دانشگاه گنبد کاووس
نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"
دوره چهارم، شماره سوم، پاییز ۹۵
http://jair.gonbad.ac.ir

بررسی عملکرد عصاره سیر بر قارچ ساپرولگنیای جداسازی شده از تخم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss*(Walbaum, 1792) در مقایسه با مالاشیت گرین و برونوپول

فرانک شفیعی[۱]، رضا داودی*[۲]، دارا باقری[۲]، فاطمه جمالی[۳]، حمیدرضا نوریزدان[۴]
[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران
[۲]استادیار گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران
[۳]استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران
[۴]استادیار گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران
تاریخ ارسال: ۹۴/۹/۱ ؛ تاریخ پذیرش۹۴/۱۰/۲۵

چکیده

شیوع عفونت‌های ناشی از ساپرولگنیاسیس در دوران انکوباسیون تخم و ممنوعیت استفاده از مواد شیمیایی نظیر مالاشیت گرین، جایگزینی ترکیبات ضدقارچی با کارایی بالا و حداقل عوارض زیست‌محیطی را ضروری می-نماید. سیر (*Allium sativum*) از جمله گیاهانی است که در زمینه خواص ضدقارچی و ضدمیکروبی آن مطالعات زیادی صورت گرفته است. بنابراین، بررسی اثرات ضد قارچی عصاره آبی، اتانولی و متانولی سیر بر قارچ ساپرولگنیا، تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد قارچ مذکور و مقایسه میزان بازدارندگی بین غلظت‌های مختلف عصاره سیر با مالاشیت گرین و برونوپول، از اهداف این تحقیق بود. قارچ ساپرولگنیا از نمونه‌های آلوده جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی شد. عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی سیر آماده‌سازی شدند. اثرات بازدارندگی غلظت‌های مختلف این عصاره‌ها (۰/۳، ۰/۵، ۳، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) پس از ۴۸ ساعت از رشد قارچ به روش چاهک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد میزان بازدارندگی تمامی عصاره‌های مورد آزمایش بر رشد قارچ ساپرولگنیا در روزهای اول و دوم با روز سوم تفاوت معنی‌داری داشتند. میزان بازدارندگی عصاره اتانولی سیر با غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی-لیتر بیشترین اثر بازدارندگی بر رشد قارچ ساپرولگنیا را نسبت به مالاشیت گرین و برونوپول نشان داد. میزان MIC برای عصاره آبی، اتانولی و متانولی سیر ۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. در نتیجه، عصاره سیر دارای خواص ضد قارچی می‌باشد و به دلیل منشأ گیاهی آن و نداشتن عوارض جانبی برای آبزیان و کاربران، می‌توان از گیاه سیر به‌عنوان ضد قارچ در صنعت آبزی‌پروری استفاده کرد.

***واژهای کلیدی*: *O. mykiss*، عصاره گیاه سیر، مالاشیت‌گرین، برونوپول، ساپرولگنیازیز، دوره انکوباسیون**

*نویسنده مسئول: da_afshin@yahoo.com

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-11-27]

مقدمه

بیماری‌های عفونی و قارچی از جمله مشکلات صنعت آبزی‌پروری است که با افزایش پرورش متراکم آبزیان باعث بروز خسارات فراوان به تولید کننده‌ها می‌شود (Ebrahimzadeh Mousavi, 2006). قارچ‌های آبزی از جمله عوامل آسیب‌رسان به صنعت تکثیر و پرورش آبزیان به شمار رفته و باعث مرگ و میر وسیعی در آبزیان می‌گردند (Forneris *et al*., 2003). قارچ‌های خانواده ساپرولگنیاسه از مهم‌ترین قارچ‌های ایجاد کننده ساپرولگنیاسیس[1] در ماهیان و تخم آن‌ها می‌باشد. استفاده از مواد شیمیایی از جمله روش‌های معمول برای کنترل بیماری ساپرولگنیاسیس می‌باشد. مالاشیت گرین از جمله داروهایی است که به دلیل اثرات مطلوب قارچ‌کشی و سهولت استفاده از آن در درمان ساپرولگنیاسیس، همواره توسط بخش تکثیر و پرورش ماهی مورد استفاده قرار گرفته است (Howe *et al*., 1999; Rach *et al*., 1997). استفاده طولانی مدت از مالاشیت گرین باعث مسمومیت تنفسی و جهش‌های ژنتیکی شده و احتمال ابتلا به سرطان را بالا برده و در آبزیان باعث مهار سیستم ایمنی، باقی ماندن در بافت‌ها و توقف رشد می‌شود (Srivastava, 2007; Mirvaghefi *et al*., 2005). در سال ۱۹۹۱ اداره غذا و دارو در آمریکا (FDA[2]) استفاده از این دارو را ممنوع اعلام کرد (Marking *et al*,. 1994; Pottinger and Day, 1999). برونوپول نیز از جمله مواد شیمیایی است که توسط Novartis ساخته شده و به تازگی در کنترل آلودگی‌های قارچی آزاد ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Aller-Gancedo *et al*., 2007; Pottinger and Day 1999; Rezinciuc *et al*., 2014). نتایج بررسی‌های اخیر نشان داده‌است که هرچند این ماده در کنترل آلودگی‌های قارچی آزادماهیان مفید بوده است، ولی برای آبزیان مضراتی را به همراه داشته است (Srivastav and Roy, 2015). افزایش عفونت‌های ناشی از قارچ ساپرولگنیا در سال‌های اخیر و محدودیت‌هایی همچون تنوع کم و گران بودن داروهای ضد قارچی، عوارض جانبی و مقاومت قارچ‌ها نسبت به داروهایی که در درمان بیماری‌های قارچی مورد استفاده قرار می‌گیرند، موجب شده است تا پژوهشگران با توجه به پتانسیل گیاهان دارویی، به جستجوی داروهای ضد قارچی جدیدی در میان گیاهان دارویی بپردازند (Firoozbkhsh *et al*., 2014; Ebrahimzadeh Mousavi, 2006).

