ارزیابی اثرات ضد قارچی محلول هوآسان تی آر۵۰ (Huwa -San TR- 50) بر قارچ ساپرولگنیا (*Saprolegnia* sp.) درشرایط آزمایشگاهی و معرفی آن به عنوان جایگزین مالاشیت گرین

مریم قیاسی[1*]، ابوالفضل سپهداری[2]، محمد بینایی [1]، فرشیده حبیبی کوتنایی [1] ، مینوسلطانی[3]

۱ - پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، فرح آباد، ص پ ۹۶۱

۲ - موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

۳ – بخش قارچ شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران

*مسئول مکاتبات: ghiasimaryam4@gmail.com

چکیده

جنس ساپرولگنیا و گونه‌های آن از مهمترین عوامل قارچی بیماریزا در ماهیان با گسترش جهانی هستند. تا سال ۲۰۰۲ در کشورهای اروپایی و آمریکا جهت کنترل این پاتوژن در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان از مالاشیت گرین استفاده می‌گردید ولی به دلیل اثرات سرطانزایی و سمی بودن آن مصرف آن منع گردید. مطالعات مختلفی تاکنون در خصوص معرفی ترکیب ضد قارچ مناسب جایگزین مالاشیت گرین انجام شده است. هوآسان تی آر-۵۰ یک ماده ضد عفونی کننده برپایه پراکسید هیدروژن است که در یک لیتر آن ۵۷۰ گرم پراکسید هیدروژن و ۰/۳۶ گرم نقره کلوئیدی به عنوان پایدار کننده قرار دارد. هدف از انجام این تحقیق ارزیابی اثرات ضد قارچی این ترکیب در شرایط آزمایشگاه و نیز تعیین میزان (Minimum Leathal Concenteration) MLC وMIC (Minimum Inhibitory Concentaration) آن در مقایسه با مالاشیت گرین بر نمونه ساپرولگنیا (Saprolegnia sp.) جداسازی شده از هچری ماهی قزال آلا(*Oncorhynchus mykiss*) است. برای انجام آزمایشات MIC و MLC از دوزهای ppm ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰، ۹۰۰و ۱۰۰۰ استفاده شد. براساس نتایج میزان MIC و MLC بر روی نمونه ساپرولگنیا جداسازی شده از هچری ماهی قزل آلای رنگین کمان به ترتیب ۴۰۰ ppm (میکرولیتر در لیتر) و ۸۰۰ppm (میکرو لیتر در لیتر) تعیین گردید. براساس نتایج حاصل از این بررسی به نظر می‌رسد هوآسان تی آر-۵۰ بتواند به عنوان جانشین مناسب برای کنترل قارچ زدگی در هچری ماهیان مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: ساپرولگنیازیس، هوآسان، قارچ زدگی، تخم ماهی، پراکسید هیدروژن

