

ارزیابی جایگزینی عصاره های الکلی حنا و برگ بو با مالاشیت گرین بر کنترل بار قارچی تخم چشم زده ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

علی عظیمیان^{۱*}، محمد مازندرانی^۱، مهتاب خلجی^۱، طاهره باقری^{۲-۳}

۱- دانشجو دکترا گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۱- هیئت علمی گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۱- دانش آموخته دکترا گروه تولید و بهره برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲- مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی گرگان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

۳- مرکز تحقیقات شیلات آبهای دور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار، ایران

Ali Azimian^{1*}, Mohammad Mazandarani¹, Mahtab Khalaji¹, Tahere Bagheri^{2,3}

1*- Ph.D. student, Department Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environment Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

1- Department Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environment Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

1- PhD graduate, Department Fisheries and aquatic ecology, Faculty of Fisheries and Environment Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2- Inland Waters Aquatics Resources Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Gorgan, Iran

3- Offshore Fisheries Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Educations and Extension Organization (AREEO), Chabahar, Iran

چکیده:

سابقه و هدف: این مطالعه به منظور پیشگیری از بیماری قارچی (*Saprolegnia parasitica*) روی تخم چشم زده قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از عصاره های برگ بو و حنا طراحی شد. مواد و روش ها: در این **روشن تحقیق** ۳ تیمار که هر کدام شامل ۳ غلظت بود (در مجموع ۹ تیمار)، انتخاب گردید و سه تراف با عصاره گیاهی و دو تراف به صورت شاهد با مالاشیت سبز و آب خالص با شرایط دمایی 2 ± 13 درجه سانتیگراد با پی اچ $5/7 - 6/5$ و میزان اکسیژن محلول 1 ± 6 میلی گرم در لیتر به مدت ۱۸ روز از مرحله سبز تا چشم زدگی تخم با دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۷۰ میلی گرم در لیتر در تیمارهای همراه عصاره و ۳، ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر در تیمار مالاشیت سبز هر کدام با ۳ تکرار به روش شستشوی روزانه به مدت ۱ ساعت مورد آزمایش قرار گرفتند. یافته ها: **نتایج نشان داد** استفاده به صورت ترکیبی دو عصاره برگ بو و حنا با دوز ۷۰ میلی گرم در لیتر، دارای بازماندگی ۷۰ درصدی در مرحله چشم زدگی تخم بوده و براساس داده های آماری دارای اختلاف معنی داری با نمونه ها و دوزهای تیمارهای شاهد داشته است. نتیجه گیری: می توان چنین نتیجه گرفت که عصاره ترکیبی برگ بو و حنا جایگزین مناسبی برای ضد عفونی کننده های شیمیایی نظیر مالاشیت سبز می باشند.

واژه های کلیدی: تخم ماهی، عصاره گیاهی، مالاشیت سبز، قزل آلا

مقدمه

ساپروولگنیازیس یک بیماری قارچی مهم و گسترده است که در آبی پروری به ویژه در تخم و لارو ماهی قزل آلا با آن مقابله می شود. زیان اقتصادی اصلی زمانی رخ می دهد که به سرعت به تخم های زنده سرایت کند (۱). تولیدات آبی پروری روز به روز رو به افزایش می باشد نیاز به غذاهای دریایی، بدتر شدن کیفیت آب، استرس و سوء تغذیه ناشی از ذخیره سازی فشرده به منظور دستیابی به بالاترین راندمان از سطح واحد، ماهی ها را مستعد بیماری ها می کند. همچنین بسیاری از عوامل دیگر مانند تغییرات ناگهانی دما، تولید مثل، انگل های خارجی، حمل و نقل و درجه بندی نیز ممکن است باعث ایجاد استرس در ماهی شوند و در نتیجه مقاومت به بیماری از بین برود (۲). فقط تعداد کمی از گونه های قارچ باعث بیماری زایی در ماهی می شوند (۳). گونه های *Saprolegnia* به عنوان یکی از مهم ترین این قارچ ها در آب های شیرین پذیرفته شده اند. گونه های *Saprolegnia* قارچ هایی در کلاس *Oomycota* هستند، بدون سپتوم و با میسلیم منشعب فراوان (۴). شیوع آلودگی های قارچی از راه آب (*Saprolegniasis*) در ماهی و تخم ماهی همچنان در آبی پروری مشکلاتی ایجاد می کند (۵). آلودگی ساپروولگنیازیس می تواند منجر به از دست دادن تخم های ماهی قزل آلا شود. بسیاری از مواد شیمیایی مانند نمک، سولفات مس، پرمنگنات پتاسیم، هیپوکلریت کلسیم، کلریدها، برونوپل، متیلن بلو، یدوفور، فرمالین و مالاشیت گرین به عنوان ضد عفونی کننده در تولید ماهی قزل آلائی رنگین کمان و محافظت از تخم استفاده می شوند (۶). Alderman (۱۹۸۴) پیشنهاد کرد که برخی از این مواد شیمیایی سالم نیستند و ممکن است اثرات مضر روی تخم داشته باشند. به عنوان مثال، مالاشیت سبز که به طور گسترده به عنوان ضد قارچ استفاده می شد، در بسیاری از کشورها به دلیل اثرات تراتوژنیک و سرطان زا در بسیاری از کشورها ممنوع شده است (۷). از مهمترین اصول بیوتکنیک تکثیر و پرورش آبزیان، حفظ بهداشت و سلامت تخم ماهیان و ماهیان جوان پرورشی در کلیه مراحل رشد می باشد. آلودگی قارچی تخم در مرحله انکوباسیون یکی از مهمترین چالش های اساسی تولید آبزیان پرورشی بوده، که همه ساله موجب خسارات اقتصادی قابل توجهی در مراکز تکثیر آبزیان می شود. بسیاری از مواد موثره که در داروها به کار گرفته

