بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد چهارم، شماره اول، بهار ۱۳۹٤
http://japu.gau.ac.ir

مقایسه اثر ضد قارچی نانوذره اکسیدروی (ZnO) با مالاشیت گرین بر قارچ ساپرولگنیا (*Saprolegnia Sp.*)

*آذر صدیقی[۱]، محمد سوداگر[۲]، سیدمسعود هاشمی‌کروئی[۳] و سیده‌صدیقه حسینی[۴]
[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۲]دانشیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد واحد تنکابن، [۴]دانشجوی دکتری گروه میکروبیولوژی، دانشگاه تربیت مدرس تهران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۲۷

چکیده

از مهم‌ترین مشکلات تکثیر تاس‌ماهی ایرانی، قارچ‌زدگی با ساپرولگنیا می‌باشد. برای کنترل این قارچ از مالاشیت‌گرین به‌عنوان یک ترکیب مؤثر در کنترل آلودگی‌های قارچی استفاده می‌شود. به‌دلیل روشن شدن اثرات و عوارض سوء مالاشیت‌گرین در انسان و انواع آبزیان، منع کاربرد آن به بیش از دو دهه می‌رسد. هدف از این پژوهش مقایسه اثر ضد قارچی نانوذره اکسیدروی با مالاشیت‌گرین روی ساپرولگنیا می‌باشد. برای این منظور پس از سنتز نانوذره اکسیدروی و تأیید آن با استفاده از XRD و SEM، اثر ضد قارچی آن با تعیین MIC به روش ماکرودایلوشن با مالاشیت‌گرین مقایسه شد. محدوده MIC نانو ذره اکسید روی با میانگین ۰/۲۸±۰/۸۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با مالاشیت‌گرین با میانگین MIC برابر با ۱/۱۵±۸/۹۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید و نانوذره اکسیدروی حساسیت‌پذیری معنی‌داری داشت ($P<0/05$). این مطالعه نشان داد که نانوذره اکسیدروی اثر ضدقارچی داشته و می‌تواند به‌عنوان گزینه مناسب برای کنترل قارچ ساپرولگنیا در فعالیت‌های شیلاتی استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی: نانوذره اکسید روی، مالاشیت‌گرین، ساپرولگنیا

*مسئول مکاتبه: azar_sadighi@yahoo.com

مقدمه

یکی از مشکلات مهم دوره انکوباسیون تخم بسیاری از گونه‌ها از جمله تاس ماهیان قارچ‌زدگی می‌باشد (هانجاوینت و همکاران، ٢٠٠٨). قارچ ساپرولگنیا از عوامل اصلی قارچ‌زدگی در تخم ماهی‌ها به‌خصوص تاس‌ماهی ایرانی است. این قارچ به تخم‌های مرده چسبیده و پس از رشد به داخل دیواره تخم نفوذ کرده و از تخم مرده به تخم‌های زنده منتقل می‌شود و از مهم‌ترین عوامل زیان‌آور به اقتصاد آبزی‌پروران در کشورهای مختلف تلقی می‌شود (ویلوقبی، ١٩٩٤؛ روبرتس، ٢٠١١). یکی از رایج‌ترین مواد شیمیایی جهت درمان و یا پیشگیری از این عارضه به‌خصوص در مورد تخم ماهیان مالاشیت‌گرین می‌باشد که به‌دلیل اثرات مطلوب قارچ‌کشی آن همواره مورد توجه دست‌اندرکاران تکثیر و پرورش ماهی در ایران بوده است (کیتاچارون و همکاران، ١٩٩٨). داوسون و همکاران (١٩٩٤) به اثر مخرب مالاشیت‌گرین اشاره نمودند. وانوست و همکاران (٢٠٠٦) هم مالاشیت‌گرین را سرطان‌زا معرفی کردند. اداره غذا و دارو در آمریکا (FAD) از سال ١٩٩١ میلادی پس از مشخص شدن اثرات سرطان‌زائی، ناقص الخلقه‌زایی و تجزیه آهسته آن در طبیعت کاربرد این ماده شیمیایی را برای آبزیانی که مصرف انسانی دارند ممنوع اعلام کرده است (کیتاچارون و همکاران، ١٩٩٨). در تحقیقات مختلف اثر ضدقارچی و ضدباکتریایی نانوذره اکسیدروی تأیید شده است. سانی و همکاران (٢٠١١) اثر ضد میکروبی نانوذره اکسیدروی را بر باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli*، *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Serratia marceseus* و *Proteus vulgari* گزارش کردند. زوکیک و همکاران (٢٠١١) نشان دادند که نانو ذره اکسید روی به‌طور مؤثری مانع رشد باکتری *Staphylococcus aureu*، *Pseudomonas aeruginosa* و مخمر *Sacharomyces cerevisiae* می‌شود. گاندال و همکاران (٢٠١٢) فعالیت ضد قارچی نانو ذره ZNO و میکرو ZNO را با تعیین MIC در *Aspergilus nige* به‌ترتیب ٢/٥ و ٥ و در *Candida albicans* ٥ و ١٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیان کردند. حسینی و همکاران ٢٠١١ اثر ضدقارچی نانو ذره اکسید روی را بر مهار رشد سویه استاندارد *Candida albicans* بررسی کردند. آن‌ها محدوده مقادیر حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد را برای نانوذره اکسید روی ٢٩٦-١/٠١٣ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین کردند. یاماتو و آیدا ٢٠٠٣ دریافتند که افزایش غلظت پودر استات روی در فعالیت ضدقارچی مؤثر است.

