

مطالعه اثرات ضد باکتریایی برخی اسانس‌های گیاهی علیه باکتری‌های

Aeromonas hydrophila و *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri*

مهدی رحیمی پردنجانی^۱؛ مهدی رئیسی^{۲*}؛ مجتبی علیشاهی^۳

* Mehdi.raissy@iaushk.ac.ir

- ۱- گروه شیلات، دانشگاه علوم تحقیقات اهواز، اهواز، ایران.
- ۲- گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
- ۳- گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران.

تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۴

چکیده

در این تحقیق اثرات ضد باکتریایی اسانس‌های مرزه بختیاری (*Satureja bachtiarica*)، زیره سبز (*Cuminum cyminum*)، مورد (*Myrtus communis*) و آویشن دنائی (*Thymus daenensis*) و همچنین کارواکرول و تیمول در کنار آنتی بیوتیک‌های فلورفینیکل و تتراسیکلین بر باکتری‌های *Aeromonas hydrophila*، *Yersinia ruckeri* و *Lactococcus garvieae* مورد بررسی قرار گرفت. حداقل غلظت ممانعت از رشد و حداقل غلظت بازدارندگی اسانس‌ها پس از رقت سازی متوالی محاسبه گردید و سپس قطر هاله عدم رشد هر اسانس در محیط مولر هینتون مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین قطر هاله عدم رشد باکتری‌های *A. hydrophila*، *Y. ruckeri* و *L. garvieae* بترتیب در مرزه بختیاری و زیره مشاهده شد. نتایج حاکی از آثار بازدارندگی و کشندگی متفاوت گیاهان در مورد باکتری‌های مختلف بود ولی اسانس‌های مورد استفاده در اکثر موارد اثر بیشتری نسبت به اکسی تتراسیکلین داشتند. بیشترین اثر ممانعت از رشد و کشندگی در مورد *A. hydrophila* و *L. garvieae* به ترتیب در تیمول، فلورفینیکل و مرزه بختیاری مشاهده گردید. حداقل غلظت ممانعت از رشد و حداقل غلظت کشندگی تیمول در خصوص *آئروموناس* ۶/۳ و ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. این مقادیر در خصوص اثر فلورفینیکل بر لاکتوکوکوس برابر با ۳/۱۲۵ و ۶/۲۵ و در خصوص اثر مرزه بختیاری بر یرسینیا برابر با ۶/۲۵ و ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بطور کلی می‌توان نتیجه گرفت که حساسیت باکتری‌های مورد مطالعه به اسانس‌های گیاهی بسیار متفاوت است ولی با توجه به نوع باکتری، استفاده از این اسانسها در درمان و پیشگیری از بیماری‌های باکتریایی ماهی نیاز به بررسیهای مورد ارزیابی قرار گیرد.

لغات کلیدی: خواص ضد باکتریایی، اسانس‌های گیاهی، *Aeromonas hydrophila*، *Yersinia ruckeri*، *Lactococcus garvieae*.

*نویسنده مسئول

مقدمه

استفاده از گیاهان و مشتقات آنها از دیرباز در درمان بسیاری از بیماری‌ها رواج داشته است (زرگری، ۱۳۶۹). نخستین بار چینی‌ها در پرورش ماهی کپور از گیاه سیر و ریواس به‌منظور درمان برخی بیماری‌ها استفاده نمودند (Choi et al., 2008). امروزه از ترکیبات گیاهی با اهداف مختلفی در آبی‌پروری استفاده می‌شود که از آن جمله می‌توان به افزایش توان ایمنی غیر اختصاصی، افزایش پاسخ واکسن‌ها، افزایش رشد و بازماندگی، آرام بخشی و بیهوشی ماهی و یا ممانعت از رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها و پیشگیری از بروز بیماری‌ها اشاره کرد (رئسی و همکاران، ۱۳۹۳). علیشاهی و همکاران، (۱۳۹۱). در این میان استفاده از ترکیبات گیاهی در پیشگیری و درمان عوامل باکتریایی اهمیت بسیار زیادی دارد. بخصوص اینکه استفاده بی‌رویه از ضدعفونی کننده‌ها و آنتی بیوتیک‌ها منجر به مشکلات زیادی در مزارع پرورش ماهی شده است که از جمله می‌توان به ایجاد مقاومت‌های دارویی و همچنین مشکلات زیست‌محیطی و آلودگی منابع آبی اشاره کرد. از طرف دیگر قیمت زیاد آنتی‌بیوتیک‌ها و هزینه‌های بالای درمان، گرایش به ترکیبات طبیعی موثر، ارزان و کم‌خطر گیاهی را بیشتر کرده است. گزارشات متعددی از استفاده گیاهان در پیشگیری از رشد باکتری-های بیماری‌زا در آبی‌پروری وجود دارد (علیشاهی و همکاران، ۱۳۹۱، Goudarzi et al., 2011، Mojab et al., 2008).

