JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره دوازدهم، شماره دوم، ۱۳۹۵، پیاپی ۳۳: ۵۵-۴۷

بررسی اثرات ضد قارچی نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) و زنیان (*Carum capticum*) بر قارچ آبزی *ساپرولگنیا پارازیتیکا* (*Saprolegnia parasitica*) در شرایط آزمایشگاهی

سعیده هوشنگی[۱]، فرید فیروزبخش[۲*]، حمید بدلی[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

۲- دانشیار گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

۳- استادیار گروه قارچ شناسی و انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۶ تیر ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: ۱۸ تیر ۱۳۹۵

چکیده

ساپرولگنیوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی آبزیان است که خسارات شدیدی را در مراحل مختلف رشد آبزیان سبب می‌شود. این مطالعه با هدف تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده (MIC) عصاره‌های الکلی و آبی گیاه زنیان و نعناع فلفلی از رشد قارچ ساپرولگنیا پارازیتیکا (Saprolegnia parasitica) انجام شده است. فعالیت ضد قارچی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی نعناع و زنیان علیه ساپرولگنیا پارازتیکا به روش اختلاط با محیط کشت و میکرودایلوشن براث بررسی شد. نتایج آزمایش ضد قارچی به روش اختلاط عصاره با محیط کشت نشان داد که، عصاره اتانولی نعناع بیشترین اثر ضد قارچی (**MIC=10 mg/ml**) را در بین سایر عصاره‌های گیاهی نسبت به ساپرولگنیا پارازیتیکا داشت و قدرت مهار رشد ساپرولگنیا پارازتیکا با افزایش غلظت افزایش یافت. در روش میکرودایلوشن براث اختلاف معنی داری در مهار رشد قارچ ساپرولگنیا پارازیتیکا بین عصاره‌های گیاهی مشاهده نشد (MIC≥2048 µ /ml). با توجه به نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر پیشنهاد می‌گردد که از فراورده‌های طبیعی گیاهان دارویی آزمایش شده می‌توان به عنوان مواد ضد قارچ در صنعت آبزی پروری استفاده نمود.

کلمات کلیدی: ساپرولگنیا پارازیتیکا، زنیان، نعناع فلفلی، فعالیت ضد قارچی

* نویسنده مسئول: فرید فیروزبخش

آدرس: گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران. تلفن: ۰۱۱۳۳۶۸۷۵۶۵

پست الکترونیک: f.firouzbakhsh@sanru.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

ساپرولگنیوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی آبزیان است که خسارات شدیدی را در مراحل مختلف رشد آبزیان سبب می‌شود.

ساپرولگنیا پارازیتیکا (*Saprolegnia parasitica*) متعلق به گروه کپک‌های آبزی و جزء خانواده ساپرلگنیاسه می‌باشد. این قارچ در صنعت تکثیر و پرورش ماهی عوارض جبران ناپذیری را ایجاد می‌کند و به عنوان عامل بیماریزا در آبزیان شناخته شده است که به واسطه رشد میسیلیوم در اندامهای سطحی منجر به عفونتهای قارچی در ماهیان می‌شود (۱). از سال ۱۹۳۰ تاکنون مالاشیت‌گرین به لحاظ حلالیت بالا در آب و اثر ضد قارچی فراوان به عنوان یک داروی قارچ‌کش بسیار مؤثر در صنعت آبزی‌پروری مورد استفاده قرار گرفته است (۶). امروزه بدلیل سرطان زا بودن و خطرات زیست محیطی مالاشیت گرین، محققان به دنبال مواد شیمیایی جایگزین آن هستند. یکی از این مواد شیمیایی فرمالین است که علی رغم اثرات ضد قارچی مطلوب به دلیل ماهیت شیمیایی خود مضر بوده و اثرات جانبی فراوانی دارد (۲۹). اگر چه ترکیبات شیمیایی دیگری مانند پرمنگنات پتاسیم و پراکسید هیدروژن به عنوان جایگزین مالاشیت گرین تعیین شده‌اند (۸) اما به دلیل ماهیت شیمیایی آنان، هر یک دارای عوارض جانبی ویژه‌ای هستند. به دلیل اثرات مضر مواد شیمیایی بر اکوسیستم آبی و بالا بودن قیمت مواد شیمیایی نیاز به روش‌های دیگری برای کنترل بیماری‌های قارچی احساس می‌شود از این رو استفاده از مشتقات گیاهی به عنوان عامل ضد قارچی مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۶ و ۱۷). تمایل به مطالعه و تحقیق در شاخه گیاهان دارویی به دلیل سمیت پایین گیاهان، کاهش اثرات مخرب محیطی و مقبولیت عمومی افزایش یافته است. طبیعت یک منبع غنی ترکیبات دارویی طبیعی در مقابل عوامل بیماریزا محسوب می‌شود. با توجه به تمرکز تحقیقات بر نقش داروهای گیاهی و توسعه سیستم‌های ارگانیک در آبزی پروری که هدف آن بیشترین استفاده از مواد طبیعی و کمترین استفاده از مواد شیمیایی و آلاینده‌هاست و با توجه به غنای سرزمینی و تنوع گیاهان دارویی کشور تصمیم گرفته شد تا اثرات ضد قارچی دو گیاه دارویی زنیان و نعناع فلفلی مورد مطالعه قرار گیرد.

