Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:13 +0430 on Sunday May 5th 2019

دانشگاه گنبد کاووس
نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"
دوره ششم، شماره چهارم، زمستان ۹۷
http://jair.gonbad.ac.ir

بررسی مقایسه‌ای خواص ضدباکتریایی و ضد قارچی اسانس‌های زنیان، اسطوخودوس و میخک در شرایط آزمایشگاهی علیه برخی پاتوژن‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)

زینب جوکار[۱]، حسنا قلی‌پور کنعانی*[۲]، حجت‌اله جعفریان[۲]،علی طاهری میرقائد[۳]
[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس، ایران
[۲]دانشیار، گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس، ایران
[۳]دانشیار، گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ ارسال: ۹۶/۷/۱۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۵

چکیده

به منظور مقایسه اثرات اسانس علیه برخی پاتوژنهای قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*)، از روش انتشار دیسک استفاده شد. حداقل غلظت مهار رشد و حداقل غلظت باکتری‌کشی و حداقل غلظت قارچ‌کشی با استفاده از روش میکرودایلوشن براث انجام شد. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی تحت تأثیر اسانس‌های زنیان (۱±۲۶ میلی‌متر) و اسطوخودوس (۱ ±۱۰ میلی‌متر) و میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری لاکتوکوکوس گارویه تحت تأثیر اسانس‌های زنیان (۱/۱۵±۲۴/۳۳ میلی‌متر) و اسطوخودوس (۰/۵۷±۱۴/۶۶ میلی‌متر) در مقایسه با قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین (۱/۵۲±۲۰/۳۳ میلی‌متر) و اریترومایسین (۰ میلی‌متر) نشان داد. در بین دو اسانس گیاهی مورد استفاده برای باکتری، اسانس زنیان با حداقل غلظت بازدارندگی برابر (۰/۰۱۷±۰/۰۴۹ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) دارای بیشترین خاصیت ضدباکتریایی بود. میانگین قطر هاله‌های عدم رشد قارچ ساپرولگنیا تحت تأثیر اسانس اسطوخودوس (۰/۵۷±۸/۳۳ میلی‌متر) و میخک (۱±۷ میلی‌متر) به‌عنوان مهارکننده در مقایسه با آنتی‌میکوتیک آمفوتریسین‌ب (۱±۱۳ میلی‌متر) اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. بنابراین می‌توان اسانس میخک و اسطوخودوس را به‌عنوان مهارکننده طبیعی قارچ و اسانس زنیان و اسطوخودوس را به‌عنوان مهارکننده طبیعی باکتری در مراکز تکثیر و پرورش آبزیان توصیه نمود.

واژه‌های کلیدی:* *O. mykiss*، اثر ضد میکروبی، *Streptococcus iniae*، *Lactococcus garviea

*نویسنده مسئول: gholipourK@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:13 +0430 on Sunday May 5th 2019

مقدمه

تخم ماهیان به لحاظ داشتن مقادیر بالای انواع مواد غذایی در خود، مورد علاقه قارچ‌های ساپروفیتی می‌باشند. از این‌رو قارچ‌های آبزی به عنوان مهمترین عامل آسیب‌رسان به روند تکامل تخم و بچه‌ماهی می‌توانند محسوب گردند. به‌طوری‌که خسارت ناشی از آن سالانه منجر به از دست رفتن درصد قابل توجهی از تخم تولید شده می‌گردد (Forneris *et al.*, 2003). ساپرولگنیوز از دسته عفونت‌های قارچی و مهمترین بیماری قارچی ماهیان و تخم آن‌ها می‌باشد (Noga, 1996). جنس ساپرولگنیا متعلق به گروه کپک‌های آبی و جزء خانواده ساپرولگنیاسه محسوب می‌شود که در آب‌های شیرین گسترش دارند و به‌عنوان مهم‌ترین گروه قارچی مؤثر در ماهیان وحشی و پرورشی شناخته شده‌اند. ساپرولگنیا از طریق چسبیدن و نفوذ به دیواره سلول‌های مرده و نیز از طریق تخم‌های مرده به تخم‌های سالم سرایت می‌کند (Bruno and Woo, 1994).

از متداول‌ترین روش‌های پیشگیری یا درمان عارضه قارچ‌زدگی در تخم‌های بارور، استفاده از مالاشیت‌گرین یا فرمالین است. مواد یاد شده برای درمان قارچ‌زدگی تخم به روش شستشو بکار گرفته می‌شود و درمان معمولاً در دوره‌ای از انکوباسیون تخم که متأثر از دماست در مراحل خاصی از دوره جنینی انجام می‌شود. باتوجه به آثار سرطان‌زایی، زیست‌محیطی و ناقص‌الخلقه‌زایی مالاشیت‌گرین برای ماهیان و کاربران آن و نیز برخی آثار سوء فرمالین در بیشتر کشورهای جهان ممنوعیت استفاده از آن به طور کامل برای تمام ماهیان یا حداقل ماهیان خوراکی اعمال شده است (Meyer and Jorgenson, 1983). همچنین در مورد بیماری‌های باکتریایی در ایران مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف نسبت به باکتری استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه، عامل بیماری استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش شده است، به‌طوری‌که امروزه این مقاومت‌های دارویی به‌عنوان یک معضل بزرگ در درمان این بیماری مطرح می‌باشند (Dügenci *et al.*, 2003).

بیماری استرپتوکوکوزیس ناشی از باکتری *Streptococcus iniae* سبب بروز خسارت‌های اقتصادی فراوان در صنعت آبزی‌پروری در جهان شده است. این بیماری در چندین گونه ماهیان آب شیرین، شور و لب‌شور گزارش شده است (Akhlaghi and Mahjoor, 2000). استرپتوکوکوس اینیایی عامل عفونی‌زای مشترک در ماهیان و انسان می‌باشد. این باکتری گرم مثبت، کوکسی شکل کپسول‌دار، بدون اسپور و غیرمتحرک است که اولین بار از آبسه‌های زیر پوستی دلفین‌های آب شیرین جدا شده است (Costa *et al.*, 2012). لاکتوکوکوس گارویه عامل بیماری لاکتوکوکوزیس، کوکوباسیل گرم مثبت و فاقد تحرک با همولیز آلفا است که از بسیاری از گونه‌های ماهی و به‌ویژه قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌عنوان عامل بیماری‌زا گزارش شده است (Ravelo *et al.*, 2001). این باکتری از عوامل بیماری‌زای مشترک محسوب می‌شود و می‌تواند منجر به بروز اندوکاردیت در انسان شود که اهمیت بیماری را دو چندان می‌کند (Wang *et al.*, 2007). در مورد

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:13 +0430 on Sunday May 5th 2019

بیماری‌های عفونی باکتریایی، با توجه به محدودیت‌های استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله ایجاد مقاومت‌های دارویی در ماهی و انسان، مشکلات زیست‌محیطی، انباشت در بافت و قیمت بالای برخی آنتی‌بیوتیک‌ها، گرایش به جایگزینی آن‌ها با مواد کم ضررتر و ارزان‌تر را تقویت نموده است. از بین مواد مختلف جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها، اخیراً فرآورده‌هایی با منشاء گیاهی جایگاه ویژه‌ای یافته‌اند (Immanuel *et al*., 2004; Harikrishnan *et al*., 2003).