می‌شود را می‌توان از گیاهان استخراج نمود. بنابراین، عوامل درمانی طبیعی (مانند اسانس های جدا شده از گیاهان معطر) در سال های اخیر به دلیل طیف گسترده فعالیت میکروبی و همچنین ایمنی و اثربخشی احتمالی مورد بررسی قرار گرفته اند (۸).

هدف کلی از این تحقیق درمان قارچ موجود در مرحله هچینگ تخم ماهی قزل آلا با استفاده از ضدعفونی کننده های گیاهی به جای ضدعفونی کننده های حاضر شیمیایی در جهت حفظ سلامت محیط کار و محیط زیست و نیز کمک در بازماندگی بیشتر توده تخم چشم زده حاصل از لقاح برای کمک در اقتصادی بودن این صنعت است.

مواد و روش ها

این تحقیق در آذر ماه ۱۴۰۱ در کارگاه پرورش ماهی مکدین فریدونشهر در استان اصفهان همزمان با رسیدن به اواسط فصل تخمک گیری ماهی قزل آلا رنگین کمان آغاز شد. ۱۲ مولد نر و ماده ۳ تا ۴ ساله، اقدام به لقاح مصنوعی شد و پس از شستشوی کامل تخمهای لقاح یافته و جذب آب، تخمها به سینی های موجود در تراف، در سالن انکوباسیون منتقل گردید و ۲۴ ساعت بعد از خواباندن، ضدعفونی توسط عصاره گیاهان دارویی (برگ بو و حنا) صورت پذیرفت.

تیمار آزمایشی شامل ۹ تیمار دارویی و ۲ تیمار شاهد، هر کدام با ۳ تکرار می باشد. تیمار اول شامل عصاره حنا (۲۵، ۵۰، ۷۰ میلی گرم در لیتر)، تیمار دوم شامل عصاره برگ بو (۲۵، ۵۰، ۷۰ میلی گرم در لیتر)، تیمار سوم شامل ترکیب عصاره (برگ بو+حنا)، تیمار اول ۱۵ میلی گرم در لیتر برگ بو به اضافه ۱۵ میلی گرم در لیتر حنا (مجموعاً ۳۰ میلی گرم در لیتر)، تیمار دوم مجموعاً ۵۰ میلی گرم در لیتر و تیمار سوم مجموعاً ۷۰ میلی گرم در لیتر مورد آزمایش قرار گرفتند. دو تیمار شاهد نیز در نظر گرفته شد که یکی تنها با آب جاری و دیگری با بهره گیری از مالاشیت سبز بود (۹).

ضدعفونی به روش شستشو با کمک آب ملایم، ۰/۲ لیتر در ثانیه به مدت یک ساعت (پس از اتمام ضدعفونی، ورودی آب تراف به حالت قبلی خود، ۰/۵ لیتر در ثانیه بر می گردد)، ۲۴ ساعت بعد از زمان لقاح و ورود تخمها به تراف انجام می شود و همه روزه تا پایان کامل چشم زدگی تخمها ادامه می یابد. در طول دوره آزمایش کلیه پارامترهای فیزیکی شیمیایی آب شامل دما، Ph و اکسیژن اندازه گیری شد (۱۰).

