

"مقاله پژوهشی"

ارزیابی اثر ضد قارچی و مقایسه مقاومت ساپروولگنیا جداسازی شده از تخم ماهیان قره برون و قزل آلائی رنگین کمان در برابر محلول هوآسان تی آر ۵۰ (Huwa- San TR- 50) در شرایط آزمایشگاهی

مریم قیاسی^{*}، ابوالفضل سپهداری^۲، رضا صفری^۱، محمد بینایی^۱، فرشیده حبیبی^۱

۱. پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

۲. موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۸/۱

چکیده

جنس ساپروولگنیا و گونه‌های آن به عنوان یکی از مهمترین عوامل قارچی مسبب تلفات تخم در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان در آب شیرین در سراسر دنیا شناخته شده است. هرچند مالاشیت گرین اثر ضد قارچی خوبی در کنترل تلفات تخم ناشی از ساپروولگنیازیس در هجری‌ها دارد ولی به دلیل اثرات سرطانزایی و سمی مصرف آن منع گردیده است. مطالعات مختلفی تاکنون در خصوص معرفی ترکیبات مناسبی که بتوانند در سطح مزرعه جایگزین مالاشیت گرین گردند، انجام شده است. هدف از این تحقیق ارزیابی اثرات ضد قارچی محلول هوآسان تی آر-۵۰ در شرایط آزمایشگاهی براساس میزان MIC (Minimum Inhibitory Concentration) آن در مقایسه با مالاشیت گرین بر نمونه ساپروولگنیا جداسازی شده از هجری ماهیان قزل آلائی رنگین کمان و قره برون بود. برای انجام آزمایشات MIC از دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰، ۹۰۰، ۱۰۰۰، ۱۲۰۰، ۱۴۰۰، ۱۶۰۰ و ۱۸۰۰ استفاده شد. نتایج میزان MIC برای ساپروولگنیا جداسازی شده از هجری ماهی قره برون ۱۴۰۰ ppm و برای نمونه قزل آلائی رنگین کمان ۸۰۰ ppm تعیین گردید. این نشان داد که نمونه ساپروولگنیا جدا شده از هجری ماهیان قره برون در برابر این دارو مقاومت بیشتری در مقایسه با نمونه جداسازی شده از هجری ماهی قزل آلائی رنگین کمان داشته است. بر این اساس به نظر می‌رسد هوآسان تی آر-۵۰ بتواند جایگزین مالاشیت گرین در کنترل قارچ زدگی در هجری ماهیان شود، ولی توفیق در کنترل قارچ زدگی به میزان مقاومت گونه‌های ساپروولگنیا در برابر این ترکیب دارویی دارد.

کلمات کلیدی: ساپروولگنیا، هوآسان، قزل آلائی رنگین کمان، قره برون، هجری

* عهده‌دار مکاتبات (✉). ghiasimaryam4@gmail.com

مقدمه

شرایط عادی قارچ قادر به آلوده ساختن تخم زنده نیست ولی محققین معتقدند که ساپروولگنیا با تولید حجم زیادی از میسلیم در اطراف تخم زنده سبب کاهش دسترسی آن به اکسیژن شده و بدین ترتیب با ایجاد خفگی در تخم زمینه مرگ آنها را فراهم می کنند (Espeland & Hansen, 2004). البته بعضی محققین عقیده دارند که نفوذ هایف قارچ به دیواره کوریونیک^۴ سلول تخم تنظیم اسمری تخم و جنین موجود در آن را به هم زده و در نهایت سبب مرگ تخم می شود (Beakes et al., 1994). اولین گزارش در خصوص مصرف مالاشیت گرین در صنعت آبی پروری در سال ۱۹۳۶ گزارش شد که نشان داد از این ماده به روش حمام و غوطه‌وری برای درمان قارچ زدگی در تخم و ماهی استفاده شده است (Clup and Beland, 1996). چگونگی مکانیسم عملکرد مالاشیت گرین در قارچ کشی چندان روشن نیست ولی عنوان شده که این ماده با مهار آنزیم‌های تنفسی (گروه سیتوکروم اکسیداز) سبب آسیب به سیستم نقل و انتقال انرژی سلولهای قارچی شده و با ممانعت از فعالیت متابولیسمی، در نهایت سبب مرگ سلولهای قارچی می شود (Espeland & Hansen, 2004). شاید به دلیل مکانیسم اثر موثر و نیز ارزان بودن آن، مالاشیت گرین به عنوان یک ترکیب شیمیایی بی نظیر در کنترل ساپروولگنیاژیس در دنیا شناخته شده است (Ali et al., 2015). مطالعات بعدی نشان داد که این ماده در بدن ماهی به لکومالاشیت تبدیل می شود (Alderman and Clifton-Hadley, 1993) که اثرات مخربی بر سیستم ایمنی و تولید مثل داشته و مصرف آن عوارض ژنتیکی و سرطان را به همراه دارد و ضروری است تا ترکیبات