از طرف دیگر هر سه عامل بیماری‌زای فوق از باکتری‌های مهم بیماری‌زا و با خسارات اقتصادی فراوان در مزارع پرورش ماهی محسوب می‌شوند که در این میان بخصوص *L. garvieae* عامل لاکتوکوکوزیس به کرات از نقاط مختلف کشور گزارش شده است (اخلاقی و کشاورزی، ۱۳۸۱). سلطانی و همکاران، (۱۳۹۱ الف). لذا با توجه به تنوع گیاهان دارویی در ایران و با در نظر گرفتن مقاومت-های دارویی و مشکلات زیست محیطی موجود در صنعت آبی‌پروری کشور، تحقیق حاضر به‌منظور بررسی اثر ضد باکتریایی تعدادی از اسانس‌های گیاهی بر سه باکتری بیماری‌زای مهم ماهی طراحی گردید. در این بررسی اثر اسانس مرزه بختیاری (*Satureja bachtiarica*)، زیره

سبز (*Cuminum cyminum*)، مورد *Myrtus communis*) و آویشن دنائی (*Thymus daenensis*) و ترکیبات کارواکرول و تیمول در کنار آنتی بیوتیک‌های فلورفنیکل و اکسی‌تراسیکلین بر باکتری‌های *A. hydrophila*، *L. garvieae* و *Y. ruckeri* مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه اسانس گیاهان مورد استفاده

به منظور اسانس‌گیری از سیستم کلونینجر استفاده گردید. مقدار ۱۰۰ گرم از گیاه با حجم ۷ برابر آب به داخل بالن ریخته و روی دستگاه کلونینجر قرار داده شد و به مدت ۳ ساعت در دمای ۶۰ درجه اسانس‌گیری به میزان ۳-۵ میلی‌لیتر بسته به گیاه انجام گرفت (علیشاهی و همکاران، ۱۳۸۹، Fereidoni and Akhlaghi, 2009).

روش تهیه سوسپانسیون باکتریایی

سه گونه باکتریایی شامل *L. garvieae* جدا شده از ماهیان قزل‌آلای بیمار که با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جنس و گونه آن اثبات شده بود، *Y. ruckeri* تهیه شده از دپارتمان باکتری شناسی ماهی، دانشگاه رویال دانمارک که از ماهی قزل‌آلا جداسازی شده و با استفاده از آزمایشات مولکولی جنس و گونه آن اثبات شده بود و *A. hydrophila* جدا شده از ماهی کپور غلفخوار بیمار که با آزمون‌های بیوشیمیایی و همچنین واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تشخیص داده شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. باکتری‌ها در محیط تریپتیکاز سوی برات (TSB) کشت داده شدند و بمدت ۲۴ ساعت در ۲۵ درجه گرم‌خانه‌گذاری گردیدند. سپس در شرایط استریل باکتری‌ها به محیط مولر هینتون برات اضافه شدند. بعد از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، میزان کدورت ایجاد شده حاصل از رشد باکتری با استفاده از اسپکتوفوتومتر با لوله استاندارد مک فارلند شماره ۵/۰ (۱۰×۱/۵) تنظیم گردید. این سوسپانسیون بعنوان ذخیره در نظر گرفته شده و در روز مصرف به نسبت ۱:۱۰۰ در همان محیط رقیق گردید و به غلظت نهائی ۱/۵×۱۰^۶ رسانده شد (علیشاهی و همکاران، ۱۳۸۹، Goudarzi et al., 2011).

مخصوص بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری و ثبت گردید. آزمایشات حداقل در ۵ تکرار جداگانه انجام گرفت (Heidari-Sureshjani et al., 2013).

تجزیه تحلیل آماری

میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد در نرم افزار اکسل وارد شد و معنی‌دار بودن اختلاف میانگین هاله‌های عدم رشد بوسیله آزمون تکمیلی دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۳ مشخص گردید.

نتایج

نتایج مطالعه حاکی از اثرات ضد باکتریایی اسانس‌های مورد استفاده بود بطوری‌که این اثر قابل مقایسه با آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده در آبی‌پرووری می‌باشد. حداقل غلظت ممانعت از رشد و حداقل غلظت بازدارنده اسانس‌های مورد بررسی در مورد هر باکتری در جداول شماره ۱ و ۲ نشان داده شده است.

بر اساس نتایج مطالعه، بیشترین اثر ممانعت از رشد و کشندگی در مورد باکتری‌های *A. hydrophila*، *L. garvieae* و *Y. ruckeri* به ترتیب در تیمول، فلورفنیکل و مرزه بختیاری مشاهده گردید. به طوری‌که حداقل غلظت ممانعت از رشد و حداقل غلظت کشندگی تیمول در خصوص *A. hydrophila* به ترتیب برابر با ۶/۳ و ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. این مقادیر در خصوص اثر فلورفنیکل بر *L. garvieae* برابر با ۳/۱۲۵ و ۶/۲۵ و در خصوص اثر مرزه بختیاری بر *Y. ruckeri* برابر با ۶/۲۵ و ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش می‌شود. بر خلاف فلورفنیکل که آثار ضد میکروبی مناسبی داشته است، اکسی تتراسیکلین اثر چندانی در مقایسه با سایر ترکیبات نداشته است. بطوری‌که در اغلب موارد حداقل غلظت ممانعت از رشد و حداقل غلظت کشندگی اسانس‌ها برابر با آنتی بیوتیک اکسی تتراسیکلین یا بهتر از آن است. برای مثال در مورد *L. garvieae* از ۶ ترکیب استفاده شده، ۵ مورد اثر مهارکنندگی بهتری نسبت به اکسی تتراسیکلین داشته‌اند و فقط کارواکرول اثر ضعیف‌تری داشته است.