اسانس‌های گیاهی به عنوان ترکیبات ضد میکروبی و ضد قارچی در شاخه‌های داروشناسی، میکروب‌شناسی و پزشکی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. فعالیت ضد باکتریایی آن‌ها به دلیل وجود ترکیبات ترپنوئیدی و فنلی می‌باشد (Dufour *et al*., 2003). اسانس‌ها باعث افزایش نفوذپذیری غشاء سلول و غشاهای بیولوژیک اندامک‌های داخل سلولی و اختلال در تنفس سلولی می‌شوند (Celikel and Kavas, 2008). اغلب اسانس‌های گیاهی استخراج شده از گیاهان دارویی دارای خواص ضد قارچی، ضد انگلی، ضد ویروسی و ضد باکتریایی می‌باشند (Kordali *et al*., 2005). خواص ضد باکتریایی اسانس‌های گیاهی و ترکیبات آن‌ها نشان داده است که باکتری‌های گرم منفی نسبت به گرم مثبت‌ها به خاطر داشتن غشای لیپوپلی‌ساکاریدی مقاومت بیشتری به اسانس‌های گیاهی داشته‌اند (Dufour *et al*., 2003). زنیان با نام علمی *Carum copticum* گیاهی علفی، یک‌ساله، کوچک، زرد رنگ و بی‌کرک به ارتفاع ۳۰ تا ۹۰ سانتی‌متر است. اسانس آژاوان (Ajowan oil) مهمترین ماده‌ای است که از دانه زنیان به‌دست آمده است و شامل ۳۵ تا ۵۰ درصد تیمول (Tymol)، ۱۵ تا ۲۰ درصد سیمن (Cymene) و ۳۰ تا ۴۰ درصد آلفا- پینن (α-pinene) می‌باشد (Najafi *et al*., 2012). اسطوخودوس با نام علمی *Lavandula stoechas* گیاهی از خانواده نعناعیان، دارای پرزهای باریک با برگ‌های متقابل و دراز و سبز رنگ، پوشیده از کرک‌های سفید پنبه‌ای و طعم تلخ می‌باشد (Samsam Sheriat, 2006). اسطوخودوس دارای ۲۶ ماده مختلف می‌باشد که فراوان‌ترین مواد تشکیل دهنده آن حاوی ۴۴٪ لینالول و ۴۰٪ استات لینالیل می‌باشد (Maberley, 1997). گل میخک گیاهی است از خانواده میرتاسه myrtaceae که نام علمی آن *Syzygium aromaticum* است. میخک دارای مقداری اسانس روغنی فرار و ۱۰ تا ۱۳ درصد تانن و ماده‌ای بلورین به نام کاریوفیلین و اسیدهای تری‌ترپن و استر است (Zheng *et al*., 1992). برخی مطالعات به اثرات ضد باکتریایی اسانس زنیان و اسطوخودوس و اثرات ضد قارچی اسانس اسطوخودوس و میخک اشاره کرده است. اثرات ضد باکتریایی اسانس زنیان توسط برخی محققین بر برخی باکتری‌های بیماری‌زای ماهی (Devasankaraiah *et al*., 1974; Rani and Khullar, 2004) و علاوه بر آن تحقیقات دیگر نیز مؤید اثرات ضد میکروبی اسانس اسطوخودوس بود (Lodhia *et al*., 2009; Jianu, *et al*., 2013). اثرات ضد قارچی اسانس اسطوخودوس (Hanamanthagouda *et al*., 2010)، فعالیت ضد قارچی اسانس میخک و اوژنول در برابر قارچ‌های رشته‌ای و مخمرها و قارچ خوراکی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:13 +0430 on Sunday May 5th 2019

(Willoughby, 1989; López *et al*., 2005)، قارچ‌های بیماری‌زای انسانی (Chaieb *et al*., 2007; Gayoso *et al*., 2005) و در مدل‌های حیوانی (Chami *et al*., 2004) گزارش شده است.

در پژوهش کنونی خواص ضد باکتریایی اسانس زنیان و اسطوخودوس بر رشد باکتری‌های گرم مثبت استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین و آموکسی‌سیلین و همچنین خواص ضد قارچی اسانس اسطوخودوس و میخک بر رشد قارچ ساپرولگنیا در مقایسه با آنتی‌بیکوتیک‌های کوتریمازول و آمفوتریپسین ب در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه اسانس‌های گیاهی: در این مطالعه ۱۰۰ گرم از قسمت‌های هوایی گیاهان از رویشگاه‌های طبیعی جمع‌آوری و در محل تاریک نگهداری و خشک شد. سپس آسیاب شده و به صورت پودر درآمد. پودر به‌دست آمده در بالن یک لیتری ریخته شد و به آن ۶۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد. اسانس با استفاده از دستگاه کلونجر (Clevenger) استخراج و توسط فیلتر استریل (۴ میکرومتر) صاف و تا زمان استفاده در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد (Sivam, 2001). سویه‌های استاندارد قارچ ساپرولگنیا و باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه در این تحقیق از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان تهیه شد.

رقت‌سازی در لوله: جهت رقت‌سازی در لوله به طور جداگانه برای باکتری محیط کشت تریپتیکاز سوی براث به میزان ۵ سی‌سی و همچنین برای قارچ محیط کشت سابورو دکستروز براث به میزان ۵ سی‌سی به هر کدام از ۱۰ لوله ونوجکت اضافه شد. به‌منظور استریل کردن محیط کشت همه لوله‌ها در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه به مدت ۱۵ دقیقه تحت فشار ۱/۱ اتمسفر قرار داده شد. برای مطالعه رفتار رشد سویه‌های مورد نظر و نیز تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)، حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC)، حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC) و قدرت ضد باکتریایی اسانس‌های زنیان و اسطوخودوس و همچنین قدرت ضد قارچی اسانس میخک و اسطوخودوس از روش‌های استاندارد ماکرودایلوشن‌براث (رقیق‌سازی در محیط مایع) استفاده شد. غلظت‌های به‌دست آمده از هر اسانس در هر کدام از این محیط کشت‌ها شامل ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲، ۰/۳۱، ۰/۱۵، ۰/۰۷، ۰/۰۳ و ۰/۰۱ میکرولیتر بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. رقت‌سازی برای سه تکرار انجام شد (Fereidouni and Akhlaghi, 2009).