ساپروولگنیاها متعلق به رده اوومیسته‌ها، گروهی از ارگانسیم‌های هتروتروف هستند که بصورت ساپروفیت و یا انگل در طیف وسیعی از میزبان‌ها در طبیعت زندگی می کنند (Robertson et al., 2009; Phillips et al., 2008). مهم ترین گونه‌های این جنس که در آبزیان بیماری‌زا شناخته شده‌اند شامل ساپروولگنیا دیکلینا^۱، ساپروولگنیا فراکس^۲، ساپروولگنیا استرالیس^۳، ساپروولگنیا مونوایکا^۴ و ساپروولگنیا پارازیتیکا^۵ هستند (Molina et al., 1995; Hussein et al., 2001; Stueland et al., 2005; Dieguez-Urbeondo et al., 2007; Fernandez-Beneitez et al., 2008; Petrisko et al., 2008; Phillips et al., 2008; Ke et al., 2009; Ghiasi et al., 2010). بطور کلی ساپروولگنیا مونوایکا، مسئول تلفات در هجری ماهیان خاویاری (Phillips et al., 2008) و ساپروولگنیا پارازیتیکا و ساپروولگنیا دیکلینا پاتوژن اصلی مسبب ساپروولگنیاژیس در اکثر گونه‌های مختلف ماهیان شناخته شده‌اند (Phillips et al., 2008; Robertson et al., 2009; Thoen et al., 2011). تخمین زده می شود که این بیماری سبب از بین رفتن یک تخم به ازای هر ۱۰ عدد تخم در هجری ماهیان سردآبی می گردد (Hussein & Hatai, 2002). مطالعات Earle و Hintz (۲۰۱۴) نشان داد که ساپروولگنیاژیس عامل مرگ و میر ۱۰٪ از تمام لاروهای هچ شده آزاد ماهیان در دنیا است و این امر موجب میشود که تقریباً ۳۰٪ از تولید جهانی ماهی برای مصرف از بین برود. در هجری-ها، ساپروولگنیا از تخم‌های مرده به عنوان محل رشد و تکثیر استفاده کرده و با ایجاد حجم فراوانی از ژئواسپورها عفونت را در سطح هجری منتشر می کند. در

^۴ - S. monoica^۵ - S. parasitica^۶ - chorionic membrane^۱ - Saprolegnia diclina^۲ - S. ferax^۳ - S. australis

از این بررسی ارزیابی اثرات ضد قارچی هوآسان تی آر-۵۰ و نیز تعیین مقاومت نمونه ساپروولگنیا جداسازی شده از هچری ماهیان قره برون و قزل آلا ی رنگین کمان براساس آزمایش MIC در مواجهه با هوآسان تی آر-۵۰ است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری، جداسازی و خالص سازی قارچ ساپروولگنیا

برای جداسازی نمونه قارچ از هچری یک مرکز تکثیر قزل آلا در منطقه دو هزار (تنکابن) و هچری ماهیان قره برون در مرکز بازسازی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی آبریان شهید رجایی (ساری) نمونه برداری گردید. تخم-های قارچ زده با استفاده از پنس به ظروف درب دار حاوی آب مقطر استریل منتقل و در آزمایشگاه تخم‌ها با آب مقطر استریل شستشو داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۸ درجه سانتی گراد (منطبق با دمای هچری) در ظروف حاوی آب مقطر استریل و آنتی بیوتیک (ممانعت از رشد عوامل باکتریایی) گرمخانه گذاری گردید. پس از آن تخم‌ها مجدداً با آب مقطر استریل شستشو داده شده و بصورت تلقیحی در محیط گلوکز یست اکستراکت آگار^۲ (YGC) کشت داده شد و به مدت ۵ روز در دمای ۱۸ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری-گردید (Ghiasi *et al.*, 2010). برای خالص سازی پرگنه از حاشیه پرگنه‌های رشد کرده با استفاده از اسکالپل استریل نمونه برداری و مجدداً پاساژ داده شد و با تهیه لام میکروسکوپی و مشاهده ساختار میکروسکوپی هایف، اسپورانژیوم و گما تولید شده و اطمینان از خلوص پرگنه کشت نهایی انجام و نمونه خالص تهیه گردید. لازم به

کم خطر جایگزین آن شوند (Fernandes *et al.*, 1991; Rao, 1995; Gouranchat, 2000). هوآسان یک ماده ضد عفونی کننده برپایه پراکسید هیدروژن است که یک لیتر آن حاوی ۵۷۰ گرم پراکسید هیدروژن و ۰/۳۶ گرم نقره کلوئیدی است که وجود آن سبب افزایش پایداری و افزایش طول عمر و قدرت ضد عفونی کنندگی پراکسید هیدروژن می شود. این ترکیب به بار منفی دیواره و غشا خارجی ارگانسیم‌های پروکاریوت و یوکاریوت به راحتی جذب شده و کمپلکس نقره به مولکول‌های آلی دیواره متصل می گردد. در چنین وضعیتی یونهای نقره به عنوان یک کاتالیزور در جهت اکسیداسیون مولکول‌های دیواره سلولی توسط پراکسید هیدروژن عمل کرده و رادیکال‌های آزاد اکسیژن ایجاد شده سیستم آبخاری از پراکسیداسیون چربی موجود در دیواره سلولی را آغاز می کنند. طی واکنش، پراکسید هیدروژن تجزیه شده (آب، اکسیژن و رادیکال آزاد) ولی مولکول نقره طی واکنش‌های مختلف اکسیداسیون - احیا، فعال باقی مانده و به عنوان یک کاتالیزور عمل می کند. این ترکیب در دامنه وسیعی از pH فعال بوده و فاقد بو و رنگ است. کاملاً محلول در آب و تا دمای ۹۵ درجه سانتی گراد فعال و در محیط‌های با سطح آلودگی پایین قابلیت پایداری و ضد عفونی کنندگی بیشتری دارد. این ماده مناسب برای کشتن انواع ویروس، باکتری، قارچ، اسپور، آلفگ و آمیب‌ها است (Elfeky *et al.*, 2020). منظور از MIC^۱، یعنی حداقل غلظت یا دوزی از یک ماده ضد عفونی کننده که بتواند مانع رشد قارچ بشود. این آزمایش روش مناسبی برای تعیین اثر بخشی یک ماده بر رشد قارچ و نیز تعیین مقاومت قارچ در برابر ماده مورد نظر است (Liu *et al.*, 2015). هدف

^۲ - Glucose Yeast extract chloramphenicol Agar

^۱ - Minimum Inhibitory Concentration

ذکر است که در این مطالعه شناسایی قارچ ساپروولگنیا در حد جنس انجام شد (Dayal, 2001) (شکل ۱ و ۲)



شکل ۱: نمای سطح و پشت کلنی خالص ساپروولگنیا

شکل ۲: نمای میکروسکوپی از نمونه خالص ساپروولگنیا

انجام آزمایشات MIC

در تعریف، MIC یعنی حداقل غلظت یا دوزی از یک ماده ضد عفونی کننده که بتواند مانع رشد قارچ شود. برای انجام کار دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰، ۹۰۰، ۱۰۰۰، ۱۲۰۰، ۱۴۰۰، ۱۶۰۰ و ۱۸۰۰ از هواسان تی آر-۵۰ به محیط کشت YGC

آگار افزوده شد. به این ترتیب که برای هر دوز ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت استریل تهیه و دوز مورد نظر به آن افزوده و محیط در پلیت (برای هر دوز سه پلیت) تقسیم گردید و از کشت خالص ساپروولگنیا به قطر ۴ میلی متر به پلیت تلقیح شد (شکل ۳) (Liu et al., 2015).



شکل ۳: مراحل تلقیح پرگنه قارچ ساپروولگنیا به تیمارهای مختلف

پلیت فاقد محلول هواسان تی آر-۵۰ به عنوان کنترل منفی و پلیت حاوی ۲ ppm مالاشیت گرین به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. پس از این مرحله

پلیت ها به مدت ۶ روز در دمای ۱۸ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شده و در روزهای ۳ و ۶ آزمایش هاله

رشد قارچ مورد بررسی و اندازه گیری قرار گرفت (Liu et al., 2015).

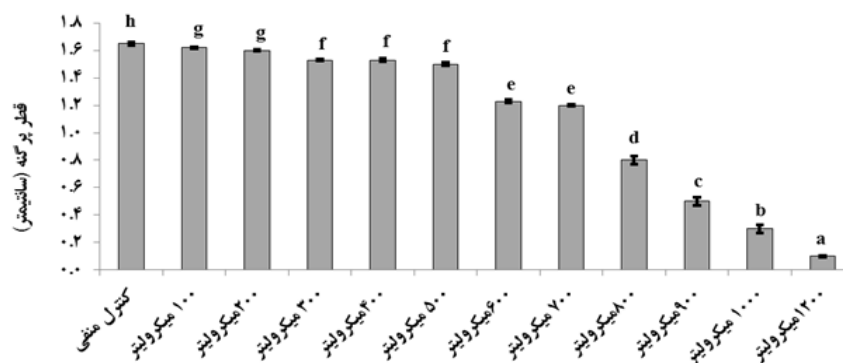
آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS۲۰ و با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) مقایسه میانگین بین تیمارهای مختلف براساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تعیین گردید ($P < 0.05$) (Zar, 2007).

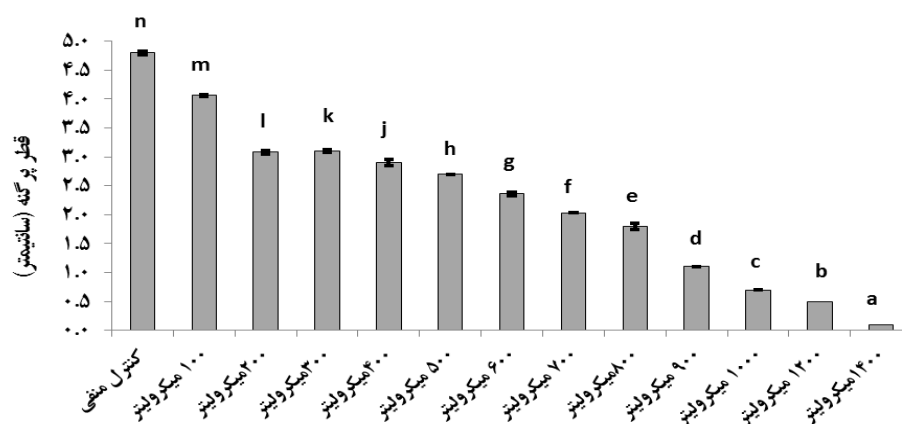
نتایج

بر اساس نتایج قطر هاله رشد در نمونه جداسازی شده از هجری ماهی قره برون در روز ۶ کشت، در دوز ppm ۱۴۰۰ و نمونه جداسازی شده از هجری ماهی قزل آلا رنگین کمان در ppm ۸۰۰ در حدود صفر بود. همچنین نتایج مقایسه میانگین قطر هاله رشد نشان داد که در روز ۳ آزمایش در نمونه های ساپروولگنیا جداسازی شده از تخم قره برون میانگین قطر هاله رشد در پلیتهای حاوی هواآسان تی آر-۵۰ در مقایسه با کنترل منفی از کاهش معنی داری برخوردار بوده ($P < 0.05$) و تنها در دوز ppm ۱۰۰ این تفاوت علی رغم کاهش عددی معنی دار نبود

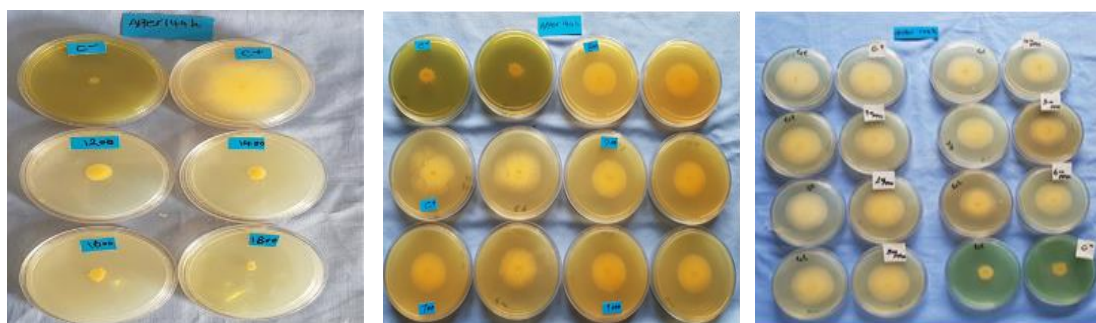
($P > 0.05$). همچنین قطر هاله رشد در این زمان در دو دوز ppm ۷۰۰ و ۶۰۰ و نیز در بین دوزهای ppm ۵۰۰، ۴۰۰ و ۳۰۰ تفاوت معنی داری نشان نداد ($P > 0.05$). نتایج مقایسه میانگین قطر هاله رشد در روز ۶ آزمایش نشان داد که کاهش قطر پرگنه تابعی از دوز مصرفی بوده و در روز ۶ آزمایش کاهش معنی داری در مقایسه با شاهد منفی و نیز در بین دوزهای مختلف وجود داشت ($P < 0.05$) (شکلهای ۴ تا ۶). نتایج مقایسه میانگین قطر هاله رشد نشان داد که در روز ۳ آزمایش در نمونه های ساپروولگنیا جداسازی شده از قزل آلا رنگین کمان میانگین قطر هاله رشد در پلیتهای حاوی هواآسان تی آر-۵۰ در مقایسه با کنترل منفی (بدون هیچ ترکیب ضد قارچ) از کاهش معنی داری برخوردار بودند و این تفاوت در بین دوزهای مختلف نیز دیده شد ($P < 0.05$). نتایج روز ۶ آزمایش نشان داد که کاهش قطر پرگنه تابعی از دوز مصرفی بوده و در این زمان کاهش معنی داری در مقایسه با شاهد منفی و نیز در بین دوزهای مختلف وجود داشت ($P < 0.05$) (شکل های ۷ تا ۹).



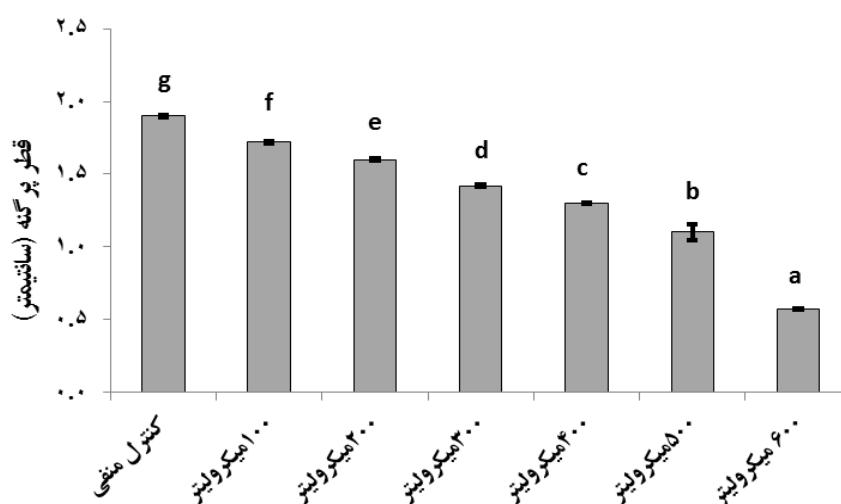
شکل ۴: مقایسه میانگین قطر هاله رشد ساپروولگنیا (از تخم ماهی قره برون) در مواجهه با محلول هواآسان تی آر-۵۰ در روز ۳ آزمایش



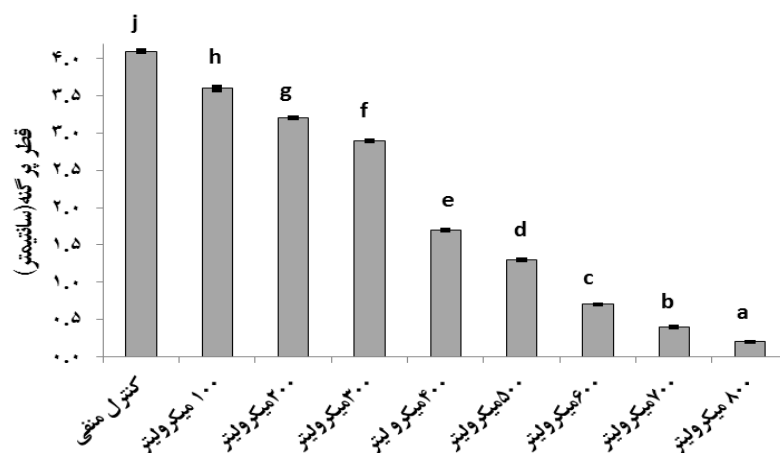
شکل ۵: مقایسه میانگین قطر هاله رشد ساپروولگنیا (از تخم ماهی قره برون) در مواجهه با محلول هوآسان تی آر-۵۰ در روز ۶ آزمایش



شکل ۶: نتایج کشت شش روزه دوزهای ۱۰۰ تا ۶۰۰ (راست)، دوزهای ۷۰۰ ppm تا ۱۰۰۰ (وسط) و دوزهای ۱۲۰۰ تا ۱۸۰۰ (چپ) نمونه قارچ ساپروولگنیا تهیه شده از هجری ماهی قره برون در مواجهه با هوآسان تی آر-۵۰



شکل ۷: مقایسه میانگین قطر هاله رشد ساپروولگنیا (از تخم ماهی قزل آلا رنگین کمان) در مواجهه با محلول هوآسان تی آر-۵۰ در روز ۶ آزمایش



شکل ۸: مقایسه میانگین قطر هاله رشد ساپروولگنیا (از تخم ماهی قزل آلائی رنگین کمان) در مواجهه با محلول هوآسان تی آر-۵۰ در روز ۶ آزمایش



شکل ۹: نتایج کشت شش روزه ۳۰۰ تا ۸۰۰ نمونه قارچ ساپروولگنیا تهیه شده از هجری ماهی قزل آلائی رنگین کمان در مواجهه با هوآسان تی آر-۵۰

بحث

(Hu et al., 2013). ساپروولگنیازیس بیماری قارچی رایج و عامل تلفات در تخم ماهیان خصوصاً در مرحله انکوباسیون است که عوامل ایجادکننده آن گونه‌های متعلق به جنس ساپروولگنیا هستند که بصورت فلور طبیعی در منابع آبی تامین کننده آب مراکز تکثیر و پرورش

امروزه در صنعت آبی‌پروری، پیشگیری و درمان بیماریهای عفونی به صورت یک اصل حیاتی درآمده است. به همین دلیل تلاش می‌شود تا مناسب‌ترین ترکیبات دارویی و ضد عفونی به این صنعت معرفی شود

ماهیان وجود دارند (Ghiasi et al., 2010; Shahbazian et al., 2010; Sarowara et al., 2013). با توجه به مکانیسم عمل و تاثیر مناسب مالا شیت گرین در کنترل قارچ زدگی هجری ها، برای مدتها این ماده به عنوان موثرترین ترکیب ضد قارچی در صنعت آبی- پروری مورد استفاده قرار گرفت، تا اینکه پس از شناخت عوارض ناشی از آن مصرف این ترکیب از سوی مراجع بهداشتی بین المللی از سال ۲۰۰۲ ممنوع اعلام گردید (Earle and Hintz, 2014). بتدریج تلاش برای معرفی ترکیبات ضد قارچی دیگر که بتوانند در این صنعت جایگزین مالا شیت گرین گردند افزایش یافت بطوریکه ۳۰ ماده شیمیایی در این خصوص مورد آزمایش و بررسی قرار گرفت (Hu et al., 2013). قدرت ضد عفونی کنندگی هواسان تی آر-۵۰ در حذف و غیرفعال کردن طیف وسیعی از عوامل میکروبی را اثبات شده و به یک ضد عفونی کننده کارآمد در پزشکی و دامپزشکی تبدیل شده است (Elfeky et al., 2020). آنچه که مسلم است انجام آزمایشات MIC برای سنجش قدرت و ارزیابی توان یک ترکیب شیمیایی در کنترل و مهار میکروارگانیسمها امری ضروری است. در واقع نتایج این آزمایشات تعیین کننده دوزی است که بواسطه آن قدرت کنترل و مهار میکروارگانیسم توسط ترکیب مورد نظر سنجیده می شود (Hu et al., 2013). براساس نتایج حاصل از این بررسی میزان MIC برای دو نمونه قارچ جداسازی شده از هجری ماهی قره برون و قزل آلاهی رنگین کمان به ترتیب ۱۴۰۰ ppm و ۸۰۰ بود. همچنین براساس نتایج آنالیز آماری مشخص شد که این ترکیب با افزایش دوز بطور معنی داری در روز ۶ آزمایش در نمونه ساپرو لگنیا جداسازی شده از تخم قره برون و نمونه جداسازی شده از تخم قزل آلاهی رنگین کمان مانع رشد

قارچ شده است. به نظرمی رسد گونه های مختلف ساپرو لگنیا مقاومت های متفاوتی در برابر ترکیبات ضد عفونی کننده از خود نشان می دهند. Rezinciuc و همکاران (۲۰۱۴) بر روی ۲۰۰۰ نمونه ساپرو لگنیا جداسازی شده از هجری ماهیان قزل آلاهی قهوه ای تحقیق کردند و با استفاده از روش مولکولی اقدام به شناسایی این نمونه ها نمودند. نتایج این بررسی نشان داد که بیشترین گونه های ساپرو لگنیا از گونه های استرالیس و فراکس بودند. در ارزیابی تاثیرات ماده ضد عفونی کننده برونوپول بر روی این نمونه ها در شرایط آزمایشگاهی مشخص شد که گونه فراکس نسبت به این ترکیب از حساسیت بیشتر و مقاومت کمتری در مقایسه با گونه استرالیس برخوردار است. به نظر می رسد که مقاومت در برابر ترکیبات ضد قارچی در اوومیس ها به موتاسیون های اختصاصی در نواحی مشخص ژنی می تواند مرتبط باشد (Blum et al., 2010; 2011). از آنجایی که شناسایی نمونه قارچ مورد استفاده در این مطالعه در حد جنس بوده است لذا وجود تفاوت در دوز بدست آمده در آزمایش MIC احتمالا می تواند ناشی از تفاوت گونه ای بین دو نمونه قارچ مورد بررسی باشد. از سوی دیگر باید توجه داشت که حساسیت زئواسپور گونه های ساپرو لگنیا در برابر ترکیبات ضد قارچی بیشتر از میسلیم قارچ است. Kitancharoen و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند که پراکسید هیدروژن با غلظت $500 \mu\text{gml}^{-1}$ به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد مانع از رشد زئواسپور و غلظت $1000 \mu\text{gml}^{-1}$ طی ۶۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد سبب توقف رشد هایف در شرایط آزمایشگاهی بر روی قارچ های ساپرو لگنیا پارازیتیکا، ساپرو لگنیا دیکلینا، ساپرو لگنیا فراکس و ساپرو لگنیا هیپوژینا می گردد. بنابراین این احتمال وجود دارد با

2000; Shahverdi *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 1996). مهمترین مکانیسم تاثیر یون نقره ایجاد اختلال در امر رونوشت برداری از DNA و ترکیب با گروه های -SH و غیر فعال نمودن آنزیم هایی است که در فعال نمودن پروتئین ها نقش دارند (Feng *et al.*, 2000). احتمالا همین مکانیسم ها سبب می شود که ترکیب شدن یون نقره ترکیبات پروتئینی غشا سلول قارچ موجب اختلال غشا سلولی شود و از سوی دیگر با اختلال در روند رونوشت برداری از DNA موجب توقف رشد میکروارگانیسم ها گردد. مطالعات نشان داده که ترکیبات نقره موجب تخریب غشا سلولی قارچ ها و ممانعت از جوانه زدن آنها می کند (Nasrollahi *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2009). لذا به نظر میرسد وجود ترکیب نقره در هواسان تی آر-۵۰ علاوه بر اینکه موجب افزایش پایداری بیشتر پراکسید هیدروژن می شود خود نیز اثرات ضد میکروبی داشته و سبب تقویت اثرات تخریبی این ماده می شود.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می دانیم از زحمات کلیه کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

منابع

1. Alderman, D.J., Clifton-Hadley, R.S., 1993. Malachite green: a pharmacokinetic study in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 16 (4), 297-311.
2. Ali, S. E., Evensen, Ø., Skaar, I., 2015. Recent advances in the mitigation of Saprolegnia infections in freshwater fish and their eggs. *The Battle Against*

افزودن هواسان تی آر-۵۰ به آب هجری که بیشتر زئواسپور در آن است بتوان با دوزی کمتر از میزان MIC بدست آمده در این بررسی از هواسان تی آر-۵۰ آلودگی در هجری را کنترل کرد. از مهمترین مواردی که در خصوص معرفی یک ترکیب دارویی یا ضد عفونی کننده مورد توجه است سهولت در استفاده است. باتوجه به اینکه ترکیب هواسان تی آر-۵۰ به آسانی در آب محلول است (Elfeky *et al.*, 2020) می توان از این ترکیب به آسانی در صنعت آبزی پروری استفاده نمود ولی از آنجایی که ترکیب پایه این ماده پراکسید هیدروژن است ضروری است مواردی که در حین استفاده از پراکسید هیدروژن مورد توجه قرار می گیرد در خصوص این ترکیب نیز اعمال شود که از جمله می توان به دما، pH و سختی آب اشاره کرد (Wagner *et al.*, 2010; Heydarnejad, 2012). پراکسید هیدروژن ترکیبی ناپایدار است و سریعاً به آب و اکسیژن تبدیل می شود (Ali *et al.*, 2015) ولی وجود نقره در ترکیب هواسان تی آر-۵۰ از یک سو به افزایش پایداری پراکسید هیدروژن کمک می نماید (Elfeky *et al.*, 2020) و از سوی دیگر خود یک ترکیب ضد عفونی کننده است. از گذشته های دور نقره و ترکیبات آن به عنوان ترکیبات ضد میکروبی موثر شناخته شده اند (Silver, 2003; Klasen, 2000) و در مقایسه با دیگر فلزات، نقره سمی بیشتری در مقابل میکروارگانیسم ها داشته ولی در از خاصیت سمی کمتری در مقابل سلول های پستانداران برخوردار بوده است (Zhao *et al.*, 1998). اثرات ضد میکروبی نقره به خوبی بر روی اشیریشیا کولی، استافیلوکوکوس ارئوس ۱ و گونه های استرپتوکوکوس اثبات شده است (Kawahara *et al.*,

- Journal of Environmental Science and Technology, 17(3), 4549-4562.
11. Espeland, S. Hansen, P., 2004. Prevention Saprolegnia on Rainbow trout eggs, Bsc thesis, nattuvisindadeildin faroe, Island
 12. Feng, Q.L., Wu, J., Chen, G.Q., Cui, F.Z., Kim, T.N., Kim, J.O., 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Journal of Biomedical Materials Resarchs, 52, 662-668.
 13. Fernandes, C., Lalitha, V.S., Rao, V.K., 1991. Enhancing effects of malachite green on the development of hepatic preneoplastic lesions induced by N - nitrosodiethylamine in rats. Carcinogenesis, 12, 839-845.
 14. Fernandez-Beneitez, M. J., Ortiz-Santaliestra, M. E., Lizana, M., and Dieguez-Urbeondo, J., 2008. *Saprolegnia diclina*: Another species responsible for the emergent disease 'Saprolegnia infections' in amphibians. FEMS Microbiology Letters, 279(1), 23-29.
 15. Ghiasi, M., Khosravi, A.R., Soltani, M., Binaii, M., Shokri, H., Tootian, Z., Rostami Bashman, M., Ebrahimzade Mousavi, H., 2010. Characterization of *Saprolegnia* isolates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) eggs based on physiological and molecular data. Journal de Mycologie Médicale, 20, 1-7.
 16. Gouranchat, C., 2000. Malachite green in fish culture (state of the art and perspectives). Bibliographic studies. Ecole Natl. Veterinaire ENVT, Nantes, France.
 17. Heydarnejad, M.S., 2012. Survival and growth of common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to different water pH levels. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 36, 245-249.
 18. Hu, X.G., Liu, L., Hu, K., Yang, X.L., Wang, G.X., 2013. In Vitro Screening of Fungicidal Chemicals for Antifungal Activity against *Saprolegnia*. Journal of the World Aquaculture Society, 44(4), 528 - 535.
 19. Hussein, M A., Hatai, K., Nomura, T., 2001. Saprolegniosis in salmonids and their Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs (A. Méndez-Vilas, Ed.), 691 - 697.
 3. Beakes, G.W., Wood, S.E., Burr. A.W., 1994. Futures which characterize *Saprolegnia* isolates from salmonid fish lesions, A review. In Salmon Saprolegniasis, Edited by G.J. Mueller. U.S. Department of Energy, Bonneville Power Administration, Portland, Oregon PP. 33-66.
 4. Blum, M., Waldner, M., Gisi, U., 2010. A single point mutation in the novel PvCesA3 gene confers resistance to the carboxylic acid amide fungicide mandipropamid in *Plasmopara viticola*. Fungal Genetics and Biology, 47, 499-510.
 5. Blum, M., Waldner, M., Olaya, G., Cohen, Y., Gisi, U., Sierotzki, H., 2011. Resistance mechanism to carboxylic acid amide (CAA) fungicides in the cucurbit downy mildew pathogen *Pseudoperonospora cubensis*. Pest Management Science, 67, 1211-1214.
 6. Clup, S.J., Belend, F.A., 1996. Malachite green: a toxicological Review. Journal of American College of Toxicology, 15 (3), 219 - 238.
 7. Dayal. R. 2001. A manual of aquatic fungi, Chawla offset printers, India, 96-110, 169-205.
 8. Dieguez - Urbeondo. J, Fregeneda - Grands, J. M., Cerenius, L., Perez - Iniesta, E., Aller - Gancedo, J. M., Telleria, M. T., Söderhäll, K., Martin, M. P., 2007. Re-evaluation of the enigametic species complex *Saprolegnia diclina* - *Saprolegnia parasitica* based on morphological, physiological and molecular data. Fungal Genetic and biology, 44(7), 585-601.
 9. Earle, G., Hintz, W., 2014. New approaches for controlling *Saprolegnia parasitica*, the causal agent of a devastating fish disease. Tropical Life Sciences Research, 25(2), 101-109.
 10. Elfeky, A., AlHarbi, M. M., Alataway, A., 2020. Application of Huwa-San TR50 as an alternative disinfectant for municipal wastewater reuse in irrigation. International