زنیان با نام علمی *Carum capticum* متعلق به خانواده چتریان می‌باشد. بیشترین و مهمترین ماده مؤثره این گیاه ترکیبی به نام تیمول است که قسمت اعظم این ترکیب در بذر گیاه زنیان جای دارد (۱۰) که اثر مهاری آن بر باکتری‌های گرم مثبت و منفی مورد بررسی قرار گرفت (۱۲). مطالعات متعددی در خصوص اثر ضد قارچی زنیان انجام شده است که از آن جمله می‌توان به اثر بازدارندگی زنیان بر دو گونه قارچ *Rhizoctonia solani* و *Phytophthora drechsleri* از عوامل پوسیدگی ریشه چغندر قند (۳) و چهار گونه قارچ (*Pythium aphanidermatu*, *Fusarium equiseti*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum*) (۱۴) و کاندیدا آلبیکنس (۱۱) در شرایط آزمایشگاهی اشاره کرد.

نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* از خانواده Laminaceae دارای ترکیبات ضدقارچی، آنتی اکسیدانی و حشره کشی می‌باشد (۱۸) و همچنین خاصیت ضد میکروبی آن بر چند گونه باکتری و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* بررسی و تأیید شده است (۱۳). مشاهده ترکیبات شیمیایی ایزومنتول، نئومنتول و منتول در اسانس نعناع فلفلی (۱۵) از مهمترین ترکیباتی هستند

Archive of SID

www.SID.ir

که تعیین کننده اثرات ضد قارچی یک گیاه محسوب می‌شوند.

هدف از انجام این پژوهش بررسی خاصیت ضدقارچی عصاره الکلی و آبی دو گیاه زنیان و نعناع فلفلی با دو روش اختلاط با محیط کشت و میکرودایلوشن براث بر قارچ ساپرولگنیا پارازیتیکا در شرایط آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها

گیاهان دارویی

در این مطالعه گیاه نعناع فلفلی و بذر گیاه زنیان از مزرعه گیاهان دارویی واقع در مشهد تهیه و در دمای اتاق به مدت ۴ روز خشک و پودر شدند. سپس ۱۰۰ گرم از پودر هر گیاه به نسبت ۱ به ۱۰ در سه حلال آب مقطر، اتانول و متانول ۹۶ درصد مخلوط و پس از ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۱ صاف شدند (۲). محلول حاصل در آزمایشگاه با استفاده از دستگاه روتاری تغلیظ و در نهایت به کمک دستگاه فریز درایر پودر و تا زمان استفاده در دمای یخچال نگهداری شدند.

تهیه سویه قارچی

جهت انجام آزمایش از ایزوله خالص قارچ ساپرولگنیا پارازیتیکای جدا سازی شده از آبهای خروجی ونیروهای پرورش قزل الای رنگین کمان که با شماره شناسه KC992717 در بانک ژن ثبت شده است (۲) استفاده شد.

تست سنجش حساسیت ارگانیسم در مقابل داروهای ضدقارچی

۱-روش میکرودایلوشن براث:

در این مطالعه از روش استاندارد میکرودایلوشن براث (Broth Microdilution) مطابق CLSI-M38A2 جهت بررسی MIC هر یک از گیاهان مورد مطالعه استفاده شد (۹). از دی متیل سولفوکساید به عنوان حلال عصاره‌های متانولی و اتانولی گیاهان استفاده شد. از محیط کشت RPMI 1640 (باگلوتامین و فنل رد و بدون بی کربنات با شناساگر pH) طبق توصیه روش استاندارد CLSI M38A2 جهت رقیق سازی محلول‌های استوک دارویی و انجام تست MIC (minimum inhibitory concentration) استفاده شد (۹).

برای تهیه سوسپانسیون تلقیحی ابتدا قارچ ساپرولگنیا پارازیتیکا مورد مطالعه بر روی محیط پتیتودکستروز آگار کشت و در دمای $^{\circ}C$ ۲۵ به مدت ۷۲ ساعت جهت اسپورزایی نگهداری شدند. سپس از قارچ‌های رشد یافته سوسپانسیون نهایی در لوله در پیچ دار حاوی سرم فیزیولوژی استریل با غلظت‌های 1×10^3 تا 5×10^3 بر طبق روش پیشنهادی CLSI M38A2 تهیه گردید (۹). ابتدا رقت‌های سریالی از عصاره‌های گیاهان تهیه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های عصاره گیاهی مورد نظر، داخل حفرات ۱ تا ۱۰ میکروپلیت مسطح ۹۶ خانه‌ای توزیع شدند بطوریکه حفره اول شامل بیشترین غلظت (۲۰۴۸ میکروگرم بر میلی لیتر) و حفره شماره ۱۰ حاوی کمترین غلظت (۴ میکروگرم بر میلی لیتر) عصاره گیاهی باشد. پس از آن به هر یک از حفره‌ها ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور قارچ اضافه شد. میکروپلیت ها در دمای $^{\circ}C$ ۲۵ به مدت ۴۸-۷۲ ساعت در دو تکرار انکوبه شدند. تعیین میزان MIC یا پایین‌ترین غلظت دارویی که قارچ بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در آن رشد قابل مشاهده‌ای نداشته باشد، به روش چشمی با استفاده از آینه محدب به راحتی ممکن گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

۲- روش اختلاط عصاره با محیط کشت

ایزوله خالص قارچ *ساپرولگنیا پارازیتیکا* بر روی محیط YGC (مخمر- گلوگز- کلرامفنیکل) خریداری شده از شرکت مرک در دمای ۲۵ درجه سلسیوس کشت داده شد. برای انجام آزمایش ۷ غلظت ۰، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر عصارهای آبی، متانولی و اتانولی دو گیاه نعناع فلفلی و زنیان تهیه و ۱ میلی لیتر از هر غلظت با ۹ میلی لیتر محیط کشت استریل با دمای ۵۵ درجه سانتی گراد در پلیت های ۹۰ میلی متری در سه تکرار مخلوط شدند. پس از جامد شدن محیط، نمونه قارچ *ساپرولگنیا پارازیتیکا* همراه با محیط کشت به قطر ۱۰ میلی متر در مرکز پلیت تلقیح و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس تا زمانیکه سطح پلیت های گروه شاهد از قارچ پر شوند (۱۴) نگهداری شد. در نهایت قطر کلنی قارچی رشد یافته در پلیت ها بر حسب میلی متر اندازه گیری شد.

نتایج

مقایسه میانگین رشد قارچ *ساپرولگنیا پارازتیکا* در غلظتهای مختلف عصارههای آبی، متانولی و اتانولی نعناع فلفلی در جدول ۱ آمده است. بیشترین میزان بازدارندگی رشد قارچ عصاره آبی نعناع فلفلی در غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر مشاهده شد که با افزایش غلظت تا ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر اختلاف معنی داری ($P<0.05$) در مهار رشد قارچ نداشت. ولی میزان رشد قارچ در غلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر در مقایسه با غلظت ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر بطور معنی داری ($P<0.05$) کاهش یافت.

حداکثر مهار رشد قارچ *ساپرولگنیا پارازتیکا* در غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر عصاره متانولی نعناع فلفلی مشاهده شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی داری ($P<0.05$) داشت. در حالیکه بیشترین اثر مهاری رشد قارچ عصاره اتانولی نعناع فلفلی در غلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر بدست آمد که با سایر تیمارها اختلاف معنی داری ($P<0.05$) نشان داده است. می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت عصارههای آبی، متانولی و اتانولی نعناع فلفلی، قدرت بازدارندگی رشد قارچ نیز افزایش یافته است.

همانطور که در نتایج اثر عصارههای آبی، متانولی و اتانولی بذر گیاه زنیان در جدول شماره ۲ مشخص است. عصاره آبی زنیان هیچگونه اثری بر مهار رشد قارچ نداشت در حالیکه بیشترین اثر عصاره متانولی و اتانولی به ترتیب در غلظت‌های ۱۵ و ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر مشاهده شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی داری ($P<0.05$) نشان داده است (جدول ۲).

در تست میکرودایلوشن براث ۲۰۴۸ میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان بالاترین غلظت و ۴ میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان کمترین غلظت در نظر گرفته شد. عصارههای آبی، متانولی و اتانولی گیاهان نعناع فلفلی و زنیان با استفاده از این روش، حتی در بالاترین غلظت یعنی ۲۰۴۸ میکروگرم بر میلی لیتر قادر به مهار رشد قارچ *ساپرولگنیا پارازتیکا* نبودند و MIC مساوی یا بیش از ۲۰۴۸ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. در حالی که فرمالین با غلظت ۲۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر توانست رشد قارچ را مهار کند (MIC) و توان قارچ کشی (MFC) از خود نشان دهد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- میانگین قطر کلنی قارچ *ساپرولگنیا پارازیتیکا* در محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی، اتانولی و آبی گیاه نعناع فلفلی در روش اختلاط با محیط کشت (پلیتهای ۹۰ میلی متری).

غلظت ((mg/ml	میزان رشد قارچ (mm)		
	عصاره آبی	عصاره متانولی	عصاره اتانولی
۰	۹۰/۰۰±۰/۰۰^{a}	۹۰/۰۰±۰/۰۰^{a}	۹۰/۰۰±۰/۰۰^{a}
۲/۵	۵۳/۶۳±۴/۱۰^{b}	۵۱/۶۶±۲/۰۸^{b}	۹۰/۰۰±۰/۰۰^{a}
۵	۲۲/۲۰±۰/۳۴^{c}	۳۱/۰۰±۱/۰۰^{c}	۸۲/۳۳±۲/۵۱^{b}
۷/۵	۲۲/۰۲±۰/۰۳^{c}	۱۱/۶۶±۱/۱۵^{d}	۷۶/۶۶±۱/۱۵^{c}
۱۰	۲۲/۷۳±۲/۴۶^{c}	۱۰/۰۰±۰/۰۰^{d*}	۶۵/۶۶±۲/۰۸^{d}
۱۵	۲۴/۵۳±۲/۶۰^{c}	۱۰/۰۰±۰/۰۰^{d*}	۳۷/۳۳±۲/۵۱^{e}
۲۰	۱۷/۱۶±۳/۴۳^{d}	۱۰/۰۰±۰/۰۰^{d*}	۱۰/۰۰±۰/۰۰^{f*}

*قطر اولیه تلقیح قارچ *ساپرولگنیا پارازیتیکا* به داخل پلیت ۱۰ میلی متر است.

اعداد با حروف متفاوت دارای اختلاف آماری معنی دار می‌باشند ($P<0.05$)

جدول ۲- میانگین قطر کلنی قارچ *ساپرولگنیا پارازیتیکا* در محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی، اتانولی و آبی بذر گیاه زنیان در روش اختلاط با محیط کشت (پلیتهای ۹۰ میلی متری).

غلظت ((mg/ml	میزان رشد قارچ (mm)		
	عصاره آبی	عصاره متانولی	عصاره اتانولی
۰	۹۰/۰۰±۰/۰۰	۹۰/۰۰±۰/۰۰^{a}	۹۰/۰۰±۰/۰۰^{a}
۲/۵	۹۰/۰۰±۰/۰۰	۸۴/۰۰±۳/۶۵^{ab}	۸۸/۰۰±۰/۰۰^{a}
۵	۹۰/۰۰±۰/۰۰	۷۶/۶۶±۱۰/۴۰^{bc}	۶۵/۳۳±۲/۸۸^{b}
۷/۵	۹۰/۰۰±۰/۰۰	۷۱/۳۳±۲/۳۰^{cd}	۴۸/۳۳±۵/۷۷^{c}
۱۰	۹۰/۰۰±۰/۰۰	۶۰/۰۰±۴/۰۰^{d}	۱۵/۰۰±۱/۰۰^{d}
۱۵	۹۰/۰۰±۰/۰۰	۳۳/۳۳±۶/۴۲^{e}	۱۰/۰۰±۰/۰۰^{d*}
۲۰	۹۰/۰۰±۰/۰۰	۲۴/۶۶±۵۱.۲^{e}	۱۰/۰۰±۰/۰۰^{d*}

*قطر اولیه تلقیح قارچ *ساپرولگنیا پارازیتیکا* به داخل پلیت ۱۰ میلی متر بوده است.

اعداد با حروف متفاوت دارای اختلاف آماری معنی دار می‌باشند ($P<0.05$)

جدول ۳-کمترین غلظت بازدارندگی رشد (MIC) و کمترین غلظت کشندگی (MFC) عصاره‌های الکلی و آبی گیاه نعناع فلفلی و بذر گیاه زنیان در غلظت‌های ۰ تا ۲۰۰۰ میکرولیتر بر میلی لیتر در مقایسه با فرمالین

نام	نوع عصاره	MIC µl/ml	MFC µl/ml
Carum capticum زنیان	آبی	≥۲۰۰۰	≥۲۰۰۰
	اتانولی	≥۲۰۰۰	≥۲۰۰۰
	متانولی	≥۲۰۰۰	≥۲۰۰۰
Mentha piperita نعناع	آبی	≥۲۰۰۰	≥۲۰۰۰
	اتانولی	≥۲۰۰۰	≥۲۰۰۰
	متانولی	≥۲۰۰۰	≥۲۰۰۰
formalin	داروی شیمیایی	۲۵۶	۲۵۶

بحث

این مطالعه نشان داد که عصاره اتانولی و متانولی نعناع فلفلی و عصاره اتانولی زنیان قادر است رشد میسیلیومی قارچ مهم بیماری زای آبزی، *ساپرولگنیا پارازیتیکا* را در شرایط آزمایشگاهی کنترل نماید. خاصیت ضد میکروبی اسانس و عصاره نعناع فلفلی و بذر گیاه زنیان در مطالعات متعدد به اثبات رسیده است. موریرا و همکاران نشان دادند که اسانس گیاه نعناع فلفلی دارای خاصیت ضد باکتریایی است (۲۱). در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شده است که اسانس گیاه نعناع فلفلی قادر به

Archive of SID

www.SID.ir

توقف رشد *Phytophthora infestans* در شرایط آزمایشگاهی است (۲۶). خاصیت ضد قارچی اسانس نعناع فلفلی علیه قارچ *فوزاریوم اکسیسپاروم* نیز به اثبات رسیده است (۲۵). Pattanki و همکاران (۲۴) و Ahmad و همکاران (۵) در تحقیقات جدا گانه ای قابلیت بازدارندگی عصاره اتانولی گیاه نعناع فلفلی علیه قارچ‌های *کاندیدا آلبیکنس* و *آسپرجیلوس نیجر* و همچنین باکتری‌های مختلف بیماریزای انسانی را مورد تأیید قرار دادند.Adham (۴) نیز اثر مهاری عصاره اتانولی ۸۰ درصد نعناع فلفلی را بر رشد باکتری‌های *Streptococcus mitis* و *Staphylococcus aureus* مشاهده کرد. این درحالی است که داورت و همکاران نشان دادند که عصاره اتانولی گیاه نعناع فلفلی اثر بازدارنده‌ای بر روی قارچ *کاندیدا آلبیکنس* ندارد (۱۱). از آنجایی که تقریباً اغلب ترکیبات گیاهی که دارای خواص ضد میکروبی می‌باشند، ترکیبات آلی اشباع شده یا ترکیبات آروماتیک دارند، غالباً از حلال‌های اتانولی یا متانولی برای استخراج اولیه آنها استفاده می‌شود. در واقع در بسیاری از مطالعات از کاربرد آب به منظور جداسازی ترکیبات مؤثر گیاهی اجتناب شده است. هر چند که نقش ترکیبات محلول در آب مثل پلی ساکارید ها و پلی پپتید به عنوان محرک‌های ایمنی ثابت شده است (۷،۲۲). نتایج این مطالعه نشان داد نوع حلال در استخراج مواد بازدارنده رشد قارچ اهمیت بسیاری داشته و در بین حلال‌های مورد استفاده برای استخراج ترکیبات ضد قارچی از نعناع فلفلی و بذر گیاه زنیان به ترتیب متانول و اتانول، مناسب‌ترین حلال تشخیص داده شد. زیرا عصاره متانولی نعناع فلفلی با غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر، عصاره اتانولی زنیان با غلظت ۱۵ میلی گرم در لیتر و عصاره اتانولی نعناع فلفلی با غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر رشد قارچ ساپرولگنیا پارازتیکا را به میزان ۱۰۰ درصد مهار کردند در حالیکه عصاره‌های آبی این گیاهان فاقد چنین اثری بودند. لذا می‌توان اینگونه استنباط نمود که اغلب ترکیبات مؤثر ضد قارچی در گیاهان مورد مطالعه، ترکیبات غیر قطبی هستند و با حلال غیر قطبی می‌توان آنها را استخراج نمود.

Iacobelis و همکاران فعالیت ضد میکروبی اسانس زنیان را به روش آگار دیفیوژن بررسی کردند و اثرهای مهاری نسبتاً بالای آن را علیه Erwinia, Rodotorula, Xanthomonas و Agrobacterium تأیید نمودند (۱۹). فعالیت ضد باکتریایی اسانس زنیان علیه باکتریهای مقاوم به دارو بررسی و اثر ضد باکتریایی آن مورد تأیید قرار گرفت (۲۳،۲۷). برخی از محققان اثبات کردند که می‌توان اسانس تخم زنیان را علیه قارچ (*Alternaria alternate*) آلترناریا آلترناتای مقاوم به داروهای ضد قارچی استفاده نمود و از رشد قارچ جلوگیری کرد (۲۰). همچنین طی تحقیقی دیگر، رشد قارچ سمی *Aspergillus parasiticus* با اسانس زنیان در شرایط آزمایشگاهی مهار شد (۲۴).

اثر بازدارنده عصاره علاوه بر نوع حلال مورد استفاده، به غلظت عصاره و نوع قارچ مورد بررسی نیز بستگی دارد. در این مطالعه از دو روش متفاوت به منظور سنجش اثر ضد قارچی عصاره استفاده شد که اثر ضدقارچی در این دو روش با یکدیگر تفاوت داشت. به طوری که رشد میسلیوم قارچ *ساپرولگنیا پارازیتیکا* در روش اختلاط عصاره با محیط کشت در غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر عصاره متانولی و ۱۵ میلی گرم در لیتر عصاره اتانولی نعناع فلفلی و ۱۵ میلی گرم در لیتر عصاره اتانولی بذر زنیان کاملاً از رشد باز مانده است. در صورتی که در روش میکرودایلوشن براث هیچ کدام از عصاره‌ها نتوانستند به صورت مستقیم بر

