JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره نهم، شماره اول، ۱۳۹۲، پیاپی ۲۶: ۱۳-۱

مطالعه تأثیر اسانس آویشن شیرازی(*Zataria multiflora Boiss*) و رزماری (*Rosmarinus officinalis*) بر جدایه‌های استرپتوکوکوس اینیایی جداسازی شده از قزل آلای رنگین کمان

مهدی سلطانی[۱و۲*]، مریم قدرت نما[۱]، علی طاهری میرقائد[۱]، اشکان زرگر[۱]، شقایق روح الهی[۱]

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

۲- قطب علمی بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱ اسفند ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: ۱۶ اردیبهشت ۱۳۹۲

چکیده

هدف از این مطالعه تعیین سروتیپ و کپسول سویه‌های استرپتوکوکوس اینیایی عامل استرپتوکوکوزیس در مزارع قزل آلای کشور و نیز تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی اسانس آویشن شیرازی و رزماری علیه این سویه‌ها بوده است. بعلاوه رفتار رشد برخی از این سویه‌ها در حضور اسانس‌های مذکور مطالعه گردیده است. براساس نتایج، بیشتر سروتیپ‌های عامل استرپتوکوکوزیس در مزارع قزل الای کشور از نوع سروتیپ I بوده و همه آنها دارای کپسول می باشند. نتایج نشان داد که حداقل غلظت ممانعت کنندگی(MIC) اسانس آویشن شیرازی علیه جدایه‌های سروتیپ I و II ۰/۰۶ µl/ml وحداقل غلظت باکتری کشی(MBC) آنها به ترتیب ۰/۱۵ µl/ml و ۰/۱۲-۰/۲۵ µl/ml بود، میزان MIC اسانس رزماری علیه جدایه‌های سروتیپ I µl/ml ۰/۱۲-۰/۲۵ و برای جدایه‌های سروتیپ II برابر ۰/۱۲ µl/ml محاسبه گردید. MBC رزماری علیه سروتیپ I و II به ترتیب بالاتر از ۱ µl/ml و ۱- ۰/۵ برآورد گردید. بعلاوه در روش دیسک مشخص شد خاصیت ضدمیکروبی آویشن شیرازی علیه سروتیپ‌های استرپتوکوکوس اینیایی بطور معنی دار بیشتر از اسانس رزماری می‌باشد. از سوی دیگر روند رشد سویه‌های مورد استفاده با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی و رزماری کاهش یافته و در غلظت‌های بالاتر از MIC رشد بطور کامل متوقف می گردد. براساس نتایج بدست آمده از این مطالعه می‌توان از اسانس‌های گیاهی مذکور، بویژه آویشن شیرازی بعنوان مهارکننده بیماری استرپتوکوکوزیس در مزارع پرورش قزل آلای رنگین کمان استفاده نمود.

کلمات کلیدی: *استرپتوکوکوس اینیایی، آویشن شیرازی، رزماری، حداقل غلظت ممانعت کنندگی، قزل آلای رنگین کمان*

* نویسنده مسئول: مهدی سلطانی

آدرس: گروه بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران. تلفن: ۶۱۱۱۷۰۹۴-۰۲۱

پست الکترونیک: msoltani@ut.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

بیماری استرپتوکوکوزیس ناشی از *استرپتوکوکوس اینیایی* سبب بروز خسارات اقتصادی فراوان به صنعت آبزی پروری در سراسر جهان ازجمله ایران گردیده است (۲۲و۲۱)، بطوریکه تاکنون استرپتوکوکوزیس در ۲۷ گونه ماهیان آب شیرین، آب شور و یوری هالین گزارش شده و نیز بعنوان پاتوژن زئونوز سبب بروز عفونت استرپتوکوکی در انسان می‌شود (۳). مصرف بی‌رویه آنتی بیوتیک‌ها برای درمان بیماری منجر به بروز مقاومت دارویی در جدایه‌های باکتریایی و کاهش کار آیی داروها می‌گردد. از سوی دیگر امکان انتقال مقاومت دارویی به باکتری‌های بیماری زای محیط زیست و انسان وجود دارد (۱۳)، بعلاوه سبب تجمع آنتی بیوتیک در بدن ماهی و در نتیجه در مصرف کنندگان ماهی شده است، لذا یافتن راههای پیشگیری برای به حداقل رساندن خسارات اقتصادی ناشی از تلفات در مزارع پرورش ماهی و نیز کاهش مشکلات زیست محیطی ناشی از مصرف گسترده آنتی بیوتیک‌ها ضروری به نظر می‌رسد. در سالهای اخیر استفاده از داروهای گیاهی به عنوان داروهای دوستدار محیط زیست برای مقابله با باکتری‌های بیماریزا مورد توجه قرار گرفته است (۱۷، ۲). رزماری گیاه همیشه سبز ومعطر بوده که در اغلب مناطق جهان رشد می‌نماید و دارای خاصیت ضدمیکروبی، آفت کشی (۲۴) وضد سرطان (۲۳)می‌باشد. آویشن شیرازی بومی ایران، افغانستان و پاکستان بوده (۱)و از اسانس آن بعنوان ماده ضد باکتریایی، ضد قارچ، آنتی اکسیدان وضد التهاب استفاده می‌شود (۲۰، ۱۹). ویژگی ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی آویشن شیرازی و رزماری علیه دامنه وسیعی از باکتری‌های بیماریزا به اثبات رسیده است (۲۳، ۱۶، ۱۱، ۹، ۴، ۲). وجود مواد فنولیک دراسانس رزماری و آویشن شیرازی مهمترین عامل مهارکننده باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ‌ها شناخته شده است (کابارا، ۱۹۹۱ بیان شده در ۱۰). بدیهی است که استفاده از این اسانس‌های گیاهی به صورت خوراکی یا حمام مستلزم اطلاع از قدرت ضدباکتریایی آنها می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس رزماری و آویشن شیرازی علیه برخی از جدایه‌های درگیر بیماری استرپتوکوکوزیس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

