بررسی خاصیت ضد باکتریایی(in vitro) برخی گیاهان دارویی بر جدایه‌های بیماری‌زای استرپتوکوکوس اینیایی

، سید عبدل حبیبی[۱]، مهدی سلطانی[۱]، سهراب احمدی وند[۱*]علی طاهری میرقائد[۱]

۱- گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۲۶ آذر ۱۳۹۷، بازنگری: ۲۰ بهمن ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۷ اسفند ۱۳۹۷

چکیده

استرپتوکوکوس اینیایی عامل بیماری استرپتوکوکوزیس، یک بیمارگر زئونوز است که باعث خسارات زیادی به صنعت آبزی پروری در بسیاری از کشورها از جمله ایران گردیده است. در مطالعه کنونی اثرات ضد باکتریایی اسانس‌های آویشن باغی(*Thymus vulgaris*)، پونه (*Mentha longiflora*) و زیره سیاه (*Carum carvi*) بر دو جدایه بیماری‌زای *استرپتوکوکوس اینیایی* با روش رقیق‌سازی در محیط مایع و جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی و سپس با روش دیسک با آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین و انروفلوکساسین مقایسه شدند. بر اساس نتایج حداقل غلظت مهار رشد (MIC) اسانس آویشن باغی، پونه و زیره سیاه برای این باکتری به ترتیب ۰/۸، ۰/۸ و ۰/۸-۱/۶ میکرولیتر بر میلی‌لیتر و همچنین حداقل غلظت باکتری کشی(MBC) اسانس‌ها به ترتیب ۰/۸، ۱/۶ و ۱/۶میکرولیتر بر میلی‌لیتر می‌باشد. بعلاوه براساس نتایج جذب نوری روند رشد جدایه‌های باکتری با افزایش غلظت اسانس‌ها کاهش یافته به طوریکه در غلظت‌های MIC و بالاتر تقریباً رشد آنها متوقف شده است. همچنین در روش دیسک میزان قطر هاله عدم رشد ناشی از اسانس آویشن باغی به طور معنی‌داری بیشتر از دیگر اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین و انروفلوکساسین بود. به طور خلاصه نتایج این آزمایش بیانگر خاصیت ضد باکتری مناسب آویشن باغی بوده و پیشنهاد می‌گردد برای کنترل و درمان بیماری استرپتوکوکوزیس در مزارع قزل‌آلا ارزیابی گردد.

کلمات کلیدی: *اسانس گیاهی، استرپتوکوکوزیس، قزل آلا، MBC ، MIC*

* نویسنده مسئول: mirghaed@ut.ac.ir

مقدمه

استرپتوکوکوس اینیایی عامل بیماری فوق حاد و سیستمیک باکتریایی استرپتوکوکوزیس است که سبب بروز خسارات اقتصادی فراوان به صنعت آبزی پروری در بخش وسیعی از جهان از جمله ایران می‌گردد به طوری که تاکنون در بیش از ۳۰ گونه ماهیان آب شیرین، شور و لب شور گزارش شده و حتی به عنوان بیمارگر زئونوز سبب بروز عفونت درانسان نیز می‌شود (۳-۱).

استرپتوکوکوس اینیایی متعلق به جنس استرپتوکوکوس یکی از جنس‌های خانواده استرپتوکوکاسه، یک کوکسی گرم مثبت به‌صورت دو تایی یا زنجیره‌ای و گاهی چند شکلی است که در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کند و اغلب بی‌هوازی اختیاری و به صورت غیرمتحرک است که سویه‌های دارای کپسول از حدت بیشتری برخوردارند (۱، ۲).

استرپتوکوکوزیس می‌تواند در مدت ۳ تا ۷ روز باعث تلفات بیش از ۵۰ درصد در جمعیت‌های ماهی شود، اگرچه در بعضی موارد شیوع آن به شکل مزمن بوده و با تعدادی کمی تلفات روزانه در مدت بیش از چندین هفته همراه است (۳-۱). با این وجود خسارات و زیان‌های ناشی از این بیماری بسیار بالا می‌باشد به طوری که فقط در آمریکا خسارت سالیانه آن ۱۰ میلیون و در جهان ۱۰۰ میلیون دلار برآورد شده است (۴).

بیماری استرپتوکوکوزیس از سال ۲۰۰۲ به طور پیوسته از مزارع قزل آلای ایران نیز گزارش شده و مهم‌ترین بیماری باکتریایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (Oncorhynchus mykiss) است که تاکنون باعث بروز تلفات سنگین در مزارع پرورشی کشور شده است (۳، ۵، ۶). در حال حاضر از جمله روش‌های مرسوم مقابله با این بیماری‌ها استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها ازجمله انروفلوکساسین و اریترومایسین (۲) و در برخی موارد استفاده از واکسن‌ها می‌باشد (۷).

از مهم‌ترین عوامل محدودکننده استفاده از آنتی بیوتیک‌ها، ظهور بیمارگرهای مقاوم به آنها در ماهی و انسان است (۸). علاوه بر این، آنتی بیوتیک‌ها سبب کشته شدن باکتری‌های مفید در لوله گوارش میزبان شده و همچنین به خاطر تجمع در محصول نهایی سبب بروز مشکلات سلامتی در مصرف‌کننده می‌گردند (۸، ۹). بنابراین یافتن راه‌های پیشگیری و درمان مناسب برای به حداقل رساندن خسارات اقتصادی ناشی از تلفات این بیماری در مزارع پرورش ماهی و نیز کاهش مشکلات ناشی از مصرف گسترده آنتی‌بیوتیک‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

در سال‌های اخیر اثرات گیاهان دارویی علیه بسیاری از بیمارگرهای باکتریایی آبزیان مورد ارزیابی قرار گرفته است و به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها مطرح می‌باشند (۱۲-۱۰). مواد مؤثره موجود در گیاهان دارویی به دلیل همراه بودن آنها با مواد دیگر پیوسته از یک حالت تعادل بیولوژیک برخوردار می‌باشد و به همین دلیل در بدن انباشته نشده و اثرات جانبی به بار نمی‌آورند و برتری قابل ملاحظه‌ای نسبت به داروهای شیمیایی دارند (۱۳).

مطالعه کنونی برای ارزیابی اثرات ضد باکتریایی اسانس‌های آویشن باغی، پونه معطر و زیره سیاه بر جدایه‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* انجام شد. بدین منظور حداقل غلظت باکتری کشی (MIC) و حداقل غلظت مهار رشد (MBC) با استفاده از روش میکرودایلوشن تعیین و همچنین قطر هاله عدم رشد باکتری ناشی از اسانس‌ها با آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین و انروفلوکساسین به روش دیسک کاغذی مقایسه گردید. بعلاوه الگوی رشد باکتری در غلظت‌های مختلف اسانس‌ها با استفاده از جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر ارزیابی گردید.

مواد و روش

اسانس‌ها: اسانس‌های آویشن باغی(*Thymus vulgaris*)، پونه (*Mentha longiflora*) و زیره سیاه (*Carum carvi*) مورد استفاده در این مطالعه به روش steam distillation تهیه شدند (۱۰،۱۲).

باکتری: جهت انجام بررسی کنونی ابتدا دو جدایه بیماری‌زای باکتری گرم مثبت *استرپتوکوکوس اینیایی* K11 (HM055572) و Z1 (HM055574) جداسازی شده از مزارع قزل آلای کشور، از قطب بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شدند. باکتری‌ها در شرایط استریل بر روی محیط ژلوز خون دار کشت داده شده و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. سپس از کلونی‌های رشد یافته ابتدا رنگ آمیزی گرم تهیه و پس از اطمینان از خلوص پرگنه و تعیین مورفولوژی و نوع رنگ آمیزی گرم تجدید کشت ثانویه به عمل آمد و در نهایت پرگنه‌های مناسب برای آزمایشات بعدی انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند. برخی مشخصات ریخت شناسی جدایه‌های باکتری در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- برخی مشخصات فنوتیپیکی جدایه‌های باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی*

مشخصه باکتری	*Z1*	*K11*
شکل باکتری	کوکسی	کوکسی
گرم	+	+
کاتالاز	-	-
اکسیداز	-	-
اندول	-	-
احیاء نیترات	-	-
H_2S	-	-
VP	-	-
آرابینوز و اینوزیتول	-	-
نوع همولیز	*α*	*α*
آرژنین	+	+
سوربیتول	-	-
رشد در pH بین ۵-۹/۵	+	+
رشد در ۶/۵ درصد نمک سدیم	-	-
دمای رشد بین ۴۰-۱۵ درجه سانتی گراد	+	+

تعیین مقادیر حداقل غلظت مهار رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC): برای تعیین حداقل غلظت مهار رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) اسانس‌ها از روش میکرودایلوشن استفاده شد (۱۰، ۱۲، ۱۴). بدین منظور رقت‌های متوالی از اسانس‌های تهیه شده در محیط TSB و در محدوده ۱۲/۸-۰/۱ میکرولیتر بر میلی لیتر تهیه شد و سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده با غلظت نهایی cfu/ml ۱۰۸ × ۳ (معادل یک مک فارلند) به صورت جداگانه به محیط‌ها اضافه شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت از انکوباسیون در دمای ۲۵درجه سانتیگراد ، کمترین رقتی که در آن هیچ باکتری رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) در نظر گرفته شد. همچنین به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)، در شرایط کاملاً استریل از همه لوله‌های فاقد کدورت ۱۰ میکرولیتر از لوله‌های حاوی محیط کشت برداشته و روی محیط ژلوز خون کشت داده شد، پس از گذشت ۲۴ ساعت از انکوباسیون، MBC با

مشاهده تعداد کلونی‌ها به دست آمد (۱۰، ۱۲، ۱۴).