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

مقدمه

جنس ساپرولگنیا متعلق به رده اوومیست‌ها، گروهی از ارگانیسم‌های هتروتروف هستند که بصورت ساپروفیت و یا انگل در طیف وسیعی از میزبانان در طبیعت زندگی می‌کنند (Robertson *et al.*, 2009; Phillips et al., 2008). مهمترین گونه‌های بیماری‌زا در آبزیان که تاکنون شناسایی شده‌اند شامل ساپرولگنیا دیکلینا (*S. diclina*)، ساپرولگنیا فراکس (*S. ferax*)، ساپرولگنیا استرالیس (*S. australis*)، ساپرولگنیا مونوایکا (*S. monoica*) و ساپرولگنیا پارازیتیکا (*S. parasitica*) هستند(Molina *et al.*, 1995; Hussein *et al.*, 2001; Stueland *et al.*, 2005; Dieguez-Uribeondo *et al.*, 2007; Fernandez-Beneitez *et al.*, 2008; Petrisko *et al.*, 2008; Phillips et al., 2008; Ke *et al.*, 2009; Ghiasi *et al.*, 2010). در هچری‌ها، گونه‌های ساپرولگنیا می‌توانند تخم‌های مرده ماهیان را آلوده نمایند و از این کانون عفونت با قابلیت شیمیوتاکسی مثبتی که دارند به تخم‌های زنده نیز سرایت کنند. این پدیده در واقع ناشی از سیگنال‌های شیمیایی است که از تخم‌های زنده به قارچ داده می‌شوند و موجب حرکت قارچ بطرف آنها می‌گردد. هنگام استقرار قارچ بر روی تخم مرده، زئواسپورهای فراوانی ایجاد و نتیجه آن انتشار آلودگی در هچری است. لذا تخم مرده، مهمترین کانون آلودگی است. به عبارت دیگر در شرایط عادی قارچ قادر به آلوده ساختن تخم زنده نیست ولی با حضور تخم مرده قارچ زده قادر به تولید میزان فراوانی از میسلیوم است که تجمع این حجم بالای میسلیوم‌ها در اطراف تخم‌های زنده سبب کاهش دسترسی آنها به اکسیژن شده و زمینه خفگی و مرگ تخم‌های زنده فراهم را می‌کند. پس از مرگ قارچ قادر به نفوذ در تخم بوده و چرخه تکثیر ادامه می‌یابد (Espeland and Hansen, 2004). بعضی محققین عقیده دارند که نفوذ هایف قارچ به دیواره کوریونیک (chorionic membrane) سلول تخم تنظیم اسمزی تخم و جنین موجود در آن را به هم زده و سبب مرگ تخم می‌شود (Beakes *et al.*, 1994). تخمین زده می‌شود در هچری ماهیان سردآبی به ازا هر ۱۰ عدد تخم، یک تخم در اثر ساپرولگنیازیس می‌میرد (Hussein and Hatai, 2001). مالاشیت گرین اولین ترکیب شیمیایی برای کنترل ساپرولگنیازیس بود که برای اولین بار در سال ۱۹۳۶ در صنعت آبزی‌پروری استفاده گردید (Clup and Beland, 1996). این ماده با مهار آنزیمهای تنفسی(گروه سیتوکروم اکسیداز) سبب آسیب به سیستم نقل و انتقال انرژی سلولهای قارچی شده و مانع هرگونه فعالیت متابولیسمی می‌گردد و در نهایت سبب مرگ سلولهای قارچی می‌شود. علی رغم اثر قارچ-کشی خوب و قیمت ارزان مالاشیت، بتدریج با شناخت عوارض این دارو در ماهی و انسان بصورت عوارض ناقص‌الخلقه زایی و سرطانزایی، مصرف این ماده توسط سازمان غذا و دارو ایالت متحده (UFDA) از سال ۱۹۹۶ میلادی و توسط اتحادیه اروپا از سال ۲۰۰۲ در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان ممنوع گردید (Espeland and Hansen, 2004). با توجه به عوارض سوء مالاشیت گرین، طیف وسیعی از مطالعات در خصوص یافتن جایگزینی مناسب برای آن جهت کنترل ساپرولگنیازیس در آبزی پروری آغاز شد. یکی از ترکیبات مهم که قابلیت جایگزینی مالاشیت را داشت پراکسید هیدروژن بود. قابلیت ضد میکروبی

پراکسید هیدروژن به خاطر پراکسیداسیون و تخریب ترکیبات دیواره سلولی باکتری و قارچ، اکسیداسیون ترکیبات اکسیژن زدا و گروه های تیول، ممانعت از عملکرد آنزیم‌ها، اکسیداسیون اسیدهای نوکلئیک، اختلال در زنجیره تولید انرژی و اختلال در مسیر پروتئین سازی است که در نهایت به مرگ سلول قارچ یا باکتری منجر می‌شود(Finnegan *et al*., 2010). هواسان یک ماده ضد عفونی کننده برپایه پراکسید هیدروژن است. یک لیتر از هواسان تی آر-۵۰ حاوی ۵۷۰ گرم پراکسید هیدروژن است. پراکسید هیدروژن به تنهایی در شرایط محیطی پایدار نبوده و به تدریج به آب و اکسیژن تبدیل می‌شود. آنچه که هواسان تی آر-۵۰ را مستثنی می‌کند وجود یک ماده پایدار کننده و افزایش دهنده طول عمر پراکسید هیدروژن است که چیزی جز فلز نقره نیست. در هر لیتر از هواسان ۰/۳۶ گرم نقره وجود دارد. هواسان تی آر-۵۰ در طیف وسیعی از pH فعال بوده، فاقد بو و رنگ است. کاملا در آب حل شده و تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد فعال است. در محیط‌های با سطح آلودگی کمتر پایداری و قدرت ضد عفونی کنندگی بیشتری دارد. این ماده مناسب برای کشتن انواع ویروس، باکتری، قارچ، اسپور، آلگ و آمیب بوده و قابلیت مصرف در گاو داری‌ها، مرغ داری‌ها و مراکز پرورش اسب را دارد (Roma technology, 2010)