تعیین کمترین رقت مهاری رشد (MIC)

آزمایش حداقل غلظت ممانعت از رشد در پلیت ۹۶ گوده-ای استریل و با روش رقت‌سازی انجام شد. برای این منظور ابتدا از محیط کشت مولر هینتون برات (مرک، آلمان)، ۱۰۰ میکرولیتر در داخل ردیف اول تا دهم گوده‌ها ریخته و سپس به اولین گوده هر ردیف ۱۰۰ میکرولیتر اسانس اضافه گردید. گوده ردیف دهم حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت و فاقد اسانس بود. سپس به گوده‌های آزمایش میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری (با تراکم $10^6 \times 1/5$ باکتری در میلی‌لیتر) اضافه گردید، لازم به ذکر است به ردیف کنترل باکتری اضافه نگردید. بعد از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در ۲۵ درجه سانتی‌گراد نتایج قرائت گردید. کدورت (درمقایسه با ردیف کنترل) به عنوان رشد باکتری و شفافیت، به عنوان عدم رشد باکتری در نظر گرفته شد (علیشاهی و همکاران، ۱۳۸۹) و آخرین گوده‌ای که کدورتی را نشان نداد، بعنوان حداقل غلظت ممانعت از رشد گزارش گردید. در مورد هر اسانس حداقل سه تکرار جداگانه در نظر گرفته شد.

تعیین کمترین رقت باکتری کشی (MBC)

برای تعیین حداقل غلظت باکتری کشی از همه گوده‌های فاقد کدورت آزمون MIC در محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. محیط‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه گرم‌خانه‌گذاری گردیدند و کمترین غلظتی از اسانس که باعث کشته شدن حداقل ۹۹ درصد باکتری‌ها گردیده بود، بعنوان حداقل غلظت ممانعت از رشد گزارش گردید. آزمایشات حداقل در سه تکرار جداگانه گزارش گردید (Heidari-Sureshjani et al., 2013).

تعیین قطر هاله‌های عدم رشد برای مقادیر MIC و

MBC

برای تعیین قطر هاله عدم رشد، با استفاده از پیت پاستور استریل و پمپ خلاء، اقدام به ایجاد چاهک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر بر روی محیط مولر هینتون آگار در شرایط استریل شد. سپس باکتری به روش کشت سفره‌ای در سه جهت (همانند آزمایش آنتی‌بیوگرام) کشت داده شد. میزان ۲۵ میکرولیتر از مقادیر بدست آمده در آزمون MIC در حداقل سه تکرار برای هر اسانس به گوده‌ها اضافه گردید و بعد از گرم‌خانه‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه، هاله عدم رشد باکتری با خط‌کش

جدول ۱- حداقل غلظت ممانعت کننده رشد (MIC) و حداقل قدرت باکتری کشی (MBC) اسانس‌ها بر روی باکتری‌های مورد آزمایش

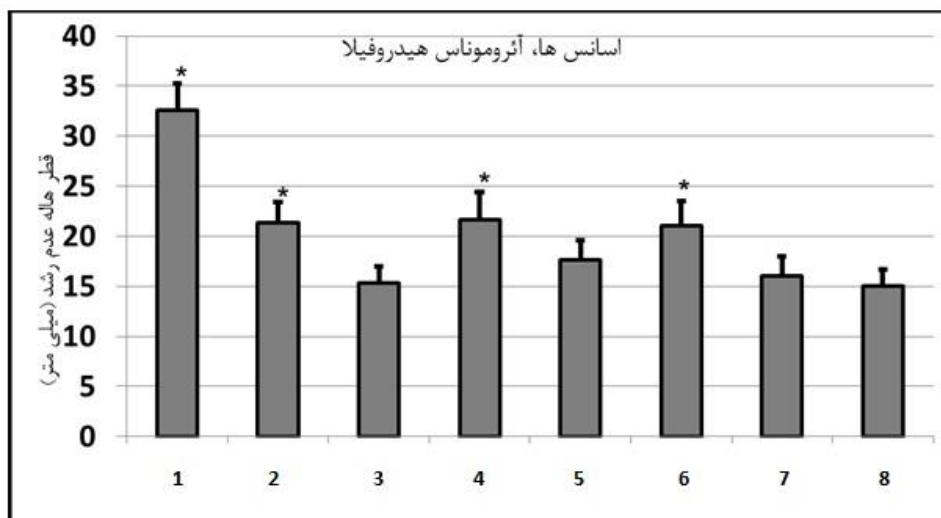
غلظت‌های اسانس (میکرو گرم در میلی لیتر)							اسانس و باکتری‌های مورد بررسی	
۳/۱۲۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	باکتری	اسانس
+	+	MIC	MBC	-	-	-	<i>A. hydrophila</i>	مرزه بختیاری
+	MIC	MBC	-	-	-	-	<i>Y. ruckeri</i>	
+	+	+	MIC / MBC	-	-	-	<i>L. garvieae</i>	
+	+	MIC	MBC	-	-	-	<i>A. hydrophila</i>	مورد
+	+	MIC	MBC	-	-	-	<i>Y. ruckeri</i>	
+	+	+	MIC/ MBC	-	-	-	<i>L. garvieae</i>	
+	+	MIC	MBC	-	-	-	<i>A. hydrophila</i>	زیره
+	+	+	MIC	MBC	-	-	<i>Y. ruckeri</i>	
+	+	MIC	MBC	-	-	-	<i>L. garvieae</i>	
+	+	+	MIC	MBC	-	-	<i>A. hydrophila</i>	آویشن دنائی
+	+	+	MIC	MBC	-	-	<i>Y. ruckeri</i>	
+	+	MIC	MBC	-	-	-	<i>L. garvieae</i>	
+	+	+	+	MIC/MB C	-	-	<i>A. hydrophila</i>	کارواکول
+	+	+	+	MIC/MB C	-	-	<i>Y. ruckeri</i>	
+	+	+	+	MIC/MB C	-	-	<i>L. garvieae</i>	
+	MIC	MBC	-	-	-	-	<i>A. hydrophila</i>	تیمول
+	+	+	MIC/MBC	-	-	-	<i>Y. ruckeri</i>	
+	+	MIC	MBC	-	-	-	<i>L. garvieae</i>	
+	+	MIC	MBC	-	-	-	<i>A. hydrophila</i>	فلورفینیکول
+	MIC	MBC	-	-	-	-	<i>Y. ruckeri</i>	(۳۰ میلی- گرم)
MIC	MBC	+	-	-	-	-	<i>L. garvieae</i>	
+	+	+	MIC	MBC	-	-	<i>A. hydrophila</i>	اکسی
+	+	+	MIC	MBC	-	-	<i>Y. ruckeri</i>	تتراساکلین (۱۰ میلی گرم)
+	+	+	MIC	MBC	-	-	<i>L. garvieae</i>	