مواد و روش‌ها

تهیه سوسپانسیون قارچ: در این پژوهش ساپرولگنیا از تخم قارچ‌زده تاس ماهی ایرانی تهیه شده از مرکز تکثیروپرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی آق‌قلا جدا و شناسایی شد. پلیت‌های خالص تهیه شده از ساپرولگنیا به‌مدت دو هفته در گرم‌خانه ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا اسپورزایی به‌طور کامل انجام گیرد. جهت تهیه سوسپانسیون، در شرایط کاملا استریل از کلنی خالص قارچ ساپرولگنیا ایجاد شده در محیط کشت نمونه‌ای تهیه گردید و به سرم فیزیولوژی دارای توین ۸۰ اضافه شد. بعد از جداسازی اسپور، شفافیت (Transmitance) سوسپانسیون در طول موج ۵۲۰ نانو متر به ۹۰ درصد رسانیده شد، که نشان‌دهنده وجود $۱×۱۰^{٦}$ اسپور که در هر سی‌سی بود (هاشمی و همکاران، ۲۰۱۲).

تهیه نانوذره اکسیدروی: پودر استات روی با فرمول $Zn(CH_3\ COO)_2.2H_2O$ از شرکت Merck تهیه و برای سنتر نانوذره استفاده شد. ۵ گرم استات روی با ۵۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر دیونیزه و استریل در ارلن ریخته و در حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد که طی مدت ۳ تا ٤ ساعت حجم محلول به یک پنجم حجم اولیه رسید. محصول به‌دست آمده به‌مدت ۱۲ ساعت در فور با دمای ۵±۱۰۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. پس از آن در دمای ۲۰±۳۰۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲٤ ساعت قرار داده شد تا کریستال‌ها کامل شوند. محصول نانوذره با تکنیک‌های XRD و SEM مورد بررسی و تأیید قرار گرفت.

آماده‌سازی استوک نانو ذره اکسید روی و مالاشیت گرین: استوک اولیه نانوذره به مقدار ۱۰ سی‌سی محلول کلوئیدی با نسبت رقت ۱/۲ بود. برای تهیه استوک لازم جهت آزمون‌های میکروبی ۵۰۰ میکرولیتر از استوک اولیه به ۹۹/۵ سی‌سی آب مقطر دیونیزه استریل برای تهیه استوکی با $۲/۵×۱۰^{۳}$ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذره در هر سی‌سی اضافه شد. از مالاشیت‌گرین استوکی تهیه شد که در هر سی‌سی استوک $۲/۵×۱۰^{۳}$ میکروگرم بر میلی‌لیتر مالاشیت گرین وجود داشت.

اثر ضد قارچی نانو ذره اکسید روی و مالاشیت گرین: در این پژوهش اثر ضد قارچی این دو ماده به‌روش ماکرودایلوشن جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) بررسی شد. برای انجام تست سریال‌های ۱۷ تایی از محیط کشت سابوردکستروز براث آماده گردید. سپس با وارد کردن یک سی‌سی از استوک تهیه شده به لوله اول سریال‌های ۱/۲ رقت تا لوله

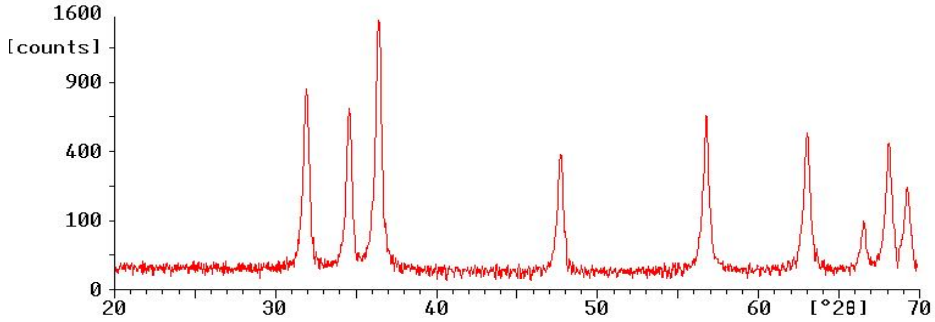
پانزدهم تهیه شد. لوله‌های شانزدهم و هفدهم به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. سپس ١٠ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور تهیه شده قارچ ساپرولگنیا به هر لوله اضافه و لوله‌ها در دمای ٢٥ تا ٣٠ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاشته شدند. بعد از انکوباسیون با ایجاد کدورت و مقایسه آن با لوله‌های شاهد، MIC مالاشیت گرین و نانوذره اکسیدروی مشخص گردید (سانی و همکاران، ٢٠١١). این تست سه بار تکرار شده و MIC میانگین محاسبه گردید. جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی قارچ (MFC) مقدار ١٠ لاندا از لوله MIC و سایر لوله‌های فاقد کدورت برداشته شد و در محیط گلوکز یست اکستراکت آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل کشت داده شد. پس از گذشت ٤٨ تا ٧٢ ساعت در پلیت‌ها با شمارش تعداد کلنی، CFU تعیین گردید. با شمارش تعداد کلنی غلظتی که تعداد میکروب‌های آن از یک‌هزارم تعداد اولیه کمتر بود، به‌عنوان MFC در نظر گرفته شد (وانوست، ٢٠٠٦). این تست سه بار تکرار شده و MFC میانگین تعیین گردید. آنالیز آماری از طریق آزمون t-test صورت گرفته و در ارتباط با مقایسه MIC و MFC مالاشیت گرین و نانوذره اکسید روی قضاوت صورت گرفت.

جدول ١- مقدار نانوذره اکسید روی و مالاشیت گرین در هر کدام از لوله‌ها بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر.

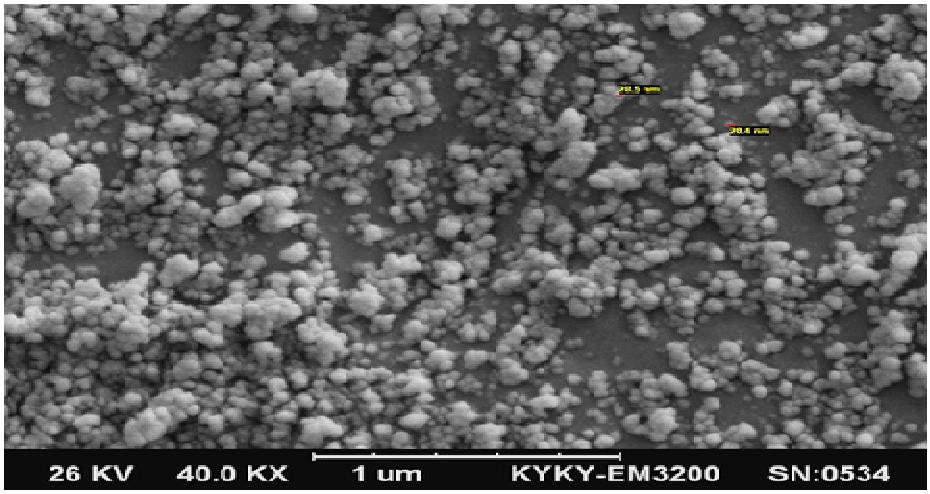
تعداد لوله	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠	١١	١٢	١٣	١٤	١٥
مقدار ماده	$1/25\times10^{3}$	$6/25\times10^{2}$	$31/25\times10$	١٥٦/٢٥	٧٨/١٢	٣٩/٠٦	١٩/٥	٩/٧	٤/٨	٢/٤	١/٢	٠/٦١	٠/٣	٠/١	٠/٠٧