الگوی رشد باکتری (جذب نوری): برای مطالعه الگوی رشد باکتری‌ها، به میزان ۱۰ میکرولیتر (3×10^8 cfu/ml) از هر یک از جدایه‌ها به محیط TSB حاوی رقت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۶ هر یک اسانس‌ها اضافه شد. سپس رشد باکتری‌ها در زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت پس از تلقیح در دمای ۲۵ درجه با بررسی میزان جذب نوری (در طول موج ۶۰۰ نانومتر) توسط اسپکتوفتومتر بررسی شد (۱۰). یک تیمار شاهد نیز برای سنجش میزان رشد باکتری در محیط نرمال فاقد اسانس استفاده گردید.

تعیین قطر هاله عدم رشد به روش دیسک: برای مطالعه اثر ضد باکتریایی اسانس‌ها بر علیه جدایه‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* از روش دیسک کاغذی استفاده شد (۱۰، ۱۲، ۱۴). بدین منظور مقدار ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی ($1/5\times10^8$ cfu/ml، معادل نیم مک فارلند) بر روی پلیت ژلوز خون کشت داده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از هر یک از اسانس‌ها بر روی دیسک‌های کاغذی اضافه و همراه با دیسک‌های استاندارد آنتی‌بیوتیک اریترومایسین و انروفلوکساسین و بر روی محیط کشت قرار داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند. در قطر هاله عدم رشد هریک از اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده بر روی جدایه‌های باکتری مورد مطالعه در ۳ تکرار بررسی و مقایسه شد.

آنالیز آماری: داده‌های به دست آمده به صورت میانگین ± انحراف معیار در سطح ۹۵ درصد ($p<0/05$) و توسط آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج

حداقل غلظت مهار رشد(MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی(MBC): نتایج حاصل از آزمایش‌های تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی(MIC) و نیز حداقل غلظت کشندگی(MBC) اسانس‌های آویشن باغی، پونه و زیره سیاه بر روی جدایه‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* در جدول ۲ ارائه شده است. میزان MIC هر سه اسانس آویشن باغی و پونه برای هر دو جدایه باکتری به صورت یکسان ۰/۸ میکرولیتر بر میلی‌لیتر به دست آمد. در حالی که میزان MIC اسانس زیره سیاه برای جدایه‌های K11 و Z1 متفاوت بوده و به ترتیب ۱/۶ و ۰/۸ میکرولیتر بر میلی لیتر اندازه گیری شد ($p<0/05$). با این وجود میزان MBC برای هر دو جدایه مشابه بوده و اسانس آویشن باغی با حداقل غلظت باکتری‌کشی ۰/۸ میکرولیتر بر میلی‌لیتر بیشترین تاثیر را نشان داد. میزان MBC دو اسانس پونه و زیره سیاه برای هر دو جدایه باکتری به صورت مشابه ۱/۶ میکرولیتر بر میلی‌لیتر بوده و از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با آویشن باغی نشان دادند ($p<0/05$).

الگوی رشد باکتری: اثر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن باغی بر الگوی رشد جدایه‌های باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* در طول موج ۶۰۰ نانومتر در شکل ۱ ارائه شده است. براساس نتایج روند رشد جدایه‌های باکتری با افزایش غلظت اسانس‌ها کاسته شده به طوری که در غلظت‌های MIC و بالاتر تقریباً رشد آنها متوقف شده است. همچنین در غلظت‌های کمتر از MIC با گذشت زمان بر میزان رشد باکتری افزوده شده است. بعلاوه آویشن باغی و زیره سیاه به ترتیب بیشترین و کمترین تأثیر را بر روند رشد جدایه‌ها نشان دادند. بعلاوه جدایه K11 کمی مقاوم‌تر از Z1 بود.

