

## بررسی خواص ضدقارچی پپتید تاناتین و عصاره‌ی زیتون تلخ بر عوامل قارچی مولد ورم پستان گاو در شرایط آزمایشگاهی

• سیده زهرا موسوی

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

• عباس تنهاییان

گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

• علی جوادمنش (نویسنده مسئول)

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۷-۰۸-۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: ۲۶-۱۲-۱۳۹۹

Email: javadmanesh@um.ac.ir



### چکیده

ورم پستان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گاو شیری است. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی برای درمان این بیماری منجر به افزایش مقاومت‌های دارویی باکتریایی و قارچی شده است. از این جهت، داروهای با منشأ طبیعی و طیف گسترده از فعالیت‌های ضد میکروبی از جمله عصاره‌های گیاهی و پپتیدهای ضد میکروبی بعنوان جایگزین‌های آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد توجه قرار گرفتند. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر پپتید تاناتین و عصاره‌ی زیتون تلخ بر روی عوامل قارچی مولد ورم پستان گاو نظیر قارچ‌های کاندیدا پارازیلووز، کاندیدا آلیکنز و گونه‌ی موکور در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی قارچ (MFC) بر اساس روش میکروبراث به وسیله‌ی پلیت ۹۶ خانه‌ای با چهار تکرار با استفاده از عصاره‌ی زیتون تلخ و پپتید تاناتین بر روی سه قارچ مولد ورم پستان صورت گرفت. نتایج آزمایش نشان داد که تاناتین بر روی هر سه قارچ مورد مطالعه اثرگذار بود. عصاره‌ی زیتون تلخ با میزان MIC برابر با  $12500 \mu\text{g/ml}$  بیشترین اثر را بر روی قارچ کاندیدا پارازیلووز داشت. غلظت‌های اعمال شده عصاره‌ی زیتون تلخ بر قارچ رشته‌ای موکور بی‌تاثیر بود در حالی که تاناتین بر روی این قارچ فعالیت مهاری داشت. این مطالعه ثابت کرد که عصاره‌ی زیتون تلخ و پپتید تاناتین می‌توانند فعالیت ضدقارچی مناسبی را علیه عوامل ورم پستان گاو مانند کاندیدا پارازیلووز، کاندیدا آلیکنز و گونه‌ی موکور در شرایط آزمایشگاهی نشان دهند، هر چند که در آینده باید فعالیت ضد قارچی این پپتید در شرایط بالینی نیز مورد بررسی قرار داد.

کلمات کلیدی: قارچ، پپتید تاناتین، ورم پستان، عصاره زیتون تلخ

• Veterinary Researches & Biological Products No 134 pp: 215-221

### Evaluation of in vitro antifungal properties of Thanatin peptide and Chinaberry extract on fungal pathogens of bovine mastitis

By: Mousavi, Z., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad. Tanhaeian, A., Plant Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad. and Javadmanesh, A., (Corresponding Author) Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.

Received: 2020-11-07

Accepted: 2021-03-16

Email: javadmanesh@um.ac.ir

Mastitis is one of the most important diseases in dairy cattle. Administration of synthetic antibiotics for treatment of mastitis leads to drug-resistance bacteria or fungi. Hence, the use of natural alternatives such as antimicrobial peptides and plant extracts has been considered as alternatives to common antibiotics. The aim of this study was to evaluate the effect of Thanatin peptide and Chinaberry extract against fungal factors of bovine mastitis such as *Candida parapsilosis*, *Candida albicans* and *Mucor* spp in vitro. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum fungicidal concentration (MFC) were determined based on broth micro-dilution method by 96-well plate with four replications using Chinaberry (*Melia azedarach*) extract and thanatin peptide on three mastitis-causing fungi. The results showed that the thanatin was effective on growth inhibition of all three fungi. Thanatin was more effective against *Candida albicans* and *parapsilosis*. Chinaberry extract with MIC of 6250 µg / ml and MFC of 12500 µg / ml had the greatest effect on *Candida parapsilosis*. Applied Chinaberry extract had no effect on *Mucor* spp fungi while thanatin showed an antifungal activity against this species. This study proved that Chinaberry extract and Thanatin peptide could show suitable antifungal activity against factors for mastitis includes *Candida parapsilosis*, *Candida albicans* and *Mucor* spp in vitro although the antifungal activity of this peptide should be investigated in clinical trials in the future.

**Keyword:** Fungi, Thanatin peptide, Mastitis, Chinaberry extract

است (۶). در نتیجه محققین به دنبال یافتن ترکیبات با منشا طبیعی با کمترین اثرات جانبی بر حیوان بمنظور جایگزینی مناسب برای داروهای شیمیایی و ضدقارچی هستند (۱۲، ۱۷). از جمله این ترکیبات می‌توان به عصاره‌های گیاهی و پپتیدهای ضد میکروبی اشاره کرد که پتانسیل این ترکیبات بخوبی به اثبات رسیده است.

