بررسی مقایسه‌ای اثرات ضدقارچی عصاره سیر و مالاشیت سبز روی تخم و تولید لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) طی دوره انکوباسیون

- **کیا امانی‌دنجی**: گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- **هومن رجبی‌اسلامی***: گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- **مهدی سلطانی**: گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
- **ابولقاسم کمالی**: گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: آذر ١٣٩٦ تاریخ پذیرش: اسفند ١٣٩٦

چکیده

هدف از این تحقیق، بررسی عصاره سیر به‌عنوان ماده ضدقارچ در طی دوره انکوباسیون تخم و لارو ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان و مقایسه اثرات آن با مالاشیت سبز است. بدین‌منظور ٢٤ ساعت پس از لقاح، جهت ضدعفونی تخم‌ها، عصاره سیر در سه گروه با غلظت ٥٠، ١٠٠ و ٢٠٠ میلی‌گرم در لیتر و سه تکرار به‌ازای هر غلظت یک روز در میان و گروه مالاشیت سبز با غلظت ٢ میلی‌گرم در لیتر هر یک به‌صورت حمام ٣٠ دقیقه ای یک روز در میان استفاده شد. گروه شاهد فاقد هرگونه مواد ضدقارچی درنظر گرفته شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیش‌ترین میزان تلفات تخم تا مرحله چشم‌زدگی برای گروه شاهد برابر ١٤٧٧±٦/٩٤ عدد تخم (٣٣/٠±٣٥/١٤ درصد) بود (P<٠/٠٥). هم‌چنین میزان تلفات تخم تا مرحله چشم‌زدگی در تیمار عصاره سیر با غلظت ٢٠٠ میلی‌گرم در لیتر برابر ٥٧٦±٥/٦٠ عدد تخم (١٣/٠±١١/٠٩ درصد) بود که نسبت به سایر تیمارهای عصاره سیر به‌طور معنی‌داری کم‌تر بود (P<٠/٠٥). میزان تلفات تخم در فاصله چشم‌زدگی تا تخم‌گشایی برای تیمار سیر با غلظت ٢٠٠ میلی‌گرم در لیتر برابر ٣٣٥/٦±٩/٨٨ عدد بوده است. درحالی‌که تلفات گروه شاهد برابر ٦٦٦±٧/٠٠ عدد تخم برآورد شد (P<٠/٠٥). تیمارهای سبز مالاشیت (٧٤/١٨±٥/٠ درصد، ٢٠٧±٤/٢ عدد) و عصاره سیر با غلظت ٢٠٠ میلی‌گرم در لیتر برابر (٠/٠٦±٦/٩ درصد، ٢٤١±٣/٨) کم‌ترین میزان تلفات را در مرحله تخم‌گشایی تا وزن ١ گرم داشتند (P<٠/٠٥). درحالی‌که میزان تلفات در گروه شاهد بالاتر از سایر تیمارها بود. از آن‌جاکه هیچ‌گونه بدشکلی و ناهنجاری ظاهری در لاروهای تفریخ شده مشاهده نشد لذا عصاره سیر با غلظت ٢٠٠ میلی‌گرم در لیتر می‌تواند به‌عنوان ماده‌ای ضدقارچ و بی‌خطر برای انسان و محیط‌زیست جهت ضدعفونی تخم‌های ماهی قزل‌آلا طی دوره انکوباسیون و لاروی به‌کار رود.

