Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2014; 17(86): 60-69

Evaluation of *in vitro* antifungal activity of *Foeniculum, Achillea, Satureja, Cinnamomum and Artemisia* against *Saprolegnia parasitica*

Firouzbakhsh F[1], Afsarian MH[2], Hooshangi S[3], Badali H[4*]

1- Department of Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
2- Department of Microbiology, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran and Department of Medical Parasitology and Mycology/Invasive Fungi Research Center (IFRC), School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
3- Department of Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
4- Department of Medical Parasitology and Mycology/ Invasive Fungi Research Center (IFRC), School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Received: 19 Feb 2014, Accepted: 11 Jun 2014

Abstract

Background: Saprolegniasis is an important aquatic fungal disease that causes severe damages at different growth stages of aquatic animals. *Saprolegnia parasitica* has been identified as an important pathogen in aquaculture. This study was investigated the activity of antifungal methanolic extracts of *Foeniculum vulgare*, *Achillea millefolium*, *Satureja hortensis*, *Cinnamomum zeylanicum*, as well as *Artemisia annua* essential oil against *S. parasitica* in comparison with formalin.

Materials and Methods: In this descriptive study, *Saprolegnia parasitica* originated from rainbow trout's farm effluent. Phenotypic identification was performed and amplification of ITS rDNA region was adjusted by using of two general primers like ITS1 and ITS4, subsequently sequencing by use of internal primer were performed. The antifungal effects of the plants were investigated based on broth microdilution method and compared by formalin.

Results: The results of sequencing verified the obtained fungus is *S. parasitica*. In broth microdilution method, the essential herb *Artemisia* inhibited the growth of *S. parasitica* at a concentration of 128 µg/ml (MIC = 128 µg/ml). At the same concentration, however, it did not show any fungicidal activity (MFC ≥ 2048 µg/ml). Methanolic extracts of the plants fennel, yarrow, Savory, and cinnamon displayed no direct effects on *S. parasitica*

Conclusion: Based on the results obtained in the present study, *Artemisia* can be classified as a powerful antifungal essential plant. The essence of *Artemisia* performed more effectively compared to formalin for the growth inhibition of *S. parasitica*.

Keywords: Antifungal activity, ITS rDNA, Medicinal plants, *Saprolegnia parasitica*

*Corresponding Author:
Address: Department of Medical Parasitology and Mycology, Invasive Fungal Research Center (IFRC), School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.
Email: badalii@yahoo.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 17، شماره 5 (شماره پیاپی 86)، مرداد 1393، 69-60

بررسی اثرات ضد قارچی رازیانه ، بومادران ، مرزه، دارچین و آرتیمیزیا برعلیه *ساپرولگنیا پارازیتیکا* در شرایط آزمایشگاهی

فرید فیروزبخش[1]، سید محمد حسین افسریان[2]، سعیده هوشنگی[3]، حمید بدلی[4*]

1- استادیار، گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
2- مربی قارچ شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران و گروه قارچ شناسی و انگل شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ های مهاجم، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
3- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
4- استادیار، گروه قارچ شناسی و انگل شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ های مهاجم، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت:92/11/30 تاریخ پذیرش: 93/3/21

چکیده

زمینه و هدف: ساپرولگنیوز از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی آبزیان است که خسارات شدیدی را در مراحل مختلف رشد آبزیان، به صنعت آبزی پروری وارد می‌سازد و توسط قارچ آبزی *ساپرولگنیا پارازیتیکا* ایجاد می‌شود. این مطالعه با هدف بررسی اثرات ضد قارچی عصاره متانولی گیاهان رازیانه، بومادران، مرزه و دارچین و اسانس گیاه آرتیمیزیا برعلیه قارچ *ساپرولگنیا پارازیتیکا* در مقایسه با فرمالین انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی، *ساپرولگنیا پارازیتیکا* از آب خروجی سالن پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان جداسازی و خالص شد. پس از شناسایی فنوتیپیکی، ابتدا DNA ژنومی استخراج و ناحیه ژنی ITS rDNA توسط آغازگرهای ITS1 و ITS4 تکثیر و تعیین توالی گردید. اثرات ضد قارچی گیاهان دارویی ذکر شده با روش میکرودایلوشن براث بررسی و با فرمالین مقایسه شد.

