Research Article

Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research
Vol. 39, No. 3, Page:433-444 (2023)

DOI: 10.22092/ijmapr.2023.362465.3328
DOR: 20.1001.1.17350905.1402.39.3.8.7

# Comparative performance of *Eucalyptus globulus* Labill. and *Allium sativum* Linn. extracts in reducing the fungal and bacterial load of Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin) eggs during the incubation period

**Abbasali Zamini[1], Reza Taati[2*], Mohammad Reza Rezaeiardeh[3] and Alirza Najafikhah[4]**

1- Department of Fisheries, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran
2*- Corresponding author, Department of Fisheries, Talesh Branch, Islamic Azad University, Talesh, Iran
E-mail: r.taati@gmail.com
3- Department of Fisheries, Talesh Branch, Islamic Azad University, Talesh, Iran
4- General Directory Office of Fisheries, Bandar Anzali, Guilan, Iran

Received: May 2023 Revised: June 2023 Accepted: August 2023

## Abstract

**Background and objectives:** Medicinal plants have a much healthier effect than chemical drugs, and due to the presence of various effective substances, they can be used in the prevention and treatment of many diseases. This research aims to compare the performance of hydroalcoholic extracts of eucalyptus and garlic in reducing the fungal and bacterial load of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) eggs during incubation.

**Methodology:** At first, enough sperm and eggs were obtained from Persian sturgeon male and female breeders after artificial propagation stages. After fertilization, the eggs were weighed by a digital scale. The number of eggs per gram, the total weight of eggs per tray, and the final number of eggs stored in the incubator were calculated. Considering the allocation of three trays for each treatment, the number of stored eggs for each treatment was 15000. The total number of stored eggs for five treatments was 75000. Hydroalcoholic extracts (70% ethanol solvent) of eucalyptus (appearance: clear, color: brown, pH=5.02) and garlic (appearance: clear, color: light brown, pH=6.49) were prepared. Five experimental treatments containing control (no extract), Eucalyptus 50 mg.l$^{-1}$, eucalyptus 100 mg.l$^{-1}$, Garlic 50 mg.l$^{-1}$, and 100 mg.l$^{-1}$ were designed in three replicates by the short-term bath method in three stages (days). At the end of the three disinfection stages, eggs were randomly sampled from each replicate for the total bacterial and fungal count.

**Results:** No significant difference was observed in the water's physical and chemical factors, such as pH, dissolved oxygen, and temperature, during the disinfection stages of eggs ($p$<0.05). The results showed that treatments containing eucalyptus and garlic extracts at 50 and 100 mg/l showed lower total bacterial and fungal counts than the control treatment ($P$<0.05). Still, the eucalyptus extract at 100 mg/l performed much better than the rest of the experimental treatments ($P$<0.05). In incubation indices such as hatching rate and healthy larvae, statistically significant differences were observed in four treatments containing garlic and eucalyptus extracts (50 and 100 mg.l$^{-1}$) with the control ($P$<0.05). Based on Duncan's test, the average rate of hatching and the number of healthy larvae were more in eucalyptus at 100 mg.l$^{-1}$ than in other studied treatments ($P$<0.05). Egg hatching rates were equal in garlic and eucalyptus at 100 and 50 mg.l$^{-1}$, respectively.

**Conclusion:** During the research, there was no change in the appearance of the larvae, which can be considered the safety of plant extracts. Various factors such as the type and compounds in the plant, the amount of used concentration, the type of microorganism, the pH level, and the

Copyright: © 2023 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijmapr.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

environment's temperature can influence the antimicrobial potential of herbal extracts and compounds. According to the obtained findings, it can be stated that hydroalcoholic extracts of Garlic and Eucalyptus played a very decisive role in reducing the fungal and bacterial contamination of Persian sturgeon eggs during the incubation period.

**Keywords:** Persian sturgeon, herbal extracts, disinfection, hatching rate, organic aquaculture.

# مقایسه عملکرد عصاره‌های اکالیپتوس (*Eucalyptus globulus* Labill.) و سیر (*Allium sativum* Linn.) در کاهش بار قارچی و باکتریایی تخم تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus* Borodin) طی دوره انکوباسیون

عباسعلی زمینی[۱]، رضا طاعتی[۲*]، محمدرضا رضایی ارده[۳] و علیرضا نجفی‌خواه[۴]

۱- دانشیار، گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه شیلات، واحد تالش، دانشگاه آزاد اسلامی، تالش، ایران، پست الکترونیک: r.taati@gmail.com

۳- مربی، گروه شیلات، واحد تالش، دانشگاه آزاد اسلامی، تالش، ایران

۴- کارشناس ارشد، اداره کل شیلات استان گیلان، بندرانزلی، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۲ تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۲

## چکیده

**سابقه و هدف:** گیاهان دارویی تأثیر بسیار سالم‌تری در قیاس با داروهای شیمیایی داشته و به‌علت داشتن مواد مؤثره گوناگون می‌توانند در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها کاربرد داشته باشند. تاسماهی ایرانی یا قره‌برون یکی از باارزش‌ترین گونه‌های ماهیان خاویاری دریای خزر است که به‌عنوان گونه مناسب پرورشی به مزارع پرورش ماهیان خاویاری معرفی‌شده و بخشی از گله‌های مولدین پرورشی را در ایران تشکیل می‌دهد. این گونه به دلیل کوتاه‌تر بودن دوره تولید خاویار در مقایسه با گونه فیل‌ماهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. هدف از این تحقیق، مقایسه عملکرد عصاره‌های هیدروالکلی اکالیپتوس و سیر در کاهش بار قارچی و باکتریایی تخم تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) طی دوره انکوباسیون بود.

**مواد و روش‌ها:** در ابتدا، از مولدین نر و ماده تاسماهی ایرانی پس از طی شدن مراحل تکثیر مصنوعی اسپرم و تخمک کافی استحصال شد. پس از لقاح، تخم‌ها توسط ترازوی دیجیتال توزین شده و تعداد تخم به‌ازای گرم، وزن کل تخم‌ها در سینی و تعداد نهایی تخم‌های ذخیره‌سازی شده در انکوباتور محاسبه گردید. با توجه به اختصاص سه سینی برای هر تیمار، تعداد تخم‌های ذخیره‌سازی شده برای هر تیمار ۱۵۰۰۰ عدد و تعداد کل تخم‌های ذخیره‌سازی شده برای ۵ تیمار ۷۵۰۰۰ عدد بود. عصاره‌های هیدروالکلی (حلال اتانول ۷۰٪) اکالیپتوس (ظاهر: شفاف، رنگ: قهوه‌ای و pH=5.02) و سیر (ظاهر: شفاف، رنگ: قهوه‌ای روشن و pH=6.49) تهیه شدند. پنج تیمار آزمایشی شامل شاهد (فاقد عصاره)، اکالیپتوس ۵۰ میلی‌گرم در لیتر، اکالیپتوس ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، سیر ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در سه تکرار به روش حمام کوتاه‌مدت طی سه مرحله (روز) طراحی شدند. در پایان سه مرحله ضدعفونی، نمونه‌برداری از تخم‌ها به‌صورت تصادفی و از هر تکرار برای شمارش کل باکتریایی و قارچی اجرا گردید.

**نتایج:** اختلاف معنی‌داری در فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب مانند pH، اکسیژن محلول و درجه حرارت طی مراحل ضدعفونی تخم‌ها مشاهده نشد ($P>0.05$). نتایج نشان داد که تیمارهای حاوی عصاره‌های هیدروالکلی اکالیپتوس و سیر در سطوح ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، شمارش کل باکتریایی و قارچی کمتری را نسبت به تیمار شاهد نشان دادند ($P<0.05$) ولی عصاره اکالیپتوس در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر عملکرد بسیار بهتری نسبت به بقیه تیمارهای آزمایشی ثبت کرد ($P<0.05$). در شاخص‌های انکوباسیون از قبیل درصد تفریخ و تعداد لاروهای سالم، اختلاف معنی‌دار آماری در چهار تیمار حاوی عصاره‌های هیدروالکلی سیر و اکالیپتوس (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) با تیمار شاهد مشاهده شد ($P<0.05$). براساس آزمون دانکن، میانگین درصد تفریخ و تعداد لاروهای سالم در تیمار عصاره اکالیپتوس ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشتر از سایر تیمارهای مورد مطالعه بود ($P<0.05$). درصد تفریخ تخم در تیمارهای ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سیر و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر اکالیپتوس باهم برابر بودند.

**نتیجه‌گیری:** در طول تحقیق، تغییری در شکل ظاهری لاروها مشاهده نشد که این مسئله می‌تواند به‌عنوان بی‌خطر بودن عصاره‌های گیاهی مطرح شود. فاکتورهای متنوعی از قبیل نوع و ترکیبات موجود در گیاه، میزان غلظت مورد استفاده، نوع میکروارگانیسم، میزان pH و دمای محیط قادرند بر ظرفیت ضدمیکروبی عصاره‌ها و ترکیب‌های گیاهی تأثیرگذار باشند. با توجه به یافته‌های حاصل، می‌توان بیان کرد که عصاره‌های هیدروالکلی سیر و اکالیپتوس نقش بسیار تعیین‌کننده‌ای در کاهش آلودگی قارچی و باکتریایی تخم تاسماهی ایرانی طی دوره انکوباسیون داشتند.

**واژه‌های کلیدی:** قره‌برون، عصاره‌های گیاهی، ضدعفونی، درصد لقاح، آبزی‌پروری سبز.

## مقدمه

تاسماهی ایرانی یا قره‌برون یکی از باارزش‌ترین گونه‌های ماهیان خاویاری حوضه جنوبی دریای خزر بوده که به‌عنوان گونه مناسب پرورشی به مزارع پرورش ماهیان خاویاری معرفی‌شده و ۳۰-۲۰٪ از گله‌های مولدین پرورشی را در ایران تشکیل می‌دهد. این گونه به دلیل کوتاه‌تر بودن دوره تولید خاویار در مقایسه با گونه فیل‌ماهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Pourali Foshtomi *et al.*, 2011).

نیاز روزافزون انسان به مواد غذایی، به‌ویژه پروتئین سفید باعث شده تا مراکز تکثیر و پرورش آبزیان در بیشتر نقاط کشور توسعه‌یافته و تولید لاروهای با کیفیت باعث افزایش تولید و سود اقتصادی پرورش‌دهندگان شود. یکی از مشکلات اساسی مراکز بازسازی ذخایر آبزیان، رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مانند قارچ‌هاست. ساپرولگنیوز مهمترین بیماری قارچی در ماهیان و تخم آنها به‌حساب می‌آید و قارچ ساپرولگنیا از طریق اتصال و نفوذ به تخم‌های مرده به تخم‌های زنده و سالم نیز سرایت می‌کند (Bruno & Wood, 1994). عواملی مانند خراشیدگی سطح تخم، ذرات شن، ورود سیکلوپس، نوسانهای دمایی، pH و کاهش اکسیژن آب در بروز بیماری‌های قارچی در دوران انکوباسیون دخالت دارند (Azari Takami, 2009). خسارت مستقیم ناشی از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا روی تخم ماهیان با توجه به ارزش اقتصادی ماهیان خاویاری قابل توجه بوده، البته خسارت‌های غیرمستقیم که ناشی از بروز مشکلات زیست‌محیطی و ورود انواع آلاینده‌های دارویی و شیمیایی به طبیعت و افزون بر آن مشکلات مربوط به بهداشت جامعه و سلامت مصرف‌کنندگان نهایی محصولات آبزیان است، قابل محاسبه نیست. از رایج‌ترین روش‌های درمان قارچ‌زدگی در تخم‌های بارور، استفاده از مالاشیت سبز بوده که با توجه به آثار سرطان‌زایی و ناقص‌الخلقه‌زایی آن، ممنوعیت استفاده از آن در اتحادیه اروپا از سال ۲۰۰۱ به‌طور کامل اجرا شده است (Kwan *et al.*, 2018). شکل احیاء شده آن لوکومالاشیت سبز نام دارد که می‌تواند در بافت ماهیان خوراکی برای مدت طولانی ذخیره شده و اثرهای مخربی بر سیستم تولیدمثلی و ایمنی ماهی داشته باشد و مصرف آن عوارض ژنتیکی و سرطان را به‌همراه دارد (Kwan *et al.*, 2018). تأیید شده که باقیمانده‌های بسیار ناچیز از مالاشیت سبز در ماهیان رشد کرده از تخم‌هایی که در معرض این ماده بوده‌اند تا مرحله بازاری وجود خواهد داشت (Sirvastava, 2007). ازاین‌رو، صنعت پرورش ماهی برای جایگزینی مالاشیت سبز به ماده مؤثر ضد قارچ که از لحاظ درمانی و تأثیرات جانبی ایمن باشد، نیاز دارد. از سوی دیگر، گرایش جهانی به سوی آبزی‌پروری سبز و توسعه روش‌های پرورش ارگانیک که در آن بیشترین استفاده از مواد طبیعی و گیاهان دارویی بعمل‌آمده، توجه دنیا را به سمت داروهای گیاهی با تأثیرات ضد قارچی و ضد باکتریایی جلب کرده است (Zhu, 2020).

مقاومت دارویی قارچ‌ها و افزایش دوز مصرفی داروهای رایج از یک‌سو و افزایش عوارض جانبی این داروها از سوی دیگر، سبب شده تا توجه به گیاهان دارویی بیشتر شود. استفاده از مواد گیاهی در درمان آبزیان طی سالیان

اخیر به دلیل در دسترس بودن، قیمت مناسب، قابل تجزیه بودن در محیط، عدم بروز مقاومت دارویی، نداشتن اثرهای زیست‌محیطی نامناسب و مؤثر بودن علیه طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا مورد توجه و مصرف قرارگرفته است (Valenzuela-Gutierrez *et al*., 2021).

گیاه اکالیپتوس (*Eucalyptus globulus*) درختی است همیشه‌سبز که ارتفاع آن به ۴۵ تا ۶۵ متر رسیده و در نواحی گرمسیری، نیمه گرمسیری و معتدله جهان مشاهده شده است. برگ‌های گیاه، بخش دارویی آن را تشکیل داده و دارای ۷۰ تا ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اوکالیپتول یا سینئول می‌باشد (Gilles *et al*., 2010؛ Ayepola & Adeniyi., 2008). همچنین شامل منوترپن‌ها (لینالول، بورنئول) و سزکویی‌ترپن‌ها مانند کاریوفیلن است (Gilles *et al*., 2010). مطالعات نشان داده است که گیاهان غنی از ترکیبات ترپنی با افزایش فعالیت و با اثر ضدباکتریایی خود موجب تقویت سیستم ایمنی و تولید آنتی‌بادی می‌شوند (Awad & Awaad, 2017؛ Zhu *et al*., 2000). به‌دلیل حضور اوکالیپتول اثر ضدباکتری (Nagata *et al*., 2006) و به‌علت کوئرستین اثر ضد ویروس دارد (Assareh *et al*., 2010؛ Abravesh *et al*., 2007).

سیر (*Allium sativum*) گیاهی است که از ۶۵٪ رطوبت، ۲۷/۵٪ کربوهیدرات، ۴/۷٪ فیبر، ۳-۲٪ ترکیبات ارگانوسولفوره و ۲٪ پروتئین تشکیل شده است. ترکیبات زیست فعال حاوی گوگرد و ترکیبات فنلی عاری از گوگرد مسئول خواص اصلی سیر هستند (Shang *et al*., 2019؛ Szychowski *et al*., 2018). ماده مؤثره گوگردی آلیسین یا دی‌آلیل‌دی‌سولفید اکسید موجود در سیر عامل اصلی بوی تند سیر بوده و خاصیت ضدباکتریایی و ضدقارچی بسیار قوی دارد و سبب جلوگیری از رشد انواع باکتری‌ها و طیف وسیعی از قارچ‌های بیماری‌زا می‌شود (Mohamed *et al*., 2011؛ Bozin *et al*., 2008؛ Harris *et al*., 2001). عصاره سیر در غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین اثر مهارکنندگی را روی رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارد (Bokaeian *et al*., 2015). اثر سیر، عصاره بابونه و گل ختمی در ترمیم زخم‌های سطحی کپور معمولی نشان داد که استفاده از سیر نسبت به دو عصاره دیگر سبب تسریع در بهبود و ترمیم زخم‌های سطحی شده است (Kazemipour *et al*., 2004).

تحقیقاتی در مورد تأثیر عصاره‌های گیاهی در کاهش چشمگیر آلودگی تخم طی دوره انکوباسیون در برابر عوامل بیماری‌زای قارچی و باکتریایی انجام شده است که می‌توان به اثرهای عصاره اکالیپتوس در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (Ebrahimzadeh Mousavi *et al*., 2006)، ماهی سفید (*Rutilus kutum*) (Najafi & Zamini, 2013) و ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (Mohammadi *et al*., 2013)، عصاره میوه سماق در ماهی سفیدک سیستان (*Schizothorax zarudnyi*) (Keykha *et al*., 2015)، عصاره سیر در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Amani Denji *et al*., 2020؛ Shafiei *et al*., 2016) و درنهایت به عصاره آویشن در تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*) (Shahrani *et al*., 2021) اشاره کرد. با توجه به تحقیقات محدود در مورد تأثیر گیاهان دارویی بر تخم ماهیان خاویاری، به‌ویژه گونه تاسماهی ایرانی و نیز یافتن جایگزین مطلوب و مطمئن به جای مالاشیت سبز و داروهای شیمیایی، لزوم انجام این تحقیق برای بررسی امکان تأثیر و تعیین سطح مطلوب عصاره‌های اکالیپتوس و سیر به‌عنوان منابع دارویی گیاهی در ضدعفونی تخم تاسماهی ایرانی ضروری به نظر می‌رسد.

## مواد و روش‌ها

### تکثیر مصنوعی و ذخیره‌سازی تخم‌ها در انکوباتور

اجرای این تحقیق در مرکز بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی واقع در سد سنگر- رشت انجام شد. در ابتدا، از مولدین نر و ماده تاسماهی ایرانی پس از طی شدن مراحل تکثیر مصنوعی، اسپرم و تخمک کافی استحصال گردید. پس از لقاح، در سالن انکوباسیون با توجه به تعداد تیمارها و تکرارها تعداد ۱۵ سینی انکوباتور یوشچنکو برای اجرای پروژه استفاده شد. حجم آب تمام

سینی‌ها یکسان و به‌طور مداوم آب تعویض گردید. منبع تأمین آب، آب چاه و در مـواقع ضروری از آب رودخانه (پس از فیلتراسیون) استفاده شد. بعد از توزین تخم‌ها توسط ترازوی دیجیتال، تعداد تخم به‌ازای هر گرم، وزن کل تخم‌ها در سینی و تعداد نهایی تخم‌های ذخیره‌سازی شده در انکوباتور به شرح ذیل محاسبه گردید.

وزن تخم‌ها در سینی (گرم) × تعداد تخم‌ها در گرم = تعداد کل تخم‌ها در سینی
۱۰۰ گرم × ۵۰ عدد =۵۰۰۰ تعداد کل تخم‌ها در سینی

با توجه به اختصاص سه سینی برای هر تیمار، تعداد تخم‌های ذخیره‌سازی شده برای هر تیمار ۱۵۰۰۰ عدد و تعداد کل تخم‌های ذخیره‌سازی شده برای ۵ تیمار ۷۵۰۰۰ عدد بود.

**تهیه عصاره، تیماربندی و افزودن عصاره به تخم‌ها**

عصاره‌های هیدروالکلی (حلال اتانول ۷۰٪) اکالیپتوس (ظاهر: شفاف، رنگ: قهوه‌ای و pH=5.02) و سیر (ظاهر: شفاف، رنگ: قهوه‌ای روشن و pH=6.49) از شرکت کشت و صنعت و فرآوری گیاهان دارویی سهاجیسا- مازندران تهیه و در ظروف تیره و دور از نور نگهداری شدند. تعداد پنج تیمار شامل تیمار اول: شاهد (فاقد عصاره)، تیمار دوم: ۵۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره سیر، تیمار سوم: ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره سیر، تیمار چهارم: ۵۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره اکالیپتوس و تیمار پنجم: ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره اکالیپتوس در سه تکرار در نظر گرفته شد (Amani Denji *et al*., 2020؛ Najafi & Zamini, 2013).

برای اثربخشی بیشتر عصاره‌های گیاهی، ابتدا آب ورودی سینی انکوباتور بسته شد (Shafizadeh *et al*., 2019)، سپس عصاره‌ها براساس تیمارهای تعریف‌شده به‌صورت یکنواخت در سینی‌های انکوباتور حل گردید تا در مدت زمان ۳۰ دقیقه ضدعفونی به‌صورت غوطه‌وری انجام شود. بعد از نمونه‌برداری از تخم‌ها، آب ورودی سینی‌ها را باز کرده تا جریان آب به روال عادی برگردد. از آنجا که زمان مصرف عصاره‌های گیاهی با مراحل رشد جنینی ارتباط مستقیمی دارند، درنتیجه از روش توصیه‌شده Dettlaff و همکاران (۱۹۹۳) استفاده شد که تأکید بر زمان لازم برای تقسیم میتوزی طی فاصله زمانی بین ظاهر شدن اولین شکاف تا دومین شکاف در تخم لقاح یافته دارد. عصاره‌های گیاهی در سه مرحله (روز) شامل مراحل ۱۵ تا ۱۷ رشد جنینی (پایان گاسترولاسیون)، مراحل ۲۸ و ۲۹ و مرحله ۳۳ رشد جنینی استفاده شدند (Azari Takami, 2009). در پایان مراحل ضدعفونی، درصد تفریخ یا تخم‌گشایی تخم‌ها محاسبه شد (Geffen & Evans, 2000).

تعداد تخم‌های چشم زده /۱۰۰× درصد تفریخ یا تخم‌گشایی = (تعداد تخم‌های تفریخ شده)

**کشت و شمارش کل باکتریایی**

پس از پایان سه مرحله ضدعفونی، نمونه‌برداری به‌صورت تصادفی از هر تکرار به مقدار ۲ گرم تخم انجام شد. نمونه‌های تخم با سرم فیزیولوژی استریل (۰/۹٪) شستشو داده شد و بعد محلول هموژن در ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل تهیه گردید. پس از تهیه رقّت‌های $10^{-1}$ تا $10^{-7}$، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقّت به محیط کشت تریپتیک سوی آگار (TSA) منتقل و به‌صورت کشت سطحی انجام شد. پلیت‌ها در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵-۳ روز ارزیابی گردیدند. تعداد کل باکتری‌ها براساسCFU (تعداد کلنی در گرم) شمارش شدند (Holt *et al*., 1994؛ Pollock *et al*., 2002).

**کشت و شمارش کل قارچی**

پس از پایان سه مرحله ضدعفونی، مقدار ۲ گرم تخم به‌صورت تصادفی به داخل ظروف استریل منتقل و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. نمونه‌های تخم ۳ تا ۵ بار به‌وسیله آب مقطر استریل شستشو شدند. برای شمارش کل، پس از تهیه محلول سوسپانسیون اقدام به رقیق‌سازی (۰/۱ و ۰/۰۱) در لوله‌های آزمایش گردید. ۰/۱ میلی‌لیتر از رقّت‌های بدست‌آمده توسط پیپت روی محیط کشت SDA[55] حاوی کلرامفنیکل ۱٪ و جنتامایسین (۸۰ میلی‌گرم) کشت داده شد. پلیت‌های کشت‌شده به مدت ۲ تا ۳ روز به‌منظور شمارش کلی و ۳ تا ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای رشد کامل پرگنه‌های قارچی انکوبه شدند. تعداد کلنی به‌ازای گرم تخم شمارش گردید (Willoughby, 1994).

**تجزیه‌وتحلیل آماری**

به‌منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها در گروه‌ها و تکرارها، از آزمون Shapiro-Wilk استفاده شد. با توجه به نرمال بودن داده‌ها، برای مقایسه میانگین بین تیمارها از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه و برای جداسازی گروه‌های همگن از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده گردید. از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها استفاده شد و داده‌ها به‌صورت میانگین± انحراف معیار ارائه شدند.

## نتایج

نتایج فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب در تیمارهای آزمایشی طی دوره انکوباسیون و در خلال مراحل ضدعفونی در جدول ۱ ارائه شده است. اختلاف معنی‌داری در فاکتورهای فیزیکوشیمیایی طی مراحل ضدعفونی مشاهده نشد ($P>0.05$).

براساس آزمون واریانس یک‌طرفه، به‌منظور مقایسه میانگین شمارش کل باکتریایی تخم، پس از استفاده از عصاره‌های سیر و اکالیپتوس در سطوح ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر با شاهد اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد ($P<0.05$). براساس آزمون دانکن، میانگین شمارش کل باکتریایی در تیمار اکالیپتوس ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کمتر ($P<0.05$) از سایر تیمارها بوده است. همچنین نتایج نشان داد که در سایر تیمارها کاهش تعداد کل باکتریایی نسبت به شاهد وجود داشته است ($P<0.05$) اما تیمار اکالیپتوس ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر عملکرد بهتری داشته است. از سوی دیگر، در میانگین شمارش کل قارچی در تخم هم اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد ($P<0.05$). به‌طوری که کلیه تیمارها کاهش معنی‌داری را نسبت به شاهد داشتند ($P<0.05$) و تیمار اکالیپتوس ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر عملکرد بهتری را ثبت کرد (جدول ۲).

جدول ۱- مقایسه میانگین تأثیر عصاره‌های گیاهی مختلف بر فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب محل رشد تخم تاسماهی ایرانی (***Acipenser persicus***) طی دوره انکوباسیون

**Table 1. Means comparison of different herbal extracts effects on physicochemical factors of water in which *Acipenser persicus* eggs grown during incubation period**

| Parameter | Control | Herbal extracts (mg.l$^{-1}$) | | | | F | d.f. | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *Allium sativum*$^{50}$ | *Allium sativum* $^{100}$ | *Eucalyptus globulus*$^{50}$ | *Eucalyptus globulus*$^{100}$ | | | |
| pH | 7.25±0.04$^{a}$ | 7.25±0.05$^{a}$ | 7.20±0.06$^{a}$ | 7.30±0.05$^{a}$ | 7.30±0.03$^{a}$ | 2.39 | 4 | 0.082 |
| Oxygen (mg.l$^{-1}$) | 9±0.12$^{a}$ | 9.27±0.09$^{a}$ | 9.44±0.06$^{a}$ | 9.55±0.03$^{a}$ | 9.75±0.03$^{a}$ | 5.53 | 4 | 0.088 |
| Temperature (˚C) | 18.15±0.09$^{a}$ | 18.20±0.06$^{a}$ | 18.17±0.05$^{a}$ | 18.10±0.06$^{a}$ | 18.25±0.08$^{a}$ | 0.702 | 4 | 0.608 |

In each row, means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

جدول ۲- مقایسه میانگین تأثیر عصاره‌های گیاهی مختلف بر بار باکتریایی و قارچی تخم تاسماهی ایرانی (***Acipenser persicus***) در پایان سه مرحله ضدعفونی طی دوره انکوباسیون

**Table 2. Means comparison of different herbal extracts effects on bacterial and fungal load of *Acipenser persicus* eggs at the end of three disinfection stages during incubation period**

| Parameter | Control | Herbal extracts (mg.l$^{-1}$) | | | | F | d.f. | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *Allium sativum*$^{50}$ | *Allium sativum* $^{100}$ | *Eucalyptus globulus*$^{50}$ | *Eucalyptus globulus*$^{100}$ | | | |
| Total bacterial count (log CFU.g$^{-1}$) | 7.62±0.13$^{c}$ | 6.24±0.06$^{b}$ | 6.26±0.03$^{b}$ | 6.38±0.06$^{b}$ | 5.92±0.87$^{a}$ | 10.24 | 4 | 0.001 |
| Fungal count (CFU.g$^{-1}$) | 27.33±2.84$^{c}$ | 17±0.57$^{b}$ | 16±2.08$^{b}$ | 19.33±1.33$^{b}$ | 10±1.15$^{a}$ | 12.42 | 4 | 0.001 |

In each row, means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

در شاخص‌های انکوباسیون (درصد تفریخ یا تخم‌گشایی و تعداد لاروهای سالم خارج‌شده از تخم) اختلاف معنی‌دار آماری در چهار تیمار دارویی عصاره‌های سیر (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و اکالیپتوس (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) با شاهد مشاهده شد ($P<0.05$). براساس آزمون دانکن، میانگین درصد تفریخ و تعداد لاروهای سالم خارج‌شده در تیمار اکالیپتوس ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشتر از سایر تیمارها بوده است ($P<0.05$). درصد تفریخ در تیمارهای ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سیر و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر اکالیپتوس باهم برابر بودند (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه میانگین تأثیر عصاره‌های گیاهی مختلف بر شاخص‌های انکوباسیون تخم تاسماهی ایرانی (***Acipenser persicus***) در پایان سه مرحله ضدعفونی

**Table 3. Means comparison of different herbal extracts effects on incubation indices of *Acipenser persicus* eggs at the end of three disinfection stages**

| Parameter | Control | Herbal extracts (mg.l$^{-1}$) | | | | F | d.f. | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *Allium sativum*$^{50}$ | *A. sativum*$^{100}$ | *Eucalyptus globulus*$^{50}$ | *E. globulus*$^{100}$ | | | |
| Hatching rate (%) | 43.66±1.52$^{a}$ | 49.66±2.51$^{b}$ | 55.33±1.52$^{b}$ | 55±2$^{c}$ | 62.66±2.51$^{d}$ | 35.28 | 4 | 0.000 |
| Number of healthy larvae | 2183.33±76.37$^{a}$ | 2483.33±125.83$^{b}$ | 2766.66±76.37$^{c}$ | 2750±100$^{c}$ | 3133.33±125.83$^{d}$ | 35.28 | 4 | 0.000 |

In each row, means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

## بحث

از راهکارهای افزایش مقاومت آبزیان در مقابل شرایط نامطلوب و استرس‌آور محیطی که می‌تواند رشد مناسب آنها را به‌دنبال داشته باشد، پایش دقیق پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب است (Makori *et al*., 2017). در این مطالعه ، پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب از وضعیت مطلوبی برای انکوباسیون تخم تاسماهی ایرانی برخوردار بودند. مدیریت بهداشتی صحیح، کاهش تراکم، خارج کردن سریع تخم‌های قارچ زده از انکوباتور و ضدعفونی تخم‌ها از اقدامات پیشگیری‌کننده مهم در کنترل آلودگی‌های قارچی محسوب می‌شوند (Swaef *et al*., 2015). مصرف داروهای شیمیایی با وجود تأثیرگذاری فوری و مفید، در برخی از مواقع عوارض جانبی به همراه داشته که حتی در صورت استفاده اصولی از آنها نمی‌توان از آثار مخربشان در امان بود. گیاهان دارویی به دلیل خواصشان از چند هزار سال پیش تاکنون مورد استفاده قرارگرفته‌اند. گیاهان، اسانس و عصاره آنها دارای سطوح متنوعی از فعالیت‌های زیستی بوده و فعالیت ضدمیکروبی تعداد زیادی از آنها ثابت شده است

(Chakraborty & Hancz, 2011).

Sattari و همکاران (۲۰۰۵) بیان کردند که عصاره‌های آبی و الکلی اکالیپتوس به‌خوبی می‌توانند از رشد باکتری سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) جلوگیری کنند. در این تحقیق، اثرهای ضدقارچی عصاره‌های اکالیپتوس و سیر بر تخم تاسماهی ایرانی به اثبات رسید. در تخم‌هایی که در معرض عصاره اکالیپتوس ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر قرار گرفتند کاهش بار باکتریایی مشهود بود که نشانگر این موضوع است که عصاره اکالیپتوس خاصیت ضدباکتریایی داشته و دارای قدرت مهار و کاهش رشد باکتری بوده و نسبت به سایر تیمارها عملکرد بهتری را نشان داده است.Ebrahimzadeh Mousavi و همکاران (۲۰۰۶) با کاربرد اسانس اکالیپتوس در کنترل آلودگی‌های قارچی تخم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) به این نتیجه رسیدند که غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اکالیپتوس اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشته و در مهار رشد قارچ‌ها نقش به‌سزایی ایفاء کرده‌اند. البته این محققان غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر را مطلوب و بهینه قلمداد کردند. در تحقیق پیش رو، قدرت مهار رشد قارچ‌ها بر تخم تاسماهی ایرانی در هر دو عصاره گیاهی به‌ویژه غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره اکالیپتوس به وضوح مشاهده شد. مقایسه اثرهای اکالیپتوس و مالاشیت‌سبز در کنترل آلودگی‌های قارچی تخم ماهی سفید دریای خزر (*R. kutum*) ثابت کرد که میزان اثر ضدقارچی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس اکالیپتوس بیشتر از مقدار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر بوده و اختلاف معنی‌دار آماری با گروه شاهد گزارش شد. ازآنجا که اکالیپتوس ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در کاهش و مهار بار قارچی تخم تاسماهی ایرانی مؤثرتر بوده و اثر ضدقارچی بیشتری داشته، بنابراین این بررسی در مطابقت با تحقیقات ذکرشده می‌باشد (Najafi & Zamini, 2013). در همین راستا، Mohammadi و همکاران (۲۰۱۳) به نتایج مشابهی در مورد بکارگیری عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس در سطوح ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر در ضدعفونی پوست و آبشش بچه ماهیان کپور معمولی (*C. carpio*) دست یافتند. مشخص شد که میانگین شمارش کل قارچی در سه مرحله ضدعفونی کمتر از گروه شاهد بوده و تأکید گردید که اگر درمان فوری نیاز باشد، استفاده از سطح ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر به دلیل عملکرد بهتر در کاهش بار قارچی و باکتریایی بهتر است. اثرهای ضدباکتریایی عصاره اکالیپتوس در سطوح ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر انواع باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت آزمایش گردید و مشخص شد که سطوح ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر اثرهای شگرفی بر باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus* داشته است (Alizadeh Behbahani *et al*., 2013). از سوی دیگر، Park و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که سطوح ۲۰ و ۴۰ میکروگرم اسانس اکالیپتوس توانست فعالیت هفت باکتری بیماری‌زای کفشک ماهی زیتونی (*Paralichthys olivaceus*) را مهار کند.

عصاره‌های گیاهی توانمندی‌های گوناگونی مانند تحریک اشتها، ارتقای رشد، کاهش استرس، تحریک پاسخ-های ایمنی و افزایش توان تولیدمثلی دارند. ترکیبات گیاهی می‌توانند هزینه‌های درمان را کاهش داده و نسبت به مولکول‌های سنتتیک، تجزیه‌پذیرتر باشند و با محیط زیست سازگار گردند (Chakraborty & Hancz, 2011). اکالیپتوس به دلیل داشتن ترکیباتی مانند سینئول، اکالیپتول و آلفا-پینن دارای خاصیت ضدعفونی، ضدالتهابی، ضددرد، آنتی‌اکسیدانی، ضدقارچی و ضدویروسی است. با عنایت به اینکه در این بررسی، عصاره اکالیپتوس دارای قدرت مهارکنندگی و کاهش بار باکتریایی بالاتری نسبت به سیر دارد، ازاین‌رو می‌تواند در سلامت تخم تاسماهی ایرانی مؤثرتر بوده و درنتیجه سلامت لاروهای حاصل را تضمین کرده، به‌طوری که تخم‌ها بدون هیچ‌گونه آسیب قارچی و باکتریایی دوران انکوباسیون را طی کرده و سبب بالارفتن درصد تفریخ، افزایش تعداد لاروهای سالم و در نهایت ارتقاء کارایی تکثیر شوند.

سیر به دلیل داشتن آلیسین تأثیر ضدقارچی قوی بر قارچ ساپرولگنیا داشته (Mohamed *et al*., 2011) و از

سوی دیگر به دلیل سرعت تجزیه عصاره‌های گیاهی و عدم آلودگی محیط زیست (Citarasu, 2010) می‌توان آن را به‌عنوان یک ماده ضدعفونی‌کننده در پیشگیری از بیماری در کارگاه‌های تکثیر ماهیان بکار برد. Shafiei و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی اثر غلظت‌های ۰/۳، ۰/۵، ۳، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره سیر در مقایسه با مالاشیت‌سبز و برونوپول بر تراکم قارچ ساپرولگنیا در انکوباسیون تخم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان اعلام کردند که غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیشترین اثر بازدارندگی را بر رشد قارچ داشته و تفاوت معنی‌داری را با دو ترکیب دیگر نشان داده است. همسو با یافته ذکرشده، Amani Denji و همکاران (۲۰۲۰) با بکارگیری سطوح ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره سیر در ضدعفونی تخم و لارو ماهی قزل آلای رنگین‌کمان به این نتیجه دست یافتند که بیشترین میزان تلفات تخم تا مرحله چشم‌زدگی برای گروه شاهد و کمترین مقدار آن در عصاره ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سیر ثبت شد. همچنین، همین سطح از عصاره سیر کمترین میزان تلفات را در مرحله تخم‌گشایی تا وزن یک گرم داشت. این نتایج، مشابه این مطالعه تأییدکننده اثرهای ضد قارچی قوی عصاره سیر می‌باشد. اثرهای ضدباکتریایی قوی سیر بر باکتری *Streptococcus iniae* و گونه‌های آئروموناس در ماهی تیلاپیا گزارش شده است (Mohamed *et al*., 2011). در مطالعات Militz و همکاران (۲۰۱۴) عصاره سیر در سطوح ۱ و ۲ میلی‌لیتر در قیاس با فرمالین علیه قارچ *Neobenedenia* sp. در ماهی باس آسیایی (*Lates calcarifer*) عملکرد بسیار مطلوبی داشته است.

البته مدت زمان اثرگذاری و حفظ ترکیبات پس از گذشت زمان در استفاده از داروها و عصاره‌های گیاهی تعیین‌کننده است. طبق گزارش Shafiei و همکاران (۲۰۱۶) قدرت بازدارندگی عصاره سیر در روز سوم (۷۲ ساعت) نسبت به روزهای اول و دوم کاهش پیدا کرد. اشاره شد که شاید در روز سوم با کم اثر شدن عصاره، قارچ توانایی رشد بیشتری پیدا کرده است. البته این نتیجه‌گیری در تضاد با این یافته‌ها بوده، زیرا ضدعفونی تخم تاسماهی ایرانی در سه مرحله با توجه به پیشرفت دوره انکوباسیون انجام شده و در هر مرحله تأثیر عصاره‌ها بیشتر از مرحله قبلی بوده است. در طول این تحقیق، تغییری در شکل ظاهری لاروها مشاهده نشد که این مسئله می‌تواند به‌عنوان بی‌خطر بودن عصاره‌های گیاهی مورد ملاحظه قرار گیرد. فاکتورهای متنوعی از قبیل نوع و ترکیبات موجود در گیاه، میزان غلظت مورد استفاده، نوع میکروارگانیسم، میزان pH و دمای محیط قادرند بر ظرفیت ضدمیکروبی عصاره‌ها و ترکیبات گیاهی تأثیرگذار باشند.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی باید گفت که با توجه به اینکه بین غلظت‌های مختلف عصاره سیر از لحاظ شمارش قارچی و شمارش باکتریایی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، می‌توان با توجه به جنبه اقتصادی، غلظت ۵۰ میلی‌گرم را به‌عنوان غلظت مطلوب پیشنهاد کرد. ولی در مورد عصاره اکالیپتوس، غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بالاترین کارایی را داشته و توصیه می‌گردد. این مطالعه ثابت کرد که ضدعفونی تخم‌های تاسماهی ایرانی با عصاره‌های اکالیپتوس و سیر سبب شده که از قارچ‌زدگی تخم‌ها تا حد زیادی جلوگیری شود و با افزایش درصد تخم‌گشایی، کارایی تکثیر ارتقاءیافته که می تواند باعث بهبود عملکرد مراکز تکثیر تاسماهی ایرانی شود.

## سپاسگزاری

از زحمات و همکاری صمیمانه آقایان مهندس عباسعلی‌زاده، مهندس محمدی پرشکوهی و مهندس جلیل‌پور صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

## References

- Abravesh, Z., Sefidkon, F. and Assareh, M.H., 2007. Extraction and identification of essential oil components of five Eucalyptus species in warm zones of Iran. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 23(3): 323-330.
- Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, A., Zendeboodi, F., Gholian, M.M. and Vasiee, A.R., 2013. Effect of aqueous and ethanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* L. on food infection and intoxication microorganisms "*in vitro*". Journal of Paramedical Sciences, 4(3): 89-99.
- Amani Denji, K., Soltani, M., Rajabi Islami, H. and

Kamali, A., 2020. The antifungal effects of *Allium sativum* and *Artemisia sieberi* extracts on hatching rate and survival of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) larvae. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 19(2): 669-680.
- Assareh, M.H., Sedaghati, M., Kiarostami, K. and Ghamari Zare, A., 2010. Seasonal changes of essential oil composition of *Eucalyptus maculata* Hook. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 25(4): 581-588.
- Awad, E. and Awaad, A., 2017. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. Fish and Shellfish Immunology, 67: 40-54.
- Ayepola, O. and Adeniyi, B., 2008. The antibacterial activity of leaf extracts of *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae). Journal of Applied Sciences Research, 4(11): 1410-1413.
- Azari Takami, G., 2009. Breeding and Cultivation of Sturgeon Caviarian Fish. University of Tehran presss, Iran, 420p.
- Bokaeian, M., Farazmand, R. and Key Ghobadi, S., 2015. The antimicrobial activity of extract of *Allium sativum* against *Staphylococcus aureus* resistant antibacterial. Journal of Plant Research, 28(1): 34-41.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A. and Igic, R., 2008. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum*). Food Chemistry, 111(4):925-929.
- Bruno, D.W. and Wood, B.P., 1994. *Saprolegnia* and other Oomycetes: 599-659. In: Woo, P.T.K. and Bruno, D.W., (Eds.). Fish Diseases and Disorders, Viral, Bacterial and Fungal Infections. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, United Kingdom, 877p.
- Chakraborty, S.B. and Hancz, C., 2011. Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. Reviews in Aquaculture, 3(3): 103-119.
- Citarasu, T., 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. Aquaculture International, 18: 403-414.
- Dettlaff, T.A., Ginsburg, A.S. and Schmalhausen, O.I., 1993. Sturgeon Fishes: Developmental Biology and Aquaculture. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 300p.
- Ebrahimzadeh Mousavi, H., Rohani, M., Khowsravi, A., Mehrabi, Y. and Basti, A., 2006. The evaluation of *Eucaliptus camaldolensis* Dehnh. essence application in control of fungal pollution of trout eggs. The Journal of Medicinal Plants, 5(20): 42-47.
- Geffen, A.J. and Evans, J.P., 2000. Sperm traits and fertilization success of male and sex reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 182: 61–72.
- Gilles, M., Zhao, J., An, M. and Agboola, S., 2010. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. Food Chemistry, 119: 731-737.
- Harris, J.C., Cottrell, S.L., Plummer, S. and Loyd, D., 2001. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). Applied of Microbiology and Biotechnology, 57(3): 282-286.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Stanley, J.T. and William, S.T., 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilikins, Baltimore, USA, 1094p.
- Kazemipour, Y., Rezaei, M. and Keyvani, Y., 2004. Qualitative comparison of effects of garlic and mallow and motherworth extracts in healing of superfacial wounds in the common carp (*Cyprinus carpio*). Pajouhesh and Sazandegi, 66: 93-97.
- Keykha, S., Gharaei, A., Mirdar Harijani, J., Ghaffari, M. and Rahdari, A., 2015. Antifungal effects of metalonic sumac (*Rhus coriaria* L.) essential oil on *Schizothorax zarudnyi* eggs. Journal of Veterinary Research, 70(2): 131-137.
- Kwan, P.P., Banerjee, S., Shariff, M., Syahira Ishak, N.A. and Yusoff, F.M., 2018. Quantitative analysis of malachite green and leucomalachite green residues in fish purchased from the markets in Malaysia. Food Control, 92: 101-106.
- Makori, A.J., Abuom, P.O., Kapiyo, R. Anyona, D.N. and Dida, G.O., 2017. Effects of water physico-chemical parameters on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth in earthen ponds in Teso North Sub-County, Busia County. Fisheries and Aquatic Sciences, 20: 30.
- 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 Diseases, 37: 451-461.
- Mohamed, M., Hussein, A.H., Hassan, W.H., Mohamed, I.K. and Moussa, I.M., 2011. Potential use of allicin (garlic, *Allium sativum* L., essential oil) against fish pathogenic bacteria and its safety for monosex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Food, Agriculture and Environment, 11(1): 696-699.
- Mohammadi, M., Zamini, A.A. and Vahabzadeh Roodsari, H., 2013. Evaluating Anti-bacterial and anti-fungal effects of *Eucalyptus globulus* Labill. hydroalcoholic extract on the skin and gills of common carp fingerlings (*Cyprinus carpio*). Journal of Aquatic Animals and Fisheries, 4(16): 63-71.

contamination in eggs of sturgeon (*Acipenser persicus* and *Acipenser stellatus*). Journal of Animal Environment, 11(3): 231-238.- Shahrani, M., Azari Takami, G., Sharif Rohani, M., Motallebi, A. and Yazdani Sadati, M., 2021. Antifungal effects of alcoholic extract of *Thymus vulgaris* on Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) eggs compared with malachite green effects. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 20(1): 218-229.

- Shang, A, Cao, S.Y., Xu, X.Y., Gan, R.Y., Tang, G.Y., Corke, H., Mavumengwana, V. and Li, H.B., 2019. Bioactive Compounds and Biological Functions of Garlic (*Allium sativum* L.). Foods, 8(7): 246-277.
- Sirvastava, K., 2007. Green supply-chain management: a state-of-the-art literature review. International Journal of Manag Review, 9(1): 53-80.
- Swaef, E., Den Broeck, W., Dierckens, K. and Decostere, A., 2015. Disinfection of teleost eggs: a review. Reviews in Aquaculture, 7: 1-21.
- Szychowski, K.A., Rybczyńska-Tkaczyk, K., Gaweł-Bęben, K., Świeca, M., Karaś, M., Jakubczyk, A. Matysiak, M. Binduga, U.F. and Gmiński, J., 2018. Characterization of Active Compounds of Different Garlic (*Allium sativum* L.) Cultivars. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 68(1): 73-81.
- Valenzuela-Gutierrez, R., Lago-Lestón, A., Vargas-Albores, F., Cicala, F. and Martinez‐Porchas, M., 2021. Exploring the garlic (*Allium sativum*) properties for fish aquaculture. Fish Physiology and Biochemistry, 47: 1179-1198.
- Willoughby, I.G., 1994. Fungi and Fish Diseases. Pisces Press. Stirling, Scotland, 57p.
- Zhu, F., 2020. A review on the application of herbal medicines in the disease control of aquatic animals. Aquaculture, 526: 735422.
- Zhu, Q.Y., Huang, Y. and Chen, Z.Y., 2000. Interaction between flavonoids and α-tocopherol in human low density lipoprotein. Journal of Nutritional Biochemistry, 11(1): 14-21.
- Nagata, H., Inagaki, Y., Yamamoto, Y., Maeda, K., Kataoka, K., Osawa, K. and Shizukuishi, S., 2006. Inhibitory effects of macrocarpals on the biological activity of *Porphyromonas gingivalis* and other Periodontopathic Bacteria. Oral Microbiolgy and Immunology, 21(3): 159-163.
- Najafi, M. and Zamini, A.A., 2013. Comparative analysis of antifungal properties of *Zataria multiflora* Boiss, *Eucalyptus* spp. essence and malachite green on eggs of kutum (*Rutilus frisii Kutum*). Advances in Biological Research, 7(5): 163-168.
- Park, J.W., Wendt, M. and Heo, G.J., 2016. Antimicrobial activity of essential oil of *Eucalyptus globulus* against fish pathogenic bacteria. Laboratory Animal Research, 32(2): 87-90.
- Pollock, R.A., Finlay, L., Mondschein, W. and Modesto, R.R., 2002. Laboratory Exercises in Microbiology. John Wiley and Sons INC., New York, USA, 232p.
- Pourali Foshtomi, H., Pourkazemi, M., Bahmani, M., Yeganeh, H. and Nezami, A.A., 2011. Comparison study on growth performance and survival rate of *Acipenser persicus* larvae using formulated diets and live food. Journal of Oceanography, 2(6): 31-42.
- Sattari, M., Shahbazi, N. and Najarpirayeh, S., 2005. Evaluation of the antibacterial effect of aqueous and alcoholic extracts of eucalyptus on *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Pathobiology Research, 8(1): 19-23.
- Shafiei, F, Davoodi, R, Bagheri, D, Jamali, F. and Nooryazdan, H., 2016. Effect of the Garlic extract (*Allium sativum*), on *Saprolegnia* isolated from Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) eggs compared with Malachite green and Bronopol. The Journal of Applied Ichthyological Research, 4(3): 93-105.
- Shafizadeh, S.M., Khara, H. and Shenavar Masouleh, A.R. 2019. The efficiency of Nanosil (Hydrogen peroxide with silver ions) to control fungal