تهیه سوسپانسیون باکتریایی: در این مطالعه دو جدایه باکتری مورد استفاده در کنار شعله و زیر هود میکروبی روی محیط کشت جامد تریپتیکاز سوی آگار کشت داده شد و در دمای ۳۰-۲۵ به مدت ۲۴ ساعت پاساژ داده شدند و سپس جهت مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. ایزوله‌های باکتریایی مورد استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:13 +0430 on Sunday May 5th 2019

در این مطالعه شامل استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه بوده است. از پرگنه‌های کشت ۲۴ ساعته هر یک از سویه‌های باکتری مورد مطالعه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با لوپ جهت تهیه سوسپانسیون باکتریایی معادل استاندارد مک فارلند شماره یک برداشت و به سرم فیزیولوژی استریل اضافه گردید و کدورت باکتریایی آن مطابق با محلول استاندارد مک فارلند شماره یک شد. از سوسپانسیون باکتریایی با تراکم 3×10^{8} cfu/ml (معادل مک فارلند شماره یک) در زیر هود و در شرایط استریل، به مقدار ۱۰ میکرولیتر (3×10^{6}cfu/ml) به هر یک از لوله‌های ونوجکت که حاوی رقت‌های متوالی از هر کدام از اسانس در محیط کشت تریپتیکاز سوی براث (TSB) بود، اضافه گردید. سپس لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در گرم‌خانه نگهداری شدند. گروه‌های کنترل در این آزمایش شامل کنترل مثبت (محیط کشت فاقد اسانس و دارای باکتری) و کنترل منفی (محیط کشت با رقت متوالی از هر اسانس و فاقد باکتری) که کدورت در مقایسه با ردیف کنترل به عنوان رشد باکتری و شفافیت به عنوان عدم رشد باکتری در نظر گرفته شد (Goudarzi *et al*., 2011).

تهیه سوسپانسیون قارچی: در این مطالعه جدایه قارچی یک گونه ساپرولگنیا مورد آزمایش قرار گرفت. ابتدا قارچ گونه ساپرولگنیا روی محیط کشت جامد سابورو دکستروز آگار کشت داده شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴-۳ روز نگهداری شد. سپس از کلنی‌های رشد یافته، سوسپانسیون قارچی تهیه گردید. جهت تهیه سوسپانسیون از قارچ ساپرولگنیا، در شرایط کاملاً استریل از کلنی خالص قارچ ساپرولگنیا ایجاد شده در محیط کشت نمونه‌ای تهیه گردید و به سرم فیزیولوژی دارای توبین ۸۰ اضافه شد. بعد از جداسازی اسپور، شفافیت سوسپانسیون در طول موج ۵۲۰ نانومتر به ۹۰٪ رسانیده شد که نشان‌دهنده وجود 1×10^{6} اسپور در هر میلی‌لیتر بود.

روش ماکرودایلوشن‌براث برای تعیین مقادیر MIC و MBC باکتری: برای تعیین MIC و MBC پس از ۲۴ ساعت از انکوبه شدن باکتری‌ها در محیط آبگوشت رقیق شده با کدورت‌سنجی چشمی و اسپکتروفتومتری، پایین‌ترین غلظتی که هیچ کدورتی در آن مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد MIC تعیین شد. برای مشخص کردن حداقل غلظت کشندگی MBC از لوله MIC، یک رقت بالاتر و یک رقت پایین تر با سمپلر مقدار ۱۰ میکرولیتر به محیط ژلوز خوندار اضافه و با پیپت پاستور استریل کشت سطحی داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرم‌خانه نگهداری و پس از آن کمترین رقتی که در آن هیچ باکتری رشد نکرد به عنوان حداقل غلظت باکتری‌کشی تعیین شد. آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد (Heidari-Sureshjani *et al*., 2013).

روش ماکرودایلوشن‌براث برای تعیین مقادیر MIC و MBC قارچ: از سوسپانسیون اسپور قارچی تهیه شده و مقدار ۱۰ میکرولیتر به هر لوله اضافه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از انکوباسیون با کدورت‌سنجی چشمی و مقایسه آن با لوله‌های شاهد، MIC هر اسانس مشخص گردید. این

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:13 +0430 on Sunday May 5th 2019

تست سه بار تکرار و MIC میانگین محاسبه شد. جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی قارچ MFC مقدار ۱۰ میکرولیتر از لولهٔ MIC و سایر لوله‌های فاقد کدورت برداشته و در محیط کشت سابورو دکستروز آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل کشت داده شد. پس از گذشت ۴۸ تا ۷۲ ساعت انکوباسیون، MFC با شمارش تعداد کلنی‌ها در پلیت تعیین گردید. با شمارش تعداد کلنی غلظتی که تعداد کلنی‌های آن از یک‌هزارم تعداد اولیه کمتر بود، به‌عنوان MFC در نظر گرفته شد. آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد (Heidari-Sureshjani *et al.*, 2013).

تست تعیین حساسیت قارچ به اسانس اسطوخودوس و میخک و حساسیت باکتری‌ها به اسانس زنیان و میخک با استفاده از دیسک: برای تعیین حساسیت قارچی به طور جداگانه مقدار ۱۰ میکرولیتر از اسانس اسطوخودوس و میخک در شرایط کاملاً استریل و زیر هود روی دیسک‌های استاندارد وارد نموده سپس محیط کشت SDA توسط ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچ مورد نظر تلقیح شد و به مدت ۳ دقیقه در حرارت اتاق قرار داده شد. سپس دیسک‌ها در فواصل معینی از یکدیگر بر روی محیط کشت قرار داده شدند. همچنین برای تعیین حساسیت باکتریایی سوسپانسیون میکروبی برابر با کدورت استاندارد مک فارلند ۰/۵ (غلظت تقریبی $1/5\times10^{8}$ CFU/ml) تهیه شد. از سوسپانسیون باکتریایی در شرایط کاملاً سترون با سوآب به‌صورت سطحی روی TSA قرار داده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از اسانس رقیق نشده زنیان و اسطوخودوس به دیسک بلانک (قطر ۶ میلی‌متر) اضافه شده و توسط پنس استریل روی محیـــط کشت باکتری قرار داده شد. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. وجود یا عدم وجود هاله ممانعت از رشد در اطراف دیسک‌ها بررسی گردید. برای قارچ از دیسک‌های حاوی آمفوتریسین ب و کوتریمازول و برای باکتری دیسک‌های حاوی آموکسی‌سیلین و اریترومایسین به عنوان شاهد مثبت و از دیسک حاوی دی‌متیل سولفوکساید به عنوان شاهد منفی استفاده شد. این آزمایش سه بار تکرار شد (Andrews, 2001).