جدول ۲- خلاصه نتایج MIC و MBC هر اسانس نسبت به باکتری‌های مورد بررسی

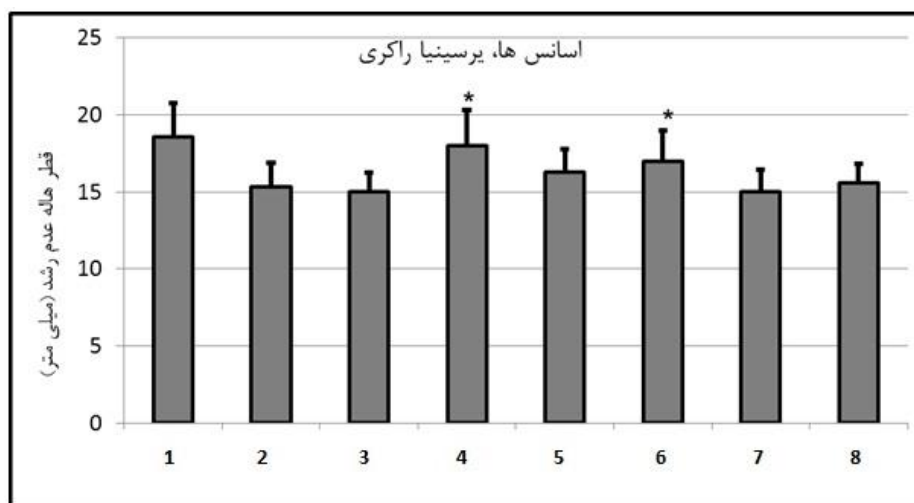
اسانس	غلظت $\mu\text{g/ml}$	MBC	MIC
مرزه بختیاری	<i>A. hydrophila</i>	۲۵	۱۲/۵
	<i>Y. ruckeri</i>	۱۲/۵	۶/۲۵
	<i>L. garvieae</i>	۲۵	۲۵
مورد	<i>A. hydrophila</i>	۲۵	۱۲/۵
	<i>Y. ruckeri</i>	۲۵	۱۲/۵
	<i>L. garvieae</i>	۲۵	۲۵
زیره	<i>A. hydrophila</i>	۲۵	۱۲/۵
	<i>Y. ruckeri</i>	۵۰	۲۵
	<i>L. garvieae</i>	۲۵	۱۲/۵
آویشن دنائی	<i>A. hydrophila</i>	۵۰	۲۵
	<i>Y. ruckeri</i>	۵۰	۲۵
	<i>L. garvieae</i>	۲۵	۱۲/۵
کارواکرول	<i>A. hydrophila</i>	۵۰	۵۰
	<i>Y. ruckeri</i>	۵۰	۵۰
	<i>L. garvieae</i>	۵۰	۵۰
تیمول	<i>A. hydrophila</i>	۱۲/۵	۶/۲۵
	<i>Y. ruckeri</i>	۲۵	۲۵
	<i>L. garvieae</i>	۲۵	۱۲/۵
فلورفنیکول ۳۰ میلی گرم	<i>A. hydrophila</i>	۲۵	۱۲/۵
	<i>Y. ruckeri</i>	۱۲/۵	۶/۲۵
	<i>L. garvieae</i>	۶/۲۵	۳/۱۲۵
اکسی تتراسایکلین ۱۰ میلی گرم	<i>A. hydrophila</i>	۵۰	۲۵
	<i>Y. ruckeri</i>	۵۰	۲۵
	<i>L. garvieae</i>	۵۰	۲۵

نتایج مندرج در شکل ۲ نشان می‌دهد که قطر هاله عدم رشد باکتری *Y. ruckeri* در مرزه بختیاری، آویشن دنائی و تیمول بطور معنی‌داری نسبت به آنتی بیوتیک‌های اکسی تتراسایکلین و فلورفنیکل بیشتر است ($P < 0.05$). قطر هاله عدم رشد باکتری *L. garvieae* در مورد، زیره و تیمول بطور معنی‌داری نسبت به آنتی بیوتیک‌های اکسی تتراسایکلین و فلورفنیکل بیشتر است ($P < 0.05$).