یافته ها: نتایج حاصل از تعیین توالی، گونه *پارازیتیکا از جنس ساپرولگنیا* را تایید نمود. در روش میکرودایلوشن براث اسانس گیاه آرتیمیزیا باعث مهار رشد *ساپرولگنیا پارازیتیکا* شد(حداقل غلظت مهار کنندگی معادل 128 میکروگرم بر میلی لیتر). هرچند که با غلظت تعیین شده توان مهاری از خود نشان نداد(حداقل غلظت مهاری مساوی یا بیش از 2048 میکرگرم بر میلی لیتر). عصاره متانولی بقیه گیاهان در غلظت تعیین شده هیچ گونه اثر مستقیمی بر این قارچ نشان ندادند.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج، در مطالعه حاضر می‌توان اسانس گیاه آرتیمیزیا را جزء گیاهان دارای اثرات ضد قارچی قوی طبقه‌بندی نمود که نسبت به فرمالین اثر قوی‌تری را نشان داد. لذا با تحقیقات بیشتر بر ترکیبات اسانس گیاهان و با خالص سازی و کشف مکانیسم اثر آن و بهینه سازی روش‌های استخراج مواد موثره می‌توان به نتایج مشابهی مانند داروهای شیمیایی که اثرات جانبی بسیار بدی را دارند رسید.

واژگان کلیدی: فعالیت ضد قارچی، ITSrDNA، گیاهان دارویی، ساپرولگنیا پارازیتیکا

***نویسنده مسئول:** ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ های مهاجم

Email: badalii@yahoo.com

مقدمه

جنس *ساپرولگنیا (Saprolegnia)* متعلق به گروه کپک‌های آبی و جزء خانواده *ساپرولگنیاسه* محسوب می‌شود که در آب‌های شیرین گسترش دارند و به عنوان مهم‌ترین گروه قارچی موثر در ماهیان پرورشی و وحشی شناخته شده‌اند(1). این قارچ به طور طبیعی در آب تازه و خاک با رطوبت بالا یافت می‌شود و باعث ایجاد بیماری ساپرولگنیوز می‌شود. بیشتر گونه‌های این خانواده روی اعضاء مرده جانوری رشد و نمو می‌کنند. . عوامل متعددی زمینه‌ساز بروز و تداوم ساپرولگنیوز در ماهیان می‌باشند که شامل بدی تغذیه، حضور مواد سمی در آب، صدمه به پوست، باله‌ها و آبشش‌ها بر اثر انگل‌های خارجی، زخم‌های فیزیکی، استرس‌های فیزیکی نظیر کاهش درجه حرارت، افزایش یا کاهشPH آب می‌باشند. سرعت رشد قارچ در درجه حرارت 15 - 5 درجهٔ سانتی‌گراد آهسته است ولی در حرارت 26 - 18 درجهٔ سانتی‌گراد بسیار سریع رشد می‌کند. علائم ابتلا در ماهیان شامل حضور توده پنبه مانند سفید تا خاکستری و گاهی اوقات قهوه‌ای رنگ بر روی پوست، باله‌ها، آبشش‌ها یا چشم ماهی می‌باشد. هر چند که تخم‌های ماهیان نیز در برابر هجوم ساپرولگنیا در امان نیستند. از سال 1930تاکنون مالاشیت‌گرین به عنوان یک داروی قارچ‌کش بسیار مؤثر در صنعت آبزی پروری مورد استفاده قرار گرفته است و علت استفاده فراوان از آن حلالیت بالای این ماده در آب و تاثیر زیاد آن بر *ساپرولگنیا* است(2، 3). متاسفانه پتانسیل تراتوژنیک یا خواص موتوژنیک مالاشیت گرین استفاده از آن را ممنوع کرده است. بعد از ممنوع شدن استفاده از مالاشیت گرین، مواد شیمیایی دیگری مانند فرمالین توسط اداره امور غذا و داروی آمریکا تهیه و جایگزین شد که با دوز 100-50 میلی‌گرم در لیتر به مدت 30 تا 90 دقیقه مورد استفاده قرار می گیرد. کلرید سدیم از دیگر ترکیبات موثر است که به میزان 25-10 گرم در لیتر به مدت 20-10 دقیقه به صورت حمام استفاده (4). هرچند که امروزه تنها تعداد محدودی از ترکیبات شیمیایی ظرفیت ضد قارچی از خود نشان داده‌اند ولی تاکنون ترکیب گیاهی به موثری مالاشیت گرین یافت نشده است. در دهه‌های اخیر، عفونت‌های ناشی از قارچ *ساپرولگنیا* افزایش چشم‌گیری داشته است. محدودیت در درمان بیماری‌های قارچی از قبیل تنوع کم و گران بودن داروهای ضدقارچی، عوارض جانبی آنها و نیز مقاومت دارویی یا کاهش حساسیت قارچ‌ها به این داروها موجب شده تا توجه پژوهش‌گران به جست جو در رابطه با داروهای ضدقارچی جدید به خصوص گیاهان دارویی معطوف شود. از این رو بسیاری از متخصصین به دلیل اهمیت گیاهان به عنوان مهم‌ترین منابع درمان بیماری‌ها راه مناسب را استفاده از گیاهان دارویی می‌دانند. رازیانه با نام علمی *Foeniculum vulgare* یکی از مهم‌ترین و قدیمی‌ترین گیاهان دارویی ایران است که به صورت زراعی و وحشی یافت می‌شود. در خصوص اثرات ضد قارچی این گیاه تحقیقات فراوانی انجام شده است. ویلسون و همکاران در سال 1997 با بررسی اثر ضد قارچی رازیانه علیه قارچ *بوتریتیس سینه رآ (Botrytis cinerea)* آن را به عنوان یک داروی طبیعی جهت مهار رشد این قارچ معرفی نمودند(5). هم‌چنین سینگ و همکاران با بررسی خواص شیمیایی ترکیبات رازیانه و بررسی خواص ضد قارچی این گیاه نشان دادند که این گیاه دارای خواص ضد قارچی علیه *آسپرژیلوس (Aspergillus)* و *فوزاریوم (Fusarium)* می‌باشد(6). بومادران با نام علمی *Achillea millefolium* گیاهی مقاوم است که به طور طبیعی در مناطق مختلف اروپا، آمریکای شمالی و آسیا می‌روید. نام دیگر این گیاه معطر علف هزار برگ می‌باشد. کاندن و همکاران با بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس و عصاره‌های متانولی و آبی گیاه بومادران در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند که عصاره متانولی و اسانس این گیاه اثر مهارکنندگی قوی بر علیه چند قارچ از جمله *کاندیدا آلبیکنس (Candida albicans)* داشته است در حالی که عصاره آبی این گیاه هیچ اثری از خود نشان نداد(7). مرزه با نام علمی*Satureia hortensis* گیاهی علفی، یک ساله و دارای ساقه‌های منشعب با طول حداکثر 30 سانتی‌متر است. پرورش این گیاه به عنوان سبزی

خوراکی بوده و استفاده خشک آن در ادویه جات در نقاط مختلف ایران رایج است. اسکوسیبوسیچ و همکاران با بررسی اثر ضد قارچی اسانس و عصاره متانولی گیاه مرزه بر علیه *آسپرژیلوس فلاووس (Aspergillus flavus)* نشان دادند که استفاده از اسانس و عصاره این گیاه می‌تواند رشد این قارچ را تا حد قابل توجهی کنترل کنند(8). گولوس و همکاران نیز با بررسی اثرات ضد میکروبی و ضد قارچی و آنتی اکسیدانی اسانس و عصاره متانولی گیاه مرزه بر روی 15 گونه قارچی و 23 گونه باکتریایی نشان دادند که عصاره متانولی و اسانس گیاه مرزه اثرات ممانعت کننده بالایی دارند(9). دارچین با نام علمی *Cinnamomum zeylanicum* درختی همیشه سبز به ارتفاع 5 تا 7 متر است که از تمام قسمت‌های آن بویی مطبوع استشمام می‌شود. کوآله و همکاران با بررسی گیاه دارچین علیه *کاندیدا - آلبیکنس* اثر ضد قارچی این گیاه را نشان دادند(10). راناسینگه و همکاران نیز با بررسی اثر ضد قارچی گیاه دارچین علیه تعدادی قارچ از جمله *فوزاریوم* نشان دادند که این گیاه می‌تواند باعث مهار رشد قارچ‌های مورد آزمایش شود(11). مطالعه‌ای که چنگ و همکاران در سال 2006 انجام دادند اثرات ضد قارچی دارچین را ثابت کردند(12). هم‌چنین آرتمیزیا با نام علمی *Artemisia annua* به نام محلی گندواش معروف است. این گیاه یک علف معمولی است که در سراسر دنیا وجود دارد. خاستگاه این علف در اروپا و آسیا می‌باشد. این گیاه گل‌هایی به رنگ زرد روشن و بویی شبیه کافور دارد(13). در سال 1971 دانشمندان به این نتیجه رسیدند که عصاره این گیاه در نمونه‌های اولیه آزمایش دارای خاصیت ضد مالاریا است. هم‌چنین درمتون پزشکی چین باستان مربوط به 150 سال قبل از میلاد به استفاده آرتمیزیا برای درمان بواسیر اشاره شده است. در سال 1972 ماده موثر و فعال این گیاه یعنی آرتمیزینین جدا شد و ساختار شیمیایی آن تشریح شد. این ماده در ساختمان رشته‌ای غده مانند برگ‌ها، ساقه‌ها و گل‌آذین وجود دارد و در سرتاسر گیاه پخش می‌شود(14). هم‌چنین مطالعات نشان می‌دهد که *آرتمیزینین* می‌تواند انگل و باکتری را از بین ببرد و این گیاه خواص ضد سرطانی نیز دارد(15). لذا با توجه به تایید اثرات ضد قارچی گیاهان مورد مطالعه (رازیانه، بومادران، مرزه و دارچین) و عدم مطالعه اثرات این گیاهان بر قارچ‌های آبزیان تا کنون، این طرح با هدف بررسی اثرات ضد قارچی گیاهان مورد نظر و تعیین حداقل غلظت بازدارنده (Minimum Inhibitor Concentration-MIC) و حداقل غلظت کشنده (Minimum fungicidal Concentration-MFC) آنها علیه قارچ *ساپرولگنیا پارازیتیکا* (*Saprolegnia parasitica*) در شرایط آزمایشگاهی به روش میکرودیلوشن انجام می‌شود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی، در ابتدا جهت جداسازی *ساپرولگنیا پارازیتیکا* از روش طعمه‌گذاری در نمونه‌های آب خروجی ونیروهای پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان واقع در گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری استفاده شد. پس از جمع‌آوری، نمونه‌ها در محیط کشت YGC که شامل مخمر، گلوکز و کلرامفنیکل می‌باشد به مدت 5 روز در دمای 25 درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. کلنی‌های ایجاد شده‌ای که از نظر ماکروسکوپی و میکروسکوپی به جنس *ساپرولگنیا* شباهت داشتند، جداسازی و خالص شدند. پس از کشت خالص از هر ایزوله، جهت استخراج DNA ژنومی از روش فنل-کلروفرم و گلوله‌های شیشه‌ای، استفاده شد(16). سپس با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز جهت تکثیر ناحیه ITS-rDNA ازآغاز گرهای ITS1 و ITS4 استفاده شد که این آغازگرها بخشی از ناحیه 3 زیر واحد کوچک DNAی ریبوزومی (SSU-rDNA)، ناحیه ITS1 و 5.8S، ITS2 و بخشی از ناحیه ۵َ زیر واحد بزرگ DNAی ریبوزومی (LSU-rDNA) را با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر می‌کنند(17). تکثیر نواحی ژنومی مورد نظر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (GenAmp PCR System 9700) و با اعمال حرارت 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه جهت واسرشت اولیه و به دنبال آن 35 چرخه شامل

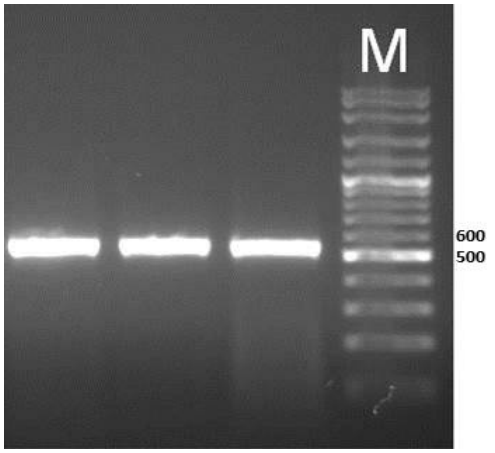
94 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، 52 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه و 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 1 دقیقه و در نهایت یک چرخه 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 7 دقیقه جهت گسترش نهایی انجام شد. پس از آن تعیین توالی نوکلئوتیدی قطعات تکثیر شده با استفاده از کیت تجاری (BigDye terminator v.3.1) مطابق دستورالعمل سازنده کیت (بایونر - کره جنوبی) انجام گردید و توالی‌های DNA به دست آمده با استفاده از نرم افزار Blast 2.0 آنالیز و گونه‌ها به وسیله جستجوی اطلاعات در سایت www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST و ارزیابی بیشترین hit تعیین شدند. تطبیق توالی‌ها با استفاده از برنامه CLUSTAL – W نسخه 1/83 صورت گرفت. جهت تهیه عصاره متانولی گیاهان دارویی (رازیانه، بومادران، مرزه و دارچین)، پس از جمع‌آوری این گیاهان، 100گرم از هر گیاه آسیاب شده و به نسبت 1 به 10 در متانول ریخته و به مدت 24-72 ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. سپس3 مرتبه با کاغذ واتمن شماره 1 فیلتر و به وسیله دستگاه روتاری غلیظ شد و در نهایت به وسیله دستگاه فریز درایر خشک و به صورت پودر ذخیره شد. برای تهیه اسانس گیاه آرتیمیزیا که از شهر ساری جمع‌آوری شده بود سرشاخه‌های گلدار آن در محلی دور از تابش مستقیم آفتاب خشک و پودر گردید و به روش تقطیر با بخار آب و با استفاده از دستگاه کلونجر به مدت 3 ساعت اسانس‌گیری انجام شد(18). برای ارزیابی حساسیت دارویی *ساپرولگنیا پارازیتیکای* جداشده از مخازن آبی برعلیه هر یک از گیاهان مورد مطالعه یعنی دارچین، مرزه، رازیانه، بومادران، آرتمیزیا و فرمالین به عنوان کنترل، از پروتوکل CLSI M-38A-2 با روش میکرودایلوشن استفاده گردید(19). در این تحقیق محلول دی متیل سولفوکساید (DMSO) به عنوان حلال عصاره‌های متانولی در نظر گرفته شد. محلول‌های استوک با غلظت 204800 میکروگرم بر میلی لیتر از هر یک از عصاره‌های فوق با استفاده از DMSO به عنوان حلال (داروهای فوق غیر محلول در آب می‌باشد) تهیه گردید. از محیط کشت RPMI 1640 (باگلوتامین و فنل رد و بدون بی‌کربنات) جهت رقیق سازی محلول‌های استوک دارویی استفاده گردید. برای تهیه سوسپانسیون تلقیحی، ابتدا *ساپرولگنیا پارازیتیکای* مورد مطالعه بر روی محیط پوتیتو دکستروز آگار کشت و در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به مدت 72 ساعت جهت اسپور زایی انکوبه شدند و از هر یک از نمونه‌های رشد یافته سوسپانسیون نهایی با غلظت $10^4\times$ 5-1 براساس پروتکل CLSI M38A2 تهیه گردید. میکروپلیت‌های 96 خانه‌ای در دمای 35 درجه سانتی‌گراد به مدت 48-72 ساعت انکوبه شدند. تعیین میزان MIC یا حداقل غلظت مهاری از داروها که بتواند بعد از 48 ساعت انکوباسیون مقدار معینی از *ساپرولگنیا پارازیتیکا* را ازبین ببرد که در آن رشد قابل مشاهده‌ای نداشته باشد، به روش چشمی با استفاده از آینه محدب به راحتی ممکن گردید.

یافته ها

در آزمون طعمه گذاری از دانه تخم آفتاب گردان و نمونه آب خروجی و نیروهای حاوی ماهی قزل آلای رنگین کمان استفاده گردید. پس از 2 هفته انکوباسیون آب و نیرو در دمای 25 درجه سانتی‌گراد، با توجه به حضور اسپور قارچ‌های مختلف آبزی در تانک‌های پرورشی، تعداد مختلفی قارچ آبزی مشاهده گردید. از بین کلنی قارچ‌های مشاهده شده سه نمونه قارچ جداسازی شد که نتایج حاصل از مشاهدات میکروسکوپی و ماکروسکوپی بر روی کلنی‌های رشد کرده در محیط کشت پس از 5 روز انکوباسیون در 25 درجه سانتی‌گراد و مقایسه مورفولوژی نمونه‌ها با کلید شناسایی، نشان می‌داد که هر 5 نمونه احتمالا از خانواده *ساپرولگنیاسه* می‌باشد(شکل 1).

شکل 1: کلنی‌های خالص *ساپرولگنیا پارازتیکا* در محیط کشت YGC

پس از تعیین جنس قارچ با استفاده از روش‌های فنوتیپی (موفولوژی)، جهت تعیین گونه از روش‌های ژنوتیپی استفاده گردید. ابتدا آزمایش تقویت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR amplification) انجام شد که به علت اهمیت توالی ناحیه ITS در تشخیص قارچ‌ها و حفاظت شده بودن این توالی که مربوط به ژن rDNA است با استفاده از آغازگرهای مربوط به این توالی یعنی ITS1 و ITS4 تکثیر انجام و قطعه‌ای حدود 550 جفت باز تکثیر گردید(شکل 2).



شکل 2: الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگاروز

جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی، محصول PCR از طریق شرکت واسطه به کشور کره جنوبی ارسال شد. پس از آن تعیین توالی به دست آمده به بانک ژنی (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) عرضه و با شماره KC992717 ثبت گردید. پس از تعیین گونه قارچ *ساپرولگنیا پارازتیکا*، تست حساسیت به عصاره‌های گیاهی مورد نظر در این مطالعه با استفاده از روش استاندارد CLSI M38A2 در شرایط برون تنی انجام گردید. در میکروپلیت 96 خانه‌ای، خانه شماره 1 به عنوان کنترل رشد منفی و خانه شماره 12 به عنوان کنترل رشد مثبت در نظر گرفته شد. در تست میکرودایلوشن براث 2048 میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان بالاترین غلظت و 4 میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان کمترین غلظت در نظر گرفته شد. عصاره‌های الکلی گیاهان دارچین، مرزه، رازیانه و بومادران با استفاده از این روش، حتی در بالاترین غلظت یعنی 2048 میکروگرم بر میلی لیتر قادر به مهار رشد قارچ *ساپرولگنیا پارازتیکا* نبودند و MIC مساوی یا بیش از 2048 میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. در حالی که اسانس گیاه آرتیمیزیا با غلظت 128 میکروگرم بر میلی لیتر توانست باعث مهار رشد قارچ شود. هرچند که در بازه غلظت تعیین شده توان قارچ کشی از خود نشان نداد(MFC معادل یا بیش از 2048 میکروگرم بر میلی لیتر). درصورتی که توان مهار رشد قارچ این اسانس از توان مهار رشد داروی فرمالین بیشتر بود(MIC معادل 256 میکروگرم بر میلی لیتر). (جدول 1).

جدول 1. میزان MIC و MFC عصاره های الکلی گیاهان دارچین، مرزه، رازیانه و بومادران، اسانس آرتیمیزیا و فرمالین

نام علمی	نام فارسی رایج	MIC µg/ml	MFC µg/ml
Achillea milefolium	بومادران	≥2048	-
Satureia hortensis	مرزه کوهی	≥2048	-
Cinnamomum zeylanicum	دارچین	≥2048	-
Foeniculum vulgare	رازیانه	≥2048	-
Artemisia annua	آرتمیزیا	128	≥2048
formalin	فرمالین	256	256

نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت مواد موثره می‌توان باعث مهار رشد قارچ *ساپرولگنیا پارازتیکا* در شرایط آزمایشگاهی شد و احتمالا برای اثر قارچ کشی گیاهان دارویی نیاز به خالص سازی مواد موثره این گیاهان دارویی می‌باشد.

بحث

در مطالعه حاضر اثرات قارچ کشی عصاره متانولی 4 گیاه دارچین، مرزه، بومادران و رازیانه مورد بررسی قرار گرفت که در دوز کمتر از 2048 میکروگرم بر میلی لیتر هیچ اثر مستقیمی برعلیه *ساپرولگنیا پارازیتیکا* نشان داده نشد. در حالی که اسانس گیاه آرتیمیزیا در غلظت 128 میکروگرم بر میلی لیتر مانع رشد *ساپرولگنیا پارازیتیکا* شد اما قدرت کشندگی در غلظت کمتر از 2048 میکروگرم بر میلی لیتر را نداشت. این مقاومت احتمالا به دلیل تفاوت در ساختار دیوار قارچ می‌باشد که مواد موثره اسانس توانایی تخریب آن را ندارند و تنها مانع از گسترش آن می‌شوند. مهم‌ترین ماده موثره گیاهان دارچین، مرزه، رازیانه و بومادران به ترتیب آلدئید سینامیک، تیمول، آنتول و ترکیباتی از فلاوونوئید می‌باشد. با توجه به اثبات اثرات ضد قارچی بالای این مواد موثره بر سایر قارچ ها و اثرات مهاری نسبتا پایین بر علیه *ساپرولگنیا پارازیتیکا* احتمال می‌رود دلیل آن متفاوت بودن ساختار *ساپرولگنیا پارازیتیکا* با سایر قارچ‌ها باشد و نتایج نشان می‌دهد که به غلظت بیشتری از مواد موثره جهت مهار رشد *ساپرولگنیا* نیاز است. در دهه‌های اخیر، عفونت‌های ناشی از قارچ فرصت طلب *ساپرولگنیا* از افزایش چشم‌گیری در میزان بروز بیماری برخوردار شده است.

اوومایست‌ها *(Oomycetes)* گروهی از قارچ‌های فرصت طلب رشته‌ای‌اند که بر روی ماهی‌های آسیب دیده یا دارای استرس و یاآلوده با سایر بیماری‌ها رشد می‌کنند(20). در خانواده *ساپرولگنیاسه* جنس *ساپرولگنیا* گونه *پارازیتیکا* عامل بخش قابل توجهی از عفونت قارچی تخم و ماهی است و اعضای این گروه به طور معمول به عنوان عامل ثانویه آلودگی ناشی از وضعیتی مانند آلودگی باکتریایی، شرایط پرورش ضعیف و هجوم انگل شناخته می‌شود(21). اوومایست‌ها از لحاظ اقتصادی مهم‌ترین عامل بیماری قارچی آزادماهیان و سایر ماهیان استخوانی هستند. توالی‌های مولکولی، بیوشیمی و ساختاری اوومایست‌ها نشان داده است که بیشتر دارای ارتباط بنیادین با کرومیستا (Chromista) و جلبک کروموفیت و سایر تک یاختگان هستند تا قارچ‌های حقیقی(22). محدودیت‌هایی در درمان بیماری‌های قارچی از قبیل تعداد کم و گران بودن داروهای ضدقارچی، عوارض جانبی آنها و نیز مقاومت دارویی یا کاهش حساسیت قارچ‌ها به این داروها موجب شده تا توجه پژوهش‌گران به جست جو در رابطه با داروهای ضد قارچی جدید به خصوص گیاهان دارویی معطوف شود(23). از این رو بسیاری از متخصصین به دلیل اهمیت گیاهان به عنوان مهم‌ترین منابع درمان بیماری‌ها راه مناسب را استفاده از گیاهان دارویی می‌دانند. با توجه به این مسئله در مطالعه‌ای اثر آنتی‌اکسیدانی 3 نوع عصاره اتریک، متانولیک و آبی دارچین به ترتیب 68، 95 و 87/5 درصد تعیین شده است که با توجه به این نتایج می‌توان از عصاره متانولی دارچین به عنوان یک داروی گیاهی مطلوب استفاده نمود. در مطالعات دیگری نیز وجود مواد فنولیک و غیر فنلیک را در گیاه رازیانه ثابت کردند و نشان دادند که قسمت اعظم ماده موثره در بذر رازیانه قرار دارد و مهم‌ترین ماده موثره آن آنتول می‌باشد(24). هرچند که تاکنون چندین مطالعه در مورد اثرات ضد قارچی و ضد میکروبی گیاهان دارویی مثل دارچین، رازیانه، مرزه و بومادران انجام شده است اما در خصوص اثرات گیاهان دارویی فوق بر علیه *ساپرولگنیا پارازیتیکا* مطالعه‌ای صورت نگرفته است. از جمله این مطالعات می‌توان به تحقیق اوزکان و همکاران در سال 2006 اشاره نمود که در طی این تحقیق اثرات ضد قارچی رازیانه بر قارچ *فوزاریوم اکسی پروم (Fusarium oxysporum)* و *آلترناریا آلترناتا (Alternaria alternata)* و *رایزوکتونیا سولانی (Rhizoketonia solani)* مورد بررسی قرار گرفته و مشخص گردید که

غلظت ppm 40 از اسانس رازیانه مانع رشد *آلترناریا* شده در صورتی که غلظت ppm 10 فاقد چنین اثری بوده است و نتیجه گرفتند که اثرات ضد قارچی رازیانه وابسته به دوز است(25). هم‌چنین در مطالعه دیگری اثر دارچین، مرزه و بومادران بر روی *کاندیدا آلبیکنس* بررسی شد که در این مطالعه اثر این گیاهان مقایسه شد و نتیجه گرفتند که دارچین دارای اثر قوی تری نسبت به 2 گیاه دیگر است(10). هم‌چنین مطالعات دیگر نشان داده است که اسانس‌های گیاهی برعلیه قارچ‌ها دارای اثر مهارکنندگی بیشتری نسبت به باکتری‌ها و اثر باکتری کشی قوی‌تری نسبت به قارچ کشی دارند(23).

آلیجیانیس و همکاران در تحقیقات خود بر روی مواد گیاهی پیشنهاد دادند که بر اساس MIC به دست آمده از اثرات ضد میکروبی گیاهان می‌توان آنها را به 3 دسته تقسیم‌بندی کرد به طوری که گیاهانی با MIC کمتر از 500 میکروگرم بر میلی لیتر دارای اثر ممانعت از رشد قوی، گیاهان با MIC بین 600 -1500 میکروگرم بر میلی لیتر دارای اثر ممانعت از رشد متوسط و گیاهان دارای MIC بیش از 1600 میکروگرم بر میلی لیتر دارای اثر ممانعت از رشد ضعیف طبقه‌بندی می‌شوند(26). براین اساس و با توجه به نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر می‌توان اسانس گیاه آرتیمیزیا را جزء گیاهان دارای اثرات ضد قارچی قوی طبقه‌بندی نمود(جدول 1).

نتیجه گیری

اثر مهاری اسانس آرتیمیزیا حتی از داروی فرمالین نیز در مهار رشد قارچ *ساپرولگنیا* قوی‌تر عمل نموده اگرچه اثرات قارچ کشی داروی شیمیایی فرمالین نسبت به اسانس و عصاره‌های گیاهی قوی‌تر ارزیابی شد اما به این نکته باید توجه داشت که یکی از دلایل قوی‌تر بودن داروهای شیمیایی خالص بودن آنهاست. بنابراین با تحقیقات بیشتر روی ترکیبات اسانس گیاهان و مواد موثره آن و با خالص سازی و کشف مکانیسم اثر آن و بهینه سازی روش‌های استخراج مواد موثره می‌توان به نتایج مشابهی مانند داروهای شیمیایی رسید. علاوه بر این کم خطر و در دسترس بودن گیاهان دارویی، ارزان و به صرفه بودن هزینه‌های استخراج مواد موثره آنها نسبت به مواد شیمیایی از مزیت‌های آن به شمار می‌رود.

تشکر و قدردانی

در پایان از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به دلیل حمایت مالی این طرح تحقیقاتی تشکر و قدردانی می‌گردد. هم‌چنین از گروه شیلات دانشکده علوم دامی و شیلات ساری و گروه قارچ شناسی و انگل شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ‌های تهاجمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Willoughby L. Fungi and fish diseases: Pisces Press; 1994.
2. Sudova E, Machova J, Svobodova Z, Vesely T. Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: a review. Veterinarni Medicina- praha. 2007;52(12):527-8.
3. Alderman D, Clifton-Hadley R. Malachite green: a pharmacokinetic study in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum). Journal of Fish Diseases. 1993;16(4):297-311.
4. Howe GE, Rach JJ, Olson JJ. Method for inducing saprolegniasis in channel catfish. Journal of Aquatic Animal Health. 1998; 10(1): 62-8.
5. Wilson C, Solar J, El Ghaouth A, Wisniewski M. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against Botrytis cinerea. Plant disease. 1997; 81(2):204-10.
6. Singh G, Maurya S, De Lampasona M, Catalan C. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of Foeniculum vulgare volatile oil and its acetone extract. Food control. 2006; 17(9):745-52.
7. Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sökmen A, et al. Antioxidant and

antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of Achillea millefolium subsp. millefolium Afan.(Asteraceae). Journal of Ethnopharmacology. 2003;87(2):215-20.
8. Skočibušić M, Bezić N, Dunkić V. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from Satureja subspicata Vis. growing in Croatia. Food chemistry. 2006;96(1):20-8.
9. Güllüce M, Sökmen M, Daferera D, Agar G, Özkan H, Kartal N, et al. In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of Satureja hortensis L. Journal of Agricultural and food chemistry. 2003; 51(14):3958-65.
10. Quale JM, Landman D, Zaman MM, Bumey S, Sathe SS. In vitro activity of Cinnamomum zeylanicum against azole resistant and sensitive Candida species and a pilot study of cinnamon for oral candidiasis. The American journal of Chinese medicine. 1996; 24(02):103-9.
11. Ranasinghe L, Jayawardena B, Abeywickrama K. Fungicidal activity of essential oils of Cinnamomum zeylanicum (L.) and Syzygium aromaticum (L.) Merr et LM Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. Letters in Applied Microbiology. 2002;35(3):208-11.
12. Cheng S-S, Liu J-Y, Hsui Y-R, Chang S-T. Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (Cinnamomum osmophloeum). Bioresource technology. 2006;97(2):306-12.
13. Zheng G-Q. Cytotoxic terpenoids and flavonoids from Artemisia annua. Planta medica. 1994;60(1):54-7.
14. Willcox M, Rasoanaivo P, Sharma V, Bodeker G. Comment on: Randomized controlled trial of a traditional preparation of Artemisia annua L.(Annual Wormwood) in the treatment of malaria. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2004; 98(12):755-6.
15. Yamey G. African heads of state promise action against malaria. BMJ: British Medical Journal. 2000;320(7244):1228-9.
16. Yamada Y, Makimura K, Merhendi H, Ueda K, Nishiyama Y, Yamaguchi H, et al. Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. Japanese journal of infectious diseases. 2002; 55(4):122-5.
17. Leclerc M, Guillot J, Deville M. Taxonomic and phylogenetic analysis of Saprolegniaceae (Oomycetes) inferred from LSU rDNA and ITS sequence comparisons. Antonie van Leeuwenhoek. 2000; 77(4):369-77.
18. Hamza OJ, van den Bout-van den Beukel CJ, Matee MI, Moshi MJ, Mikx FH, Selemani HO, et al. Antifungal activity of some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections. Journal of Ethnopharmacology. 2006; 108(1):124-32.
19. Rex JH. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: Approved Standard: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
20. Pickering A, Pottinger T. Cortisol can increase the susceptibility of brown trout, Salmo trutta L., to disease without reducing the white blood cell count. Journal of fish biology. 1985; 27(5):611-9.
21. Willoughby L, Pickering A, Johnson HG. Polycell-gel assay of water for spores of Saprolegniaceae (fungi), especially those of the Saprolegnia pathogen of fish. Hydrobiologia. 1984;114(3):237-48.
22. Walser CA, Phelps RP. The use of formalin and iodine to control Saprolegnia infections on channel catfish, Ictalurus punctatus, eggs. Journal of Applied Aquaculture. 1994;3(3-4): 269-78.
23. Hobbs C. Pocket guide to herbal medicine: Thieme; 2004.

24. Cherng J-M, Chiang W, Chiang L-C. Immunomodulatory activities of common vegetables and spices of Umbelliferae and its related coumarins and flavonoids. Food chemistry. 2008;106(3):944-50.
25. Ozcan MM, Chalchat J-C, Arslan D, Ates A, Unver A. Comparative essential oil composition and antifungal effect of bitter fennel (Foeniculum vulgare ssp. piperitum) fruit oils obtained during different vegetation. Journal of medicinal food. 2006;9(4):552-61.
26. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species. Journal of Agricultural and food chemistry. 2001;49(9):4168-70.