

ارزیابی کاربرد اسانس اوکالپتوس (*Eucalyptus camaldolensis* Dehnh.) در کنترل

آلودگی‌های قارچی تخم ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

حسینعلی ابراهیم‌زاده موسوی^{۱*}، مصطفی شریف‌روحانی^۲، علیرضا خسروی^۳، یداله مهرابی^۴، افشین
آخوندزاده‌بستی^۵

۱- دانشیار، گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

۲- استادیار، عضو هیات علمی موسسه تحقیقات شیلات ایران

۳- استاد، گروه قارچ‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

۴- کارشناس ارشد شیلات ایران

۵- دانشیار، گروه کنترل و بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

* آدرس مکاتبه: تهران، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

صندوق پستی: ۶۴۵۳ - ۱۴۱۵۵، تلفن: ۶۶۹۲۳۵۱۰ (۰۲۱)، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲ (۰۲۱)

پست الکترونیک: hmosavi@ut.ac.ir

تاریخ تصویب: ۸۵/۹/۲۱

تاریخ دریافت: ۸۳/۸/۲۷

چکیده

مقدمه: استفاده از گیاهان دارویی جهت پیشگیری و کنترل آلودگی‌های قارچی در مراکز تکثیر ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان به عنوان جایگزین مالاشیت گرین امری ضروری و لازم به نظر می‌رسد.

هدف: هدف این بررسی، ارزیابی قدرت مهارکنندگی اسانس اوکالپتوس در کنترل آلودگی‌های قارچی تخم قزل‌آلای رنگین کمان است. روش بررسی: اسانس اوکالپتوس در کنترل آلودگی‌های قارچی تخم استحصالی از مولدین ۴ ساله قزل‌آلای رنگین کمان مورد ارزیابی بالینی و کارگاهی قرار گرفت. تاثیر این اسانس در دزهای ۱، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ پی پی ام به مدت ۱ ساعت روزانه با ۳ تکرار تا رسیدن به مرحله چشم‌زدگی (۲۰ - ۱۸ روز) بررسی شد. گروه‌های کنترل با شرایط یکسان در معرض ۱ پی پی ام داروی مالاشیت گرین (به عنوان کاربردی‌ترین داروی ضدقارچ) و دیگری بدون هرگونه مداخله دارویی واقع شدند.

یافته‌ها: نتایج کشت تخم‌های قارچ‌زده، آلودگی به ساپروولگنیا پارازیتیکا و فوزاریوم سولانی را مشخص نمود. نتایج آزمایش تعیین حداقل غلظت مهارکننده اسانس نسبت به ساپروولگنیا ۲/۳ و نسبت به فوزاریوم ۸/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است. نتایج اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب قبل و بعد از تجویز اسانس به انکوباتورها مؤید عدم بروز تاثیر منفی در ویژگی آب است. نتیجه‌گیری: اوکالپتوس در دوزهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ پی پی ام اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشته و پوشش نسبتاً مناسبی از نظر مهار رشد قارچ‌های آبی فراهم نموده است.

کل‌واژگان: اوکالپتوس، قزل‌آلای رنگین کمان، مالاشیت گرین، تخم چشم زده، قارچ‌زدگی



مقدمه

از طرف دیگر رواج گرایش جهانی به آبی‌پروری سبز و توسعه سیستم‌های پرورشی ارگانیک^۱ که در آن بیشترین استفاده از مواد طبیعی و کمترین استفاده از مواد شیمیایی و آلاینده به عمل می‌آید ما را بر آن داشت تا با توجه به غنای سرزمینی و تنوع گیاهان دارویی کشور به ارزیابی بالینی برخی ترکیبات گیاهی با توجه به ویژگی ضدقارچی آنها بپردازیم [۱،۲].

