

مقایسه تأثیر فرمولاسیون های بیولوژیک حاوی متارایزیوم آنیزوپیله بر کنه های هیالوما

محمد میرزایی^۱، امید دیانی^{۲*}، طوبی ملایی جواران^۳

گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران؛ گروه علوم دامی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران؛ دانشجو،

گروه علوم دامی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۳۱

چکیده:

زمینه و هدف: قارچ های جنس متارایزیوم به طور فزاینده ای در فرمول های تجاری در برابر حشرات استفاده می شوند. به هر صورت، در مطالعات تجربی اثر ضد کنه ای آن ها کمتر بررسی شده است. با توسعه مقاومت کنه ها به کنه کش ها و آگاهی ما از اینکه مواد شیمیایی برای محیط زیست مضر هستند، این مطالعه با هدف بررسی استفاده از ۴ فرمولاسیون مختلف از قارچ متارایزیوم آنیزوپیله برای مبارزه با کنه هیالوما انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۴ فرمولاسیون مختلف شامل: آب مقطر با ۰/۲ درصد توئین و متارایزیوم آنیزوپیله، آب مقطر با ۱۰ درصد روغن پنبه دانه، ۰/۰۱ درصد ساکارز با ۰/۲ درصد توئین و متارایزیوم آنیزوپیله، آب مقطر با ۱۰ درصد پارافین مایع، ۰/۰۱ درصد ساکارز با ۰/۲ درصد توئین و متارایزیوم آنیزوپیله و آب مقطر (شاهد) استفاده گردید. چهار فرمولاسیون تهیه شده روی بدن ۱۲۸ کنه بالغ در چهار گروه در شرایط یکسان پاشیده شد. پس از پاشش فرمولاسیون ها، تعداد کنه مرده در روزهای بعد شمارش شدند. تأثیر تیمارها بر مرگ و میر کنه ها با استفاده از آنالیز بقاء برای زمان بررسی شد.

یافته ها: گرچه اثر فرمولاسیون های آب، پارافین مایع و روغن پنبه دانه با قارچ متارایزیوم آنیزوپیله، از نظر آماری با همدیگر اختلاف معنی داری نداشتند، لیکن اثر فرمولاسیون روغن پنبه دانه بهتر بود. بین اثر فرمولاسیون های حاوی قارچ و فرمولاسیون فاقد قارچ (شاهد) اختلاف آماری معنی داری مشاهده گردید ($P < 0.05$).

نتیجه گیری: برای از بین بردن کنه هیالوما روی بدن دام ها، به جای استفاده از سموم و مواد شیمیایی می توان سوسپانسیون روغن پنبه دانه حاوی قارچ متارایزیوم آنیزوپیله را مورد استفاده قرار داد. بدون اینکه ضرری برای محیط زیست، دام ها و انسان داشته باشد. با این حال تحقیقات بیشتری در این خصوص توصیه می گردد.

واژه های کلیدی: کنه هیالوما، فرمولاسیون روغنی، مبارزه بیولوژیک، متارایزیوم آنیزوپیله.

مقدمه:

کنه ها از طریق ایجاد خسارت به پوست و چرم و فراورده های دامی و کاهش تولید گوشت بر عملکرد دام تأثیر می گذارند (۱). مطالعات انجام شده نشان می دهند برای پیشگیری از انتقال بیماری ها به دام و انسان و نیز برای جلوگیری از ایجاد خسارات اقتصادی در دام ها، بهترین روش از بین بردن ناقلین اصلی یعنی کنه ها می باشد. در حال حاضر، برای از بین بردن تمام

انگل های خارجی در تمام گونه های جانوری وجود داشته و خسارت فراوانی به دام ها وارد می نمایند. این انگل ها باعث کاهش بازدهی دام ها به علت ایجاد بیماری های پوستی، کم خونی، لاغری و کاهش رشد می شوند. انتقال عوامل بیماریزای دامی و انسانی مانند تیلیویوز، بیماری ویروسی تب خونریزی دهنده کریمه-کنگو و انسفالیت توسط کنه صورت می گیرد.

کشش سطحی و تندش اسپورها شده و باعث می گردد در فرمولاسیون، روغن و آب مقطر به صورت امولسیون درآیند (۸). برای افزایش سرعت رشد اسپورها به فرمولاسیون ساکارز اضافه می شود تا پیش از ایجاد آلودگی، قارچ در کنه هیالوما رشد کند (۱۰)؛ بنابراین هدف از این مطالعه استفاده از روغن پنبه دانه، پارافین مایع، توئین و ساکارز به منظور تهیه سوسپانسیون با اسپور قارچ متارازیوم آنیزوپیل به غلظت $10^8 \times 1/76$ اسپور قارچ در هر میلی لیتر برای مبارزه با کنه هیالوما بود.