۱- تشخیص سروتیپ جدایه‌های باکتریایی و بررسی وجود کپسول

به منظور تشخیص سروتیپ‌ها از ۱۵ جدایه استرپتوکوکوس اینیایی استفاده گردید. این جدایه‌ها طبق مطالعات قبلی توسط سلطانی و همکاران (۲۰۰۵) و سلطانی و همکاران (۲۰۰۸) از مزارع قزل آلای پرورشی واقع در استانهای مازندران، لرستان، شهرکرد، کرمانشاه، تهران، فارس کردستان جداسازی و شناسایی شده بودند. هر کدام از جدایه‌ها به تعداد ۵-۴ پاساژ داده شده و از نمونه لیوفیلیزه آنها برای این مطالعه استفاده شد. برای تعیین سروتیپ‌ها از آزمایشات آرژنین دهیدرولاز و ریبوزاستفاده شد (۶). برای این کار ابتدا هر کدام از جدایه‌ها درمحیط اورنیتین دکربوکسیلاز/آرژنین دهیدرولاز حاوی ۱٪ آرژنین تلقیح و پس از گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه نتیجه قرائت شد. برای انجام آزمایش ریبوز جدایه‌های مورد مطالعه در محیط فنل رد حاوی ۰/۵٪ قند ریبوز تلقیح و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه درصورت تغییر رنگ محیط از قرمز به زرد جدایه بعنوان ریبوز مثبت تلقی شد. برای مطالعه کپسول باکتریایی ازروش رنگ آمیزی آنتونی استفاده

Archive of SID

www.SID.ir

شد، برای این منظور از سوسپانسیون هر یک ازجدایه‌ها در پودر شیر بر روی لام گسترش تهیه شد و پس از خشک نمودن گسترش در مجاورت هوا، به مدت ۲ دقیقه رنگ آمیزی با کریستال ویوله ۱٪ و سپس شستشو با سولفات مس ۲۰٪ صورت گرفت.

۲- تهیه اسانس‌ها و آنالیز آن‌ها

گیاه آویشن شیرازی و رزماری توسط پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تایید نام علمی گردید. تهیه اسانس به روش steam distillation صورت گرفت وآنالیز اسانس‌ها توسط دستگاه گازکروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی انجام شد. دستگاه GC/MS از نوع Agilent بوده واز برنامه دمایی ۵ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد با گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، نگهداری ستون در ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه استفاده شد. دمای اتاقک تزریق ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت گاز هلیم ۰/۸ میلی متر در دقیقه بود. دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد و میزان انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت بود.

۳- آزمایش قدرت ضدباکتریایی به روش دیسک

برای انجام مطالعات خواص ضدباکتریایی اسانس‌ها از ۵ جدایه شامل دو جدایه از سروتیپ I، یک جدایه از سروتیپ II و دو جدایه از سروتیپ‌های بینابینی استفاده شد. برای مطالعه میزان فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌های آویشن شیرازی و رزماری از روش دیسک استفاده گردید (۱۰، ۲). بدین منظور ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌ها معادل مک فارلند شماره ۱ حاوی 10^8 cfu/ml بر روی محیط ژلوز خون کشت داده شد. ۵ میکرولیتر از اسانس‌های رقیق نشده به دیسک‌های فیلتراستریل (قطر ۶ میلیمتر) اضافه شده و دیسک‌ها بر روی کشت‌های باکتری قرار داده شدند، از دیسک استاندارد انروفلوکسازین برای کنترل مثبت استفاده گردید، همچنین به عنوان کنترل منفی ۵ میکرولیتر DMSO ۴٪ به دیسک‌های فیلتر اضافه شد، سپس به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه صورت گرفت. پس از گذشت زمان مذکور قطر منطقه مهار رشد اندازه‌گیری، قطر دیسک از آن کسر و نهایتاً مقادیر بدست آمده بر ۲ تقسیم شد (سه تکرار برای هر اسانس در نظر گرفته شد) (۲).

٤- تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) و باکتری کشی (MBC)اسانس‌ها

برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی آویشن شیرازی و رزماری از روش ماکرودایلوشن استفاده گردید (۸). بدین منظور ابتدا رقت‌های متوالی از اسانس‌ها در لوله‌های ونوجکت حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت TSB و DMSO ۴٪ گردید. رقت‌های تهیه شده شامل ۰/۰۰۱۷ µl/ml، ۰/۰۰۳۵، ۰/۰۰۷، ۰/۰۱۵، ۰/۰۳، ۰/۰۶، ۰/۱۲، ۰/۵، ۱ بود. از کشت ۴۸ ساعته هر یک از جدایه‌ها سوسپانسون باکتریایی معادل مک فارلند شماره یک با تراکم 10^8 cfu/ml تهیه و به میزان 10 µl به هر یک از رقت‌ها تلقیح گردید. محیط های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. گروه کنترل در این آزمایش شامل کنترل مثبت (محیط کشت فاقد اسانس و حاوی DMSO و باکتری) و کنترل منفی (محیط کشت با رقت‌های متوالی اسانس و فاقد باکتری) نیز لحاظ شد. پس از ۲۴ ساعت، رشد باکتری به روش چشمی از طریق مقایسه کدورت لوله های حاوی اسانس تلقیح شده با کنترل منفی مطالعه گردید. کمترین غلظتی از اسانس که در آن، کدورت مشاهده نشد بعنوان

Archive of SID

www.SID.ir

MIC درنظر گرفته شد. برای تعیین MBC، از رقت‌های MIC و بیشتر از آن به میزان ۱۰ میکرولیتر روی محیط ژلوزخون در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد و کمترین غلظتی که در آن هیچ پرگنه ای رشد نکرده بود بعنوان MBC لحاظ شد.

۵- مطالعه رشد جدایه‌ها

برای مطالعه رشد میزان ۱۰ میکرولیتر ازهر یک ازجدایه‌ها با تراکم 10^8 cfu/ml به محیط کشت TSB حاوی رقت‌های متوالی از اسانس‌های مورد اشاره اضافه و در زمان‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد پس از تلقیح باکتری میزان جذب نوری با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. گروه کنترل در این بررسی محیط کشت تلقیح شده فاقد اسانس بود.