عصاره‌های گیاهی در واقع ترکیبات مشتق شده از گیاهان می‌باشند که علاوه بر بو و عطر مطبوع، بعنوان افزودنی‌های خوراکی بمنظور مبارزه با عوامل بیماری‌زا مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۶). زیتون تلخ (*Melia azedarach. L*) یکی از گیاهان خانواده ملیاسه، بومی چین، ایران و هند است (۴) که در بخش‌های مختلف طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. دلیل استفاده از عصاره‌ی زیتون تلخ طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی و ضد میکروبی آن می‌باشد و از این عصاره به عنوان داروی ضد التهاب و ضد عفونی کننده استفاده می‌شود. ترکیباتی همچون لیمونوئیدها، لیمونین، نامیلین و اوباکونون در قسمت‌های مختلف درخت زیتون تلخ شناسایی شده‌اند (۱۵). مطالعات نشان داده‌اند که عصاره‌ی زیتون تلخ می‌تواند موجب مهار برخی پاتوژن‌های قارچی

#### مقدمه

ورم پستان از جمله شایع‌ترین و پرتترین بیماری‌ها در واحدهای گاو شیری محسوب می‌شود. علائم ورم پستان شامل ظاهر آبکی شیر، ایجاد لخته یا چرک در شیر است (۲، ۳). این بیماری را می‌توان با علائم ظاهری مانند تورم، دمای بالا، قرمزی، سفتی یا درد پستان تشخیص داد. گزارش شده است که چندین گونه از قارچ‌ها مانند گونه‌های کاندیدا (۸)، کریپتوکوکوس نئوفورماس، گونه‌های کپک سیاه سنجاقی (*Mucor. spp*) باعث ایجاد این بیماری در گاو شده‌اند (۹). ورم پستان معمولاً از طریق دستگاه‌های شیردوشی آلوده و یا بستر خیس و آلوده منتقل می‌شود. درمان با آنتی‌بیوتیک برای عفونت‌های باکتریایی امکان‌پذیر است، اما شیر این گاوها تا زمانی که بقایای دارو از بدن گاو خارج نشود، قابل فروش نیست. غالباً اولین انتخاب دامپزشک و دامدار برای گاوهای بیمار، بدون شناسایی ارگانسیم‌های ایجاد کننده ورم پستان، استفاده از آنتی‌بیوتیک است. در نتیجه، ورم پستان مقاوم به آنتی‌بیوتیک بطور مکرر در گله‌ها قابل مشاهده است. علاوه بر این، شواهد شفافی مبنی بر اثربخش بودن استفاده از داروهای ضدقارچی بمنظور کنترل ورم پستان گزارش نشده

۳۷ درجه و ۸ دقیقه عرض با شرایط آب و هوایی گرم و خشک در فصل تابستان جمع‌آوری شدند. فاصله درختان ۵×۴ بود و عملیات داشت همچون آبیاری، کوددهی و مبارزه با آفات و بیماری‌ها براساس استاندارد و نیاز درختان صورت پذیرفت. میوه‌ها ابتدا با آب معمولی و سپس با آب مقطر استریل آن‌ها را شستشو داده شدند. سپس در زیر سایه و به صورت هواخشک و به دور از نور مستقیم خشک گردیدند. میوه‌های خشک شده با دستگاه آسیاب به پودر تبدیل شدند. به ازای هر ۱۰۰ ml آب، ۱۰ g پودر زیتون تلخ به آب مقطر استریل اضافه و بر روی شیکر به مدت ۲۴ h قرار داده شد. سپس جهت عصاره‌گیری، مخلوط آب و پودر با کاغذ صافی، توسط قیف بوختر و پمپ خلا صاف گردید. سپس برای بدست آوردن پودر عصاره، مایع رد شده از کاغذ صافی را در آن ۴۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ h قرار داده شد. پس از تبخیر آب، پودر باقی‌مانده را جمع‌آوری کرده و در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد، جهت انجام آزمایشات بعدی نگهداری شد (۱۶).

### آزمایش بررسی اثر ضدقارچی

سوسپانسیون قارچی دارای کدورت معادل ۰/۵ مک‌فارلند که تعداد سلول به اندازه  $5 \times 10^6 - 1 \times 10^6$  را داشت، تهیه شد و پس از ایجاد چاهک‌ها، توسط سوآپ بر روی سطح محیط کشت که قبلاً به دمای اتاق رسیده است به طور یکنواخت پخش گردید. سپس پلیت‌ها به مدت ۳ تا ۵ min در محل خود قرار داده شدند تا مایع اضافی آن جذب و به محیط کشت نفوذ کند.

