



بررسی مولکولی و تعیین حساسیت لاکتوکوکوس گارویه عامل لاکتوکوکوزیس در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان نسبت به اسانس‌های گیاهی

میلاد عادل^{۱*}، رضا صفری^۲، امین نعمت‌الهی^۳، وحیده تقدسی^۴

۱. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بهداشت آبزیان، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری- ایران.
۲. مربی، گروه میکروبیولوژی، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری- ایران.
۳. دانشیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۴. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز- ایران.

پذیرش: ۷ اردیبهشت ماه ۹۴

دریافت: ۲۱ دی ماه ۹۳

چکیده

باکتری لاکتوکوکوس گارویه از مهم‌ترین عوامل عفونی ایجادکننده خسارات اقتصادی در مزارع پرورشی کشور است. در مطالعه حاضر، فراوانی باکتری لاکتوکوکوس گارویه در ده مزرعه پرورشی قزل‌آلای رنگین‌کمان استان مازندران با آزمایش‌های بیوشیمیایی و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه، رقت‌های متوالی از اسانس گیاهان درمنه، نعنای فلفلی، بومادران و زیره سیاه برای به دست آوردن حداقل غلظت مهار رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) در برابر جدایه‌های باکتری لاکتوکوکوس گارویه، به روش تهیه رقت متوالی تهیه گردید، همچنین، با استفاده از روش انتشار در دیسک، هاله‌ی مهار رشد باکتری نیز اندازه‌گیری شد و مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد ماهیان ۷ مزرعه از ۱۰ مزرعه مورد مطالعه، مبتلا به لاکتوکوکوزیس بودند و در مجموع ۳۸ جدایه لاکتوکوکوس گارویه از ماهیان به دست آمد. بر اساس نتایج به دست آمده، اسانس‌های زیره سیاه، نعنای فلفلی و درمنه اثر ضد باکتریایی مناسب، قابل مقایسه با استرپتومایسین علیه باکتری لاکتوکوکوس گارویه داشتند؛ بنابراین اسانس‌های گیاهی یاد شده پس از انجام مطالعات تکمیلی می‌توانند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌های تجاری رایج برای درمان عفونت‌های ناشی از لاکتوکوکوزیس باشند.

واژه‌های کلیدی: لاکتوکوکوس گارویه، قزل‌آلای رنگین‌کمان، حساسیت، اسانس‌های گیاهی.

مقدمه

نشان می‌دهد، به گونه‌ای که این میزان در بررسی Soltani و همکاران در سال ۲۰۱۱، ۶/۶۵ درصد، Mirzakhani در سال ۲۰۰۹، ۵۵ درصد، Sharifiyazdi و همکاران در سال ۲۰۱۰، ۱۶ درصد و Shahrani و همکاران در سال ۲۰۱۴، ۷۶ درصد بوده است (۱۱، ۱۵، ۱۶ و ۲۰). نکته قابل توجه دیگر در مورد این باکتری آن است که محدوده میزبانی این باکتری محدود به آبزیان نیست و به‌عنوان یک عامل ایجادکننده بیماری مشترک در جوامع انسانی مطرح است (۱۰). باکتری یاد شده از افراد مبتلا به اندوکاردیت گزارش شده است و گزارش‌های متعددی از بروز بیماری از

لاکتوکوکوزیس ناشی از باکتری لاکتوکوکوس گارویه (*Lactococcus garvieae*) موجب خسارت‌های اقتصادی فراوانی به صنعت آبزی‌پروری جهان شده است، به‌طوری‌که این بیماری از گونه‌های متعددی از ماهیان آب شیرین، لب‌شور و شور مناطق مختلف دنیا به‌ویژه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و به‌خصوص زمانی که دمای آب به بالاتر از ۱۵ درجه سانتی‌گراد می‌رسد، گزارش شده است (۱). بررسی‌های به عمل آمده در ایران میزان بالای شیوع لاکتوکوکوزیس را در مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان





گردید و آن‌گاه پرگنه‌ها جمع‌آوری شد. در این مطالعه بعد از رنگ‌آمیزی گرم و انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی توصیه‌شده از سوی Austin و Austin در سال ۲۰۰۷، کوکسی‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی به منظور استخراج DNA و تشخیص قطعی با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Polymerase chain reaction) مورد استفاده قرار گرفتند (۲).

استخراج DNA جدایه‌ها، بر اساس دستورالعمل کیت استخراج DNA (MBST, Iran) صورت گرفت. تشخیص قطعی جدایه‌ها با طراحی آغازگرهای اختصاصی F (5'-CATAACAATGAGAATCGC-3') و R (3'-GCACCCTCGCGGGTTG-5') بر پایه ژن rRNA ۱۶S صورت گرفت و اندازه محصول مورد انتظار ۱۱۰۷ جفت باز (bp) بود (۱۶). برنامه حرارتی دستگاه ترموسایکلر در ۳۰ سیکل حرارتی شامل مرحله واسرشت سازی اولیه دو رشته DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمر به DNA الگو در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰X، ۳ U DNA Taq Polymerase، ۶۰ پیکومول از هر یک از پرایمرها، ۰/۶ میکرولیتر از مخلوط dNTPs (۱۰mM)، ۲۰۰ نانوگرم از نمونه‌های DNA استخراج شد و حجم نهایی محصول PCR با آب مقطر استریل به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. در پایان محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز و باند به دست آمده با دستگاه UVI tec (مدل BTS-20.MS) عکس‌برداری شد و سپس نتیجه آزمایش قرائت گردید. در این مطالعه از باکتری استرپتوکوکوس اینیایی به‌عنوان کنترل منفی و از نمونه توالی شده لاکتوکوکوس گارویه با شماره دستیابی EU727199 برای کنترل مثبت استفاده شد.

طریق این باکتری در انسان با علائمی از قبیل سپتی‌سمی، کوری، التهاب سلولی، تهوع و مشکلات گوارشی در دست است (۲۳).

مقاومت‌های دارویی روزافزون علیه این باکتری و افزایش دوز مصرفی داروهای متداول از یک‌سو و افزایش عوارض جانبی ناشی از استفاده از این داروها از سوی دیگر، موجب شده تا در سال‌های اخیر بیشترین توجه به عوامل با پایه طبیعی مانند گیاهان دارویی معطوف شود، که حداقل اثرهای سوء یاد شده را داشته باشند. آثار ضد باکتریایی گیاهان مختلف از قبیل زیره سبز، رزماری، چای سبز، اسفند، شیرین‌بیان، بلوط، مرزه کوهی و بابونه در شرایط آزمایشگاهی روی باکتری لاکتوکوکوس گارویه از سوی پژوهشگران کشور مورد بررسی قرار گرفته است (۵ و ۱۳). این پژوهش با هدف تعیین فراوانی لاکتوکوکوس گارویه با روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی در مزارع پرورشی قزل‌آلای رنگین‌کمان استان مازندران و تعیین حساسیت این باکتری نسبت به اسانس‌های گیاهی زیره سیاه (*Bunium persicum*)، نعناع فلفلی (*Mentha piperita*)، بومادران (*Achillea wilhelmsii*) و درمنه (*Artemisia annua L*) در مقایسه با داروی شیمیایی استرپتوماکسین صورت گرفته است.

مواد و روش کار

به‌منظور جداسازی و شناسایی باکتری لاکتوکوکوس گارویه، نمونه‌گیری از ۲۰۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (با محدوده وزنی 80 ± 220 گرم) با علائمی مشکوک به لاکتوکوکوزیس، از ۱۰ مزرعه پرورشی در استان مازندران صورت گرفت. نمونه‌ها در مجاورت یخ و در حداقل زمان ممکن به آزمایشگاه باکتری‌شناسی پژوهشکده اکولوژی خزر منتقل شدند و نمونه‌گیری از قدام کلیه، کبد، طحال و مغز صورت گرفت؛ سپس نمونه‌ها در محیط آگار قلب مغز (Brain heart infusion) کشت داده شده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری



نتایج

نتایج کشت باکتریایی منجر به جداسازی تعداد ۹۲ جدایه باکتریایی (۴۵ درصد کل) از بافت‌های مورد مطالعه ماهیان بود و از ۵۵ درصد ماهیان مورد مطالعه هیچ باکتری جداسازی نشد. از تعداد ۹۲ جدایه باکتریایی جداسازی شده، تعداد ۶۸ نمونه در گروه کوکوباسیل‌های گرم مثبت قرار داشتند. بر اساس نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی ۴۹ جدایه (۲۴/۵ درصد کل نمونه‌ها) مشخصات مربوط به گونه لاکتوکوکوس گارویه را داشتند؛ یعنی کاتالاز، اکسیداز، اوره آز و سیترات منفی و سوربیتول مثبت بودند. پس از انجام واکنش PCR بر روی ۴۹ جدایه، تعداد ۳۸ جدایه (تعداد ۱۹ درصد کل نمونه‌های مورد مطالعه) به‌عنوان باکتری لاکتوکوکوس گارویه تشخیص داده شدند (شکل ۱). نتایج مطالعه یاد شده نشان داد که از ۱۰ مزرعه مورد مطالعه تعداد ۸ مزرعه (آمل، تنکابن، هراز، ساری، نوشهر، سوادکوه، چالوس و بابل) مبتلا به لاکتوکوکوس گارویه بودند.

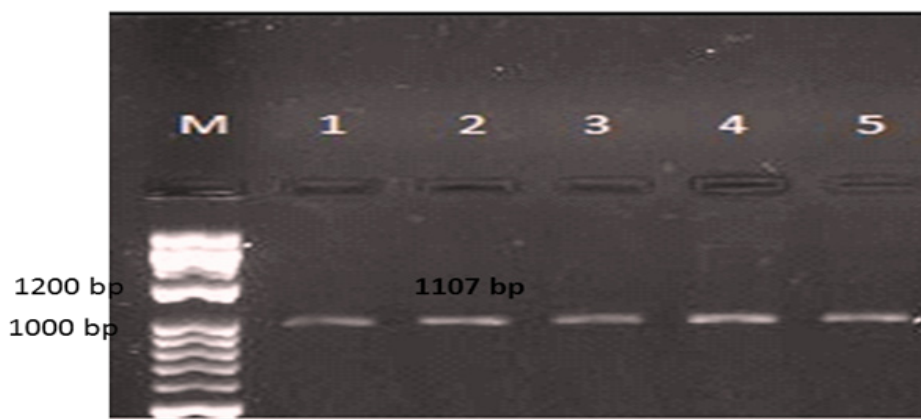
نتایج اندازه‌گیری قطر هاله‌ی مهاری نشان داد که قطر هاله‌ی مهاری استرپتومایسین $16/8 \pm 0/3$ میلی‌متر و اسانس‌های زیره سیاه، نعنای فلفلی، بومادران و درمنه به ترتیب $21/2 \pm 1/2$ ، $20/1 \pm 0/7$ ، $14/6 \pm 0/9$ میلی‌متر تعیین شد (جدول ۱). نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که محدوده MIC اسانس‌های مورد مطالعه بین ۱-۰/۰۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار داشت (جدول ۱)؛ همچنین مقادیر MBC برای اسانس‌های درمنه، نعنای فلفلی، بومادران و زیره سیاه به ترتیب < 1 ، $0/5$ ، $> 1/5$ و $0/12$ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. این در حالی است که مقدار MIC و MBC استرپتومایسین برای این باکتری به ترتیب $0/5$ و 1 میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد (جدول ۱).

بحث

برای مطالعه فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های زیره سیاه، نعنای فلفلی، بومادران و درمنه از روش انتشار در دیسک استفاده شد. بدین منظور ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری (حاوی 10^7 باکتری) بر روی محیط ژلوز خون کشت داده شد؛ سپس ۱۰ میکرولیتر از اسانس‌های رقیق نشده به دیسک‌های بلانک (قطر ۶ میلی‌متر) اضافه شد و آن‌گاه دیسک‌ها بر روی محیط کشت TSA قرار داده شدند (۲۱). در این مطالعه، از دیسک استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم) برای کنترل مثبت استفاده شد؛ همچنین به‌عنوان کنترل منفی، ۵ میکرولیتر DMSO ۴ درصد به دیسک‌های فیلتر اضافه گردید و سپس در دمای ۲۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری شد. پس از گذشت این زمان قطر هاله‌ی عدم رشد برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

برای تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی رشد هر یک از اسانس‌ها از روش ماکرودایلوشن استفاده شد (۲۱). رقت‌های تهیه شده شامل $0/0017$ ، $0/0035$ ، $0/007$ ، $0/015$ ، $0/03$ ، $0/06$ ، $0/12$ ، $0/25$ ، $0/5$ ، $1/5$ و 2 (میکرولیتر بر میلی‌لیتر) بود (۲۱). از کشت ۴۸ سوسپانسیون باکتریایی با تراکم 10^7 تهیه و به میزان ۱۰ میکرولیتر به هر یک از رقت‌ها تلقیح گردید؛ سپس محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرما گذاری شد. پس از ۲۴ ساعت کمترین غلظتی از اسانس که در آن کدورت مشاهده نشد به‌عنوان MIC (Minimum Inhibitory Concentration) در نظر گرفته شد. از رقت‌های MIC و بیشتر از آن به میزان ۱۰ میکرولیتر روی محیط ژلوز خون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد و کمترین غلظتی که در آن هیچ پرگنه‌ی باکتری رشد نکرد به‌عنوان MBC (Minimum Bacteriocidal Concentration) لحاظ شد (۲۱). مقایسه آماری داده‌ها بر اساس آزمون t-test و در سطح احتمال ۵ درصد تعیین شد ($P < 0/05$).





شکل ۱- PCR حاصل از DNA برخی جدایه های لاکتوکوکوس گارویه مورد استفاده در این مطالعه (M: مارکر، جدایه ۵: کنترل مثبت، جدایه های ۱، ۲، ۳ و ۴: جدایه های مورد آزمایش)

جدول ۱- فعالیت ضد باکتریایی اسانس های گیاهی مورد مطالعه روی باکتری لاکتوکوکوس گارویه در شرایط آزمایشگاهی

اسانس مورد مطالعه	میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی متر)		میزان MBC (mg/ml)	میزان MIC (mg/ml)	اسانس
	کنترل مثبت (استرپتومایسین)	کنترل منفی 4%DMSO			
نعناع فلفلی	^a ۱۶/۹±۰/۲	-	۰/۵	۰/۱۲	
درمنه	^a ۱۷/۱±۰/۳	-	<۱	۰/۵	
زیره سیاه	^a ۱۶/۸±۰/۲	-	۰/۱۲	۰/۰۶	
بومادران	^a ۱۷/۰±۰/۲	-	>۱/۵	<۱	

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه ها است ($P < 0.05$).

هم زمان آزمایش های بیوشیمیایی و تکنیک های مولکولی از قبیل PCR و Multi-PCR ضروری به نظر می رسد (۱). نتایج بررسی حاضر نشان دهنده آن است که ۱۹ درصد از ماهیان قزل آلا ی رنگین کمان مورد بررسی، در ده مرکز پرورشی استان مازندران مبتلابه لاکتوکوکوزیس بودند. مطالعه Soltani و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داد، ۴/۶ درصد از ماهیان پرورشی در این استان مبتلابه لاکتوکوکوس گارویه بودند که نسبت به این پژوهش درصد ابتلای کمتری داشتند (۲۰). پژوهش Shahrani و همکاران در سال ۲۰۱۴ در استان چهارمحال و بختیاری مشخص کرد، ۷۶ درصد از ماهیان مورد مطالعه در ۲۳ مزرعه مبتلا به لاکتوکوکوزیس بودند (۱۵). در

در سال های اخیر لاکتوکوکوس گارویه به عنوان یکی از مهم ترین علل بروز تلفات و خسارات اقتصادی در مزارع سردابی کشور مطرح شده است (۴). علائم کلینیکی مشاهده شده در این مطالعه شامل اگزوفتالمی یک یا دوطرفه، خونریزی در چشم، اندام های داخلی و قاعده باله ها، تیرگی بدن، تورم شکم و شنای نامنظم بود که با نشانه های بالینی گزارش شده از سوی پژوهشگران مختلف در ماهیان قزل آلا ی رنگین کمان مبتلابه لاکتوکوکوزیس تشابه فراوانی دارد (۱، ۴، ۱۵، ۱۶ و ۱۹). با توجه به غیراختصاصی بودن نشانه های بالینی در اکثر بیماری های خونریزی دهنده باکتریایی و به منظور کنترل و شناسایی دقیق و سریع عوامل ایجاد کننده تلفات در ماهیان استفاده



مارسنس (*Serratia Marcescens*) و *اشریشیا کلای* (*Escherichia coli*) به ترتیب با قطر هاله‌ی بازدارندگی رشد ۳۰، ۲۴، ۲۱، ۲۰ و ۲۸ میلی‌متر بوده است (۵). بررسی‌های به عمل آمده نشان‌دهنده آن است که اثر ضد میکروبی اسانس زیره سیاه بیشتر مربوط به حضور ترکیب‌های تریپونین و کومین آلدئیدی آن است (۴ و ۵). نتایج آزمایشگاهی این مطالعه نشان داد که اسانس نعنای فلفلی پس از زیره سیاه، اثر ضد باکتری مناسبی روی باکتری بیماری‌زای *لاکتوکوکوس گارویه* دارد به گونه‌ای که حداقل غلظت مهارکنندگی آن ۰/۱۲ میکروگرم در میلی‌لیتر، حداقل MBC ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و هاله‌ی عدم رشد در محدوده $20/1 \pm 1/2$ میلی‌متر بوده است. بررسی Talpur در سال ۲۰۱۴ نشان داد که استفاده از سطوح مختلف پودر نعنای فلفلی در جیره غذایی ماهی سیپ دریاپی (*Lates calcarifer*) موجب افزایش مقاومت ماهی در برابر باکتری *ویبریو هاروی* (*Vibrio harveyi*) می‌شود (۲۲). در مطالعه دیگری خاصیت ضد میکروبی نعنای فلفلی علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها شامل *سالمونلا تیپیموریوم*، *اشریشیا کلای*، *سودوموناس آئروجنازا* به اثبات رسیده است (۶، ۷ و ۱۸). مطالعات نشان داد که خواص ضد میکروبی این گیاه بیشتر به دلیل وجود منتول و کتون‌هایی نظیر پولیجون (*Pulegone*)، ایزومنتون (*Isomenthone*)، کارون (*Carvone*)، پیپیریتون (*Piperitone*) و دهیدروکارون (*Dehydrocarvone*) است که موجب از هم گسستگی دیواره سلولی باکتری و در پایان تخلیه محتویات و مواد داخل سلولی آن می‌شود (۱۸).

پس از اسانس نعنای فلفلی، اسانس درمنه، خاصیت ضد باکتری نسبتاً مناسبی نسبت به اسانس بومادران روی *لاکتوکوکوس گارویه* دارد. آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس درمنه نشان داد که اسانس تهیه شده از بخش‌های هوایی آن دارای مقادیر قابل توجه ترکیبات فلاونوئیدی و فنولیک از قبیل ایزوالنتولاکتون دارد که خواص ضد میکروبی این

مطالعه مشابه دیگری که از سوی Soltani و همکاران در سال ۲۰۱۱، در این استان به عمل آمد، ۲۵ درصد از کل جدایه‌های باکتریایی به‌عنوان *لاکتوکوکوس گارویه* تشخیص داده شد (۱۹). این در حالی است که در بررسی Sharifyazdi و همکاران در سال ۲۰۱۰، در استان فارس نشان دادند که ۱۶ درصد از کل نمونه‌های مورد مطالعه مبتلابه *لاکتوکوکوس گارویه* بودند (۱۶). کلیه مطالعات یاد شده بیانگر گسترش و پراکندگی فراوان باکتری مذکور در مزارع مهم پرورشی کشور است؛ از سویی با توجه به این‌که بیماری ناشی از این باکتری، در گروه بیماری‌های قابل انتقال به انسان قرار گرفته است لازمه اتخاذ برنامه‌های مؤثر و کاربردی به‌منظور مقابله و کنترل این بیماری بیش از پیش نمایان می‌شود (۲۰). از سوی دیگر مقاومت‌های دارویی ایجاد شده روی این باکتری که در محدوده ۲۵ تا ۱۰۰ درصد (۱۴) یا $33/8$ تا $62/7$ درصد (۱۵) گزارش شده است، لزوم توجه به استفاده از ترکیبات طبیعی جایگزین، از قبیل عصاره و اسانس‌های گیاهی - که کمترین اثرهای سوء ذکر شده برای آنتی‌بیوتیک‌هاست - را ضروری کرده است (۲۴).

نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد که در بین اسانس‌های گیاهی مورد مطالعه، اسانس زیره سیاه بیشترین اثر مهارکنندگی باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* را با قطر هاله‌ی بازدارندگی $21/2 \pm 1/4$ میلی‌متر داشته است. مطالعه‌ی Rafiee Pour و همکاران در سال ۲۰۱۴، نیز نشان‌دهنده اثر ضد باکتریایی مناسب اسانس زیره سبز و رزماری بر باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* بود (۱۳). نتایج مطالعات دیگر نیز تأییدکننده اثرات ضد میکروبی قابل توجه زیره سیاه علیه باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) و اپیدرمیدیس (*Staphylococcus epidermidis*) با قطر هاله‌ی بازدارندگی رشد ۳۲ و ۲۹ میلی‌متر و باکتری‌های گرم منفی *شیگلا فلکسنری* (*Shigella flexner*)، *کلبسیلا پنومونی* (*Klebsiella pneumoniae*)، *سراشیا*





- cosis in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Bull. Eur. Ass Fish Pathol; 2000; 24: 132-136.
- 2- Austin, B. and Austin DA. Bacterial Fish Pathogens. Disease of Farmed and Wild Fish; 4th Ed.; Springer Bristol UK; 2007; pp: 124-128.
- 3- Azadbakht. M; Semnani, K; Khansari, N. The essential oils composition of *Achillea Wilhelmsii* C. Koch leaves and flowers. J. Med Plant; 2003; 2: 55-59.
- 4- Fereidouni, M.S; Akhlaghi, M. and Khadem Alhosseini, A.A. Antibacterial effects of medicinal plant extracts against *Lactococcus garvieae*, the etiological agent of rainbow trout lactococcosis. Inter J. Aquatic Biol; 2013; 1(3): 119-124.
- 5- Foroumadi, A; Asadipour, A; Arabpou, R.F. and Amanzadeh, Y. Composition of the Essential Oil of *Bunium persicum* (Boiss.) from Iran. J. Essential Oil Res; 2002; 14: 161-162.
- 6- Hadian, J; Ghasemnezhad, M. and Ranjbar H. Antifungal potency of some essential oils in control of postharvest decay of strawberry caused by *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger*. J. Essential Oil Res; 2008; 11: 553-562.
- 7- Iscan, G; Demirci, F; Kirimer, N; Ku'rku'oglu, M. and Baser, K.H.C. Antimicrobial screening: *Mentha piper-*

اسانس به این ترکیبات نسبت داده می‌شود (۸). در این پژوهش مقادیر MIC اسانس درمنه برای لاکتوکوکوس گارویه ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد، این در حالی است که این مقدار برای باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۰/۰۵۳ و ۰/۰۳۱ گرم در لیتر و برای باکتری‌های *سودوموناس آئروجناز* و *اشریشیاکلا* به ترتیب ۰/۰۲۵ و ۰/۰۱۷ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد (۹). نتایج بررسی حاضر نشان داد که اسانس بومادران کمترین اثر مهارکنندگی رشد را روی لاکتوکوکوس گارویه در بین اسانس‌های مورد مطالعه داشت. مقدار MIC بومادران برای لاکتوکوکوس گارویه < ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. بیشترین خواص ضد میکروبی بومادران به حضور ترکیبات فلاونوئیدی و سزکوئی ترین نسبت داده می‌شود (۳ و ۱۲).

با توجه به گسترش لاکتوکوکوزیس در سطح مزارع پرورشی استان مازندران و مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به وجود آمده در سال‌های اخیر و طبق نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، می‌توان بیان کرد که اسانس گیاهان زیره سیاه، نعنای فلفلی و درمنه اثر ضد باکتریایی مناسبی علیه باکتری لاکتوکوکوس گارویه در شرایط آزمایشگاهی دارند. در ادامه لازم است که مطالعات وسیع‌تر و دامنه‌دارتری در شرایط بالینی در مزارع پرورشی صورت گیرد و پس از مشخص شدن دوز مؤثر، ماده مؤثره اصلی، عامل آنتی باکتریال و مکانیسم اثر اسانس‌های زیره سیاه، نعنای فلفلی و درمنه، اسانس گیاهی مذکور به‌عنوان مواد ضد باکتریایی طبیعی و جدید به صنعت آبی‌پروری کشور معرفی شوند و بتواند جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های مقاوم به‌منظور کنترل و کاهش خسارات اقتصادی ناشی از باکتری لاکتوکوکوس گارویه گردند.

منابع

- 1- Akhlaghi, M. and Mahjoor, M. Some histopathological aspects of streptococ-

- 13- Rafiee Pour, A; Mirzargar, S.S; Soltani, M; Ebrahimzadeh Mousavi, H.A. and Mostafavi, S.A. The antibacterial effects of *Cuminum cyminum* L. and *Rosmarinus officinalis* extracts and essential oil against *Lactococcus garvieae* in laboratory conditions on rainbow trout. Eur. J. Experi Biol; 2014; 4(1): 456-463.
- 14- Raissy, M. and Ansari, M. Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). African J. Biotech; 2011; 8(10): 1473-76.
- 15- Shahrani, M; Raissy, M. and Tajbakhsh, E. Study of frequency and antimicrobial resistance of *Lactococcus garvieae* in rainbow trout fish in Chaharmahal va Bakhtiari Province. Biologic J. Micro-org; 2014; 11(3): 71-78.
- 16- Sharifiyazdi, H; Akhlaghi, M; Tabatabaei, M. and Mostafavizadeh, S.M. Isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) cultured in Iran. Iranian J. Vet Res; 2010; 11, 342-350.
- 17- Sivam, G.P. Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as supplement. American Soc Nutri Sci; 2001; 131: 1106 -1108.
- 18- Sivropoulou, A; Kokkini, S; Lanaras, T; Arsenakis, M. and Papaniko laou, E. Antimicrobial and cytotoxic activities of ita essential oil. J. Agri Food Chem; 2002; 50: 3943-3946.
- 8- Kazemi, M; Zand, M.R; Roshanaei, K; Mehrzad, M. and Rustaiyan, A. Composition of the Volatile Oils of *Artemisia armenica* Lam. and *Artemisia splendens* Willd From Iran. J. Essential Oil Res; 2010; 22:126-128.
- 9- Massiha, A; Khoshkholgh-Pahlaviani, M.M. and Issazadeh, Kh. Antibacterial activity of essential oils and plant extracts of *Artemisia (Artemisia annua L.)* in vitro. J. Res Med Sci; 2013; 15(6): 14-18.
- 10- Milani, C.J.E; Aziz, R.K; Locke, J.B; Dahesh, S. and Nizet, N. The novel polysaccharide deacetylase homologue Pdi contributes to virulence of the aquatic pathogen *Streptococcus iniae*. J. Microbiol; 2010; 156: 543-554.
- 11- Mirzakhani, A. Isolation of *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae* in rainbow trout farms in Chaharmahal va Bakhtiari Province by Multiplex PCR. Shahrekord: Islamic Azad Univ. J; 2009; pp: 14-36.
- 12- Mothana, R, Lindequist U, Geraenert R, Bednarski P. Studies of the in Vitro Anticancer, Antimicrobial and antioxidant potentials of selected Yemeni medicinal plants from the island Soqatra. BMC Complem Alternat Med. 2009; 9: 7-11.



- 24- Zargary, A. Medicinal plants; 6th.Ed.; Tehran: Tehran University Publications; 1991; pp: 14-18.
- Origanum essential oil concentration. J. Agric Food chem; 1996; 44: 1202-1205.
- 19- Soltani, M; Raissy, M; Goodarzi, M.A. and Momtaz, H. Isolation of *Lactococcus garvieae* in rainbow trout farms and 16SrRNA gene sequencing in Chahramahal VA Bakhtiari Province. J. Vet Med; 2011; 8(1): 61-67.
- 20- Soltani, M; Hazeri, M; Sharifpour, I; Mirzargar, S. and Shohre, P. Study of Bacterial Diseases in Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mikyss*) in Mazandaran Province. Iranian J. Vet Microbiol; 2012; 8, 1-12.
- 21- Soltani, M; Ghodratnama, M; Taheri Mirghaed, A; Zargar, A. and Rooholahi, Sh. The effect of *Zataria multiflora* Boiss and *Rosmarinus officinalis* essential oil on *Streptococcus iniae* isolated from Rainbow trout farms. J. Vet Microbiol; 2013; 9(1): 1-11.
- 22- Talpur, A.D. *Mentha piperita* (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch) against *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture; 2014; (420-421): 71-78.
- 23- Wang, C.Y.C; Shie, H.S; Chen, S.C; Hung, J.P. and Hsie, H.T.C. *Lactococcus garvieae* infections in human: possible association with aquaculture outbreaks. Inter J. Clinic Pract; 2007; 61(1): 68-73.





Molecular study and determine the sensitivity of *Lactococcus garvieae* the causative agent of lactococcosis in rainbow trout on essential oils

Adel, M.^{1*}; Safari, R.²; Nematolahi, A.³; Taghdosi, V.⁴

1. PhD Student, Department of Aquatic Animal Health and Diseases, Caspian Sea Ecology Research Center, Sari- Iran.
2. Lecturer, Department of Microbiology, Caspian Sea Ecology Research Center, Sari-Iran.
3. Associate Professor, Department of Food hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
4. PhD Student, Department of Biotechnology, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz-Iran.

Received: 11 January 2015 *Accepted:* 27 May 2015

Summary

Lactococcus garvieae is the one of the most causative agents of economic losses in fish farms in Iran. In this study, frequency of *L. garvieae* from 10 rainbow trout fish farms in Mazandaran Province was studied using biochemical tests and PCR. Then, Serial dilutions of essential oils of *Artemisia annua* L, *Mentha piperita*, *Achillea wilhelmsii* C. Koch and *Bunium persicum* was prepared to determine minimum bacteriocidal concentration (MBC) and minimum inhibitory concentration (MIC) of isolated bacteria. Also, the inhibition zone diameter of bacteria was determined by disc diffusion method and compared to each other. The results indicated that fish from 7 out of 10 studied farms were infected to lactococcosis and 38 isolates were identified as *L. garvieae* from the fish. The results also represented that essential oils of *B. persicum*, *M. piperita* and *A.annua* L showed good antibacterial activity on *L. garvieae* that comparable to streptomycin. The results of the present study demonstrated that mention essential oils after more studies could be a replaced than common industrial antibiotics to treat infections caused by *L. garvieae*.

Keywords: *Lactococcus garvieae*, Rainbow trout, Sensitivity, herbal essential oils.

* Corresponding Author email: miladadel85@yahoo.com