جدول ۲- حداقل غلظت مهار رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی(MBC) اسانس‌های آویشن باغی، پونه و زیره سیاه بر روی جدایه‌های باکتری استرپتوکوکوس اینیایی

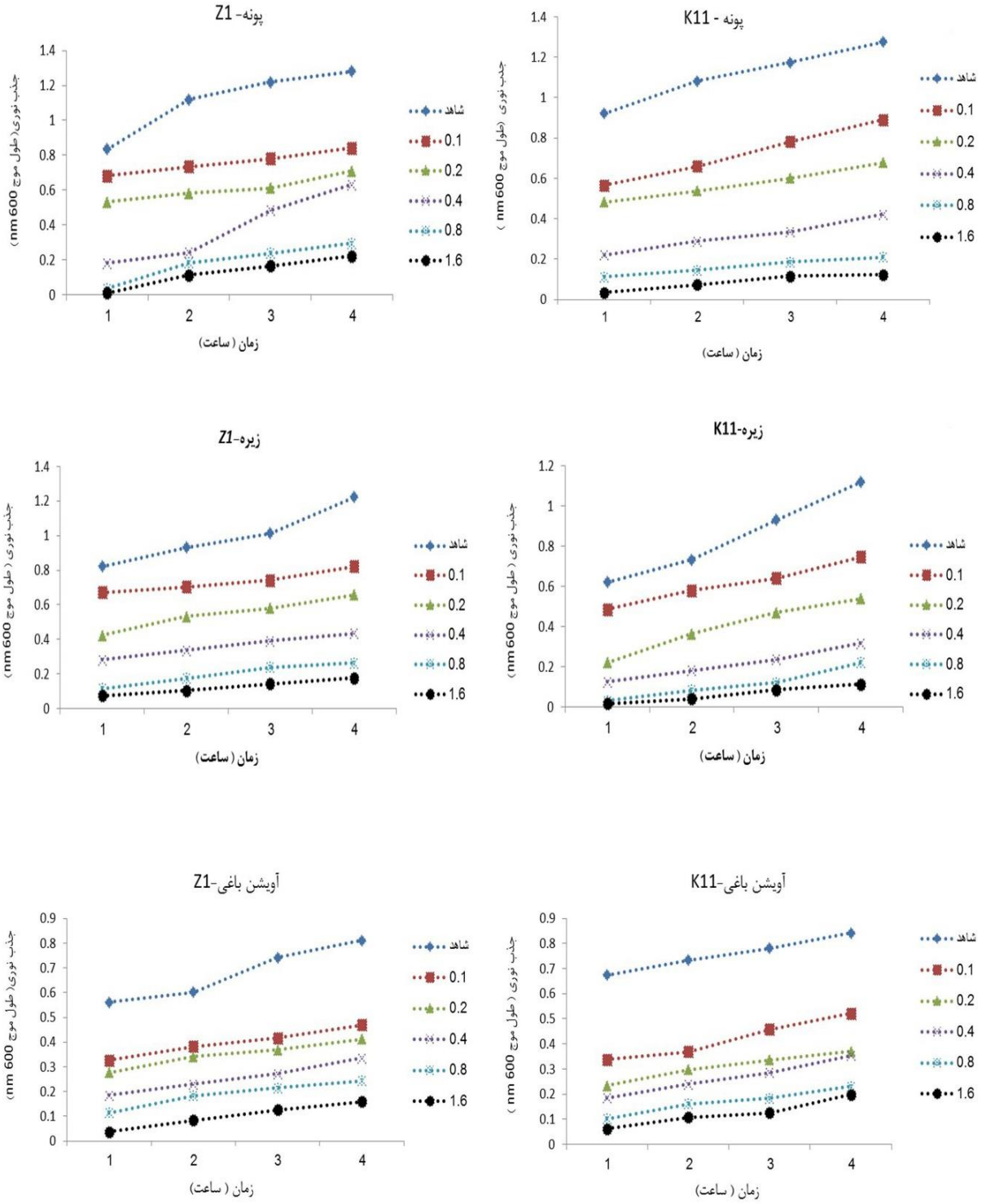
اسانس	سویه باکتری	غلظت (µl/ml)						
		۶/۴	۳/۲	۱/۶	۰/۸	۰/۴	۰/۲	۰/۱
آویشن باغی	K11	–	–	–	MIC MBC	+	+	+
	Z1	–	–	–	MIC MBC	+	+	+
پونه	K11	–	–	MBC	MIC	+	+	
	Z1	–	–	MBC	MIC	+	+	+
زیره سیاه	K11	–	–	MIC MBC	+	+	+	+
	Z1	–	–	MBC	MIC	+	+	+

علامت + و- به ترتیب نشان‌دهنده رشد و عدم رشد باکتری در حضور غلظت‌های مشخص اسانس می‌باشند.

قطر هاله عدم رشد (دیسک): نتایج حاصل از قطر هاله عدم رشد (روش دیسک کاغذی) جدایه‌های باکتری ناشی از هر یک از اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در این آزمایش در نمودار ۲ ارائه شده است. جدایه K11 کمی مقاوم تر از جدایه Z1 بوده و قطر هاله عدم رشد کمتری داشت. همچنین اسانس آویشن باغی بیشترین فعالیت ضد باکتریایی علیه دو جدایه K11 و Z1 به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۳۸±۳ و ۴۰±۲ میلی‌متر را نشان داد که حتی کمی بیشتر از میزان به‌دست آمده برای دو آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین (به ترتیب ۳۰±۲/۵ و ۳۳±۱) و اریترومایسین (به ترتیب ۳۵ ±۱/۵ و ۳۶±۴) بود. در حالی که اسانس زیره سیاه با قطر هاله عدم رشد ۳۱±۴/۵ و ۳۱±۲/۵ میلی‌متر به ترتیب برای جدایه‌های K11 و Z1 کمترین فعالیت ضد باکتریایی را نشان داد. همچنین میزان قطر هاله عدم رشد ناشی از اسانس پونه برای جدایه‌های K11 و Z1 به ترتیب ۱۷±۱/۵ و ۲۳±۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

بحث و نتیجه‌گیری

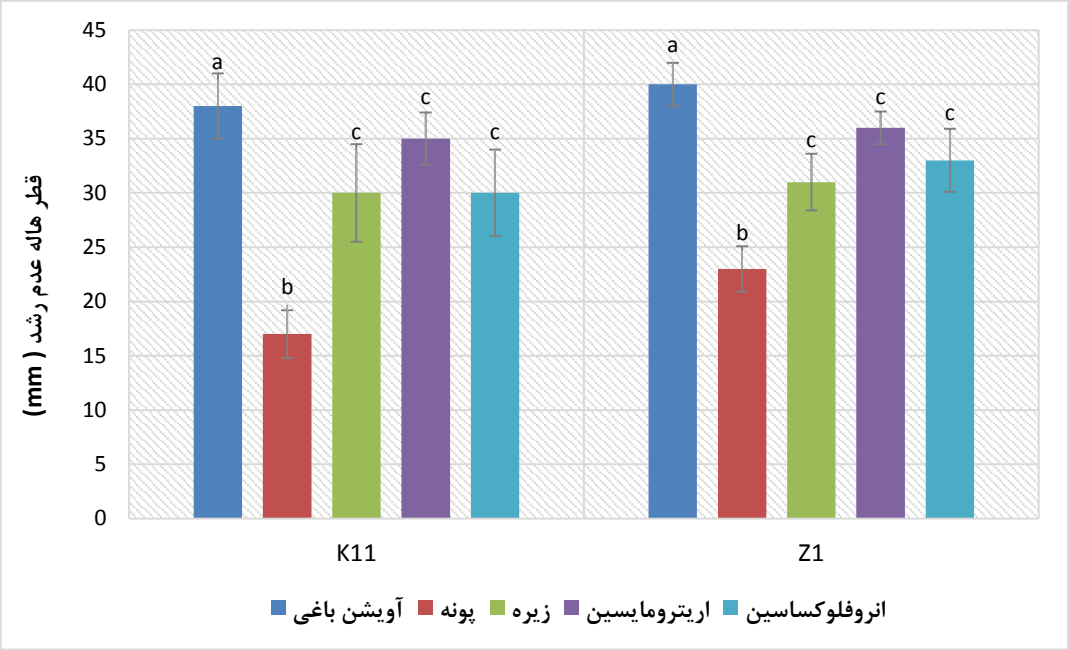
استرپتوکوکوزیس ناشی از باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس اینیایی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های آبزیان است که سبب مرگ و میر بالایی (بیش از ۷۵ درصد) می‌شود و در سطح وسیعی از جهان از جمله ایران گزارش شده است (۳-۱). باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* به عنوان اصلی‌ترین گونه بیماری‌زای مزارع قزل‌آلای کشور مطرح است که باعث خسارات زیادی شده و پیشگیری، کنترل و ریشه‌کنی آن ضروری می‌باشد (۳، ۵، ۶). اگرچه با استفاده از برخی آنتی‌بیوتیک‌ها این بیماری هم اکنون بهبود می‌یابد، اما با توجه به مشکلات فراوان این داروها ازجمله مقاومت باکتریایی و پیامدهای زیست محیطی، تجمع آنتی‌بیوتیک در بدن ماهی و متعاقباً مصرف‌کنندگان ماهی، جایگزین نمودن گیاهان دارویی دارای خاصیت ضد باکتریایی می‌تواند بسیار سودمند باشد (۲، ۱۳).



شکل۱- الگوی رشد جدایه‌های (K11 و Z1) باکتری استرپتوکوکوس اینیایی جداسازی شده از ماهی قزل آلا در حضور غلظت‌های مختلف اسانس‌های آویشن باغی، پونه و زیره سیاه در طول موج ۶۰۰ نانومتر.