برای این کار، از عصاره و پیتید با حجم ۱۰۰، ۱۵۰، و ۲۰۰  $\mu$ l در چاهک‌ها ریخته شدند و پس از سپری شدن ۴۸ ساعت قطر هاله‌ی بازدارندگی از رشد اندازه‌گیری شد. برای قارچ رشته‌ای موکور عصاره و پیتید به محیط کشت اضافه شدند، به این صورت که پس از اتوکلاو کردن محیط کشت و سرد شدن آن (قبل از بستن محیط)، عصاره و پیتید در حجم‌های ۱۵۰ و ۲۰۰  $\mu$ l به محیط کشت اضافه گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند. برای شاهد از محیط کشت بدون عصاره استفاده شد. در نهایت قطر پرگنه‌ی قارچ اندازه‌گیری و ثبت شد (۱۶).

### تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) قارچ

جهت تعیین MIC و MFC روش میکرودیالوژن به کار گرفته شد. بدین صورت که از محیط کشت PDB (عصاره‌ی سیب‌زمینی را پس از عبور دادن از پارچه‌ی لملل با ۲۰ g دکستروز مخلوط و حجم آن را به یک لیتر رسانده و سپس اتوکلاو انجام شد) و از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. غلظت‌های مختلف از عصاره و پیتید اضافه گردید و سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ h در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. بعد از سپری شدن این زمان، اولین سلولی که هیچ کدورت و رشدی از قارچ در آن دیده نشد را به عنوان MIC گزارش گردید. سپس تمامی سلول‌هایی را که بعد از MIC هیچ گونه کدورت و رشدی در آن‌ها مشاهده نگردیده، مجدداً کشت داده شدند. رقتی را که بعد از کشت مجدد هیچ قارچ رشد نکرد به عنوان MFC گزارش گردید (۱۶).

نظیر اسپرژیلوس نیگار، اسپرژیلوس فلاووس، فوزاریوم اکسی پوروم و رزپوس استلینفر شود (۱۷، ۲۰). همچنین کارپینلا و همکاران ۱۹۹۹ نشان دادند عصاره‌ی حاصل از میوه‌ی زیتون تلخ دارای فعالیت ضد رشد قارچ با MIC بین ۵۰ تا ۳۰۰ mg/ml و کشتن قارچ با MFC بین ۶۰ تا ۵۰۰ mg/ml علیه اسپرژیلوس فلاووس، فوزاریوم مونیلیفورم، میکروسپوروم کانیز و کاندیدا آلبیکنز نشان دادند (۴).

علاوه بر اثر ضدقارچی عصاره‌های گیاهی، روش‌های جایگزین دیگری مانند استفاده از پیتیدهای ضد میکروبی نیز در نظر گرفته شده است. در سال‌های اخیر توجه زیادی از محققان به پیتیدهای ضد میکروبی به دلیل کارایی آن‌ها در برابر عوامل بیماری‌زای مختلف شده است (۱۷). این پیتیدها در طبیعت یافت می‌شوند و از طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها، حشرات، بی‌مهرگان، گیاهان، دوزیستان، پرندگان، ماهی‌ها و سایر پستانداران استخراج می‌شوند. پیتیدهای ضد میکروبی دارای طیف گسترده‌ای از خواص ضد ویروسی، باکتریایی، قارچی و حتی ضد سرطانی بوده که معمولاً تعداد اسید آمینه‌های بین ۱۲ تا ۵۰ دارند، حاوی بار مثبت و دارای ساختار آمفی‌پاتیک می‌باشند. این ترکیبات در یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها متفاوت هستند. پیتیدهای ضد میکروبی در یوکاریوت‌ها به دو دسته‌ی عمده تقسیم‌بندی می‌شوند: ۱- پیتیدهای کاتیونی که شامل سکروپین، دفنسنین، تیونین، پیتیدهای مشتق شده از لاکتوفرین، تاناتین، ترکیبات مشتق شده از هیستون، ماریچ بتا و سایر ساختارهای طبیعی و فعال پروتئینی. ۲- پیتیدهای آنیونی که شامل نوروپیتید، دی‌پیتیدهای آروماتیک، پروتئین‌های باند شده به اکسیژن (۵، ۶، ۱۸، ۲۱). تاناتین یک پیتید کاتیونی نشأت گرفته از حشره‌ی *Podisus maculiventris* می‌باشد که طیف گسترده‌ای از فعالیت را در برابر باکتری‌ها و قارچ‌ها در غلظت‌های فیزیولوژیکی نشان داده است. تاناتین حاوی دو باقیمانده سیستمین ۱۱ و ۱۸ است که یک پل دی‌سولفید تشکیل می‌دهند. تاکنون مطالعات زیادی در مورد فعالیت ضدباکتریایی این پیتید انجام شده است (۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۶، ۲۱). ممرآبادی و همکاران، ۲۰۱۸ اثرات ضد میکروبی پیتید تاناتین را علیه قارچ‌های آلاینده‌ی مواد غذایی نشان دادند (۱۶).