روش بررسی:

برای انجام این مطالعه تجربی، کنه های سخت از روی بدن گاو از نواحی گوش، کشاله ران و زیر دم به وسیله پنس جمع آوری شد؛ سپس کنه های جمع آوری شده در آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان تعیین جنس شده و فقط ۱۲۸ کنه ماده بالغ خون خورده جنس هیالوما جهت انجام آزمایش انتخاب شدند. کنه های ماده بالغ خون خورده در طول دوره آزمایش، در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و رطوبت ۷۰-۶۵ درصد بر روی خاک نگهداری شدند (۱۱).

قارچ *Metarhizium anisopliae* V245PTCC5281

برای مبارزه با کنه هیالوما، از وزارت علوم تحقیقات و فناوری سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. قارچ ها در محیط کشت (Potato Dextrose Agar= PDA) کشت داده شدند، پس از ۱۵ روز کلنی متارازیوم آنیزوپیل در انکوباتور در دمای ۲۹-۲۸ درجه سانتی گراد رشد کرد. برای ایجاد سوسپانسیون اسپور قارچ، ۵۰ سی سی آب مقطر و ۰/۱ سی سی توئین ۸۰ به همراه چند پرل شیشه ای استریل به لوله های حاوی قارچ متارازیوم آنیزوپیل اضافه شد، سپس به منظور جداسازی اسپورها از میسلیوم ها لوله ها به شدت تکان داده شدند و سوسپانسیون به دست آمده در ارلن استریل جمع آوری شد. در نهایت سوسپانسیون به مدت ۱۵ دقیقه در شیکر

انگل های خارجی دام و مبارزه با کنه ها از حمام ضد کنه یا سموم شیمیایی از جمله سموم کلره، فسفره، کاربامات و پایرتروئیدها استفاده می شود (۲)؛ اما کاربرد این سموم برای دام ها و انسان مسموم کننده بوده، زیرا به صورت اختصاصی عمل نکرده و نیز پایداری آن ها در محیط زیست سبب مشکلات متعدد زیست محیطی می گردد، از طرفی در گونه تحت مبارزه مقاومت به سم ایجاد می شود (۳-۵).

از بین روش های غیر شیمیایی مبارزه با انگل های خارجی، بیشترین کاربرد مربوط به روش های ایمونولوژی و بیولوژی است. از واکنش های نو ترکیب برای مبارزه با کنه ها استفاده شده است؛ ولی تنها ۳۰ تا ۳۵ درصد تأثیر گذار بوده اند. از طرفی برای کنه های دو میزبان یا سه میزبان از جمله هیالوما هنوز واکنش مناسبی تهیه نشده است. محققین برای کنترل بیولوژیک حشرات، از قارچ متارازیوم آنیزوپیل (*Metarhizium anisopliae*) به عنوان پارازیت اختصاصی حشرات استفاده کرده اند (۶). محققین در رابطه با مکانیزم عمل قارچ متارازیوم آنیزوپیل بر روی کنه بیان کرده اند که این قارچ به علت داشتن برخی از آنزیم ها از جمله آنزیم کیتیناز، آنزیم لیپاز و سایر آنزیم ها می تواند پوشش و سطح محافظتی کنه را که کیتین می باشد، تجزیه کرده و در نتیجه با از بین بردن لایه سطحی بدن کنه به درون کنه نفوذ می کنند، سپس با استفاده از آنزیم لیپاز و سایر آنزیم ها باعث تجزیه کنه از درون می شود، در نتیجه موجب مرگ و از بین رفتن کنه می گردد (۷).

برای ساخت فرمولاسیون کاربردی، بالا بردن راندمان این فرمولاسیون، ایجاد چسبندگی لازم و افزایش طول عمر اسپور قارچ ها از دو نوع روغن گیاه پنبه دانه و پارافین مایع استفاده شده است (۸). استفاده از فرمولاسیون روغنی، اسپور قارچ ها را تا حدی در برابر اشعه UV خورشید محافظت می کند (۹) و به منظور تأمین رطوبت لازم برای افزایش کارایی فرمولاسیون از توئین ۸۰ استفاده شده است. توئین موجب افزایش

۳۰ دقیقه شیکر (۲۵۰ دور در دقیقه) شدند. تعداد ۱۲۸ کنه ماده جمع آوری شده که خون هم خورده بودند به چهار گروه مساوی تقسیم شدند. فرمولاسیون های تهیه شده بر روی بدن کنه ها پاشیده شد. برای نگهداری کنه ها از لیوان های یکبار مصرف به طول ۹ سانتی متر استفاده شد. کف لیوان ها با شن و ماسه مرطوب پوشیده شد. در هر لیوان ۴ عدد کنه قرار داده شد و لیوان ها در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و رطوبت ۸۰-۷۵ درصد نگهداری شدند (۱۰). هر لیوان با چهار کنه به عنوان یک تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد. مرگ و میر کنه ها در یک دوره ۱۳ روزه مورد بررسی قرار گرفت (جدول شماره ۱).