در این مطالعه اثرات ضد باکتریایی اسانس‌های آویشن باغی، پونه و زیره سیاه در مقایسه با دو آنتی‌بیوتیک اریترومایسین و انروفلوکساسین بررسی شد که نتایج بیانگر وجود خواص ضد باکتریایی قوی‌تر آویشن باغی نسبت به سایر اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها بود. مشابه با این نتایج اثرات ضد

باکتریایی، قارچی و حتی ضد ویروسی گونه‌های مختلف گیاه آویشن به ویژه آویشن باغی در بسیاری از مطالعات in vitro نشان داده شده است (۱۰، ۱۶، ۱۷). بعلاوه در مطالعات in vivo نیز تأثیر مثبت عصاره آویشن باغی بر میزان رشد و همچنین شاخص‌های خونی قزل‌آلای رنگین کمان گزارش شده است (۱۸).



شکل ۲- قطر هاله عدم رشد جدایه‌های باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* در اثر اسانس‌های آویشن باغی، پونه و زیره سیاه در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های تجاری انروفلوکساسین و اریترومایسین با روش دیسک کاغذی بر روی محیط ژلوز خوندار

بر اساس مشاهدات سلطانی و همکاران (۱۹) با افزایش میزان اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora Boiss*) متعلق به خانواده نعناعیان (*Lamiaceae*)، فعالیت همولیتیک باکتری استرپتوکوکوس اینیایی به دلیل سرکوب تولید استرپتولیزین-اس کاهش نشان داده، اگرچه اسانس به طور کامل سبب غیر فعال شدن باکتری نشده ولی سبب کاهش بیان ژن sag A (مربوط به استرپتولیزین-S) و در نتیجه سبب کاهش تولید توکسین باکتری شده است.

بر اساس مطالعات انجام شده آویشن باغی دیگر عضو خانواده نعناعیان دارای میزان بالایی از ترکیبات فنولی (تیمول) و هیدروکربن‌های ترپنی (گاما ترپینن) و کارواکرول است که تا حدودی توجیه کننده فعالیت ضد باکتریایی این گیاه می باشد (۲۰، ۲۱).

اسانس زیره‌ی سیاه (*C. carvi*) خاصیت آنتی اکسیدان و آنتی باکتریال داشته و اثرات مثبت این گیاه بر رشد ماهی تیلاپیا (۲۲) ، و رشد و فعالیّت ضد باکتریایی موکوس ماهی کپور در برابر دو باکتری گرم منفی (*Serratia marcescens* و *Escherichia coli*) نیز گزارش شده است (۲۳، ۲۴).

در مطالعه حاضر زیره سیاه با حداقل غلظت ممانعت کنندگی ۱/۶-۰/۸ و نیز حداقل غلظت کشندگی ۱/۶ میکرولیتر بر میلی‌لیتر، در مقایسه با سایر اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها کمترین فعالیت ضد باکتریایی علیه جدایه‌های *استر پتو کوکوس اینیایی*

را نشان داد که با نتایج قطر هاله عدم رشد و الگوی رشد نیز هم‌خوانی داشت. اگرچه میزان MIC و MBC به دست آمده کمتر (فعالیت ضد باکتریایی قوی‌تر) از دامنه گزارش شده برای زیره سبز (به ترتیب ۱/۵۶و۳/۱۲) اما بیشتر (فعالیت ضد باکتریایی ضعیف‌تر) از زیره سیاه ایرانی (به ترتیب ۰/۱۵۶ و ۰/۳۱۲) علیه باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* بود (۲۵، ۲۶).

زیره دارای ترکیبات مؤثره کومین آلدئید، گاما ترپینن، پارا سیمن، بتا پینن، آلفا پینن، میرسن و لیمونن می‌باشد، اگرچه میزان هر یک از ترکیبات مؤثره با توجه به گونه، شرایط زیست محیطی و فصلی مناطق رشد گیاه و روش تهیه اسانس و عصاره می‌تواند متفاوت باشد (۲۷، ۲۸). بنابرین نتایج متفاوت به دست آمده در این مطالعه‌ها می‌تواند ناشی از متفاوت بودن میزان هر یک از این ترکیبات مؤثره و همچنین جدایه باکتری به کار برده شده باشد (۲۶).

در رابطه با اثرات ضد باکتری اسانس پونه معطر، در مطالعه‌ای که توسط محبوبی و حقی در سال ۲۰۰۸ صورت گرفت (۲۹)، حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس پونه برای باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، باسیلوس سرئوس و لیستریا مونوسیتوژن، بین ۰/۲۵ تا ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. در مطالعه حاضر نیز، حداقل غلظت مهارکنندگی این اسانس در خصوص باکتری‌های گرم مثبت به کار رفته، در غلظت‌های ۰/۸ و ۱/۶ میکرولیتر بر میلی‌لیتر به دست آمده است.

میزان فعالیت ضد میکروبی بستگی به وجود یا فقدان برخی ترکیبات و میزان آنها در گیاه دارد که می‌تواند تحت تأثیر عوامل زیادی از جمله منطقه جغرافیایی رویش گیاه، واریته گیاهی، سن گیاه در هنگام تهیه اسانس و یا عصاره متغیر باشد (۲۸-۲۶).

