

مطالعه اثر عصاره آبی و اتانولی گیاه زنیان (*Ammi Trachyspermum*) و چای کوهی (*Stachys lavandulifolia*) بر علیه استرپتوکوکوس اینیایی عامل بیماری استرپتوکوکوزیس جدا شده از ماهیان قزل آلابی رنگین کمان پرورشی

محسنی سی سخت پ^۱. نعمت اللهی ا^{۲*}. عباس والی م^۳. کبوتری ج^۴.

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بهداشت آبزیان. دانشکده دامپزشکی. دانشگاه شهرکرد
- ۲- دانشیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد-ایران
- ۳- استادیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد-ایران
- ۴- استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد-ایران

چکیده

استرپتوکوکوزیس یک بیماری عفونی سپتی سمیک در ماهیان است. استفاده مکرر از آنتی بیوتیک ها در صنعت آبی پروری باعث تجمع زیستی این ترکیبات در بافت های خوراکی ماهیان و ظهور عوامل بیماری زای باکتریایی مقاوم به دارو در این صنعت شده است. از جمله راهکارها به منظور مقابله و جلوگیری از بروز مقاومت آنتی بیوتیکی، استفاده از عصاره ها و اسانس های گیاهی علیه باکتری های بیماری زای ماهی می باشد. مطالعه اخیر به منظور استفاده از عصاره های گیاه زنیان و چای کوهی علیه باکتری زئونوز/استرپتوکوکوس اینیایی انجام شد. برای تعیین قدرت ضد باکتریایی عصاره ها از روش استاندارد انتشار در دیسک، تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) استفاده گردید. حداقل غلظت کشندگی عصاره های الکلی و آبی زنیان به ترتیب، غلظت ۱۸/۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر و غلظت ۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر و حداقل غلظت کشندگی عصاره های الکلی و آبی چای کوهی نیز به ترتیب، غلظت ۱۸/۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر و غلظت ۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر محاسبه شد. در نتیجه، عصاره اتانولی گیاه زنیان و چای کوهی بیشترین اثر ضد باکتریایی علیه باکتری استرپتوکوکوس اینیایی از خود نشان دادند. با توجه به اثر مناسب عصاره های فوق روی باکتری استرپتوکوکوس اینیایی، لازم است امکان استفاده از آن ها در درمان و پیشگیری از بیماری های باکتریایی ماهی ارزیابی بیشتری گردد. واژه های کلیدی: "استرپتوکوکوس اینیایی"، "ماهی قزل آلابی رنگین کمان"، "عصاره گیاه زنیان"، "گیاه چای کوهی"، "مهارکنندگی و کشندگی".

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی به منظور درمان بیماری از سالیان دور در مناطق مختلف دنیا و همچنین ایران رواج داشته است. مقاومت دارویی منجر به افزایش مرگ و میر آبزیان و افزایش هزینه های مراقبت بهداشتی کارگاه می شود که پیشگیری از بروز مقاومت و انتشار میکروارگانیسم مقاوم میتواند منجر به کاهش اثرات زیان آور و هزینه های وابسته به آنها شود (۲). آنتی بیوتیک ها سبب کشته شدن باکتری های مفید در لوله گوارش میزبان شده و همچنین به خاطر تجمع در محصول نهایی سبب بروز مشکلات سلامتی در مصرف کننده نهایی میگردند (۳). در ایران مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف، نسبت به باکتری استرپتوکوکوس اینیایی، عامل بیماری

استرپتوکوکوزیس قزل آلالی رنگین کمان گزارش گردیده است، به طوری که امروزه این مقاومت های دارویی به عنوان یک معضل بزرگ در درمان این بیماری مطرح می‌باشند. بیماری استرپتوکوکوزیس در ماهی به شکل مجموعه ای از بیماری های مشابه می باشد و توسط جنس ها و گونه های مختلفی از باکتری های کوکسی که گرم مثبت، کروی شکل، غیر متحرک، کاتالاز منفی و بدون اسپور است ایجاد می گردد(۲۳). تاکنون گزارش شده است که ۲۷ گونه از ماهیان پرورشی از جمله ماهی قزل آلالی رنگین کمان مستعد به عفونت استرپتوکوکوس اینیایی می باشند(۶). علائم این بیماری شامل بیرون زدگی دوطرفی چشم ها و یا فرورفتگی آن ها، تیرگی پوست، خونریزی های سرسوزنی روی دیواره داخلی سرپوش آبششی و شکم ماهی مبتلا به استرپتوکوکوزیس، متسع شده و در محوطه صفاقی مایع آسینی همراه با خون وجود دارد. از جمله راهکارها به منظور مقابله و جلوگیری از بروز مقاومت آنتی بیوتیکی، استفاده از عصاره ها و اسانس های گیاهی می باشد که دارای حداقل اثرات سوء، در ارتباط با آنتی بیوتیک ها می باشند(۱۰). تحقیقات نشان داده است که افزودن گیاهان دارویی به رژیم غذایی آبیان موجب تعدیل میکروفلور روده ای آن ها می شوند(۱۶ و ۳۲). استفاده از گیاهان و مشتقات آنها از دیرباز در درمان بسیاری از بیماری ها رواج داشته است(۳۳). نخستین بار چینی ها در پرورش ماهی کپور از گیاه سیر و ریواس به منظور درمان برخی بیماری ها استفاده نمودند(۱۰). مطالعات نشان دهنده آن است که خاصیت ضد میکروبی گیاهان عموماً به دلیل وجود ترکیبات فنلی، ساپونین، تانن و فلاونوئیدهای موجود در ساختارهای آن ها می باشد که با تاثیر بر روی غشای پلاسمایی و سلولی میکروارگانیسم ها و یا با مهار آنزیم های ساختاری غشای سلولی آن ها خاصیت ضد میکروبی خود را اعمال می نمایند(۱۷). زینان با نام علمی *Ammi Trachyspermum* متعلق به خانواده چتریان می‌باشد. یک گیاه معطر، علفی و یکساله است که در طب سنتی به منظور اثرهای درمانی مختلف مانند مدر، ضد تهوع، ضد نفخ استفاده می‌شود(۳۴). عصاره میوه این گیاه بصورت ضماد در التیام درد به کار می‌رود. این گیاه دارای ترکیباتی شامل تیمول، پارا-سیمن، گاما-ترپینن، بتا-پینن و کارواکرول می‌باشد که بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اثر دارد(۲۰). گیاه چای کوهی با اسم علمی *Stachys lavandulifolia* از خانواده نعناعیان می‌باشد که در تحقیقات بسیاری اثرات ضد میکروبی گیاهان متعلق به خانواده نعناعیان به اثبات رسیده است(۳۱). اثرات درمانی این گیاه در طب سنتی به عنوان یک داروی ضد عفونی کننده ریوی شناخته شده است(۲۸). این گیاه که با نام لولوپشمی یا اولیله شناخته می‌شود دارای ترکیبات دارای فعالیت بیولوژیکی می‌باشد که شامل فنیل اتانویید، ترپنویید و فلاونویید می‌باشد(۳۰). در چندین بررسی اثر گیاهان بر روی باکتری ها بررسی شده، از جمله تحقیق Romiani و همکاران ۲۰۱۲، با بررسی ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضد باکتریایی رزماری، آویشن شیرازی، شوید و اوکالیپتوس علیه استرپتوکوکوس اینیایی عامل مشترک در دام و انسان در مزارع پرورش ماهی، دریافتند که محدوده حداقل غلظت بازدارندگی این گیاهان به ترتیب ۲۵۰-۳/۹ میکروگرم بر میلی لیتر و ۵۰۰-۷/۸ میکروگرم بر میلی لیتر و محدوده حداقل غلظت کشندگی برای اسانس و عصاره گیاهان به ترتیب ۷/۸-۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر و ۱۵/۶-۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. اسانس رزماری قوی‌ترین اثر ضد میکروبی را از خود نشان داد(۲۴)، همچنین در مطالعه Pirbalouti و همکاران ۲۰۱۱، با بررسی فعالیت ضد میکروبی گیاهان دارویی ایران