29. Phillips, A. J., Anderson, V. L., Robertson, E. J., Secombes, C. J., Van West, P., 2008. New insights into animal pathogenic oomycetes. *Trends in Microbiology*, 16, 13–19.
30. Rao, K.V.K., 1995. Inhibition of DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures by malachite green: a new liver tumor promoter. *Toxicology Letter*, 81(2–3), 107–113.
31. Rezinciuc, S., J.V. Sandoval-Sierra and J. Diéguez-Urbeondo. 2014. Molecular identification of bronopol tolerant strain of *Saprolegnia australis* causing egg and fry mortality in farmed brown trout, *Salmo trutta*, *Fungal Biology*, 118(7), 591–600.
32. Robertson, E. J., Anderson, V. L., Phillips, A. J., Secombes, C. J., Dieguez-Urbeondo, J., Van West, P., 2009. *Saprolegnia* – fish interactions. In K Lamour and S Kamoun (eds.). *Oomycete genetics and genomics, diversity, interactions and research tools*. Hoboken, NJ, USA: Wiley-Blackwell, 407–424.
33. Sarowara, M. N., Van Den Berg, A. H., Mclaggan, D., Young, M. R., Van West, P., 2013. *Saprolegnia* strains isolated from river insects and amphipods are broad spectrum pathogens. *Fungal Biology*, 117, 752–763.
34. Shahbazian, N., Ebrahimzadeh, M.H.A., Soltani, M., Khosravi, A.R., Mirzargar, S. Sharifpour, I., 2010. Fungal Contaminations in Rainbow Trout Eggs in Kermanshah province propagations with emphasis on saprolegniaceae. *Iranian Journal. Fisheries Science*, 9, 151–160.
35. Shahverdi, A.R., Fakhimi, A., Shahverdi, H.R. Minaian, S., 2007. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine*, 3, 168–171.
36. Silver, S. 2003. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 341–353.
37. Stueland, S., Hatai, K., Skaar, I., 2005. Morphological and physiological characteristics of *Saprolegnia* spp. strains eggs in Japan. *Journal of Wildlife Diseases*, 37(1), 204–207.
20. Kawahara, K., Tsuruda, K., Morishita, M., Uchida, M., 2000. Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dental Materials*, 16, 452–455.
21. Ke, X., Wang, J., Gu, Z., Li, M., Gong. X., 2009. Morphological and molecular phylogenetic analysis of two *Saprolegnia* sp. (oomycetes) isolated from silver crucian carp and zebra fish. *Mycological Research*, 113(5), 637–644.
22. Kim, K.J., Sung, W.S., Suh, B.K., Moon, S.K., Choi, J.S., Kim, J.G., Lee, D.G., 2009. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *Biometals*, 22(2), 235–242.
23. Kitancharoen, N., Hatai, K. Yamamoto, A., 1997. Aquatic fungi developing on eggs of salmonids. *Journal of Aquatic Animal Health*, 9, 314 – 316.
24. Klasen, H.J. 2000. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns*, 26, 131–138.
25. Liu, L, Shen, Y.F., Liu, G.L., Ling, F., Liu, X.Y., Hu, K., Yang, X.L., Wang, G.X., 2015. Inhibition of dioscin on *Saprolegnia* in vitro. *FEMS Microbiology Letters*, 362, fnv196.
26. Molina, F. I., Jong, S., Ma, G., 1995. Molecular characterization and identification of *Saprolegnia* by restriction analysis of genes coding for ribosomal RNA. *Antonie van Leeuwenhoek*, 68(1), 65–74.
27. Nasrollahi, A., Pourshamsian, K., Mansourkiaee, P., 2011. Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi. *International Journal of Nano Dimension*, 1(3), 233–239.
28. Petrisko, J. E., Pearl, C. A., Pilliod, D. S., Sheridan, P. P., Williams, C. F., Peterson, C. R., Bury. R. B., 2008. *Saprolegniaceae* identified on amphibian eggs throughout the Pacific Northwest, USA, by internal transcribed spacer sequences and phylogenetic analysis. *Mycologia*, 100(2), 171–181.

- 1996, Antibacterial activity of silver ions implanted in SiO₂ filler on oral streptococci. Dental Materials, 12, 227-229.
41. Zar, J.H., 2007. Biostatistical analysis. New Jersey: Prentice-Hall; p. 662.
42. Zhao, G.J., Stevens, S.E., 1998. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. Biometals, 11, 27-32.
- pathogenic to Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Journal of Fish Diseases, 28, 445-453.
38. Thoen, E., Evensen, Ø., Skaar, I., 2011. Pathogenicity of *Saprolegnia* spp. to Atlantic salmon, *Salmo salar* L., eggs. Journal of Fish Diseases, 34, 601-608.
39. Wagner, E.J., Oplinger, R.W., Arndt, R.E., Forest, A.M., Bartley, M., 2010. The safety and effectiveness of various hydrogen peroxide and iodine treatment regimens for rainbow trout egg disinfection. North American Journal of Aquaculture, 72, 34-42.
40. Yamamoto, K., Ohashi, S., Aono, M., Kokubo, T., Yamada, I., Yamauchi, J.