پونه دارای ترکیبات مؤثره پونه، منتول، منتون، تیمول، میرسن، پولگن، سینئول و کارون بوده و بر اساس گزارشات اسانس آن در مقایسه با عصاره‌های اتانولی و آبی خواص ضد میکروبی قوی‌تری دارد (۲۹، ۳۰). بنابرین دلیل تفاوت نتایج حاصله می‌تواند به دلیل تفاوت در جنس‌های باکتری و همچنین میزان هر یک از ترکیبات مؤثره گیاه و روش تهیه اسانس و عصاره به کار رفته باشد.

به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که حساسیت جدایه‌های باکتری استرپتوکوکوس اینیایی مورد مطالعه به اسانس آویشن باغی نسبت به سایر اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های تجاری بیشتر بوده و پیشنهاد می‌گردد این اسانس در درمان و پیشگیری بیماری‌های باکتریایی ماهی به ویژه استرپتوکوزیس ارزیابی گردد.

سپاسگزاری

این مطالعه در قالب پایان نامه با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه تهران به اجرا در آمده که نهایت تشکر و قدردانی را اعلام می داریم.

References

1- Agnew W, Barnes A. *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and candidate for reliable vaccination. Vet Microbiol. 2007; 122: 1-15.

2- Austin B, Austin, D A. Bacterial Fish Pathogens*:* Disease in Farmed and Wild. 738. Fish, 4th *edn.* Springer-Praxis, Goldalming, 2007. 739.

3- Soltani M, Jamshidi S, Shafipour I. Streptococcosis caused by Streptococcus iniae in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran: biophysical characteristics and pathogenesis. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 2005; 25:95-106.

4- Shoemaker CA, Klesius PH, Evans JJ. Prevalence of *Streptococcus iniae* in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the United States. Am J Vet Res. 2001; 62: 174-7.

5- Erfanmanesh A, Soltani M, Pirali E, Mohammadian S, Taherimirghaed A. Genetic characterization of Streptococcus iniae in diseased farmed rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Iran. Scientific World Journal. 2012; Article ID 594073, 6 pages. doi: 10.1100/2012/594073.

6- Ahmadivand S, Soltani M, Mardani K, Shokrpoor S, Rahmati-Holasoo H, et al. Isolation and identification of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. Acta Trop. 2016; 156: 30-36.

7- Soltani M, Alishahi M, Mirzargar S, Nikbakht G. Vaccination of rainbow trout against *Streptococcus iniae* infection: comparison of different routes of administration and different vaccines. Iran J Fish Sci. 2007; 7: 129-40.

8- Akinbowale OL, Peng H, Barton MD. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. J. Appl. Microbiol. 2006;100: 1103–1113.

9- MacMillan J. Aquaculture and antibiotic resistance: a negligible public health risk? World Aquaculture. 2001; 32: 49-68.

10- Soltani M, Ghodratnama M, Taheri MA, Zargar A, Rouhollahi SH. The effect of *Zataria multiflora Boiss*. and *Rosmarinus officinalis* essential oil on *Streptococcus iniae* isolated from rainbow trout farms. Journal of Veterinary Microbiology. 2013; 9 (1):1-13. (In Persian).

11- Adel M, Safari R, Ghitanchi AH, Zorriehzahra MJ. Chemical composition and in vitro antimicrobial activity of some Iranian medical herbs against *Yersinia ruckeri*. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 2016; 15(3):1108-1123.

12- Roomiani L, Soltani M, Akhondzadeh Basti A, Mahmoodi A. Effect of *Rosmarinus officinalis* Essential Oil and Nisin on *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae* in a Food Model System, Journal of Aquatic Food Product Technology. 2017; 26 (10): 1189-1198.

13- Van Hai N. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review. Aquaculture. 2015; 446: 88–96.

14- Ahmadivand S, Soltani M, Ahmadpoor M, Eagderi S. Antibacterial effects of Rue (*Ruta graveolens*) extract against pathogenic bacteria (*Lactococcus garvieae & Aeromonas hydrophila*). Journal of breeding and aquaculture. 2015; 3 (6): 11-18. (In Persian).

15- Gonçalves GMS, Bottaro M, Nilson AC. Effect of the Thymus vulgaris essential oil on the growth of *Streptococcus mutans*. Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences. 2011; 32 (3):375-380.

16- Soković M, Glamoclija J, Cirić A, Kataranovski D, Marin PD, Vukojević J, et al. Antifungal activity of the essential oil of Thymus vulgaris L. and thymol on experimentally induced dermatomycoses. Drug Dev Ind Pharm 2008; 34(12): 1388-93.