علیه/استرپتوکوکوس/اینیایی جدا شده از قزل‌آلای رنگین کمان، اکثر عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی دارای فعالیت ضد باکتریایی نسبتاً بالایی علیه/استرپتوکوکوس/اینیایی بودند و از گیاهان مورد مطالعه، فعال‌ترین اسانس‌ها شامل: آویشن، مرزه، خوشاریزه و عصاره اتانولی بلوط بوده است. حداقل غلظت مهارکنندگی در مرزه ۳۹ میکروگرم بر میلی‌گرم و در گلپر ۷۸ میکروگرم بر میلی‌گرم بوده است. بنابراین اسانس مرزه می‌تواند یک منبع مهم ترکیبات ضد باکتری علیه/استرپتوکوکوس/اینیایی جدا شده از ماهی قزل‌آلای رنگین کمان باشد (۲۲). هدف از این مطالعه، بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی زنیان و چای کوهی بر باکتری/استرپتوکوکوس/اینیایی جدا شده از ماهیان قزل‌آلای پرورشی در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش کار

جمع‌آوری گیاه

بعد از شناسایی و جمع‌آوری گیاهان از نواحی مختلف استان کهگیلویه و بویر احمد، شهر سی سخت، قسمت مورد نیاز گیاهان جدا شده و در شرایط مناسب (تاریک و خشک) نگهداری و به طور کامل خشک گردید. بعد از خشک شدن و آسیاب کردن قسمت‌های مورد استفاده عصاره‌گیری انجام شد (شکل‌های ۱ و ۲).



شکل ۲- گیاه چای کوهیچگونگی تهیه عصاره



شکل ۱- گیاه زنیان

اتانولی و عصاره آبی

۵۰ گرم از پودر گیاه زنیان و ۵۰ گرم از پودر گیاه چای کوهی را در ۲۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه در ظروف جداگانه و ۵۰ گرم از پودر گیاه زنیان و ۵۰ گرم از پودر چای کوهی در دو ارلن جداگانه به ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید و ارلن‌ها به مدت ۷۲ ساعت روی شیکر قرار داده شد تا استخراج عصاره به طور کامل انجام گیرد، سپس مخلوط حلال و گیاه توسط صافی از هم جدا شد و عصاره صاف شده توسط دستگاه تقطیر در خلا (Rotary evaporator) تقطیر شد. عصاره‌ها در پلیت‌های استریل ریخته شدند. سپس در شرایط استریل ۳ گرم از هر کدام از عصاره‌ها را با ۷ میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط کرده و توسط دستگاه ورتکس خوب مخلوط شدند، آن‌گاه عصاره‌ها

از فیلتر میکروبیولوژی ۰/۲۲، میکرون عبود داده شدند و در ظرف درب‌دار استریل در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۲). سپس عصاره‌ها در رقت‌های گوناگون مورد بررسی قرار گرفتند.

