

ارزیابی اثرات ضد قارچی محلول هوآسان تی آر ۵۰ (Huwa -San TR- 50) بر قارچ

ساپروولگنیا (*Saprolegnia sp.*) در شرایط آزمایشگاهی و معرفی آن به عنوان جایگزین

مالاشیت گرین

مریم قیاسی^{۱*}، ابوالفضل سپهداری^۲، محمد بینایی^۱، فرشیده حبیبی کوتنایی^۱، مینوسلطان^۳

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

خلاصه

جنس ساپروولگنیا 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) (Minimum Inhibitory Concentration) MIC و Concentration) MLC آن در مقایسه با مالاشیت گرین بر نمونه ساپروولگنیا (*Saprolegnia sp.*) جداسازی شده از هجری ماهی قزال آلا (*Oncorhynchus mykiss*) است. برای انجام آزمایشات MIC و MLC از دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰، ۹۰۰ و ۱۰۰۰ استفاده شد. براساس نتایج میزان MIC و MLC بر روی نمونه ساپروولگنیا جداسازی شده از هجری ماهی قزل آلا رنگین کمان به ترتیب ۴۰۰ ppm (میکرولیتر در لیتر) و ۸۰۰ ppm (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 هجری ماهیان مورد استفاده قرار گیرد.

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

مقدمه

جنس ساپروولگنیا متعلق به رده اوومیسته‌ها، گروهی از ارگانیسیم‌های 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 ساپروولگنیا دیکلینا (*S. diclina*)، ساپروولگنیا فراکس (*S. ferax*)، ساپروولگنیا استرالیس (*S. australis*)، ساپروولگنیا مونوایکا (*S. monoica*) و ساپروولگنیا 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.*, 2010; Ke *et al.*, 2009; Ghiasi *et al.*, 2010). در هجری‌ها، گونه‌های ساپروولگنیا 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، ژئواسپوره‌های فراوانی ایجاد و نتیجه آن انتشار آلودگی در هجری 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 میسلیم است که تجمع این حجم بالای میسلیم‌ها 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 هجری ماهیان سردآبی به ازای هر ۱۰ عدد تخم، یک تخم در اثر ساپروولگنیازیس می‌میرد (Hussein and Hatai, 2001). مالاشیت گرین اولین ترکیب شیمیایی برای کنترل ساپروولگنیازیس بود که برای اولین بار در سال ۱۹۳۶ در صنعت آبی‌پروری 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. علی‌رغم 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 (FDA) 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 ساپروولگنیازیس در آبی‌پروری 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 نیول، 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 می شود (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 می شود. آنچه که هواسان تی آر-۵۰ را مستثنی می کند 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. کاملاً در آب حل شده و تا ۹۵ درجه سانتی گراد 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، آنگ 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 ساپروولگنیا: تخمهای قارچ زده قزل آلا با استفاده از پنس در ظروف درب دار حاوی آب مقطر استریل جمع آوری و به آزمایشگاه، ارسال گردید. در آزمایشگاه، پس از شستشو تخم با آب مقطر استریل، مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۸ - ۱۲ درجه سانتی گراد 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 به صورت تلقیحی در پلیتهای حاوی *Glucose Yeast extract chloramphenicol Agar (YGC)* به صورت تلقیحی کشت داده و به مدت ۵ روز در دمای ۱۸ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند (Ghiasi *et al.*, 2010). برای خالص سازی پرگنه از حاشیه پرگنه های رشد کرده با استفاده از اسکالپل استریل نمونه برداشته و مجدداً پاساژ داده شد و با تهیه لام میکروسکوپی و مشاهده ساختار میکروسکوپی هایف، اسپورانژیوم و گاما 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 ساپروولگنیا شکل ۲ - نمای میکروسکوپی زئواسپور و گاما قارچ ساپروولگنیا

۲ - انجام آزمایشات (Minimum Inhibitory Concentration) MIC

برای انجام کار دوزهای (ppm) میکرولیتر در لیتر ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰، ۹۰۰ و ۱۰۰۰ از هوآسان تی آر-۵۰ به محیط کشت YGC آگار افزوده شد. به این ترتیب که برای هر دوز ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت تهیه و پس از اتوکلاو شدن و رسیدن محیط کشت به دمای ۴۵ درجه سانتی گراد 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 ساپروولگنیا به قطر ۴ میلی متر

به پلیت تلقیح شد. پلیت فاقد محلول هوآسان تی آر-۵۰ به عنوان کنترل مثبت و پلیت حاوی ۲ (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 سانتی گراد گرمخانه گذاری شده و در روزهای ۳ و ۶ آزمایش هاله رشد قارچ مورد بررسی و اندازه گیری قرار گرفت. (شکل ۳ و ۴) (Tampieri *et al.*, 2003).

۳ - انجام آزمایشات (Minimum Leathal Concentration) MLC

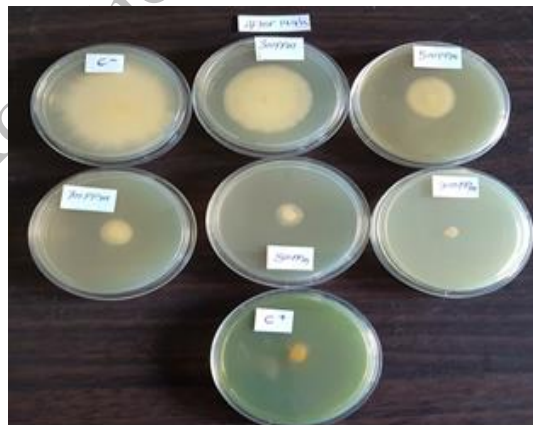
جهت انجام این آزمایش ابتدا محیط کشت GY براث براساس فرمول Willoughby و Pickering (۱۹۸۲) با کمی تغییرات ساخته شد. به طوری که به یک لیتر آب مقطر، گلوکز (۱۰ gr)، عصاره مخمر (۲ gr)، KH_2PO_4 (۲/۰۴ gr) و $\text{Na}_2\text{HPO}_4(12\text{H}_2\text{O})$ (۰/۵۹۶ gr) اضافه شد. سپس میزان ۱۰۰ میلی لیتر از محیط به ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری 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 میزان ۲ ppm 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 سانتی گراد در داخل انکوباتور شیکر دار) با دور ۱۵۰ rpm) 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 سالیین نرمال مجدداً در محیط کشت YGC آگار کشت داده شد و مجدداً 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 در دوزهای 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 می کند و با توجه به نتایج اندازه گیری قطر هاله رشد در روز ۶ کشت، در دوز ۴۰۰ ppm قطر هاله رشد نصف قطر هاله رشد کنترل منفی (فاقد هواسان) بود و بنابراین می توان نتیجه گرفت در مورد این نمونه MIC حدود ۴۰۰ ppm است (شکل ۴). همچنین در تعریف MLC اشاره شده که حداقل دوز یا غلظتی از یک ماده ضدعفونی کننده است که ۹۹/۹ درصد جلوی رشد قارچ را می گیرد و در نتایج حاصل از آزمایش MLC این در غلظت ۸۰۰ ppm بدست آمد.



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

ساپروولگنیازیس متداول ترین بیماری قارچی در هچری ماهیان در آب شیرین است و با ایجاد در تخم، موجب کاهش راندمان تولید لارو و بچه ماهی می گردد. قارچ ساپروولگنیا 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 هچری ها، برای مدت ها این ماده به عنوان موثرترین ترکیب

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 مالاویت گردند آغاز شد (Earle and Hintz, 2014). ترکیب هوآسان 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 آبی‌پروری معرفی گردد. مسلم است انجام آزمایشات MIC و MLC 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 ضد عفونی کننده است (Hu et al., 2013). براساس نتایج حاصل از این بررسی میزان MIC برای ساپروولگنیا جداسازی شده از هچری قزل آلی رنگین کمان ۴۰۰ ppm و میزان MLC ۸۰۰ ppm بود. باید توجه داشت که حساسیت زئواسپور گونه‌های ساپروولگنیا در برابر ترکیبات ضد قارچی بیشتر از میسلیم قارچ است. Kitancharoen و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند که غلظت $500 \mu\text{gml}^{-1}$ پراکسید هیدروژن به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد مانع از رشد زئواسپور گردید در حالیکه غلظت $1000 \mu\text{gml}^{-1}$ طی ۶۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد سبب توقف رشد هایف در شرایط آزمایشگاهی بر روی قارچهای ساپروولگنیا پارازیتیکا، ساپروولگنیا دیکلینا، ساپروولگنیا فراکس و ساپرو لگنیا هیپوژینا شد. بنابراین این احتمال وجود دارد با افزودن هوآسان تی آر-۵۰ به آب هچری که واجد زئواسپورها هستند احتمالاً بتوان با دوزی کمتر از میزان MIC اثرات ضد قارچی هوآسان تی آر-۵۰ را در شرایط مزرعه انجام داد. از مهمترین مواردی که در خصوص معرفی یک ترکیب دارویی یا ضد عفونی کننده مورد توجه است سهولت در استفاده است. با توجه به اینکه ترکیب هوآسان تی آر-۵۰ به آسانی در آب محلول است (Roma technology, 2010) می‌توان از این ترکیب به آسانی در صنعت آبی‌پروری 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 سریعاً 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). هر چند ترکیب اصلی هوآسان تی آر-۵۰ پراکسید هیدروژن است ولی وجود نقره کلوئیدی 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 اشیریشیا 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 پروتئینی 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). احتمالاً 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 هجری ابتدا طی یک مطالعه در شرایط مزرعه دوزهای ppm ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ روزانه در دو تیمار زمانی ۱۵ و ۳۰ دقیقه جهت کنترل ساپروولگنیازیس در هجری ماهیان قزل آلا 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 هجری 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 Saprolegniasis Report 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.

- 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 enigmatic 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* on Rainbow 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 Materials Resarchs, 52: 662-668.
- Fernandez-Beneitez, M. J., Ortiz-Santaliestra, M. E., Lizana, M. and Dieguez-Urbeondo, 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 (*Acipenser 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. *Saprolegnia* 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.

- 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 Biology*, 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 Sepahdari², Mohammad Binaii³, Farshideh Habibi Kotenaei⁴, Mino Soltanio⁵

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-Mycolology Department, Veterinary medicine faculty, Tehran University

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

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