مواد و روش کار

۱ – جداسازی و شناسایی قارچ ساپرولگنیا : تخمهای قارچ زده قزل آلا با استفاده از پنس در ظروف درب دار حاوی آب مقطر استریل جمع‌آوری و به آزمایشگاه، ارسال گردید. در آزمایشگاه، پس از شتشو تخم با آب مقطر استریل، مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۸ - ۱۲ درجه سانتی‌گراد در ظروف حاوی آب مقطر استریل و آنتی بیوتیک(جهت ممانعت از رشد عوامل باکتریایی) گرمخانه گذاری گردید. پس از آن نمونه ها پس از شستشوی مجدد با آب مقطر استریل به‌صورت تلقیحی در پلیتهای حاوی Glucose Yeast extract chloramphenicol Agar(YGC) به صورت تلقیحی کشت داده و به مدت ۵ روز در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند (Ghiasi *et al*., 2010). برای خالص سازی پرگنه از حاشیه پرگنه‌های رشد کرده با استفاده از اسکالپل استریل نمونه برداشته و مجددا پاساژ داده شد و با تهیه لام میکروسکوپی و مشاهده ساختار میکروسکوپی هایف، اسپورانژیوم و گما تولید شده و اطمینان از خلوص پرگنه کشت نهایی انجام و نمونه خالص تهیه گردید (Dayal, 2001) (شکل ۱ و ۲)

شکل ۱ – پشت و سطح پرگنه خالص ساپرولگنیا

شکل ۲ - نمای میکروسکوپی زئواسپور و گما قارچ ساپرولگنیا

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

۲ - انجام آزمایشات MIC (Minimumum Inhibitory Concenteration)

برای انجام کار دوزهای (ppm) میکرولیتر در لیتر ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰، ۹۰۰ و ۱۰۰۰ از هواسان تی آر-۵۰ به محیط کشت YGC آگار افزوده شد. به این ترتیب که برای هر دوز ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت تهیه و پس از اتوکلاو شدن و رسیدن محیط کشت به دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد دوز مورد نظر به ظرف حاوی محیط کشت افزوده و سپس محیط تهیه شده در سه پلیت (برای هر دوز سه تکرار در نظر گرفته شد) تقسیم و نمونه تلقیحی از کشت خالص ساپرولگنیا به قطر ۴ میلی متر

به پلیت تلقیح شد. پلیت فاقد محلول هواسان تی آر-۵۰ به عنوان کنترل مثبت و پلیت حاوی۲ (ppm) میلی گرم در لیتر مالاشیت گرین به عنوان نمونه منفی مورد استفاده قرار گرفت. پس از این مرحله پلیت‌ها به مدت ۶ روز در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شده و در روزهای ۳ و ۶ آزمایش هاله رشد قارچ مورد بررسی و اندازه‌گیری قرار گرفت. (شکل ۳ و ۴) (Tampieri *et al*., 2003).

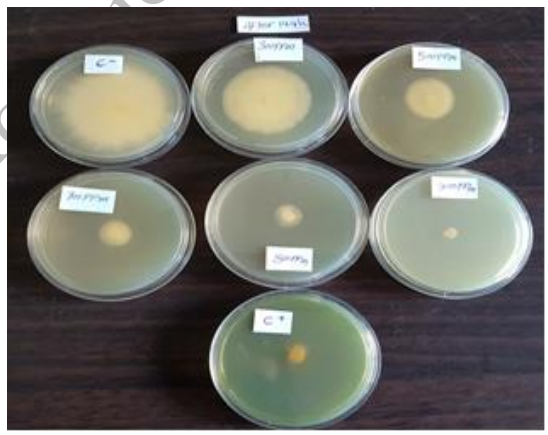
۳ - انجام آزمایشات MLC (Minimumum Leathal Concenteration)