با توجه به اینکه قارچی که در مراحل تکامل تخم ماهی قزل آلا ظاهر می شود، به صورت توده ای شکل و پفکی و قابل مشاهده می باشد. می توان جهت تعیین درصد قارچ زدگی در هر سینی تراف تیمار بعد از اینکه خطر دستکاری مکانیکی تخم ها برطرف شد (با توجه به شرایط دمایی تحقیق حدوداً بعد از ۱۶ روزگی از مرحله تخم سبز تا چشم زدگی اول)، با استفاده از روش وزنی می توان درصد و وزن تخم های مرده را از تخم چشم زده سنجید (شکل ۱)، که ابتدا به کمک سیفون تخمهای مرده از سینی خارج شده و پس از گرفتن آب تخم های مرده به وسیله سبد، به کمک ترازوی دیجیتالی وزن شده و در جداول مربوطه یادداشت شدند (فراهانی، ۱۳۸۹).

آنالیز آماری

داده به کمک نرم افزار SPSS 26 و آزمون واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. قبل از آزمون های آماری، نرمال بودن پراکنش داده ها توسط آزمون کولموگروف بررسی گردید. پراکنش تمامی داده ها (در هر تکرار) نرمال بود. لذا برای تجزیه و تحلیل داده ها، از آزمون های پارامتریک (آزمون تجزیه واریانس یکطرفه و آزمون مقایسه میانگین دانکن) استفاده گردید. تمامی داده های مربوط به تیمارها شامل دما، اکسیژن و در جدول ۱ قابل مشاهده است.

جدول ۱- دوزهای مورد استفاده در تیمارهای آزمایش

Table1- Doses used in experimental treatments

نوع تیمار- عصاره	دوز استفاده شده عصاره- (mg/l)	وزن رهاسازی شده تخم لقاح یافته در هر سینی (gr)	مدت زمان ضدعفونی در روز	دمای آب- (° C)	Ph آب	اکسیژن آب- (mg/l)	مدت زمان هیچینگ و ضدعفونی- (day)
حنا	(۵۰، ۷۰، ۲۵)	۴۰۰	۱ ساعت به صورت شستشو	۱۳ ± ۲	۷/۵ ۶/۵	۶ ± ۱	۱۸
برگ بو	(۵۰، ۷۰، ۲۵)	-	-	-	-	-	-
برگ بو و حنا	(۵۰، ۷۰، ۳۰)	-	-	-	-	-	-
مالاشیت	(۳، ۵۱۰)	-	-	-	-	-	-
آب خالص	-	-	-	-	-	-	-

نتایج

با توجه به آزمون تجزیه واریانس یکطرفه نتیجه می گیریم که «وزن تخمهای مرده» بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی داری وجود دارد ($P < ۰/۰۱$).

جدول ۲- مقایسه «وزن تخمهای مرده» بین تیمارهای حنا، برگ بو، حنا+برگ بو، مالاشیت سبز و تیمار بدون دارو

Table2- Comparison of "weight of dead eggs" between treatments of henna, bay leaves, henna + bay leaves, green malachite and treatment without drugs

تیمار دارویی	وزن تخمهای مرده (gr) $\pm S.E$ میانگین
حنا	$210 \pm 14/14^b$
برگ بو	$214/44 \pm 14/44^b$
حنا + برگ بو	$153/33 \pm 9/72^a$
مالاشیت سبز	$169/44 \pm 12/03^a$
بدون دارو	$378/22 \pm 0/70^c$

آزمون مقایسه میانگین دانکن نیز نشان می دهد که بین تیمارهای حنا + برگ بو و مالاشیت ، تیمارهای برگ بو و حنا و تیمار بدون دارو در گروهی مجزا قرار داشته از نظر «وزن تخمهای مرده»، اختلاف معنا داری وجود دارد ($P < 0.05$). با توجه به آزمون تجزیه واریانس یکطرفه نتیجه می گیریم که بین تیمارهای مختلف آزمایش از نظر «درصد بازماندگی» اختلاف معنی دار آماری وجود دارد ($P < 0.01$) (جدول ۲).

جدول ۳- مقایسه «درصد بازماندگی» بین تیمارهای حنا، برگ بو، حنا+برگ بو، مالاشیت سبز و تیمار بدون دارو

Table 3- Comparison of "survival percentage" between treatments of henna, bay leaves, henna + bay leaves, green malachite and treatment without drugs

تیمار دارویی	وزن تخمهای مرده (gr) $\pm S.E$ میانگین
حنا	$47/56 \pm 3/61^b$
برگ بو	$45/33 \pm 3/32^b$
حنا + برگ بو	$61/11 \pm 2/61^a$
مالاشیت سبز	$58/11 \pm 2/81^a$
بدون دارو	$5/44 \pm 0/18^c$

آزمون مقایسه میانگین دانکن نیز نشان می دهد که از نظر «درصد بازماندگی» تیمارهای حنا+برگ بو و مالاشیت در یک گروه، تیمارهای برگ بو و حنا در یک گروه و تیمار بدون دارو در گروهی مجزا قرار داشته و با هم اختلاف معنی دار آماری دارند ($P < 0.05$) (جدول ۳).

جدول ۴- مقایسه «وزن تخمهای مرده» بین غلظت های مختلف تیمارهای حنا، برگ بو، حنا+برگ بو، مالاشیت سبز و تیمار بدون دارو

Table 4- Comparison of "weight of dead eggs" between different concentrations of henna, bay leaves, henna + bay leaves, green malachite and treatment without drugs

تیمار دارویی	غلظت دارو (ppm)	وزن تخمهای مرده (gr) $\pm S.E$ میانگین
حنا	۲۵	$263/33 \pm 8/82^g$
	۵۰	$196/67 \pm 3/33^{ef}$
	۷۰	$170/00 \pm 0/00^c$
برگ بو	۲۵	$266/67 \pm 8/82^g$
	۵۰	$203/33 \pm 12/02^f$
	۷۰	$173/33 \pm 3/33^{Cd}$
حنا + برگ بو	۳۰	$186/67 \pm 3/33^{de}$
	۵۰	$153/33 \pm 3/33^b$
	۷۰	$120/00 \pm 0/00^a$
مالاشیت سبز	۳	$206/67 \pm 3/33^f$
	۵	$176/67 \pm 3/33^{Cd}$
	۱۰	$125/00 \pm 2/89^a$
بدون دارو	۰	$378/22 \pm 0/70^h$

جدول ۴ نشان میدهد که بین تیمارهای مختلف با توجه به آزمون تجزیه واریانس از نظر «وزن تخمهای مرده» اختلاف معنی دار آماری وجود دارد ($P < 0/01$).

آزمون مقایسه میانگین دانکن نیز نشان داد که بین تیمارهایی حنا+برگ بو ۷۰ و ملاشیت ۱۰، حنا+برگ بو ۵۰، حنا ۷۰ و برگ بو ۷۰ و ملاشیت ۵، برگ بو ۷۰ و ملاشیت ۵ و حنا+برگ بو ۳۰، حنا+برگ بو ۳۰ و حنا ۵۰، حنا ۵۰ و برگ بو ۵۰ و ملاشیت ۳، حنا ۲۵ و برگ بو ۲۵ و تیمار بدون دارو مجزا قرار داشته و با هم اختلاف معنی داری از نظر «وزن تخمهای مرده» دارند ($P < 0/05$).

جدول ۵- مقایسه «درصد بازماندگی» بین غلظت های مختلف تیمارهای حنا، برگ بو، حنا+برگ بو، ملاشیت سبز و تیمار بدون دارو

Table 5- Comparison of "survival percentage" between different concentrations of henna, bay leaves, henna + bay leaves, green malachite and treatment without drugs

تیمار دارویی	غلظت دارو (ppm)	وزن تخمهای مرده (gr)
		$\pm S.E$ میانگین
حنا	۲۵	$34/00 \pm 2/08^B$
	۵۰	$50/67 \pm 0/67^{ef}$
	۷۰	$58/00 \pm 0/00^C$
برگ بو	۲۵	$33/33 \pm 2/03^B$
	۵۰	$48/33 \pm 3/33^f$
	۷۰	$54/33 \pm 0/33^{Cd}$
حنا + برگ بو	۳۰	$52/00 \pm 0/00^{de}$
	۵۰	$61/33 \pm 0/67^b$
	۷۰	$70/00 \pm 0/00^a$
ملاشیت سبز	۳	$48/67 \pm 0/67^f$
	۵	$57/67 \pm 0/33^{Cd}$
	۱۰	$68/00 \pm 0/58^a$
بدون دارو	۰	$5/44 \pm 0/18^h$

در جدول ۵ با توجه به آزمون تجزیه واریانس یکطرفه مشاهده کردیم که از نظر «درصد بازماندگی» میان تیمارها اختلاف معنی داری وجود دارد ($P < 0/01$).

آزمون مقایسه میانگین دانکن نیز نشان داد که از نظر «درصد بازماندگی» تیمارهای حنا+برگ بو ۷۰ و ملاشیت ۱۰، حنا+برگ بو ۵۰، حنا ۷۰ و ملاشیت ۵، برگ بو ۷۰ و حنا+برگ بو ۳۰، حنا+برگ بو ۳۰ و حنا ۵۰، حنا ۵۰ و برگ بو ۵۰ و ملاشیت ۳، حنا ۲۵ و برگ بو ۲۵ و تیمار بدون دارو و با هم اختلاف معنی داری وجود دارد ($P < 0/05$).