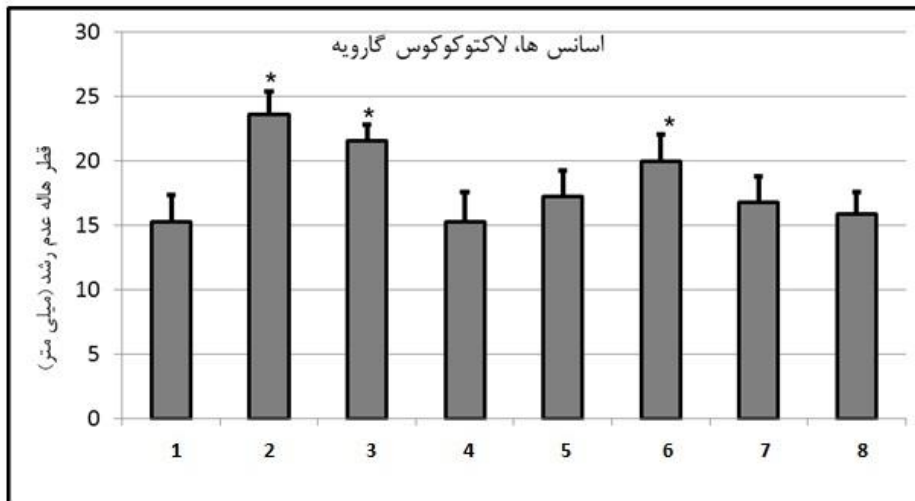
نتایج تشکیل هاله عدم رشد در شکل‌های ۱ تا ۳ نشان داده شده است. بر اساس نتایج، بیشترین قطر هاله عدم رشد باکتری *A. hydrophila* در مرزه بختیاری مشاهده شد و این مقدار در مورد اسانس‌های مرزه بختیاری، آویشن دنائی، مورد و تیمول بطور معنی‌داری بیشتر از سایر ترکیبات از جمله آنتی بیوتیک‌های فلورفنیکل و اکسی تتراسایکلین بود ($P < 0.05$).



شکل ۱- قطر هاله ممانعت از رشد باکتری *A. hydrophila* با استفاده از حداقل غلظت ممانعت از رشد اسانس‌های مختلف. علامت * در بالای میله انحراف معیار نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح اطمینان ۹۵٪ با تیمارهای شاهد (آنتی بیوتیک اکسی تتراسیکلین و فلورفنیکل) است. ۱: مرزه، ۲: مورد، ۳: زیره، ۴: آویشن، ۵: کارواکرول، ۶: تیمول، ۷: فلورفنیکل، ۸: اکسی تتراسیکلین.



شکل ۲- قطر هاله ممانعت از رشد باکتری *Y. ruckeri* ایجاد شده توسط حداقل غلظت ممانعت از رشد اسانس‌های مختلف. علامت * در بالای میله انحراف معیار نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح اطمینان ۹۵٪ با تیمارهای شاهد (آنتی بیوتیک اکسی تتراسیکلین و فلورفنیکل) است. ۱: مرزه، ۲: مورد، ۳: زیره، ۴: آویشن، ۵: کارواکرول، ۶: تیمول، ۷: فلورفنیکل، ۸: اکسی تتراسیکلین.



شکل ۳- قطر هاله ممانعت از رشد باکتری *L. garvieae* با استفاده از حداقل غلظت ممانعت از رشد اسانس های مختلف. علامت * در بالای میله انحراف معیار نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح اطمینان ۹۵٪ با تیمار های شاهد (آنتی بیوتیک اکسی تتراسیکلین و فلورفینیکل) است. ۱: مرزه، ۲: مورد، ۳: زیره، ۴: آویشن، ۵: کارواکرول، ۶: تیمول، ۷: فلورفینیکل، ۸: اکسی تتراسیکلین.

بحث

باکتری های *A. hydrophila*، *L. garvieae* و *Y. ruckeri* از عوامل مهم بیماری زا در ماهیان پرورشی در ایران و بسیاری از نقاط جهان هستند که قادر به ایجاد سپتی سمی و تلفات زیاد در ماهیان مبتلا هستند. بروز این بیماری ها در ماهی قزل آلا ی رنگین کمان با خسارات اقتصادی زیادی همراه است لذا استفاده از روش های موثر، کم خطر و کم هزینه در راستای پیشگیری و درمان این بیماری ها از اهمیت زیادی برخوردار است. بخصوص اینکه در سال های اخیر همزمان با گسترش مزارع پرورش ماهی قزل آلا در کشور شاهد بروز همه گیری های مختلف ناشی از عوامل عفونی هستیم که استفاده بی رویه و بدون قاعده از آنتی بیوتیک ها و ضد عفونی کننده ها توسط پرورش دهندگان ماهی را بدنبال داشته است که خطرات ناشی از آنها بارها مورد تاکید قرار گرفته است.