جهت انجام این آزمایش ابتدا محیط کشت GY براث براساس فرمول Willoughby و Pickering (۱۹۸۲) با کمی تغییرات ساخته شد. به طوری که به یک لیتر آب مقطر، گلوکز (۱۰gr)، عصاره مخمر (۲ gr)، KH2PO4 (۲/۰۴gr) و Na2HPO4(12H2O) (۰/۵۹۶ gr) اضافه شد. سپس میزان ۱۰۰ میلی لیتر از محیط به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری منتقل و استریل گردید. سپس به هر ارلن دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰، ۹۰۰ و ۱۰۰۰ ppm افزوده شد. برای شاهد مثبت میزان۲ppm مالاشیت گرین و برای شاهد منفی نیز هیچ ماده‌ای اضافه نگردید. ارلن‌ها پس از تلقیح با نمونه قارچ (با همان روش که در آزمایش MIC گفته شد) در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور شیکر دار(با دور۱۵۰rpm) به مدت ۶ روز گرمخانه گذاری شدند. پس از این مرحله توده های قارچی رشد یافته در صورت وجود از داخل ارلن برداشت شده و پس از شستشو با سالین نرمال مجدا در محیط کشت YGC آگار کشت داده شد و مجددا ۶ روز دیگر در دمای قبلی گرمخانه گذاری گردید و نتایج رشد و عدم رشد پرگنه‌ها ثبت گردید (شکل ۳). در دوزهایی که نمونه قارچ رشد نداشت به عنوان دوز MLC تعیین گردید(Tampieri *et al*., 2003).

شکل ۳- نتایج کشت ۶ روزه در محیط GY براث. حضور و عدم حضور توده قارچی در محیط کشت دوزهای مختلف هواسان(راست) و مقایسه نمونه ها دردوزهای حاوی توده قارچی و فاقد آن با کنترل مثبت(مالاشیت گرین)(چپ)

نتایج و بحث

باتوجه به تعرف MIC که حداقل غلظت یا دوزی از یک ماده ضدعفونی کننده است که موجب ممانعت ۵۰ درصدی در رشد قارچ ایجاد می‌کند و با توجه به نتایج اندازه گیری قطر هاله رشد در روز ۶ کشت، در دوز ۴۰۰ppm قطر هاله رشد نصف قطر هاله رشد کنترل منفی(فاقد هوآسان) بود و بنابراین می‌توان نتیجه گرفت در مورد این نمونه MIC حدود ۴۰۰ppm است (شکل ۴). همچنین در تعریفMLC اشاره شده که حداقل دوز یا غلظتی از یک ماده ضدعفونی کننده است که ۹۹/۹ درصد جلوی رشد قارچ را می‌گیرد و در نتایج حاصل از آزمایش MLC این در غلظت ۸۰۰ ppm بدست آمد.



شکل ۴ - نتایج کشت شش روزه ۳۰۰ ppm تا ۹۰۰ppm نمونه قارچ ساپرولگنیا تهیه شده از هچری ماهی قزل آلا

ساپرولگنیازیس متداول ترین بیماری قارچی در هچری ماهیان در آب شیرین است و با ایجاد در تخم، موجب کاهش راندمان تولید لارو و بچه ماهی می‌گردد. قارچ ساپرولگنیا بصورت فلور طبیعی در منابع آبی تامین کننده آب مراکز تکثیر و پرورش ماهیان وجود دارند(Ghiasi *et al.*, 2010; Shahbazian *et al.*, 2010; Sarowara *et al.*, 2013). با توجه به مکانیسم عمل و تاثیر مناسب مالاشیت گرین در کنترل قارچ زدگی هچری‌ها، برای مدتها این ماده به عنوان موثرترین ترکیب

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

ضد قارچی مورد استفاده قرار گرفت تا اینکه پس از شناخت عوارض ناشی از آن، مصرف این ترکیب از سوی مراجع بهداشتی بین المللی از سال ۲۰۰۲ ممنوع اعلام گردید و تحقیقات در خصوص معرفی ترکیبات ضد قارچی که بتوانند جایگزین مالاشیت گردند آغاز شد (Earle and Hintz, 2014). ترکیب هواسان تی آر-۵۰ ماده‌ای ضد عفونی کننده برپایه پراکسید هیدروژن و نقره کلوئیدی است که با توجه به نداشتن عوارض سو می‌تواند به عنوان یک ترکیب ضد قارچ به صنعت آبزی‌پروری معرفی گردد. مسلم است انجام آزمایشات MIC وMLC برای سنجش قدرت و ارزیابی توان یک ترکیب شیمیایی در کنترل و مهار میکروارگانیسمها امری ضروری است. در واقع نتایج این آزمایشات تعیین کننده دوزی است که بواسطه آن قدرت کنترل و مهار میکروارگانیسم توسط ترکیب مورد نظر سنجیده می‌شود. لذا این آزمایشات اولین گام برای معرفی یک ترکیب شیمیایی به عنوان دارو یا ضدعفونی کننده است(Hu *et a*l., 2013). براساس نتایج حاصل از این بررسی میزان MIC برای ساپرولگنیا جداسازی شده از هچری قزل آلای رنگین کمان ۴۰۰ ppm و میزان MLC ۸۰۰ ppm بود. باید توجه داشت که حساسیت زئواسپور گونه‌های ساپرولگنیا در برابر ترکیبات ضد قارچی بیشتر از میسلیوم قارچ است. Kitancharoen و همکاران(۱۹۹۷) نشان دادند که غلظت μgml^{-1} ۵۰۰ پراکسید هیدروژن به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد مانع از رشد زئواسپور گردید درحالیکه غلظت μgml^{-1} ۱۰۰۰ طی ۶۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد سبب توقف رشد هایف در شرایط آزمایشگاهی بر روی قارچهای ساپرولگنیا پارازیتیکا، ساپرولگنیا دیکلینا، ساپرولگنیا فراکس و ساپرو لگنیا هیپوژینا شد. بنابراین این احتمال وجود دارد با افزودن هوآسان تی آر-۵۰ به آب هچری که واجد زئواسپورها هستند احتمالا بتوان با دوزی کمتر از میزان MIC اثرات ضد قارچی هواسان تی آر-۵۰ را در شرایط مزرعه انجام داد. از مهمترین مواردی که در خصوص معرفی یک ترکیب دارویی یا ضدعفونی کننده مورد توجه است سهولت در استفاده است. باتوجه به اینکه ترکیب هواسان تی آر-۵۰ به آسانی در آب محلول است (Roma technology, 2010) می‌توان از این ترکیب به آسانی در صنعت آبزی‌پروری استفاده نمود، لیکن از آنجایی که ترکیب پایه این ماده پراکسید هیدروژن است ضروری است مواردی که در حین استفاده از پراکسید هیدروژن مورد توجه قرار می‌گیرد در خصوص این ترکیب نیز اعمال شود که از جمله می‌توان به دما، pH و سختی آب اشاره نمود (Wagner *et al.*, 2010; Heydarnejad, 2012). پراکسید هیدروژن ترکیبی ناپایدار است و سریعا به آب و اکسیژن تبدیل میشود (Ali *et al.*, 2015) و احتمالاً به همین دلیل است که توصیه شده در شرایط استفاده برای درمان ماهیان از دوز بالاتر در مدت زمان کمتر استفاده شود (Gaikowski *et al.*, 1999). هرچند ترکیب اصلی هواسان تی آر-۵۰ پراکسید هیدروژن است ولی وجود نقره کلوییدی کمک به افزایش پایداری پراکسید هیدروژن می‌نماید (Roma technology, 2010). همچنین باید در نظر داشت که از زمانهای بسیار قدیم نقره و ترکیبات آن به عنوان عوامل ضد میکروبی موثر شناخته شده‌اند (Silver, 2003; Klasen, 2000) و در مقایسه با دیگر فلزات، نقره قابلیت سمی بیشتری در مقابل میکرو ارگانیسمها داشته ولی در عین حال از خاصیت سمی کمتری در مقابل سلولهای مهره‌داران برخوردار است

(Zhao *et al*., 1998). استفاده از این ترکیب به خوبی بر روی اشریشیا کولی، استافیلوکوکوس اورئوس و گونه‌های استرپتوکوکوس مطالعه شده است (Kawahara *et al*., 2000; Shahverdi *et al*., 2007; Yamomoto *et al*., 1996). مهمترین مکانیسم تاثیر یون نقره ایجاد اختلال در امر رونوشت برداری از DNA است. همچنین این یون با ترکیب با گروه‌های SH– آنزیمهایی که نقش آنها فعال نمودن پروتئین‌ها است سبب غیر فعال شدن ترکیبات پروتئنی می‌گردد (Feng *et al*., 2000). مطالعات نشان داده است که ترکیبات نقره موجب تخریب غشا سلولی قارچها و ممانعت از جوانه زدن آنها می‌کنند (Nasrollahi *et al*., 2011; Kim *et al*., 2009). احتمالا همین مکانیسم‌ها سبب می‌شود که از یک سو یون نقره با ترکیب شدن با ترکیبات پروتئینی غشا سلول و از سوی دیگر با تاثیر در روند رونوشت برداری از DNA کمک به توقف رشد کند و با افزایش پایداری پراکسید هیدروژن تاثیر ترکیب را افزایش دهد.

یافته ترویجی

براساس نتایج حاصل از این تحقیق، میزان MIC و MLC محلول هوآسان در مقایسه با مالاشیت گرین تعیین گردید و در شرایط آزمایشگاهی قدرت قارچ کشی آن به اثبات رسید لیکن ضروری است تا از تاثیر سو احتمالی این ماده بر روی تخم نیز آگاه شد. بنابراین برای استفاده از این ترکیب به جای مالاشیت گرین در شرایط هچری ابتدا طی یک مطالعه در شرایط مزرعه دوزهای ppm ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ روزانه در دو تیمار زمانی ۱۵ و ۳۰ دقیقه جهت کنترل ساپرولگنیازیس در هچری ماهیان قزل آلای رنگین کمان مورد استفاده قرار گیرد تا هم تاثیرات سو احتمالی که این ماده بر روی تخم مشخص شود و نیز میزان و طول دوره مصرف میزان مناسب این ماده در کنترل قارچ زدگی تخم مورد بدست آید و در نهایت برای استفاده در کنترل قارچ زدگی در سطح هچری معرفی گردد.

منابع

Ali, S. E., Evensen, O. and Skaar, I., 2015. Recent advances in the mitigation of Saprolegnia infections in freshwater fish and their eggs. The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs (A. Méndez-Vilas, Ed.), 691–697.

Beakes, G.W., Wood, S.E. and Burr, A.W., 1994. Features which characterize Saprolegnia isolates from salmon fish lesions — a review. In: Mueller, G.J. (Ed.), Salmon SaprolegniasisReport to Bonneville Power Administration. Environment, Fish and Wildlife Division, Portland, Oregon, pp. 33–66.

Clup, S.J. and Belend, F.A., 1996. Malachite green: a toxicological Review. Journal of American College of Toxicology, 15 (3): 219 – 238.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

Dayal. R., 2001. A manual of aquatic fungi, Chawla offset printers, India, 96 – 110, 169 – 205.

Dieguez Uribeondo, J., Fregeneda Grands, J.M., Cerenius, L., Perez Iniesta, E., Aller Gancedo, J.M., Telleria, M. T., Söderhäll, K. and Martin, M. P., 2007, Re-evaluation of the enigametic species complex *Saprolegnia diclina – Saprolegnia parasitica* based on morphological, physiological and molecular data. Fungal Genetic and biology, 44(7): 585–601.

Earle, G. and Hintz, W., 2014. New approaches for controlling Saprolegnia parasitica, the causal agent of a devastating fish disease. Tropical Life Sciences Research, 25(2): 101–109.

Espeland, S. and Hansen, P., 2004. Prevention Saprolegnia onRainbow trout eggs, Bsc thesis, Natturuvisin dadeildin faroe university, Island.

Feng, Q.L., J. Wu, G.Q. Chen, F.Z. Cui, T.N. Kim and Kim, J.O., 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and *Staphylococcus aureus*. Journal of Biomedical Mater ials Resarchs, 52: 662-668.

Fernandez-Beneitez, M. J., Ortiz-Santaliestra, M. E., Lizana, M. and Dieguez-Uribeondo, J., 2008. Saprolegnia diclina: Another species responsible for the emergent disease' Saprolegnia infections' in amphibians. FEMS Microbiology Letters, 279(1): 23–29.

Finnegan, M., Linley, E., Denyer, S.P., McDonnell, G., Simons, C. and Maillard, J.Y., 2010. Mode of action of hydrogen peroxide and other oxidizing agents: differences between liquid and gas forms. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 65: 2108–2115.

Ghiasi, M., Khosravi, A.R., Soltani, M., Binaii, M., Shokri, H., Tootian, Z., Rostami Bashman, M. and Ebrahimzade Mousavi, H., 2010. Characterization of Saprolegnia isolates from Persian sturgeon (Acipencer persicus) eggs based on physiological and molecular data. Journal de Mycologie Médicale, 20:1-7.

Heydarnejad, M.S., 2012. Survival and growth of common carp (Cyprinus carpio L.) exposed to different water pH levels. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 36: 245–249.

Hu, X.G., Liu, L., Hu, K., Yang, X.L. and Wang, G.X., 2013. In Vitro Screening of Fungicidal Chemicals for Antifungal Activity against Saprolegnia. Journal of the World Aquaculture Society, 44(4): 528 – 535.

Hussein, M A., Hatai, K. and Nomura, T., 2001. Saprolegniosis in salmonids and their eggs in Japan. Journal of Wildlife Diseases, 37(1): 204–207.

Hussein, M.M.A. and Hatai, K., 2001. In vitro inhibition of Saprolegnia by bacteria isolated from lesions of salmonids with saprolegniosis. Fish Pathology, 36 (2):73– 78.

Roam Technology., 2010. Huwa-San© for Food & Beverage, Cited 20 Nov, 2009 www.huwasan.com/more-info,.

Kawahara, K., Tsuruda, K., Morishita, M. and Uchida, M., 2000. Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. Dental Materials, 16: 452-455.

Ke, X., Wang, J., Gu, Z., Li, M. and Gong, X., 2009. Morphological and molecular phylogenetic analysis of two Saprolegnia sp. (oomycetes) isolated from silver crucian carp and zebra fish. Mycological Research, 113(5): 637–644.

Kim, K.J., Sung, W.S., Suh, B.K., Moon, S.K., Choi, J.S., Kim, J.G. and Lee, D.G., 2009. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on Candida albicans. Biometals, 22(2):235–242.

Kitancharoen, N., Hatai, K. and Yamamoto, A., 1997. Aquatic fungi developing on eggs of salmonids. Journal of Aquatic Animal Health, 9: 314 – 316.

Klasen, H.J. 2000. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. Burns, 26:131–138.

Molina, F. I., Jong, S. and Ma, G., 1995. Molecular characterization and identification of Saprolegnia by restriction analysis of genes coding for ribosomal RNA. Antonie van Leeuwenhoek, 68(1): 65–74.

Nasrollahi, A., Pourshamsian, K. and Mansourkiaee, P., 2011. Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi. International Journal of Nano Dimension, 1(3):233–239.

Petrisko, J. E., Pearl, C. A., Pilliod, D. S., Sheridan, P. P., Williams, C. F., Peterson C. R., and Bury, R. B., 2008. Saprolegniaceae identified on amphibian eggs throughout the Pacific Northwest, USA, by internal transcribed spacer sequences and phylogenetic analysis. Mycologia, 100(2): 171–181.

Phillips A J, Anderson, V. L., Robertson, E. J., Secombes C. J. and.van West, P., 2008. New insights into animal pathogenic oomycetes. Trends in Microbiology, 16: 13–19.

Pickering, A.D. and Willoughby. L.G., 1982. Saprolegnla infections of salmonid fish. In: Roberts, R.J. (Ed.) Microbial diseases of fish. Academic Press, London.UK, 120p.

Robertson, E. J., Anderson, V. L., Phillips, A. J., Secombes, C. J., Dieguez-Uribeondo, J. and Van West, P., 2009. Saprolegnia – fish interactions. In K Lamour and S Kamoun (eds.). Oomycete genetics and genomics, diversity, interactions and research tools, Wiley-Blackwell ,Hoboken, NJ, USA, 407–424.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

Sarowara, M. N., Van Den Berg, A. H., Mclaggan, D., Young, M. R. and Van West, P., 2013. Saprolegnia strains isolated from river insects and amphipods are broad spectrum pathogens. Fungal Biolology, 117: 752–763.

Shahbazian, N., Ebrahimzadeh, M.H.A., Soltani, M., Khosravi, A.R., Mirzargar, S. and Sharifpour, I., 2010. Fungal Contaminations in Rainbow Trout Eggs in Kermanshah province propagations with emphasis on saprolegniceae. Iranian Journal. Fisheries Science, 9: 151–160.

Shahverdi, A.R., Fakhimi, A., Shahverdi, H.R. and Minaian, S., 2007. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Nanomedicine, 3: 168-171.

Silver, S., 2003. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. FEMS Microbiology Reviews, 27:341–353.

Stueland, S., Hatai, K.and Skaar, I., 2005. Morphological and physiological characteristics of Saprolegnia spp. strains pathogenic to Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Journal of Fish Diseases, 28: 445–453.

Tampieri, M.P., Galuppi, R., Carelle, M.S., Macchioni, F., Cioni, P.L. and Morelli, I., 2003. Effect of selected essential oils and pure compounds on Saprolegnia parasitica. Pharmaceutical Biology, 41, 584–591.

Wagner, E.J., Oplinger, R.W., Arndt, R.E., Forest, A.M. and Bartley, M., 2010. The safety and effectiveness of various hydrogen peroxide and iodine treatment regimens for rainbow trout egg disinfection. North American Journal of Aquaculture, 72: 34–42.

Yamamoto, K., Ohashi, S., Aono, M., Kokubo, T., Yamada, I. and Yamauchi, J., 1996. Antibacterial activity of silver ions implanted in SiO2 filler on oral streptococci. Dental Materials, 12: 227-229.

Zhao, G.J. and Stevens, S.E., 1998. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of Escherichia coli to the silver ion. Bio metals, 11: 27–32.

Assessment of anti-fungal effect of Huwa-San TR-50 and determination of MIC and MLC on *Saprolegnia* sp. *invitro* and introduced as malachite green alternative

Maryam Ghiasi[1*] Abolfazl Sepahdari[2], Mohammad Binaii[3], Farshideh Habibi Kotenaei[4], Mino Soltanio[5]

1,3,4-Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Caspian Sea Ecology Research Center (CSERC), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Sari, Iran

2- Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

5-Mycology Department, Veterinary medicine faculty, Tehran University

*Corresponding author e-mail: ghiasimaryam4@gmail.com

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

Abstract

Saprolegnia sp. is the most important pathogenic fungi in fish. *Saprolegnia parasitica, S. diclina, S. ferax and S. hypogina* are the most abundance of the fungi that caused saprolegniasis in fish and hatcheries. They have global distributions and their presences were reported from fresh water fish farms of the world. Up till 2002, *Saprolegnia* infections in aquaculture were kept under control with malachite green. However, the use of malachite green has been banned worldwide due to its carcinogenic and toxicological effects and this has resulted in a dramatic re-emergence of *Saprolegnia* infections in aquaculture. Many investigations have been carried out on the introduction of an appropriate anti-fungal agent alternative to malachite green. Huwa- San TR- 50 is a disinfectant based on hydrogen peroxide. One liter of Huwa-San TR-50 contains 570 g hydrogen peroxide and 0.36 g silver as stabilizer.

In this study, the antifungal effects, minimum lethal concentration (MLC) and minimum inhibitory concentration (MIC) of Huwa- San TR- 50 were conducted and compared to malachite green in vivo several doses including the 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 and 1000 ppm on the isolates *saprolegnia* sp were isolated from Rainbow trout. The results of MIC and MLC levels on the *saprolegnia* sp isolate from rainbow trout eggs were 400 and 800 ppm respectively. The results suggest that Huwa- San TR- 50 could introduce as appropriate anti-fungal agent alternative to malachite green.

Keywords: Saprolegniasis, Huwa- San TR- 50, fungal infection, Fish egg, Hydrogen peroxide