با توجه به نتایج حاصل از داده ها که در جداول بدست آمده، نتایجی به شرح ذیل حاصل شد. در صد بازماندگی در عصاره گیاه حنا، با دوز ۲۵ میلی گرم در لیتر ۳۴ درصد، دوز ۵۰ میلی گرم در لیتر ۵۰ درصد و دوز ۷۰ میلی گرم در لیتر ۵۸ درصد می باشد. در تیمار عصاره برگ بو، با دوز ۲۵ میلی گرم در لیتر ۳۳ درصد، دوز ۵۰ میلی گرم در لیتر ۴۸ درصد و دوز ۷۰ میلی گرم در لیتر ۵۴ درصدی می باشد. در تیمار سوم ترکیبی دو عصاره برگ بو و حنا با دوز ۳۵ میلی گرم در لیتر ۵۲ درصد، با دوز ۵۰ میلی گرم در لیتر ۶۱ درصد و دوز ۷۰ میلی گرم در لیتر ۷۰ درصد بوده است.

نتایج حاصل از درصد بازماندگی در تیمارهای شاهد به شرح ذیل می باشد. در تیمار مالاشیت سبز، در دوز ۳ میلی گرم در لیتر ۴۸ درصد، در دوز ۵ میلی گرم در لیتر ۵۷ درصد و دوز ۱۰ میلی گرم در لیتر ۶۸ درصد بوده است. با توجه به نتایج به دست آمده می توان چنین نتیجه گرفت که وزن تخمهای مرده استحصالی در طول دوره ضدعفونی و نیز درصد بازماندگی، براساس آزمون های آماری نشان می دهد، تیمارهای حنا+برگ بو ۷۰ و مالاشیت ۱۰، حنا+برگ بو ۵۰، حنا ۷۰ و مالاشیت ۵، برگ بو ۷۰ و حنا+برگ بو ۳۰، حنا+برگ بو ۳۰ و حنا ۵۰ و مالاشیت ۳، حنا ۵۰ و برگ بو ۵۰ و مالاشیت ۳، حنا ۲۵ و برگ بو ۲۵ و تیمار بدون دارو با هم اختلاف معنی داری داشتند. با توجه به آزمون های واریانس یکطرفه و دانکن با سطح اطمینان ۹۹ و ۹۵ درصد میتوان گفت اختلاف معنی داری بین نمونه های گیاهی با داروهای شیمیایی وجود دارد و تیمار ترکیبی عصاره برگ بو و حنا با تیمار مالاشیت سبز ۱۰ میلی گرم در لیتر (۱۰ پی پی ام بهترین دوز مصرفی مالاشیت سبز در فرایند ضدعفونی می باشد) در یک گروه قرار می گیرد و دقیقاً با هم برابری دارد که می تواند نشان داد عصاره های گیاهی می تواند جایگزین مناسبی برای ضدعفونی کننده های شیمیایی خطرناک نظیر مالاشیت سبز باشد.

بحث

مالاشیت سبز علی رغم خطرات و مضرات شناخته شده آن از قبیل اثرات تراتوزنتیک و جهش زایی، به دلیل کارایی زیاد آن در کنترل آلودگی های قارچی همچنان به عنوان یک قارچ کش استفاده می شود. نتایج بدست آمده نشان داده است که که عصاره ترکیبی برگ بو و حنا با دوز ۷۰ پی پی ام دارای بازماندگی قابل توجه براساس آزمون های آماری با آخرین دوز مصرفی مالاشیت سبز دارد که بسیار قابل تحمل است. البته باید در این مبحث اشاره نمود که دوز ترکیبی برگ بو و حنا به میزان ۷۰ پی پی ام به صورت ۴۵ میلی گرم حنا و ۲۵ میلی گرم برگ بو استفاده شد که دارای تاثیر بیشتری نسبت به دوز مساوی ۳۵ میلی گرم سیر و ۳۵ میلی گرم حنا داشته است.

