفریخگاه‌های تکثیر آبزیان را دارند (۲۷).

تاکنون مطالعات مختلفی درباره شناسایی ترکیبات فعال موجود در گونه‌های مختلف گیاهان دارویی بومادران و بابونه و مکانیسم عمل آنها در برابر میکروب‌ها انجام شده‌است که منجر به شناسایی اثرات ضد میکروبی این گیاهان در برابر برخی باکتری‌ها و قارچ‌ها شده‌است. در سال ۱۳۹۰ محمدی سیچانی و همکاران خاصیت ضدمیکروبی گونه ای از گیاه بومادران (*Achillea wilhelmsii*) را بر روی سویه‌های مختلف باکتری از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشرشیا کلی* مورد بررسی قرار دادند و فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی و اسانس این گیاه را علیه این باکتری‌ها گزارش کردند (۵). در سال ۱۳۹۵ موقری پور و همکاران نیز با تعیین و بررسی مواد فعال موجود در عصاره آبی و الکلی گیاه دارویی بومادران (*Achillea Millefolium*) فعالیت ضد قارچی این گیاه در برابر قارچ بیماریزای *Candida albicans* را گزارش کردند (۶). در مطالعه حاضر نیز اثر ضد قارچی عصاره هیدروالکلی گل‌های بابونه و بومادران بر روی قارچ *ساپرولگنیا پارازیتیکا* مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که عصاره هیدروالکلی این دو گیاه می‌تواند از رشد قارچ *ساپرولگنیا پارازیتیکا* جلوگیری نماید. البته عصاره هیدرو الکلی بابونه اثرات ضد قارچی قوی‌تری نسبت به عصاره بومادران از خود نشان داد و در هر دوی این گیاهان با افزایش غلظت عصاره‌ها اثرات ضد قارچی آنها نیز افزایش یافت (جدول ۱). به دلیل اینکه ترکیبات فلاونوئیدی با خاصیت ضد قارچی در عصاره بابونه به وفور یافت می‌شوند (۲۶ و ۳۵) شاید بتوان علت اصلی فعالیت ضد قارچی بیشتر بابونه نسبت به بومادران را در میزان بیشتر فلاونوئیدهای موجود در ترکیب آن بیان کرد. البته اثرات هم افزایی طیف وسیعی از ترکیبات ثانویه مانند اسیدهای فنولیک، کومارین‌ها، ترپنوئیدها و استرول‌ها که به مقدار کمتری در این گیاهان وجود دارند، نیز در عملکرد ضد میکروبی آنها نقش بسزایی دارد (۲۰).

به طورکلی متابولیت‌های ثانویه موجود در آن دسته از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی که خاصیت ضد میکروبی بالایی دارند، بیشتر از جنس ترکیبات فنلی می‌باشند. به عنوان مثال، در ترکیباتی که شامل یک گروه هیدروکسیل (OH-) متصل به حلقه فنلی هستند، گروه هیدروکسیل علاوه بر آنکه در انتقال یون‌ها از میان غشاء پلاسمایی دخالت دارد، می‌تواند در غیر فعال کردن آنزیم‌های میکروبی نیز نقش داشته باشد. منوترپن‌های کارواکرول (Carvacrol) و تیمول (Thymol) مثال‌هایی از متابولیت‌های ثانویه فنلی هستند که با از بین بردن شیب یون‌های هیدروژن و پتاسیم، در نهایت منجر به تخلیه ذخیره ATP درون سلول‌های میکروب‌ها (ممانعت از سنتز ATP و یا افزایش هیدرولیز آن) می‌شوند (۲۰).

با توجه به بررسی نتایج درصد چشم‌زدگی و درصد تفریخ تخم‌ها، بالاترین درصد چشم‌زدگی و درصد تفریخ تخم‌ها مربوط به تیمار مالاشیت‌سبز بوده که در صورت استفاده از این دارو ٪۲/۳۲±۷۷/۹۷ تخم‌ها تبدیل به لارو می‌شوند. بعد از تیمار مالاشیت‌سبز بهترین تیمار، عصاره بابونه بود که در یک دوره انکوباسیون ٪۰/۲۶±۷۵/۹۰ تخم‌ها به لارو تبدیل شدند و تنها حدود ٪۲۴ این تخم‌ها تفریخ نشدند و این در حالی است که در گروه شاهد حدود ٪۴۴ تخم‌ها از بین رفتند و به مرحله تفریخ نرسیدند (جدول ۳). هرچند کمترین تعداد تلفات تخم‌ها در مراحل مختلف انکوباسیون و بیشترین تعداد تخم‌های تفریخ شده در پایان دوره انکوباسیون متعلق به تیمار مالاشیت‌سبز بوده و به طور معنی‌داری با گروه شاهد تفاوت داشته است (جدول ۲)، اما با وجود کارایی بالای مالاشیت‌سبز در کنترل آلودگی قارچی *ساپرولگنیا* در تفریخگاه، به دلیل اثرات سوء زیست محیطی این دارو و سرطان‌زایی آن، از سال‌ها قبل استفاده از آن در کارگاه‌های تکثیر آبزیان در بسیاری از کشورها محدود و یا ممنوع شده‌است (۴).

در نهایت به نظر می‌رسد، وجود ترکیبات فعال مختلف از جمله فلاونوئیدها، تانن‌ها و ترپنوئیدها در عصاره هیدروالکلی گیاهان دارویی بابونه و بومادران، باعث ایجاد ویژگی ضد میکروبی به خصوص اثرات ضد قارچی در برابر آلودگی‌های قارچی در دوران انکوباسیون تخم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان شده‌است. همچنین عصاره گیاهی بابونه با غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، اگرچه از نظر توان ضد قارچی در مقایسه با تیمار مالاشیت‌سبز از بازدهی کمتری برخوردار بوده، اما از آنجایی که نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری موجب کاهش تلفات تخم‌ها و افزایش تعداد تخم‌های تفریخ شده در پایان دوره انکوباسیون شده‌است (جدول ۲)، می‌تواند جایگزین بسیار مناسبی برای داروهای شیمیایی ضد قارچی مانند مالاشیت‌سبز باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد رشته تکثیر و پرورش آبزیان بوده و با حمایت مالی دانشکده منابع طبیعی و معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه اجرا شده است.

منابع

۱. احمدی، ز.، ستاری، م.، تبرایی، ب.، بیگدلی، م. (۱۳۹۰). شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه بومادران و ارزیابی اثرات ضد میکروبی عصاره و اسانس. *مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک*، دوره ۱۴، صفحات ۱۰-۱.

۲. شریفی، ا.، گرجی پور، ر.، گرجی پور، ع.، سردسیری، م.، محمدی، ر.، جبارنژاد، ع. (۱۳۹۱). اثر ضد قارچی عصاره هیدروالکلی جفت گیاه بلوط بر روی قارچ ساپرولگنیا. *ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج*، دوره ۱۷، صفحات ۸۴-۷۸.

۳. کیخا، س.، قرایی، ا.، میردارهریجانی، ج.، غفاری، م.، راهداری، ع. ۱۳۹۴. بررسی اثر ضد قارچی عصاره متانولی میوه سماق طی دوره انکوباسیون تخم ماهی سفیدک سیستان (*Schizothorax zarudnyi*). *مجله تحقیقات دامپزشکی*، دوره ۷۰، صفحات ۱۳۷-۱۳۱.

۴. متفقی، ف.، جوادی، ا.، علامه، س. (۱۳۹۷). بررسی وجود مالاشیت گرین در گوشت ماهیان پرورشی، قزل آلای رنگین کمان و ماهی کپور در مناطق شمال، جنوب، هراز و شهرکرد. *مجله علمی شیلات ایران*، دوره ۲۷، صفحات ۱۳۸-۱۳۱.

۵. محمدی سیچانی، م.، امجد، ل.، محمدی کمال آبادی، م. (۱۳۹۰). اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی و اسانس گل‌های بومادران بر باکتری‌های بیماریزا. *مجله تحقیقات علوم پزشکی زاهدان*، دوره ۱۳، صفحات ۱۴-۹.

۶. موقری پور، ع.، شیخ فتح الهی، م.، پورخسروانی، م. (۱۳۹۵). مقایسه آزمایشگاهی اثر ضدقارچی عصاره گیاه بومادران با میکونازول ۲ درصد بر *کاندیدا آلبیکنس*. *مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد*، دوره ۴۰، صفحات ۱۵۸-۱۴۹.

7. Abdollahzadeh, Sh., Mashouf, R .Y., Mortazavi, H., Moghaddam, M. H., Roozbahani, N., Vahedi, M. (2011). Antibacterial and Antifungal Activities of Punica Granatum Peel Extracts Against Oral Pathogens. *Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences* **8**: 1-6.
8. Afzali, S. F., Shariatmadari, H., Hajabbasi, M. A., Moatar, F. (2007). Salinity and drought stress effects on flower yield and Flavonol-O- glycosides in Chamomile (*Matricaria chamomilla L.*). *Medicinal and Aromatic Plants* **23**: 382 - 90.
9. Alam, M. H., Murat, E., Siegfrie, N., Hubert, K. (2007). Chemical composition and content of essential oil from the bud cultivated Turkish clove (*Syzygiumaromaticum L.*). *Bioresource Technology* **2**: 265 -269.
10. Baser, K. H. C., Demirci, B., Demirci, F., Kocak, S., Akinci, C., Malyer, H., Guleryuz, G. (2002). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea multifida*. *Planta Medica* **68**: 941-3.
11. Caruana, S., Yoon, G. H., Freeman, M. A., Mackie, J. A., Shinn, A. P. (2012). The efficacy of selected plant extracts and bioflavonoids in controlling infections of *Saprolegnia australis* (Saprolegniales; Oomycetes). *Aquaculture* **358-359**: 146–154.
12. Effiong, B. N., Sanni, A. (2010). Antifungal properties and phytochemical screening of crude extract of *Lemna pauciscostata* (Helgelm) against fish feed spoilage fungi. *Life Science Journal* **7**:1-4.
13. Fernandez-Torres, B., Carrillo A. J., Martin, E., Del Palacio, A., Moore, M. K., Valverde, A. (2001). *In vitro* activities of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 2524-2528.
14. Hashemi Karouei, S. M., Sadeghpour Haji, M., Gholampour Azizi, I. (2012). Isolation of Saprolegnia and the Influence of Root Ethanolic Extract of Ruta graveolens on *Saprolegnia. Spp* Growth. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics* **2**: 64-67.
15. Khakzadihe, M., Eslami, H., Vazifehdust, S., Behboudi, M. R., Shahab-Zadeh, S. H. (2015). Investigating the antibacterial effects of Aqueous and alcoholic extracts of Thyme on *Bacillus subtilis* bacterias. *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Scienses* **4**: 5531-5538.
16. Kumagai, A, Nawata, A. (2010). Prevention of Flavobacterium psychrophilum. Vertical transmission by iodophor treatment of unfertilized eggs in salmonids. *Fish Pathology* **45**: 164–168.
17. Madhuri, Sh, Mandloi, A. K., Govind, P., Sahni, Y. P. (2012). Antimicrobial activity of some medicinal plants against fish pathogens. *International Research Journal of Pharmacy* **3**: 28-30.
18. Magiatis, P., Skaltsounis A. L., Chinou, I., Haroutounian S. A. (2002). Chemical composition and in-vitro antimicrobial activity of the essential oils of three Greek Achillea species. *Zeitschrift für Naturforschung C* **57**: 287-90.
19. Muyima, N. Y. O., Nziweni, S., Mabinya L. V. (2004). Antimicrobial and antioxidant activities of *Tagetes mimuta*, *Lippia javanica* and *Foeniculum vulgaressential* oils from eastern cape province of south Africa. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* **7**: 68 - 78.
20. Syahidah, A., Saad, C. R., Daud, H. M., Abdelhadi, Y. M. (2015). Status and potential of herbal applications in aquaculture: A review. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* **14:** 27-44.
21. Pitaroki, D., Tzakou, O., Loukis, A., Harvala, C. (2003). Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soil-borne pathgens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 3249 - 3301.
22. Rather, M. A., Dar, B. A., Sofi, S. N., Bhat, B. A., Qurishi, M. A. (2012). *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arabian Journal of Chemistry* **9**: 1574-1583.
23. Saeidnia, S., Gohari, A. R., Mokhber-Dezfuli, N., Kiuchi, F. (2011). A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achillea*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* **19**: 173-186.

24. Shahbazian, N., Ebrahimzadeh Mousavi, H. A., Soltani, M., Khosravi, A. R., Mirzargar, S., Sharifpour, I. (2010). Fungal contamination in rainbow trout eggs in Kermanshah province propagations with emphasis on Saprolegniaceae. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* **9**: 151-160.
25. Shin, S., Kulatunga, D. C. M., Dananjaya, S. H. S., Nikapitiya, C., Lee, J., Zoysa, M. D. (2017). *Saprolegnia parasitica* Isolated from Rainbow Trout in Korea: Characterization, Anti-Saprolegnia Activity and Host Pathogen Interaction in Zebrafish Disease Model. *Mycobiology* **45**: 297–311.
26. Singh, O., Khanam, Z., Misra, N., Srivastava, M. K. (2011). Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacognosy Reviw* **5**: 82–95.
27. Sokmen, A., Sokmen, M., Daferera, D., Polissiou, M., Candan, F., Unlü, M., Akpulat, H. A. (2004). The *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and methanol extracts of *Achillea biebersteini* Afan. *(Asteraceae*). *Phytotherapy Research* **18**: 451-456.
28. Sudova, E., Machova, J., Svobodova, Z., Vesely, T. (2007). Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: a review. *Veterinarni Medicina* **52**: 527–539.
29. Tafi, A. A., Meshkini, S., Tukmechi, A., Alishahi, M., Noori, F. (2018). Immunological Antistreptococcal Effects of *Salvia officinalis* and *Aloe vera* Extracts Supplemented Feed in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi Journal* **24**: 365-370.
30. Taheri, A., Kalbassi, M. R., Abedian, A. M. (2012). Effect of short term transportation of chilled rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gametes in moisture oxygen bags on fertilization rate. *Journal of Marine Science and Technology* **11**: 16-24.
31. Taskova, R., Mitova, M., Najdenski, H.,Tzvetkova, I., Duddeck, H. (2002). Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Carthamus lanatus*. *Fitoterapia* **6**: 540 – 544.
32. Touhali, I.S. (2018). Isolation and Identification of *Saprolegnia Parasitica* and Other Fungi from Farms Fishes in the Province of Wasit / Iraq. *Journal of Global Pharma Technology* **10**:135-142.
33. Yoshinari, T., Yaguchi, A., Takahashi-Ando, N., Kimura, M., Takahashi, H., Nakajima, T., Sugita-Konishi, Y., Nagasawa, H., Sakuda, S. (2008). Spiroethers of German chamomile inhibit production of aflatoxin G and trichothecene mycotoxin by inhibiting cytochrome P450 monooxygenases involved in their biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters* **284**: 184-190.
34. Zawada. A, Polechonski. R, Bronowska. A. (2014). Iodine disinfection of sea trout, *Salmo trutta* (L.), eggs and the affect on egg surfaces. *Archives of Polish Fisheries* **22**: 121-126.
35. Zomorodian, Z ., Ghadiri, P., Saharkhiz, M. J., Moein, M. R., Mehriar, P., Bahrani, F., Golzar, T., Pakshir, K., Fani, M. M. (2015). Antimicrobial Activity of Seven Essential Oils From Iranian Aromatic Plants Against Common Causes of Oral Infections. *Jundishapur Journal of Microbiology* **8**: 1-6.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 15, Issue 1, 2019

Antifungal effects of *Achillea officinolis* and *Matricaria chamomilla* plant extracts on control infection of rainbow trout eggs by *Saprolegnia parasitica*

Amiri, H.[1], Meshkini, S.[2*]

1-Master of Science in Aquaculture, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran,
2- Associate Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Received: 14 January 2019 Accepted: 10 March 2019

Abstract

One of the important factors causing the loss of fish eggs in the hatcheries is contamination with Saprolegnia parasitica. Today, Green Malachite is the most widely used drug against this fungi, which has been confirmed to be carcinogenic. The aim of this study is to investigate the antifungal effects of Matricaria chamomilla and Achillea officinolis extracts to control of infected rainbow trout eggs with Saprolegnia parasitica in comparison with Green Malachite. In this study minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) were mesured by Micro Broth Dilution test and the growth of fungi in a solid medium, and determined as 100 and 150 mg/mL for M. chamomilla and 150 and 200 mg/mL for A. officinolis, respectively. The eggs of rainbow trout were divided into four treatments (control, two plant extract and Green Malachite treatments) and were exposed with MFC of each extract and 1 mg/L Green Malachite for 1 hour/day during incubation period. The mortality of eggs were compared in stages of fertilization to sighting, sighting to hatching and total incubation period. The results showed that the mortality of eggs in each stage in Green Malachite treatment was significantly lower than control and A. officinolis ($p<0.05$), but did not show difference with M. chamomilla treatment ($p>0.05$). The lack of significance difference of mortality and hatching percentage in M. chamomilla (75.90±0.26%) compared to Green Malachite (77.97±2.32%) showed that M. chamomilla extract with antifungal effects is a suitable natural remedy for replacing Green Malachite in fish eggs hatcheries.

Keywords: Rainbow Trout, Herbal Extract, Matricaria chamomilla, Achillea officinolis, Saprolegnia

**Corresponding author: Meshkini. S.*
Address: Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Iran. Tel: 0098- 4432770508, Mobile: 00989144432296
Email: s.meshkiniy@urmia.ac.ir,