مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال یازدهم، شماره سوم، پیاپی چهل و سوم، زمستان ۱۴۰۱ (۶۶-۵۵)

DOI: 10.30473/eab.2023.62409.1863

مقاله پژوهشی:

ارزیابی فعالیت ضدقارچی و ضدباکتریایی اسانس‌های کاکوتی کوهی، آویشن باغی و رزماری علیه برخی از پاتوژن‌های قارچی و باکتریایی آبزیان

فریدون حسنی[1*]، طاهره عبیاوی[1]، علی طاهری میرقائد[2]، رحیم پیغان[3]، مجتبی علیشاهی[3]

۱. دکتری، بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۲. استاد، گروه بهداشت و بیماری آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۳. استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۵ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۸)

چکیده

استفاده گسترده و طولانی‌مدت از ترکیبات شیمیایی باعث می‌شود میکروارگانیسم‌ها با مواد ضدمیکروبی که علیه آن‌ها به‌کار برده می‌شود، توانایی سازگاری پیداکرده و از تأثیر داروها کاسته و در مقابل میکروب‌ها مقاوم شوند. اسانس‌های گیاهی به‌عنوان ترکیبات ضدمیکروبی و ضدقارچی در شاخه‌های داروشناسی، میکروب‌شناسی و پزشکی موردمطالعه قرار گرفته‌اند. در این پژوهش تأثیر اسانس گیاهان کاکوتی کوهی (*Ziziphora cliniopodiodes*)، آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) و رزماری (*Salvia rosmarinus*) علیه پاتوژن‌های قارچی شامل *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس فلاووس*، گونه *ساپرولگنیا*،گونه فوزاریوم و باکتریایی برای *استرپتوکوکوس اینیایی*، *استرپتوکوکوس میتیس*، *لاکتوکوکوس گارویه*، *یرسینیا راکری* و *آئروموناس هیدروفیلا* مورد مطالعه قرار گرفت. ارزیابی فعالیت ضدقارچی و ضدباکتریایی از روش رقت‌سازی در لوله برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی‌رشد (MIC)، حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) و قارچ‌کشی (MFC) استفاده شد. براساس نتایج، در بررسی MIC و MFC بیش‌ترین خاصیت ضدقارچی مربوط به اسانس آویشن باغی علیه *آسپرژیلوس فومیگاتوس* (۰/۰۱۵ ± ۰/۰۲۳ و ۰/۰۳±۰/۰٤٦ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) و کم‌ترین خاصیت قارچ‌کشی مربوط به اسانس رزماری علیه *آسپرژیلوس نایجر* (۰/۷۲±۱/٦٦ و۱/٤٤±۳/۳۳) به دست آمد و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). برطبق نتایج حاصل از بررسی MIC و MBC کم‌ترین غلظت به‌دست‌آمده علیه باکتری‌ها مربوط به اسانس کاکوتی کوهی علیه *استرپتوکوکوس میتیس* (۰/۰۰۵ ± ۰/۰۱٦ و ۰/۰۱۱ ±۰/۰۳۳ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) به دست آمد که با مقادیر اسانس رزماری اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). براساس این مطالعه اسانس‌های کاکوتی کوهی، آویشن باغی و رزماری قابلیت استفاده جهت کنترل و پیش‌گیری از بیماری‌های قارچی و باکتریایی آبزیان را دارا می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: آبزیان، باکتری، پاتوژن، قارچ، گیاهان دارویی.

Evaluation of Antifungal and Antibacterial Activity of Essential Oils of *Ziziphora clinopodioides*, *Thymus vulgaris* and *Salvia rosmarinus* to Some Fungal and Bacterial Pathogens of Aquatic Animals

Fredun Hassani[1*], Tahere Abyavi[1], Ali Taheri Mirghaed[2], Rahim Payghan[3], Mojtaba Alishahi[3]

1. Ph.D. of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.
2. Professor, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
3. Professor, Department of clinical Sciences, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.

(Received: Jan. 05, 2022 - Accepted: Mar. 19, 2023)

Abstract

Extensive and long-term use of chemical compounds causes microorganisms ability to adapt with the antimicrobial agents used against them, reduced the effect of drugs, and in return make microbes resistant. Plant essential oils have been studied as antimicrobial and antifungal compounds in the pharmacology, microbiology and medicine fields. In this study, the essential oils of *Ziziphora cliniopodiodes*, *Thymus vulgaris* and *Salvia rosmarinus* to fungal pathogens including *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavusus*, *Saprolegnia* spp., *Fusarium* spp., and bacteria pathogens including *Streptococcus mitis*, *Lactococcus Garvieae*, *Yersinia ruckeri* and *Aeromonas hydrophila* were examined. Evaluation of antifungal and antibacterial activity by Tube dilution method used for determine the minimum growth inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and fungicide (MFC). Based on the results of MIC and MFC, the highest antifungal properties were obtained for thyme essential oils to *Aspergillus fumigatus* (0.023 ± 0.015 and 0.046±0.03 µl/ml) and the lowest fungicidal property of rosemary essential oil against Aspergillus niger (1.66±0.72 and 3.33±1.44) were obtained and there was a significant difference with other treatments (P<0.05). According to the results of MIC and MBC, the lowest concentrations obtained against bacteria were related to the essential oil of *Z. clinopodioides* against *Streptococcus mitis* (0.016±0.005 and 0.033±0.011 µl/ml), which were obtained with essential oil of rosemary was significantly different (P<0.05). According to this study, essential oils of *Z. clinopodioides*, thyme and rosemary can be used to control and prevent fungal and bacterial diseases of Aquatic animals.

Keywords: Aquatic animals, Bacteria, Fungi, Medical herbs, Pathogen.