آنالیز آماری داده‌ها: در این مطالعه به منظور تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت قارچ‌کشی تیمارهای اسانس میخک و اسطوخودوس هر کدام با ۳ تکرار علیه قارچ ساپرولگنیا در نظر گرفته شد و به منظور تعیین قطر هاله عدم رشد قارچ ساپرولگنیا نیز تیمارهای اسطوخودوس و میخک و دیسک‌های حاوی آمفوتریسین ب و کوتریمازول به عنوان شاهد مثبت (۴تیمار) با ۳ تکرار انجام شد. تعداد نمونه‌ها برابر ۱۲ بود. همچنین به منظور تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت باکتری‌کشی تیمارهای اسانس زنیان و اسطوخودوس هر کدام با ۳ تکرار علیه باکتری استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه در نظر گرفته شد و به منظور تعیین قطرهاله عدم رشد باکتری نیز تیمارهای اسانس زنیان و اسطوخودوس و دیسک‌های حاوی آموکسی‌سیلین و اریترومایسین به عنوان شاهد مثبت (۴ تیمار) با ۳ تکرار انجام گردید. تعداد نمونه‌ها برای هر دو باکتری برابر با ۲۴ بود. برای آنالیز داده‌های حاصل از آزمایش، ابتدا در محیط نرم‌افزاری SPSS-17 نرمال بودن آن‌ها توسط آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد و مشخص شد با

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:13 +0430 on Sunday May 5th 2019

توجه به جدول تست نرمالیته داده‌ها نرمال بودند (P>۰/۰۵). به منظور مقایسه قطر هاله عدم رشد باکتری و قارچ در گروه‌های تحت بررسی از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (one way ANOVA) استفاده شد و مقایسه گروه‌ها به کمک آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۵ ٪ انجام شد.

نتایج

نتایج حاصل از خواص آنتی‌باکتریال گیاهان مورد مطالعه در جداول ۱، ۲ و ۳ آورده شده است. براساس نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد، تأثیر اسانس زنیان علیه باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در مقایسه با اسانس اسطوخودوس و آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده دارای اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). میانگین قطر هاله عدم رشد اسانس‌های زنیان در مقایسه با قطر هاله عدم رشد اسانس اسطوخودوس، آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین و اریترومایسین علیه باکتری لاکتوکوکوس گارویه افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). قطر هاله عدم رشد برای اسانس اسطوخودوس در مقایسه با اسانس زنیان و آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین و اریترومایسین علیه باکتری لاکتوکوکوس گارویه در سطح کمتر بود و اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۵).

جدول ۱- حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) اسانس زنیان علیه باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه

باکتری	MIC (µl/ml)	MBC (µl/ml)
استرپتوکوکوس اینیایی	۰/۰۴۹ ± ۰/۰۱۷	۰/۰۹۶ ± ۰/۰۴۶
لاکتوکوکوس گارویه	۰/۰۴۹ ± ۰/۰۱۷	۰/۱۲ ± ۰/۰۴۶

جدول۲- حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) اسانس اسطوخودوس علیه باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه

باکتری	MIC (µl/ml)	MBC (µl/ml)
استرپتوکوکوس اینیایی	۰/۸۳ ± ۰/۳۶	۱/۶۶ ± ۰/۷۲
لاکتوکوکوس گارویه	۰/۵۱ ± ۰/۱۷	۱/۰۴ ± ۰/۳۶

جدول ۳- قطر هاله عدم رشد باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه تحت تأثیر اسانس اسطوخودوس، زنیان و آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی سیلین و اریترومایسین بر حسب (میلی‌متر)

باکتری	اسطوخودوس	زنیان	آموکسی‌سیلین	اریترومایسین
استرپتوکوکوس اینیایی	۱۰±۱[a]	۲۶ ±۱[b]	۲۰/۳۳ ±۱/۵۲[c]	۰[d]
لاکتوکوکوس گارویه	۱۴/۶۶ ±۰/۵۷[a]	۲۴/۳۳ ±۱/۱۵[b]	۲۰/۳۳ ± ۱/۵۲[c]	۰[d]

داده‌ها (میانگین± انحراف معیار) در سه تکرار و حروف کوچک متفاوت (a, b, c, d) در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین تیمارهای مختلف می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:13 +0430 on Sunday May 5th 2019

براساس نتایج تجزیه و تحلیل آماری در جداول ۴ و ۵ از میانگین قطر هاله‌های عدم رشد تأثیر اسانس اسطوخودوس در مقایسه با اسانس میخک و کوتریمازول اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). ولی در مقایسه با ضد قارچ آمفوتریسین ب اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۵). میانگین قطر هاله‌های عدم رشد اسانس میخک در مقایسه با اسانس اسطوخودوس اختلاف معنی دار نبود (P>۰/۰۵). ولی در مقایسه با آنتی‌میوتیک آمفوتریسین ب و کوتریمازول اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۵).

جدول ۴- حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) اسانس میخک و اسطوخودوس علیه یک گونه ساپرولگنیا

غلظت / اسانس	MIC (µl/ml)	MFC (µl/ml)
میخک	۵/۶۶ ± ۰/۵۷	۴ ± ۱
اسطوخودوس	۶/۳۳ ± ۰/۵۷	۴/۳۳ ± ۰/۵۷

جدول ۵- قطر هاله عدم رشد قارچ ساپرولگنیا تحت تأثیر اسانس اسطوخودوس و میخک، آنتی‌میکوتیک آمفوتریپسین‌ب و کوتریمازول بر حسب (mm)

قارچ	اسطوخودوس	میخک	آمفوتریپسین ب	کوتریمازول
ساپرولگنیا	۸/۳۳ ± ۰/۵۷^{ab}	۷ ±۱ ^{a}	۱۳ ±۱ ^{c}	۱۰ ± ۱^{b}

داده‌ها (میانگین± انحراف معیار) در سه تکرار و حروف کوچک متفاوت (a, b, c) در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین تیمارهای مختلف می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

لاکتوکوکوزیس و استرپتوکوکوزیس از جمله بیماری‌های باکتریایی هستند که با تلفات و خسارات فراوانی در ماهیان آب شیرین و شور همراه هستند. باکتری لاکتوکوکوزیس گارویه و استرپتوکوکوس اینیایی از عوامل مهم بروز سپتی‌سمی و تلفات بالا در مزارع پرورش ماهی به‌ویژه در قزل‌آلای رنگین‌کمان محسوب می‌شوند (Austin and Austin, 2007). بیماری‌های قارچی نیز به‌عنوان یکی از مهمترین عوامل زیان‌آور در صنعت آبزی‌پروری است که از لحاظ درجه اهمیت بعد از بیماری‌های باکتریایی قرار دارد (Bruno and Woo, 1994). هنوز هم استفاده از مواد شیمیایی برای ضد عفونی تخم ماهیان بدون در نظر گرفتن عوارض جانبی آن بر سلامت آبزی و انسان در کارگاه‌های تکثیر صورت می‌گیرد. هم‌چنین مقاومت‌های شدید دارویی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در آبزی پروری، به عنوان یک معضل بزرگ در درمان بیماری‌ها مطرح می‌باشد. لذا استفاده از مواد گیاهی برای ضد عفونی تخم ماهیان جهت جلوگیری از قارچ‌زدگی هم چنین برای کنترل باکتری‌های بیماری‌زای ماهی جهت جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها ضروری است. نتایج این مطالعه نشان‌دهنده اثرات بالای ضد باکتریایی مناسب اسانس‌های زنیان و اسطوخودس روی باکتری *Lactococcus*

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:13 +0430 on Sunday May 5th 2019

garvieae و *Streptococcus iniae* و اثرات ضدقارچی اسانس‌های میخک و اسطوخودوس روی قارچ ساپرولگنیا می‌باشد. به‌طوری‌که این اثر قابل مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد استفاده علیه این باکتری‌هاست.