نتایج

۱- آنالیز اسانس‌های آویشن شیرازی و رزماری

براساس نتایج حاصل از آنالیز اسانس آویشن شیرازی و رزماری با استفاده از GC/MS، اسانس آویشن شیرازی دارای۳۳ ترکیب بوده و بیشترین ترکیب تشکیل دهنده آن کارواکرول (۶۲/۸۶٪) می‌باشد. اسانس رزماری نیز از ۴۸ ترکیب تشکیل گردیده که بیشترین ترکیب تشکیل دهنده اسانس رزماری مربوط به آلفا پینن (۱۹/۱۵٪) می‌باشد. برخی از ترکیبات این اسانس‌ها در جدول شماره ۱ آورده شده است.

۲- تشخیص سروتیپ های باکتریایی و بررسی کپسول باکتریایی

از ۱۵ جدایه جداسازی شده از مزارع پرورش قزل آلای رنگین کمان، ۹ جدایه شامل 201A و 201C ,196A,CH18-3 ,F5C ,F8 ,L2B ,F6B CH18-1 به عنوان سروتیپ I (آرژنین مثبت و ریبوز مثبت) و جدایه CH18-4 سروتیپ II (آرژنین منفی و ریبوز منفی) تشخیص داده شدند. درحالیکه جدایه L6 و LG5 آرژنین منفی و ریبوز مثبت بودند. نتایج رنگ آمیزی کپسول نشان داد که تمامی جدایه های مورد بررسی دارای کپسول کامل بودند.

۳- نتایج آزمایش دیسک

اسانس آویشن شیرازی و رزماری دارای خاصیت ضدباکتریایی علیه جدایه های استرپتوکوکوس اینیایی می‌باشد (جدول۲). براساس نتایج، اندازه منطقه مهار رشد جدایه‌های سروتیپ I و II تحت تأثیر اسانس آویشن شیرازی بطور معنی دار در سطح $P<$ ۰/۰۵ بیشتراز اسانس رزماری می‌باشد. منطقه مهار رشد ناشی از آنتی بیوتیک انروفلوکسازین بطور معنی‌دار کمتر از اسانس آویشن شیرازی بوده در حالیکه اختلاف معنی داری در سطح $P>$ ۰/۰۵ بین منطقه مهار رشد جدایه های سروتیپ I و II تحت تأثیر انروفلوکسازین و اسانس رزماری مشاهده نمی‌شود. از سوی دیگر DMSO ۴٪ بعنوان حلال اسانس رزماری و آویشن شیرازی سبب مهار رشد هیچ کدام از جدایه‌ها نمی گردد.

٤- حداقل غلظت ممانعت کنندگی و حداقل غلظت باکتری کشی اسانس‌ها

نتایج خاصیت ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی و رزماری نشان داد MIC اسانس آویشن شیرازی علیه جدایه‌های مورد استفاده ۰/۰۶ µl/ml و MBC آن ۰/۵-۰/۱۲ µl/ml می‌باشد. همچنین MIC و MBC این اسانس رزماری علیه جدایه‌ها به ترتیب۰/۲۵-۰/۱۲ و ۱>- ۰/۵ µl/ml محاسبه گردید (جدول۳).

Archive of SID

www.SID.ir

۵- رشد

تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی و رزماری بر رشد جدایه‌های سروتیپ I و II استرپتوکوکوس اینیایی در نمودار ۱و۲ آمده است. روند رشد جدایه های باکتریایی مورد استفاده با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی کاهش یافته بطوری که در غلظت‌های MIC و بالاتر از آن رشد جدایه‌ها متوقف گردیده است. همچنین در غلظت های کمتراز MIC با گذشت زمان روند رشد تمامی جدایه های باکتریایی افزایش یافته است.

جدول ۱- مهمترین ترکیبات اسانس های آویشن شیرازی و رزماری با استفاده از GC/MS

اسانس آویشن شیرازی			اسانس رزماری		
نام ترکیب	اندیس بازدارنده	درصد	نام ترکیب	اندیس بازدارنده	درصد
آلفا- پینن	۱۱/۳۶	۱/۴۱	آلفا پینن	۱۱/۵۹	۱۹/۱۵
بنزن	۱۶/۱۱	۱۱/۱۶	کامفن	۱۲/۱۸	۶/۴۳
کارواکرول	۳۰/۰۸	۶۲/۸۲	بتا - پینن	۱۳/۵۰	۲/۶۷
اوکالیپتول	۱۶/۳۲	۱/۰۳	اکتانون	۱۹/۰۹	۱/۹۶
گاما – ترپینن	۱۷/۸۰	۳/۷۸	بتا - میرسن	۱۴/۳۶	۲/۶۴
لینالول	۱۹/۹۸	۲/۵۱	۱،۸ سینئول	۱۶/۳۶	۹/۰۵
بورنئول	۲۳/۱۱	۱/۷۶	لینالول	۲۰/۰۲	۲/۳۷
فنل	۳۰/۲۷	۵/۰۳	کامفور	۲۲/۱۱	۸/۵۰
ترانس- کاریوفیلن	۳۴/۸۱	۲/۵۷	بورنئول	۲۲/۳۲	۶/۳۵
تیمول متیل اتر	۲۶/۳۷	۰/۱۴	آلفا - ترپینئول	۲۴/۶۰	۱/۵۸
کارواکرول متیل اتر	۲۶/۸۱	۰/۳۷	وربنون	۲۵/۲۳	۳/۰۲