مواد و روش‌ها

در این بررسی مقدار ۱۶ کیلوگرم تخم قزل‌آلا به تعداد ۲۳۲/۴۶۴ عدد از مولدین ۴ ساله مورد مطالعه و ارزیابی بالینی تاثیر اسانس اوکالپیتوس قرار گرفتند. اسانس اوکالپیتوس به صورت خالص از شرکت باریج اسانس تهیه و جهت حلال شدن آن در آب از توئین ۲۰ استفاده گردید. حدود یک‌ساعت بعد از لقاح، تخم‌ها با متوسط وزنی ۲۸۰ گرم در سینی‌های فایبر گلاس به ابعاد ۴۰×۴۰×۱۵ توزیع گردیده و تحت تیمارهای ۱، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ پی پی ام به مدت یک ساعت در ۳ تکرار با توالی روزانه قرار گرفتند.

گروه‌های کنترل با شرایط مشابه در معرض ۱ ppm مالاخیت گرین به مدت ۱ ساعت روزانه و دیگری با شرایط یکسان بدون هیچ‌گونه مداخله دارویی قرار گرفتند. متوسط درجه حرارت ۱۱ درجه سانتی‌گراد اکسیژن ۹ ppm و pH=۸ بود که قبل و بعد از مداخله اندازه‌گیری شدند و میزان آب ورودی تراف‌ها ۷۰۰ لیتر در ساعت (۱۲ لیتر در دقیقه) بود. ارزیابی آزمایشگاهی اسانس اوکالپیتوس با استفاده از تکنیک MIC (تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد قارچ) انجام شد. pH در طول دوره انکوباسیون تخم، درجه حرارت، اکسیژن و قبل و بعد از هر مداخله دارویی در هر یک از تیمارها ثبت شد. دبی آب ورودی طبق شرایط موجود در کارگاه به تراف‌ها به میزان متوسط ۱۲ لیتر در دقیقه (۷۰۰ لیتر در ساعت) محاسبه و برای جلوگیری از هرگونه خطای محاسباتی در تنظیم مقدار اسانس‌ها دو نوبت در هفته کنترل و تنظیم گردیدند.

رشد روز افزون جمعیت و تامین پروتئین موردنیاز جوامع بشری زمینه توسعه سیستم‌های مختلف پرورش دام، طیور و آبزیان را فراهم نموده است. تکثیر و پرورش آبزیان و به ویژه ماهیان سرد آبی در اکثر نقاط کشور در حال انجام بوده و طبق آخرین آمار رسمی (سال ۱۳۸۲) بالغ بر ۲۳۰۰۰ تن ماهی قزل‌آلا در کشور تولید شده و طبق برنامه‌ریزی انجام شده این رقم در سال پایانی برنامه چهارم (۱۳۸۸) به ۵۹۰۰۰ تن خواهد رسید. در این میان یکی از موانع و مشکلات اساسی تولید، بروز عارضه قارچ‌زدگی تخم‌های ماهیان قزل‌آلا در مرحله تکثیر مصنوعی آنها است. اگرچه آمار رسمی درخصوص شدت و شیوع این عارضه در مراکز تکثیر این ماهی در سطح کشور منتشر نشده است ولی شواهد سالیان اخیر نشان‌دهنده این واقعیت است که حدود نیمی از تخم‌های تولیدی مراکز تکثیر که متجاوز از ۶۰ مرکز در ۱۴ استان کشور هستند، به دلیل قارچ‌زدگی از چرخه تولید خارج می‌شوند.

خسارات مستقیم ناشی از این عارضه با توجه به ارزش اقتصادی تخم قزل‌آلا قابل توجه است و البته خسارات غیرمستقیم که ناشی از بروز مشکلات زیست محیطی و راهیابی مواد دارویی و شیمیایی آلاینده به چرخه طبیعت و افزون بر آن، مشکلات مربوط به بهداشت عمومی جامعه و سلامت مصرف‌کنندگان نهایی محصولات آبی‌پروری است قابل محاسبه نیست.

مالاخیت گرین^۱ از دیرباز به عنوان بهترین ماده موثر در کنترل و درمان قارچ‌زدگی آبزیان مطرح بوده و علی‌رغم مشخص شدن عوارض سوء ناشی از آن از قبیل سرطان‌زایی، ناقص‌الخلقه‌زایی و آلاینده‌گی محیط زیست همچنان در کشور به میزان وسیعی در حال مصرف است. اگرچه آلترناتیوهای متعدد و در عین حال موثر و کاربردی مانند پرمنگنات پتانسیم، آب اکسیژنه، ازناسیون^۲ برای آن مشخص شده ولی با توجه به ماهیت شیمیایی آنان هریک دارای جنبه‌های سوء مصرف ویژه‌ای هستند [۳،۵،۶،۷،۸،۱۴].

¹ Organic culture¹ Malachite green² Ozonation

از نظر تعداد لارو استحصالی تیمار 1^{ppm} با $419/33$ عدد و تیمار 100^{ppm} با 238 عدد لارو (جدول شماره ۲) و بالاخره از نظر میانگین وزن متوسط تیمار 10^{ppm} با $147/66$ و تیمار 5^{ppm} با 130^{mg} بیشترین و کمترین برآیند را داشته‌اند (جدول شماره ۲).

همچنین آنالیز آماری نتایج کاربرد مالاشیت گرین (دز PPM ۱) و گروه کنترل (بدون کاربرد مواد شیمیایی) نشان‌دهنده رابطه معنی‌دار کاربرد مالاشیت گرین در روزهای ۱۰ و ۱۸ نسبت به گروه کنترل است (جدول شماره ۱).

نتایج مربوط به مقایسه میانگین تعداد تخم چشم‌زده نهایی، درصد تفریخ، تعداد لارو استحصالی و وزن متوسط آنها در جدول شماره ۲ ارایه شده است.

از نظر تعداد تخم چشم‌زده مالاشیت گرین با 2969 عدد و کنترل با $592/5$ عدد بالاترین و پایین‌ترین نتایج را در این تحقیق داشته‌اند (جدول شماره ۲).

بحث

آلودگی‌های قارچی تخم در مرحله انکوباسیون یکی از مهمترین چالش‌های اساسی تولید آبزیان پرورشی بوده که همه ساله موجب خسارات اقتصادی قابل توجهی در مراکز تکثیر آبزیان می‌شود. ساپروولگنیو سایر اوومیسیت‌ها به طور طبیعی در اکثر منابع آبی موجود بوده و در صورت حضور عوامل زمینه‌ساز مانند هرگونه استرس فیزیکی و شیمیایی و همین‌طور کیفیت نامناسب تخم استحصالی از مولدین یا نارس بودن و حتی فوق رسیده بودن آنها به آسانی گسترش و تکثیر می‌یابند [۴، ۱۱، ۱۳].

مالاشیت گرین علی‌رغم خطرات و مضرات شناخته شده آن از قبیل اثرات تراژژنیک و جهش‌زایی، به دلیل کارایی زیاد آن در کنترل آلودگی‌های قارچی همچنان به عنوان یک قارچ‌کش استفاده می‌شود. این در حالی است که طبق توجیه سازمان غذا و داروی ایالات متحده امریکا^۱ منع مصرف مؤکد داشته و کاربرد آن در بسیاری کشورها ممنوع شده است [۴، ۶، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲].

کنترل تعداد کلونی‌های قارچی روزانه به تفکیک هر تراف در هر یک از تیمارها و تکرارها انجام و نتایج مربوطه ثبت و با استفاده از نرم‌افزار spss (version 11) تحت آزمون‌های T, Levene's, Anova, Post Hoc و تعیین همبستگی با سطح اطمینان ۹۵ درصد قرار گرفتند و نمودارهای مربوطه نیز با استفاده از نرم‌افزار Excell-2000 ترسیم گردیدند. ارزیابی بالینی یا کارگاهی اسانس فوق تا مرحله چشم‌زدگی تخم‌ها یعنی حدود ۱۸ روز صورت گرفت و در طول این مدت هیچ‌گونه دستکاری و غربالگری در خصوص حذف کلونی‌های قارچی از سینی‌ها به عمل نیامد. شمارش تعداد کلونی‌های قارچی در هر سینی روزانه انجام شد.

نتایج

نتایج کاربرد اسانس اوکالپیتوس در تیمارهای مختلف ۱، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ پی پی ام در نمودار شماره ۱ ارایه شده است. آنالیز آماری نتایج نشان می‌دهد که میانگین تعداد کلنی‌های قارچی در روز ۵ در دزهای ۱، ۵ و ۲۵ نسبت به کنترل معنی‌دار بوده و سایر دزها رشدی نداشته‌اند (جدول شماره ۱).

در روز ۱۰ در دزهای ۱، ۵، ۱۰ و ۵۰ نسبت به مالاشیت و در دزهای ۵، ۱۰ و ۲۵ نسبت به کنترل معنی‌دار بوده است (جدول شماره ۱).

در روز ۱۵ در دزهای ۱، ۵، ۱۰ و ۵۰ نسبت به مالاشیت معنی‌دار بوده و در کلیه دزها نسبت به کنترل معنی‌دار بوده است (جدول شماره ۱).

در روز ۱۸ در دزهای ۱، ۵، ۱۰ و ۵۰ نسبت به مالاشیت گرین و در دزهای ۱، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ نسبت به کنترل معنی‌دار بوده است (جدول شماره ۱).

از نظر میانگین تخم چشم زده در تیمار 1^{ppm} با $1563/33$ عدد و تیمار 50^{ppm} با $1048/33$ عدد بیشترین و کمترین میزان تخم چشم زده را دارا بوده‌اند (جدول شماره ۲).

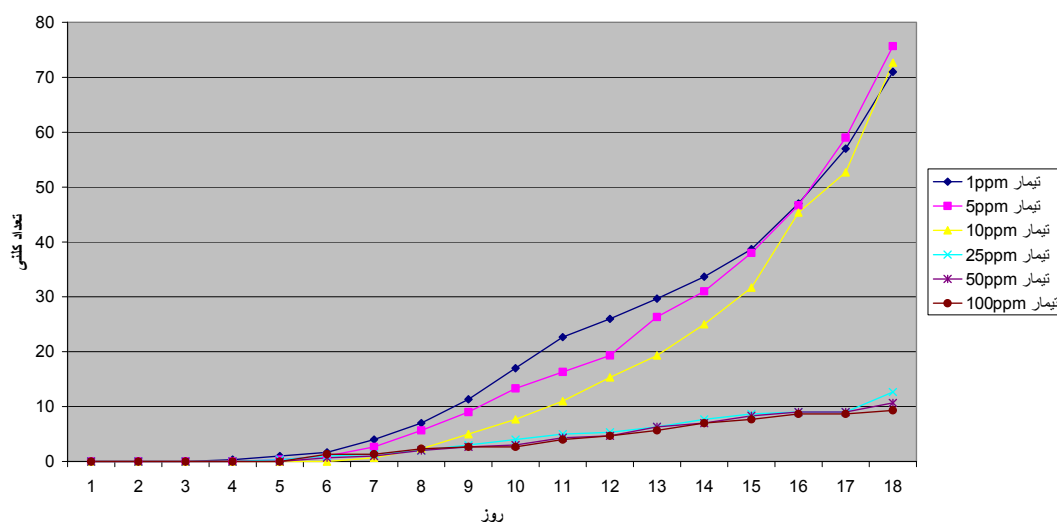
در مقایسه میانگین درصد تفریخ، تیمار 25^{ppm} با $15/9$ و تیمار 10^{ppm} با ۳ درصد بالاترین و پایین‌ترین درصد تفریخ را داشته‌اند (جدول شماره ۲).

¹ FDA

نتایج آزمایش‌ها تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) اسانس نسبت به ساپروولگینا (۲/۳) و فوزاریوم (۸/۲) مؤید تاثیر قویتر این اسانس در مهار رشد ساپروولگینا است. با توجه به

از آنجا که تحقیق حاضر اولین بررسی در نوع خود در زمینه کاربرد مواد طبیعی و گیاهی در زمینه کنترل آلودگی‌های قارچی تخم‌آزبان بوده است با مجهولات و مشکلات فراوانی همراه بوده است.

نمودار ۱: میانگین تعداد کلنی های قارچی تخم در گروه اوکالپتوس



جدول شماره ۱ - میانگین و انحراف معیار تعداد کلنی های قارچی تخم در تیمارهای مختلف $p < 0.05$

روز	تیمار	اوکالپتوس (x + SD)						ملاشیت گرین	کنترل
		۱ PPM	۵	۱۰	۲۵	۵۰	۱۰۰		
۱		۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۵		۱ ± ۱	۰/۳۳ ± ۰/۵۸	۰	۰/۳۳ ± ۰/۵۸	۰	۰	۰	۴ ± ۱/۴۱
۱۰		۱۷ ± ۲/۶۵	۱۳/۳۳ ± ۱/۵۳	۷/۶۷ ± ۱/۵۳	۴ ± ۲	۳ ± ۱	۲/۶۷ ± ۳/۰۶	۰	۲۳ ± ۱۶/۹۷
۱۵		۳۸/۶۷ ± ۳/۰۶	۳۸ ± ۳/۶۱	۳۱/۶۷ ± ۲/۰۸	۸/۶۷ ± ۳/۰۶	۸/۳۳ ± ۱/۱۵	۷/۶۷ ± ۳/۰۶	۱/۵۰ ± ۲/۱۲	۶۹ ± ۶۳/۶۴
۱۸		۷۱ ± ۲	۷۵/۶۷ ± ۷/۵۷	۷۲/۶۷ ± ۷/۵۷	۱۲/۶۷ ± ۲/۵۲	۱۰/۶۷ ± ۱/۵۳	۹/۳۳ ± ۲/۵۲	۶/۵۰ ± ۲/۱۲	۱۱۳/۵۰ ± ۱۵/۲۶

جدول شماره ۲ - مقایسه میانگین درصد تفریخ، تخم چشم زده نهایی، تعداد لارو استحصالی و وزن متوسط تیمارهای مختلف

مقیاس میانگین	تیمار - دز	اوکالپتوس						ملاشیت گرین	شاهد
		۱	۵	۱۰	۲۵	۵۰	۱۰۰		
درصد تفریخ		۸/۶	۹/۴	۳	۱۵/۹	۱۲	۱۰/۶	۲۲/۸	۱/۳
تخم چشم زده نهایی		۱۵۶۳/۳۳	۱۳۴۵/۳۳	۱۴۲۰/۶۶	۱۲۴۱/۶۶	۱۰۴۸/۳۳	۱۳۳۳/۳۳	۲۹۶۹	۵۹۲/۵
تعداد لارو استحصالی		۴۱۹/۳۳	۴۲۰	۱۴۰/۶۶	۳۸۳	۲۶۳	۲۳۸	۱۰۷۲/۵۰	۴۷/۵۰
میانگین وزن متوسط		۱۳۶	۱۳۰	۱۴۷/۶۶	۱۳۶/۶۶	۱۴۵/۳۳	۱۴۳/۳۳	۱۴۰/۵۰	۱۲۷/۵۰



اینکه غیر از یک مورد از کشت‌های قارچی که در آن فوزاریوم سولانی جداسازی و شناسایی گردید بقیه کشت‌های قارچی ساپروولگینا پارازیتیکا غالب بوده است و از این نظر با توجه به شدت و شیوع ساپروولگینازیس کاربری اسانس اوکالیپتوس موثر به نظر می‌رسد.

اوکالیپتوس در دزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد (بدون کاربری دارو) داشته و با گروه کنترل (مالاشیت گرین) اختلاف معنی‌داری ندارد و این امر مؤید تاثیر مناسب و پوشش ضد قارچی مطلوب این اسانس در کنترل آلودگی‌های قارچی مرحله انکوباسیون تخم قزل‌آلای رنگین‌کمان است. از طرفی با توجه به نسبت موجود بین دز

۲۵ و ۱۰۰ که $\frac{1}{4}$ است تاثیر مهم و تعیین‌کننده‌ای از نظر کنترل آلودگی در این دامنه وجود نداشته و می‌توان با توجه به جنبه‌های اقتصادی و مشکلات ناشی از مصرف حجم بالای اسانس، دز 25^{PPM} را به عنوان دز مطلوب کاربرد اسانس اوکالیپتوس به صورت روزانه به مدت ۱ ساعت در کنترل

آلودگی‌های قارچی تخم ماهی قزل‌آلا توجیه نمود.

این تحقیق در غالب پروژه مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و موسسه تحقیقات شیلات ایران انجام شده است. نویسندگان مراتب سپاس خود را از ریاست محترم و معاونین محترم مراکز فوق اعلام می‌نمایند. همچنین از زحمات کارشناسان محترم مرکز تکثیر ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج و بخش بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و نیز شرکت باریج اسانس قدردانی می‌گردد. همچنین از زحمات جناب آقای دکتر باهنر مشاور آماری این پروژه سپاسگزاری به عمل می‌آید.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی که هزینه انجام این تحقیق را متقبل گردیدند، همچنین از سرکار خانم مهندس مهناز رحیمی به خاطر زحماتی که در تدوین نمودارها کشیدند، تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

6. Bailey TA. Effects of 25 Compounds on four Species of aquatic fungi (saprolegnia) pathogenic to fish. *J. Aquaculture*. 1984; 38: 97-104.
7. Bailey TA and Jeffrey SM. Evaluation of 215 Candidate fungicides for use in fish culture. *Fish wild life Div*. 1989; 9.
8. Edgell P, Lawseth D, Mclean WE and Britton EW. The use of salt solution to control fungus (Saprolegnia) infestation on salmonid eggs. *Prog. Fish cult.*, 1993; 55: 48-52.
9. Hardin B. Potassium permanganate kills fishes parasite. *News from the USDA Agriculture Research service*. 2001, pp: 9-12.
10. Marking LL, Rach JJ and Schreier TM. Evaluation of antifungal agents for fish culture. *Prog fish cult*. 1994; 65: 225 – 231.

۱. امیدبگی رضا. بررسی جنبه‌های تولید آویشن و فراوری مواد موثره آن. پژوهش و سازندگی. ۱۳۷۶، شماره ۳۶، صفحات ۷۱ – ۶۷.
۲. نامجو خالص شهرام. بررسی اثرات ضدقارچی گیاهان ایران (قسمت سوم). پایان‌نامه دکتری داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران. شماره ۲۳۴۸. ۱۳۶۳، ۱۲۴ صفحه.
3. Bruno DW and Woo BP. Fish dis. & disorders. Vol 3. CABI publishing. 1994; pp: 599- 659.
4. Bailey TA. Method for in vitro screening of aquatic fungicide. *J. fish Dis*. 1983; 6: 91-100.
5. Bailey TA. Screening fungicide for ues in fish culture. Evaluation of the agar plug transfer, cellophane transfer and agar dilution methods. *Prog. Fish cult*. 1983; 45: 24-27.

11. Neish GA, Hughes GC. Fungal diseases of fish, *T.F.H pub.* 1980; 159.
12. Nelson NC. A review of the literature on the use of malachite green in fisheries. *U.S.Bur. sport fish wild life.* 1974; 79.
13. Noga EJ. *Fish dis, and diagnosis & treatment.* Mosby - year book. Inc, st. Louis. Mo, 1996, 367 p.
14. Rach JJ, How GE and Schreier MT. Safety of formalin treatments on warm and coldwater fishes. *Aquaculture.* 1997; 149: 183-191.