تاکنون مواد مختلف، با غلظت های متفاوت برای جایگزینی با مالاشیت سبز آزمایش شدند. با توجه به تحقیقات انجام شده قبلی پیرامون موضوع پژوهش، از جمله می توان به کاربرد اسانس اکالیپتوس، عصاره آلویتا، عصاره جفت گیاه بلوط در کنترل قارچ تخم چشم زده جزء مهمترین تحقیقات انجام شده در سالهای اخیر می باشد، اشاره کرد. در مقایسه مواد مذکور با کاربرد عصاره برگ بو و حنا باید گفت در اسانس اکالیپتوس باید اشاره کرد تهیه آن در دوزهای بالاتر که دارای اثر گذاری بیشتر است براساس اظهارات محقق گران قیمت بوده و عصاره ۲۵ پی پی ام جهت کنترل قارچ پیشنهاد شده است که این دوز در مقایسه با دوز ۷۰ پی پی ام عصاره سیر و حنا دارای اثرگذاری کمتری می باشد. در کاربرد عصاره آلویتا در کنترل قارچ تخم باید اشاره کرد که این تحقیق بیشتر در شرایط آزمایشگاهی بوده و تاثیرگذاری آن در جنبه عملی تا حدودی مبهم و نیز براساس گفته محقق دوز بالاتر از ۱ گرم آن بسیار سمی و باعث نابود شدن توده تخم چشم زده شده و حتی در مراحل لاروی باعث گیجی لاروها شد و تاثیرگذاری منفی دارد و نیز تهیه عصاره آن میتواند دشوار و گران قیمت باشد. در بحث کاربرد عصاره جفت بلوط براساس گفته های محقق تهیه دشوار و برای تهیه ۵۶ گرم عصاره خشک بلوط نیاز به حدود ۲۰ کیلوگرم میوه بلوط است که هم تهیه آن دشوار و هم می تواند توجه اقتصادی نداشته باشد (۱۱). مطالعات انجام شده با عصاره های گیاهی نیز اثرات نامطلوبی را بر میزان هچینگ با افزایش دوز نشان داد (۱۲، ۱۳).

مطالعاتی در زمینه استفاده از ضدعفونی کننده های گیاهی بر روی تخم لقاح یافته و چشم زده انواع ماهیان انجام گرفته است. مقایسه کیفی اثر سیر و عصاره بابونه و گل ختمی در ترمیم ظاهری زخم های سطحی ماهی کپور معمولی نشان داده است که پس از

سه هفته زخم‌های ماهی‌های آکواریوم دارای سیر با کمترین غلظت (دوز ۵ پی پی ام) کاملاً از نظر ظاهری ترمیم یافته‌اند. کاربرد اسانس اکالپتوس در کنترل قارچی تخم مولدین ۴ ساله کپور بررسی و دوزهای ۵۰ تا ۱۰۰ پی پی ام به مدت ۱ ساعت با سه تکرار به مدت ۱۸ روز دارای اختلاف معنی دار با نمونه شاهد مالاشیت سبز بوده است. مطالعه انجام شده در رابطه با استفاده از آلوتینا برای حذف قارچ در مراحل انکوباسیون تخم ماهی قزل آلا که به دو صورت آزمایشگاهی و محیطی انجام گرفت، نشان داد که در روش آزمایشگاهی روی نمونه شاهد (بدون آلوتینا) توده قارچی رشد کرد و در نمونه‌های حاوی آلوتینا هیچ قارچی مشاهده نشد. در روش محیطی با توجه به تحلیل‌های آماری با ضریب اطمینان ۹۵ درصد اختلاف معنی داری بین تخم‌های چشم زده تراف‌های حاوی آلوتینا و تراف‌های حاوی مالاشیت گرین وجود ندارد و آلوتینا با غلظت یک گرم در لیتر از بین غلظت‌های آزمایش شده، می‌تواند جایگزین مناسبی برای مالاشیت گرین باشد. تاثیر اسانس آویشن شیرازی بر میزان تفریخ تخم قزل آلا رنگین کمان، به منظور ارزیابی اسانس آویشن شیرازی در کنترل آلودگی‌های ناشی از میکروارگانیسم‌ها در شرایط کارگاهی پرورش این ماهی، استحصال تخمک و اسپرم از ماهیان مولد ۴-۵ ساله مطابق روش معمول کارگاهی صورت گرفت و پس از لقاح و انتقال تخم‌های لقاح یافته به سینی‌ها ضد عفونی با اسانس آویشن شیرازی به صورت شستشو انجام گرفت که موجب بقای تخم و افزایش درصد تفریخ و بازماندگی لاروها تا وزن یک گرمی گردید. اما در مقایسه با نمونه‌های شاهد، قابل رقابت با آب اکسیژنه و مالاشیت گرین نمی‌باشد. در مقایسه اثرات اسانس آویشن شیرازی و مالاشیت سبز در کنترل آلودگی قارچی تخم ماهی سفید دریای خزر، مشخص شده که بین تیمارهای گروه آزمایشی آویشن شیرازی اثر بیشتر و بهتری در مهار قارچ زدگی تخم‌ها داشته و اختلاف معنی دار با گروه شاهد مشاهده شد. اثر ضد قارچی عصاره هیدرولیکی جفت گیاه بلوط بر روی قارچ ساپروولگینا، بعد از جمع‌آوری بلوط و جدا کردن پوسته از میوه آن عصاره هیدرولیکی تهیه شد و حداقل غلظت کشندگی این عصاره روی قارچ ساپروولگینا بررسی شد. نتایج آن نشان داد که غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دارای آثار کشندگی بر روی قارچ نسبت به نمونه شاهد بود. بسیاری از مطالعات اثرات بازدارندگی عصاره‌ها، ترکیبات یا اسانس‌های گیاهی را بر روی تخم ماهی (*in vivo*) یا روی سویه‌های (*in vitro*) جدا شده از تخم ماهی نشان می‌دهند (۱۹، ۱۸، ۱۷، ۱۶، ۱۵، ۱۴).