(۱۵۰ دور در دقیقه) قرار داده شد. سوسپانسیون ساخته شده با استفاده از لام نئوبار تعیین غلظت شد (۱۵-۱۲) و از این سوسپانسیون، نهایتاً ۴ فرمولاسیون مختلف با غلظت $10^4 \times 1/76$ اسپور قارچ در هر میلی لیتر ساخته شد و بر روی کنه ها اسپری شد. فرمولاسیون های ساخته شده عبارت بودند از: (آب مقطر با ۰/۲ درصد توئین و متارایزیوم آنیزوپیله، ۲) آب مقطر با ۱۰ درصد روغن پنبه دانه، ۰/۱ درصد ساکارز با ۰/۲ درصد توئین و متارایزیوم آنیزوپیله، ۳) آب مقطر با ۱۰ درصد پارافین مایع، ۰/۱ درصد ساکارز با ۰/۲ درصد توئین و متارایزیوم آنیزوپیله، ۴) آب مقطر (شاهد). پس از تهیه فرمولاسیون ها، به منظور یکنواخت شدن آن ها به مدت

جدول شماره ۱: ترکیبات فرمولاسیون های ساخته شده با قارچ *Metarhizium anisopliae*

شماره فرمولاسیون	ترکیبات فرمولاسیون
۱	آب مقطر، ۰/۲ درصد توئین و قارچ
۲	آب مقطر، ۰/۲ درصد توئین، ۱۰ درصد روغن پنبه دانه، ۰/۱ درصد ساکارز و قارچ
۳	آب مقطر، ۰/۲ درصد توئین، ۱۰ درصد پارافین مایع، ۰/۱ درصد ساکارز و قارچ
۴	آب مقطر

اختلاف آماری معنی داری بین چهار گروه کنه مشاهده نگردید ($P > 0/05$) (نمودار شماره ۱)؛ اما پس از گذشت ۴ روز، بیشترین میزان مرگ و میر کنه ها با فرمولاسیون های (آب مقطر، ۰/۲ درصد توئین با قارچ متارایزیوم آنیزوپیله) و (۱۰ درصد پارافین مایع، ۰/۱ درصد ساکارز، ۰/۲ درصد توئین با قارچ متارایزیوم آنیزوپیله) به دست آمد؛ اما ۶ روز پس از پاشش بیشترین میزان مرگ و میر کنه ها با فرمولاسیون (آب مقطر، ۱۰ درصد روغن پنبه دانه، ۰/۱ درصد ساکارز و ۰/۲ درصد توئین با قارچ متارایزیوم آنیزوپیله) به دست آمد. البته تحلیل آماری تأثیر تیمارها بر مرگ و میر کنه های هیالوما با استفاده از آنالیز بقاء برای زمان و نرم افزار SPSS و ($P < 0/05$) بررسی شد.