در این تحقیق اثر ضد باکتریایی ۶ ترکیب مختلف بر *A. hydrophila*، *L. garvieae* و *Y. ruckeri* مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. گزارشات مختلفی از توان ضد میکروبی گیاهان مطالعه شده و یا گیاهان هم خانواده آنها در مطالعات پیشین ارائه شده است (انصاری و همکاران،

۱۳۹۳، علیشاهی و همکاران، ۱۳۸۹، سلطانی و همکاران،

۱۳۹۱ ب و (Mojab et al., 2008).

Goudarzi و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه خود اقدام به بررسی اثر عصاره و اسانس برخی گیاهان از جمله مرزه بختیاری، مورد و آویشن دنائی بر باکتری *L. garvieae* نمودند. در بین ۱۵ عصاره بررسی شده، عصاره های مورد و آویشن دنائی دارای توان مهار کنندگی رشد باکتری بودند و سایر عصاره ها فاقد اثر گزارش گردیدند. اگرچه اغلب اسانس ها دارای قدرت مهار رشد باکتری بودند و اسانس مرزه بختیاری و آویشن دنائی بیشترین اثر را داشتند. در مطالعه دیگری علیشاهی و همکاران (۱۳۸۹) تاثیر عصاره گیاهان زیتون، سیاه دانه، آلوئه ورا، آویشن، اکیناسه، اسکوتلاریا و پوست انار بر باکتری های *A. Y. ruckeri*، *hydrophila* و *Streptococcus iniae* را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاکی از تاثیر ضد باکتریایی عصاره گیاهان زیتون، سیاه دانه و اسکوتلاریا بود و سایر عصاره فاقد تاثیر مناسب گزارش شدند.

نتایج بررسی حاضر حاکی از اثرات متفاوت اسانس های گیاهی است. در مورد باکتری *A. hydrophila* کمترین غلظت ممانعت کننده از رشد در تیمول مشاهده شد (۶/۲۵)

باکتری‌ها گزارش کرد و این امر را ناشی از تیمول (۲۰/۶ درصد در این مطالعه) اعلام داشت.

آثار ضد باکتریایی آویشن دنائی و تیمول در خصوص باکتری *L. garvieae* نیز مشاهده شد بطوری‌که پس از فلورفنیکل که در حال حاضر داروی انتخابی این باکتری است، آویشن دنائی و تیمول بیشترین اثر بر مهار رشد باکتری را داشتند. آثار مناسب آویشن و ماده موثره آن (تیمول) با نتایج سایر مطالعات همخوانی دارد، بطوری‌که در بررسی Goudarzi و همکاران (۲۰۱۱) نیز عصاره و اسانس این گیاه دارای خواص ممانعت از رشد قوی بر باکتری *L. garvieae* اعلام شد. در مطالعه صادق زاده و همکاران در سال ۱۳۸۵ اثر آویشن دنایی بر باکتری *Clostridium perfringens* مشخص گردید که این گیاه اثرات ضد باکتریایی قابل توجهی بر باکتری مورد مطالعه داشته است. در مطالعه دیگری Mojab و همکاران (۲۰۰۸) نیز اثر ضد میکروبی آویشن دنائی بر گونه‌های مختلف باکتری شامل *Staphylococcus Streptococcus Micrococcus luteus aureus* را گزارش کردند.

اثر ضد میکروبی و ضد قارچی مرزه بختیاری نیز در برخی مطالعات پیشین مورد تاکید قرار گرفته است، بطوری‌که تاثیر این گیاه بر گونه‌های مختلف استرپتوکوکوس توسط Heidari-Sureshjani et al. (2013) گزارش شده است. همچنین در مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۶ مشخص شد که اسانس این گیاه یک ممانعت کننده‌ی قوی تولید آفلاتوکسین‌های B₁ و G₁ بواسطه مهار رشد قارچ می‌باشد (Kumar et al., 2006). حداقل غلظت مهار کننده رشد این اسانس در مورد *L. garvieae* در این مطالعه ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و در مطالعه Goudarzi et al. (2011) برابر با ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شده است. وجود چنین تفاوت‌هایی در مطالعات مختلف را می‌توان عمدتاً به میزان ماده موثره گیاه که ناشی از شرایط و کیفیت کشت، زمان برداشت، شرایط آب و هوایی و منطقه برداشت گیاه نسبت داد که این امر باید در زمان استفاده از مشتقات گیاهی مد نظر قرار گیرد (Abdelmajeed et al., 2013).

میکروگرم در میلی‌لیتر). کمترین اثر نیز در آویشن دنائی، کارواکرول و اکسی تتراسیکلین مشاهده گردید و بقیه عصاره‌ها تفاوت چشمگیری نداشتند. نتایج بررسی هاله عدم رشد نیز از الگوی مشابهی تبعیت می‌کند، بطوری‌که اثر تیمول، مرزه بختیاری، آویشن دنائی و گیاه مورد بطور معنی‌داری بیشتر از فلورفنیکل و اکسی‌تتراسیکلین بود ($P < 0.05$). خواص ضد میکروبی تیمول در مطالعات مختلفی مورد تائید قرار گرفته است. فتاحی در تحقیق مشابهی در سال ۱۳۸۵ به بررسی خواص ضد باکتریایی ترکیبات اسانس آویشن شیرازی پرداخت و نشان داد که تیمول بیشترین اثر ضد باکتریایی را دارد. Düğenci و همکاران (۲۰۰۳) آثار ضد میکروبی مناسب تیمول را مورد تاکید قرار داده و کارواکرول را دارای اثرات کمتری دانسته‌اند. اثر مناسب تیمول بر باکتری‌های بیماری‌زای ماهی از جمله *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus* and *V. anguillarum* در مطالعه Gang-Joon و همکاران (۲۰۱۲) به اثبات رسید. به نظر می‌رسد که تیمول منجر به تخریب و از بین بردن یکپارچگی غشای باکتری شده و منجر به مرگ آن می‌گردد (Lambert et al., 2001).

بیشترین اثر بر ممانعت از رشد *Y. ruckeri* در اسانس مرزه بختیاری مشاهده شد و کارواکرول دارای کمترین اثر بود. قطر هاله عدم رشد باکتری *Y. ruckeri* در زمان استفاده از مرزه بختیاری، آویشن دنائی و تیمول بطور معنی‌داری نسبت به آنتی بیوتیک‌های اکسی تتراسیکلین و فلورفنیکل بیشتر بود ($P < 0.05$). در مطالعه دیگری تیموری (۱۳۸۸) به مطالعه اثر مرزه بختیاری بر باکتری‌های گرم مثبت *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* *Pseudomonas* و گرم منفی *Micrococcus luteus aeruginosa*, *Kellebsiella oxytoca*, *Kellebsiella pneumonia* پرداخت. ایشان اسانس این گیاه را دارای قدرت ممانعت از رشد بسیار زیادی بر

لیزوزیم خون ماهی قزل‌آلای رنگین کمان. مجله علمی شیلات ایران. ۲۱: ۲۳-۱۳.

صادق زاده، ل.، سفید کن، ف. و اولیا، پ.، ۱۳۸۵. بررسی ترکیب و خواص میکروبی اسانس آویشن شیرازی، پژوهش و سازندگی. ۷۱: ۱۸-۲۴.

علیشاهی، م.، قربان پور نجف آبادی، م.، نجف زاده ورزی، ح.، پشم فروش، م.، ۱۳۸۹، مطالعه اثرات ضد باکتریایی برخی عصاره‌های گیاهی علیه استرپتوکوکوس اینیایی، یرسینیا راکری، آئروموناس هیدروفیلا، مجله دامپزشکی ایران. ۶: ۳۰-۲۱.

علیشاهی، م.، پور مهدی بروجنی، م. و عبدی، ا.، ۱۳۹۱. مقایسه اثر برخی محرک‌های ایمنی و عصاره‌های گیاهی بر فاکتورهای رشد و مقاومت ماهی بزم در برابر استرس‌های محیطی. مجله دامپزشکی ایران. ۸: ۵۹-۶۷.

فتاحی، ف. ۱۳۸۵. بررسی اثرات عصاره چند گونه گیاه دارویی بر روی باکتری کلستریدیوم پرفرنژنس در محیط کشت مایع، پایان‌نامه دکترای دامپزشکی، شماره ۴۸۱، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد.

Abdelmajeed, N.A., Danial, E.N. and Aya, H.S., 2013. The effect of environmental stress on qualitative and quantitative essential oil of aromatic and medicinal plants. Archives Des Sciences, 66: 100-120.

Choi, S.H., Park, K.H., Yoon, T.J. and Kim, J.B., 2008. Dietary Korean mistletoe enhances cellular non-specific immune responses and survival of Japanese eel (*Anguilla japonica*). Fish and Shellfish Immunology, 24: 67-73.

Düğenci, S.K., Arda, N. and Candan, A., 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. Journal of Ethnopharmacology, 88: 99-106.

Fereidoni, M.S. and Akhlaghi, M., 2009. resistance pattern of *Streptococcus iniae* to antibiotics in rainbow trout. Paper presented at the First International

با توجه به نتایج بدست آمده، اسانس برخی گیاهان مطالعه شده شامل مرزه بختیاری، آویشن دنائی و مورد دارای اثرات ضد باکتریایی قابل رقابت با آنتی‌بیوتیک‌های پر مصرف آبزیان هستند. لذا با توجه به خطرات جانبی آنتی‌بیوتیک‌ها، لازم است اثرات ضد باکتریایی این گیاهان در شرایط مزرعه نیز مورد آزمون قرار گیرد تا در صورت امکان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها شوند.

منابع

اخلاقی، م و کشاورزی، م. ۱۳۸۱. وقوع استرپتوکوکوزیس در مزارع پرورش قزل‌آلای استان فارس. مجله تحقیقات دامپزشکی ایران. ۳: ۱۸۳-۱۸۹.