ایجاد عوارض جانبی کمتر نسبت به داروهای سنتزی، عدم ایجاد مقاومت داروئی، سلامت و بهداشت محیط زیست از مزایای استفاده از داروهای گیاهی است (Ghasemi Pirbaloti *et al*., 2010). در طب سنتی از گیاه سیر به‌عنوان گیاهی با خواص ضد قارچ و ضد باکتری نام برده شده است. ترکیب اکسید

1. Saprolegniasis
2. Food and Drug Administration

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-11-27]

دی‌آلیل دی‌سولفید به عنوان ماده مؤثره سیر، در ایجاد خاصیت ضد قارچی و ضد باکتریایی عصاره این گیاه شناخته شده است (Ghannoum, 1990; Bozin *et al*., 2008; Kazemipour *et al*., 2004).

مطالعات مختلفی توانایی عصاره سیر را در مقابله با میکروارگانیسم‌ها، درمان زخم‌ها و جراحات وضعیت سلامت ماهیان مورد تأیید قرار داده‌اند. در مطالعه‌ای (Kazemipour *et al*., 2004) اثر کیفی سیر و عصاره بابونه و گل ختمی در ترمیم ظاهری زخم‌های سطحی کپور معمولی را مورد مقایسه قرار گرفت و نتایج نشان داد که استفاده از سیر نسبت به عصاره بابونه و گل ختمی باعث تسریع در بهبودی و ترمیم زخم‌های سطحی ماهی‌ها می‌شود. در مطالعه‌ای آسیب‌پذیری چند سویه باکتری در مقابل غلظت‌های مختلف عصاره آبی سیر مورد بررسی قرار گرفت (Wei and Musa, 2008) و نشان داده شد که تمام غلظت‌های سیر در مقابل تست‌های پاتوژن باکتری‌ها مؤثر واقع شده است. در بررسی خواص ضد قارچی ۲۴ فلاونویید حاصل از ۲۴ عصاره‌ی گیاهی نیز مشخص شد عصاره سیر دارای اثر ضد قارچی مؤثری بر قارچ *Saprolegnia australis* جدا شده از تخم‌های ماهی تیلاپیا می‌باشد (Caruana *et al*., 2012).

لذا بررسی اثرات ضدقارچی عصاره آبی، اتانولی و متانولی سیر بر قارچ ساپرولگنیا، تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد و مقایسه میزان بازدارندگی بین غلظت‌های مختلف عصاره سیر با مالاشیت گرین و برونوپول، از اهداف این تحقیق بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، تهیه جدایه قارچی و روش شناسایی قارچ: نمونه‌برداری از تخم‌های قارچ‌زده ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج صورت گرفت. نمونه‌های آلوده در ظرف حاوی آب مقطر دو بار استریل قرار داده شد و به آزمایشگاه دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج فارس منتقل شد. به منظور دستیابی به قارچ مورد نظر، تعدادی از نمونه‌های آلوده را در پتری‌های حاوی محیط کشت YGC[1] قرار داده و در انکوباتور در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از گذشت ۳روز توده‌هایی پنبه مانند درون پتری مشاهده شد. به منظور خالص-سازی، کلنی‌هایی که از لحاظ ظاهری (ویژگی‌های مورفومتریک و تولید کلنی‌های سفید پنبه مانند) مشابه با ساپرولگنیا بودند از روی محیط کشت برش داده و در محیط کشت جدید کشت داده شدند (Yuasa and Hatai, 1995). این عمل در چندین مرحله در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک جهت جلوگیری از رشد باکتری‌ها تکرار شد تا کلنی‌های خالص ساپرولگنیا، عاری از باکتری و دیگر قارچ‌ها

1. Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-11-27]

بدست آمد. از توده‌های سفید رنگ پنبه مانند اسلاید تهیه شد و تصاویر رنگ‌آمیزی شده زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱). شناسایی قارچ بر اساس روش (Roberts, 2012, Coker and Matthews, 1937) انجام شد.

تهیه عصاره‌های هیدروالکلی و طرح آزمایش: به منظور تهیه عصاره هیدروالکلی سیر، از روش خیساندن استفاده گردید. در این تحقیق، از حلال‌های معمول مورد استفاده برای عصاره‌گیری چون آب (Irkin and Korukluoglu, 2007)، اتانول (Caruana *et al.,* 2012) و متانول (Bozin *et al*., 2008) استفاده شد. گیاهان بعد از خشک شدن در شرایط تاریکی، آسیاب شد. ۱۵۰ گرم از پودر حاصل وزن و ۵ برابر حجمی-وزنی اتانول و متانول ۸۰ درصد برای عصاره اتانولی و متانولی و آب مقطر برای عصاره آبی اضافه شد (Forooghi *et al*., 2012). این مخلوط به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه در شیکر انکوباتور نگهداری شد (Bozin *et al*., 2008). سپس عصاره خام به وسیله کاغذ صافی فیلتر و مایع به دست آمده در دستگاه روتاری با دمای ۴۰ درجه ریخته شد. تقطیر تا خارج شدن کامل عصاره از الکل انجام شد و سپس با استفاده از دستگاه فور با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد عصاره‌ها خشک شدند.