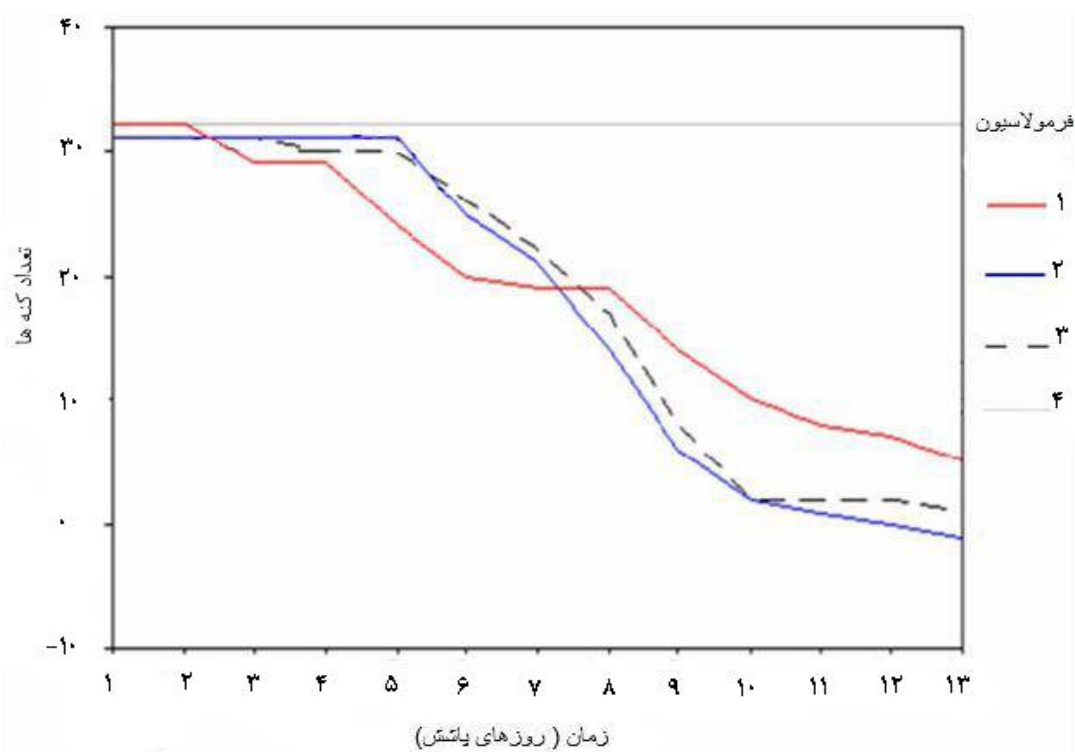
به منظور اثبات تأثیر فرمولاسیون های ساخته شده حاوی قارچ بر روی کنه ها و اطمینان از مرگ و میر آن ها در اثر فعالیت قارچ ها، کنه های مرده بر روی لام قرار داده شدند. با استفاده از سوزن تشریح اجساد آن ها شکافته شد، سپس بافت های بدن کنه ها که در اثر فعالیت قارچ ها تجزیه شده بود در زیر میکروسکوپ بررسی شد. در روش آماری تأثیر تیمارها بر مرگ و میر کنه های هیالوما با استفاده از آنالیز بقاء برای زمان و نرم افزار آماری SPSS و ($P < 0/05$) بررسی شد.

یافته ها:

از نظر میزان مرگ و میر کنه های هیالوما تا ۴ روز پس از اسپری کردن فرمولاسیون های مختلف،

اسپور قارچ و گروه کنه درمان شده با فرمولاسیون فاقد اسپور قارچ (گروه شاهد) اختلاف آماری معنی داری مشاهده گردید ($P < 0/05$).

سه گروه کنه درمان شده با سه فرمولاسیون حاوی قارچ متارایزیوم آنیزوپیله، وجود ندارد؛ ولی بین این سه گروه کنه درمان شده با فرمولاسیون های حاوی



نمودار شماره ۱: مقایسه بین عملکرد فرمولاسیون های مختلف بر میزان مرگ و میر و کاهش تعداد کنه های هیالوما

هیچ کنه ای تلف نشد. در ۱۳ روز پس از پاشش فرمولاسیون ها، تمام کنه ها تحت تأثیر دو فرمولاسیون آب مقطر، ۰/۲ درصد توئین، ۱۰ درصد روغن پنبه دانه، ۰/۰۱ درصد ساکارز و قارچ، آب مقطر، ۰/۲ درصد توئین، ۱۰ درصد روغن پارافین مایع، ۰/۰۱ درصد ساکارز و قارچ از بین رفتند. در حالی که با فرمولاسیون آب مقطر، ۰/۲ درصد توئین و قارچ حدود ۸۵ درصد کنه ها (۲۷ کنه) تلف شدند. به طور کلی در پایان ۱۳ روز پس از پاشش فرمولاسیون های حاوی قارچ متارایزیوم آنیزوپیله، تعداد ۹۱ کنه تلف شد؛ ولی در کل ۱۳ روز مطالعه و بررسی میزان مرگ و میر کنه ها، فرمولاسیون آب مقطر تأثیری بر کنه ها نگذاشت و تمامی آن ها زنده ماندند.