Archive of SID

www.SID.ir

زئوسپور قارچ *ساپرولگنیا پارازیتیکا* تأثیر بگذارند. این اختلاف احتمالاً به دلیل متفاوت بودن ساختار زئوسپور این قارچ می‌باشد. این تفاوت‌های ساختاری این توان را به این قارچ داده است تا بتواند در مقابل مواد ضد قارچی مقاومت کند. در نتیجه نیاز به غلظت بیشتر و خالص‌تری از این مواد مؤثره در انجام آزمایش به روش میکرودایلوشن براث می‌باشد. بدیهی است که باتوجه به تنوع گیاهان مورد مطالعه، ساز و کار دفاعی قارچ در مقابل ترکیبات متفاوت نیز متغییر بوده و در نتیجه می‌توان انتظار داشت که آستانه تحمل قارچ نسبت به ترکیبات ضدقارچی و شیب تغییرات رشد آن نسبت به مقدار ماده مؤثره متفاوت باشد.

منابع

۱- سلطانی، م.(۱۳۸۰). *بیماری‌های آزاد ماهیان*، انتشارات دانشگاه تهران، ۴۴۴ صفحه.

۲- فیروزبخش، ف. افسریان، م. هوشنگی، س. بدلی، ح. (۱۳۹۳) بررسی اثرات ضد قارچی رازیانه، بومادران، مرزه، دارچین و آرتمیزیا علیه ساپرولگنیا پارازتیکا در شرایط آزمایشگاهی. *مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک* سال ۱۷، شماره ۵، ص ۶۰-۶۹.

3- Abdolmaleki, M., Bahraminejad, M., Abasi, S. (2008). Inhibitory effect of some plant extracts on mycelial growth *Phytophthora drechsleri* and *Rhizoctonia solani* Causes root rot. *Sugar Beet* **25**: 193-205

4- Adham, A.N. (2014). Synergistic Effects between *Mentha Piperita*, *Mentha Longifolia* and
Ocimum Basilicum on Different Bacterial Strains. *International Journal of Chemistry* 7:170-176

5- Ahmad, I., Beg, A.Z. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology* **74**: 113-23

6- Alderman, D., Clifton, H. (1993). Malachite green: a pharmacokinetic study in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Fish Diseases***16**: 297-311

7- Bahraminejad, S., Asenstorfer, R.E., Riley,.T., Schultz, C.J. (2008). Analysis of the antimicrobial activity of flavonoids and saponins isolated from the shoots oats (*Avena sativa* L.). *Journal of Phytopathology* **156**: 1 – 7.

8- Barnes, M., Ewing, D., Cordes, E. (1998). Observations on hydrogen peroxide control of Saprolegnia spp. during rainbow trout egg incubation. *The Progressive fish-culturist* **60**: 67-70.

9- Clinical and Laboratory Standards Institute.I. (2008). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, Second Edition: Approved Standard M38-A2. CLSI, Wayne, PA, USA,

10- Devasankaraiah, G., Hanin, I., Haranath, P.S. (1974). Cholinomimetic effects of aqeous extracts from *Carum copticum* seeds. *Pharmacology* **52**: 613-4.

11- Duarte, M. T., Figueira, G.M., Sartoratto, A. (2005). Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* **97**: 305-11

12- Erturk, O. (2006). Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Biologia* **61**: 275 – 78.

13- Ezzat, S.M. (2001). In vitro inhibition of *Candida albicans* growth by plant extracts and essential oils. *Microbiology and Biotechnollogy* 42: 757 – 759

14- Felahati, R., Razavi, V., Jahanbakhsh, V. (2000). Evaluation of extracts of some fungicidal properties of plant parts. *Agricultural Sciences and Technology* **15**: 87-951315- Hamza, O. (2006). Antifungal activity of some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections. *Ethnopharmacology* **108**, 124-132

16- Harison,M., Jyotsna Kiran P., Pratima, T. (2014) A comparative evaluation of antifungal activity of medicinal plant extracts and chemical fungicides against four plant pathogens. *International Journal of Current Microbiology Applied Sciences* **3**: 97-109

17- Heydari, M., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., Sharifi,A,. Hosseini,S., Salehpour, Z. (2015) The Effect of Aquatic and Alcoholic Extracts of Persian Oak (*Quercusbrantiivar*

Archive of SID

persica) Fruit Extract on *Saprolegnia parasitica*. *International journal of Scientific Engineering and Technology Research* **4**: 2318-2322

18- Hoffmann, B.G., Lunder, L.T. (1984). Flavonoids from *Mentha pipertia* leaves. *Planta medicine*; **50**: 361-67

19- Iacobellis, N.S., Capasso, F. (2005). Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. Essential oils. *Agriculture Food Chemestry* **53**: 57-61

20- Khosravi, A.R., Mohammad Salehi, R., Yahyaraeyat, R., Mokhtari, A.R., Panahi, P. (2015). Chemical Composition and Antifungal Activity of *Trachyspermum copticum* Essential Oil Against *Alternaria alternata* (In-Vitro Study). *Journal of Medicinal Plants* **53**: 82-88

21- Moreira, M.R., Ponce, A.G., Valle, C.E., Roura. S.I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Food Science and Technology* **38**: 565– 70.

22- Navarro, V., Villarreal, M.L., Rojas, G., Lozoya, X. (1996). Antimicrobial evaluation of some plants used Mexican traditional medicine for the treatment of the infectious diseas. *Journal of Ethnopharmacology* **53**: 1437

23- Ogundipe, O., Akinbiyi, O., Moody, J.O. (1998). Antibacterial activities of essential ornamental plants. *Natural Products & Medicine* **2**: 46-47

24- Pattanki S, Subramanyam VR. (1996). Antibacterial and antifungal activity of ten essential oil in vitro. *Microbios* **86**: 237-46

25- Pawar, V.C.,Thaker, V.S. (2007). Evaluation of the *anti-Fusarium oxysporum f. spcicer* and *anti-Alternari aporri* effects of some essential oils. *Microbiallogy.Biotechnollogy* **23**: 1099 – 1106

26- Quitanilla, P., Rohloff, J., Iversen, T.H. (2002). Influence of essential oils on *Phytophthora infestans*. *Potato Research* **45**: 225 – 235.

27- Rani, P., Khullar, N. (2004). Antimicrobial evaluation of some medicinal plants for their anti-enteric potential against multi drug resistant *Salmonella typhi*. *Phytotherapy Research* **18**: 670-73

28- Rezaei Kahkha, M.R., Amanloo, S., Kaykhaii, M. (2014). Antiaflatoxigenic activity of *Carum copticum* essential oil, *Environmental Chemistry Letters* **12**: 231–234

29- Sudova, E., Machova, J., Svobodova, Z. (2007). Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: a review. *Veterinaria medicine* **52**: 527- 32

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 12, Issue 2, 2016

Evaluation of Invitro Antifungal Activity of *Mentha Piperita* and *Carum Capticum* Against *Saprolegnia Parasitica*

Hooshangi, S.[1], Firouzbakhsh, F.[2]*, Badalii, H.[3]

1. M.Sc. Department of Fisheries, Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
2. Associate Professor, Department of Fisheries, Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
3. Assistant Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Received Date: 27June 2015 *Accepted Date: 8 July 2016*

Abstract:
Saprolegniasis is an important aquatic fungal disease that causes severe damages at different growth stages of aquatic animals. The aim of this study was to measure the minimum inhibitory concentration (MIC) of alcoholic and aqueous extracts of Carum capticum and Mentha piperita on Saprolegnia parasitica. The antifungal activity of the aqueous, ethanolic and methanolic extracts of M. piperita and C. capticum on S. parasitica was tested using a mycelial radial growth technique and minimal inhibition concentration values were estimated according to the micro dilution method. The results of antifungal activity by mycelia radial growth technique showed that the ethanolic extract of M. piperita had a significant antifungal activity (MIC=10mg/ml) compared with the other extracts against S. parasitica. The growth potential in S. parasitica increased with increase in the concentration. Growth inhibition values of plant extracts on S. parasitica in broth micro dilution method were not significant (MFC ≥ 2048). Our study suggests that natural products derived from the examined medicinal plants have the potential to be used as antifungal in fish culture.

Keywords: *Saprolegnia parasitica, Carum capticum, Mentha piperita, antifungal activity*

**Corresponding author: Firouzbakhsh, F.*
Address: Department of Fisheries, Faculty of Animal science and Fisheries, Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. Tel:
Email: f.firouzbakhsh@sanru.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir