Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره پانزدهم، شماره اول، ۱۳۹۸، پیاپی ۳۸: ۵۹-۴۹

مطالعه اثر بازدارندگی اسانس مرزه بختیاری و مرزه خوزستانی بر بیان ژن کپسول (*epsD*) باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* با استفاده از Real Time PCR

حسین مومنی[۱]، مهدی رئیسی[۲*]، حاجیه قاسمیان صفایی[۳]، حسن ممتاز[۴]

۱-دانش آموخته دکترای تخصصی بهداشت آبزیان، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران

۲-استاد گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۳-استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران. و مرکز تحقیقات مواد غذایی، دانشکده تغذیه و مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۴-استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۲/۱۵

چکیده

لاکتوکوکوس گارویه عامل بیماری لاکتوکوکوزیس یکی از مهمترین باکتری‌های بیماری‌زا در ماهیان به حساب می‌آید. بررسی حاضر باهدف مطالعه اثر بازدارندگی غلظت‌های مختلف اسانس گیاه مرزه بختیاری و مرزه خوزستانی بر بیان ژن کپسول (*epsD*) باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* عامل بیماری لاکتوکوکوزیس ماهیان انجام پذیرفت. به‌منظور انجام این مطالعه، باکتری دارای ژن *epsD* در مجاورت حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) اسانس‌ها برابر با ۰/۱۲ µl/ml قرار گرفت و میزان بیان ژن مربوطه با استفاده از Real Time PCR بررسی گردید. نتایج نشان داد که بیان ژن در باکتری‌های مجاورت داده شده با غلظت MIC اسانس‌ها کاهش یافت. نتایج همچنین حاکی از کاهش بیان ژن مذکور متعاقب افزایش غلظت اسانس بود. اگرچه میزان تأثیر مرزه بختیاری بر بیان ژن کپسول بیش از مرزه خوزستانی بود. از-این‌رو استفاده از اسانس مرزه بختیاری و مرزه خوزستانی به منظور کنترل و پیشگیری بیماری لاکتوکوکوزیس به‌واسطه ممانعت از بیان ژن کپسول توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: ژن کپسول، *لاکتوکوکوس گارویه*، اسانس گیاهی، Real Time PCR.

*نویسنده مسئول: مهدی رئیسی

آدرس: گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

پست الکترونیک: mehdi.raissy@iaushk.ac.ir

مقدمه

لاکتوکوکوس گارویه عامل بیماری لاکتوکوکوزیس یک سپتی سمی حاد یا فوق‌حاد در ماهیان آب شور و شیرین در سراسر دنیا می‌باشد. این باکتری یک کوکوباسیل گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری، غیرمتحرک و غیرهاگزا است که منجر به بروز تلفات گسترده در ماهیان می‌گردد (۴، ۲۲). بروز بیماری مذکور با تلفات زیادی در مزارع پرورش ماهی، همراه می‌باشد و به‌خصوص این ضایعات در قزل‌آلای رنگین‌کمان مشهودتر است، به‌طوری‌که این‌گونه را حساس‌ترین میزبان *لاکتوکوکوس گارویه* می‌دانند (۱۱، ۲۷). از علائم کلی بیماری می‌توان به شنای غیرعادی، تیرگی بدن، اگزوفتالمی، خونریزی در داخل و یا اطراف کره چشم یا خونریزی‌های سطحی بدن در نواحی سرپوش آبششی، قاعده باله‌ها و همچنین خونریزی‌های وسیع داخلی اشاره کرد (۱۳، ۲۲). عوامل مختلفی بر حدت باکتری تاثیر گذارند که از آن جمله می‌توان به وجود یا عدم وجود کپسول اشاره کرد به‌طوری‌که مطالعات حاکی از بیماری‌زایی بیشتر سویه‌های دارای کپسول (KG^-) در مقایسه با سویه‌های بدون کپسول (KG^+) می‌باشد (۲۴). لذا عواملی که قادر به توقف ساخت کپسول در باکتری باشند می‌توانند بیماری‌زایی لاکتوکوکوس گارویه را کاهش دهند. امروزه استفاده از گیاهان دارویی به‌منظور بررسی اثرات ضد میکروبی آن‌ها، با توجه به توانایی باکتری‌ها در ایجاد عفونت‌های حاد و بروز مقاومت‌های دارویی ناشی از مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها، مورد توجه واقع‌شده است. مطالعات مختلفی توانایی بالای گیاهان دارویی را علیه پاتوژن‌های باکتریایی اثبات کرده‌اند (۱۶، ۱۷، ۱۸).

از سایر علل گسترش استفاده از عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی می‌توان به اثرات ضد باکتریایی مناسب، نبود عوارض جانبی، مقبولیت گیاهان دارویی در بین عوام و همچنین در دسترس و ارزان قیمت بودن آن‌ها اشاره کرد (۱۶). مطالعات مختلفی تأثیرکشندگی یا بازدارندگی از رشد اسانس‌های روغنی بر باکتری‌های بیماری‌زای ماهی را مورد تائید قرار داده‌اند (۲۳، ۱۶، ۱۷). مرزه بختیاری ازجمله گونه‌های جنس مرزه، متعلق به خانواده نعناعیان می‌باشد. خواص ضد میکروبی و ضد قارچی آن به‌طور عمده به وجود ترکیباتی مانند پاراسمین، ترپینین، منتون، تیمول، کارواکرول و ترکیبات فنلی نسبت داده می‌شود (۱).

مرزه خوزستانی دارای اثرات ضد میکروبی بر روی باکتری‌های گرم مثبت وگرم منفی از قبیل استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوک اپیدرمیدیس، سالمونلاتیفی موریوم و اشریشیا کلی می‌باشد (۱۰).

مرزه خوزستانی نیز از خانواده *لامیاسه* ازجمله گونه‌های متعلق به جنس مرزه و بومی ایران می‌باشد که گسترش فراوانی در شمال خوزستان و جنوب لرستان دارد. خواص ضد میکروبی این گیاه مربوط به الکل‌های آلیفاتیک مانند لینالول و فنل‌ها (تیمول و اوژنول) و همچنین بخش مهمی از خاصیت ضد میکروبی این گیاه مربوط به کارواکرول آن می‌باشد (۲۷). این مطالعه با هدف بررسی میزان بیان ژن کپسول *epsD* باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* در مجاورت با اسانس‌های مرزه بختیاری و مرزه خوزستانی با روش Real time PCR انجام شد.

مواد و روش کار

در این مطالعه، دو سویه *لاکتوکوکوس گارویه* که قبلاً با روش‌های سرولوژیک و مولکولی مورد شناسائی قرار گرفته بودند و در مرکز تحقیقات شیلات دانشگاه آزاد

اسلامی نگهداری می‌شدند، مورد مطالعه قرار گرفتند. در ابتدا حضور ژن *epsD* در جدایه‌ها با روش PCR تأیید شد.

PCR جهت تأیید حضور ژن *epsD*

جهت تائید وجود ژن کپسول در باکتری، روش (واکنش زنجیره پلیمراز) با استفاده از زوج پرایمر (5-F:TGCTGTCATCATATTGTGTCCA-3) و R: (5-GGCTATGGCATTAGTCAGGAAG-3) و با استفاده از کیت استخراج DNA سیناژن، (ایران) انجام شد. مخلوط واکنش جهت PCR ژن *epsD* در حجم نهایی ۵۰ µl شامل ۵ µl PCR buffer 10X، ۰/۵ µmol از هر پرایمر، ۱/۵ واحد آنزیم Taq polymerase و ۵ µl از dNTP (10 mM) و ۱۰۰ نانوگرم از DNA مربوطه انجام شد.

آزمایش در ۳۵ سیکل و برنامه دمائی مورد استفاده شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ^{o}c ۹۴ به مدت ۱ دقیقه، واسرشته سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، توسعه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ دقیقه انجام گرفت و در آخر توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام در ۱ سیکل انجام گرفت (۲۳).

تهیه اسانس‌ها و آنالیز آن‌ها

اسانس‌ها از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آزاد واحد شهرکرد تهیه شد و تجزیه GC/MS با استفاده از دستگاه Agilent 5975 C ساخت کشور آمریکا مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین MIC و MBC اسانس گیاهان مرزه بختیاری و مرزه خوزستانی

جهت بررسی اثرات ضد میکروبی و حداقل غلظت بازدارنده از رشد (Minimum inhibitory concentration) اسانس گیاهان مورد استفاده از روش براث ماکرودایلوشن (broth macrodilution) استفاده شد (۸، ۱۲). به‌این منظور ابتدا رقت‌های متوالی از اسانس‌ها در لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت TSB (Trypticase Soy Broth) و دی متیل سولفوکساید ۳ درصد آماده‌سازی شد. رقت‌های اسانس‌های گیاهی شامل ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲۵، ۰/۰۳۱۲، ۰/۰۱۵۶ و ۰/۰۰۷ میکرولیتر بر میلی‌لیتر آماده گردید. پس از کشت ۴۸ ساعته باکتری که کدورت آن معادل مک فارلند شماره یک بود به میزان ۲۰ میکرولیتر به هر یک از رقت‌ها تلقیح گردید. محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. گروه‌های کنترل در این آزمایش شامل کنترل مثبت (محیط کشت فاقد اسانس و حاوی دی متیل سولفوکساید و باکتری) و کنترل منفی (محیط کشت با رقت‌های متوالی اسانس و فاقد باکتری) نیز لحاظ شد. پس از ۲۴ ساعت، رشد باکتری از طریق مقایسه کدورت لوله‌های حاوی اسانس تلقیح شده با کنترل منفی مطالعه گردید. کمترین غلظتی از اسانس که در آن کدورت مشاهده نشد به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای تعیین MBC، از رقت‌های MIC و بیشتر از آن به میزان ۱۰ µl روی محیط آگار خون‌دار در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد و کمترین غلظتی که در آن هیچ پرگنه‌ای رشد نکرده بود به‌عنوان MBC لحاظ شد.

مجاورت نمونه‌های *لاکتوکوکوس گارویه* با اسانس‌ها

جهت انجام این کار باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* به میزان نیم مک فارلند در لوله آزمایش حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث کشت داده شد. در ادامه به هرکدام از لوله‌ها معادل ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶ و ۱/۳۲

از غلظت MIC اسانس‌ها اضافه شد. بعد از مخلوط کردن آن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری شد و سپس نمونه‌ها جهت استخراج RNA مورداستفاده قرارگرفتند.

استخراج RNA

استخراج RNA با استفاده از کیت Cinnapure RNA و (CAT NO: PR891620) (ساخت ایران) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گردید. غلظت RNA به‌وسیله اندازه‌گیری جذب نوری در 260 نانومتر (A260) با نانو دراپ ۲۰۰۰ ارزیابی شد و خلوص RNA به‌وسیله نسبت جذب نوری در طول‌موج 260 نانومتر به جذب نوری در 280 نانومتر به دست آمد. صحت و سایز انتشار RNA توتال خالص به‌وسیله کیت DNase بعد از تأیید صحت RNA و حذف DNAهای اضافی موجود به سرعت همه نمونه‌های RNA به cDNA تبدیل و صحت تبدیل آن توسط انجام الکتروفورز ژل آگارز تأیید شد و در ادامه به وسیله الکتروفورز ژل آگارز و اتیدیوم بروماید بررسی شد.

سنتز cDNA

به‌منظور ساخت cDNA از کیت Revert Aid first (Fermentase, Lithuania) cDNA synthesis طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

انجام Real time PCR

جهت انجام این مطالعه با استفاده از کیت SYBR GreenMaster mix (2X) و با استفاده از دستگاه Gene Rotor 6000 (Qiagen, Germany) شرکت Roch کشور آلمان (Cat.No: (03515869001 انجام شد.

در این مطالعه از relative quantification استفاده شد و برای آنالیز نتایج هم از روش (Livak)$^{-\Delta\Delta CT}2$ که نسبت بیان دو ژن کپسول و رفرنس را محاسبه می‌کند، استفاده گردید. در این روش، ژن *sodA* به عنوان ژن Housekeeping مورد استفاده قرار گرفت، که برای شناسایی آن از توالی پرایمر مندرج در جدول ۲ استفاده شد. همچنین جهت شناسایی ژن کپسول (*epsD*) نیز با استفاده از نرم افزار طراحی پرایمر سایت NCBI اقدام به طراحی یک جفت پرایمر اختصاصی شد (جدول ۱).

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در تشخیص میزان بیان ژن *epsD*

Primer Sequence (5′→3′)
epsD-F TGAGCTGGACAAGCGTTGAA
epsD-R ATAGCACTCCGCAAAACTGC
sodA-F GTGTCTCAGTCCCAGTGTGG
soda-R ACTTGATGATCCCGCGTTGT

برنامه دمایی مورد استفاده جهت تکثیر قطعه ژنی به شرح زیر بود: فعال‌سازی اولیه آنزیم ۹۵ درجه سانتی-گراد به مدت ۱۵ دقیقه و ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، اتصال آغاز گرها ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و بسط ترکیبی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و همچنین منحنی ذوب از ۶۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد هر ۵ ثانیه یک درجه.

نتایج

نتایج آنالیز اسانس‌ها

اسانس‌های مورد استفاده به‌منظور سنجش ترکیبات تشکیل‌دهنده مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج در جدول ۲ ذکر شده است. بر این اساس میزان تیمول و کارواکرول به‌عنوان دو ترکیب اصلی ماده موثره در اسانس‌های مرزه بختیاری و مرزه خوزستانی برابر با ۲/۶۴، ۰/۸۵ و ۴۱/۳۳، ۵۷/۱۶ بود.

جدول ۲- نتیجه آنالیز اسانس مرزه خوزستانی و مرزه بختیاری

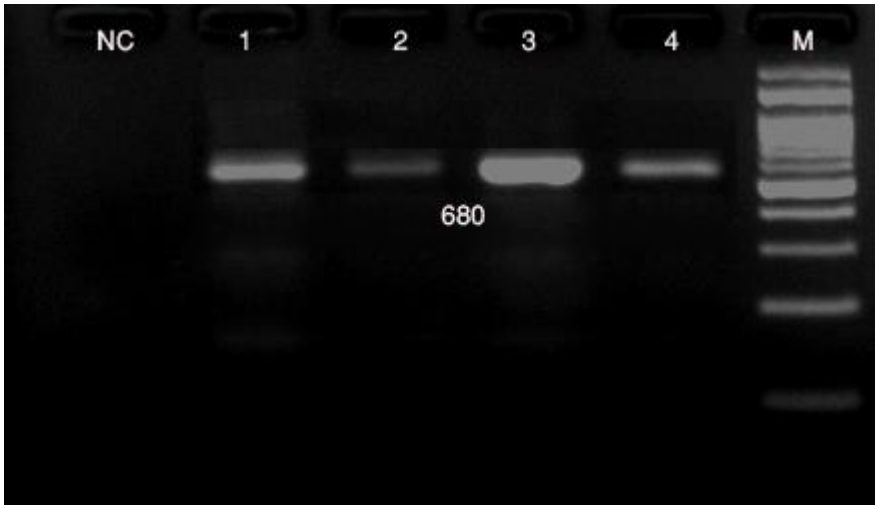
ردیف	زمان	ترکیبات	مرزه خوزستانی	مرزه بختیاری
1	5.11	Alpha-Thujene	2.18	0.9
2	5.28	Alpha-Pinene	1.01	0.6
3	6.18	Sabinene	0.13	0.02
4	6.27	Beta-Pinen	0.36	0.26
5	6.56	Beta-Myrcene	2.01	0.8
6	6.94	Phellandrene	0.51	0.23
7	7.28	Alpha-Terpinene	5.94	3.03
8	7.49	P-Cymene	3.7	2.8
9	7.6	Limonene	0.77	0.66
10	8.53	Gamma-Terpinene	38.51	23.02
11	12.15	Terpinene-4-ol	0.18	0.33
12	15.85	Thymol	2.64	0.85
13	16.28	Carvacrol	41.33	57.16
14	19.92	Trans-Caryophyllene	0.23	0.29
15	22.59	Beta-Bisabolene	0.42	0.4

حداقل غلظت مهارکننده رشد

نتایج آزمون حداقل غلظت مهار کننده رشد نشان داد که این میزان برای اسانس مرزه بختیاری و اسانس مرزه خوزستانی برابر با µl/ml ۰/۱۲ بود. حداقل غلظت کشنده باکتری نیز برای دو اسانس فوق برابر با ۰/۲۵ µl/ml بود.