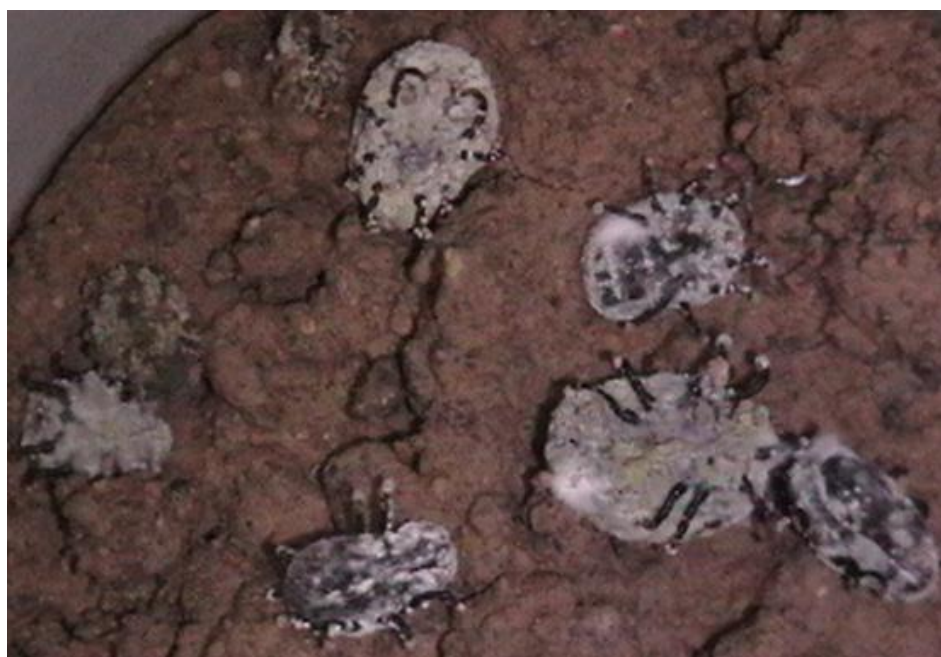
تأثیر فرمولاسیون های مختلف با قارچ و بدون قارچ بر میزان مرگ و میر کنه ها پس از ۹ روز در جدول شماره ۲ آورده شده است. ۹ روز پس از پاشش فرمولاسیون های مختلف بر روی کنه ها مشخص شد که فرمولاسیون های حاوی قارچ متارایزیوم آنیزوپیله در از بین بردن کنه ها به طور معنی داری ($P < 0/05$) موثر بودند. به گونه ای که فرمولاسیون های حاوی قارچ متارایزیوم آنیزوپیله بین ۶۸-۹۷ درصد کنه ها را از بین بردند. بیشترین میزان مرگ و میر با سوسپانسیون آب مقطر، ۰/۲ درصد توئین، ۱۰ درصد روغن پنبه دانه، ۰/۰۱ درصد ساکارز و حاوی قارچ متارایزیوم آنیزوپیله به میزان ۹۶/۷۷ درصد بدست آمد. در گروه شاهد، سوسپانسیون حاوی آب مقطر و بدون قارچ،

جدول شماره ۲: تأثیر فرمولاسیون های مختلف بر میزان مرگ و میر کنه هیالوما در طول زمان

شماره فرمولاسیون	ترکیبات فرمولاسیون	درصد تلفات پس از ۹ روز	درصد تلفات پس از ۱۳ روز
۱	آب مقطر، ۰/۲ درصد توئین، متارایزیوم آنیزوپیله	۶۷/۷۵	۸۴/۶۲
۲	آب مقطر، ۰/۲ درصد توئین، ۱۰ درصد روغن پنبه دانه، ۰/۰۱ درصد ساکارز، متارایزیوم آنیزوپیله	۹۶/۷۷	۱۰۰
۳	آب مقطر، ۰/۲ درصد توئین، ۱۰ درصد پارافین مایع، ۰/۰۱ درصد ساکارز، متارایزیوم آنیزوپیله	۹۰/۹	۱۰۰
۴	آب مقطر	—	۰

در بین فرمولاسیون های حاوی سوسپانسیون اسپور قارچ متارایزیوم آنیزوپیله، فرمولاسیون متشکل از آب مقطر، ۱۰ درصد روغن پنبه دانه، ۰/۰۱ درصد ساکارز و ۰/۲ درصد توئین بیشترین تأثیر را داشت و بیشترین میزان مرگ و میر کنه ها با این فرمولاسیون به دست آمد و کم اثر ترین فرمولاسیون بر مرگ و میر کنه ها، فرمولاسیون حاوی آب مقطر، ۰/۲ درصد توئین و قارچ متارایزیوم آنیزوپیله بود. تشریح اجساد کنه ها پس از تلف شدن نشان

داد که فرمولاسیون های ساخته شده حاوی اسپور قارچ بر کنه ها اثر گذاشته و مرگ و میر کنه ها در اثر فعالیت قارچ ها بوده است (تصویر شماره ۱)؛ همچنین با بررسی میکروسکوپی رشد میسلیم قارچ بر روی کنه ها مشخص شد که میسلیم قارچ ها بر سطح کوتیکول کنه هیالوما رشد کرده و در نتیجه باعث از بین رفتن کنه ها شدند. نحوه رشد میسلیم قارچ متارایزیوم آنیزوپیله بر سطح کوتیکول کنه هیالوما در تصویر شماره ۲ آورده شده است.