کلمات کلیدی: مالاشیت سبز، تخم، عصاره سیر، قزل‌آلای رنگین‌کمان

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: rajabi.h@srbiau.ac.ir

مقدمه

آلودگی‌های قارچی یکی از علل بروز تلفات و خسارات در صنعت آبزی‌پروری محسوب می‌شوند (Mousavi و همکاران، ۲۰۰۹). حضور بسیار گسترده ارگانیسم‌های قارچی در منابع آبی و حضور عوامل مستعدکننده از قبیل کیفیت نامطلوب آب، تراکم، حمل و نقل و دستکاری‌های بی‌مورد ازجمله عوامل بروز عفونت‌های قارچی در ماهیان محسوب می‌شوند (Mousavi و همکاران، ۲۰۰۹). ساپرولگنیوز جزو مهم‌ترین بیماری‌های قارچی در ماهیان و تخم آن‌ها محسوب می‌شود (مخیر،۱۳۷۴؛ Noga، ۱۹۹۶). ساپرولگنیا (Saprolegnia) از طریق چسبیدن و نفوذ به دیواره سلول‌های مرده و نیز از طریق تخم‌های مرده به تخم‌های سالم سرایت می‌کند (Bruno و Wood، ۱۹۹۴). از متداول‌ترین روش‌های پیشگیری یا درمان عارضه قارچ‌زدگی در تخم‌های بارور استفاده از مالاشیت سبز می‌باشد. استفاده طولانی مدت از سبز مالاشیت باعث مسمومیت تنفسی، جهش‌های ژنتیکی و افزایش احتمال ابتلا به سرطان می‌شود و هم‌چنین در آبزیان باعث مهار سیستم ایمنی، باقی ماندن در بافت‌ها و توقف رشد خواهد شد (Sirvastava، ۲۰۰۷). در سال ۱۹۹۱ اداره غذا و دارو در آمریکا (FDA= Food and Drug Administration) استفاده از این دارو را ممنوع اعلام کرد (Marking و همکاران، ۱۹۹۴). افزایش عفونت‌های ناشی از قارچ ساپرولگنیا در سال‌های اخیر و محدودیت‌هایی هم‌چون تنوع کم و گران بودن داروهای ضدقارچی، عوارض جانبی و مقاومت قارچ‌ها نسبت به داروهایی که در درمان بیماری‌های قارچی مورد استفاده قرار می‌گیرند، موجب شده است تا پژوهشگران با توجه به پتانسیل گیاهان دارویی، به جستجوی داروهای ضدقارچی جدیدی در میان گیاهان دارویی بپردازند (EbrahimzadehMousavi، ۲۰۰۶؛ Firoozbkhsh و همکاران، ۲۰۱۴). مقاومت‌های دارویی روز افزون قارچ‌ها و افزایش دوز مصرفی داروهای متداول از یک سو و افزایش عوارض جانبی استفاده از این داروها از سوی دیگر، موجب شده است تا در سال‌های اخیر بیش‌ترین توجه به عواملی با پایه طبیعی مانند گیاهان دارویی معطوف شود که دارای حداقل اثرات سوء ذکر شده می‌باشند. گیاه سیر با نام علمی (*Allium sativum*) از خانواده چتریان (Amaryllidaceae) دارای ترکیبات متنوعی از انواع اسیدهای آمینه، مواد معدنی، ویتامین‌ها، فلاونوئیدها، ترکیبات فرار و غیرفرار با ارزش دارویی و درمانی قابل توجه است (Sivam، ۲۰۰۱). در طب سنتی از گیاه سیر به‌عنوان گیاهی با خواص ضدقارچ و ضدباکتری نام برده شده است. ترکیب اکسید دی آلیل دی سولفید به‌عنوان ماده مؤثره سیر، در ایجاد خاصیت ضدقارچی و ضدباکتریایی عصاره این گیاه شناخته شده است (Bozin و همکاران، ۲۰۰۸؛ Kazemipour و همکاران، ۲۰۰۴؛ Ghannoum و همکاران، ۱۹۹۰). مطالعات مختلفی توانایی عصاره سیر را در مقابله با میکروارگانیسم‌ها، درمان زخ ها و جراحات وضعیت سلامت ماهیان مورد تأیید قرار داده‌اند. در مطالعه Kazemipour و همکاران (۲۰۰۴)، اثر کیفی سیر و عصاره بابونه و گل ختمی در ترمیم ظاهری زخم‌های سطحی کپورمعمولی را مورد مقایسه قرار گرفت و نتایج نشان داد که استفاده از سیر نسبت به عصاره بابونه و گل ختمی باعث تسریع در بهبودی و ترمیم زخم‌های سطحی ماهی‌ها می‌شود. در مطالعه‌ای آسیب‌پذیری چندسویه باکتری در مقابل غلظت‌های مختلف عصاره آبی سیر مورد بررسی قرار گرفت (Wei و Musa، ۲۰۰۸) و نشان داده شدکه تمام غلظت‌های سیر در مقابل تست‌های پاتوژن باکتری‌ها مؤثر واقع شده است. با توجه به اثرات مخرب استفاده از مواد شیمیایی در درمان عارضه قارچ‌زدگی تخم‌ها، هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضدقارچی تیمارهای مختلف عصاره سیر به‌عنوان یک ماده گیاهی طی دوران انکوباسیون تخم و تولید لارو ماهی قزل‌آلا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره‌ها: عصاره‌های اتانولی گیاه سیر به سفارش گروه بهداشت و بیماری آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران توسط پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی به‌روش معمول عصاره‌گیری از گیاه خشک تهیه (درجه خلوص ۸۵-۸۰ درصد) و در ظروف دربسته تیره رنگ، دور از نور و در یخچال نگه‌داری شد.

تهیه مولد و استحصال تخم: مولدین قزل‌آلای ۴ ساله، از کارگاه تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان ماهیچال، واقع در استان لرستان، شهرستان الیگودرز (متعلق به شرکت آبزی اکسیر کوثر) با سابقه سلامت بهداشتی، تهیه شدند. پس از انتخاب مولدین نر و ماده به شکل تصادفی و انجام معاینات لازم، نسبت به جداسازی مولدین رسیده‌اقدام گردید. عملیات تخم‌گیری از مولدین، مطابق روش معمول و هرساله کارگاه مذکور بود. به‌طوری‌که پس از بی‌هوشی با پودر گل میخک (۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر) و انجام عملیات تخم‌گیری و اسپرم‌گیری، مخلوط کردن تخمک‌ها با اسپرم با روش لقاح خشک و مرحله جذب آب تخمک‌های لقاح یافته در قالب تیمار و تکرارها مورد استفاده قرار گرفتند. تخم‌های لقاح یافته به‌روش معمول کارگاه به‌آرامی (مطابق با روش تکثیر کارگاه) به سینی‌های تراف منتقل گردید. به‌علاوه تخم‌های مربوط به همه تیمارها هم‌زمان استحصال و استفاده شدند.