انصاری، م.، سلطانی، م.، حسینی، ا. و کمالی، ا.، ۱۳۹۳. مطالعه اثر اسانس مرزه خوزستانی (*Satureja khuzestanica*) بر ممانعت از رشد باکتری *L.garvieae* در گوشت قزل‌آلای رنگین کمان در دمای یخچال، میکروب شناسی مواد غذایی. ۳: ۳۳-۳۹.

تیموری، م.، ۱۳۸۸. تجزیه اسانس و بررسی اثر ضد باکتریایی گیاه مرزه (*Satureja bachtiarica*) در استان اردبیل. پژوهش‌های اکوفیزیولوژی گیاهی ایران (پژوهش‌های علوم گیاهی). ۱۴: ۱۹-۲۶.

رئیس‌ی، م.، فخریان، م.، جعفریان، م. و ورشوئی، ح.، ۱۳۹۳. مطالعه تأثیر اسانس برخی گیاهان بر ایمنی غیراختصاصی ماهی استرلیاد، مجله علمی پژوهشی زیست‌شناسی دریا. ۲۱: ۲۸-۲۳.

زرگری، ع. ۱۳۶۹. گیاهان دارویی، انتشارات دانشگاه تهران، چاپ ششم، جلد چهارم، صفحات ۳۹-۲۸.

سلطانی، م.، رئیس‌ی، م.، گودرزی، م.، ممتاز، ح. و مومنی، م. ۱۳۹۱الف. تعیین فراوانی *L.garvieae* عامل لاکتوکوکوزیس در مزارع پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان استان چهارمحال و بختیاری و تعیین توالی ژن *16S rRNA* جدایه‌های حاصل. مجله دامپزشکی ایران. ۸: ۶۹-۶۱.

سلطانی، م.، ظریف‌منش، ط. و ذریه‌زهر، ج.، ۱۳۹۱ب. مطالعه تأثیر اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر میزان فعالیت سیستم عامل مکمل و

- Congress on Aquatic Animal Health Management and Disease, Iranian Veterinary Institution, Tehran, 20-21 July 2008.
- Gang-Joon, H., Cheol-Hyun, K., Se-Chang, P., Mahanama, De Z. and Gee-Wook, Sh., 2012.** Antimicrobial activity of thymol against pathogenic gram-negative bacteria of fishes. *The Philippine Journal of Veterinary Medicine*, 49: 103-106.
- Goudarzi, M.A., Hamedi, B., Malekpoor, F., Abdizadeh, R., Ghasemi Pirbalouti, A. and Raissy, M., 2011.** Sensitivity of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout to some Iranian medicinal herbs. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5: 3067-3073.
- Heidari-Sureshjani, M., Tabatabaei-Yazdi, F., Alizadeh-Behbahani, B. and Mortazavi, A., 2013.** 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*, 6: 29-33.
- Kumar, V.P., Neelam, S., Chauhan Harish, P. and Rajani, M., 2006.** Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *Journal of Ethno pharmacology*, 107: 182-188.
- Lambert, R.J., Skandamis, P.N., Coote, P.J. and Nychas, G.J., 2001.** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 453-62.
- Mojab, F., Poursaeed, M., Mehrgan, H. and Pakdaman, S., 2008.** Antibacterial activity of *Thymus daenensis* methanolic extract. *Pakistan Journal of Pharmacological Science*, 21: 210-213.

Antibacterial effects of some medicinal plant essential oils against *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri* and *Aeromonas hydrophila*

Rahimi Pordanjani M.¹; Raissy M.^{2*}; Alishahi M.³

*Mehdi.raissy@iaushk.ac.ir

1- Islamic Azad University, Ahwaz Branch, Ahwaz, Iran.

2. Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

3. Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahwaz, Iran.

Received: June 2015

Accepted: December 2015

Keywords: Antibacterial effects, Medicinal plant, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri*, *Lactococcus garvieae*.

Abstract

In this study, the antibacterial effects of essential oil extracted from 4 medicinal plants, (*Thymus deansis*, *Satureja bachtiarica*, *Cuminum cyminum* and *Myrtus communis*) carvacrol, tymol, florfenicol and tetracycline against three pathogenic bacteria (*Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri* and *Lactococcus garvieae*) were evaluated. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC) of the essential oils were evaluated after preparation of serial dilution. Inhibition zone were also determined on Muller Hinton agar medium. According to the results, the largest inhibition zone was observed from *S. bachtiarica* and *C. cyminum* essential oils against *A. hydrophila*, *Y. ruckeri* and *L. garvieae*. The obtained results showed different MICs and MBCs for different bacteria; however, in most cases the essential oils were more effective than tetracycline. Tymol, florfenicol and *S. bachtiarica* essential oil demonstrated the highest inhibitory and bactericidal effects against *A. hydrophila*, *Y. ruckeri* and *L. garvieae*, respectively. The MIC and MBC of tymol against *A. hydrophila* were 6.3 and 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. The MIC and MBC of florfenicol against *L. garvieae* were 3.125 and 6.25 and of *S. bachtiarica* essential oil against *Y. ruckeri* were 6.25 and 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. It can be concluded that the sensitivity of the bacteria studied to the essential oils are different. However, considering the antimicrobial effects of some essential oils, it is necessary to evaluate their beneficial effects in prevention and treatment of bacterial diseases in fish.

* Corresponding author