نتایج حاصل از آزمایش‌های ضد باکتری نشان داد که در بین دو اسانس گیاهی مورد مطالعه، اسانس زنیان بیشترین اثر مهارکنندگی روی باکتری‌های *S. iniae* و *L. garvieae* به‌ترتیب با قطر هاله بازدارندگی ۱±۲۶ و ۱/۱۵±۲۴/۳۳ میلی‌متر داشته است. حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی اسانس زنیان علیه باکتری *S. iniae* به‌ترتیب ۰/۰۱۷±۰/۰۴۹ و ۰/۰۴۶±۰/۰۹۶ و علیه باکتری *L. garviea* به‌ترتیب ۰/۰۱۷±۰/۰۴۹ و ۰/۰۴۶±۰/۱۲ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد. اسانس زنیان دارای بیشترین قدرت ضد باکتریایی (کمترین میزان MIC) است که تأثیر آن برای هر دو باکتری از اسانس اسطوخودوس و آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین و اریترومایسین بیشتر است. بیشتر اجزای این اسانس از ترکیبات فنولی می‌باشد که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی است (Bown, 1996). گیاه زنیان حاوی مقدار قابل توجهی تیمول و پارا-سایمن بوده که وجود این ترکیبات و نیز اثر سینرژیستی آن‌ها با سایر ترکیبات موجود در اسانس می‌تواند عامل فعالیت ضد میکروبی اسانس باشد (Aberoomand Azar *et al*., 2010). در این تحقیق نیز این موضوع اثبات گردید. مطالعات گانگ جون و همکاران (Gang-Joon *et al*., 2012) نشان از اثبات تأثیر مناسب تیمول بر باکتری‌های بیماری‌زای ماهی از جمله *Aeromonas salmonicida* subsp. *anguillarum*، *Vibrio tarda parahaemolyticus*، *Vibrio ulnificus* دارد.

بررسی تأثیر فعالیت‌های ضد باکتریایی عصاره متانولی زنیان بر باکتری‌های (*Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis*) در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که میزان MIC این گیاه در محدوده ۵۰-۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد (Hussain *et al*., 2011). همچنین عصاره اتانولی زنیان استخراج شده از دانه گیاه زنیان علیه باکتری لاکتوکوکوس گارویه دارای حداقل غلظت بازدارندگی ۴۵۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر و قطرهاله عدم رشد باکتری به‌روش دیسک دیفوژن ۳/۱۳±۱۸ میلی‌متر بود. که نشان‌دهنده اثرات ضد میکروبی نسبتاً بالا نسبت به عصاره و اسانس‌های مورد استفاده در مطالعه بود (Fereidouni *et al*., 2013) که همسو با نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر بود. هر چند اسانس زنیان در تحقیق حاضر دارای اثرات قطر هاله عدم رشد بیشتر بود که احتمالاً تأثیر عصاره الکلی در مهار رشد باکتری در مقابل تأثیر اسانس متفاوت بوده است.

مطالعه عروج‌علیان و همکاران (Oroojalian *et al*., 2010a and 2010b) نشان‌دهنده اثرات ضد باکتریایی اسانس زنیان علیه باکتری *listeria monocytigene* با حداقل غلظت بازدارندگی در دامنه ۰/۰۳ تا ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر است. این تأثیر در محیط عصاره ماهی سفید در مقایسه با گوشت ماهی سفید

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:13 +0430 on Sunday May 5th 2019

چشمگیرتر بود (Hosseini *et al.*, 2013). هم‌چنین اسانس زنیان دارای اثرات ضدباکتریایی علیه باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* به‌ترتیب دارای هاله مهار رشد ۱۰ و ۱۱ میلی‌متر بود (Singh *et al.*, 2002). اسانس زنیان ترکیب مؤثری جهت کاهش سرعت رشد باکتری *Staphylococcus aureus* و کاهش تولید انتروتوکسین‌های ناشی از آن در سوریمی ماهی کیلکا با حداقل غلظت بازدارنده رشد و حداکثر غلظت قابل تحمل معادل ۰/۰۶٪ و ۰/۰۱۵٪ می‌باشد (Azizkhani and Tooryan, 2016).

طبق نتایج بررسی حاضر حاصل از اسانس اسطوخودوس اثر مهارکنندگی باکتری‌های *S. iniae* و *L. garvieae* به‌ترتیب با قطر هاله بازدارندگی ۱±۱۰ و ۰/۵۷±۱۴/۶۶ میلی‌متر داشته است. حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی اسانس اسطوخودوس علیه باکتری *S. iniae* به‌ترتیب ۰/۳۶±۰/۸۳ و ۰/۷۲±۱/۶۶ و علیه باکتری *L. garvieae* به‌ترتیب ۰/۷۲±۱/۶۶ و ۰/۳۶±۱/۰۴ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد. برگ‌های گیاه اسطوخودوس علاوه بر دیترپن، حاوی مقادیر زیادی الکل‌های حلقوی، فلانوئیدها و اسیدهای آلی مثل کارنوزیک اسید و ساپونین است که در این بین ساپونین‌ها خاصیت ضد باکتریایی مؤثرتری دارند (Kim *et al.*, 2003). ترکیب لینالول فراوان‌ترین ترکیب تشکیل‌دهنده اسانس اسطوخودوس می‌باشد که دارای خواص بیولوژیکی متفاوت از جمله اثر آرام‌بخشی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (Cruz *et al.*, 2006). عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس دارای اثرات ضد باکتریایی علیه باکتری‌های بیماری‌زای *Listonella anguillarum* ،*Lactococcus garvieae* ،*Photobacterium damselae* ،*Piscicida subsp.* ،*Yersinia ruckeri* است. قطر هاله عدم رشد علیه باکتری لاکتوکوکوس گارویه ۱±۳/۵ میلی‌متر بود که نسبت به بقیه باکتری‌ها کمتر بود و حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی آن علیه باکتری لاکتوکوکوس گارویه به‌ترتیب ۴/۲ و ۸/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (Bulfon *et al.*, 2014).