در مطالعات قبلی، اثر تاناتین و عصاره‌های گیاهی بر روی باکتری‌های بیماری‌زای دامی (ورم پستان) شناسایی شد (۱۲، ۱۷، ۲۱). هدف از این مطالعه بررسی تاثیر پیتید تاناتین و عصاره‌ی زیتون تلخ بر روی عوامل قارچی مولد ورم پستان گاو نظیر قارچ‌های کاندیدا پارازیولوزیز، کاندیدا آلبیکنز و گونه‌ی موکور در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

### مواد و روش

#### تهیه پیتید تاناتین

این پیتید بصورت نوترکیب در سلول‌های HEK۲۹۳ بیان شده و از مطالعه قبلی تهیه گردید (۲۱).

#### تهیه عصاره‌ی زیتون تلخ

برای تهیه‌ی عصاره، میوه‌های زیتون تلخ واقع در فضای سبز پردیس دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران با موقعیت جغرافیایی ۵۹ درجه و ۱۵ دقیقه تا ۶۰ درجه و ۳۶ دقیقه طول و ۳۵ درجه و ۴۳ دقیقه تا

### آنالیز آماری

در این مطالعه از طرح کاملا تصادفی با سه تکرار استفاده شد. بمنظور تجزیه آماری داده‌ها شامل قطر هاله عدم رشد قارچ و محدوده رشد قارچ رشته‌ای از واریانس یک طرفه در نرم افزار SAS (ویرایش ۹/۱) توسط مدل خطی تعمیم یافته (GLM) انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی استفاده شد و اختلاف میانگین‌ها در سطح  $P < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

### نتایج

نتایج مربوط به اثرگذاری پیتید تاناتین و عصاره‌ی زیتون تلخ بر روی دو قارچ کاندیدا آلبیکنز و پارازیلووزیز طی مدت ۴۸ ساعت در شکل ۱ نشان داده شده است. بررسی قطر هاله‌ی عدم رشد نشان داد با افزایش میزان تاناتین قطر هاله‌ی عدم رشد در هر دو قارچ کاندیدا آلبیکنز و پارازیلووزیز بطور معنی داری افزایش یافته است ( $p < 0.001$ ) (جدول ۱). مقایسه بین مقادیر مختلف عصاره‌ی زیتون تلخ بر روی دو قارچ کاندیدا آلبیکنز و پارازیلووزیز اثرپذیری معنی داری را با افزایش عصاره بر روی هر دو قارچ نشان داد ( $p < 0.001$ ) (جدول ۱).

اثر عصاره‌ی زیتون تلخ و تاناتین بر روی قارچ رشته‌ای موکور در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد مقادیر اعمال شده از عصاره‌ی

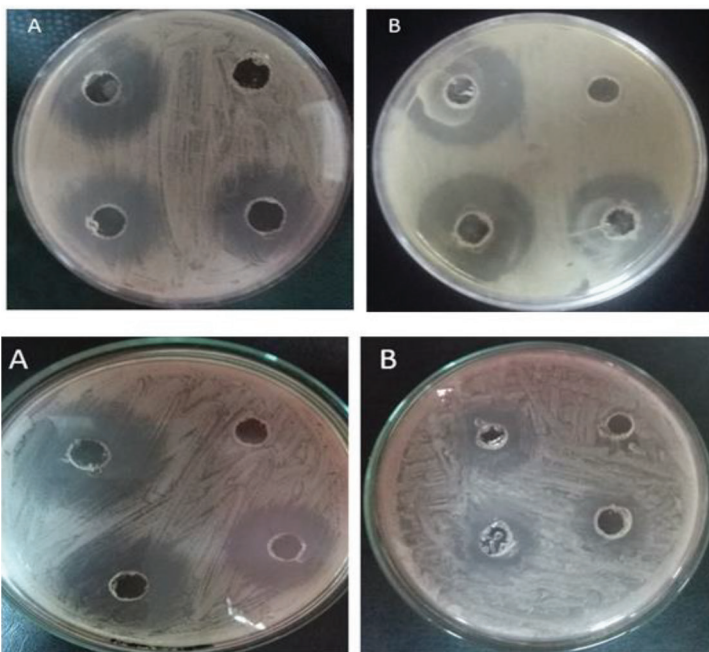
زیتون تلخ بر رشد موکور بی‌تاثیر بود در حالی که تاناتین مانع از رشد این قارچ گردید (جدول ۲).

بررسی میزان MIC و MFC بصورت جدول ۳ می‌باشد. نتایج نشان داد تاناتین با کمترین میزان بر کاندیدا آلبیکنز و پارازیلووزیز موثر است. عصاره‌ی زیتون تلخ با میزان MIC برابر با  $6250 \mu\text{g/ml}$  و MFC برابر با  $12500 \mu\text{g/ml}$  بیشترین اثر را بر روی قارچ کاندیدا پارازیلووزیز داشت. غلظت‌های اعمال شده عصاره‌ی زیتون تلخ بر قارچ رشته‌ای موکور بی‌تاثیر بود در حالی که تاناتین بر روی این قارچ اثر گذار بود.

### بحث

ورم پستان به عنوان یکی از مشکلات بهداشتی بسیار مهم عامل بیشترین ضرر اقتصادی و مصرف وسیع آنتی‌بیوتیک‌ها در گاو‌داری‌های شیری است. اگرچه درمان آنتی‌بیوتیکی معمولاً برای کنترل ورم پستان باکتریایی به کار می‌رود اما تجویز آن بدون بررسی عامل ایجاد کننده‌ی ورم پستان، گسترش مقاومت‌های دارویی و باقیمانده آن‌ها در شیر، گوشت و انتقال این سویه‌ها به انسان را نیز افزایش می‌دهد. لذا، محققین در جستجوی مواد جدید ضد میکروبی و محرک‌های ایمنی جهت جایگزینی هستند. قارچ‌ها جز دسته‌ای از ارگانسیم‌های ایجادکننده‌ی ورم پستان هستند که کنترل آن‌ها اجتناب‌ناپذیر است (۸). متداول‌ترین روش برای

تاناتین زیتون تلخ



کاندیدا پارازیلووزیز

کاندیدا آلبیکنز

شکل ۱- قطر هاله‌ی رشد باکتری تحت تاثیر عصاره زیتون تلخ و تاناتین بر روی دو قارچ کاندیدا آلبیکنز و پارازیلووزیز.

A: گروه تیمار شده با مقادیر ۱۰۰، ۱۵۰ و  $200 \mu\text{l}$  تاناتین.

B: گروه تیمار شده با مقادیر ۱۰۰، ۱۵۰ و  $200 \mu\text{l}$  عصاره زیتون تلخ.

بیماری‌زای قارچی در برابر بسیاری از این داروهای شیمیایی مقاوم می‌شوند (۱۰). در نتیجه، توجه بسیاری از محققان به سایر گزینه‌ها و مواد کم‌ضرر با فعالیت ضدقارچی جلب شده است. به عنوان مثال،

مه‌پاتوژن‌های قارچی استفاده از ترکیبات شیمیایی است که به عنوان آلاینده‌های محیطی و همچنین تهدیدهای بالقوه برای سلامت انسان و محیط زیست در نظر گرفته می‌شوند (۱، ۱۷). علاوه بر این، عوامل

جدول ۱- آنالیز قطر هاله‌ی عدم رشد (mm) دو قارچ کاندیدا آلبیکنز و پارازیلوویز تیمار شده با مقادیر مختلف تاناتین و عصاره‌ی زیتون تلخ.

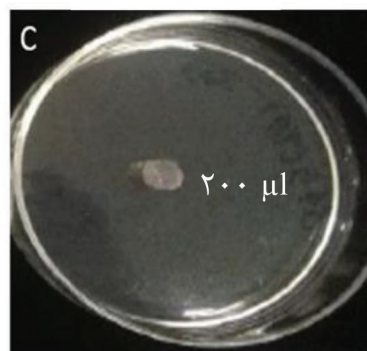
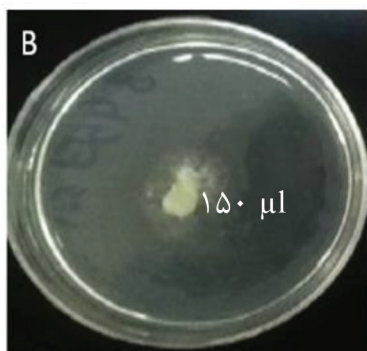
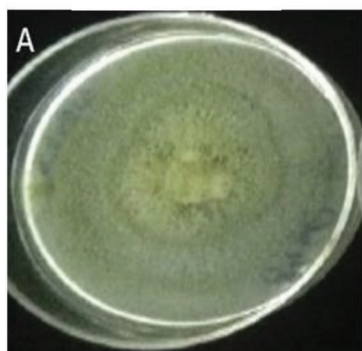
P value	تاناتین (µl)			باکتری
	۲۰۰	۱۵۰	۱۰۰	
< . . . ۱	۳۵/۳۳ ± ۰/۵ <sup>c</sup>	۳۱ ± ۰/۵ <sup>b</sup>	۲۴/۶۶ ± ۰/۵ <sup>a</sup>	کاندیدا آلبیکنز
< . . . ۱	۳۱/۳۳ ± ۰/۸ <sup>c</sup>	۲۴ ± ۰/۸ <sup>b</sup>	۲۰/۳۳ ± ۰/۸ <sup>a</sup>	کاندیدا پارازیلوویز
P value	عصاره‌ی زیتون تلخ (µl)			
	۲۰۰	۱۵۰	۱۰۰	
< . . . ۱	۲۵/۰۰ ± ۰/۵ <sup>c</sup>	۱۹/۶۶ ± ۰/۵ <sup>b</sup>	۱۵/۳۳ ± ۰/۵ <sup>a</sup>	کاندیدا آلبیکنز
< . . . ۱	۳۰/۶۶ ± ۰/۶ <sup>c</sup>	۲۵/۳۳ ± ۰/۶ <sup>b</sup>	۲۱/۶۶ ± ۰/۶ <sup>a</sup>	کاندیدا پارازیلوویز