تیمارهای عصاره سیر: تیمار سیر شامل سه غلظت (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) که هر غلظت شامل ۳ تکرار (هر تکرار شامل یک تراف حاوی سه سینی تخم و هر سینی حاوی ۳۵۰ گرم تخم) بود. در دوز ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر با حذف تلفات ۲۴ ساعت اولیه تخم، مجموعاً شامل ۱۳۲۳۹ عدد تخم بود و عملیات درمانی در

این دوز از ۳۶ ساعت پس از شروع انکوباسیون آغاز و به‌میزان ۱۲ میلی‌لیتر در لیتر از عصاره سیر به‌مدت ۳۰ دقیقه یک روز درمیان به صورت حمام جاری تا مرحله چشم‌زدگی انجام شد. در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر با حذف تلفات ۲۴ ساعت اولیه تخم، مجموعاً شامل ۱۳۲۱۵ عدد تخم بود و عملیات درمانی در این دوز از ۳۶ ساعت پس از شروع انکوباسیون آغاز و به‌میزان ۲۴ میلی لیتر در لیتر به‌مدت ۳۰ دقیقه، یک روز درمیان به‌صورت حمام جاری تا مرحله چشم‌زدگی انجام شد. در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر با حذف تلفات ۲۴ ساعت اولیه تخم، مجموعاً شامل ۱۳۲۰۶ عدد تخم بود و عملیات درمانی در این دوز از ۳۶ ساعت پس از شروع انکوباسیون آغاز و به‌میزان ۴۸ میلی‌لیتر در لیتر به‌مدت ۳۰ دقیقه یک روز درمیان به‌صورت حمام جاری تا مرحله چشم‌زدگی انجام شد.

تیمار مالاشیت سبز: تیمار سبز مالاشیت (شاهد مثبت) مانند تیمارهای قبلی شامل یک تراف (هر تراف حاوی ۳ سینی و هر سینی ۳۵۰ گرم تخم لقاح یافته) که با حذف تلفات ۲۴ ساعت اولیه تخم، مجموعاً شامل ۱۳۲۲۳ عدد تخم بود. برای درمان نیز از سبز مالاشیت به‌میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر به‌مدت ۳۰ دقیقه توصیه شده توسط سلطانی و همکاران (۱۳۸۸) استفاده شد.

تیمار شاهد: برای تیمار شاهد منفی نیز از یک تراف (حاوی ۳ سینی و هر سینی حاوی ۳۵۰ گرم تخم لقاح یافته) بدون هیچ‌گونه مداخله دارویی استفاده شد که با حذف تلفات تخم در ۲۴ ساعت اولیه پس از انکوباسیون میزان کل تخم استفاده شده برای تیمار شاهد برابر ۱۳۲۸۴ عدد تخم بود.

تعیین درصد تخم‌گشایی: پس‌از انکوباسیون تخم‌های لقاح یافته همان‌طورکه اشاره شد ابتدا نسبت به جمع‌آوری تخم‌های تلف شده پس از ۲۴ ساعت اولیه اقدام، سپس از جمع‌آوری تلفات تا مرحله چشم‌زدگی خودداری نموده و پس از آن به‌صورت روزانه تخم‌های تلف شده به‌آرامی و با دقت تمام سیفون و شمارش گردید. در آخر کار میزان درصد تخم‌گشایی تخم‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (سلطانی و همکاران ۱۳۸۸):

معادله (۱): = تعداد تخم تخم‌گشایی شده
تعداد تخم تلف شده تا مرحله تخم‌گشایی- تعداد تخم اولیه

معادله (۲): = درصد تخم‌گشایی
تعداد تخم اولیه ÷ (۱۰۰× تعداد تخم تخم‌گشایی شده)

تعیین درصد بقا لاروها تا وزن یک گرمی: برای تعیین درصد بقاء لاروهای تخم‌گشایی شده از هر تیمار نسبت به جمع‌آوری و ثبت تلفات روزانه تا وزن یک گرمی اقدام گردید و سپس میزان بقاء لاروها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Ai و همکاران، ۲۰۰۴):

معادله (۳): = تعداد لارو باقی مانده تا یک گرم
تعداد لارو تلف‌شده تاخاتمه آزمایش- تعداد لارو اولیه پس‌از تخم‌گشایی

معادله (۴): نرخ بازماندگی× (Nt – N0) = ۱۰۰
Nt=تعداد ماهیان در ابتدای دوره آزمایش، N0=تعداد ماهیان در انتهای دوره آزمایش

کیفیت آب: برای انجام این تحقیق، اقداماتی مانند کنترل دبی آب روزانه، مراقبت برای جلوگیری از تابش نور در دوران انکوباسیون تخم‌ها، عدم دستکاری تخم‌ها و تنظیم آب ورودی روی تخم‌ها و تراف‌های حاوی لاروها به‌صورت شبانه‌روزی صورت گرفت. آب کارگاه مرکز تکثیر شامل آب چاه عمیق بود و میزان آب ورودی روی تراف تخم‌ها ۰/۸ لیتر در دقیقه و برای لاروها ۵ لیتر در دقیقه تنظیم گردید (فرزانفر، ۱۳۸۴؛ سلطانی و همکاران، ۱۳۹۱). در مورد لاروها نیز تغذیه فعال مطابق روش معمول کارگاه با شنای فعال حدود ۵۰ درصد لاروها و آمدن آن‌ها به سطح آب شروع و در ابتدا لاروها تا وزن ۰/۵ گرمی به‌میزان ۵ درصد وزن بدن با استفاده ازغذای تجاری SFTOO به تعداد حداقل ۱۲ بار در روز تغذیه و سپس تا وزن ۱ گرمی به‌میزان ۴/۵ درصد وزن بدن با استفاده از غذاهای SFTO و SFT1 تغذیه شدند. شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی آب ازجمله دما، اکسیژن محلول و pH به‌صورت‌روزانه اندازه‌گیری می‌شد. میانگین دما، اکسیژن محلول، سختی و pH به‌ترتیب برابر ۱۲±۲، ۸±۱ میلی‌گرم بر لیتر، ۱۸۲±۱۲ میلی‌گرم بر لیتر و ۷/۸±۰/۳ بود.