* نویسندهٔ مسئول: فریدون حسنی
Email: Fredunhassani@yahoo.com

مقدمه

در دهه‌های گذشته استفاده گسترده آنتی‌بیوتیک‌هادر درمان عفونت‌های انسانی، بیماری‌های دامی، کشاورزی و شیلات سبب افزایش حضور این مواد در محیطزیست و درنتیجه آن مقاوم شدن برخی از باکتری‌ها به‌ویژه باکتری‌های گرم منفی به آن‌ها شده است. هم‌چنین گسترش آنتی‌بیوتیک‌ها باعث ایجاد باکتری‌هایی با چندین مقاومت شده که سبب آلودگی مواد غذایی و در نتیجه ایجاد عفونت‌های مختلف در مصرف‌کننده می‌شود (Matyar *et al*., 2004). اسانس‌های گیاهی به‌عنوان ترکیبات ضدمیکروبی و ضدقارچی در شاخه‌های داروشناسی، میکروب‌شناسی و پزشکی موردمطالعه قرار گرفته‌اند. فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها به‌دلیل وجود ترکیبات ترپنوئیدی و فنلی می‌باشد (Dufour *et al*., 2003). کاکوتی کوهی با نام علمی *Ziziphora clinopodioides* متعلق به خانواده Ziziphora و خانواده Lamiaceae، یک گیاه چندساله است. خانواده Lamiaceae در ایران شامل چند صد گونه و در ۴۹ جنس پراکنده هستند. توزیع جغرافیایی کاکوتی در جهان، از شبه‌جزیره شرقی بالکان، جنوب‌شرقی آسیا و از آسیای مرکزی به کوه‌های پامیر–آلای و هیمالیا (ایران، عراق، بخش‌های مرکزی و شرقی ترکیه) و آفریقا شامل می‌شود (Baser *et al*., 1991). آویشن یک گیاه شناخته‌شده با ویژگی‌های معطر است که اغلب به‌عنوان یک ادویه از دوران باستان استفاده می‌شده است. اسانس آویشن منبع غنی از ترکیبات زیست‌فعال آروماتیک مانند تیمول و کارواکرول است که نقش مهمی به‌عنوان عوامل آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی ایفا می‌کند (Marino *et al*., 1999). رزماری به‌عنوان یک گیاه معطر شناخته شده است که از هزاران سال پیش برای تزئین، آشپزی، دارویی در تشریفات مذهبی استفاده می‌شود (Ribeiro *et al.,* 2015).

عفونت‌های قارچی در ماهی به‌طور کلی تحت تأثیر برخی از عوامل ثانویه یا پاتوژن‌های دیگر مانند نتیجه مشکلات کیفیت آب، شرایط ضعیف، تروما (دست‌کاری خشن یا پرخاشگری ماهی)، بیماری‌های باکتریایی یا انگلی در نظر گرفته می‌شود (Yanong, 2003). ساپرولگنیوزیس (Saprolegniasis) یکی از شدیدترین بیماری‌های مزارع پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان محسوب می‌شود، ساپرولگنیا با تضعیف سیستم ایمنی و مرگ ماهی‌ها باعث تلفات اقتصادی در آزادماهیان و سایر آبزیان می‌شود (Tandel *et al.,* 2020). اکثر سموم قارچی شناخته‌شده به‌وسیله گونه‌های متعلق به جنس‌های قارچی *آسپرژیلوس*، *پنیسیلیوم*، *فوزاریوم*، *کلاوی‌سپس*، *آلترناریا*، *استاکی‌بوتریس* و *میروتسیوم* تولید می‌شوند. در پژوهش‌های مختلف انجام‌شده، گونه‌های متعددی از جنس‌های مختلف قارچی به‌ویژه *آسپرژیلوس*، *یوروتیوم*، *پنیسیلیوم*، *فوزاریوم* از مواد اولیه استفاده‌شده در تهیه خوراک دام‌ها جدا شدند که *آسپرژیلوس فلاووس* بالاترین میزان شیوع را داشته است. پراکندگی قارچ‌های مولد سم و گستردگی میزبان‌های آن‌ها و نیز وسعت و دامنه اثر سموم قارچی بر موجودات زنده از جمله میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و حیوانات خطر حضور این سموم در زنجیرهٔ غذایی انسان را افزایش داده است. در بین این سموم قارچی، آفلاتوکسین‌ها و اکراتوکسین‌ها خطرناک‌تر از بقیه بوده و آثار زیانباری بر حیوانات پرورشی از جمله ماهیان دارند که می‌توان به کاهش ایمنی بدن، کاهش رشد و تولید، افزایش ضریب تبدیل مواد غذایی و تلفات آبزیان اشاره کرد (Leong *et al.,* 2010; Magan *et al*., 2004). فوزاریوزیس در میگو به بیماری آبشش سیاه (Black gill disease) و یا قارچ‌زدگی میگو معروف است. این بیماری اولین‌بار توسط Ishikawa (1968) در میگوهای ژاپنی (*Penaeus japonicas*) پرورش داده‌شده در کشور ژاپن، گزارش شد. در این بیماری عامل قارچی گونه فوزاریوم به‌عنوان عامل ایجادکننده این بیماری معرفی شد (Pushparajan & Soundarapandian,

2010). این بیماری به‌طور عمده در میگوهای بالغ دیده می‌شود. در این بیماری زخم‌های سیاه‌رنگی بر روی آبشش، ضمایم و کوتیکول میگو ایجاد می‌شود. معمولاً ضایعات در قسمت‌های انتهایی ضمایم میگوها ایجاد می‌شود. این قارچ در کوتیکول سالم نمی‌تواند بیماری ایجاد کند. میزان تلفات این بیماری در میگو بستگی به‌شدت آلودگی قارچی، وضعیت میگو و وضعیت عفونت‌های ثانویه دارد (Khoa *et al*., 2004).

صنعت آبزی‌پروری در سال‌های اخیر به رشد قابل‌توجهی رسیده است، این رشد با مشکلاتی نیز مواجه شده است که از این چالش‌ها می‌توان به ظهور و بروز بیماری‌های عفونی با منشأ ویروسی و باکتریایی اشاره کرد (Soltani *et al*., 2009). ازجمله بیماری‌های مهم در آبزی‌پروری استرپتوکوکوزیس یا آنتروکوکوزیس است. عامل این بیماری، باکتری گرم مثبت *استرپتوکوکوس اینیایی* است که باعث ایجاد یک بیماری عفونی سپتی‌سمیک در ماهیان آب شیرین، لب‌شور و آب‌شور می‌شود. این بیماری برای اولین بار در سال ۱۹۸۵در ژاپن و از ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) گزاش شده است (Hoshina *et al*., 1958). علاوه بر اهمیت این بیماری در آبزی‌پروری این بیماری یک تهدید برای سلامت عمومی انسان‌هایی که با آبزیان سروکار دارند، محسوب می‌شود (Mata *et al*., 2004). *لاکتوکوکوس گارویه* از منابع مختلفی مانند ماهی، محصولات غذایی، حیوانات خشکی‌زی و انسان نیز جدا شده است، اما یک عامل بیماریزای مهم در ماهیان بوده و باعث ایجاد سپتی‌سمی خونریزی‌دهنده کشنده و فوق حاد در ماهیان وحشی و پرورشی در آب شور و شیرین می‌شود، به‌ویژه هنگامی که دمای آب به بالاتر از ۱۵ درجه سانتی‌گراد می‌رسد (Ture & Altinok, 2016). *یرسینیا راکری* عامل بیماری دهان قرمز انتروباکتریایی از بیماری‌های سیستمیک در ماهیان است که باعث خسارت‌های اقتصادی قابل‌توجهی در صنعت آبزی‌پروری به‌ویژه در آزادماهیان در سراسر جهان می‌شود (Fadaeifard & Simin, 2014). این بیماری امروزه با نام یرسینیوزیس یا سپتی‌سمی یرسینیایی شناخته شده است. ماهیان مبتلا علائمی نظیر کندی حرکت، تیرگی رنگ همراه با قرمزشدن رنگ اطراف دهان، سرپوش آبششی و قاعده باله‌ها به‌همراه اگزوفتالمی (Exophtalmia) از خود نشان می‌دهند. البته در مواردی ممکن است علائم قرمزی اطراف دهان مشاهده نشود (Feranadez *et al*., 2007). باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* یکی از شایع‌ترین باکتری‌های فرصت‌طلب در آب‌های شیرین است که در اثر افزایش بار مواد آلی در آب، جمعیت آن به‌سرعت افزایش می‌یابد و می‌تواند به عامل مسبب بیماری سپتی‌سمی هموراژیک در ماهی‌های آب شیرین، به‌ویژه گونه‌های پرورشی بدل شود (Yin *et al*., 2009).

میزان تولید آبزیان در جهان طبق آمار رسمی فائو از ۱۴۰ میلیون تن در سال ۲۰۰۳ به حدود ۲۱۲ میلیون تن در سال ۲۰۱۸ رسیده است. بیش از چهل درصد از پرورش آبزیان آب شیرین کشور را ماهیان سردآبی (قزل‌آلا) تشکیل می‌دهد و ایران با تولید ۱۴۰ هزار تن قزل‌آلا رتبه اول جهانی تولید این ماهی در آب شیرین را به خود اختصاص داده است و ازآنجاکه این تولید با استفاده از آب شیرین انجام می‌شود، توجه به الزامات توسعه پایدار این فعالیت ازجمله تأمین تخم چشم‌زده سالم و باکیفیت، تأمین تجهیزات بهبود کیفیت آب و پساب و توسعه بازار مصرف آن ضروری است که هم‌اکنون بخشی از آن از شرکت‌های اروپایی و به‌ویژه شرکت‌های فرانسوی تأمین می‌شود. با توجه به اهمیت و تأثیر عوامل بیماری‌زا بر رشد صنعت آبزی‌پروری کشور دست‌یافتن به دانش کنترل و پیشگیری از بروز بیماری در استخرهای آبزی‌پروری به‌منظور جلوگیری از تعطیلی این صنعت امروزه خیلی مورد اهمیت واقع شده است. لذا هدف اصلی این مطالعه بررسی تأثیر اسانس‌های کاکوتی کوهی، آویشن شیرازی و رزماری بر روی پاتوژن‌های

بیماری‌زای باکتریایی و قارچی ماهی به‌منظور دستیابی به حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد باکتری و قارچ (Minimum Inhibitory Concentration)، حداقل غلظت باکتری‌کشی (Minimum Bactericidal Concentration) و حداقل غلظت قارچ‌کشی (Mminimum Fungicidal Concentration) در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده سازی اسانس گیاهی

در این مطالعه برگ و ساقه گیاهان کاکوتی کوهی، آویشن باغی و رزماری از رویشگاه‌های طبیعی خریداری و مورد تأیید قرار گرفت و به طور طبیعی در سایه خشک گردید و با استفاده از دستگاه آسیاب برقی پودر شد. از پودر به دست‌آمده ۱۰۰ گرم به بالن یک لیتری کلونجر (Clevenger) منتقل و ۶۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه و روی شعله آتش گذاشته شد. اسانس با استفاده از دستگاه کلونجر به روش تقطیر استخراج گردید، به‌طوری‌که پس از جوشیدن آب، اسانس از گیاهان پودر شده همراه با بخار آب خارج شده و به لوله‌ی سرد کلونجر که جریان آب سرد در آن برقرار است هدایت می‌شود و پس از تقطیر، در لوله پایین دستگاه که شیر خروجی دارد جمع می‌شود. دو فاز شامل اسانس (روغنی) و مایع در خروجی دستگاه شکل می‌گیرد که با باز نمودن شیر خروجی دستگاه اجازه می‌دهیم مایع خارج و اسانس را در یک لوله دیگر نگهداری می‌کنیم و تا زمان استفاده در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (Sivam, 2001).

سویه‌های قارچی مورد آزمایش

در این مطالعه پنج جدایه قارچی شامل یک گونه *ساپرولگنیا* (Khosravi *et al*., 2012)، *آسپرژیلوس فلاووس* (Khosravi *et al*., 2013)، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* (Khosravi *et al*., 2013)، *آسپرژیلوس نایجر* (Khosravi *et al*., 2013) و یک گونه *فوزاریوم* (Khosravi *et al*., 2012) مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین MIC[1] و MFC[2]

در این مطالعه اثر ضدقارچی این ماده به روش ماکرودایلوشن جهت تعیین MIC و حداقل غلظت کشندگی MFC، روش توصیه شده توسط Evans & Richardson (1989) با مقداری تغییرات استفاده شد. برای تهیه سوسپانسیون قارچی ابتدا قارچ روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار (Sabouraud Dextrose Agar) کشت داده شد و در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۴-۳ روز نگهداری شد سپس از کلنی‌های رشد کرده، سوسپانسیون قارچی تهیه گردید برای این کار به سطح کلنی رشد کرده در محیط جامد، مقداری سرم فیزیولوژی اضافه و بعد از مدتی با پیپت پاستور استریل از سطح محیط برداشته شد. به کلنی‌های خالص ایجادشده در محیط کشت سرم فیزیولوژی دارای توین ۸۰ اضافه شد. بعد از جداسازی اسپور، برای تهیه سوسپانسیون قارچی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر میزان عبور نور از سوسپانسیون، مورد سنجش قرار گرفت (میزان عبور نور ۹۰ درصد برای به دست آوردن سوسپانسیونی با تقریباً 10^6 اسپور قارچی در هر میلی‌لیتر مورد نیاز است). برای تعیین MIC و MFC اسانس از روش استاندارد رقیق‌سازی در محیط مایع (Macro Dilution Broth) استفاده شد. برای رقت‌سازی از غلظت‌هایی معادل ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲، ۰/۳۱، ۰/۱۵، ۰/۰۷، ۰/۰۳، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر از اسانس در لوله استفاده شد، یک تیمار به‌عنوان شاهد که شامل محیط کشت مایع و بدون استفاده از رقت‌های سریالی اسانس‌ها بود در این آزمایش در نظر گرفته شد. به هر کدام از لوله‌ها

1. Minimum inhibitory concentrations
2. Minimum Bactericidal Concentration

مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی اضافه شد و ۲۴–۴۸ ساعت انکوبه گردید. بعد از این مدت با روش کدورت‌سنجی چشمی کم‌ترین رقتی که در آن کدورتی مشاهده نشد MIC در نظر گرفته شد، از MIC و دو غلظت کم‌تر به میزان ۱۰ میکرولیتر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار کشت گسترده داده شد و ۲۴ ساعت انکوباسیون گردید، سپس غلظتی که هیچ گونه رشدی روی محیط جامد نداشت به‌عنوان MFC لحاظ گردید.

سویه‌های باکتری موردآزمایش

سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در این بررسی شامل *استرپتوکوکوس اینیایی* GQ850377، *لاکتوکوکوس گارویه* GQ850376، *استرپتوکوکوس میتیس* ATCC 9811، *یرسینیا راکری* Ir-MS4 و *آئروموناس هیدروفیلا* ATCC 7966T بودند.

تعیین MIC و MBC

به‌منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و باکتری‌کشی اسانس‌های مورداشاره از روش رقیق‌سازی در لوله حاوی محیط کشت مایع تریپتیکاز سوی براث (Trypticase Soy Broth) استفاده گردید. سویه‌های لیوفلیزه به محیط مایع تریپتیکاز سوی براث تلقیح و به‌مدت ۲۴ در انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند، با استفاده از سانتریفیوژ سوسپانسیون باکتریایی با تراکم ۳×۱۰^{۸} cfu/ml (معادل مک‌فارلند شماره یک) در سرم فیزیولوژی (PSB) تهیه گردید. غلظت‌هایی از هر اسانس معادل ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵۶، ۰/۰۷۸، ۰/۰۳۹، ۰/۰۱۹ و ۰/۰۰۹ (میکرولیتر/ میلی‌لیتر) در لوله‌های آزمایشگاهی در سه تکرار آماده شد. از سوسپانسیون باکتریایی به اندازه ۱۰ میکرولیتر (۳×۱۰^{۶}cfu/ml) به تمام غلظت‌ها و تیمار شاهد (تلقیح باکتری به محیط کشت مایع و بدون استفاده از اسانس) اضافه گردید و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد، پایین‌ترین غلظتی که هیچ‌گونه کدورتی در آن مشاهده نشد به‌عنوان MIC تعیین گردید برای مشخص‌کردن MBC، به مقدار ۱۰ میکرولیتر از MIC و یک غلظت بالاتر و یک غلظت پایین‌تر به محیط کشت تریپتیکاز سوی آگار اضافه و کشت گسترده در پلیت داده شد پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در گرماخانه نگهداری شد. از غلظتی که کم‌ترین رشد باکتری در پلیت را منجر شد به‌عنوان حداقل غلظت باکتری‌کشی برای هر باکتری تعیین شد (Soltani *et al.*, 2013).

بررسی‌های آماری

جهت تعیین MIC، MFC و MBC اسانس‌های مورد استفاده علیه قارچ‌ها و باکتری‌های مورد مطالعه در هر آزمایش سه تکرار برای هر اسانس و پاتوژن در نظر گرفته شد که میانگین سه تکرار برای هر آزمون با استفاده از نرم افزار SSPS 26 محاسبه گردید. تیمار شاهد که شامل محیط کشت مایع در لوله همراه با تلقیح پاتوژن بود جهت بررسی صحت رشد عوامل قارچی و باکتریایی مورد استفاده قرار گرفت و از آنجایی که هیچگونه عامل بازدارنده از رشد پاتوژن‌ها در محیط کشت آن‌ها مورداستفاده قرار نگرفت، صرفاً به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد و در مقایسه آماری نقشی نداشته است و فقط بیانگر کیفی رشد پاتوژن‌ها در شرایطی بوده است که اسانس‌های گیاهی مورداستفاده قرار نگرفته است. مقایسه آماری داده‌های حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد و حداقل غلظت قارچ‌کشی و باکتری‌کشی اسانس‌های گیاهی با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه با آزمون توکی (Tukey) و تست تکمیلی دانکن (Duncan) در سطح معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) استفاده گردید.

نتایج

نتایج این تحقیق به‌طورکلی با توجه به این‌که گروه شاهد نقش کنترل مثبت برای صحت آزمایش داشته

است و هیچ‌گونه عامل بازدارنده از رشد در هنگام تلقیح پاتوژن‌های قارچی و باکتریایی در این تیمارها استفاده نشده است و در مقابل تیمارهایی که از اسانس‌های گیاهی استفاده شده است در غلظت‌هایی متفاوت از رشد عوامل قارچی و باکتریایی ممانعت کرده است (اختلاف در میزان غلظت وجود داشته است) این مقایسه آماری بین سه اسانس استفاده شده صورت گرفته شد.

حداقل‌غلظت ممانعت‌کننده از رشد اسانس‌ها

نتایج حاصل از آزمایش MIC اسانس‌های کاکوتی کوهی، آویشن باغی و رزماری بر روی قارچ‌های *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس فلاووس*، یک گونه *ساپرولگنیا* و یک گونه *فوزاریوم* در جدول ۱ آمده است.

نتایج تأثیر ضدقارچی اسانس‌های کاکوتی کوهی، آویشن باغی به‌دست‌آمده با استفاده از روش ماکرودایلوشن براث با هم موردمقایسه قرار گرفتند و بر طبق نتایج بیش‌ترین خاصیت ضدقارچی مربوط به تیماری بوده است که با کم‌ترین غلظت، از رشد پاتوژن‌های قارچی ممانعت کرده است. براساس تجزیه و تحلیل میانگین داده‌های MIC، اسانس‌های کاکوتی کوهی و آویشن باغی بیش‌ترین تأثیر بر قارچ‌های مورد مطالعه داشته است و کم‌ترین خاصیت ضدقارچی مربوط به اسانس رزماری بوده است که اختلاف معنی‌دار بوده است (P <۰/۰۵).

حداقل غلظت قارچ‌کشی اسانس‌ها

نتایج حاصل از آزمایش MFC اسانس‌های کاکوتی کوهی، آویشن باغی و رزماری بر روی قارچ‌های *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس فلاووس*، یک گونه *ساپرولگنیا* و یک گونه *فوزاریوم* در جدول ۲ آمده است.