a-c میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک برای اثر تیمارها اختلاف معنی‌داری دارند.

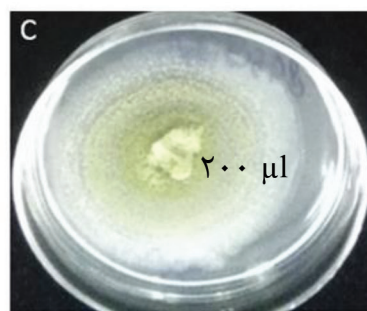
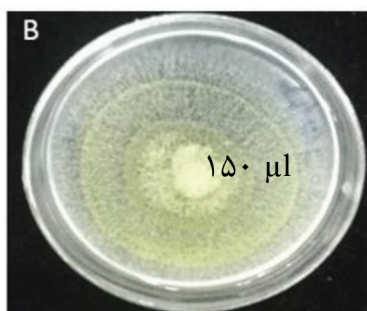
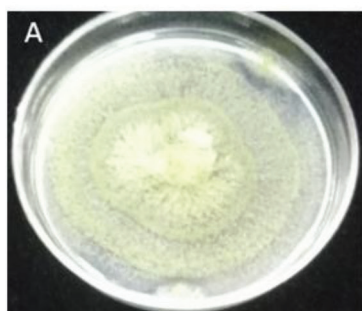
تیمار ۲

تیمار ۱

شاهد



تاناتین



زیتون تلخ

شکل ۲- تاثیر زیتون تلخ و تاناتین بر روی قارچ رشته‌ای گونه‌ی موکور.

A: گروه شاهد B: قارچ تیمار شده با ۱۵۰ µl تاناتین (عکس بالا) و عصاره‌ی زیتون تلخ (عکس پایین) C: قارچ تیمار شده با ۲۰۰ µl تاناتین.

(عکس بالا) و عصاره‌ی زیتون تلخ (عکس پایین).

ناخوشایند داروهای شیمیایی نظیر ایجاد مقاومت دارویی می‌توان چشم‌انداز روشنی برای این ترکیبات برای کمک به فرآیند درمان بیماری‌های دامی با منشا قارچی و باکتریایی تصور کرد. اگرچه این مطالعه با محدودیت‌هایی نیز همراه بود که می‌توان به عدم بررسی ماده موثره عصاره زیتون تلخ و غلظت آن، عدم بررسی اثرات هم افزایی پتیتد و عصاره و همچنین عدم انجام کارآزمایی بالینی جهت رسیدن به نتایجی عملی اشاره کرد. امید است در آینده بتوان به بررسی‌های بیشتر در این زمینه پرداخت. این مطالعه ثابت کرد که عصاره زیتون تلخ و پتیتد تاناتین می‌توانند فعالیت ضدقارچی مناسبی را علیه عوامل ورم پستان گاو مانند کاندیدا پارازیلوزیز، کاندیدا آلبیکنز و گونه‌ی موکور در شرایط آزمایشگاهی نشان دهند.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد، شماره گرنت 2/47173 انجام گرفت.

### منابع مورد استفاده

- 1- Adam, K., A. Sivropoulou, S. Kokkini, T. Lanaras and M. Arsenakis. 1998. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 1739-1745.
- 2- Barkema, H. W., M. Green, A. J. Bradley and R. Zadoks. 2009. Invited review: The role of contagious disease in udder health. *Journal of dairy science* 92: 4717-4729.
- 3-Bolourchi, M., Mokhber Dezfouli, M. R., Kasravi, R., Moghimi Esfandabadi, A., & Hovarashti, P. (2008). An estimation of national average of milk somatic cell count and production losses due to sub-

چندین مطالعه در مورد استفاده از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی برای مهار عوامل بیماری‌زای قارچی انجام شده است (۱۹). در مطالعه حاضر، فعالیت ضدقارچی عصاره گیاهی زیتون تلخ و پتیتد تاناتین در برابر عوامل بیماری‌زای قارچی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از این پژوهش فعالیت ضدقارچی عصاره زیتون تلخ را تأیید کرد. ممرآبادی و همکاران ۲۰۱۸ فعالیت ضدقارچی عصاره زیتون تلخ را با MIC بین ۱۲۵۰۰ تا ۵۰۰۰  $\mu\text{g/ml}$  علیه جنوتریکوم کاندیدیوم، بوتریتیس سیزه، ریزوکتونیا سولانی، آلتناریا تنوزیما و گیرلا فوجیکوری گزارش کردند که همسو با مطالعه‌ی حاضر بود (۱۶). پیشنهاد دیگر استفاده از پتانسیل پتیتدهای ضد میکروبی است (۷). از این نظر، تاناتین یکی از مناسب‌ترین پتیتدهای ضد میکروبی است که در این پژوهش سعی شد به عنوان یک ترکیب امیدوارکننده برای کنترل پاتوژن‌های قارچی ارائه شود. کوچ و همکاران ۲۰۱۲ گزارش کردند تاناتین در غلظت  $10 \mu\text{M}$  بر روی قارچ تولیدکننده‌ی میکوتوکسین (متابولیت‌های ثانویه‌ی سمی قارچ‌های رشته‌ای) فوزاریوم گرامینیوم موثر است (۱۴). ممرآبادی و همکاران ۲۰۱۸ فعالیت ضدقارچی تاناتین را علیه جنوتریکوم کاندیدیوم، بوتریتیس سیزه، ریزوکتونیا سولانی، آلتناریا تنوزیما و گیرلا فوجیکوری در غلظت‌های بسیار پایین ثابت کردند (۰/۶ تا  $2/4 \mu\text{g/ml}$ ) که همراستا با نتایج این مطالعه بود. در مطالعه تاناتین و عصاره زیتون تلخ به ترتیب در محدوده‌ی  $1/5-0/75 \mu\text{l}$  و  $25000-6250 \mu\text{l}$  حداقل کشندگی خود را علیه قارچ‌های مولد ورم پستان نظیر کاندیدا آلبیکنز، پارازیلوزیز و موکور نشان دادند. ویژگی‌های ارزشمند تاناتین، مانند غیرآلرژی‌زا بودن (۲۲)، این پتیتد را به عنوان نامزد خوبی در برابر عوامل بیماری‌زای قارچی کرده است (۲۳)، همچنین لازم به ذکر است که هزینه تولید این پتیتد ضد میکروبی با داروهای شیمیایی قابل مقایسه نیست (۱۶). با توجه به فعالیت ضدقارچی و ضدباکتریایی (۱۶، ۱۲) تاناتین و عصاره زیتون تلخ و سازگاری آن با سلامت و ایمنی محیطی در مقایسه با اثرات

جدول ۲- آنالیز محدوده‌ی رشد قارچ موکور (mm) تیمار شده با مقادیر مختلف تاناتین.

P value	مقادیر ( $\mu\text{l}$ )			رشد قارچ موکور (mm)
	۲۰۰	۱۵۰	۰	
< ۰.۰۰۱	$0 \pm 0/5^c$	$7 \pm 0/5^b$	$41/6 \pm 0/2^a$	

a-c میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک برای اثر تیمارها اختلاف معنی‌داری دارند.

جدول ۳- میزان MIC و MFC ( $\mu\text{g/ml}$ ) تاناتین و عصاره زیتون تلخ بر روی کاندیدا آلبیکنز، پارازیلوزیز و موکور.

گونه‌ی موکور		کاندیدا آلبیکنز				کاندیدا پارازیلوزیز					
زیتون تلخ		تاناتین		زیتون تلخ		تاناتین		زیتون تلخ		تاناتین	
MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC
-	-	۳	۱/۱۲۵	۲۵۰۰۰	۱۲۵۰۰	۱/۵	۰/۷۵	۱۲۵۰۰	۶۲۵۰	۱/۵	۰/۷۵