تصویر شماره ۱: تأثیر گذاری قارچ متارایزیوم آنیزوپیله بر مرگ و میر کنه هیالوما



تصویر شماره ۲: بررسی میکروسکوپی رشد میسلیم قارچ متارایزیوم آنیزوپيله بر سطح کوتیکول کنه هیالوما

بحث:

فرمولاسیون متارایزیوم آنیزوپيله با روغن پنبه دانه میزان مرگ و میر ملخ دریایی را تا ۱۰۰ درصد افزایش داده است. روغن پنبه دانه و روغن پارافین موجود در فرمولاسیون های روغنی سبب چسبندگی بیشتر اسپورهای قارچ به کوتیکول سطح بدن کنه شده و در نتیجه فرایند رشد و نفوذ قارچ در بدن کنه و انهدام کنه تسهیل می گردد (۱۸). در مطالعه حاضر نیز، دو فرمولاسیون حاوی روغن پنبه دانه و روغن پارافین سبب مرگ ۱۰۰ درصد کنه ها پس از ۱۳ روز شدند؛ ولی تأثیر گذاری فرمولاسیون فاقد روغن پنبه دانه و روغن پارافین کمتر بود. در این مطالعه برای نخستین بار کنه هیالوما در شرایط غیر استریل و شبیه سازی شده با شرایط مزرعه نگهداری شد و تأثیرگذاری فرمولاسیون های مختلف بر کنه هیالوما در چنین شرایطی بررسی گردید، تا نتایج به دست آمده به نتایج کاربردی در مزرعه نزدیک تر باشد. با توجه به اینکه در خاک مزرعه گونه های بسیاری از میکروارگانیسم ها وجود دارند و با توجه به رقابت موجود بین این

تحقیقات نشان داده است که قارچ متارایزیوم آنیزوپيله دارای کمترین خطر برای مهره داران از جمله انسان و دام می باشد و همچنین دارای کمترین خطر برای محیط زیست می باشد (۱۶)؛ بنابراین این مطالعه با هدف بررسی استفاده از ۴ فرمولاسیون مختلف از قارچ متارایزیوم آنیزوپيله به عنوان جایگزینی مناسب برای سموم شیمیایی جهت مبارزه با کنه هیالوما انجام شد. به این منظور فرمولاسیون های روغنی و آبی با استفاده از اسپور قارچ متارایزیوم آنیزوپيله ساخته و بر روی کنه هیالوما پاشیده شد. در مطالعه حاضر، فرمولاسیون های ساخته شده با روغن به همراه متارایزیوم آنیزوپيله تأثیرگذاری بیشتری نسبت به فرمولاسیون آبی داشتند؛ همچنین Polar و همکاران برای مبارزه با کنه های بوفیلوس میکروپلوس (*Boophilus microplus*) با استفاده از قارچ متارایزیوم آنیزوپيله، در ساخت فرمولاسیون از روغن پارافین استفاده کردند و دریافتند که تأثیر پذیری فرمولاسیون تا ۲ برابر افزایش یافت (۱۷)؛ همچنین گزارش شده است که

نتیجه گیری:

برای بررسی تأثیر فرمولاسیون های مختلف بر میزان مرگ و میر کتله ها از روش پاشش استفاده شد تا نتایج حاصل از آن به نتایج کاربردی نزدیک تر باشد. از طرفی در ساخت فرمولاسیون ها از آب مقطر استفاده شد. چون یکی از روش های نگهداری اسپور قارچ ها در آب می باشد و مدت نگه داری آن ها از ۷-۱ سال متغیر است (۲۹). در نتیجه می توان این نوع فرمولاسیون ها را حداقل تا یک سال نگهداری کرد و به عنوان جایگزینی برای سموم به صورت تجاری برای نقاط آلوده در مزرعه در سطح وسیع به کار برد.

تشکر و قدردانی:

از همه کسانی که ما را در انجام این طرح یاری کرده اند، به ویژه پژوهشکده تعلیم و تربیت کرمان، مسئولین آزمایشگاه بیوتکنولوژی و بخش علوم دامی دانشگاه شهید باهنر کرمان، همچنین مهندس امینی، مهندس تجلی، دکتر رادفر و آقای امین زاده کمال تشکر و قدردانی را داریم.

میکروارگانسیم ها، نتایج به دست آمده از این آزمایش نشان می دهد که اگر میکروارگانسیم غالب در شرایط خاک مزرعه قارچ متارازیوم آنیزوپیله باشد، می تواند به عنوان یک عامل بالقوه عمل کرده و موجب نابودی تخم ها، لاروها و حتی کتله های بالغ هیالوما در زمان پوست اندازی شود (۱۹). در این مطالعه فقط اثر قارچ متارازیوم آنیزوپیله بر روی کتله هیالوما به دلیل اهمیت فراوان آن در انتقال بیماری ها، گسترده جغرافیایی و تنوع میزبانی آن مورد بررسی قرار گرفت. در حالی که اثر این قارچ بر حشره کولیکوئیدس و کتله های همافیزالیس، بوفیلوس میکروپلوس، ایکسودس اسکاپولاریس (*Ixodes scapularis*)، ریپی سفالوس سانگی نئوس (*Dermacentor variabilis*)، ریپی سفالوس (*Rhipicephalus sanguineus*) و میکروپلوس و آرگاس (*Argas*) اثبات شده است (۲۸-۲۰). گرچه استفاده از اسپور قارچ متارازیوم آنیزوپیله برای مبارزه با کتله ها از سال ها پیش شروع شده است؛ ولی نکته جدید و قابل توجه این تحقیق استفاده از فرمولاسیون های خاص با این قارچ جهت مبارزه با کتله های متعلق به جنس هیالوما می باشد.

منابع:

1. Telmdarhe Z, Vatandoost H, Rafinejad J, Mohebbali M, Tavakoli M, Abdi Goodarzi M, et al. Prevalance of argasidea and ixodidea ticks and determenation of their sensitivity to cypermethrin in Meshginshahr. J Ardabil Univ Med Sci. 2009; 9(2): 127-33.
2. Sanzydi D. Principles of animal and poultry. Translated to Persian by: Moghaddam GH, Pashmi M. Tehran: Amid Pub; 2002.
3. Kaaya GP, Samish M, Hedimbi M, Gindin G, Glazer I. Control of tick populations by spraying *Metarhizium anisopliae* conidia on cattle under field conditions. Exp Appl Acarol. 2011; 55(3): 273-81.
4. Perinotto WM, Angelo IC, Golo PS, Quinelato S, Camargo MG, Sa FA, et al. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. Exp Parasitol. 2012; 130(3): 257-60.
5. Ren Q, Sun M, Guan G, Liu Z, Chen Z, Liu A, et al. Susceptibility of the tick *Haemaphysalis qinghaiensis* to isolates of the fungus *Metarhizium anisopliae* in China. Exp Appl Acarol. 2014; 64(2): 253-8.
6. Van D. Biological control. Translated to Persian by: Mossavi SMR. 1 ed. Mashhad; SID Pub, Iran; 2000. p: 220-226.

7. Frazzon AP, da Silva Vaz Junior I, Masuda A, Schrank A, Vainstein MH. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol.* 2000; 94(1-2): 117-25.
8. Connick Jr W, Lewis J, Quimby Jr P, editors. Formulation of biocontrol agents for use in plant pathology. *UCLA Symp Mol Cell Biol.* 1990; 1(1): 345-72.
9. Moore D, Bridge P, Higgins P, Bateman R, Prior C. Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. *Ann Appl Biol.* 1993; 122(3): 605-16.
10. Rangel DE, Anderson AJ, Roberts DW. Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance. *J Invertebr Pathol.* 2006; 93(2): 127-34.
11. Durrani AZ, Shakoory AR. Study on ecological growth conditions of cattle *Hyalomma* ticks in Punjab, Pakistan. *Iran J Parasitol.* 2009; 4(1): 19-25.
12. Briggs LL, Colwell DD, Wall R. Control of the cattle louse *Bovicola bovis* with the fungal pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Vet Parasitol.* 2006; 142(3-4): 344-9.
13. Pourseyed SH, Tavassoli M, Bernousi I, Mardani K. *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales): an effective alternative to chemical acaricides against different developmental stages of fowl tick *Argas persicus* (Acari: Argasidae). *Vet Parasitol.* 2010; 172(3-4): 305-10.
14. Tavassoli M, Pourseyed SH, Ownagh A, Bernousi I, Mardani K. Biocontrol of pigeon tick *Argas reflexus* (Acari: Argasidae) by entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales). *Braz J Microbiol.* 2011; 42(4): 1445-52.
15. Ren Q, Sun M, Guan G, Li Y, Liu Z, Liu A, et al. Biological control of engorged female *Haemaphysalis qinghaiensis* (Acari: Ixodidae) ticks with different Chinese isolates of *Beauveria bassiana*. *Parasitol Res.* 2011; 109(4): 1059-64.
16. Zimmermann G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Sci Technol.* 2007; 17(9): 879-920.
17. Polar P, Kairo MT, Moore D, Pegram R, John SA. Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. *Mycopathologia.* 2005; 160(2): 151-7.
18. Briggs LL, Colwell DD, Wall R. Control of the cattle louse *Bovicola bovis* with the fungal pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Vet Parasitol.* 2006; 142(3-4): 344-9.
19. Samuels KDZ, Pinnock DE, Bull RM. Scarabeid (sic) larvae control in sugarcane using *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol.* 1990; 55: 135-7.
20. Nicholas AH, McCorkell B. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae), the principal vector of bluetongue virus in Australia. *J Vector Ecol.* 2014; 39(1): 213-8.
21. Ren Q, Sun M, Guan G, Liu Z, Chen Z, Liu A, et al. Susceptibility of the tick *Haemaphysalis qinghaiensis* to isolates of the fungus *Metarhizium anisopliae* in China. *Exp Appl Acarol.* 2014; 64(2): 253-8.
22. Do Carmo Barcelos Correia A, Fiorin AC, Monteiro AC, Verissimo CJ. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle. *J Invertebr Pathol.* 1998; 71(2): 189-91.
23. Hornbostel VL, Ostfeld RS, Zhioua E, Benjamin MA. Sublethal effects of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) on engorged larval, nymphal, and adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol.* 2004; 41(5): 922-9.
24. Kirkland BH, Westwood GS, Keyhani NO. Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. *J Med Entomol.* 2004; 41(4): 705-11.

25. Rot A, Gindin G, Ment D, Mishoutchenko A, Glazer I, Samish M. On-host control of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Acari: Ixodidae) by *Metarhizium brunneum* (Hypocreales: Clavicipitaceae). *Vet Parasitol.* 2013; 193(1-3): 229-37.
26. Camargo MG, Marciano AF, Sa FA, Perinotto WM, Quinelato S, Golo PS, et al. Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. *Vet Parasitol.* 2014; 205(1-2): 271-6.
27. Angelo IC, Tunholi-Alves VM, Tunholi VM, Perinotto WM, Golo PS, Camargo MG, et al. Physiological changes in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) experimentally infected with entomopathogenic fungi. *Parasitol Res.* 2015; 114(1): 219-25.
28. Pourseyed SH, Tavassoli M, Bernousi I, Mardani K. *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales): an effective alternative to chemical acaricides against different developmental stages of fowl tick *Argas persicus* (Acari: Argasidae). *Vet Parasitol.* 2010; 172(3-4): 305-10.
29. Sanei J. Mycology Laboratory Agenda. Iran: Gorgan: Payk Rihan Pub; 2008.

Comparison of the effect of biological formulations containing *Metarhizium anisopliae* on *Hyalomma* ticks

Mirzaei M¹, Dayani O^{2*}, Molaei Javaran T³

¹Pathobiology Dept., Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R. Iran; ²Animal Sciences Dept., Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R. Iran; ³Student, Animal Sciences Dept., Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R. Iran.

Received: 6/Oct/2014 Accepted: 21/Jun/2015

Background and aims: Fungi from the genus *Metarhizium* are used increasingly in commercial formulations against insects. However, a few field experiments have been performed to kill ticks with these fungi. The development of tick resistance to acaricides and our awareness that chemicals are harmful to the environment was led to conduct this research. This study aimed to evaluate efficacy of applying 4 different formulations of *Metarhizium anisopliae* fungus to combat *Hyalomma* ticks.

Methods: In this experimental study, 4 different formulations were used including: distilled water with 2% Tween and *Metarhizium anisopliae*, distilled water with 10% cotton seed oil, 0.01% sucrose, 0.2% tween and *Metarhizium anisopliae*, distilled water with 10% liquid paraffin, 0.01% sucrose, 0.2% tween and *Metarhizium anisopliae*, and distilled water as the control group. Four prepared formulations were equally sprayed on 128 mature ticks, in 4 groups. Dead ticks due to spray of formulations were counted in the following days. Treatment effect based on mortality of ticks was assessed using time-survival analysis.

Results: Though of the suspensions made by water, liquid paraffin, cotton seed oil and the fungus was not statistically significant, cotton seed oil suspension was the best treatment effect between these three groups. There were significant differences between these groups and control group (P<0.05).

Conclusion: Oil suspension containing *Metarhizium anisopliae* fungus can be used instead of toxic chemicals compounds to eliminate *Hyalomma* ticks from farm animal bodies, with no harm to the environment, animals and humans. Therefore, further research is recommended in this regard.

Keywords: *Hyalomma tick*, Oil formulations, Biologic control, *Metarhizium anisopliae*.

Cite this article as: Mirzaei M, Dayani O, Molaei Javaran T. Comparison of the effect of biological formulations containing *Metarhizium anisopliae* on *Hyalomma* ticks. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 17(6): 73-82.

***Corresponding author:**

Animal Sciences Dept., Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R. Iran,
Tel: 00989133978566, E-mail: odayani@uk.ac.ir