17- Koch C, Reichling J, Schneele J, Schnitzler P. Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. Phytomedicine. 2008; 15(1-2): 71-8.

18- Azizi E, Yeganeh S, Firouzbakhsh F, Janikhalili K. Effects of dietary Supplemental thyme essence (*Thymus vulgaris L.*) on growth, hematological and serum biochemical parameters of Rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss*). JAIR. 2016; 4 (2):45-61. (In Persian).

19- Soltani M, Ghodratnama M, Ebrahimzadeh-Mosavi HA, Nikbakht-Brujeni G, Mohamadian S, Ghasemian M. Shirazi thyme (*Zataria multiflora Boiss*) and Rosemary (Rosmarinus officinalis) essential oils repress expression of sagA, a streptolysin S-related gene in Streptococcus iniae. Aquaculture. 2014; 430: 248–252.

20- Imelouane B, Amhamdi H, Wathelet JP, Ankit M, Khedid K, El Bachiri A. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. IJAB 2009; 11(2): 205–8.

21- Borugă O, Jianu C, Mişcă C, Goleţ IGruia AT, Horhat FG. *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. J Med Life. 2014; 3:56-60.

22- Ahmad MH, Abdel Tawwab M. The use of caraway seed meal as a feed additive in fish diets: growth performance, feed utilization, and whole-body composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. Aquaculture. 2011. 314: 110-114.

23- Roohi Z, Imanpoor M R, Hajimoradloo A, Salmanian Ghahderijani M. Effect of herbal supplements of caraway (*Carum carvi*) and fenugreek (Trigonella foenum graecum) on antibacterial activity and soluble protein of mucus in *Cyprinus carpio* fingerlings. J. Aqu. Eco. 2016; 6 (1):128-136.

24- Roohi Z, Imanpoor MR, Jafari V, Taghizadeh V. Effect of different levels of caraway on growthperformance and some blood parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Animal Environment. 2015; 7(1): 105-112. (In Persian).

25- Sanchooli N. In Vitro Antibacterial Effects of Essential Oils onSome Fish Pathogenic Bacteria. Journal of Veterinary Microbiology. 2016; 12, (1): 1-10. (In Persian).

26- Mirghaed A, Abiavi T, Hassani F, Shafie Sh. Evaluation of the antibacterial activity of Bunium persicum essential oil against fish bacterial pathogens. J. Aqu. Eco. 2018; 7 (4):159-165. (In Persian).

27- Foroumadi A, Asadipour A, Arabpour RF, Amanzadeh Y. Composition of the essential oil of *Bunium persicum (Boiss*.) from Iran. Journal of Essential Oil Research. 2002; 14: 161-162.

28- Nostro A, Gernano MP, Angelo VA, Marino A, Cannatelli MA. Extraction methods and bio

autography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Lett Appl Microbiol. 2000; 30: 379-384.

29- Mahboubi M, Haghi G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium L.* essential oil. J Ethnopharmacol. 2008; 119(2):325-7.

30- Gaeini Z, Sohrabvandi S, Sobhani R, Soleimani M.. Characteristics of pennyroyal essential oils. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2013; 7 (5) : 661-668. (In Persian).

In vitro Antibacterial Activity of Some Medical Plants against *Streptococcus iniae*

Ali Taheri Mirghaed[1*], Seyed Abdol Habibi [1], Mehdi Soltani [1], Sohrab Ahmadi vand [1]

1- Department of Aquatic Animals Health and Diseases, Veterinary faculty, Univercity of Tehran, Tehran, Iran.

Receive: December 17, 2018; Revise: February 9, 2019; Accept: February 26, 2019

Summary

The zoonotic bacteria *Streptococcus iniae* is the causative agent of streptococcosis associated with serious economic losses in the world aquaculture industry, including Iran. The antimicrobial activities of *Thymus vulgaris*, *Carum carvi*, and *Menthalong flora* essential oils were determined against two pathogenic isolates of *S. iniae* using broth microdilution, and were compared with erythromycin and enrofloxacin antibiotics by disk diffusion assay. Also, bacterial growth was followed by OD at 600 nm**.** The minimum inhibitory concentration (MIC) of the *T. vulgaris, C. carvi,* and *M. flora* essential oils were 0.8, 0.8, and 0.8-1.6 µl/ml; and the minimum bactericidal concentration (MBC) values were found as 0.8, 1.6, and 1.6 µl/ml; respectively. Moreover, the growth of isolates was reduced by increasing essential oils concentration. In addition, disk diffusion assay revealed that the antimicrobial activity of *T. vulgaris* essential oil is significantly higher than the other plants, as well as erythromycin and enrofloxacin antibiotics. These findings support the use of *T. vulgaris* for the control of streptococcosis in trout farms.

Key words: *essential oil, Streptococcusis, trout, MIC, MBC*