جدول۲- میانگین منطقه مهار رشد تعدادی از سویه های استرپتوکوکوس به روش دیسک

جدایه باکتریایی	آویشن شیرازی cm ±SD	رزماری cm±SD	انروفلوکسازین cm±SD	دی متیل سولفوکساید cm±SD
L2B	۲/۱۱ ±(۰/۱۴۴)	۰/۷۱ ±(۰/۱۲۵)	۰/۹۶±(۰/۱۱۳)	۰
201C	۲/۶۳± (۰/۱۱۵)	۰/۹۳ ±(۰/۲۵۱)	۱/۲۲±(۰/۰۸۱)	۰
CH18-4	۲/۲۵±(۰/۱۲۸)	۰/۹۵±(۰/۰۹۲)	۱/۳۸±(۰/۱۰۶)	۰
L6	۲/۳±(۰/۲۶۲)	۰/۸۴±(۰/۰۹۸)	۰/۷۹±(۰/۱۳۹)	۰
LG5	۲/۱۵±(۰/۰۹۲)	۰/۹۳±(۰/۱۶۵)	۰/۷۲±(۰/۰۸۸)	۰

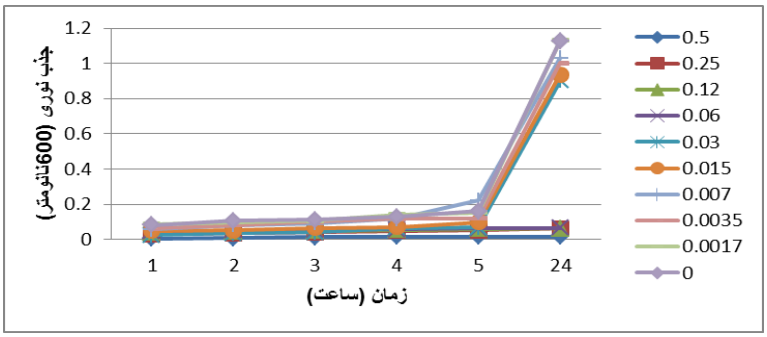
جدول ۳- میزان MIC(µl/ml) و MBC(µl/ml) اسانس های آویشن شیرازی و رزماری علیه جدایه ها در دمای ۲۵°C.

جدایه	آویشن شیرازی		رزماری	
	MIC	MBC	MIC	MBC
201A	۰/۰۶	۰/۵	۰/۱۲	>۱
L2B	۰/۰۶	۰/۵	۰/۲۵	>۱
CH18-4	۰/۰۶	۰/۲۱	۰/۱۲	۱
LG5	۰/۰۶	۰/۲۵	۰/۱۲	۱
L6	۰/۰۶	۰/۱۲	۰/۱۲	۰/۵

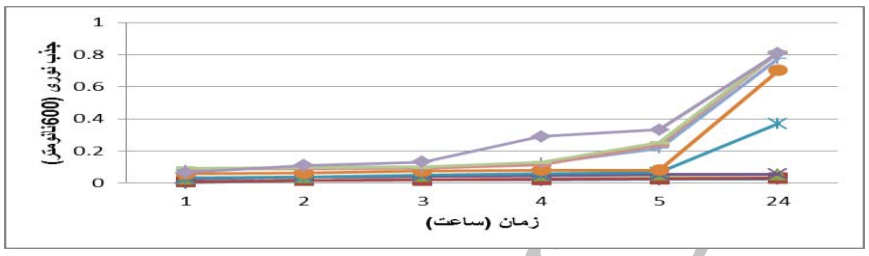
Archive of SID

www.SID.ir

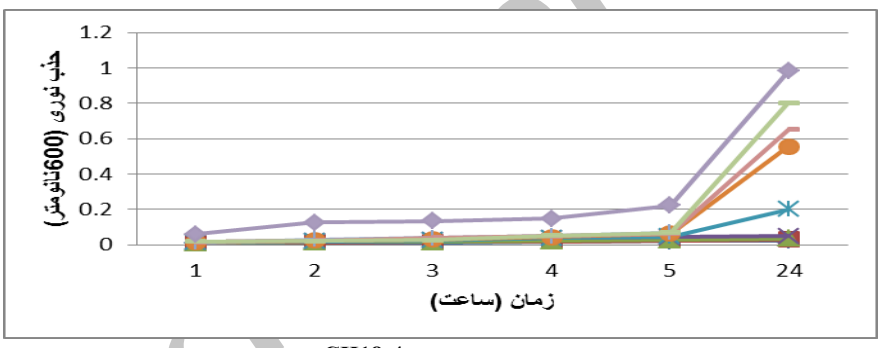
نمودار۱- رفتار رشد برخی جدایه های *استرپتوکوکوس اینیایی* در حضور غلظت های مختلف اسانس آویشن شیرازی طی ۲۴ ساعت در دمای ۲۵°C.