براساس نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری میانگین داده‌های MFC اسانس‌های کاکوتی کوهی و آویشن باغی بیش‌ترین خاصیت ضدقارچی را بر روی قارچ‌های موردمطالعه نشان دادند و اسانس رزماری طبق نتایج حداقل غلظت قارچ‌کشی کم‌ترین خاصیت ضدقارچی را داشت و اختلاف بین کم‌ترین و بیش‌ترین خاصیت قارچ‌کشی معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

جدول ۱. MIC اسانس‌های کاکوتی کوهی، آویشن باغی و رزماری علیه پاتوژن‌های قارچی (برحسب µl/ml)

اسانس (µl/ml) / قارچ	کاکوتی کوهی	آویشن باغی	رزماری
	MIC	MIC	MIC
A. fumigatus	۰/۰۲۷ ^{a} ± ۰/۰۱۱	۰/۰۲۳ ^{a} ± ۰/۰۱۵	۱/۰۴ ^{b} ± ۰/۳۶
A. niger	۰/۱۰۵ ^{a} ± ۰/۰۴۴	۰/۰۴۶ ^{a} ± ۰/۰۳	۱/۶۶ ^{b} ± ۰/۷۲
A. flavus	۰/۰۶۶ ^{a} ± ۰/۰۲۳	۰/۰۹۲ ^{a} ± ۰/۰۵۸	۰/۸۳ ^{b} ± ۰/۳۶
Saprolegnia spp.	۰/۰۴۶ ^{a} ± ۰/۰۳	۰/۰۳۳ ^{a} ± ۰/۰۱۱	۰/۰۲۱ ^{b} ± ۰/۰۹
Fusarium spp.	۰/۰۴۶ ^{a} ± ۰/۰۳	۰/۰۹۲ ^{a} ± ۰/۰۵۹	۰/۸۳ ^{b} ± ۰/۳۶

اعدادی که در هر ردیف با حروف متفاوت مشخص شده‌اند، نشان‌دهنده اختلاف معناداری در سطح ۰/۰۵ درصد می‌باشند (P<۰/۰۵).

جدول ۲. MFC اسانس‌های کاکوتی کوهی، آویشن باغی و رزماری علیه پاتوژن‌های قارچی (برحسب µl/ml)

اسانس / قارچ	کاکوتی کوهی	آویشن باغی	رزماری
	MFC	MFC	MFC
A. fumigatus	۰/۰۴۶ ^{a} ± ۰/۰۳	۰/۰۴۷ ^{a} ± ۰/۰۳۱	۲/۰۸ ^{b} ± ۰/۷۲
A. niger	۰/۱۸۳ ^{a} ± ۰/۱۲	۰/۰۹۲ ^{a} ± ۰/۰۵۶	۳/۳۳ ^{b} ± ۱/۴۴
A. flavus	۰/۱۰۵ ^{a} ± ۰/۰۴۴	۰/۱۸۳ ^{a} ± ۰/۱۲	۱/۶۶ ^{b} ± ۰/۷۲
Saprolegnia spp.	۰/۰۹۲ ^{a} ± ۰/۰۶	۰/۰۶۶ ^{a} ± ۰/۰۲۳	۰/۴۲ ^{b} ± ۰/۱۸
Fusarium spp.	۰/۰۹۲ ^{a} ± ۰/۰۶	۰/۱۸۳ ^{a} ± ۰/۱۲	۱/۶۶ ^{b} ± ۰/۷۲

اعدادی که در هر ردیف با حروف متفاوت مشخص شده‌اند، نشان‌دهنده اختلاف معناداری در سطح ۰/۰۵ درصد می‌باشند (P<۰/۰۵).

حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد اسانس‌ها در برابر پاتوژن‌های باکتریایی ماهی

نتایج تأثیر اسانس‌های کاکوتی کوهی، آویشن باغی و رزماری بر روی سویه‌های *استرپتوکوکوس اینیایی*، *استرپتوکوکوس میتیس*، *لاکتوکوکوس گارویه*، *یرسینیا راکری* و *آئروموناس هیدروفیلا* در جدول ۳ آمده است، در تیمار شاهد رشد باکتری‌های مورد مطالعه در لوله‌های حاوی محیط کشت مایع بدون استفاده از اسانس مشاهده گردید.

از مقایسه تأثیر ضدباکتریایی اسانس‌های کاکوتی کوهی، آویشن باغی و رزماری بر تمام باکتری‌های مورد آزمایش، بیش‌ترین خاصیت ضدباکتریایی مربوط به اسانس کاکوتی کوهی علیه باکتری‌های *استرپتوکوکوس اینیایی*، *لاکتوکوکوس اینیایی* و *آئروموناس هیدروفیلا* بود که با حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد به‌دست‌آمده برای اسانس آویشن باغی، اختلاف معنی‌داری نبود (P> ۰/۰۵). کم‌ترین خاصیت ضدباکتریایی مربوط به اسانس رزماری بوده است که با غلظت به‌دست‌آمده در سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

حداقل غلظت باکتری‌کشی اسانس‌ها در برابر پاتوژن‌های باکتریایی ماهی

نتایج تأثیر اسانس‌های کاکوتی کوهی، آویشن باغی و رزماری استفاده بر روی پنج سویه *استرپتوکوکوس اینیایی*، *استرپتوکوکوس میتیس*، *لاکتوکوکوس گارویه*، *یرسینیا راکری* و *آئروموناس هیدروفیلا* در جدول ۴ آمده است.

از مقایسه میانگین MBC اسانس‌های کاکوتی کوهی، آویشن باغی و رزماری علیه باکتری‌های موردآزمایش بیش‌ترین خاصیت ضدباکتریایی مربوط به اسانس‌های کاکوتی کوهی و آویشن باغی بود که با غلظت‌های به‌دست‌آمده برای اسانس رزماری اختلاف معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵).

جدول ۳. MIC اسانس‌های کاکوتی کوهی، آویشن باغی و مرزه علیه پاتوژن‌های باکتریایی ماهی (بر حسب µl/ml)

اسانس / باکتری	کاکوتی کوهی	آویشن باغی	رزماری
	MIC	MIC	MIC
S. iniae	۰/۰۳۳ ^{a} ± ۰/۰۱۱	۰/۰۳۳ ^{a} ± ۰/۰۱۱	۰/۸۳ ^{b} ± ۰/۳۶
S. mitis	۰/۰۱۶ ^{a} ± ۰/۰۰۵	۰/۰۶۵ ^{ab} ± ۰/۰۲۱	۰/۴۱۶ ^{b} ± ۰/۱۸
L garvieae.	۰/۰۲۳ ^{a} ± ۰/۰۱۵	۰/۰۵۲ ^{a} ± ۰/۰۲۱	۰/۱۳ ^{b} ± ۰/۰۴۵
Y. ruckeri	۰/۰۲۶ ^{a} ± ۰/۰۱۱	۰/۱۳ ^{ab} ± ۰/۰۴۵	۰/۲۱ ^{b} ± ۰/۰۱
A. hydrophila	۰/۰۴۶ ^{a} ± ۰/۰۳	۰/۱۰۴ ^{a} ± ۰/۰۴۵	۱/۰۴ ^{b} ± ۰/۳۶

اعدادی که در هر ردیف با حروف متفاوت مشخص شده‌اند، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ درصد می‌باشند (P<۰/۰۵).