تجزیه و تحلیل آماری: اختلاف معنی‌دار میان میانگین نتایج آزمایشات توسط آنالیز یک‌طرفه واریانس (ANOVA) در سطح ۵ درصد با استفاده از برنامه SPSS (نسخه ۱۵/۰) مورد سنجش قرار گرفت. میانگین صفات در زمان‌های اندازه‌گیری از آزمون حداقل تفاوت معنی‌داری (LSD) مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج

خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب طی دوره پرورش ماهی قزل‌آلا در جدول ۱ خلاصه‌شده است. در این تحقیق سعی شد تا کلیه فاکتورهای محیطی نظیر دمای آب، جریان آب در انکوباتورها و سایر شرایط تحت کنترل قرار گیرد. عوامل فیزیکی و شیمیایی محیط آزمایش شامل دما، شوری، pH آب اندازه‌گیری و ثبت شد. به‌طوری‌که میانگین دما، pH، اکسیژن محلول و سختی کربناته در طی دوره به‌ترتیب برابر با ۱۲±۰/۲، ۷/۸±۰/۳، ۸±۱ و ۱۸۲±۱۲ به‌دست آمد. نتایج حاصل از تلفات تخم از مرحله چشم‌زدگی تا مرحله تخم‌گشایی در جدول ۲ ارائه شده است. مقایسه نتایج آماری نشان می‌دهد که تعداد و درصد تخم تلف‌شده تامرحله چشم‌زدگی بین تیمارهای مالاشیت سبز، عصاره

سیر و گروه شاهد تفاوت معنی‌داری دارد ($p<0/05$) به‌طوری که بیش‌ترین تعداد و درصد تخم تلف‌شده تا مرحله چشم‌زدگی، در گروه شاهد و کم‌ترین میزان در تیمار مالاشیت سبز با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. هم‌چنین تعداد و درصد تخم تلف‌شده تا مرحله چشم‌زدگی در میان تیمارهای عصاره سیر و مالاشیت سبز به‌طور معنی‌داری متفاوت بود و تیمارهایی که از مالاشیت سبز استفاده شده بود، دارای کم‌ترین میزان و درصد تلفات تخم تا مرحله چشم‌زدگی بودند ($p<0/05$). با افزایش غلظت عصاره سیر تا ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، میزات تلفات تخم تا مرحله چشم‌زدگی، کاهش می‌یابد. با توجه به نتایج مربوط به تعداد و درصد تخم تلف‌شده از چشم‌زدگی تا تخم‌گشایی در هریک از تیمارها، استفاده از غلظت‌های مختلف عصاره سیر و مالاشیت سبز سبب کاهش معنی‌دار تعداد و درصد تخم تلف‌شده از چشم‌زدگی تا تخم‌گشایی نسبت به گروه شاهد شد ($p<0/05$). هم‌چنین میزان تلفات در تیمار عصاره سیر با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارهای عصاره سیر و گروه شاهد کاهش یافت ($p<0/05$).

جدول ۱: خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب طی دوره آزمایش

شاخص	دما (°C)	اکسیژن محلول(ppm)	سختی کربناته کل (ppm)	pH
میزان در آب	۱۲±۰/۲	۸±۱	۱۸۲±۱۲	۷/۸±۰/۳

جدول ۲: نتایج حاصل از تلفات تخم‌های قزل‌آلا درمان شده با عصاره سیر (۵۰، ۱۰۰ و۲۰۰ میلی‌گرم/لیتر)، مالاشیت سبز (۲ میلی‌گرم/لیتر) و شاهد منفی

شاخص	تیمار شاهد	مالاشیت سبز (۲میلی‌گرم/لیتر)	عصاره سیر (۵۰ میلی‌گرم/لیتر)	عصاره سیر (۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر)	عصاره سیر (۲۰۰میلی‌گرم/لیتر)
تعداد تخم اولیه	۴۴۱۱±۴/۵۰^{a}	۴۴۰۸±۴/۳۸^{a}	۴۴۱۳±۴/۵۸^{a}	۴۴۰۵±۷/۱۳^{a}	۴۴۰۲±۳/۶۰^{a}
تعداد تخم تلف‌شده تا چشم‌زدگی	۱۴۷۷±۶/۹۴^{a}	۴۹۸±۵/۱۱^{e}	۶۰۸±۵/۷۸ ^{b}	۵۸۹±۴/۰۰^{C}	۵۷۶±۵/۶۰^{d}
درصد تخم تلف‌شده تا چشم‌زدگی	۳۳/۳۵±۰/۱۴^{a}	۱۱/۲۹±۰/۱۲^{d}	۱۳/۷۷±۰/۱۲^{b}	۱۳/۳۷±۰/ ۰۷^{c}	۱۳/۱۱±۰/ ۰۹ ^{c}
تعداد تخم تلف‌شده از چشم‌زدگی تا تخم‌گشایی	۶۶۶±۷/۰۰^{a}	۳۰۵±۷/۲۱^{d}	۳۷۷±۴/۰۵^{b}	۳۶۹±۴/۴۸^{b}	۳۳۵/۶±۹/۸۸^{c}
درصد تخم تلف شده از چشم‌زدگی تا تخم‌گشایی	۰/۱۶±۵/۰۳^{d}	۰/۱۵±۶/۹^{c}	۰/۰۹±۸/۵۴^{a}	۰/۱۱±۸/۴^{a}	۰/۲۱±۷/۶۲^{b}
مجموع تعداد تخم تلف‌شده تا تخم‌گشایی	۳۲۱۴±۱۳^{a}	۸۰۳±۲/۲۲^{d}	۹۶۱/۴±۳۲/۹^{b}	۹۵۸±۴/۰۹^{b}	۹۱۱/۶±۳/۸^{c}

*حروف مشابه و متفاوت در هر ستون به‌ترتیب نشانگر عدم اختلاف معنی‌دار و وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشند.