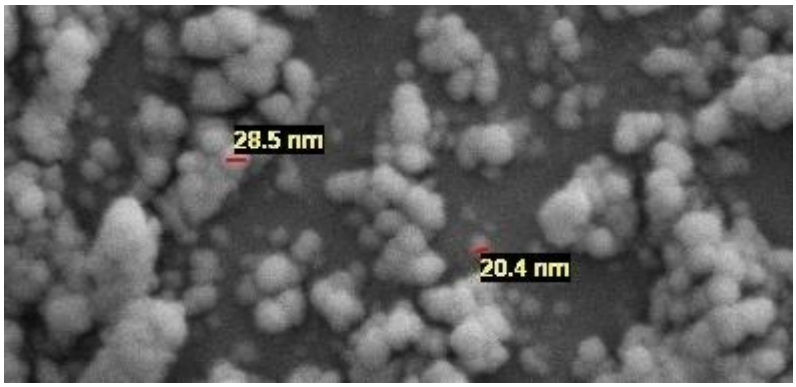
نتایج

نانوذره اکسیدروی ساخته شده در این پژوهش به رنگ سفید و به شکل ذرات کروی بوده جهت بررسی ساختار بلوری نانوذره اکسیدروی از روش XRD و جهت شناسائی اندازه قطر نانو ذره اکسید روی از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) استفاده شد. در این پژوهش ساختار بلوری و اندازه خصوصیات ساختاری نانوذره اکسیدروی با XRD و SEM تأیید شد (شکل‌های ١ و ٢).



شکل ۱- شمای **XRD** از نانوذره اکسیدروی.





شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانو ذرات اکسید روی.

در این پژوهش میانگین MIC نانوذره اکسیدروی علیه ساپرولگنیا ۰/۲۸±۰/۸۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای مالاشیت‌گرین ۱/۱۵±۸/۹۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و میانگین (MFC) ساپرولگنیا نسبت به نانوذره اکسیدروی و مالاشیت‌گرین به‌ترتیب ٦/۹۰±۲۱/۱۵ و ۱۰٤/۱٦ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید (جدول ۲). بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل آماری از میانگین گروه‌های مورد آزمایش رابطه معناداری وجود دارد (P<۰/۰۵).

جدول ۲- MIC و MFC نانوذره اکسیدروی (محلول کلوییدی) و مالاشیت‌گرین روی قارچ ساپرولگنیا بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر.

ماده شیمیایی	حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)	حداقل غلظت کشندگی (MFC)
نانوذره اکسیدروی	۰/۲۸±۰/۸۱	٦/۹۰±۲۱/۱۵
مالاشیت‌گرین	۱/۱۵±۸/۹۸	۱۰٤/۱٦