جدول ٤. MBC اسانس‌های کاکوتی کوهی، آویشن باغی و مرزه علیه پاتوژن‌های باکتریایی ماهی (برحسب µl/ml)

اسانس / باکتری	کاکوتی کوهی	آویشن باغی	رزماری
	MBC	MBC	MBC
S. iniae	۰/۰۶۷ ^{a} ± ۰/۰۲۳	۰/۰۶۶ ^{a} ± ۰/۰۲۳	۱/۶۶ ^{b} ± ۰/۷۲
S. mitis	۰/۰۳۳ ^{a} ± ۰/۰۱۱	۰/۱۳۱ ^{ab} ± ۰/۰۴۳	۰/۸۳ ^{b} ± ۰/۳۶
L garvieae.	۰/۰۴۷ ^{a} ± ۰/۰۳	۰/۱۱ ^{a} ± ۰/۰۴۴	۰/۲۶ ^{b} ± ۰/۰۹
Y. ruckeri	۰/۰۵۳ ^{a} ± ۰/۰۲۳	۰/۲۶ ^{ab} ± ۰/۰۹	۰/۴۲ ^{b} ± ۰/۱۸
A. hydrophila	۰/۰۹۳ ^{a} ± ۰/۰۶	۰/۲۱ ^{a} ± ۰/۰۹	۱/۶۶ ^{b} ± ۰/۷۲

اعدادی که در هر ردیف با حروف متفاوت مشخص شده‌اند، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ درصد می‌باشند (P<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

پرورش آبزیان در حال حاضر سریع‌ترین رشد صنایع غذایی در جهان است (FAO, 2014). عوامل بیماری‌زا عفونی از مهم‌ترین چالش‌های پیش روی این صنعت محسوب می‌شوند. با توجه به افزایش مقاومت باکتریایی به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، سعی شده است از ترکیبات گیاهان در درمان بیماری‌های مختلف استفاده نمود. از هزاران سال پیش، گیاهان نقش مهمی در حفظ سلامتی و بهبود زندگی بشر ایفا کرده‌اند. گیاهان دارویی دارای خواص مفیدی هستند که از بین آن‌ها می‌توان به خواص آنتی‌باکتریال، ضدانگلی، ضدقارچ و آنتی‌اکسیدان اشاره کرد (Mirmalek *et al*., 2015). 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 & Woo, 1994). اکثر قارچ‌ها یوکاریوتیک و چند سلولی هستند و حاوی رشته‌هایی هستند که به‌عنوان هیف شناخته می‌شوند. به‌طورکلی رشد هیف با گسترش دیواره سلولی و اجزای داخلی از نوک آن اتفاق می‌افتد. قارچ‌ها هتروتروفیک هستند و مواد مغذی را با استفاده از هضم خارج سلولی (با ترشح آنزیم‌های گوارشی به محیط اطراف خود) هضم، بیومولکول‌های ساده هم از طریق دیواره سلولی و غشا جذب می‌شوند (Kirk, 1980).

ساپرولگنیوزیس در ماهیان آب شیرین را می‌توان با کیفیت خوب آب، گردش هوا در حوضچه‌ها، تغذیه خوب، کاهش تراکم ماهی برای به حداقل‌رساندن آسیب‌ها و در نهایت استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی مانند مالاشیت گرین (Malachite green)، فرمالین و پراکسیدهیدروژن کنترل کرد (Sharma *et al*., 2012). با این‌حال، استفاده بیش از حد قارچ‌کش‌ها برای درمان بیماری‌های ماهی منجر به انباشت بقایای سمی در گوشت ماهی می‌شود، خطر آلودگی محیط زیست را افزایش می‌دهد و باعث بسیاری از عوامل سرطان‌زا و تراتوژنیک است. بنابراین، آثار مضرر این قارچ‌کش‌ها بر سلامت انسان و محیط زیست مسئله مهمی است و توسعه قارچ‌کش‌های مؤثر و سازگار با محیط زیست ضروری است. در پژوهشی که توسط Mostafa et al. (2020) بر روی قدرت ضدقارچی برخی عصاره‌های گیاهی علیه *ساپرولگنیا دیکلینا*، عامل ایجادکننده ساپرولگنیوزیس انجام شد. عصاره اتانولی چهار گیاه انار، آویشن، سیاه دانه و زنجبیل به روش انتشار در دیسک و حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد انجام شد و نتایج بیانگر تأثیر بالقوه‌ی عصاره‌های اتانولی انار و آویشن بر میسلیوم‌های *ساپرولگنیا دیکلینا* در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، درصورتی‌که عصاره‌های سیاه دانه و زنجبیل مؤثر نبودند. در مطالعه‌ای که توسط Nazemi Salman et al. (2017) بر روی فعالیت ضدقارچی اسانس‌های جاشیر، کاکوتی، باریجه و بادرشبو علیه *کاندیدا آلبیکنس* به‌روش تست آنتی‌بیوگرام و حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد در شرایط آزمایشگاهی انجام شد، نتایج بیانگر قطر هاله بالا در همه اسانس‌ها علیه *کاندیدا آلبیکنس* بود و حداقل غلظت بازدارنده اسانس‌های موردمطالعه کم‌تر از کلرهگزیدین (۱/۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر) و کم‌ترین مقدار مربوط به اسانس گیاه کاکوتی (۰/۲۶ میکروگرم در میلی‌لیتر) بود. در تحقیقی که توسط Sofiene et al. (2019) بر روی تأثیر اسانس رزماری به‌عنوان یک عامل ضدقارچی و علف‌کش انجام گرفت پس از تعیین ترکیبات موجود در اسانس رزماری با استفاده از دستگاه GC-MS (شامل ۵۴/۶۱ ٪ 1,8-cineole، ۱۲٪/۲۷ camphor و ۷٪/۰۹ α-pinene)، فعالیت ضدقارچی اسانس رزماری بر روی قارچ‌های *Fusarium oxysporum*، *Fusarium culmorum* و *Penicillium italicum* به‌روش کدروت‌سنجی در میکروپلیت‌الایزا انجام شد، نتایج بیانگر صددرصد ممانعت‌کنندگی اسانس رزماری علیه قارچ *Fusarium oxysporum* گزارش شد. طبق نتایج حاصل از این پژوهش اسانس‌های کاکوتی کوهی،

آویشن باغی و رزماری در برابر فعالیت گونه‌های *آسپرژیلوس*، *ساپرولگنیا* و *فوزاریوم* قابلیت ممانعت‌کننده از رشد نشان دادند که با نتایج حاصل از پژوهش‌های پیشین مطابقت دارد.