با توجه به نتایج مربوط به درصد بازماندگی تخم‌های قزل‌آلا که در جدول ۳ ارائه شده است، بیش‌ترین درصد بازماندگی از تخم تا مرحله چشم‌زدگی و تخم‌گشایی مربوط به تیمار مالاشیت سبز برابر ۸۸/۷۱±۰/۱۱ و کم‌ترین درصد مربوط به گروه شاهد برابر ۶۶/۶۵±۰/۱۴ بود. مقایسه نتایج آماری مربوط، حاکی از آن است که میزان درصد بازماندگی از تخم تا مرحله چشم‌زدگی و تخم‌گشایی بین تیمارهای عصاره سیر و مالاشیت سبز تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد ($p<0/05$) به‌طوری‌که این درصد در تیمار مالاشیت سبز به‌طور معنی‌داری بالاتر بود. هم‌چنین تیمار عصاره سیر با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر دارای بیش‌ترین درصد بازماندگی نسبت به سایر تیمارهای عصاره سیر در مراحل چشم‌زدگی و چشم‌گشایی بود. براساس نتایج ارائه شده در جدول ۴، میزان تلفات لارو در میان تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد معنی‌دار بود، به‌طوری‌که کم‌ترین میزان تلفات در لارو قزل‌آلا از مرحله تخم‌گشایی تا وزن یک گرمی در تیمار سبز مالاشیت مشاهده شد و هم‌چنین تیمار عصاره سیر با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر در میان تیمارهای عصاره سیر کم‌ترین میزان تلفات را داشت که برابر با ۲۴۱±۳/۸ بود ($P<0/05$). هم‌چنان که مشخص است با توجه به نتایج مذکور، بیش‌ترین درصد بازماندگی لاروها مربوط به تیمار مالاشیت سبز و کم‌ترین میزان برای تیمار شاهد بود. درصد بازماندگی لارو در تیمارهایی که از عصاره سیر با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده کردند، به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سایر تیمارهای عصاره سیر و گروه شاهد بود ($p<0/05$).

جدول ۳: نتایج درصد بازماندگی تخم‌های قزل‌آلا درمان شده با عصاره سیر (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰میلی‌گرم/لیتر)، مالاشیت سبز (۲میلی‌گرم بر لیتر) و شاهد منفی

شاخص	تیمار شاهد	مالاشیت سبز (۲ میلی‌گرم/لیتر)	عصاره سیر (۵۰میلی‌گرم/لیتر)	عصاره سیر (۱۰۰میلی‌گرم/لیتر)	عصاره سیر (۲۰۰ میلی‌گرم/لیتر)
درصد بازماندگی تخم تا چشم‌زدگی	۶۶/۶۵±۰/۱۴^{c}	۸۸/۷۱±۰/۱۱^{a}	۸۶/۲۳±۰/۰۹^{b}	۸۶/۶۳±۰/۰۱^{b}	۸۶/۸۹±۰/۰۸^{b}
درصد بازماندگی از چشم‌زدگی تا تخم‌گشایی	۸۴/۹۷±۰/۰۷^{d}	۹۳/۱±۰/۱۳^{a}	۹۱/۴۶±۰/۱۱^{c}	۹۱/۶±۰/۰۹^{c}	۹۲/۳۸±۰/۱۵^{b}

* حروف مشابه و متفاوت در هر ستون به‌ترتیب نشانگر عدم اختلاف معنی‌دار و وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشند.

جدول۴: نتایج حاصل از تلفات و بازماندگی لارو قزل‌آلای تولیدی تا وزن یک گرم حاصل از تراف‌های تخم درمان شده با عصاره سیر (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/لیتر)، مالاشیت سبز (۲ میلی‌گرم/لیتر) و شاهد منفی

شاخص	تیمار شاهد	مالاشیت سبز (۲ میلی‌گرم/لیتر)	عصاره سیر (۵۰ میلی‌گرم/لیتر)	عصاره سیر (۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر)	عصاره سیر (۲۰۰ میلی‌گرم/لیتر)
تعداد لارو اولیه	۲۲۸۵±۱۵/۱^{d}	۳۶۰۵±۲/۶^{a}	۳۴۵۱±۲۸/۹^{c}	۳۴۴۷±۴/۵^{c}	۳۴۹۰/۳±۱۱/۵^{b}
تعداد لارو تلف شده (٪)	۲۷۰/۳±۷/۳^{a} (۱۱/۸۲±۰/۲۵)	۲۰۷±۴/۲^{c} (۵/۷۴±۰/۱۸)	۲۶۵±۵/۵^{b} (۷/۷±۰/۱۷)	۲۶۶±۴/۰^{a} (۷/۷۱±۰/۱۲)	۲۴۱±۳/۸^{c} (۶/۹±۰/۰۶)
تعداد لارو باقی‌مانده (٪)	۲۰۱۴/۶±۹/۰۱^{d} (۸۸/۱۷±۰/۲۵)	۳۳۹۸±۱/۷^{a} (۹۴/۲±۰/۱۱)	۳۱۸۶±۳۴/۱^{c} (۹۲/۷۱±۰/۱۷)	۳۱۸۱±۸/۵^{c} (۹۲/۲±۰/۱)	۳۲۴۹/۳±۸/۶^{b} (۹۳±۰/۰۶)

* حروف مشابه و متفاوت در هر ستون به ترتیب نشانگر عدم اختلاف معنی‌دار و وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشند.

بحث

یکی از راهکارهای افزایش مقاومت حیوانات در مقابل شرایط تنش‌زا که می‌تواند رشد مناسب آن‌ها را درپی داشته باشد، بهبود شرایط پرورش ماهیان درشرایط اسارت به‌وسیله کنترل عوامل فیزیکی و شیمیایی آب است. با شناخت عوامل زیستی و فراهم کردن محیط زیست مناسب برای آن‌ها، می‌توان ظرفیت تولیدمثل ماهی را در کشور افزایش داد. دما، pH، سختی و اکسیژن آب استخرهای پرورشی ماهی قزل‌آلا به‌ترتیب برابر ۱۸-۱۲ درجه سانتی‌گراد، ۹- ۶/۵، ۴۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد (طیبی و اردکانی، ۱۳۹۱). در تحقیق حاضر نیز (جدول ۱) خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب ذکر شده است که در دامنه قابل قبول برای ماهی قزل‌آلا است.

ساپرولگنیاسیس از مشکلات عمده دوره انکوباسیون تخم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌حساب می‌آید و تاکنون مؤثرترین روش برای درمان این بیماری را مدیریت صحیح بهداشتی و استفاده از مواد شیمیایی دانسته ند (Akhlaghi و Bahaodini، ۲۰۱۲). با توجه به این که‌قارچ‌های آبی به‌ویژه خانواده ساپرولگنیاسه درمنابع آبی تأمین‌کننده مراکز تکثیر وجود دارند و موجب کاهش تولید این مراکز می‌شوند (Wolf، ۱۹۵۸) و هم‌چنین ممنوعیت استفاده از موادی نظیر مالاشیت سبز، یافتن داروی جایگزین مناسب نظیر استفاده از مواد گیاهی و یا ترکیباتی که کم‌ترین مشکلات زیست‌محیطی را دربر داشته باشند، امری ضروری در مراکز تکثیر محسوب می‌شوند. درمان با داروهای شیمیایی و سنتزی علی‌رغم نتیجه بخش بودن دارای عوارض جانبی می‌باشند و ممکن است مقاومت داروئی ایجاد کنند (Sagdic، ۲۰۰۳). مالاشیت سبز یک عامل ضدقارچی است اما دارای خواص ناهنجاری و جهش‌زایی می‌باشد و سبب ناهنجاری در تخم و ماهی می‌شود که از سال ۱۹۹۱ ممنوع اعلام شده است (Kitancharoen، ۱۹۹۸). از این رو جهت درمان ساپرو لگنیازیس، سایر روش‌های درمانی با تعیین MIC (Minimum Inhibitory Concentration) پیشنهاد شده است. سیر یکی از ترکیبات گیاهی موثر در جلوگیری از بیماری‌های قارچی می‌باشد. مهم‌ترین جزء مؤثر سیر ترکیب آلی سولفورداری به‌نام آلیسین (Alicin) می‌باشد که خواص ضدقارچی گیاه سیر روی باکتری‌ها و قارچ‌ها ازجمله ساپرولگنیا را می‌توان به آن نسبت داد. خواص ضدمیکروبی و ضدقارچی سیر در مطالعات دیگر نیز به‌اثبات رسیده است (Harris و همکاران، ۲۰۰۱). تحقیقات Hussein و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که گیاه سیر دارای اثرات ضدباکتریایی بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی و گونه‌های آئروموناس در ماهی نیل تیلاپیا دارد. Venogopal و همکاران (۱۹۹۵)، فعالیت ضدقارچی سیر را علیه ۱۱ سویه بالینی درماتوفیت بررسی کردند که نتایج نشان‌دهنده آن بود که سیر می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب ضد درماتوفیتی مؤثر مورد استفاده قرار گیرد. این نتایج مشابه مطالعه حاضر تأییدکننده اثرات ضدقارچی قوی سیر می‌باشد. در تحقیق حاضر، استفاده از ترکیبات عصاره سیر و مالاشیت سبز تاثیر مثبتی بر کاهش میزان تلفات و افزایش بازماندگی لاروها داشته است. همان‌طورکه نتایج تحقیق نشان می‌دهد، روند تلفات تخم در مرحله چشم‌زدگی، چشم‌گشایی و لاروی در گروه شاهد بیش‌تر از سایر تیمارها است و با تیمارهای عصاره سیر و مالاشیت سبز تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد. دلیل این تفاوت را می‌توان عدم استفاده از هرگونه ماده ضدعفونی کننده در گروه شاهد دانست. کم‌ترین میزان تلفات تخم در مرحله چشم‌زدگی و چشم‌گشایی در تیمار مالاشیت سبز مشاهده شد. هم‌چنین در تیمارهای عصاره سیر میزان تلفات تخم در مرحله چشم‌زدگی و چشم‌گشایی نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود و با افزایش غلظت عصاره سیر تعداد تلفات کاهش داشت. بنابراین می‌توان بیان کرد که عصاره سیر دارای اثر ضدقارچی قابل توجه در مقایسه با مواد رایج مانند سبز مالاشیت است که به‌علت خاصیت ضدعفونی کنندگی قوی‌شان به‌میزان زیادی مورد توجه می‌باشند.