بحث

این پژوهش با این هدف انجام شد که بیماری‌های قارچی ساپرولگنیازیس از مشکلات دوره انکوباسیون تخم تاس‌ماهی به حساب می‌آید (بائر و همکاران، ۲۰۰۲) ساپرولگنیا از طریق چسبیدن و نفوذ به دیواره سلول‌های مرده و نیز از طریق تخم‌های مرده به تخم سالم سرایت می‌کند (ویلوقبی، ۱۹۹٤). مالاشیت‌گرین یکی از فراورده‌های رنگی دی آریل متان است و یک عامل ضد قارچی می‌باشد اما دارای تراتوژنیک و موتان‌زایی بوده و باعث ناهنجاری در تخم و ماهی می‌شود که از سال ۱۹۹۱ ممنوع اعلام شده است (کیتاچارون، ۱۹۹۸). از این‌رو جهت درمان ساپرولگنیازیس سایر روش‌های درمانی با تعیین MIC پیشنهاد شده است. کوم‌ویلی وکاشی‌ویگی در سال ۲۰۰۵ خاصیت ضدقارچی هیپوکلریت سدیم را با MIC، ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین کردند. هاشمی و همکاران در سال ۲۰۱۲ عصاره ریشه گیاه *Ruta graveolens* را به‌عنوان مهارکننده قارچ ساپرولگنیا با MIC برابر با ۲۵×۱۰^{۳} میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند. غلامپور عزیزی و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی تأثیر عصاره‌های الکلی و آبزی از *Citrullus colocynthis*، MIC و MFC تعیین شده به‌ترتیب ٦۲۵×۱۰ و ۲۵×۱۰^{۳} میکروگرم بر میلی‌لیتربود. این پژوهش پس از خالص‌سازی ساپرولگنیا و تأیید نانوذره اکسیدروی، با تست‌های تعیین حساسیت نانو ذره نشان داد که با مقذار کمتر نسبت به مهارکنندگان

مزبور اثر دارد. نانوذره اکسیدروی یک ترکیب غیرآلی محلول در آب است و ضدقارچی آن به اثبات رسیده ضمن این‌که این نانوذره با اتصال به غشاء میکروارگانیزم‌ها متصل شده فاز چرخه رشد را طولانی کرده و مدت زمان جوانه‌زنی ارگانیزم‌ها طولانی‌تر می‌شود (ژانگ و همکاران، ۲۰۰۸). نتایج این تحقیق نشان داد که مالاشیت‌گرین و نانوذره اکسیدروی دارای اثرات مهارکنندگی قارچی می‌باشند. در این میان ساپرولگنیا در برابر نانوذره اکسیدروی با مقایسه MIC و MFC حساسیت بیشتری نسبت به مالاشیت‌گرین از خود نشان داد که با توجه به آنالیز آماری t-test این رابطه معنی‌دار بود.

در مورد تعیین MFC باید در نظر داشت مطالعاتی که بر فعالیت قارچ‌کشی، عوامل ضدقارچی انجام شده است نشان می‌دهد که هیچ روش استانداردی برای تعیین MFC وجود ندارد. بنابراین این خطر وجود دارد که یک عامل ضدقارچی را که در واقع قارچ‌کش نمی‌باشد به‌عنوان قارچ‌کش گزارش کرد (اریکا، ۲۰۰۵).

در این پژوهش با افزایش غلظت محلول کلوییدی فعالیت ضد قارچی نیز افزایش یافت که این نتایج با یاماتو و آیدا ۲۰۰۳ مطابقت داشت. ژانگ و همکاران ۲۰۰۸ با استفاده از روش مرطوب خواص ضد میکروبی نانوذره اکسیدروی را بررسی کردند. حسینی و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از روش مرطوب نانوذره اکسیدروی خواص ضدقارچی *Candida albicans* را با غلظت ۲۹۶-۱/۰۱۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین کردند. در مطالعه اخیر نیز خواص مهارکنندگی نانوذره اکسید روی با استفاده از روش مرطوب با حداقل غلظت مهارکنندگی ۰/۲۸±۰/۸۱ و غلظت کشندگی ۶/۹±۲۱/۵ بررسی شد. با توجه به نتایج بالا با استفاده از نانوذره اکسیدروی قارچ‌زدگی کاسته شده و می‌توان گفت که اثر نانوذره اکسیدروی در مقایسه با مالاشیت‌گرین در *In vitro* مثبت بوده که گامی نوین در عرصه کنترل قارچ‌زدگی در تخم تاس‌ماهی ایرانی در شرایط *In vivo* است.