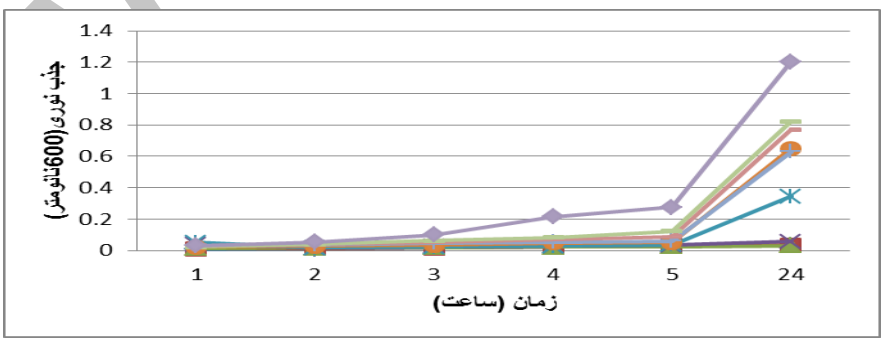
نمودار۱-۱- جدایه201C



نمودار۲-۱- جدایهL2B

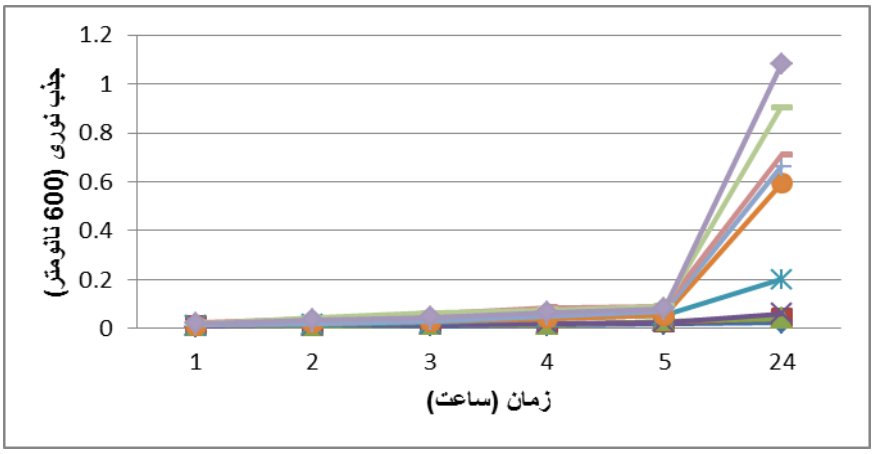


نمودار۳- ۱- جدایهCH18-4



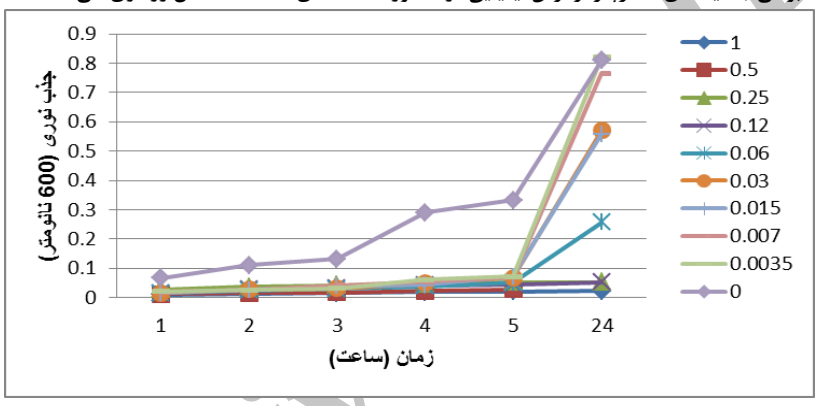
نمودار۴-۱- جدایهL6

www.SID.ir

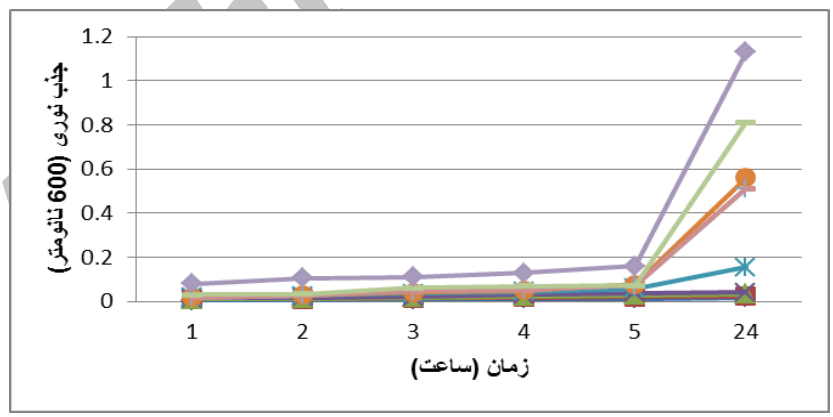


نمودار۵-۱- جدایه**LG5**

نمودار۲- رفتار رشدبرخی جدایه های *استرپتوکوکوس اینیایی* در حضور غلظت های مختلف اسانس رزماری طی ۲۴ ساعت در دمای ۲۵°C.