طی مطالعه مشابهی ارزیابی اثرات اسانس آویشن شیرازی بر میزان تفریخ تخم قزل‌آلا رنگین‌کمان و درصد بقای لارو آن در مقایسه با آب اکسیژنه و مالاشیت سبز مورد بررسی قرار گرفت که درآن استفاده از غلظت میلی‌گرم در لیتر اسانس آویشن به‌مدت یک ساعت در روز منجر به ۶۳/۹۴ درصد بازماندگی تخم تا مرحله تفریخ و ۸۹/۱۳ درصد تا تولید لارو یک گرمی گردید (Wolf، ۱۹۵۸). در تحقیقی دیگر Sharif Rohani و همکاران (۲۰۰۶) غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسانس آویشن شیرازی در فاصله زمانی ۲۴ ساعت پس از لقاح تا مرحله چشم‌زدگی در دمای ۱۱ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک ساعت در روز را استفاده نمودند که بیش‌ترین درصد تفریخ تخم به‌میزان ۴/۳۴ درصد در تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر حاصل شد (Sokman و همکاران، ۱۹۹۹). براساس نتایج این مطالعه، گروه شاهد کم‌ترین میزان بازماندگی را در مراحل چشم‌زدگی و چشم‌گشایی نسبت به تیمار عصاره سیر و مالاشیت سبز داشت. با توجه به نتایج این تحقیق، میزان بازماندگی لاروها در تیمار مالاشیت سبز نسبت به سایر تیمارها به‌طور معنی‌داری بالاتر است. هم‌چنین براساس این نتایج، عصاره سیر با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر تاثیر به‌سزایی در کاهش تعداد تلفات لارو داشته است که این امر احتمالاً ناشی از تاثیر ضدقارچی این عصاره می‌باشد.

در مطالعات مشابه militz و همکاران (۲۰۱۴) اثر عصاره سیر با غلظت‌های ۲۰،۱۰،۲،۱ میلی‌گرم در لیتر را روی تفریخ تخم ماهی *Neobenedia* آزمایش کردند. براساس این آزمایش تیمارهای سیر بهترین نتیجه را نسبت به فرمالین از خودنشان دادند.

براساس بررسی حاضر، استفاده از مالاشیت سبز سبب کاهش میزان تلفات تخم، لارو و افزایش درصد بازماندگی لاروها شد. هم‌چنین استفاده از غلظت‌های بالای عصاره سیر (۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) نیز میزان تلفات تخم را نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش داد و سبب بهبود بازماندگی لاروی در ماهیان شد. با توجه به اثرات مخرب و سرطان‌زا مالاشیت سبز و ممنوعیت استفاده از آن در آبزی‌پروری، می‌توان عصاره سیر را به‌عنوان جایگزینی مناسب در این امر معرفی کرد. گیاه سیر به‌دلیل دارا بودن ترکیبات ضدقارچی از جمله ترکیب آلیسین دارای تاثیر ضدقارچی مناسبی روی ساپرولگنیا در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد و هم‌چنین به‌دلیل سرعت تجزیه بالای عصاره‌های گیاهی و عدم آلودگی محیط زیست می‌توان عصاره سیر را به‌عنوان یک ترکیب ضدعفونی کننده در پیشگیری از ساپرولگنیا در کارگاه‌های تکثیر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده کرد.

منابع

۱. **سلطانی، م.؛ ظریف‌منش، ط. و ذریه‌زهرا، س.ج.، ۱۳۹۱.** مطالعه تاثیر اسانس آویشن شیرازی بر میزان فعالیت سیستم عامل مکمل و لیزوزیم خون ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان. مجله علمی شیلات ایران. دوره ۲۱، شماره ۴، صفحات ۱۳ تا ۲۲.

۲. **سلطانی، م.؛ اسفندیاری، م.؛ خضرائی‌نیا، م.س. و سجادی، م.، ۱۳۸۸.** ارزیابی اثرات اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر میزان تفریخ تخم قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhyncus mykiss*) و درصد بقاء لارو آن در مقایسه با آب اکسیژنه و مالاشیت گرین. مجله تحقیقات دامپزشکی. شماره ۲، صفحات ۱۲۷ تا ۱۳۴.

۳. **طیبی، ل. و اردکانی، س.، ۱۳۹۱.** سنجش پارامترهای کیفی آب رودخانه گاماسیاب و عوامل موثر بر آن. علوم و تکنولوژی محیط زیست. دوره ۱۴، شماره ۲، صفحات ۳۷ تا ۴۹.

۴. **فرزانفر، ع.، ۱۳۸۴.** تکثیر و پرورش آزاد ماهیان. انتشارات موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۶۷ صفحه.

۵. **مخیر، ب.، ۱۳۷۴.** بیماری‌های ماهیان پرورشی. انتشارات دانشگاه تهران. صفحات: ۱۷۶ تا ۱۹۴.

۶. **Ai, Q.H.; Mai, K.S.; Zhang, C.X., Xu, W.; Duan, Q.Y.; Tan, B.P. and Liufu, Z.G., 2004.** Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. Aquacult. Vol. 242, pp: 489-500.

۷. **Akhlaghi, M. and Bahaodini, A.A., 2012.** Compare several treatments to combat Saprolegniasis in fertilized eggs of rainbow trout. Veterinary Journal Res and Develop. Vol. 94, pp: 18-24.

۸. **Bozin, B.; Mimica-Dukic, N.; Samojlik, I.; Goran, A. and Igic, R., 2008.** Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum*). Food Chem. Vol. 111, No. 4, pp: 925-929.

۹. **Bruno, D.W. and Wood, B.P., 1994.** *Saprolegnia* and other Oomycetes. In Fish Diseases and Disorders, Viral, Bacterial and Fungal Infections. Edited by P.T.K. Woo and D.W. Bruno. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, United Kingdom. pp: 599-659.

١٠. **Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., 2006.** Evaluation of eucalyptus essential oil in controlling fungal contamination of eggs of rainbow trout. Journal of Plant Res. Vol. 20, pp: 42-47.