پس از انجام پیش‌تست، غلظت‌های ۵۰، ۵، ۳، ۰/۵ و ۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی سیر انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند. از آب مقطر به‌عنوان شاهد منفی و از مالاشیت گرین و برونوپول به‌عنوان ترکیبات شیمیایی ضد قارچ مورد استفاده در آبزی‌پروری به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. غلظت‌های مورد استفاده برای مالاشیت گرین و برونوپول به‌ترتیب ۰/۱۵ (Sudova *et al*., 2007) و ۱۰ پی‌پی‌ام (Aller-Gancedo and Fregeneda-Granzdes, 2007) انتخاب شد. برای تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد قارچ، از روش رقت‌سازی استفاده گردید. بدین ترتیب که پس از پیش‌تست، غلظت‌های صفر (آب مقطر)، ۰/۳، ۰/۵، ۳ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هر کدام از عصاره‌ها مورد استفاده قرار گرفت (Morteza Semnani *et al*., 2007). روش تأثیر عصاره‌ها بر قارچ به روش چاهک‌گذاری انجام گرفت. پس از ایجاد چاهک‌ها، قارچ ساپرولگنیا در مرکز پتری کشت داده شد و میزان ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌ها در چاهک‌های ایجاد شده در فواصل ۲/۵ میلی‌متری از مرکز پتری (فاصله ۱/۵ سانتی‌متری از لبه‌ی پتری) ریخته شد (Bahraminezhad *et al.*, 2010). نمونه‌ها به گرم‌خانه با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند (Udomkusonsri *et al.*, 2007) و به مدت ۷۲ ساعت با فاصله ۲۴ ساعته میزان رشد قارچ از مرکز پتری اندازه‌گیری و ثبت گردید. برای تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد قارچ، از روش رقت‌سازی استفاده گردید. بدین ترتیب که پس از پیش‌تست، غلظت‌های صفر (آب مقطر)، ۰/۳، ۰/۵ و ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هر کدام از عصاره‌ها، مورد استفاده قرار گرفت (Morteza Semnani *et al.,* 2007). درصد بازدارندگی از رشد قارچ‌ها توسط فرمول زیر محاسبه شد (Marinelli *et al*., 2012):

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-11-27]

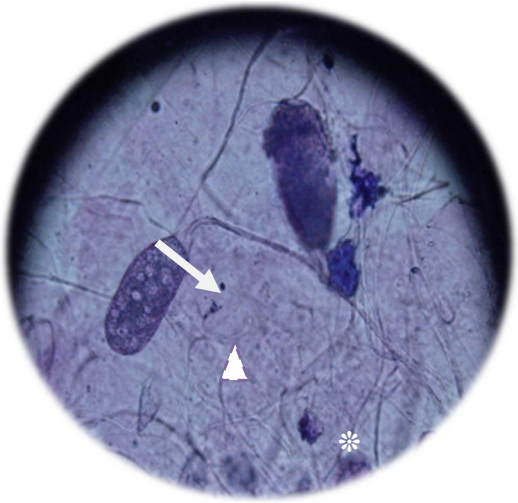
$$Inhibition = \frac{(C - T)}{C} \times 100$$

که در این فرمول T، میزان رشد در تیمار و C، میزان رشد در شاهد را نشان می‌دهد.

آزمایش در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی، با ۴ تکرار انجام گرفت. بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف انجام شد. تجزیه واریانس توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA و مقایسه بین میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح معنی‌دار ۹۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. برای مقایسه بازدارندگی بین روزهای مختلف از آزمون فاکتوریل برای هر کدام از عامل‌ها (روز و غلظت) استفاده گردید و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام پذیرفت.

نتایج

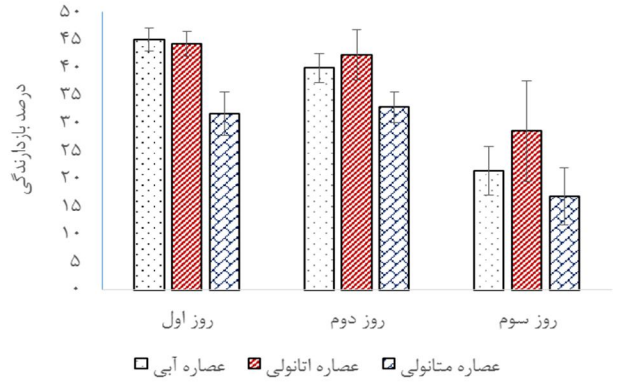
نتایج مربوط به مشاهده اسلاید قارچ ساپرولگنیا در زیر میکروسکوپ، خالص بودن کلنی‌ها را نشان داد. با توجه به وجود هیفه بلند، منشعب و بدون دیواره عرضی، زئوسپورانژیوم بر روی هیفه بارور (استوانه‌ای شکل، بلند و تا حدودی قطورتر از هیفه و متصل به آن)، داشتن دو دیواره که در داخل آن‌ها زئوسپورهای کروی وجود داشت، جنس قارچ ساپرولگنیا تشخیص داده شد (شکل ۱).