پاتوژن‌های باکتریایی تهدید بزرگی برای تولید ماهی در سراسر جهان هستند که ناشی از اهمیت بالای اقتصادی بیماری‌هایی است که ایجاد می‌کنند (Bondad-Reantaso *et al*., 2005). بدین‌ترتیب پیداکردن راه‌های مناسب و ایمن جهت مهار پاتوژن‌های باکتریایی به پیشرفت این صنعت منجر می‌شود. در مطالعه‌ای که توسط Nazemi Salman et al. (2018) تحت عنوان مقایسه تأثیر ضدمیکروبی اسانس‌های کاکوتی، بادرشبو، باریجه و جاشیر با کلرهگزیدین (Chlorhexidine) بر روی *انتروکوکوس فکالیس* در شرایط آزمایشگاهی، به‌روش انتشار در دیسک و میکرودایلوشن براث انجام شد نتایج بیانگر تأثیر چهار اسانس استفاده‌شده علیه باکتری *انتروکوکوس فکالیس بود*. قطر هاله عدم رشد اسانس‌های کاکوتی (۲۵ میلی‌متر) و جاشیر (۲۳ میلی‌متر) بالاتر از کلرهگزیدین (۲۱ میلی‌متر) بود. نتایج MIC و MBC حاکی از بیش‌ترین تأثیر اسانس‌کاکوتی (۰/۲۶۲۵ و ۰/۵۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در مقایسه با اسانس‌های دیگر علیه *انتروکوکوس فکالیس* گزارش شد. در پژوهشی که توسط Chitsaz et al. (2005) بر روی تأثیر اسانس کاکوتی کوهی علیه چندین گونه باکتری انجام گرفت، نتایج بیانگر تأثیر اسانس کاکوتی کوهی بر جلوگیری از رشد تمام باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی موردمطالعه، به‌ویژه *سالمونلا تیفی موریم* بود. در تحقیقی که توسط Kačániová et al. (2021) بر روی فعالیت بیولوژیکی اسانس آویشن انجام گرفت، ترکیبات اسانس شامل thymol (۴۸٪/۱)، p-cymene (۱۱٪/۷)، 1,8-cineole (۶٪/۷)، γ-Terpinene (۶٪/۱) و carvacrol (۵٪/۵) به‌وسیله کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) اندازه‌گیری شد، فعالیت ضدباکتریایی اسانس به‌روش انتشار در دیسک و حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد بر روی باکتری‌های گرم مثبت (شامل *باسیلوس سوبتیلیس*، *انتروکوکوس فکالیس* و *استافیلوکوکوس ارئوس*) و گرم منفی (شامل *یرسینیا انتروکولیتیکا*، *سودوموناس آئروژینوزا* و زیرگونه‌ای از *سالمونلا انتریکا*) انجام شد. براساس نتایج قطر هاله عدم رشد اسانس آویشن در برابر باکتری‌ها از ۹/۸۹ تا ۲۲/۴ میلی‌متر بود و کم‌ترین MIC برای باکتری‌های *باسیلوس سوبتیلیس*، *انتروکوکوس فکالیس* و *استافیلوکوکوس ارئوس* گزارش شد. در مطالعه‌ای که توسط Metin et al. (2020) بر روی فعالیت ضدباکتریایی اسانس و عصاره برخی گیاهان دارویی علیه پاتوژن‌های باکتریایی ماهی به‌روش چاهک‌گذاری در محیط کشت آگار انجام شد، از چهار گیاه دارویی مریم‌گلی، رزماری، اسطوخودوس و زوفا علیه پاتوژن‌های باکتریایی گرم منفی (آئروموناس کاویه، *آئروموناس هیدروفیلا*، ویبریو آنگلیاروم، *یرسینیا راکری*، *ادواردزیلا تاردا* و *سودوموناس آئروژینوزا*) و گرم مثبت (*لاکتوکوکوس گارویه*، *استافیلوکوکوس وارنری* و *واگوکوکوس سالمونیاروم*) استفاده شد. براساس نتایج حاصل از قطر هاله عدم رشد مریم‌گلی و رزماری فعالیت آنتی‌باکتریال قوی‌تری نسبت به اسانس اسطوخودوس و زوفا در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داد. در پژوهشی که توسط Metin et al. (2020) بر روی تأثیر اسانس رزماری و مریم‌گلی علیه باکتری آئروموناس سوبریا در ماهی گلدفیش در شرایط آزمایشگاهی به‌روش چاهک‌گذاری در آگار و تجویز خوراکی اسانس همراه با غذا انجام گرفت. نتایج حاکی از قطر هاله عدم رشد اسانس رزماری در برابر آئروموناس سوبریا برابر ۲/۸۲±۲۰ میلی‌متر و اسانس مریم‌گلی۲/۱۲±۱۸/۸ میلی‌متر بود. تأثیر رژیم غذایی حاوی اسانس‌های رزماری (۱ میلی‌لیتر در کیلوگرم) و گل‌مریم (۱ تا ۳ میلی‌لیتر در کیلوگرم) به‌مدت ۴۵ روز موجب کاهش تلفات پس از

چالش با *آئروموناس سوبریا* شد. براساس نتایج حاصل از این پژوهش تأثیر ضدباکتریایی اسانس‌های کاکوتی کوهی، آویشن باغی و رزماری در برابر تمام باکتری‌های مورداستفاده در غلظت‌های پائینی برای مهار از رشد و کشندگی باکتری به‌ویژه در برابر باکتری‌های گرم مثبت به اثبات رسید که با نتایج حاصل از مطالعات پیشین مطابقت دارد.

باتوجه به نتایج حاصل از این پژوهش، می‌توان بیان نمود که اسانس‌های کاکوتی کوهی، آویشن باغی و رزماری دارای تأثیر ضدقارچی مناسبی علیه قارچ‌های گونه‌های آسپرژیلوس (*فومیگاتوس*، *نایجر* و *فلاووس*)، *ساپرولگنیا* و *فوزاریوم* است و تأثیر اسانس‌های نامبرده علیه باکتری‌های *استرپتوکوکوس اینیایی*، *استرپتوکوکوس میتیس*، *لاکتوکوکوس گارویه*، *یرسینیا راکری* و *آئروموناس هیدروفیلا* نیز در شرایط آزمایشگاهی مناسب می‌باشند. لذا استفاده از این اسانس‌ها علیه پاتوژن‌های قارچی و باکتریایی آبزیان پس از آزمون‌های تکمیلی در شرایط طبیعی پرورش آبزیان توصیه می‌گردد.