Metin و همکاران (۲۰۱۳) اثرات ضد قارچی اسانس *Satureja cuneifolia* را بر روی *S. parasitica* بررسی کردند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اسانس مورد استفاده رشد قارچ را به طور کامل در شرایط آزمایشگاهی مهار کرد و زمانی که روی تخم آزمایش شد، میزان هچ ($44/5 \pm 0/57$ درصد) در مقایسه با گروه شاهد ($23/65 \pm 0/14$ درصد) به میزان قابل توجهی افزایش یافت (۲۰).

Özdemir و همکاران (۲۰۲۱) اثرات پیشگیرانه کوتاه مدت عصاره‌های *Coriandrum sativum*، *Melissa officinalis* را روی تخم‌های قزل‌آلا رنگین کمان بررسی کردند نتایج نشان داد که که تلفات ناشی از قارچ، ۱۰ درصد کاهش یافته است. با توجه به نتایج آنها، تمام عصاره‌ها در غلظت کمتر از ۱۰۰ ppm اثرات بازدارندگی نشان دادند. با این حال، گونه‌های داودی، *Yucca*، *Zingiber officinale* sp. و *Atractylodes macrocephala* موثرترین گیاهان بودند. آنها همچنین اظهار داشتند که مطالعات *in vivo* باید برای به دست آوردن نتایج قابل اعتمادتر انجام شود. Udomkusonsri و همکاران (۲۰۰۷) بیان کرد که حلال مورد استفاده در فرآیند استخراج ممکن است بر اثربخشی عصاره تأثیر بگذارد.

نتیجه گیری

با توجه به آزمایشات انجام شده، می توان چنین نتیجه گرفت که در تهیه عصاره ها دقت بیشتری گردد و توجه شود که حتما عصاره ها به صورت اتانولی تهیه شوند. براساس توضیحات داده شده قبلی، قابل توضیح است در آزمایشات انجام شده کاربرد ترکیبی دو عصاره حنا و برگ بو با دوز ۷۰ پی پی ام به صورت ۴۵ میلی گرم حنا و ۲۵ میلی گرم برگ بو، تاثیرگذارتر خواهد بود.

منابع

1. Goddard, A. L. (2018). Effects of Secondary Salinization on Three Coastal Breeding Amphibians in Oregon: *Taricha graulosa*, *Hyla regilla*, and *Rana auror*. Oregon State University. (Master's thesis).
2. Naylor, L. R., Goldburg, R. J., Primavera, J. H., Kautsky, N., Beveridge, M. C. M., Clay, J., ... Troell, M. (2000). Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405, 1017–1024.
3. Roberts, R. J., & Shepherd, C. J. (1997). Infectious disease. In *Handbook of Trout and Salmon Diseases*, 3rd ed. (pp. 29–64). Oxford, UK: Blackwell Science.
4. Branson, E. (2002). Efficacy of bronopol against infection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with the fungus *Saprolegnia* species. *Veterinary Record*, 151(18), 539–541.
5. Schreier, T. M., Rach, J. J., & Howe, G. E. (1996). Efficacy of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride on fungal-infected rainbow trout eggs. *Aquaculture*, 140(4), 323–331.
6. Çelikkale, M. S. (1988). İçsu balıkları ve yetiştiriciliği I. K.T.Ü. Sürmene Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Yüksekokulu, Cilt: 1, Yayın no: 124, K.T.Ü. Basımevi, Trabzon, 419 s.
7. Emre, Y., & Kürüm, V. (1998). Havuz ve kafeslerde alabalık yetiştiriciliği teknikleri (p. 232). Ankara, Turkey: Minpa Matbaacılık.
8. Karga, M., Kenanoglu, O. N., & Bilen, S. (2020). Investigation of antibacterial activity of two different medicinal plants extracts against fish pathogens. *Journal of Agricultural Production*, 1(1), 5–7.
9. Özdemir, R. Taştan, Y. Güney, K. (2021). Prevention of Saprolegniasis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs using oregano (*Origanum onites*) and laurel (*Laurus nobilis*) essential oils. *Journal of Fish Diseases*. 00, 1-8.
10. Farahani, R. (1389). Practical scientific guide to salmon breeding. Daryasar Publications.
11. Mousavi, S. M., Mirzargar, S. S., Ebrahim Zadeh Mousavi, H., Omid, B. R., Khosravi, A., Bahor, A., & Ahmadi, M. R. (2009). Evolution of antifungal activity of new combined essential oils in

- comparison with malachite green on hatching rate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 4, 103–110.
12. Metin, S., Diler, O., Didinen, B. I., Terzioğlu, S., & Gormez, O. (2015). In vitro and in vivo antifungal activity of *Satureja cuneifolia* ten essential oil on *Saprolegnia parasitica* strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) eggs. *Aquaculture Research*, 46(6), 1396–1402.
 13. Özçelik, H., Taştan, Y., Terzi, E., & Sönmez, A. Y. (2020). Use of Onion (*Allium cepa*) and Garlic (*Allium sativum*) Wastes for the Prevention of Fungal Disease (*Saprolegnia parasitica*) on Eggs of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fish Diseases*, 43(10), 1325–1330
 14. Ghasemi Pirbalouti, A., Taheri, M., Raiesi, M., Bahrami, H., & Abdizadeh, R. (2009). In vitro antifungal activity of plant extracts on *Saprolegnia parasitica* from cutaneous lesions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 7(2), 94–96.
 15. Khallil, A. R. M. (2001). Phytofungitoxic properties in the aqueous extracts of some plants. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4, 392–394.
 16. Khosravi, A. R., Shokri, H., Sharifrohani, M., Mousavi, H. E., & Moosavi, Z. (2012). Evaluation of the antifungal activity of *Zataria multiflora*, *Geranium herbarium*, and *Eucalyptus camaldolensis* essential oils on *Saprolegnia parasitica*–infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(7), 674–679.
 17. Mori, T., Hirose, H., Hanjavanit, C., & Hatai, K. (2002). Antifungal activities of plant extracts against some aquatic Fungi. *Biocontrol Science*, 7(3), 187–191.
 18. Udomkusonsri, P., Trongvanichnam, K., Limpoka, M., Klangkaew, N., & Kusucharit, N. (2007). In vitro efficacy of the antifungal activity of some Thai medicinal-plants on the pathogenic fungus, *Saprolegnia parasitica* H2, from fish. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 41, 56–61.
 19. Xue-Gang, H., Lei, L., Cheng, C., Kun, H., Xian-Le, Y., & Gao-Xue, W. (2013). In Vitro Screening of Chinese Medicinal Plants for Antifungal Activity against *Saprolegnia* sp. and *Achlya klebsiana*. *North American Journal of Aquaculture*, 75(4), 468–473.
 20. Metin, S., Diler, O., Didinen, B. I., Terzioğlu, S., & Gormez, O. (2013). In vitro and in vivo antifungal activity of *Satureja cuneifolia* ten essential oil on *Saprolegnia parasitica* strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) eggs. *Aquaculture Research*, 46(6), 1396–1402.

Evaluation of the replacement laurel (*Laurus nobilis*) and Lawsonia Inermis L alcoholic essential oils with malachite green on the control *Saprolegniasis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs

Abstract

Background and objectives: This study was designed to prevent *Saprolegniasis* (*Saprolegnia parasitica*) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs using laurel (*Laurus nobilis*) and Lawsonia Inermis L alcoholic essential oils. This research was completely practical and carried out in environmental conditions. Materials and methods: In this research, 3 treatments, each containing 3 concentrations, (9 treatments in total) were selected, and three trays with essential oils and two trays as controls with green malachite and pure water with temperature conditions of 13 ± 2 degrees Celsius with a pH of 6.5-7.5 and a dissolved oxygen level of 6 ± 1 mg/liter for 18 days essential oils treatments are included 25, 50 and 70 mg/L and green malachite treatment is 3, 5 and 10 mg/L each with 3 repetitions by washing daily for 1 hour. Results: The results showed that the combined use of two essential oils of with dose of 70 mg/liter had 70% survival in the egg emergence stage and based on statistical data, it had a significant difference with the samples and doses of the control treatments. Conclusion: It can be concluded that the combined essential oils are suitable alternative to chemical disinfectants such as green malachite.

Keywords: Fish egg, essential oils, green malachite, rainbow trout