با اثبات اثربخش بودن نانوذره اکسیدروی بر روی ساپرولگنیا، بتوان در آینده از نانوذره اکسیدروی برای کنترل بیماری ساپرولگنیازیس ماهیان (به‌ویژه تخم تاس‌ماهی ایرانی) به‌عنوان جایگزین مناسب مالاشیت‌گرین استفاده نمود. اما در این زمینه انجام تحقیقات گسترده‌تر در شرایط *In vitro* و نیز پژوهش‌هایی در شرایط *In vivo* برای بررسی اثرات نانوذره اکسیدروی و دوز مؤثر درمانی ضروری به‌نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد تکثیر و پرورش آبزیان خانم آذر صدیقی بود. به‌این وسیله از سرپرست دانشکده علوم آزمایشگاهی دانشگاه آزاد بابل جناب آقای دکتر غلام‌پور عزیزی سپاس‌گزاری می‌گردد. همچنین از جناب آقای رضا اسماعیلی کارشناس مسئول گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد واحد بابل که در انجام این پژوهش با ما همکاری صمیمانه داشتند؛ تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

1. Bauer, O., Pugachv, N. and Voronin, N. 2002. Study of parasites and diseases of sturgeon in Russia. Ichthyol. Pp: 420-429.
2. Erika, J. 2005. Antifungal agents, Susceptibility Testing Methods of Antifungal Agents HUMANA PRESS. Pp: 3-12.
3. Gholampour Azizi, I., Hoseini Fard, M. and Tahmasbpour, S. 2012. The Effect of Aquatic and Alcoholic Extracts of *Citrullus colocynthis* on Grow of the *saprolegnia parasitica*. Fish and Marine Sciences. 4(3): 258-262.
4. Gondal, M.A., Alzahrani, A.J. and Randhawa, M.A. 2012. Morphology and antifungal effect of nano-ZnO and nano-Pd-doped nano-ZnO against Aspergillus and Candida. Journal of Environmental Science and Health. 47: 1413-1418.
5. Hanjavanit, G., Nilubol, K. and Charuwan, R. 2008. Experimental Infection of Aqauatic Fungi on Eggs of African Catfish (*clariass gariepinus* Burch). KKU Sci. J. Pp: 36-43.
6. Hashemi Karouei, S.M., Sadeghpour Haji, M. and Gholampour Azizi, I. 2012. Ethanolic extract of ruta gravelens on saprolegnia. Spp. Bioscience, biochemistry and bioinformatics. 2(1).
7. Kitancharoen, N., Yamaoto, A. and Hatai, K. 1998. Effect of Sodium Chlorid, Hydrogen peroxide and Malachit green on Fungal infection in Rainbow trout eegs. Biocontrol Science. 3(2): 113-115.
8. Robarts, R.Y. 2011. Fish pathology, thirdedition, sunders, UK, chapter 12:380-412.
9. Soni, B.H., Deshpande, M.P., Sandip, V., Sunil, H. and Kaheria, H. 2011. Study on antimicrobial activity of undoped Mn ZnO nanoparticles synthesized by micro wave irradiation. Archives of Applied Science Research. 3(2): 173-179.
10. Vanwest, P. 2006. Saproleegnia Parasitica, an Oomycete Pathogen With a fishy appetite. New challenges for an old problem. Mycologist. 20: 330-337.

11. Wiloughby, L.G. 1994. Fungi and fish diseases. Pisces Press Sterling, Scotland. 57p.
12. Yammamoto, O. and Iida, Y. 2003. Antifungal characteristics of Spherical Carbon Materials with Zinc Oxide. Society of Japon. 1296: 6-614.
13. Zhang, L., Ding, Y., Povey, M. and York, D. 2008. ZnO nanofluids-a potential antibacterial agent. Progress in Natural Science. 18(8): 939-440.
14. Zvekic, D., Srdic, V.V., Karaman, M.A. and Matavulj, M.N. 2011. Antimicrobial properties of ZnO nanoparticles incorporated in polyurethane varnish. Processing and Application of Ceramics. 5(1): 4.