REFERENCES

Baser, K.H.C.; Sezik, E.; Tümen, G. (1991). Composition of the essential oil of *Ziziphora clinopodioides* Lam. *Journal of Essential Oil Research*, *3*(4), 237-239.

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.

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.

Evans, EGV.; Richardson, MD. (1989). Medical Mycology "A Practical Approach". England: Oxford. p.235-259.

Fadaeifard, F.; Simin, S. (2014). Detaction of virulence genes (Yrp1 and YrpE) in the *Yersinia ruckeri* by polymerase chain reaction test in Charmahal-Va-Bakhtiary provin, Iran. *Biological Journal of Microorganism*, 3(9): 65-73.

Hoshina,T.; Sano,T.; Morimoto,Y. (1958). A *Streptococcus* pathogenic to fish.

Kačániová, M.; Vukovič, N.; Hleba, L.; Bobková, A.; Pavelková, A.; Rovná, K.;& Arpášová, H. (2021). Antimicrobial and antiradicals activity of *Origanum vulgare* L. and Thymus vulgaris essential oils. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 263-271.

Khoa, L.; Hatai, K.; Aoki, T. (2004). *Fusarium incarnatum* isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius, with black gill disease cultured in Vietnam. *Journal of fish diseases*, 27: 507-515.

Kirk, DL.; The world of fungi. In: Biology today. 3rd edition. New York: Random House. (1980). p. 121-37.

Leong ,YH.; Ismail, N.; Latif ,AA.; Ahmad, R. (2010). Short Communication: Aflatoxin occurrence in nuts and commertial nutty products in Malaysia. Food Control. 21:334-8.

Magan, N.; Olsen, M. (2004). Mycotoxins in Food Detection and Control. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.

Marino, M.; Bersani, C.; Comi, G. (1999). Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris L.* measured using a bioimpedometric method. *Journal of food protection*, *62*(9), 1017-1023.

Mata, A. I.; Blanco, M. M.; Domınguez, L.; Fernández-Garayzábal, J. F.; Gibello, A. (2004). Development of a PCR assay for *Streptococcus iniae* based on the lactate oxidase (lctO) gene with potential diagnostic value. *Veterinary microbiology*, *101*(2), 109-116.

Matyar, F.; Din,cers, s.; kaya, A.; ColAK, O. (2004). Prevalence and resistance to antibiotics in Gram negative bacteria isolated from retial fish in Turkey. Annals of microbioligy, 54: 151-160.

Metin, S.; Didinen, B. I.; Kara, N.; & Diler, Ö. (2020). Effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and Sage (*Salvia officinalis*) Essential Oils on Disease Resistance against Aeromonas sobria in Goldfish (*Carassius auratus*). *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, (72).

Metin, S.; Kara, N.; Didinen, B. I.; Kubilay, A.; (2021). Antibacterial Activity of Essential Oils and Extracts of Some Medicinal Plants against Bacterial Fish Pathogens. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, *73*.

Mirmalek, S. A.; Azizi, M. A.; Jangholi, E., Yadollah-Damavandi, S., Javidi, M. A., Parsa, Y., ... & Alizadeh-Navaei, R. (2015). Cytotoxic and apoptogenic effect of hypericin, the bioactive component of Hypericum perforatum on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Cancer cell international*, *16*(1), 1-9.

Moss, M.O. (1998). Recent studies on mycotoxins. *Journal of Applied microbiological Symposium Supplement*, 84: 62-76.

Mostafa, A.A.F.; Al-Askar, A.A.; Dawoud, T. M.; Ameen, F.; & Yassin, M. T. (2020). In vitro evaluation of antifungal activity of some agricultural fungicides against two saprolegnoid fungi infecting cultured fish. *Journal of King Saud University-Science*, *32*(7), 3091-3096.

Nazemisalman, B.; Vahabi, S.; Yazdinejad, A.; Haghghi, F.; Jam, M. S.; & Heydari, F. (2018). Comparison of antimicrobial effect of Ziziphora tenuior, Dracocephalum moldavica, Ferula gummosa, and Prangos ferulacea essential oil with chlorhexidine on Enterococcus faecalis: An in vitro study. *Dental research journal*, *15*(2), 111.

Pushparajan, N.; Soundarapandian, P. (2010). Recent farming of marine black tiger shrimp, Penaeus monodon (Fabricius) in South India. *African Journal of Basic & Applied Sciences*, 2(1-2), 33-36.

Ribeiro-Santos, R.; Carvalho-Costa, D.; Cavaleiro,C.;Costa,H. S.; Albuquerque, T. G.; Castilho, M. C.; ... Sanches-Silva, A. (2015). A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends in Food Science & Technology*, *45*(2), 355-368.

Roomiani, L.; Soltani, M.; Akhondzadeh Basti, A.; Mahmoodi, A.; Taheri, A.; Taheri Mirghaed, A.; Yadollahi, F. (2013). Evaluation of the chemical composition and in vitro antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis*, *Zataria multiflora*, Anethum graveolens and Eucalyptus globulus against *Streptococcus iniae* the cause of zoonotic disease in farmed fish.

Sharman, MJ.; Mansfield, CS. (2012). Sinonasal aspergillosis in dogs: a review. *J Small Anim Pract*; 53(8): 434-444.

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.

Soltani, M.; Ghodratnema, M.; Ahari, H.; Ebrahimzadeh, M. H.; Atei, M.; Dastmalchi, F.; Rahmania, J. (2009). The Inhibitory Efect of Silver Nanoparticles on the Bacterial Fish Pathogens, *Streptococcus Iniae Lactococcus Garvieae, Yersinia Ruckeri Aeromonas Hydrophila*.

Tandel, R. S.; Chadha, N. K.; Dash, P.; Sawant, P. B.; Pandey, N. N.; Chandra, S.; ... & Thakuaria, D. (2021). An in-vitro study of Himalayan plant extracts against oomycetes disease Saprolegniasis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Environmental Biology*, *42*(4), 1008-1018.

Ture, M.; Altinok, I. (2016). Detection of putative virulence genes of *Lactococcus garvieae*. *Diseases of Aquatic Organisms*, *119*(1), 59-66.

Yanong, R. P. (2003). Fungal diseases of fish. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, *6*(2), 377-400.

Yin, G.; Ardó, L.Á.S.Z.L.Ó.; Thompson, K.D.; Adams, A.; Jeney, Z.; Jeney, G. (2009). Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, *26*(1), 140-145.