روش تهیه سوسپانسیون باکتری

باکتری /استرپتوکوکوس/ اینیایی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت از آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی و آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد تهیه شده بود. باکتری فوق از همه‌گیری بیماری در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در استان چهارمحال و بختیاری جدا شده و با روش‌های بیوشیمیایی و سپس PCR جنس و گونه آن اثبات شده بود. باکتری در محیط تریپتیکاز سوی برات (TSB) کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در ۲۵ درجه انکوبه گردیدند. سپس در شرایط استریل بذر باکتری به محیط مولر هینتون برات اضافه گردید. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در فاز لگاریتمی رشد باکتری، میزان کدورت ایجاد شده حاصل از رشد باکتری با استفاده از اسپکتروفوتومتر با لوله استاندارد مک فارلند شماره ۵/۵ ($10^8 \times 1/5$) تنظیم گردید. این سوسپانسیون به عنوان ذخیره در نظر گرفته شده و در هنگام مصرف (در همان روز) به نسبت ۱:۱۰۰ در همان محیط رقیق گردید ($10^6 \times 1/5$) (۱۱).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های مورد آزمایش از روش Broth Micro Dilution استفاده گردید. بطور خلاصه، آزمایش‌ها در پلیت ۹۶ خانه استریل و با روش برات میکرودایلوشن انجام شد. بدین ترتیب که ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری را به چاهک‌های حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌ها و ۱۰۰ میکرولیتر محیط Muller Hinton Brouth (MHB) اضافه کردیم. سپس از خانه اول توسط سمپلر، ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و در خانه دوم ریخته شد، به همین ترتیب تا آخرین خانه این کار ادامه پیدا کرد و در نهایت از خانه آخر ۱۰۰ میکرولیتر به بیرون ریخته شد. تیمارها بدین صورت در نظر گرفته شد که، چاهک اول (کنترل مثبت) حاوی سوسپانسیون باکتریایی و محیط (MHB)، چاهک دوم (کنترل منفی) حاوی محیط (MHB) و سپس تیمارهای مربوط به عصاره‌ها بود. ضمناً سه تیمار آخر چاهک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک‌های، استرپتومایسین، اریترومایسین و جنتامایسین بود که برای مقایسه اثر ضد باکتریایی عصاره‌ها با آنها در نظر گرفته شد (شکل ۳).



شکل ۳- پلیت ۹۶ خانه و میکروپیپت جهت انجام آزمایش

تعیین قطر هاله عدم رشد برای مقادیر MIC و MBC

برای تعیین قطر هاله عدم رشد، بوسیله پیپت پاستور استریل و پمپ خلا چاهک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر در شرایط استریل در روی محیط مولر هینتون آگار ایجاد گردید. سپس ذخیره باکتری اولیه با کدورت‌سنجی بوسیله اسپکتوفوتومتر (با غلظت ۰/۵ مک فارلند) تهیه شده و به روش کشت سفره‌ای در سه جهت کشت داده شد. میزان ۲۵ میکرولیتر از مقادیر بدست آمده MIC برای هر عصاره در سه تکرار به گوده‌ها اضافه گردید و بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه، هاله عدم رشد باکتری با خط کش اندازه‌گیری و ثبت گردید (۱۲).

تجزیه و تحلیل آماری

در ابتدا آزمون نرمالیتیه انجام شد و با توجه به نرمال بودن داده‌ها از آزمون‌های پارامتریک استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌های آماری بدست آمده و رسم نمودارهای مربوط و نتایج با استفاده از نرم افزار آماری Excel ۲۰۱۳ و SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها (میانگین \pm خطای معیار، $Mean \pm SE$) و تیمارها با استفاده از آزمون‌های آنالیز واریانس یک طرفه و دانکن صورت گرفت.

نتایج

نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر در جدول ۱ و نمودارهای ۱ الی ۴ توضیح داده شده است. همانگونه که در جدول ۱ مشخص است، عصاره اتانولی گیاه زنیان و چای کوهی بیشترین اثر ضد باکتریایی علیه باکتری استرپتوکوکوس اینیایی از خود نشان دادند.

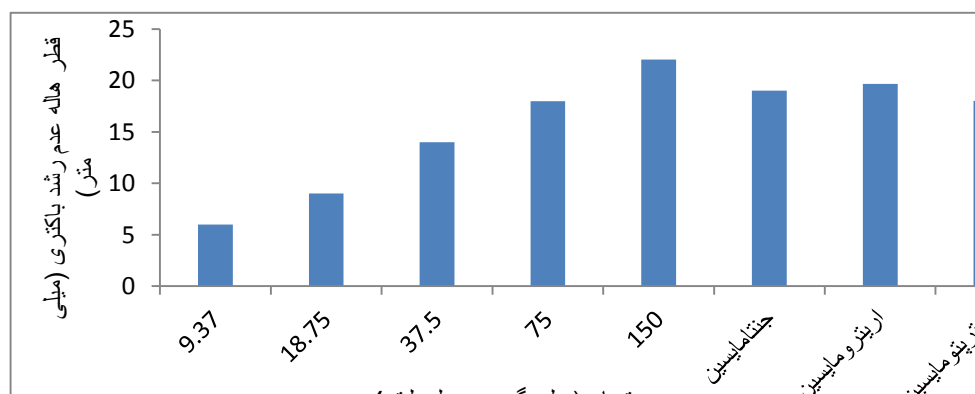
جدول ۱: حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های زنیان و چای کوهی علیه باکتری استرپتوکوکوس اینیایی.

۲/۳	۴/۶	۹/۳۷	۱۸/۷۵	۳۷/۱۵	۷۵	۱۰۰	باکتری	میلی گرم بر میلی لیتر
+	+	MIC	MBC	-	-	-	استرپتوکوکوس اینیایی	عصاره اتانولی زنیان
+	+	+	+	MIC	MBC	-	استرپتوکوکوس اینیایی	عصاره آبی زنیان
+	+	MIC	MBC	-	-	-	استرپتوکوکوس اینیایی	عصاره اتانولی چای کوهی
+	+	+	+	MIC	MBC	-	استرپتوکوکوس اینیایی	عصاره آبی چای کوهی

+ نشان دهنده رشد باکتری در محیط کشت می باشد.

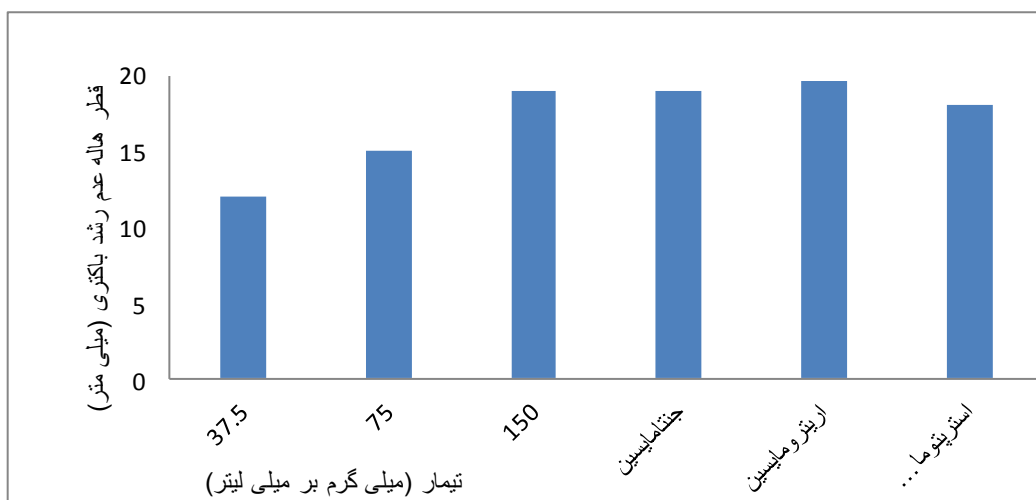
- نشان دهنده عدم رشد باکتری در محیط کشت می باشد.

بر طبق نتایج نشان داده شده در نمودار ۱، غلظت های عصاره اتانولی زنیان با هم اختلاف معنی داری به ازای قطر عدم رشد داشتند. با توجه به اختلاف معنی دار غلظت های مختلف عصاره ها، نتایج بازگو کننده افزایش اثر ضد باکتریایی عصاره به ازای افزایش غلظت آن ها می باشد؛ می توان گفت با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله بازدارندگی نیز افزایش می یابد. هاله عدم رشد در ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره با میانگین ۲۲/۰۵ میلی متری قطر هاله عدم رشد اریترومايسين با میانگین هاله عدم رشد ۲۱/۷۵ میلی متری رقابت می کند و می تواند جایگزین مناسبی برای اریترومايسين باشد.



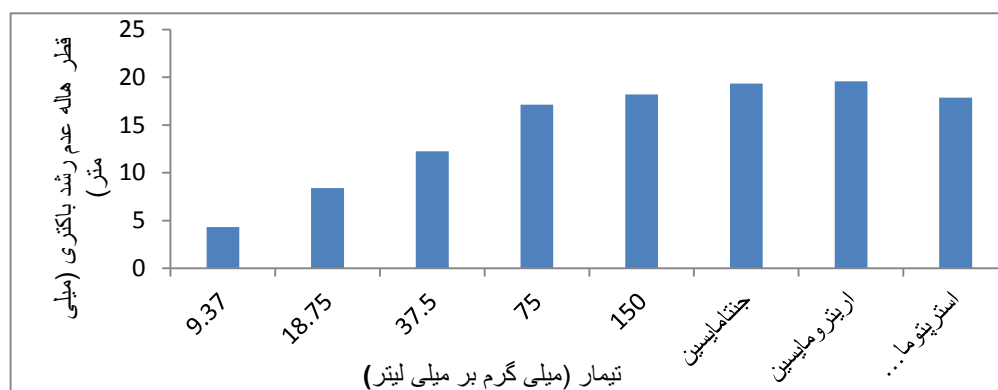
نمودار ۱. مقایسه اثر ضد باکتریایی عصاره اتانولی زنیان با آنتی بیوتیک های رایج علیه باکتری استرپتوکوکوس اینیایی.

عصاره آبی زنیان، در غلظت ۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر، اثر باکتری‌سیدی (MBC) مشخصی در برابر رشد *استرپتوکوکوس اینیایی* از خود نشان داد و همچنین در غلظت ۳۷/۵ میلی گرم بر میلی لیتر خاصیت باکتریواستاتیک (MIC) از خود بروز نمود. قطر هاله عدم رشد غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره با میانگین ۱۹/۴۱ میلی‌متر نسبت به قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط *استرپتومایسین* با میانگین ۱۸ میلی‌متر، بیشتر بوده است و این خود امکان جایگزینی آنتی بیوتیک با عصاره آبی زنیان را نشان می‌دهد (جدول ۱ و نمودار ۲).



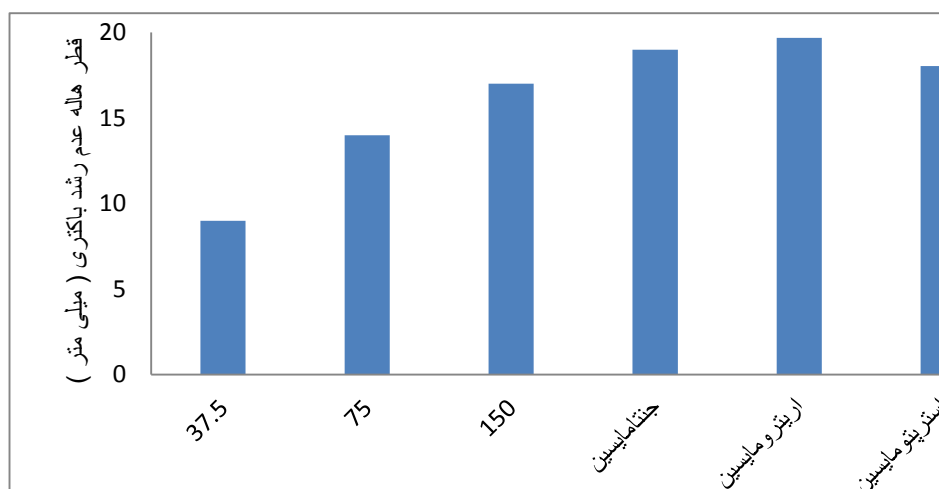
نمودار ۲. مقایسه اثر ضد باکتریایی عصاره آبی زنیان با آنتی بیوتیک‌های رایج علیه باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی*.

عصاره اتانولی چای کوهی، در غلظت ۱۸/۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر، اثر باکتری‌سیدی و در غلظت ۹/۳۷ میلی گرم بر میلی لیتر خاصیت باکتری استاتیک را در برابر رشد باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* از خود نشان داد. ولی از طرف دیگر، هاله عدم رشد مربوط به آنتی بیوتیک‌های اریترومایسین و جنتامایسین، بیشتر از بیشترین غلظت استفاده شده از عصاره اتانولی چای کوهی بود (جدول ۱ و نمودار ۳).



نمودار ۳. مقایسه اثر ضد باکتریایی عصاره اتانولی چای کوهی با آنتی‌بیوتیک‌های رایج علیه باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی*.

عصاره آبی چای کوهی، در غلظت ۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر، اثر باکتری‌سیدی و در غلظت ۳۷/۵ میلی گرم بر میلی لیتر خاصیت باکتری استاتیک را در برابر رشد باکتری /استرپتوکوکوس/ اینیایی از خود نشان داد. هاله عدم رشد مربوط به جنتامایسین با میانگین ۱۹/۵ میلی‌متر بیشتر از بیشترین غلظت استفاده شده از عصاره آبی چای کوهی بود (جدول ۱ و نمودار ۴).



نمودار ۴. مقایسه اثر ضد باکتریایی عصاره آبی چای کوهی با آنتی‌بیوتیک‌های رایج علیه باکتری /استرپتوکوکوس/ اینیایی.

بحث

در سال‌های اخیر نیز توجه زیادی به تاثیر عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی بر روی میکروارگانیسم‌ها به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی و ترکیبات آنتی‌میکروبیال شده است. گیاه زنیان دارای دانه‌های غنی از فیبر، مواد معدنی، ویتامین‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشد. تیمول، موجود در آن که عمده‌ترین ترکیب شیمیایی آن می‌باشد به عنوان یک آنتی‌باکتریال، ضد اسپاسم و داروی ضد قارچ شناخته شده است. به همین علت است که در بعضی مناطق از جمله در هند، مصر و خاورمیانه برای درمان عفونت‌های پوستی به کار می‌رود (۱۹). مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی گیاه زنیان، تیمول، سیمن، آلفاپینن، دی‌پنتن، گاما ترپنین، بتاپینن، میرسن و کارواکرول می‌باشد که بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اثر دارد (۱۸). Oskuee و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر درمانی گیاه زنیان را در ایران مورد مطالعه قرار دادند و مشخص نمودند که تیمول بخش اصلی و موثر این گیاه است. گیاه در برابر باکتری /استافیلوکوکوس/ اورئوس و باسیلوس سابتیلیس اثر ضد باکتریداشته و همچنین فعالیت ضد ویروسی در برابر فاژ از خود نشان داد (۲۱)، همچنین در مطالعه خسروی‌پور و همکاران (۱۳۹۳)، با بررسی فعالیت ضد باکتریایی اسانس گیاه زنیان بر باکتری‌های *Pectobacterium carotovorum subsp. Carotovorum* و *Escherichia coli* در محیط کشت آگار مغذی، به این نتیجه رسیدند که، حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی اسانس زنیان علیه باکتری هایپکتو باکتریوم کاروتووورم به ترتیب معادل ۰.۵٪ و ۱٪ و در مورد باکتری /شریشیاکلی/ به ترتیب معادل ۰.۱۲۵٪ و ۰.۲۵٪ بود. با توجه به نتایج به نظر می‌رسد که اسانس زنیان می‌تواند جایگزین مناسبی در مقایسه با ترکیبات شیمیایی در کنترل باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی، جانوری و نیز انسانی باشد (۱۴). گیاه چای کوهی دارای ماده موثره هایپیرسین می‌باشد که فرآورده‌های آن هم بر اساس همین

ماده استانداردسازی می‌شوند و اثر ضد افسردگی گیاه نیز مربوط به این ماده است. اثر درمانی این گیاه نیز از سالیان دور مورد توجه بوده و در جوامع گوناگون مورد استفاده بوده است (۲۷). بیماری باکتریایی استرپتوکوکوزیس در استخرهای پرورش ماهی، با ۳۰ تا ۵۰ درصد مرگ و میر همراه است. در چند دهه گذشته باکتری بیماری‌زای فوق سبب خسارات اقتصادی فراوانی در مزارع پرورش ماهی شده است (۷). ضمن اینکه در مناطقی که ماهیان بصورت خام مصرف می‌شوند به عنوان یک عامل زئونوز شناخته شده است (۵). به دلیل ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی ناشی از استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک‌ها در کارگاه‌های پرورش ماهی، در سال‌های اخیر توجه زیادی به جایگزینی فرآورده‌هایی با منشا گیاهی به عنوان جایگزین آنتی بیوتیک‌ها شده است. از این رو در این تحقیق اثر ضد باکتریایی گیاه زنیان و چای کوهی علیه باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که همه عصاره‌های مورد بررسی دارای خواص ضد باکتریایی بودند. بیشترین قدرت باکتریسیدی مربوط به عصاره اتانولی زنیان ($MBC=18/75$, $MIC=9/37$) و عصاره اتانولی چای کوهی با ($MBC=18/75$, $MIC=9/37$) بود. اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد این باکتری در اطراف گوده‌های حاوی عصاره‌ها نشان داد که، غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی زنیان هاله عدم رشد بیشتری نسبت جنتا مایسین، استرپتوماسین و اریترومایسین داشته است که نشان دهنده قدرت باکتریسیدی قوی این عصاره است. نتایج بازگو کننده افزایش اثر ضد باکتریایی عصاره به ازای افزایش غلظت آن‌ها می‌باشد می‌توان گفت با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله بازدارندگی نیز افزایش می‌یابد. هاله عدم رشد در غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی زنیان با میانگین $22/05$ میلی متری قطر هاله عدم رشد اریترومایسین با میانگین هاله عدم رشد $21/75$ میلی متری رقابت می‌کند و می‌تواند جایگزین مناسبی برای اریترومایسین باشد. عصاره آبی زنیان در غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره، هاله عدم رشد بیشتری نسبت به شاهد و کمتر از اریترومایسین داشت. طاهری میرقائد و همکاران (۱۳۹۷)، با بررسی اثر ضد باکتریایی اسانس زیره سیاه ایرانی علیه باکتری‌های بیماری‌زای ماهی، بیشترین و کمترین هاله مهار را برای باکتری‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* و *یرسینیا راکری* را ثبت کردند (۸)، همچنین صفری و همکاران (۱۳۹۴)، با بررسی اثرات ضد باکتریایی برخی اسانس‌های گیاهان بومی کشور علیه باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* در یافتند که در بین پنج اسانس گیاهی اسانس زیره سیاه بیشترین اثر مهار کنندگی علیه باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* با قطر هاله $32/8$ میلی متر داشته است (۲۹). در این بررسی حلال آب و اتانول برای تهیه عصاره‌های گیاه چای کوهی و زنیان مورد استفاده قرار گرفت. عصاره آبی دارای مواد محلول در آب می‌باشد و عصاره اتانولی می‌تواند شامل مواد مختلف با قطبیت کمتر نیز باشد. عصاره‌های الکلی میزان بالاتری از مواد موثره گیاه را استخراج می‌کنند. تقریباً همه ترکیبات ضد میکروبی شناخته شده گیاهی، حلقوی یا ترکیبات آلی هستند و بیشتر بوسیله حلال‌های اتانولی و متانولی استخراج می‌شوند. در بررسی حاضر، هاله عدم رشد مربوط به جنتامایسین با میانگین $19/5$ میلی متر بیشتر از بیشترین غلظت استفاده شده از عصاره اتانولی چای کوهی بود. هاله عدم رشد غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی چای کوهی با میانگین $18/38$ میلی متر نسبت به قطر هاله عدم رشد استرپتومایسین با میانگین ۱۸ میلی متر بیشتر بوده است. هاله عدم رشد مربوط به جنتامایسین با میانگین $19/5$ میلی متر بیشتر از بیشترین غلظت استفاده

شده از عصاره آبی چای کوهی بود. ایروانی و همکاران (۱۳۹۴)، با بررسی اثر عصاره مرزه، چای کوهی و پونه بر روی *استافیلوکوکوس آرتروس* مقاوم و حساس به متی‌سیلین، به این نتیجه رسیدند که چای کوهی خواص بازدارندگی و کشندگی خوبی نسبت به عصاره مرزه از خود نشان نداد، اما در مقابل سویه های مقاوم به متی‌سیلین این خواص بهتر نمایان شد. در این مطالعه، کم‌ترین اثرات ضد میکروبی مربوط به گیاه پونه بود که حساسیت آن در مقابل هر دو نوع باکتری حساس و مقاوم به متی‌سیلین یکسان بود (۱۳). تانن هم یکی از ترکیبات پلی فنلی یا پلیمری با وزن مولکولی بالا است که در گیاهان مختلف وجود دارد. تانن‌ها می‌توانند برای باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای و حتی سمی باشند و با رسوب پروتئین‌های میکروبی مانع از رشد آن‌ها می‌شوند (۹). ترپنوئیدها و اسانس‌ها، متابولیت‌های ثانویه هستند که غنی از ترکیبات با هسته‌ی مرکزی ایزوپرنی‌اند. این ترکیبات با نام عمومی، ترپن‌ها خوانده می‌شوند. هنگامی که این ترکیبات حاوی عناصر دیگری (معمولاً اکسیژن) باشند، ترپنوئید نامیده می‌شوند (۲۵). تقریباً همه ترکیبات ضد میکروبی شناخته شده گیاهی، حلقوی یا ترکیبات آلی هستند و بیشتر بوسیله حلال‌های اتانولی و متانولی استخراج می‌شوند (۱۵). فعالیت کم عصاره‌های آبی نسبت به عصاره های الکلی به علت غلظت کم ترکیبات فنولی محلول در آب است (۲۶). از طرف دیگر، باکتری‌های گرم مثبت نسبت به ترکیبات ضد باکتریایی، حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی هستند. به دلیل وجود غشای خارجی احاطه کننده دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی به نظر می‌رسد که این باکتری‌ها در برابر اثر عصاره‌ها حساسیت کمتری از خود نشان دهند. این غشا انتشار مواد آب‌گریز از میان لایه پوشاننده لیپوپلی ساکاریدی را محدود می‌کند (۵). Abutbul و همکاران (۲۰۰۴)، با بررسی اثر درمانی آویشن بر بیماری استرپتوکوکوزیس ناشی از *استرپتوکوکوس اینیایی* در تیل‌پیا، بیان نمودند که آویشن دارای اثر ضد باکتریایی بر علیه این باکتری بوده و تجویز خوراکی آویشن به صورت برگ‌های خشک آن و یا عصاره اتیل استات خشک، در غذا سبب کاهش میزان مرگ و میر در مقایسه با گروه کنترل که غذایشان فاقد آویشن بوده است، گردید (۴). علیشاهی و همکاران (۱۳۸۸) با مطالعه اثرات ضد باکتریایی برخی عصاره‌های گیاهی علیه *استرپتوکوکوس اینیایی*، *یرسینیا راکری* و *آئروموناس هیدروفیلا* دریافتند که اسانس های زیره سیاه، آویشن شیرازی و سیر اثرات ضد باکتریایی مناسبی علیه *S.iniae* از خود نشان دادند (۱).

باتوجه به نتایج بدست آمده از بررسی حاضر، با استفاده از روش میکرودايلوشن، مقادیر MIC و MBC عصاره های اتانولی زنیان و چای کوهی در یک سطح بوده و از طرف دیگر، MIC و MBC عصاره های آبی زنیان و چای کوهی نیز مشابه است. با توجه به هاله عدم رشد باکتری ها توسط عصاره ها، قوی ترین عصاره مربوط به عصاره اتانولی زنیان در غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر است که میتواند جایگزین مناسبی برای آنتی بیوتیک های رایج در مزارع پرورش ماهی باشد. همچنین با توجه به اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های مورد بررسی، می توان با خالص سازی مواد موثره در آنها و مطالعه روی این عصاره‌ها، در آینده از آنها به عنوان جایگزین مناسبی برای آنتی-بیوتیک‌ها استفاده نمود. امکان استفاده از این عصاره‌ها به صورت خوراکی نیاز به تحقیق بیشتر در مورد اثرات ضد باکتریایی سیستمیک این عصاره‌ها در هنگام تجویز خوراکی آنها دارد. در نتیجه، تجویز و استفاده از این عصاره‌ها مخصوصاً عصاره های اتانولی زنیان و چای کوهی هم

به صورت خوراکی و هم به صورت حمام در ماهی قابل توصیه می‌باشد، مشروط به اینکه کارایی و بی‌خطر بودن عصاره‌ها در ماهی ثابت گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بدینوسیله از کارکنان گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد مخصوصاً آقایان مهندس یدالله خسروی و مهندس جمشید کبیری که در مراحل مختلف این پژوهش همکاری نموده اند سپاسگزاری مینمایند.

- ۱- Alishahi, M., Ghorbanpoor, M., Najafzadeh, H., Pashmforoosh, M. (۲۰۱۰). Antibacterial effects of some medical plant extracts on *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri* and *Streptococcus iniae*. *Iranian Veterinary Journal*. ۲(۲۷): ۲۱-۳۰.
- ۲- Acuigru, P.(۱۹۸۰). Trial vaccination of rainbow trout against *Aeromonas liquefaciens*. In: *Fish Diseases*. (W. Ahne ed.), ۳rd ed. *Springer –Verlag Berlin*. ۲۰۶-۲۱۱.
- ۳- Aoki, T., Takami, K., Kitao, T., (۱۹۹۰). Drug resistance in non hemolytic *Streptococcus sp.* Isolated from cultured *yellow tail*. *Disease of Aquatic organisms*, ۸:۱۷۱-۱۷۷.
- ۴- Abutbul, S., Golan-Goldhirsh, A., Barazani, O.(۲۰۰۴), Thyme therapeutic effects on diseases caused by *Streptococcus iniae* Streptococcosis in Tilapia. *Aquaculture* ۲۳۸:۹۷-۱۰۵.
- ۵- Austin, B., Austin, DA. (۱۹۹۹). Bacterial Fish Patogens. Disease of Farmed and Wild Fish ISBN . *Springer Praxis Pub. Chichester*. ۳۵-۴۹, ۱۹۸-۱۹۹, ۱۴۳-۲۴۴.
- ۶- Agnew, W., Barnes, A.C.(۲۰۰۷). *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary Microbiology*, ۱۲۲(۱-۲):۱-۱۵.
- ۷- Akhlaghi, M., Mahjoor, M. (۲۰۰۰). Some histopathological aspects of Sterptococcosis in cultured rainbow trout. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*. ۲۴: ۱۳۲-۱۳۶.
- ۸- Taheri, A., Abayavi, T., Hasani, F., Shafiee, SH. (۲۰۱۸). Antibacterial effect of essential oil of Iranian cumin (*persicum Bunium*) against some bacterial fish pathogens. *Journal of Aquatic Ecology*. ۷(۴): ۱۵۹-۱۶۵.
- ۹- Carson, J., Gudkovs, N., Austin, B. (۱۹۹۳). Characteristics of an *Enterococcus-like* bacterium from Australia and South Africa, pathogenic for rainbow trout. *Journal of Fish Disease*. ۱۶(۴).
- ۱۰- Choi, S.H., Park, K.H., Yoon, T.J., Kim, J.B..(۲۰۰۸). Dietary Korean mistletoe enhances cellular non-specific immune responses and survival of Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Fish and Shellfish Immunology*, ۲۴:۶۷-۷۳.
- ۱۱- Goudarzi, M.A., Hamedi, B., Malekpoor, F., Abdizadeh, R., Ghasemi Pirbalouti, A. and Raissy, M., ۲۰۱۱. Sensitivity of *Lactococcus garvieae* isolate from rainbow trout to some Iranian medicinal herbs. *Journal of Medicinal Plants Resiearch*. ۵: ۳۰۶۷-۳۰۷۳.

- ۱۲- Heidari-Sureshjani, M., Tabatabaei-Yazdi, F., Alizadeh-Behbahani, B., Mortazavi, A., (۲۰۱۳). Antimicrobial effect of aqueous, ethanol, methanol and glycerin extracts of *Satureja bachtiarica* on *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, ۶: ۲۹-۳۳.
- ۱۳- Irvani, M., Maghsoudi, R., Kamali, P. (۲۰۱۶). The effects of extract of *Satureja hortensis*, *Stachys lavandulifolia* Vahl, and *Mentha pullegium* on methicillin resistant and methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* bacteria. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences (J Shahrekord Univ Med Sci)* ۱۷(Suppl): ۳۲-۴۰.
- ۱۴- Khosravipour, S., Rezaeian-Doloei, R., (۲۰۱۵). Antibacterial activity of *Carum copticum* essential oil against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Escherichia coli* in nutrient broth medium. *Research in Plant Pathology*. ۳(۲): ۵۳-۵۹.
- ۱۵- Khajeh, M., Yamini, Y., Sefidkon, F., Bahramifar, N. (۲۰۰۴). Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chem.* ۸۶:۵۸۷-۹۱.
- ۱۶- Leonhardt, C. W. M., Scheeder, MR. (۲۰۰۰). Monogastric Nutrition and Potential for Improving Muscle Quality. *Antioxidants in Muscle Foods: Nutritional Strategies to Improve Quality*: ۱۹۹.
- ۱۷- Morteza-Semnani, K., Saeedi, M., Mahdavi, MR., Rahimi, F. (۲۰۰۷). Antimicrobial effects of methanolic extracts of some spices of *Stachys* and *Phlomis*. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* . ۵۷:۵۷-۶۶.
- ۱۸- Mirzai, M., Sefidkon, F. (۱۹۹۸). Flor of Iran. Medical and aromatic plant research instate of forests and rangelands. Tehran: *Ministry of Jihad-e-Agriculture*. ۸۲-۶۴.
- ۱۹- Mirzavand, S. (۱۹۹۲). Evaluation and comparison of Macroscopic, microscopic and phytochemical properties of anise, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum Copticum* fruits. *Pharmaceutical thesis. Isfahan University of Medical Science*.
- ۲۰- Nagulakshmi, S., Shankaracharya, NB., Naik, JP., Rao, LJM. (۲۰۰۰). Studies on chemical and technological aspects of ajowan aspects (*Trachyspermum ammi*). *J food sci techol mysore*. ۳۹:۲۷۷-۸۱
- ۲۱- Oskuee, RK., Behravan, J., Ramezani, M. (۲۰۱۱). Chemical composition, antimicrobial activity and antiviral activity of essential oil of *Carum copticum* from Iran. *Avicenna J Phytomed* ۲۰۱۱; ۱:۸۳-۹۰

- ۲۲- Pirbalouti, A.G. (۲۰۱۱). Antibacterial activity of Iranian medicinal plants against *Streptococcus iniae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Archives of Biological Sciences*. ۶۳(۱). ۵۹-۶۶.
- ۲۳- Plumb, J.A., (۱۹۹۹). Tilapia bacterial diseases. In-Health: maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Ames: Iowa State University, ۲۹۷-۳۰۵.
- ۲۴- Roomiani, L. (۲۰۱۲). Study of effect Rosmarinus officinalis oil and nisin on the growth of *Streptococcus iniae* in lab conditions and fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). A thesis submitted to the graduate studies office in the degree of Ph.D in fisheries science. Islamic azad university, science and research branch. ۱۶۰.
- ۲۵- Rattanachakunsoon, P., Phumkhaichorn, P. (۲۰۰۹). Protective effect of clove oil- supplemented fish diets on experimental *Lactococcus garvieae* infection in tilapia. *Bioscience, biotechnology, and biotechnology*, ۷۳(۹):۲۰۸۵-۲۰۸۹.
- ۲۶- Rezazadeh, Sh., Pirali Hamedani, M., Hajiakhoundi, A. (۲۰۰۶). Chemical composition of the essential oils of *stachys athorecalyx* c. Koch. Collected from arasbaran prospected region. *J. Medicinal Plants*., ۵ (۱۸): ۵۶ – ۶۲.
- ۲۷- Rojhan, M.S.(۱۹۸۲). Cure with medicinal plants. Tehran: Atrak Publication ۱۲۹.
- ۲۸- Rabbani ,M., Sajjadi ,SE., Jalali, A. (۲۰۰۵). Hydroalcohol extract and fractions of *Stachys lavcandulifolia Vahl*: effects on spontaneous motor activity and elevated plus-maze behaviour. *Phytother Res*; ۱۹:۸۵۴-۸۵۸.
- ۲۹- Safari, R., Adel, M., Monji, H., Riyahi Cholicheh, H., Nematolahi, A. (۲۰۱۵). Evaluation of antibacterial effect of some of the endemic herbal essential oils on *Streptococcus iniae* in invitro. *Journal of Aquatic Ecology*. ۴(۴): ۴۰-۳۳.
- ۳۰- Sajjadi, MH., Amiri, H. (۲۰۰۷). Chemical constituents of the essential oils of different stages of the growth of *Stachys lavandulifolia Vahl*. From Iran. *Pak J Biol Sci*., ۱۰(۱۶): ۲۷۸۴-۶.
- ۳۱- Soltani, M., Ghodrathnama, M., Taheri Mirghaed, A.(۲۰۱۳). The effect of *Zataria multiflora Boiss* and *Rosmarinus officinalis* essential oil on *Streptococcus iniae* isolated from Rainbow trout farms. *Journal of Veterinary Microbiology*. ۹(۱): ۱-۱۱.
- ۳۲- Velmurugan, S., Citarasu, Th.(۲۰۱۰). Effects of antibacterial extracts on the gut floral changes in Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Romanian Biotechnological Letters*, ۱۵(۶):۵۷۰۹-۵۷۱۷
- ۳۳- Zargari, A. (۱۹۹۰). Handbook of Medical Plants. ۶ th edition. University of Tehran Press, Iran ۲۸-۳۹.
- ۳۴- Zargari, A.(۱۹۹۳). Handbook of Medical Plants. University of Tehran Press, Iran. ۳۶-۳۰.

Study of the effect of aqueous and ethanolic extracts of *Carum copticum* and *Stachys lavandulifolia* plants in *Streptococcus iniae* cause of streptococcosis disease isolated from Rainbow trout fish farms

Mohseni sisakht P^۱. Nematollahi A^۲. Abbasvali M^۳. Kaboutari J^۴

- ۱- MSc of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine. Shahrekord University. Iran
- ۲- Associate Professor, Department of Food hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran
- ۳- Assistant Professor, Department of Food hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran
- ۴- Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.

Abstract

streptococcosis is an infectious septicemic disease in fish. The frequent use of antibiotics in the aquaculture industry has led to the bio-distribution of these compounds in the edible tissues of fish and the emergence of drug-resistant bacterial pathogens in the industry. One of the strategies to tackle and prevent the emergence of antibiotic resistance is the use of herbal extracts and essential oils against pathogenic bacteria. The present study was carried out to use plant extracts of *Carum copticum* and *Stachys lavandulifolia* against *Streptococcus iniae* as fish pathogen. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum inhibitory concentration (MBC) was used to determine the antibacterial strength of the extracts from the standard emission method in the disk. The minimum germination concentration of ethanolic and aqueous extracts of *Carum copticum* were ۱۸, ۷۰ mg / ml and ۷۰ mg / ml, respectively, and the minimum concentration of alcoholic and aqueous extracts of *Stachys lavandulifolia* were also, ۱۸, ۸۰ mg / ml and a concentration of ۷۰ mg / ml. As a result, ethanolic extracts of *Carum copticum* and *Stachys lavandulifolia* showed the highest antibacterial activity against *Streptococcus iniae*. In conclusion, it can be concluded that due to the proper effect of these extracts on *Streptococcus iniae*, it is necessary to evaluate the possibility of their use in the treatment and prevention of bacterial diseases of fish.

Key Words: "*Streptococcus iniae*," Rainbow trout," Herb extracts, "*Carum copticum*," "*Stachys lavandulifolia*," "*Bacteriostatic and Bacteriocidal*".