شکل ۱- نمایی از قارچ ساپرولگنیا در زیر میکروسکوپ، علامت ستاره (هیفه‌های منشعب بدون دیواره عرضی)، مثلث (زئوسپورانژیوم) و فلش (زئوسپور)

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-11-27]

بین میزان بازدارندگی عصاره‌ها در روزهای اول و دوم با روز سوم تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. (شکل ۲). با توجه به بهتر بودن نتایج روز دوم در بازدارندگی از رشد قارچ، تنها نتایج مربوط به روز دوم برای بررسی‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۲- مقایسه بازدارندگی از رشد عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی سیر در روزهای آزمایش (میانگین ± خطای استاندارد).

نتایج حاصل از میزان بازداندگی بین عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی سیر در غلظت‌های مختلف نشان داد در عصاره آبی سیر، تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مورد استفاده وجود ندارد و اثرگذاری عصاره‌ها و مواد شیمیایی در بازدارندگی از رشد قارچ یکسان بودند (جدول ۱). در عصاره اتانولی سیر مشخص شد که بیشترین بازدارندگی از رشد مربوط به غلظت mg/ml ۳ بود. برای عصاره متانولی بیشترین بازدارندگی از رشد قارچ مربوط به غلظت‌های mg/ml ۵۰، ۵ و ۳ این عصاره بود که از نظر بازدارندگی از رشد قارچ با مواد شیمیایی عملکرد یکسانی داشتند (جدول ۱).

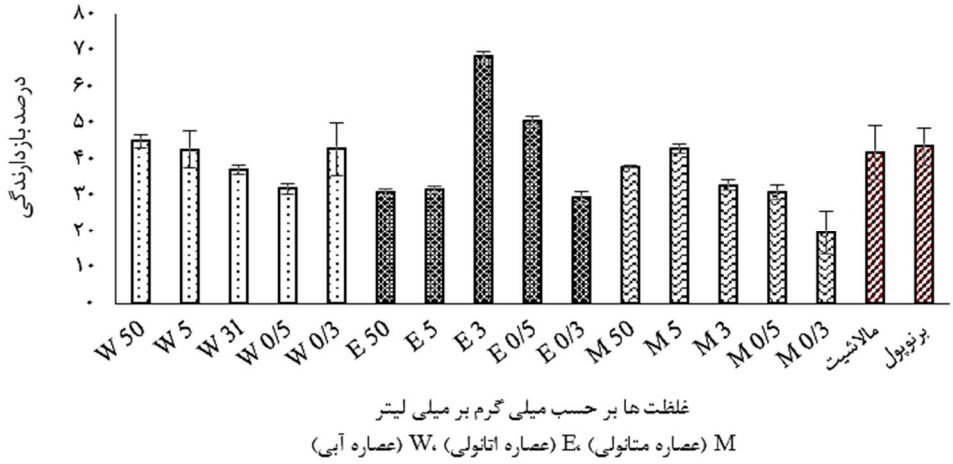
جدول ۱- مقایسه بازدارندگی از رشد قارچ ساپرولگنیا در غلظت‌های مختلف عصاره‌های سیر (میانگین± خطای استاندارد)

	میانگین		
غلظت	آبی	اتانولی	متانولی
mg/ml۵۰	۴۵/۱۶۱۶ ±۱/۸۱ [a]	۳۰/۹۸۶۷ ±۰/۸۲ [cd]	۳۸/۰۶۱۹± ۰/۴۳ [a]
mg/ml۵	۴۲/۷۷۵۶ ±۵/۱۸ [a]	۳۱/۷۷۷۹± ۰/۹۱ [cd]	۴۲/۹۸۳۱± ۱/۲۸ [a]
mg/ml۳	۳۷/۰۸۴۵ ±۱/۲۰ [a]	۶۸/۳۱۳۹±۱/۴۵ [a]	۳۲/۹۰۸۶± ۱/۴۰ [a]
mg/ml۰/۵	۳۱/۸۹۸۵ ±۱/۴۴ [a]	۵۰/۵۹۳۶ ±۱/۳۳ [b]	۳۰/۹۸۲۶± ۱/۹۹ [ab]
mg/ml۰/۳	۴۲/۸۴۷±۷/۲۹ [a]	۲۹/۶۵۳۵±۱/۶۴ [d]	۱۹/۶۵۲۸±۶/۱۰ [b]
مالاشیت گرین	۴۱/۹۲۰۴ ±۷/۳۳ [a]	۴۱/۹۲۰۴ ±۷/۳۳ [bc]	۴۱/۹۲۰۴± ۷/۳۳ [a]
برونوپول	۴۳/۶۳۹± ۵/۱۷ [a]	۴۳/۶۹۳ ±۵/۱۷ [b]	۴۳/۶۳۹± ۵/۱۷ [a]

* حروف ناهمسان در هر ستون نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار ($p<0.05$) می باشد.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-11-27]

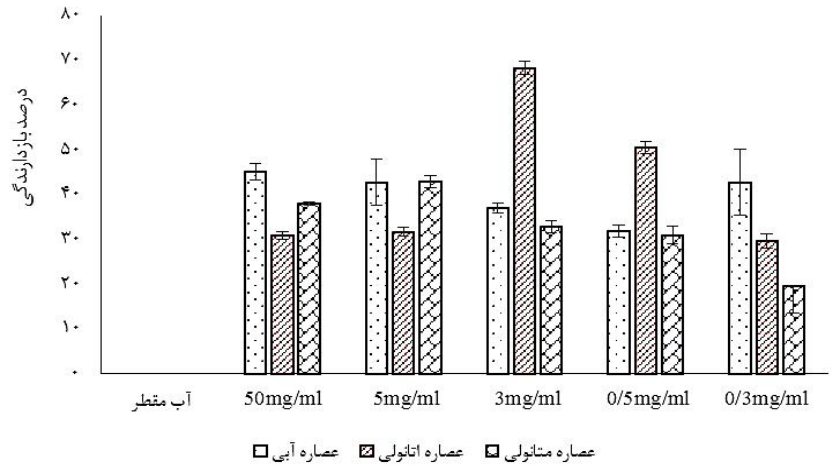
نتایج مربوط به مقایسه درصد بازدارندگی عصاره سیر با مالاشیت گـرین و برونوپـول نشـان داد کـه بیشترین بازدارندگی مربوط به غلظت mg/ml ۳ عصاره اتانولی سیر بود که این میزان با مالاشیت گرین و برونوپول از لحاظ آماری تفاوت داشت ($p<0.05$) (شکل ۳). پس از آن عصاره اتـانولی سـیر بـا غلظـت mg/ml ۰/۵ و عصاره آبی سیر با غلظت mg/ml ۵۰ به ترتیب بیشـترین اثرگـذاری را در بازدارنـدگی از رشد قارچ ساپرولگنیا با تفاوت معنی‌داری با مالاشیت و برونوپول نشان دادند (شـکل ۳). غلظـت‌هـای ۵ mg/ml متانولی سیر، mg/ml ۰/۳ آبی سیر، mg/ml ۵ آبی سیر، mg/ml ۵۰ متـانولی سـیر، mg/ml ۳ آبی سیر، mg/ml ۳ متانولی سیر، mg/ml ۰/۵ آبی سیر و mg/ml ۵ اتانولی سیر از لحاظ اثرگـذاری بـر قارچ ساپرولگنیا با با مالاشیت گرین و برونوپول هم اثر بودند.



شکل۳- مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌های سیر در بازدارندگی از رشد قارچ ساپرولگنیا نسبت به مواد شیمیایی

نتایج مربوط به مقایسه بازدارندگی از رشد قارچ ساپرولگنیا برای تمام غلظت‌های مورد بررسی در این آزمایش نشان داد که کم‌ترین غلظت بازدارنده از رشد قارچ که نسبت به آب مقطر (بازدارندگی صفر) تفاوت معنی‌دار نشان داد، غلظت ۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود ($p<0.05$) (شکل ۴).

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-11-27]



شکل ۴- کم‌ترین غلظت بازدارنده از رشد ساپرولگنیا (میانگین ± خطای استاندارد).

بحث و نتیجه‌گیری

ساپرولگنیاسیس از مشکلات عمده دوره انکوباسیون تخم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به حساب می‌آید و تاکنون مؤثرترین روش برای درمان این بیماری را مدیریت صحیح بهداشتی و استفاده از مواد شیمیایی دانسته‌اند (Akhlaghi and Bahaodini, 2012). درمان با داروهای شیمیایی و سنتزی علی‌رغم نتیجه‌بخش بودن دارای عوارض جانبی می‌باشند و ممکن است مقاومت داروئی ایجاد کنند. از این رو استفاده از داروهای گیاهی می‌تواند راه حلی مناسب در جهت رفع این مشکلات باشد. عوامل مختلفی قادرند بر فعالیت ضد میکروبی داروهای گیاهی تأثیر گذار باشند که از آن جمله می‌توان به نوع و ترکیبات موجود در گیاه، مقدار استفاده، نوع میکروارگانیسم، میزان pH و دمای محیط اشاره نمود (Sagdic, 2003).

در استفاده از داروها و عصاره‌های گیاهی مدت زمان اثر گذاری و حفظ ترکیبات پس از گذشت زمان مهم است. در این تحقیق نتایج حاصل از مقایسه بازدارندگی از رشد قارچ طی ۷۲ ساعت، نشان داد عصاره‌ها در روز سوم (۷۲ ساعت) نسبت به روز اول و دوم بازدارندگی کمتری داشتند. یعنی اثر بخشی عصاره‌ها در روز اول و دوم نسبت به روز سوم بهتر بودند. شاید یکی از دلایل این امر این باشد که در روز سوم با کم اثر شدن عصاره، قارچ توانایی رشد بیشتری داشت. در مقایسه اثرات ضدقارچی پنج عصاره گیاهی بر قارچ بیماری‌زای گیاهی ریزوکتونیا سولانی[1] طی سه روز بیان شد بیشترین

1- *Rhizoctonia solani*

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-11-27]

بازدارندگی از رشد قارچ در روز سوم صورت گرفته است (Forooghi *et al*., 2012). تأثیر عصاره سیر و چندین عصاره دیگر بر تخم ماهی تیلاپیا طی ۱۶۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد گرچه عصاره سیر تا ۱۶۸ ساعت پس از انکوباسیون اثرگذار بوده است، ولی بیشترین تأثیر عصاره سیر در ۷۲ ساعت گزارش شد (Caruana *et al*., 2012). در تحقیق حاضر مشخص شد گرچه عصاره سیر تا روز سوم در بازدارندگی از رشد قارچ ساپرولگنیا مؤثر واقع شد، ولی قطر هاله بازدارنده رشد در روز اول و دوم بیشتر از روز سوم است.

در فرایند عصاره‌گیری، حلال‌های مختلف می‌توانند انواع و مقادیر متفاوت متابولیت‌های موجود در گیاه را استخراج کنند و بنابراین عصاره گیاه در حلال‌های مختلف می‌تواند اثرات متفاوتی در کنترل بیمارگرها داشته باشد (Abdolmaleki *et al*., 2011). در این پژوهش از بین عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی، بیشترین بازدارندگی مربوط به عصاره اتانولی سیر بود (شکل ۳). در مقایسه اثر عصاره آبی و متانولی سیر بر سه سویه قارچ گزارش شد. عصاره‌های متانولی و آبی بر هر سه سویه قارچ تأثیر گذارند ولی اثر عصاره متانولی بر قارچ میکروسپروم جیپسئوم[۲] بیشتر از عصاره آبی آن می‌باشد (Ayatollahi Mousavi *et al*., 2008). در مقایسه تأثیر عصاره‌های آبی و متانولی هندوانه ابوجعل[۱] بر قارچ ساپرولگنیا پارازیتیکا، عصاره متانولی تأثیر بیشتری بر این قارچ داشت (Gholampour Azizi *et al*., 2012). در استفاده از عصاره آبی و الکلی بلوط[۳] علیه قارچ *Saprolegnia parasitica* بیان شد این قارچ در عصاره اتانولی به‌طور کامل رشد کرده حساسیت بسیار کمی نسبت به عصاره آبی و بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره متانولی دارد (Heydari *et al*., 2015). با توجه به مطالب بیان شده چون هر حلال قادر به استخراج متابولیت‌های مختلفی از گیاه است و هر ترکیب عملکرد خاصی دارد، در این پژوهش می‌توان چنین بیان کرد که ترکیبات استخراج شده توسط اتانول از سیر، تأثیر بیشتری بر قارچ ساپرولگنیا داشتند. مطالعات بسیاری اثربخش بودن استفاده از عصاره سیر را نسبت به داروها و مواد شیمیایی مورد تأیید قرار داده‌اند. در این پژوهش مشخص شد که عصاره اتانولی سیر در مقایسه با مالاشیت گرین و برونوپول بیشترین بازدارندگی را دارد که این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p<0.5$). ترکیب عصاره آبی سیر با داروهای فلوکونازول، ایتراکونازول و کتوکونازل، می‌تواند منجر به افزایش فعالیت ضدقارچی این داروها علیه برخی مخمرهای بیماری‌زا و نیز کاهش مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی آن‌ها علیه عوامل قارچی در شرایط آزمایشگاهی گردد (Razaghparast *et al*., 2009). تأثیر

1- *Microsporum gypseum*
2- *Citrullus colocynthis*
3- *Quercusbrantiivar persica*

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-11-27]

عصاره سیر بر کاندیدا آلبیکینس بیشتر از داروهای کلوتریمازول، آمفوتریسین و نیستاتین گزارش شد (Fani and Araghizadeh, 2009).

داروهای شیمیایی را همیشه نمی‌توان با یک میزان و معیار به‌کار برد. زیرا کارایی و سمیت این مواد در حضور مواد آلی و شرایط فیزیکوشیمیایی آب قابل تغییر است (Mirvaghefi *et al*., 2005). در استفاده از عصاره‌های گیاهی اثرگذاری غلظت‌های مختلف هر عصاره با توجه به نوع حلال و ترکیبات استخراج شده توسط حلال و نیز با توجه به نوع میکروارگانیسم، محیط رشد میکروارگانیسم (جامد یا مایع) متفاوت خواهد بود. در مطالعه حاضر به نظر می‌رسد غلظت‌های بیشتر از ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به علت ویسکوزیته بالاتر توانایی کمتری در انتشار در محیط کشت را داشته‌اند. همچنین غلظت‌های کمتر از این مقدار نیز میزان ترکیبات موجود در آن‌ها با کاهش غلظتشان کمتر شده و اثرگذاری کمتری را دارا بودند. غلظت‌های ۱۰, ۱۰۰, ۱۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ پی پی‌ام از عصاره‌ی سیر دارای اثر بازدارندگی رشد بر قارچ ساپرولگنیا می‌باشد (Caruana *et al*., 2012). در مطالعه حاضر غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی سیر بیشترین بازدارندگی را در مقایسه با مالاشیت گرین و برونوپول داشت ($p<0.5$). با توجه به یافته‌های دیگر محققین و یافته‌های این پژوهش می‌توان بیان کرد غلظت‌های مختلف عصاره‌ها نتایج متفاوتی را نشان می‌دهند.

میزان استفاده از داروها و مواد شیمیایی با توجه به نوع دارو و میکروارگانیسم متفاوت است و میزان مجاز برای مصرف به‌صورت دستور برای هر دارو بیان شده است. در استفاده از عصاره‌های گیاهی MIC مطرح می‌شود. در این پژوهش MIC برای عصاره آبی، اتانولی و متانولی ۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیان شد (شکل ۴). علت تفاوت در این مقادیر در مطالعات مختلف را می‌توان به تفاوت در میکروارگانیسم، تفاوت در ترکیبات موجود در عصاره‌ها، تفاوت در غلظت‌های مورد استفاده از هر عصاره، تفاوت در نوع محیط کشت و ویسکوزیته عصاره و عوامل محیطی دانست. در پژوهشی مشخص شد که غلظت mg/ml ۶۲/۵ عصاره سیر باعث کشتن مژه‌دار *Ichthyophthirius multifilus* مسبب بیماری لکه سفید می‌شود (Buchmann *et al*., 2003). عصاره ریشه گیاه *Ruta graveolens* به‌عنوان مهارکننده قارچ ساپرولگنیا با MIC برابر با $\mu g/ml$ ۲۵×۱۰^{۳} گزارش شد (Hashemi Karouei *et al*., 2011). با بررسی تأثیر عصاره‌های الکلی و آبی از *Citrullus colocynthis*، میزان MIC حدود $\mu g/ml$ ۱۰ ×۶۲۵ گزارش شد (Gholampour Azizi *et al*., 2012). محدوده MIC نانو ذره اکسید روی به‌طور میانگین $\mu g/ml$ ۰/۸۱±۰/۲۸ گزارش شد (Sedighi *et al*., 2015). میزان MIC عصاره آبی و الکلی بلوط علیه قارچ ساپرولگنیا پارازیتیکا حدود mg/ml۱۰×۶۲۵ بیان شد (Heydari *et al*., 2015).

این مطالعه نشان داد که عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی سیر اثر ضد قارچی مناسبی بر قارچ ساپرولگینا دارد و این اثر وابسته به حلال، غلظت و روز می‌باشد. ترکیبات استخراج شده توسط اتانول،

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-11-27]

نتایج خوبی را در بازدارندگی از رشد قارچ ساپرولگنیا نشان دادند. بیشترین بازدارندگی مربوط به غلظت ۳ mg/ml عصاره اتانولی سیر بود که این غلظت از مالاشیت گرین و برونوپول در مهار رشد قارچ ساپرولگنیا قوی‌تر عمل نمود. میزان MIC برای عصاره آبی، اتانولی و متانولی سیر ۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. در ادامه پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی، ترکیبات موجود در عصاره گیاه سیر خالص‌سازی شده و ترکیبات مؤثره ضدقارچی این گیاه علیه قارچ ساپرولگنیا مورد بررسی قرار گیرد تا زمینه برای کاربرد دارویی آن علیه این قارچ فراهم شود. در این پژوهش کم‌ترین غلظت مورد آزمایش برای عصاره‌ها غلظت ۰/۳ mg/ml گزارش شد و غلظت‌های کمتر از این مقدار مورد ارزیابی قرار نگرفت؛ پیشنهاد می‌شود غلظت‌های کمتر از ۰/۳ mg/ml، برای دستیابی به میزان دقیق MIC مورد ارزیابی قرار گیرند.

منابع

Abdolmaleki M., Bahrami Nezhad S., Abbasi S. 2011. Antifungal effects of some plant extracts against four fungal plant pathogens. Journal of Medicinal Plants, 2(38): 148-155. (In Persian).

Akhlaghi M., Bahaodini A.A. 2012. Compare several treatments to combat Saprolegniasis in fertilized eggs of rainbow trout. Veterinary Journal (Research and Development), 94: 18-24. (In Persian).

Aller-Gancedo J.M., Fregeneda-Grandes J.M. 2007. Comparative efficacy of Pyceze (bronopol) in controlling mortality of brown trout (*Salmo trutta*) eggs. Aquaculture Research, 38: 618-624.

Ayatollahi Mousavi S.A., Yaghmai B., Mehrabian M. 2009. The Study of the Effects of Aqueous and Methanol Extracts of Garlic against *Trichophyton Mentagrophytes*, *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum*. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences, 8(1): 3-10. (In Persian).

Bahraminezhad S., Marefatzadeh M., Abbasi S., Zarekhafri A. 2010. Evaluate the anti-fungal methanolic extract effects of 27 species of plant against the pathogenic fungi of plant. Modern Technology in Agriculture, 4(2): 7-18. (In Persian).

Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Goran A., Igic R. 2008. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum*). Food Chemistry, 111(4): 925-929.

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

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 and 359: 146-154.

Coker W., Matthews V. 1937. Saprolegnials, monoblepharidales, blastocladiales. North American Flora, 2: 1-76.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-11-27]

Ebrahimzadeh Mousavi H.A. 2006. Evaluation of eucalyptus essential oil in controlling fungal contamination of eggs of rainbow trout. Journal of Plant Research, 20: 42-47. (In Persian).

Fani M.M., Araghizadeh A. 2009. Evaluation of antifungal activity of Garlic extract against *Candida albicans*. Journal of Hormozgan University of Medical Sciences, 13(3): 143-148. (In Persian).

Firoozbkhsh F., Afsarian F.M., Houshangi S., Badali H. 2014. Antifungal effects of fennel, yarrow, fennel, cinnamon and Artemisia in vitro against *S. parasitica*. Iranian Journal of Medical Sciences, 17(5): 60-69. (In Persian).

Forneris G., Bellardi S., Palmegiano G.B., Saroglia M., Sicuro B., Gasco L., Zoccarato I. 2003. The use of ozone in trout hatchery to reduce saprolegniasis incidence. Aquaculture, 221(1): 157-166.

Forooghi M., Mohammadi S., Ghasemi A. 2012. Antifungal activity of five plant extracts on plant pathogenic fungi Rizosolonia solani. Journal of the Microbes World, 4-5(13): 1115-1121. (In Persian).

Ghannoum M. 1990. Inhibition of Candida adhesion to buccal epithelial cells by an aqueous extract of *Allium sativum* (garlic). Journal of Applied Bacteriology, 68(2): 163-169.

Ghasemi Pirbaloti A., Ghasemi M.R., Momtaz H., Golparvar A.R., Hamedi B., Shahgholian L. 2010. Effect of several medicinal plants of the *bacterium Brucella abortus* (*Brucella abortus*) in terms of In-vivo and In-vitro. Herbal Medicines, 1: 21-28. (In Persian).

Gholampour Azizi I., Hoseynifard M., Taghipoor S. 2012. The Effect of Aquatic and Alcoholic Extracts of *Citrullus colocynthis* on Growth of the *Saprolegnia parasitica*. World Journal of Fish and Marine Sciences, 4(3): 258-262.

Hashemi Karouei S.M., Sadeghpour Haji M., Gholampour Azizi I., Mirzaei Jahed H. 2011. 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(1): 64-67.

Heydari M., Ebrahimzade Mousavi H.A., Sharifi A., Hosseini S., Salehpour Z. 2015. The Effect of Aquatic and Alcoholic Extracts of Persian Oak (*Quercusbrantiivar. persica*) fruit extract on *Saprolegnia parasitica*. Scientific Engineering and Technology Research, 4(12): 2318-2322.

Howe G.E., Gingerich W.H., Dawson V.K., Olson J.J. 1999. Efficacy of hydrogen peroxide for treating saprolegniasis in channel catfish. Journal of Aquatic Animal Health, 11(3): 222-230.

Irkin R., Korukluoglu M. 2007. Control of *Aspergillus niger* with garlic, onion and leek extracts. African Journal of Biotechnology, 6 (4): 384-387.

Kazemipour Y., Rezaei M., Keyvani Y. 2004. Compare the qualitative effect of garlic extract, chamomile and mallow in healing the wounds of the surface appearance of common carp (*Cyprinus carpio*). Research and Development in Cattle Breeding and Aquaculture, 17(4): 93-97. (In Persian).

Marinelli E., Orzali L., Lotti E., Riccioni L. 2012. Activity of some essential oils against pathogenic seed borne fungi on legumes. Asian Journal of Plant Pathology, 6: 66-74.

Marking L.L., Rach J.J., Schreier T.M. 1994. American Fisheries Society evaluation of antifungal agents for fish culture. The Progressive Fish-Culturist, 56(4): 225-231.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-11-27]

Mirvaghefi A.R., Azari Takami Gh., Jafarpoor A. 2005. A comparative Study of the Effect of Hydrogen peroxide as against Mallachite Green Used for Prevantion and control of Fungal Infection During Hatching Peroid in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. Journal of Natural Resources, 58(4): 853-860. (In Persian).

Morteza Semnani K., Saeedi M., Mahdavi M.R., Rahimi F. 2007. Compare anti microbial effect of methanolic extract of some plants of genre Stachys and Phlomis. Jurnal of Mazandaran Medical Sciences, 7(57): 57-66. (In Persian).

Pottinger T., Day J. 1999. A *Saprolegnia parasitica* challenge system for rainbow trout: assessment of Pyceze as an anti-fungal agent for both fish and ova. Diseases of Aquatic Organisms, 36(2): 129-141.

Rach J.J., Howe G.E., Schreier T.M. 1997. Safety of formalin treatments on warm-and cool water fish eggs. Aquaculture, 149(3): 183-191.

Razaghparast A., Shams Ghahfarokhi M., Yadegari M.H., Razaghi Abyaneh M. 2009. Antifungal effect of aqueous extract of garlic (*Allium sativum*) separately and in combination with Fluconazole, Itraconazole and Ketonazole on pathogenic yeasts. Journal of Gorgan University of Medical Sciences, 11(1:29): 49-56. (In Persian).

Rezinciuc S., Sandoval-Sierra J.V., Di-Eguez-Uribeondo J. 2014. Molecular identification of a bronopol tolerant strain of *Saprolegnia australis* causing egg and fry mortality in farmed brown trout, Salmo trutta. Fungal Biology, 118: 591-600.

Roberts R.J. 2012. Fish Pathology, John Wiley & Sons. 590 P.

Sagdic O. 2003. Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. LWT-Food Science and Technology, 36(5): 467-473.

Sedighi A., Sudagar M., Hashemi Koruei S.M., Hoseyni S.S. 2015. Compare antifungal effect of nanoparticles of zinc oxide (ZnO) with malachite green on the fungus (*Saprolegnia* Sp.). Exploitation and aquaculture, 4(1): 29-37.

Srivastava K. 2007. Green supply-chain management: a state-of-the-art literature review. International Journal of Management Reviews, 9(1): 53-80.

Srivastava K., Roy D. 2015. Effects of malachite green (Triarylmethane dye) and Pyceze (Bronopol) on the hematological parameters of a freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). International Journal of Fisheries and Aquatic Studies, 2(6): 119-122.

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(12): 527-539.

Udomkusonsri P., Trongvanichnam K., Limpoka M. 2007. In vitro Efficacy of Antifungal Activity of Some Thai Medicinal-Plants on the Pathogennic Fungus, Saprolegnia Parasitica H2, from Fish. Kasetsart Journal : Natural Science, 41: 56–61.

Wei L., Musa N. 2008. Inhibition of Edwardsiella tarda and other fish pathogens by *Allium sativum* extract. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences, 3: 692-696.

Yuasa K., Hatai K. 1995. Relationship between pathogenicity of *Saprolegnia spp.* isolates to rainbow trout and their biological characteristics. Gyobyo Kenkyu= Fish Pathology, 30(2): 101-106.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-11-27]