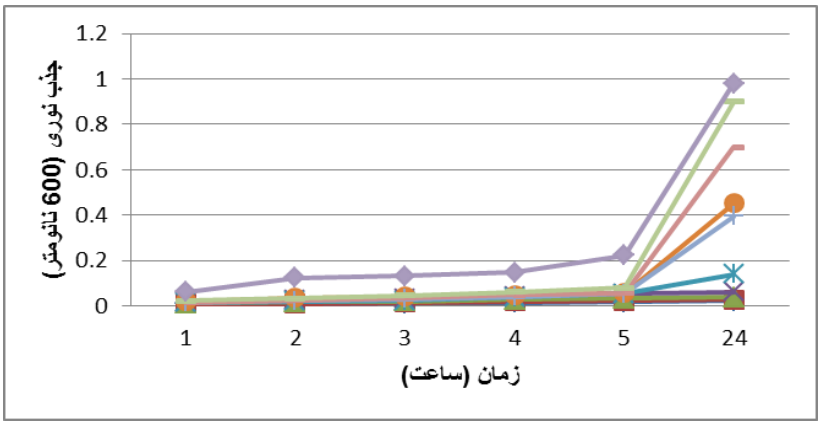


نمودار۱-۲- جدایه**201C**

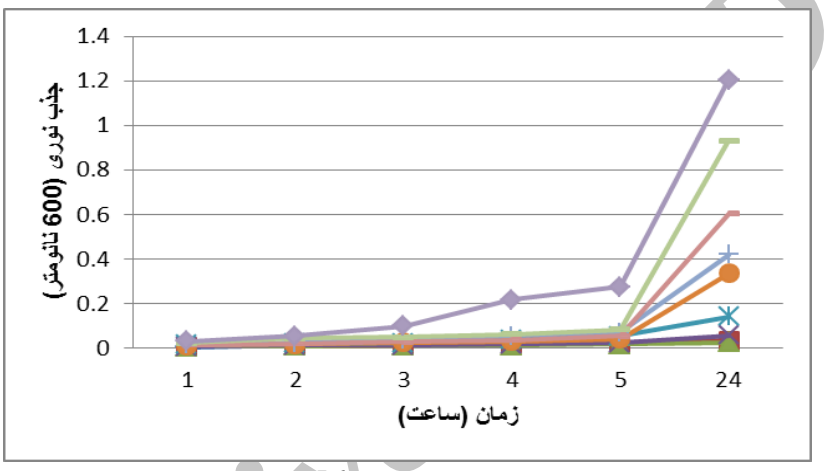


نمودار۲- ۲- جدایه**L2B**

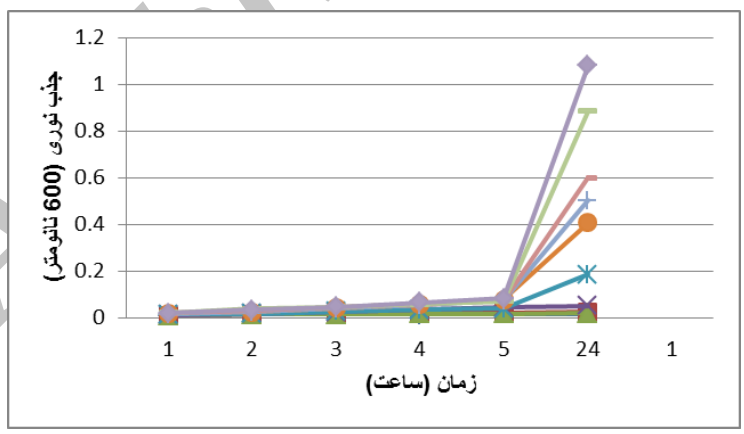
www.SID.ir



نمودار۳-۲- جدایه CH18-4



نمودار۴-۲- جدایه L6



نمودار۵-۲- جدایه LG5

بحث

مطالعه حاضر به منظور شناسایی سروتیپ‌های استرپتوکوکوس اینیایی و بررسی تأثیر اسانس رزماری و آویشن شیرازی بر رشد آنها صورت گرفته است.

آزمایش‌های انجام شده جهت شناسایی سروتیپ ۱۵جدایه استرپتوکوکوس اینیایی جداسازی شده از مزارع پروررش قزل آلای رنگین کمان ایران نشان دهنده وجود دو سروتیپ I و II بود، علاوه بر این،

www.SID.ir

نتایج مطالعه بیانگر وجود جدایه‌هایی غیر از دو سروتیپ مذکور در مزارع قزل آلای رنگین کمان می‌باشد که نیازمند مطالعات بعدی است، بهرحال باتوجه به اینکه واکنش آرژنین دهیدرولاز فاکتور قابل اطمینانی برای تعیین نوع سروتیپ نبوده و دربرخی شرایط که آرژنین دهیدرولاز منفی می‌باشد، مثبت قرائت می گردد (۵)، احتمالاً دو جدایه L6 و LG5 نیز سروتیپ II می‌باشند. بوچانان و همکاران (۲۰۰۵) نیز دو سروتیپ را در بین جدایه‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* تشخیص داده و مشخص گردید فراوانی سروتیپ I در بروز بیماری استرپتوکوکوزیس بیشتر بوده، درحالیکه فراوانی سروتیپ II کمتر می‌باشد، با این حال به دلیل دارا بودن کپسول کامل ترسروتیپ II نقش مؤثرتری در بیماریزایی دارد. در مطالعه حاضر علی رغم فراوانی بیشترسروتیپ I، از لحاظ دارا بودن کپسول هر دو سروتیپ دارای کپسول کامل بودند. در بررسی حاضر کارواکرول با ۶۲/۸۲٪ اصلی ترین ترکیب آویشن شیرازی بود . میثاقی و همکاران (۲۰۰۷) نیز کارواکرول را بعنوان اصلی‌ترین ترکیب آویشن شیرازی گزارش نمودند. اماشریفی فر و همکارانش (۲۰۰۷) مهمترین اجزای تشکیل دهنده اسانس آویشن شیرازی را تیمول و کارواکرول دانسته اند. وجود تفاوت در ترکیب اسانس گیاهان به دلیل اختلاف در منطقه جغرافیایی، سن گیاه در زمان برداشت، روش خشک نمودن و نحوه اسانس گیری می باشد (۱۲). تاکنون اثرات ضدمیکروبی آویشن شیرازی بر مهار رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، اشریشیا کلی، سالمونلا تیفیموریوم، شیگلا فلکسنری، پروتئوس ولگاریس* مشخص گردیده است (۱۶، ۱۴، ۹، ۴). مطالعات ساعی دهکردی و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد باکتری های گرم منفی در مقایسه با باکتری های گرم مثبت نسبت به آویشن شیرازی مقاوم تر بوده که احتمالاً به دلیل ویژگی هیدروفیلیک غشاء خارجی باکتری های گرم منفی و نفوذ ناپذیر بودن آن در مقابل ترکیبات لیپوفیلیک همچون اسانس‌های گیاهی می‌باشد (ارسیسلی و اوزتورک (۲۰۰۵) بیان شده در۱۹)، اما شریفی فر و همکاران (۲۰۰۷)بیان داشتند که تأثیرمهارکنندگی اسانس آویشن شیرازی بر باکتری های گرم منفی بیشتر می باشد. نتایج آزمایشگاهی بدست آمده از این مطالعه نشان می دهد که اسانس آویشن شیرازی قدرت ضدباکتریایی علیه سویه های بیماریزای *استرپتوکوکوس اینیایی* دارد، بطوریکه حداقل غلظت ممانعت کنندگی آن علیه سویه های سروتیپ I ۰/۰۶ میکرولیتر برمیلی لیتر، حداقل MBC ۰/۵میکرولیتر بر میلی لیتر و منطقه مهار رشد در دامنه ۲/۱۱-۲/۶۳سانتی متر بوده است. همچنین میزان MIC این اسانس برای جدایه های سروتیپ II ۰/۰۶ میکرولیتر بر میلی لیتر، MBC ۰/۱۲-۰/۲۵میکرولیتر بر میلی لیتر و منطقه مهار رشد۲/۱۵- ۲/۳ سانتی متر محاسبه شد. افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی سبب کاهش رشد جدایه‌های مورد مطالعه می گردد، بطوریکه روند رشد باکتریایی در غلظت‌های MIC و بالاتر از آن متوقف گردید، همچنین رشد تمامی جدایه‌ها با گذشت زمان در غلظت های کمتر ازMIC افزایش یافت. خاصیت ضد میکروبی آویشن شیرازی بیشتر از انروفلوکسازین می باشد، بطوری که منطقه مهار رشد ناشی از این اسانس بطور معنی دار بیشتر از آنتی بیوتیک بود. بطورکلی خاصیت ضدمیکروبی آویشن شیرازی به دلیل حضور ترکیبات فنلی از جمله تیمول و کارواکرول است. کارواکرول لیپوفیلیک سبب افزایش نفوذ پذیری و ازهم گسیختگی دیواره سلول باکتریایی ودرنتیجه

Archive of SID

تخلیه مواد داخل سلول باکتریایی می گردد (۱۶). اوسالاه و همکاران (۲۰۰۶) نیز تأثیر تیمول و کارواکرول را بر تخریب دیواره سلولی *لیستریا مونوسیتوژنز و اشریشیا کلی* نشان داد.

تحقیقات مختلف اثر مهارکننده اسانس رزماری را بر باکتری های گرم مثبت، گرم منفی و قارچها نشان داده اند که می توان به *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفیموریوم، باسیلوس سرئوس، پروتئوس ولگاریس، اشریشیا کلی، سودوموناس آئروژنیوزا، لیستریا منوسیتوژنز، کاندیدا آلبیکانس* اشاره نمود (۲۳، ۱۲، ۱۱، ۱۰). جمعیت‌های وحشی رزماری دارای تفاوت‌هایی در فعالیت ضدمیکروبی بوده که بعلت ترکیب شیمیایی مختلف و متغیر می‌باشد (۱۵، ۷). گچکار و همکاران (۲۰۰۷) مهمترین اجزای تشکیل دهنده اسانس رزماری را ۱، ۸ سینئول، آلفا پینن و لینالول دانسته اند، درحالیکه جیانگ و همکاران (۲۰۱۱)۱، ۸سینئول، آلفا پینن، کامفور، کامفن و بتا- پینن را بعنوان اجزای اصلی اسانس رزماری شناسایی کردند. در مطالعه حاضرنیز اصلی ترین اجزای تشکیل دهنده به ترتیب آلفا- پینن، ۱و۸ سینئول، کامفور و کامفن بودند. فعالیت بیولوژیک اسانس را نمی توان تنها به یک یا تعدادی از اجزاء تشکیل دهنده آن نسبت داد زیرا ممکن است مواد با مقادیر اندک نیز تأثیر بسزایی بر فعالیت ضدباکتریایی اسانس داشته باشند که می تواند ناشی از اثرات سینرژیستی یا آنتاگونیستی مجموعه ای از این ترکیبات در یک گیاه باشد (۲۳). مطالعه حاضر بیانگر خاصیت ضدباکتریایی اسانس رزماری علیه جدایه‌های استرپتوکوکوس اینیایی می‌باشد، بطوری‌که MIC این اسانس علیه جدایه های سروتیپ I دردامنه ۰/۱۲-۰/۲۵ میکرولیتر برمیلی لیتر، MBC بالاتر از ۱ میکرولیتر بر میلی لیتر و منطقه مهار رشد ۰/۷۱-۰/۹۳ سانتی متر اندازه گیری گردید. MIC اسانس رزماری برای جدایه های سروتیپ II ۰/۱۲ میکرولیتر بر میلی لیتر، MBC در دامنه ۱ -۰/۵ میکرولیتر بر میلی لیتر و منطقه مهار رشد ۰/۹۵ – ۰/۸۴ سانتی متر بدست آمد. آبوتبول و همکاران (۲۰۰۴) مشخص کرد عصاره رزماری دارای خاصیت باکتروستات علیه *استرپتوکوکوس اینیایی* بوده و عصاره اتیل استات رزماری (mm/mg ۳۷/۵) در مقایسه با عصاره متانولی (mm/mg ۱۷/۰۵) و اتانولی (mm/mg ۲۳/۸۱) بیشترین اثر ضدباکتریایی را دارا می‌باشد، همچنین میزان مرگ و میر ماهیان تیلاپیای مبتلا به *استرپتوکوکوس اینیایی* که با عصاره رزماری تغذیه شده بودند به شدت کاهش یافته و یک روز پس از درگیری با باکتری، هیچ باکتری از ماهیان باقی مانده جداسازی نگردید. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که مصرف اسانس آویشن شیرازی و رزماری می تواند مانع از رشد و تکثیر سروتیپ‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* شده و لذا به علت تأثیر ناچیز بر محیط زیست مصرف آن می تواند به عنوان یک ماده ضد میکروبی مؤثر در مزارع پرورش آبزیان برای ضدعفونی کردن ستون آب و نیز درمان ماهیان درگیر با عفونت های استرپتوکوکی به روش خوراکی و یا حمام توصیه گردد. مطالعات بیشتر برای مشخص نمودن مکانیزم عمل اسانس های مذکور و نیز تعیین دوزمؤثر اسانس رزماری و آویشن شیرازی در مزارع پرورش آبزیان جهت کاهش تلفات ماهیان درگیراسترپتوکوکوزیس نیاز می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه تهران (گرنت شماره ۷۵۰۸۰۰۲/۶/۲۰) و نیز با حمایت

Archive of SID

www.SID.ir

قطب علمی بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشگاه تهران انجام گرفته است.

منابع

۱. کمیته تدوین فارماکوپه گیاهی ایران. (۱۳۸۱). فارماکوپه ایران. چاپ اول، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی.، جلد اول، صفحه ۵۱

2. Abutbul, S., Golan-Goldhirsh, A, Barazani, O., ZilbSrg, D., (2004). Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (Oreochromis sp.). *Aquaculture* **238**: 97-105
3. Agnew, W., Barnes, A., (2007). *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and candidate for reliable vaccination. *Veterinary Micribiology* **122**: 1-15
4. Amin, M., Kalantar, E., Mohammad-Saeid, N., Ahsan, B., (2010). Antibacterial effect and physicochemical properties of essential oil of *Zataria multiflora* Boiss. *Asian Pacific Journal of Tropical medicine*, 439-442
5. Barnes, A. C., Ellise, A. E., (2003). Variation in arginine dihydrolase activity in *Streptococcus iniae* may be an artefact of the assay. *Bulletin of European association of Fish Pathologists* **23**: 163-166
6. Buchanan, J. T., Stannard, J. A., Lauth, X., Ostland, V. E., Powell, H., C., Westerman, M. E., Nizet, V., (2005). *Streptococcus iniae* phosphoglucomutase is a virulence factor and a target for vaccine development. *Infection and Immunity* **73**: 6935-6944
7. Celiktas, O. Y., HamesKocabas, E. E., Bedir, E., Vardersukan, F., Ozek, T., Baser, K. H. C., (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry* **100**: 553-559
8. Clinical and Laboratory Standards Institute, (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; approved standard, 7th edition. M7-A7 26, pp. 64
9. Fazeli, M. R., Amin, G., Ahmadian Attari, M. M., Ashtiani, H., Jamalifar, H., Samadi, N., (2007). Antimicrobial activities of Iranian sumac and Avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control* **18**: 646-649
10. Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M., Taghizadeh, M., Astaneh, S.,Rasooli, I.,(2007). Chemical and biological characteristic of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry* **102**: 898-904
11. Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y., Wang, W., Luo,M., Zhao, C., Zu, Y., Liu, Z., (2011). Chemical compositionand antimicrobial activity of essential oil of Rosmary. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **32**: 63-68
12. Jordan, M., Lax, V., Rota, M., Loran, S., Sotomayor, J., (2013). Effect of bioclimatic area on the essential oil composision and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis*. *Food Control* **30**: 463-468
13. MacMillan, J., (2001). Aquaculture and antibiotic resistance: a negligible public health risk? *World Aquaculture* **32**: 49-68
14. Misaghi, A., Akhundzadeh Basti, A., (2007). Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and nisin on *Bacillus cereus* ATCC 11778. *Food Control***18**: 1043-1049
15. Moghtader, M., Afzali, D., (2009). Study of the antibacterial properties of the essential oil of rosemary. *American-Eurasian Journal of Agriculture Environment Science* **5**: 393-397
16. Moosavy, M. H., Akhundzadeh Basri, A., Misaghi, A., Zahraei Saleh,T., Abbasifar, R., Ebrahimzadeh Mousavi,H. A., Alipour, M., EmamiRazavi, N., Gandomi¸H., Noori, N., (2007). Effect of *Zataria multiflora Boiss*. essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in food model system and on the bacterial cell membrane. *Food Research International* **41**: 1050-1057
17. Namiki, M., (1990). Antioxidants antimutagens in food. *Food Science* **29**: 273-300
18. Oussalah, M., Caillet, S., Laroix, M., (2006). Mechanism of Action of Spanish Oregano, Chines Cinnamon and Savory Essential Oils Against Cell Membrane and Walls of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food protection* **69**: 1046-1055
19. Saei-Dehkordi, S. S., Tajik, H., Moradi, M., Khalighi-Sigaroodi, F., (2010).

Archive of SID

www.SID.ir

Chemical composition of essential oil *Zataria multiflora Boiss*. From different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology* **48**:1562-1567

20. Sharififar, F., Moshafi, M. H., Mansuri, S. H., Khodashenas, M., Khoshnoodi, M., (2007). In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora Boiss*. *Food Control* **18**: 800-805
21. Soltani, M., Jamshidi, S., Shafipour, I., (2005). Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran: biophysical characteristics and pathogenesis. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* **25:** 95-106
22. Soltani, M., Nikbakht, G., Ebrahimzadeh Mousavi, H. A., (2008). Epizootic outbreaks of Lactococcosis caused by *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* **28**: 207-212
23. Wang, W., Li, N., Luo, M., Zu, Y., Effert, T., (2012). Antimicrobial activity and Anticancer of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. *Molecules* **17**: 2704-2713
24. Zoubiri, S., Baaliouamer, A., (2011). Chemical composition and insecticidal properties of some aromatic herbs essential oils from Algeria. *Food Chemistry* **29**: 179-182

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 9, Issue 1, 2013

The Effect of *Zataria multiflora Boiss.* and *Rosmarinus officinalis* Essential Oil on *Streptococcus iniae* Isolated from Rainbow Trout Farms

Soltani, M.[1, 2]*, Ghodratnama, M.[1], Taheri Mirghaed, A.[1], Zargar, A.[1], Rooholahi, Sh.[1]

1- Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2- Center of Excellence of Aquatic Animal Health, University of Tehran, Tehran, Iran

Received Date: 19 Feb 2013 *Accepted Date: 6 May 2013*

Abstract

The aim of this study was to investigate serotypes and bacterial capsule presence of Streptococcus iniae starins, the cause of streptococcosis in rainbow trout farms of Iran. The study also aimed to identify the minimum inhibitory concentrations (MICs) of Zataria multiflora and Rosmarinus officinalis essential oil against these strains and to assess the growth behavior of them. The results showed, most strains from rainbow trout farms were serotype I and all serotypes had complete bacterial capsule. The MIC of Z. multiflora to Streptococcus iniae serotype I and serotype II was 0.06 µl/ml and the minimum bactericidal concentrations (MBCs) were 0.5 and 0.12-0.25 µl/ml. minimum inhibitory concentrations of R. officinalis to serotype I and II were in range 0.12 to 0.25 µl/ml and 0.12 µl/ml, respectively. MBCs of R. officinalis against serotype I and II were >1 µl/ml and 0.5-1 µl/ml According to disk diffusion assay results, antimicrobial activity of Z. multiflora essential oil is significantly higher than R. officinalis. The growth of strains was reduced by increasing essential oils concentration. Our results suggested that Z. multiflora and R. officinalis essential oils could be effective for the inhibition of streptococcosis in rainbow trout farms.

Keywords: *Streptococcus iniae, Zataria multiflora, Rosmarinus officinalis, MIC, Rainbow trout*

**Corresponding author: Soltani, M.*
Address: Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. Tel: 021-61117094
Email: msoltani@ut.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir