

## "مقاله پژوهشی"

## اثرات ضد قارچی عصاره الکلی گیاه آویشن باغی در مقایسه با مالاشیت گرین بر عوامل قارچی جداسازی شده از هچری تاس ماهی سیری (*Acipenser baerii*)

مسعود شهرانی<sup>۱</sup>، قباد آذری تاکامی<sup>۱\*</sup>، مصطفی شریف روحانی<sup>۲</sup>، عباسعلی مطلبی<sup>۴</sup>، محمد علی یزدانی ساداتی<sup>۵</sup>

۱. گروه تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. گروه تخصصی بهداشت و بیماری های آبزیان، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

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

۴. گروه بهداشت و مواد غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۵. موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۶

### چکیده

با توجه به خسارت اقتصادی ناشی از آلودگی قارچی در پرورش تاس ماهیان و خاصیت سرطان زایی از مالاشیت گرین در مصرف کننده و اثرات مضر بر محیط زیست معرفی و جایگزینی مواد طبیعی ضروری است. هدف از این تحقیق مقایسه اثر ضدقارچی عصاره آویشن باغی با مالاشیت گرین روی قارچ های جداسازی شده از تخم تاس ماهیان سیری بوده است. بدین منظور طی فصل تکثیر ۱۳۹۶ از تخم های قارچ زده ماهیان موسسه تحقیقات تاس ماهیان دکتر دادمان گیلان نمونه برداری صورت گرفت، نمونه ها در محیط کشت سابورو دکستروز آگار و گلوکز- پیتون آگار کشت داده شدند و در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۷-۵ روز گرم خانه گذاری و سپس مورد شناسایی قرار گرفتند. سپس اثر ضد قارچی عصاره الکلی آویشن باغی به روش دیسک دیفیوژن ارزیابی و حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی قارچ ها (MFC) اندازه گیری شد. در این مطالعه گونه های قارچی ساپروولگنیا (*Saprolegnia*)، فوزاریوم (*Fusarium*)، رودوتورلا (*Rhodotorula*)، پنسیلیوم (*Penicilium*)، تریکودرما (*Trichoderma*)، کریسوسپوریوم (*Chrysosporium*) و هایف استریل (*Strile hyphae*) از تخم های آلوده به قارچ جداسازی و شناسایی شد. با توجه به نتایج تحقیق، عصاره آویشن باغی تاثیر معنی داری بر عوامل قارچی جداسازی شده از تخم تاس ماهی سیری داشتند ( $P < 0.05$ )، اما بیشترین تاثیر بر قارچ ساپروولگنیا و کمترین تاثیر آن بر گونه های قارچی فوزاریوم و تریکودرما مشاهده شد. مقادیر غلظت ممانعت کنندگی رشد عصاره الکلی برای قارچ ساپروولگنیا، فوزاریوم، رودوتورلا، پنسیلیوم، تریکودرما، کریسوسپوریوم و هایف استریل به ترتیب  $\geq 0.75$ ، ۳، ۱/۵، ۱/۵،  $\leq 0.75$  و  $\leq 0.75$  میلی گرم در میلی لیتر و مقادیر حداقل غلظت کشندگی هم برای قارچ های فوق به ترتیب  $\geq 1/5$ ، ۳، ۳، ۱/۵ و ۱/۵ میلی گرم در میلی لیتر تعیین شد. با توجه نتایج، عصاره آویشن باغی می تواند جایگزین مناسبی برای مالاشیت گرین به منظور کاهش آلودگی قارچی در مرحله تکثیر تاس ماهی سیری باشد.

**کلمات کلیدی:** تاس ماهی سیری، آویشن باغی، اثرات ضد قارچی، مالاشیت گرین

## مقدمه

تاس ماهی سبیری (*Acipenser baerii*) یکی از شاخص ترین اعضای خانواده تاس ماهیان بوده که علی رغم وارداتی بودن آن، می توان به مزیت هایی همچون سازگاری راحت با شرایط پرورشی، مقاوم بودن به تغییرات محیطی، سرعت رشد بالا، پذیرش طیف وسیعی از مواد خوراکی، استعداد فراوان برای رشد در شرایط مطلوب، سن بلوغ کم و خاویاردهی سریع آن اشاره نمود (سرافراز و اکبریان، ۱۳۸۴). در سال های اخیر توسعه سریع صنعت پرورش ماهی و هم چنین بروز مشکلات ناشی از آلودگی قارچی باعث گردید که به نقش مهم قارچ ها در زندگی ماهیان توجه شود. قارچ ها در بهداشت آبزیان از اهمیت خاصی برخوردارند و به عنوان یک عامل اساسی در تعیین وضعیت بهداشتی کارگاه های تکثیر ماهیان مدنظر قرارگیرند. یکی از مهمترین عوامل زیان آور در صنعت آبی پروری بیماری های قارچی می باشند، که از لحاظ درجه اهمیت بعد از بیماری های ویروسی و باکتریایی قراردارند. این بیماری ها از مشکلات جدی دوره انکوباسیون تخم بسیاری از گونه از جمله تخم تاس ماهیان به حساب می آیند (قیاسی، ۱۳۸۷).

عفونت های قارچی ماهیان دارای پراکنش جهانی بوده و از اغلب گونه های وحشی و پرورشی جداسازی و گزارش شده اند (Alderman, 1982). در ایران نیز مطالعات متعددی در زمینه آلودگی های قارچی تخم، اندام های سطحی و داخلی ماهیان مختلف صورت گرفته است، که می توان به آلودگی قارچی تخم ماهی سفید، آلودگی قارچی لارو بچه ماهیان و اندام های سطحی تاس ماهی ایرانی، آلودگی قارچی تخم ماهی قزل آلا، رنگین کمان، آلودگی قارچی کپور ماهیان پرورشی

اشاره نمود (قیاسی، ۱۳۸۷; Hussein and Hatai, 2002; Jalilpour et al., 2006; فیروزبخش و همکاران، ۱۳۸۸; کوهپایه و همکاران، ۱۳۸۶). حضور این عوامل بیماری زا در منابع آبی و در شرایطی از قبیل تراکم، دستکاری و استرس های دوران تکثیر زمینه ساز بروز عفونت های قارچی در ماهیان و تخم آنها شده است. گونه های مختلف گیاه آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) متعلق به تیره نعناع (*Lamiaceae*) در کوهستان های ایران می روید. این گیاه در طب سنتی و در صنایع غذایی، دارویی، بهداشتی و آرایشی استفاده های متنوعی می شود. اثرات ضد قارچی این گیاه در مدل های آزمایشگاهی (اکبری، ۱۳۸۵) و حیوانی (Soković et al., 2008) به اثبات رسیده است. ترکیبات موثر ضد میکروبی در عصاره آویشن باغی حاوی فلاونوئیدهایی مانند اپی ژنین، نارینژین، لوتولین و روغن های فرار محتوی کارواکرول (*Carvacrol*) و تیمول (*Thymol*) می باشد (Soković et al., 2008).

در ایران نیز تحقیقات دیگری در خصوص بررسی تاثیر برخی از گیاهان دارویی به عنوان جایگزین مالا شیت گرین و فرمالین در کنترل و نابودی عوامل قارچی آلوده کننده تخم های ماهیان در مرحله انکوباسیون صورت پذیرفته است، که در این خصوص می توان به تحقیقات انجام شده توسط عادل و همکاران (۱۳۹۳)، کیخا و همکاران (۱۳۹۴) و شفیع و همکاران (۱۳۹۵) در ارتباط با معرفی جایگزین مالا شیت گرین در مزارع سردآبی اشاره نمود.

یکی از مهمترین عوامل تلفات تخم در هجری ماهیان خاویاری و استخوانی آلودگی تخم به قارچ ها به ویژه ساپروولگنیا است که در صنعت آبی پروری کشور ضررهای اقتصادی زیادی را به دنبال داشته است.

پس از نمونه برداری لوله های حاوی تخم های قارچ زده به آزمایشگاه منتقل و در پتری دیش های استریل تخلیه گردید، سپس تخم های قارچ زده سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد و قسمتی از کلونی قارچ به همراه تخم بر روی محیط کشت سابورود کستروز آگار (SDA) و محیط کشت اختصاصی قارچ ساپروولگنیا (گلوکز- پیتون آگار) منتقل گردید. به منظور جلوگیری از رشد عوامل باکتریایی در محیط های کشت فوق از دو آنتی بیوتیک پنی سیلین جی و استرپتومایسین به میزان ۲۵۰ میلی گرم در لیتر استفاده شد. پس از آن محیط های کشت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵-۷ روز گرم خانه گذاری شدند و روزانه الگوی رشد قارچ ها بررسی شد (شریف روحانی، ۱۳۸۳).

پس از کامل شدن رشد پرگنه ها جهت بررسی میکروسکوپی، قسمتی از پرگنه های رشد یافته بر روی لام حاوی لاکتوفنل-کاتن بلو قرار داده شد و در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ نمای های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. شناسایی قارچ ها با استفاده از کلید شناسایی و براساس منابع موجود (Beakes *et al.*, 1994; Khulbe, 2001) صورت گرفت.

برگ گیاه خشک شده آویشن باغی را پودر کرده، سپس ۱۵۰ گرم از پودر حاصل برای عصاره گیری استفاده شد. هر ۵۰ گرم پودر آویشن باغی با ۴۰۰ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد مخلوط شده و این مخلوط به مدت ۱۲ ساعت بر روی شیکر با دور ۱۰۰rpm در دمای محیط خیسانده شد. بعد از گذشت این زمان، مخلوط حاصل توسط پمپ خلا صاف شد. سپس محلول زیر صافی را در روتاری تحت خلاء در دمای ۴۳ درجه سانتی گراد تغلیظ شده و محلول تغلیظ شده در پلیت های شیشه ای ریخته شد تا حلال اتانول بطور کامل تبخیر

بسیاری از گونه های ساپروولگنیا به عنوان عوامل مهاجم ثانویه فرصت طلب مطرح بوده اند که به دنبال بروز شرایط استرس زا و شرایط نامطلوب محیطی از قبیل کیفیت پایین آب، جابه جایی و تعویض ضعیف و دیر هنگام آب، اکسیژن محلول پایین و آمونیاک زیاد، زیاد بودن میزان مواد آلی، تراکم بالا، تغییرات دما و بلوغ جنسی یا تخم ریزی موجب بروز تلفات در ماهی ها و تخم آنها می گردند (قیاسی، ۱۳۸۷). بنابراین شناسایی فلور قارچی تخم ماهیان خاویاری از نظر عوامل بیماریزای احتمالی و بروز تلفات در تخم آنها از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد.

هدف از این بررسی شناسایی عوامل قارچی مسئول بروز تلفات تخم در هجری تاس ماهی سیبری و نیز مقایسه اثر ضد قارچی عصاره الکلی آویشن باغی با مالاشیت گرین روی قارچ های جد سازی شده از تخم تاس ماهیان سیبری بوده می باشد.

## مواد و روش ها

این تحقیق که در فصل بهار ۱۳۹۶ در موسسه تحقیقات بین المللی تاس ماهیان دریای خزر واقع در سد سنگر استان گیلان انجام گرفت. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. ۲/۵ کیلوگرم تخم تاس ماهی سیبری انتخاب گردید و پس از لقاح با اسپرم ها به تعداد ۱۵ انکوباتور کالیفرنایی منقل گردید. با شروع فصل تکثیر تاس ماهی سیبری طی سه مرحله (ابتدا، وسط و انتهای مرحله انکوباسیون) و در هر مرحله تعداد ۵۰ عدد تخم قارچ زده با پنس استریل بصورت تصادفی از انکوباتورها برداشته شد و به لوله های در پیچ دار محتوی آب مقطر استریل منتقل گردید.

قارچ از مرکز پتری دیش پلیت اندازه گیری و تغییرات مشاهده و قطر هاله عدم رشد با خط کش استاندارد اندازه گیری و ثبت شد.

حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد عصاره ها با استفاده از روش رقت سنجی تعیین گردید. بدین صورت که رقت های متوالی از عصاره الکلی آویشن باغی (صفر به عنوان شاهد، ۲، ۴، ۸، ۱۶ و ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر) در محیط مایع سابورو دکستروز براث افزوده شده و به آن ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون قارچی  $10^6 \times 1$  CFU/ml تلقیح شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. پس از طی این زمان لوله ها از نظر کدورت ناشی از رشد قارچی با لوله شاهد مقایسه گردید و کمترین غلظت آویشن باغی که مانع رشد قارچ شده و کدورتی در لوله مشاهده نشده بود، به عنوان MIC در نظر گرفته شد (Hellio et al., 2000). همچنین برای تعیین MFC، رقت های MIC و بالاتر از آن به میزان ۱۰ میکرولیتر با سمپلر برداشته شده و بر روی محیط کشت SDA به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد و کمترین غلظتی از عصاره که رشد قارچ را به طور کامل مهار کرد و در آن کدورتی مشاهده نشد (شفاف بود) به عنوان MFC در نظر گرفته شد (Hellio et al., 2000; شریف روحانی، ۱۳۸۴).

پس از شمارش و ثبت تخم های قارچ زده نسبت به تجزیه و تحلیل آماری داده ها اقدام گردید. تجزیه و تحلیل داده های مربوط به نتایج تحقیق با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۰، از طریق آنالیز واریانس یک طرفه و برای مقایسه بین میانگین ها آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت ( $P \leq 0.05$ ).

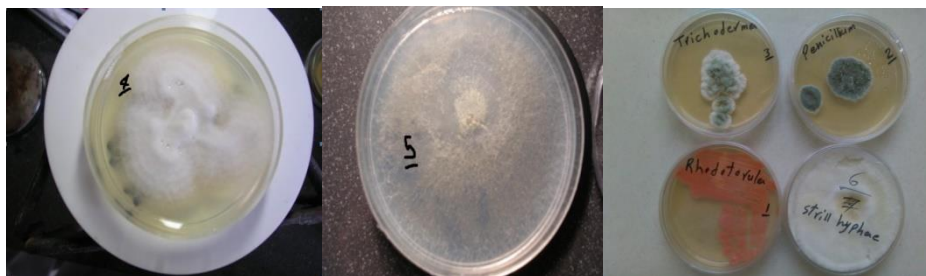
شود (Salaby and Razin, 1992) و عصاره حاصل تا زمان مصرف در یخچال (۴ درجه سانتی گراد) نگهداری شد. مالاشیت گرین مورد استفاده در این مطالعه نیز از شرکت مرک آلمان از مراکز معتبر تهیه گردید. به منظور بررسی تاثیر اثر ضد قارچی عصاره الکلی آویشن باغی و مالاشیت گرین در ابتدا سوسپانسیون قارچی از هر کدام کشت های خالص عوامل قارچی جداسازی شده از تخم های قارچ زده تاس ماهی سبیری تهیه گردید. سوسپانسیون های قارچی تهیه شده دارای کدورت ۰/۵ مک فارلند بوده و دارای تعداد  $10^6 \times 1$  سلول قارچی در هر میلی لیتر بودند.

پس از تهیه سوسپانسیون های قارچی مطابق با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند، یک سواب استریل را آغشته به سوسپانسیون قارچی تهیه شده کرده و در سطح محیط کشت سابورو دکستروز آگار که قبلاً به دمای اتاق رسیده به طور یکنواخت تلقیح شد. سپس پلیت ها مدت ۳ تا ۵ دقیقه در محل مناسبی قرار داده تا مایع اضافی آن جذب شده و به درون آگار نفوذ کند. دیسک های مورد استفاده در این مطالعه عاری از هرگونه ماده دارویی بوده و با مقادیر ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۵۰ ppm از عصاره آویشن باغی آغشته شدند. دیسک مالاشیت گرین (۱ ppm) نیز به صورت جداگانه تهیه شد. در این مطالعه از دیسک آغشته به آب مقطر به عنوان شاهد منفی استفاده شد. در مرحله بعد دیسک های تهیه شده با غلظت مشخص در کنار شعله توسط پنس استریل در سطح پلیت که در مرکز آن سوسپانسیون های قارچی مشخص، قرار داده شده بودند، قرار داده شد. سپس محیط کشت های مربوطه به مدت ۹۶ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شدند. به فاصله زمانی ۲۴ ساعته میزان رشد

## نتایج

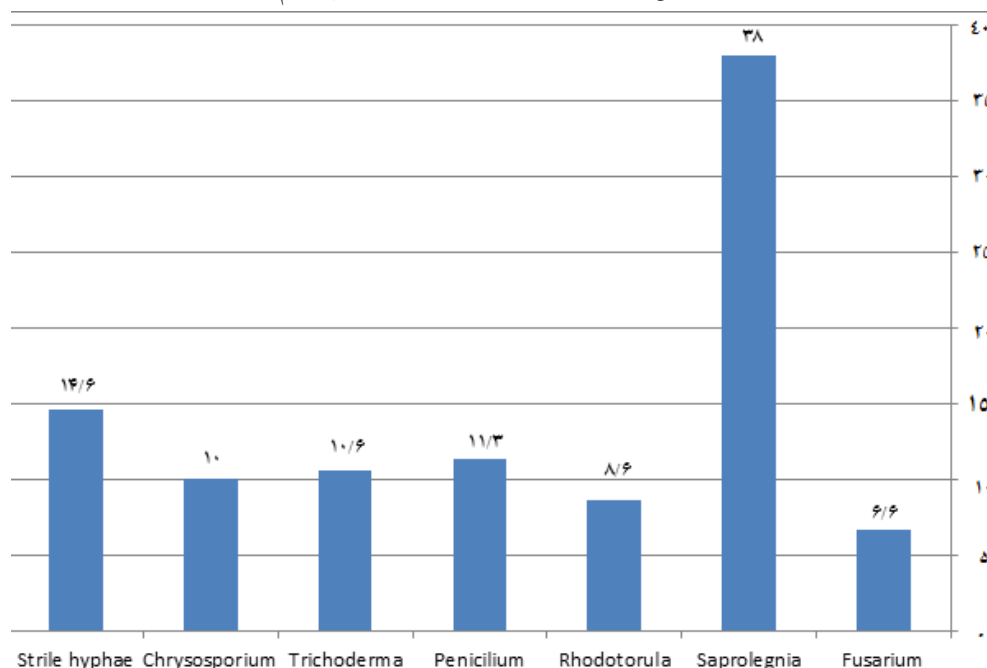
در این مطالعه گونه‌های قارچی ساپروولگنیا (*Saprolegnia*)، فوزاریوم (*Fusarium*)، رودوتورلا (*Rhodotorula*)، پنسیلیوم (*Penicilium*)، تریکودرما (*Trichoderma*)، کریسوسپوریوم (*Chrysosporium*) و هایف استریل (*Strile hyphae*) از نمونه تخم‌های لقاح یافته تاس ماهی سیری با استفاده از کلید شناسایی و بر اساس منابع موجود (Beakes et al., 1994)؛

(Khulbe, 2001) صورت گرفت (شکل ۱). نتایج حاصل از بررسی درصد فراوانی تخم‌های قارچ زده لقاح یافته تاس ماهی سیری در شکل ۲ نشان داده شده است. همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود بیشترین و کمترین درصد فراوانی، به ترتیب مربوط به گونه ساپروولگنیا و فوزاریوم بوده است.



شکل ۱: قارچ‌های جداسازی شده

۱. رودوتورلا (*Rhodotorula*) ۲. پنسیلیوم (*Penicilium*) ۳. تریکودرما (*Trichoderma*) ۴. فوزاریوم (*Fusarium*) ۵. ساپروولگنیا (*Saprolegnia*) ۶. هایف استریل (*Strile hyphae*) ۷. کریسوسپوریوم (*Chrysosporium*)



شکل ۲: درصد فراوانی قارچ‌های جداسازی شده

نتایج حاصل از ارزیابی درصد تخم‌های قارچ زده در هر تیمار جهت بررسی اثر نوع تیمار بر درصد تخم‌های قارچ در جدول ۱ ارائه شده است. با توجه به نتایج حاصل شده، در کلیه گونه‌های قارچی مورد بررسی، نوع تیمار اثر معنی‌داری بر تعداد قارچ‌های موجود در تخم‌های لقاح یافته تاس‌ماهی سبیری داشته است ( $P < 0/05$ ). نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده آن است که غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۱۲۵۰ ppm آویشن باغی اثرات مشابه مالاشیت گرین در کنترل گونه‌های قارچی مورد

مطالعه داشته است و تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشته است ( $P \geq 0/05$ ). از سوی دیگر تفاوت معنی‌داری بین تیمار ۵۰۰ و ۷۵۰ ppm آویشن باغی با تیمار شاهد در اکثر گونه‌های قارچی مورد مطالعه مشاهده نشده است ( $P \geq 0/05$ ). بیشترین تاثیر نوع تیمار بر قارچ ساپروولگنیا و کمترین تاثیر آن بر گونه‌های قارچی فوزاریوم و تریکودرما بود.

جدول ۱: میانگین تعداد قارچ تخم‌های لقاح یافته تاس‌ماهی سبیری در هر تیمار

قارچ	تیمار					شاهد
	۵۰۰ ppm	۷۵۰ ppm	۱۰۰۰ ppm	۱۲۵۰ ppm	۱ ppm	
	آویشن باغی	آویشن باغی	آویشن باغی	آویشن باغی	مالاشیت گرین	
رودوتورلا	۱/۳۳۳±۰/۵۷۷ <sup>a</sup>	۱/۰۰±۰/۵۷۷ <sup>ab</sup>	۰/۰۰±۰/۰۰ <sup>b</sup>	۰/۰۰±۰/۰۰ <sup>b</sup>	۰/۰۰±۰/۰۰ <sup>b</sup>	۲/۰۰±۱/۰۰ <sup>a</sup>
پنسیلیوم	۱/۶۶۶±۱/۱۵۴ <sup>ab</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>b</sup>	۰/۰۰±۰/۰۰ <sup>c</sup>	۰/۰۰±۰/۰۰ <sup>c</sup>	۰/۰۰±۰/۰۰ <sup>c</sup>	۳/۰۰±۱/۰۰ <sup>a</sup>
تریکودرما	۱/۳۳۳±۰/۵۷۷ <sup>ab</sup>	۱/۰۰±۰/۰۰ <sup>ab</sup>	۰/۶۶۷±۰/۵۷۷ <sup>b</sup>	۰/۳۳۳±۰/۱۵۷ <sup>c</sup>	۰/۳۳۳±۰/۱۵۷ <sup>c</sup>	۱/۶۶۶±۰/۵۷۷ <sup>a</sup>
ساپروولگنیا	۳/۳۳۳±۱/۵۲۷ <sup>b</sup>	۲/۳۳±۲/۳۰۹ <sup>bc</sup>	۰/۰۰±۰/۰۰ <sup>d</sup>	۰/۰۰±۰/۰۰ <sup>d</sup>	۰/۶۶۷±۰/۵۷۷ <sup>c</sup>	۱۲/۶۶±۳/۵۱۱ <sup>a</sup>
کریسوسپوریوم	۱/۰۰±۰/۵۷۷ <sup>b</sup>	۰/۶۶۶±۰/۵۷۷ <sup>b</sup>	۰/۰۰±۰/۰۰ <sup>c</sup>	۰/۰۰±۰/۰۰ <sup>c</sup>	۰/۰۰±۰/۰۰ <sup>c</sup>	۳/۳۳۳±۱/۵۲۷ <sup>a</sup>
فوزاریوم	۱/۰۰±۰/۵۷۷ <sup>ab</sup>	۰/۶۶۶±۰/۵۷۷ <sup>ab</sup>	۰/۰۰±۰/۰۰ <sup>b</sup>	۰/۰۰±۰/۰۰ <sup>b</sup>	۰/۰۰±۰/۰۰ <sup>b</sup>	۱/۶۶۶±۰/۵۷۷ <sup>a</sup>
استریل هائینه	۱/۰۰±۰/۵۷۷ <sup>b</sup>	۱/۰۰±۱/۰۰ <sup>b</sup>	۰/۶۶۶±۰/۵۷۷ <sup>b</sup>	۰/۳۳۳±۰/۱۵۷ <sup>c</sup>	۰/۳۳۳±۰/۱۵۷ <sup>c</sup>	۴/۰۰±۱/۷۳۲ <sup>a</sup>

\* حروف غیر مشابه کوچک در هر نوع قارچ، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است.

مقایسه میانگین تعداد هر یک از قارچ‌ها در تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون تکمیلی دانکن

صورت پذیرفت. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد دهد که کارایی بالاتر غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۱۲۵۰ ppm

آویشن باغی و مالا شیت گرین در مقایسه با تیمار ۵۰۰ و ۷۵۰ ppm آویشن باغی با تیمار شاهد بوده است ( $P < 0.05$ ).

### نتایج MIC و MFC

نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) عصاره الکلی آویشن باغی بر روی گونه‌های قارچی جداسازی شده از تخم تاس ماهی سبیری در

جدول ۲ نشان داده شده است. مقادیر غلظت ممانعت کنندگی رشد عصاره الکلی برای قارچ ساپروولگنیا، فوزاریوم، رودوتورلا، پنسیلیوم، تریکودرما، کریسوسپوریوم و استریل هایفه به ترتیب  $\geq 0.75$ ، ۳،  $1/5$ ،  $1/5$ ،  $1/5$ ،  $1/5$  و  $\leq 0.75$  میلی گرم در میلی لیتر و مقادیر حداقل غلظت کشندگی هم برای قارچ‌های فوق به ترتیب  $\geq 1/5$ ،  $\geq 3$ ، ۳، ۳،  $1/5$  و  $1/5$  میلی گرم در میلی لیتر تعیین شد.

جدول ۲: MIC و MFC عصاره الکلی آویشن باغی بر روی گونه‌های قارچی جداسازی شده از تخم تاس ماهی سبیری

نوع قارچ مورد مطالعه	MIC (میلی گرم/میلی لیتر)	MFC (میلی گرم/میلی لیتر)
رودوتورلا	$1/5$	۳
پنسیلیوم	$1/5$	۳
تریکودرما	$\leq 0.75$	$1/5$
ساپروولگنیا	$\geq 0.75$	$\geq 1/5$
کریسوسپوریوم	$1/5$	۳
فوزاریوم	۳	$\geq 3$
استریل هایفه	$\leq 0.75$	$1/5$

فراوانی مربوط به جنس فوزاریوم بوده است. این موضوع بیانگر این حقیقت است که قارچ ساپروولگنیا در آلودگی قارچی تخم تاس ماهیان سبیری از اهمیت زیادی برخوردار بوده و علی رغم شرایط متغیر محیطی و مدیریتی مزارع، دارای دامنه آلودگی وسیعی نسبت به سایر اعضای این گونه است.

قیاسی (۱۳۸۷) موفق به شناسایی قارچ ساپروولگنیا پارازیتیکا از تخمهای آلوده ماهیان خاویاری و سفید در هجری‌های استان مازندران با روش‌های مورفولوژیک و مولکولی شد. همچنین این قارچ توسط Cze Czuga و همکاران (۱۹۹۵) از تخم چند گونه ماهی خاویاری جداسازی و شناسایی شد. نتایج مطالعه فعلی و مطالعات

### بحث

آلودگی‌های قارچی از جمله عوامل بروز خسارت در صنعت آبزی پروری کشور و به عنوان یک شاخص تعیین کننده وضعیت بهداشتی مزارع پرورشی محسوب می‌شوند. از جمله عوامل موثر در بروز تلفات در سیستم هجری ماهیان خاویاری و دیگر ماهیان استخوانی، آلودگی تخم‌های لقاح یافته به قارچ‌ها به خصوص ساپروولگنیا است که ضررهای زیادی را متوجه صنعت آبزی پروری می‌کند (Shahbazian et al., 2010).

نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین درصد فراوانی مربوط به قارچ ساپروولگنیا و کمترین درصد

قبل نشان دهنده آن است که جنس ساپرولیگنیا گونه قارچی بیماریزای غالب در تخم ماهیان خاویاری در سیستم هجری و عامل اصلی بروز تلفات در تخم این ماهیان محسوب می شود. با توجه به نقش مهم عوامل استرس زا در بروز ساپرولیگنیا زیس، کاهش شرایط استرس زا از طریق بهبود شرایط محیطی و مدیریتی از قبیل کیفیت مناسب آب و تعویض به موقع آن، کاهش بار مواد آلی، اجتناب از تراکم بیش از حد ماهی و دستکاری های بی مورد و استفاده از ضد عفونی کننده های مناسب در هجری ها می تواند در کنترل و کاهش تلفات و ضررهای اقتصادی ناشی از این بیماری مفید واقع شود (قیاسی، ۱۳۸۷).

نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده آن است که غلظت های ۱۰۰۰ و ۱۲۵۰ ppm آویشن باغی اثرات مشابه مالاشیت گرین در کنترل گونه های قارچی مورد مطالعه داشته است و تفاوت معناداری با مالاشیت گرین نداشته است ( $P \geq 0.05$ ). با توجه به این نکته می توان گفت با توجه به فراوانی بالای قارچ ساپرولیگنیا در تخم تاس ماهیان سیبری عصاره آویشن باغی می تواند جایگزین خوبی برای کاهش فراوانی ساپرولیگنیا و خسارات قابل توجه ناشی از آن باشد. از جمله ترکیبات اصلی گیاه آویشن باغی تیمول و کارواکول هستند که می توان خاصیت ضد قارچی این گیاه را به آن نسبت داد. کارواکول ایزوتیمولی است که با مهار فعالیت آنزیم *ATPase* موجب افزایش نفوذ پذیری غیراختصاصی غشای سلولی میکروارگانیسم ها و در نتیجه آن افزایش حساسیت آنها نسبت به گیاهان ترکیبات ضد میکروبی می شود (Najib Zade et al., 2009).

براساس مطالعه Sharifian و همکاران (۲۰۰۹) خاصیت ضد قارچی کارواکول در سایر گیاهان مانند مورت و مرزه خوزستانی به اثبات رسیده است. پذیرا (۱۳۹۶) به بررسی فعالیت ضد قارچی آویشن باغی بر روی قارچ های آسپرژیلوس نیجر، آسپرژیلوس فلاوس، آسپرژیلوس فومگاتوس، آسپرژیلوس نایجر و ساپرولیگنیا پارازیتیکا جداسازی شده از پوست ماهی کوی پرداخت. بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین اثر مهار کنندگی اسانس آویشن باغی بر روی آسپرژیلوس فلاوس و کم ترین اثر مهار کنندگی آن بر روی ساپرولیگنیا پارازیتیکا مشاهده شد. Mousavi و Raftos در سال ۲۰۱۲، اثرات ضد قارچی و سمیت اسانس روغنی ترکیبی از گیاهان آویشن باغی (*Thmus vulgaris*)، مریم گلی (*Salvia officinali*)، اکالیپتوس نیلی (*Eucalyptus globules*) و نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) در ماهی قزل آلا رنگین کمان در مقایسه با مالاشیت گرین مورد بررسی قرار دادند، که نتایج نشان داد ترکیب چهار اسانس گیاه ذکر شده می تواند به عنوان یک ترکیب ضد قارچی در هجری ها و مراکز تکثیر ماهیان سرد آبی مورد استفاده قرار گیرد. Ceneto و همکاران در سال ۲۰۱۰، اثر ضد قارچی عصاره گیاهان رزماری و آویشن باغی را بر قارچ های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس اونکرانستوس بررسی کردند که نتایج آن نشان داد هر دو عصاره در غلظت های پایین می تواند اثر ضد قارچی قابل توجهی بر این دو گونه داشته باشند که همسو با مطالعه حاضر است.

مطابق با نتایج تحقیق حاضر، کلیه گونه های قارچی مورد بررسی تحت تاثیر اثرات بازماندگی عصاره الکلی آویشن باغی قرار گرفتند که این مسئله بیانگر



که اسانس این گیاه فعالین ضد قارچی مشابهی با آمفوتریسین B دارد و برای درمان بیماری های قارچی نیز می توان از آن استفاده کرد.

علت تفاوت در مقادیر MIC و MFC در مطالعات مختلف را می توان به تفاوت در میکروارگانیزم ها، تفاوت در ترکیبات موجود در عصاره ها، تفاوت در نوع غلظت های مورد استفاده از هر عصاره، تفاوت در نوع محیط کشت و ویسکوزیته عصاره و عوامل محیطی دانست (عادل و همکاران، ۱۳۹۳).

با توجه به سوابق استفاده از گیاهان دارویی در مزارع پرورش ماهی جهت کنترل و پیگیری از بیماری های قارچی در دوره انکوباسیون که یکی از مهمترین عوامل زیان دهنده در صنعت تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری است و اثرات قوی عصاره الکلی آویشن باغی با غلظت ۱۰۰۰ ppm به بالاتر جایگزینی آن با مالاشیت گرین به منظور کاهش عوارض ناشی از مصرف آن در صنعت آبرزی پروری و مصارف انسانی در اولویت کار قرار گیرد. لذا توصیه می شود در مطالعات آتی، ترکیبات موجود در عصاره آویشن باغی خالص سازی شده و ترکیبات موثر ضد قارچی مورد بررسی قرار بگیرد تا زمینه برای کاربرد دارویی آن علیه قارچ های بیماریزا به ویژه ساپروولگنیا در سیستم هجری فراهم شود. از طرفی با توجه به ارزیابی اقتصادی تحقیق حاضر و تهیه و عصاره گیری گیاه آویشن باغی و شرایط داشت و برداشت آسان این گیاه و مقایسه آن با مالاشیت گرین می توان چنین نتیجه گیری کرد که جایگزینی عصاره آویشن باغی در مقایسه با مالاشیت گرین از نظر اقتصادی به صرفه می باشد.

طیف گستره اثر ضد قارچی عصاره الکلی آویشن باغی است. مقادیر غلظت ممانعت کنندگی رشد عصاره ی الکلی برای قارچ ساپروولگنیا، فوزاریوم، رودوتورلا، پنسیلیوم، تریکودرما، کریسوسپوریوم و استریل هایفه به ترتیب  $0.75 \leq$ ، ۳،  $1/5$ ،  $0.75 \leq$ ،  $1/5$  و  $0.75 \leq$  میلی گرم در میلی لیتر و مقادیر حداقل غلظت کشندگی هم برای قارچ های فوق به ترتیب  $1/5 \leq$ ، ۳، ۳، ۳،  $1/5$  و ۳ میلی گرم در میلی لیتر تعیین شد. Vidua-materus و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که اسانس آویشن باعث کاهش رشد میسلیم آسپرژیلوس در مقادیر ۲ تا ۸ میلی لیتر می شود. Moghtader در سال ۲۰۱۲، مقایسه اثر ضد قارچی اسانس آویشن باغی با تیمول مصنوعی در قارچ آسپرژیلوس نیجیر بررسی کردند که نتایج آن نشان داد که اسانس روغنی گیاه آویشن باغی در رقت های ۱،  $1/2$  و  $1/4$  فعالیت ضد قارچی قوی تر از استرپتومایسین سولفات (۷۲ درصد) و آنتی بیوتیک جنتامایسین ۸ میلی گرم در میلی لیتر داشت که در مقایسه با تیمول سنتتیک در رقت ۱۰ درصد قوی تر بود. اکبری (۱۳۸۵) اثرات ضد قارچی گیاه آویشن و مرزنجوش علیه ایزوله های بالینی کاندیدا آلبیکنس مقاوم و حساس به فلوکونازول را مورد بررسی قرار داد که نتایج این تحقیق نشان داد که اسانس و عصاره هر دو گیاه قادر به مهار رشد این ایزوله ها بوده، که از بین این عصاره ها، آویشن بیشترین اثر ضد قارچی را (۱۲۵-۰/۴۹ میلی گرم در میلی لیتر) داشت و پس از آن به ترتیب اسانس مرزنجوش و عصاره آبی آویشن و مرزنجوش در رده های بعدی قرار داشتند. Giordani در سال ۲۰۰۴، در مطالعه فعالیت ضد قارچی آمفوتریسین B با اسانس آویشن باغی در قارچ کاندیدا آلبیکنس مشاهده کردند

## سپاسگزاری

نویسندگان مقاله کمال تقدیر و تشکر خود را از موسسه تحقیقات بین المللی تاس ماهیان دریای خزر و جناب آقای دکتر مهدی معصومزاده رئیس محترم بخش بهداشت و بیماریهای آن موسسه دارند.

## منابع

۱. اکبری، پ.، ۱۳۸۵. بررسی اثرات ضد قارچی عصاره‌های گیاهی آویشن و مرزنجوش علیه ایزوله‌های بالینی کاندیدا البیکنس مقاوم و حساس به فلوکونازول. فصلنامه گیاهان دارویی، ۳(۱)، ۶۲-۵۳.
۲. پذیرا، ع.، ۱۳۹۶. فعالیت ضد قارچی اسانس آویشن باغی بر روی قارچ‌های آسپرژیلوس نیجر، آسپرژیلوس لاوس، آسپرژیلوس فومگاتوس، آسپرژیلوس نایجر و ساپروولگنیا پارازیتیکا جداسازی شده از پوست ماهی کوی (*Cyprinus carpio Koi*). نشریه توسعه آبی پروری، ۱۱(۲)، ۲۲-۱۳.
۳. سرفراز، ژ.، اکبریان، م.ع.، ۱۳۸۴. بر بیولوژی ماهیان خاویاری دریای خزر. انتشارات نقش مهر، ۱۱۰ صفحه.
۴. شریف روحانی، م.، ۱۳۸۳. بررسی کاربرد برخی اسانس‌های گیاهی در کنترل آلودگی‌های قارچی تخم قزل‌آلای رنگین‌کمان به عنوان جایگزین احتمالی مالاشیت گرین در شرایط کارگاهی. پایان نامه دکترای تخصصی بهداشت و بیماری‌های آبزیان، ۱۹۳ صفحه.
۵. شفیعی، ف.، داودی، ر.، باقری، د.، جمالی، ف.، نوریزدان، ح.، ۱۳۹۵. بررسی عملکرد عصاره سیر بر قارچ ساپروولگنیای جداسازی شده از تخم ماهی قزل-آلای رنگین‌کمان در مقایسه با مالاشیت گرین و برونوپول. نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی، ۴(۳)، ۹۳-۱۰۵.
۶. کیخا، س.، قزایی، ا.، میردار هریجانی، ج.، غفاری، م.، راهداری، ع.، ۱۳۹۴. بررسی اثر ضدقارچی عصاره متانولی میوه سماق طی دوره انکوباسیون تخم ماهی سفیدک سیستان. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۷۰(۲)، ۱۳۷-۱۳۱.
۷. فیروزبخش، ف.، کاظمی، ر.، کاظمی، م.، خسروی، ع.، جلیل‌پور، ج.، ابراهیم‌زاده موسوی، ح.، ۱۳۸۸. بررسی قارچ‌های سطحی تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) پرورشی و صید شده از دریای خزر. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۸(۳)، ۲۹۵-۲۹۱.
۸. قیاسی، م.، ۱۳۸۷. تعیین الگوی مولکولی و پروتئینی قارچ‌های آبی (ساپروولگنیا) جدا شده از تخم‌های آلوده ماهیان خاویاری و استخوانی مراکز تکثیر و پرورش استان مازندران. پایان نامه دکترای تخصصی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۶۲ صفحه.
۹. عادل، م.، صفری، ر.، نعمت‌الهی، ا.، قیاسی، م.، نافیان دهکردی، ا.، ۱۳۹۳. ارزیابی فعالیت ضدقارچی اسانس‌های زولنگ، زیره سبز، انارجه و سیر روی فوزاریوم سولانی جداسازی شده از ماهیان اکواریومی زینتی. نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی، ۲(۴)، ۳۲-۲۳.
۱۰. کوهپایه، ع.، رئیسی، م.، حسینی فرد، م.، ۱۳۸۶. شناسایی برخی گونه‌های قارچی جدا شده از تخم ماهیان قزل‌آلا در استان چهارمحال و بختیاری. مجموعه خلاصه مقالات پنجمین گردهمایی دامپزشکان علوم بالینی ایران، صفحه ۳۰.
11. Alderman, D.J., 1982. Fungal disease of aquatic animal. In: microbial disease of fish. 5nd Edition, Academic press, London, UK, pp. 242.
12. Beakes, G.W., Wood, S.E., Burr, A.W., 1994. Features which characterize Saprolegnia isolates from salmonid fish lesions. A review. In: Salmon Saprolegniasis. Report to Bonneville Power Administration, Portland, pp. 33-66.
13. Centeno, S., Calvo, M.A., Adelantado, C., Figueroa, S., 2010. Antifungal activity of

- Agronomy and Crop Science, 168, 243-248
23. Najib Zade, T., Yadegari, M.H., Naghdi Badi, H., 2009. Evaluation antifungal effects of essential oils 24. *Satureja khuzestanica* and *Myrtus communis*. Presented for the M.Sc, Tarbiat Modares University Tehran, pp. 98.
24. Soković, M., Glamoclija, J., Cirić, A., Kataranovski, D., Marin, P.D., Vukojević, J., Brkić, D., 2008. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* L. and thymol on experimentally induced dermatomycoses. Drug Development and Industrial Pharmacy, 34(12), 1388-1393.
25. 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.
26. Sharifian, M., Bolhari, B., Nosrat, A., Aligholi, M., 2009. The effect of carvacrol on *Enterococcus faecalis* as an intracanal medicament-Invitro study. Balkan Journal of Dental Medicine, 1(22), 35-40.
27. Viuda-Martos, M., Ruíz-Navajas, Y., Fernández-López, J. and Pérez Álvarez, J., 2007. Chemical composition of the essential oils obtained from some spices widely used in mediterranean region, Acta Chimica Slovenica, Vol.54, pp. 921-926.
- extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* against *Aspergillus flavus* and *A. ochraceus*. Pakistan Journal of Biological Sciences, 13(9), 452-455.
14. Czezuga, B., Muszynsko, E., Wussoghi, G., Kamaly A., Kiziewicz, B., 1995. Aquatic faungi growing on the eggs of several species *Acipenser* fishes. Acta Ichthyologica Et Piscatoria, 15(2), 71-79.
15. Hussein, M.M., Hatai, K., 2002. Pathogenesis of saprolegnia species associated with outbreaks of salmonid saprolegniosis in Japan. Fishery Sciences, 68, 1067-1072.
16. Giordani R, Regli P, Kaloustian J, Mikail C, Abou L, Portugal H., 2004. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. Phytotherapy Research, 18(12), 990-995.
17. Hellio, C., Bremer, G., Pons, A.M., Le Gal, Y., and Bourgougnon, N., 2000. Inhibition of the development of microorganisms) by extracts of marine algae from Brittany (France). Applied Microbiology and Biotechnology, 54, 543-549.
18. Jalilpour, J., Shenavar Masouleh A., Masoumzadeh, M., 2006. Fungal flora in *Acipenser persicus* eggs with particular emphasis on *Saprolegnia* sp. (Oomycetes) and mortality during mass incubation at Shahid Beheshti hatchery. Journal Applied Ichthyology, 22(1), 265-268.
19. Khulbe, R.D., 2001. A manual of aquatic fungi. 3rd Edition, Academic Press, London, England, pp. 87.
20. Moghtader, M., 2012. Antifungal effects of the essential oil from *Thymus vulgaris* L. and comparison with synthetic thymol on *Aspergillus niger*. Journal of Yeast and Fungal Research, 3(6), 83-88.
21. Mousavi, s.M., Raftos, D., 2012. In vitro antifungal activity of a new combination of essential oils against some filamentous fungi. Journal of Middle East Journal of Scientific Research, 6, 156-161.
22. Salaby AS. Razin AM. , 1992. Dense cultivation and fertilization for higher yield of *Thymus vulgaris*. Journal of