- clinical mastitis in commercial dairy herds in Iran. *Journal of Veterinary Research*, 63(3), 263-266.
- 4- Carpinella, M. a. C., G. G. Herrero, R. A. Alonso and S. M. Palacios. 1999. Antifungal activity of Melia azedarach fruit extract. *Fitoterapia* 70: 296-298.
- 5- Daneshmand, A., H. Kermanshahi, M. H. Sekhavati, A. Javadmanesh and M. Ahmadian. 2019. Antimicrobial peptide, cLF36, affects performance and intestinal morphology, microflora, junctional proteins, and immune cells in broilers challenged with E. coli. *Scientific reports* 9: 1-9.
- 6- Daneshmand, A., H. Kermanshahi, M. H. Sekhavati, A. Javadmanesh, M. Ahmadian, M. Alizadeh and A. Aldawoodi. 2020. Effects of cLFchimera peptide on intestinal morphology, integrity, microbiota, and immune cells in broiler chickens challenged with necrotic enteritis. *Scientific Reports* 10: 1-11.
- 7- Datta, A., A. Ghosh, C. Airoidi, P. Sperandeo, K. H. Mroue, J. Jiménez-Barbero, P. Kundu, A. Ramamoorthy and A. Bhunia. 2015. Antimicrobial peptides: insights into membrane permeabilization, lipopolysaccharide fragmentation and application in plant disease control. *Scientific reports* 5: 11951.
- 8- Dworecka-Kaszak, B., A. Krutkiewicz, D. Szopa, M. Kleczkowski and M. Biegańska. 2012. High prevalence of Candida yeast in milk samples from cows suffering from mastitis in Poland. *The Scientific World Journal* 2012, 5.
- 9- Gomes, M. Z., R. E. Lewis and D. P. Kontoyiannis. 2011. Mucormycosis caused by unusual mucormycetes, non-Rhizopus, Mucor, and Lichtheimia species. *Clinical Microbiology Reviews* 24: 411-445.
- 10- Hahn, M. 2014. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: Botrytis as a case study. *Journal of chemical biology* 7: 133-141.
- 11- Imamura, T., K.-T. Sekine, T. Yamashita, H. Kusano and H. Shimada. 2016. Production of recombinant thanatin in watery rice seeds that lack an accumulation of storage starch and proteins. *Journal of Biotechnology* 219: 28-33.
- 12- Javadmanesh, A., Z. Mousavi, A. Tanhaeian, M. Azghandi. 2019. Comparison of antimicrobial activity of thanatin peptide with two cinnamon and oregano essential oils on farm animal's pathogenic bacterial isolates. *Veterinary Researches & Biological Products*, 33(1): 47-53. (In Farsi).
- 13- Javadmanesh, A., A. Tanhaeian, S. Z. Mousavi and M. Azghandi. 2018. Investigation of recombinant thanatin effects on the growth inhibition of E. coli mastitis in dairy cows. The 2nd International Congress on Biomedicine.
- 14- Koch, A., W. Khalifa, G. Langen, A. Vilcinskas, K. H. Kogel and J. Imani. 2012. The antimicrobial peptide thanatin reduces fungal infections in Arabidopsis. *Journal of Phytopathology* 160: 606-610.
- 15- Koul, O., J. S. Multani, S. Goomber, W. M. Daniewski and S. Berlozecki. 2004. Activity of some nonazadirachtin limonoids from Azadirachta indica against lepidopteran larvae. *Australian Journal of Entomology* 43: 189-195.
- 16- Mamarabadi, M., A. Tanhaeian and Y. Ramezany. 2018. Antifungal activity of recombinant thanatin in comparison with two plant extracts and a chemical mixture to control fungal plant pathogens. *AMB Express* 8: 180.
- 17- Mousavi, Z., F. Mohammadi, A. Tanhaeian. 2020. Antibacterial effect of essential oil and peptide on some bovine mastitis bacteria in vitro. *Veterinary Researches & Biological Products*, Accepted. (In Farsi).
- 18- Roshanak, S., F. Tabatabaei Yazdi, A. Javadmanesh and J. Movaffagh. 2020. Evaluation of Antimicrobial Activity of Buforin I and Nisin and Synergistic Effect of the Combination of them as a Novel Antimicrobial Preservative Evaluation Synergistic Effect of Buforin I and Nisin. *Journal of Food Protection*. 83 (11): 2018-2025.
- 19- Sales, M. D. C., H. B. Costa, P. M. B. Fernandes, J. A. Ventura and D. D. Meira. 2016. Antifungal activity of plant extracts with potential to control plant pathogens in pineapple. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6: 26-31.
- 20- Sen, A. and A. Batra. 2012. In vivo and in vitro comparative study of total phenol content and antioxidant activity of Melia azedarach. *Journal of Pharmaceutical Research* 5: 47-50.
- 21- Tanhaeian, A., M. Azghandi, Z. Mousavi and A. Javadmanesh. 2020. Expression of Thanatin in HEK293 Cells and Investigation of its Antibacterial Effects on Some Human Pathogens. *Protein and Peptide Letters* 27: 41-47.
- 22- Wu, G., X. Li, X. Fan, H. Wu, S. Wang, Z. Shen and T. Xi. 2011. The activity of antimicrobial peptide S-thanatin is independent on multidrug-resistant spectrum of bacteria. *Peptides* 32: 1139-1145.
- 23- Wu, T., D. Tang, W. Chen, H. Huang, R. Wang and Y. Chen. 2013. Expression of antimicrobial peptides thanatin (S) in transgenic Arabidopsis enhanced resistance to phytopathogenic fungi and bacteria. *Gene* 527: 235-242.