در تحقیق حاضر قطر هاله عدم رشد اسانس اسطوخودوس علیه *L. garvieae* ۰/۵۷±۱۴/۶۶ میلی‌متر بود که دارای اثرات ضد کتریایی بیشتری بود. احتمالاً تأثیر عصاره الکلی در مهار رشد باکتری در مقابل تأثیر اسانس متفاوت بوده است. هم‌چنین طبق نتایج تحقیقات بلازکوویچ و همکاران (Blažeković *et al.*, 2011) اثرات ضد باکتریایی عصاره اتانولی استخراج شده از گل، ساقه و برگ گیاه اسطوخودوس علیه باکتری‌های *Bacillus subtilis*، *Enterococcus faecalis*، *Escherichia coli*، *Klebsiella pneumoniae*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus aureus*، دارای قطر هاله عدم رشد ۰±۱۰ و علیه باکتری *Streptococcus pyogenes* دارای قطر هاله عدم رشد ۱±۱۴ میلی‌متر بود که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت. در تحقیق حاضر قطرهاله عدم رشد اسانس اسطوخودوس نیز علیه باکتری *S. iniae* نیز ۱±۱۰ و علیه *L. garvieae* نیز ۰/۵۷±۱۴/۶۶ میلی‌متر بود. اسانس اسطوخودوس دارای اثرات ضد باکتریایی علیه باکتری‌های *Salmonella enteritidis, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Enterobacter*

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:13 +0430 on Sunday May 5th 2019

cloacae, Proteus mirabilis, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Micrococcus flavus است که قطر هاله عدم رشدشان در محدوده ۲۲-۶ میلی‌متر بود. قطر هاله عدم رشد علیه باکتری *L. monocytogenes* و *E. coli* به‌ترتیب ۱۰ و ۱۴ میلی‌متر بود (van Soković *et al*., 2010) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. طبق نتایج تحقیقات استارلیپر و همکاران (Starliper *et al*., 2015) اسانس‌های گیاهی از جمله میخک و اسطوخودوس دارای اثرات ضد باکتریایی متوسط علیه باکتری *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* از جمله باکتری بیماری‌زای ماهی می‌باشد که دارای قطر هاله عدم رشد به‌ترتیب ۳/۱ ± ۲۹/۳ ، ۲/۳ ± ۱۲/۷ میلی‌متر بود. درحالی‌که طبق نتایج بررسی حاضر حاصل از اسانس اسطوخودوس اثر مهارکنندگی باکتری‌های *S. iniae* و *L. garvieae* به‌ترتیب با قطر هاله بازدارندگی ۱±۱۰ و ۰/۵۷±۱۴/۶۶ میلی‌متر داشته است.

احتمالاً نوع متفاوت سویه‌های باکتری و تفاوت در مقاومت آنها باعث ایجاد اختلاف شده است. همچنین آزمایش‌های ضد قارچی در تحقیق حاضر نشان داد که اسانس میخک و اسطوخودوس به ترتیب با مقدار MIC برابر با (۰/۵۷±۵/۶۶) و (۰/۵۷±۶/۳۳) میکرولیتر و MFC برابر با (۱±۴) و (۰/۵۷±۴/۳۳) میکرولیتر برمیلی‌لیتر و قطر هاله عدم رشد (۱±۷) و (۰/۵۷±۸/۳۳) میلی‌متر دارای اثرات ضد قارچی علیه قارچ ساپرولگنیا می‌باشد. نتایج برخی تحقیقات (Blažeković *et al*., 2011) نیز حاکی از اثرات ضد قارچی عصاره اتانولی استخراج شده از گل، ساقه و برگ گیاه اسطوخودوس علیه قارچ‌های *Candida krusei*، *Candida tropicalis*، *Cryptococcus neoformans*، *Hansenula anomala*، *Microsporum gypseum*، *Microsporum canis*، که دارای قطر هاله عدم رشد ۰±۸ میلی‌متر بود که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت. در این تحقیق قطر هاله عدم رشد اسانس اسطوخودوس علیه قارچ ساپرولگنیا ۰/۵۷±۸/۳۳ میلی‌متر بود. در تحقیقات دیگری که توسط زوزات و همکاران (Zuzarte *et al*., 2012) صورت گرفت اسانس اسطوخودوس *Lavandula multifida* دارای اثرات ضد قارچی علیه قارچ‌های Dermatophytes و *Cryptococcus neoformans* با حداقل غلظت بازدارندگی ۰/۱۶ میکرولیتر بر میلی‌لیتر و علیه *Candida albicans* در حدود ۰/۰۸ میکرولیتر بر میلی‌لیتر بود. درحالی‌که در تحقیق حاضر اسانس اسطوخودوس دارای اثرات ضدقارچی علیه قارچ ساپرولگنیا با میزان MIC برابر با ۰/۵۷±۶/۳۳ میکرولیتر بر میلی‌لیتر بود. احتمالاً نوع متفاوت سویه‌های قارچی و تفاوت در مقاومت آن‌ها باعث ایجاد اختلاف شده است. همچنین اونیال و همکاران (Uniyal *et al*., 2012) نشان دادند که اسانس اسطوخودوس دارای اثرات ضد قارچی علیه قارچ‌های *Aspergillus niger* و *Aspergillus Fumigatus* به‌ترتیب دارای هاله ۱/۱±۲۰ و۱±۱۵ می‌باشد. درحالی‌که در تحقیق حاضر اسانس اسطوخودوس با قطر هاله عدم رشد برابر ۰/۵۷±۸/۳۳ میلی‌متر دارای اثرات ضد قارچی علیه قارچ ساپرولگنیا می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:13 +0430 on Sunday May 5th 2019

اسانس میخک نیز دارای بیشترین اثرات ضد قارچی علیه قارچ‌های *Aspergillus niger* و *Fumigatus Aspergillus* بود. همچنین مطالعات نشان داده‌اند که اسانس میخک با غلظت ppt ۱۰۰ و بالاتر بر عفونت قارچی تخم قزل‌آلای رنگین‌کمان ویژگی ضد قارچی دارد (Bouchard *et al*., 2000). همچنین طی مطالعات پینتو و همکاران (Pinto *et al*., 2009) اسانس میخک و اوژنول موجود در آن دارای فعالیت ضد قارچی علیه قارچ‌های گونه‌های *Aspergillus candida* و dermatophyte با حداقل غلظت بازدارندگی به ترتیب در محدوده ۰/۶۴، ۰/۳۲، ۰/۱۶ میکرولیتر بر میلی‌لیتر بود. همچنین در مطالعات حسین و همکاران (Hussain *et al*., 2011) حداقل غلظت بازدارندگی اوژنول میخک ترکیب شده با محلول دی‌متیل‌سولفوکسید دارای اثرات ضد قارچی بر قارچ‌های *Saprolegnia spp*., *Aspergillus klebsiana, Aspergillus piscicida* به‌ترتیب ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر بود. در مطالعه حاضر حداقل غلظت بازدارندگی اسانس میخک علیه قارچ ساپرولگنیا ۰/۵۷±۵/۶۶ میکرولیتردر میلی‌لیتر به‌دست آمد. احتمالاً نوع متفاوت سویه‌های قارچی و تفاوت در مقاومت آن‌ها باعث ایجاد اختلاف شده است.

مطالعات هاسکونن و همکاران (Hoskonen *et al*., 2013) نیز حاکی از اثرات ضد قارچی اسانس میخک در شرایط آزمایشگاهی علیه قارچ ساپرولگنیا بود. حداقل غلظت بازدارنده رشد قارچ ساپرولگنیا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود. استفاده از اسانس میخک در کنترل عفونت قارچی در حین انکوباسیون تخم قزل‌آلای رنگین‌کمان ممکن نبود. اما با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به میزان صددرصد باعث مرگ و میر قارچ‌ها قبل از مرحله چشم‌زدگی تخم شده بود. در تحقیق حاضر نیز اسانس میخک دارای اثرات ضد قارچی علیه قارچ ساپرولگنیا بود. ترکیب مؤثر موجود در اسانس میخک اوژنول می‌باشد. سطوح بالای این ترکیب در اسانس میخک باعث فعالیت بیولوژیکی، خاصیت ضد باکتریایی، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی قوی آن می‌شود. این ترکیب فنولیکی باعث دناتوره شدن پروتئین‌ها شده و با فسفولیپیدهای دیواره سلولی واکنش می‌دهد. از این‌رو موجب تغییر در نفوذپذیری دیواره سلولی می‌شود (Wenqiang *et al*., 2007).

باتوجه به نتایج حاصل از این مطالعه، می‌توان بیان نمود که اسانس‌های گیاهان اسطوخودوس و زنیان دارای اثرات ضد باکتریایی مناسبی روی باکتری استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه می‌باشند. همچنین اسانس اسطوخودوس و میخک دارای اثرات ضد قارچی روی قارچ ساپرولگنیا در شرایط in vitro می‌باشد. استفاده ازاین اسانس‌ها در درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها پس از مطالعات in vivo توصیه می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:13 +0430 on Sunday May 5th 2019

تشکر و قدردانی

از آقای مهندس فریدون حسنی که در طول این تحقیق همکاری‌های فراوان نمودند و همچنین از کارکنان بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Aberoomand Azar P., Mottaghianpuor Z., Sharifan A., Larijani K. 2010. Studies on the Effect of Extraction Method on Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Carum copticum* Essential Oil. Food Technology & Nutrition, 7(2): 10-18. (In Persian).

Akhlaghi M., Mahjoor M. 2000. Some histopathological aspects of streptococcosis in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 24: 132-136.

Andrews J.M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48: 5-16.

Austin B., Austin D.A. 2007. Bacterial Fish Pathogens. Disease of Farmed and Wild Fish. Springer Praxis Books. 552 P.

Azizkhani M., Tooryan F.2016. Effects of *Carum Copticum* essential oil on growth and gene expression of enterotoxins A and C in *Staphylococcus aureus* in Kilka fish (*Clupeonella cultriventris caspia*) surimi. Journal Fisheries Science & Technology, 5(1): 141-152. (In Persian).

Blažeković B., Stanic G., Pepeljnjak S., Pepeljnjak S., Vladimir-Knežević S. 2011. In Vitro Antibacterial and Antifungal Activity of *Lavandula ´ intermedia* Emeric ex Loisel. 'Budrovka'. Molecules, 16: 4241-4253.

Bouchard L., Patel J., Lahey L. 2000. The effect of clove oil on fungal infections of salmonid eggs. Journal of Special Publication - Aquaculture Association of Canada, 4(110): 81-84.

Bown D. 1996. The royal horticultural society encyclopedia herbs their uses. London: Dorling Kindersley Distributed by Houghton Mifflin, 7: 363-364.

Bruno D.W., Woo B.P. 1994. Fish Diseases Disorders, Volume 3, Viral, Bacterial and Fungal Infections. In: Woo PTK, Bruno DW (Eds.). CABI Publishing, Waling Ford, Oxon, United Kingdom, pp: 559-599.

Bulfon C., Volpatti D., Galeotti M. 2014. In vitro vntibacterial activity of plant ethanolic extracts against fish pathogens. Journal of the World Aquaculture Society, 45: 545-557.

Celikel N., Kavas G. 2008. Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. Czech Journal of Food Science, 3: 174-181.

Chaieb K., Zmantar T., Ksouri R., Hajlaoui H., Mahdouani K. Abdelly C., Bakhrouf A. 2007. Antioxidant properties of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* and

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:13 +0430 on Sunday May 5th 2019

its antifungal activity against a large number of clinical Candida species. Journal of Mycoses, 50: 403-406.

Chami F., Chami N., Bennis S., Trouillas J., Remmal A. 2004. Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. Journal of Antimicrobial Chemother, 54: 909-914.

Costa G., Danz H., Kataria P., Bromage E. 2012. A holistic view of the dynamisms of teleost IgM: A case study of *Streptococcus iniae* vaccinated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Development Competition Immunology, 36: 298-305.

Cruz T., Cabo M.M., Castillo M.J., Jimenez J., Ruiz C., Ramos-Cormenzana A. 2006. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of different samples of *Thymus baeticus boiss*. Phototherapy Research, 7(1): 92-94.

Devasankaraiah G., Hanin I., Haranath P.S., Ramanamurthy P.S. 1974. Cholinomimetic effects of aqueous extracts from *Carum copticum* seeds. British Journal of Pharmacology, 52: 613-614.

Dufour A., Snozzi M., Koster W., Bartram J., Ronchi E. 2003. Assessing Microbial Safety of Drinking Water: Improving Approaches and Methods. World Health Organization. Geneva, Switzerland. 295 P.

Dügenci S.K., Arda N., Candan A. 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. Journal of Ethno Pharmacology, 88: 99-106.

Fereidouni M., Akhlaghi M. 2009. Resistance pattern of S*treptococcus iniae* to antibiotics in rainbow trout. The first international congress on aquatic animal health management and disease, Tehran Iran. *Vibrio parahaemolyticus*. International Journal of Food Microbiology, 111: 6-11. (In Persian).

Fereidouni M., Akhlaghi M., Khadem Alhoseini A. 2013. Antibacterial effects of medical plant extracts against *Lactococcus garvieae* the etiological agent of rainbow trout *Lactococcosis*. International Journal of Aquatic Biology, 1(3): 119-124. (In Persian).

Forneris G., Bellardi S., Palmegiano G.B., Saroglia M., Sicuro B., Gasco L., Zoccarato I. 2003. The use of ozone in trout hatchery to reduce saprolegniasis incidence. Aquaculture, 221: 157-166.

Gang-Joon H., Cheol-Hyun K., Se-Chang P., Mahanama De Z., Gee-Wook S.h. 2012. Antimicrobial activity of thymol against pathogenic gram-negative bacteria of fishes. The Philippine Journal of Veterinary Medicine, 49: 103-106.

Gayoso C.W., Lima E.O., Oliveira V.T., Pereira F.O., Souza E.L., Lima I.O., Navarro D.F. 2005. Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia cariophyllata* essential oil and eugenol. Fitoterapia, 76: 247-249.

Goudarzi M.A., Hamedi B., Malekpoor F., Abdizadeh R., Ghasemi Pirbalouti A., Raissy M. 2011. Sensitivity of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout to some Iranian medicinal herbs. Journal of Medicinal Plants Research, 5: 3067-3073. (In Persian).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:13 +0430 on Sunday May 5th 2019

Hanamanthagouda M.S., Kakkalameli S.B., Naik P.M., Naik P.M., Nagella P., Seetharamareddy H.R., Murthy H.N. 2010. Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities. Food Chemistry, 118: 836-839.

Harikrishnan R., Nisha Rani M., Balasundaram C. 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture, 221: 41-50.

Heidari-Sureshjani M., Tabatabaei-Yazdi F., Alizadeh-Behbahani B., Mortazavi A. 2013. Antimicrobial effect of aqueous, ethanol, methanol and glycerin extracts of *Satureja bachtiarica* on *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences, 6: 29-33. (In Persian).

Hoskonen P., Heikkinen J., Eskelinen P., Pirhonen J. 2013. Efficacy of clove oil and ethanol against Saprolegnia sp. and usability as antifungal agents during incubation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) eggs. Aquaculture Research, 46(3): 581-589.

Hosseini H., Rabiei S., Rezaei M., Mousavi T. 2013. Inhibitory effects of Ajowan essential oil on growth of *Listeria monocytogenes* in *Rutilus frissi kutum* broth medium and fillet. Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 8(2): 71-80. (In Persian).

Hussain T., Arshad M., Khan S., Sattar H., Qureshi M.S. 2011. In vitro screening of methanol plant extracts for their antibacterial activity. Pakistan Journal of Botany, 43: 531-538.

Immanuel G., Vincybai V.C., Sivaram V., Palavesam A., Marian M.P. 2004. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. Aquaculture, 236: 53-65.

Jianu C., Pop G., G.T., Horhat F.G. 2013. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of lavender (*Lavandula angustifolia*) and lavandin (*Lavandula x intermedia*) grown in Western Romania. Internatioal Journal of Agriculture and Biology, 15: 772-776.

Kim K.J., Kim Y.H., Yu H.H., Jeong S.I., Cha J.D., Kil B.S., You Y.O. 2003. Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Chrysanthemum boreale*. Planta Medica, 69: 274-277.

Kordali S., Kotan R., Mavi A., Cakir A., Ala A., Yildirim A. 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium, A. dracunculus, Artemisia santonicum* and *Artemisia spicigera* essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 9452-9458.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:13 +0430 on Sunday May 5th 2019

Lodhia M.H., Bhatt K.R., Thaker V.S. 2009. Antibacterial activity of essential oils from palmarosa, evening primrose, Lavender and Tuberose. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 71(2): 134-136.

López P., Sánchez C., Batlle R., Nerín C. 2005. Solid and vapour-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 6939-6946.

Maberley D.J. 1997. Plant Book. A portable Dictionary of Vascular Plants. 2th ed. Cambridge university press, United Kingdom. 874 P.

Meyer F.P., Jorgenson T.A. 1983. Teratological and other effects of malachite green on development in rabbits and *rainbow trout*. Translation of the American Fisheries Society, 112: 818-814.

Najafi Sh., Razavizadeh R., Shafagh M. 2012. Effect of water deficit stress on morphological and physiological indices of *Carum copticum*. Iranian Journal of Plant Biology, 6(22): 25-38. (In Persian).

Noga E.J. 1996. Fish Diseases and Diagnosis and Treatment. Mosby-Year Book, Incorporation, Saint. Louis, Monaco, USA. 367 P.

Oroojalian F., Kasra-Kermanshahi R., Azizi M., Bassami M.R. 2010a. Phytochemical composition of the essential oils from three *Apiaceae spp*. and their antibacterial effects on food-borne pathogens. Food Chemistry, 120:765-70. (In Persian).

Oroojalian F., Kasra-Kermanshahi R., Azizi M., Bassami M.R. 2010b. Synergistic antibacterial activity of the essential oils from three medicinal plants against some important food-borne pathogens by microdilution method. Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 26: 133-146. (In Persian).

Pinto E., Vale-Silva L., Cavaleiro C., Salgueiro L. 2009. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on Candida, *Aspergillus* and dermatophyte species. Journal of Medical Microbiology, 58(11): 1454-1462.

Rani P., Khullar N. 2004. Antimicrobial evaluation of some medicinal plants for their anti-enteric potential against multi drug resistant *Salmonella typhi*. Phototherapy Research, 18: 670-673.

Ravelo C., Magarinos B., Romalde J.A., Tornazo A.E. 2001. Conventional versus miniaturized system for the phenotypic characterization of *Lactococcus garveae* strains. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 21: 136-144.

Samsam Sheriat H .2006. Medicinal Plants. Chaharbagh publishing Do., Tehran, Iran. 212 P.

Singh G., Kapoor I.P., Pandey S.K., Singh U.K., Singh R.K. 2002. Studies on essential oil part 10 antibacterial activity of volatile oils of some spices. Phototherapy Research, 16: 680-682.

Sivam G.P. 2001. Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as supplement. American Society of Nutrition Sciences, 131: 1106-1108.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:13 +0430 on Sunday May 5th 2019

Starliper C.E., Ketola H.G., Noyes A.D., Schill W.B., Henson F.G., Chalupnicki M.A., Dittman D.E. 2015. An investigation of the bactericidal activity of selected essential oils to Aeromonas spp. Journal of Advanced Research, 6: 89-97.

Uniyal V., Bhatt R.P., Saxena S., Talwar A. 2012. Antifungal activity of essential oils and their volatile constituents against respiratory tract pathogens causing *Aspergilloma* and *Aspergillosis* by gaseous contact. Journal of Applied and Natural Science, 4(1): 65-70.

Soković M., Glamočlija J., Marin P.D., Brkić D., van Griensven L.J. 2010. Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an In Vitro Model. Molecules, 15: 7532-7546.

Wang C.Y., Shie H.S., Chen S.C., Huang J.P., Hsieh I.C., Wen M.S. 2007. *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible association with aquaculture outbreaks. International Journal of Clinical Practice, 61(1): 68-73.

Wenqiang G., Shufen L., Ruixiang Y., Shaokun T., Can Q. 2007. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. Food Chemistry, 101: 1558-1564.

Willoughby S. 1989. The Fishing Industry of Barbados. Government Printing Department. Bridgetown, Barbados, North America. 20 P.

Zheng G.Q., Kenney P.M., Lam L.K.T. 1992. Sesquiterpensfrom clove *(Eugenia caryophylata)* as Potential Anticarcinogenic Agents. Journal of Natural Products, 55 (7): 999-1003.

Zuzarte M., Vale-Silva L., Gonçalves M.J., Cavaleiro C., Vaz S., Canhoto J., Salgueiro L. 2012. Antifungal activity of phenolic-rich *Lavandula multifida* L. essential oil. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease, 31(7): 1359-1366.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jair.gonbad.ac.ir at 14:13 +0430 on Sunday May 5th 2019

www.SID.ir