١١. **Firoozbkhsh, F.; Afsarian, F.M.; Houshangi, S. and Badali, H., 2014.** Antifungal effects of fennel, yarrow, fennel, cinnamon and Artemisia in vitro against *S. parasitica*. Iranian Journal of Medical Sci. Vol. 17, No. 5. pp: 60-69.

١٢. **Ghannoum, M., 1990.** Inhibition of Candida adhesion to buccal epithelial cells by an aqueous extract of *Allium sativum* (garlic). Journal of Apply Bacteriol. Vol. 68, No. 2. pp: 163-169.

١٣. **Ghasemi Pirbaloti, A.; Ghasemi, M.R.; Momtaz, H.; Golparvar, A.R.; Hamedi, B. and Shahgholian, L., 2010.** Effect of several medicinal plants of the bacterium Brucellaabortus (Brucella abortus) in terms of in vivo and in vitro. Herbal Medic.Vol. 1, pp: 21-28.

١٤. **Harris, J.C.; Cottrell, S.L.; Plummer, S. and Loyd, D., 2001.** Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). Appllied of Microb and Biotech. Vol. 57, No. 3. pp: 282-286.

١٥. **Hussein, M.M.A.; Hamdy Hassan, W. and Ibrahim Moussa, I.M., 2011.** Potential use of allicin (garlic, *Allium sativum* Linn, essential oil) against fish pathogenic bacteria and its safety for monosex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Food Agri and Environ. Vol. 11, No. 1, pp: 696-699.

١٦. **Kazemipour, Y.; Rezaei, M. and Keyvani, Y., 2004.** Compare the qualitative effect of garlic extract, chamomile and mallow in healing the wounds of the surface appearance of common carp (*Cyprinus carpio*). Res and Develop in Cattle Breeding and Aquacul. Vol. 17, No. 4, pp: 93-97.

١٧. **Kitancharoen, N.; Yamato, A. and Hatai, K., 1998.** Effect of sodium chloride hydrogen peroxide and malachite green on fungal infection in rainbow trout eggs. Biocontrol Sci. Vol. 3, pp: 113-115.

١٨. **Marking, LL., Rach, J.J. and Schreier, T.M., 1994.** Evaluation of antifungal agents for fish culture. Prog Fish Cult. Vol. 56, pp: 225-231.

١٩. **Militz, T.A.; Southgate, P.C.; Carton, A.G. and Hutson, K.S., 2014.** Efficacy of garlic (*Allium sativum*) extract applied as a therapeutic immersion treatment for *Neobenedenia* sp. management in aquaculture. Journal of Fish Dis. Vol. 37, pp: 451-461.

٢٠. **Mousavi, S.M.; Mirzargar, S.S.; Ebrahimzadeh Mousavi, H.; Omid Baigi, R.; Khosravi, A.; Bahonar, A. and Ahmadi, M.R., 2009.** Evaluation of Antifungal Activity of New Combined Essential Oils in Comparison with Malachite Green on Hatching Rate in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Eggs. Jornal of fish and aqua sci. Vol. 4, No. 2, pp: 103-110.

٢١. **Noga, E.J., 1996.** Fish Diseases and Diagnosis and Treatment. Mosby Year Book, Inc, St. Louis, Mo, USA.

٢٢. **Noga, E.J., 1996.** Fish Disease, Diagnosis and Treatment. Mosby year book. 565 pp.

٢٣. **Plakas, S.M.; Doerge, D.R. and Turnipseed, S.B., 1999.** Disposition and metabolism of malachite green and other therapeutic dyes in fish. In Xenobiotics in fish. Ed. by Smith, D. J., W. H. Gingerich, and M. G. Beconi-Barker. Kluwer Academic/Plernum Publishers, New York. pp: 149-166.

٢٤. **Sagdic, O., 2003.** Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. LWT. Food Sci and Techno. Vol. 36, No. 5, pp: 467-473.

٢٥. **Sharif Rohani, M.; Ebrahimzadeh Mousavi, H.; Khosravi, A.; Mokhayer, B.; Bahonar, A.; Mirzargar, S. and Mehrabi, Y., 2006.** Evaluation of Geranium herbarum essence application in control of fungal contamination in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. Journal of Facul of Veterin Medicine. Vol. 61, No. 3, pp: 269-272.

٢٦. **Sivam, G.P., 2001.** Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as supplement. American Soci Nutr Sci. Vol. 131, pp: 1106-1108.

۲۷. **Srivastava, K., 2007.** Green supply-chain management: a state-of-the-art literature review. International Journal of Manag Review, Vol. 9, No. 1, pp: 53-80.

۲۸. **Sokman, A.; Jones, B.M. and Erturk, M., 1999.** The in vitro antibacterial activity of Turkish medicinal plants. Ethnopharmac. Vol. 67, pp: 79-86.

۲۹. **Venugopal, P.V. and Venugopal, T.V., 1995.** Antidermatophytic activity of garlic (*Allium sativum*) in vitro. International Journal of Dermato. Vol. 34, No. 4, pp: 278-289.

۳۰. **Wei, L. and Musa, N., 2008.** Inhibition of Edwardsiella tarda and other fish pathogens by *Allium sativum* extract. American-Eurasian Journal of Agri & Environ Sci. Vol. 3, pp: 692-696.

۳۱. **Willoughby, L.G., 1994.** An ecological study of water at the medium of growth and reproduction of Saprolegnia from salmonid fish. Trans Br Mycol Soc. Vol. 87, No. 87, pp: 493-502.

۳۲. **Wolf, K., 1958.** Fungus of Saprolegnia infestation on incubating fish eggs. Fishery health. Fish Wildlife Service U.S. Vol. 460, pp: 1-4.