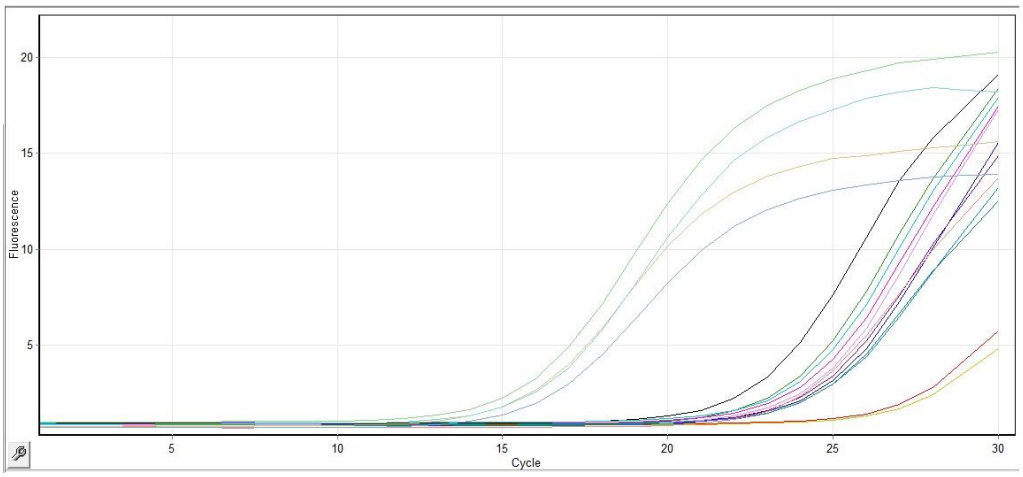
نتایج PCR تأیید حضور ژن *epsD*

سویه‌های مورد بررسی جهت وجود ژن کپسول مورد آزمون قرار گرفتند و مشاهده باند ۶۸۰ bp حاکی از حضور ژن مربوطه در جدایه‌ها بود. نتیجه حاصل از الکتروفورز محصول PCR ژن *epsD* بر روی ژل آگارز در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن *epsD* بر روی ژل آگارز. M: مارکر ۱۰۰bp، ستون ۱: کنترل مثبت (PTCC 1884)، ستون ٤-۲ نمونه‌های مثبت دارای ژن *epsD*، NC: کنترل منفی (آب مقطر).

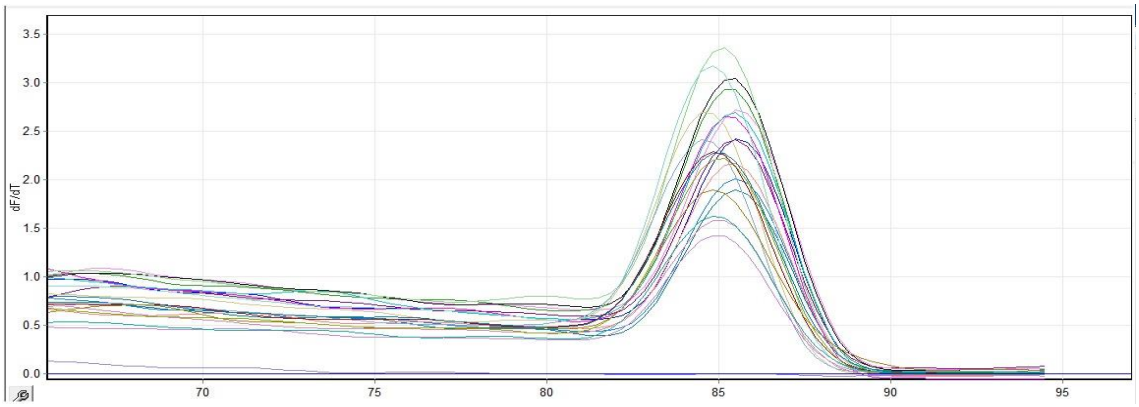
نتایج تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده توسط دستگاه Nanodrop 2000 اندازه‌گیری شد و نتایج حاکی از خلوص بالا و عدم آلودگی نمونه‌ها بود. نتایج و منحنی تکثیر ژن *epsD* با استفاده از Real time PCR نشان دادند که تکثیر به خوبی و با عملکرد مناسب و بدون هیچ‌گونه پارازیتی صورت گرفته است. شکل ۲ منحنی تکثیر ژن *epsD* در قبل و بعد از تیمار با اسانس مرزه بختیاری و مرزه خوزستانی و همچنین منحنی پیشرفت واکنش ژن *sodA* به عنوان ژن Housekeeping را نشان می‌دهد.



شکل ۲- منحنی تکثیر محصول ژن *epsD*

مقایسه منحنی تکثیر قبل و بعد از مواجهه با اسانس نشان می‌دهد که میزان Ct افزایش یافته است (شکل ۲).

نتایج مربوط به منحنی ذوب ژن *epsD* در سویه دارای کپسول *لاکتوکوکوس گاروییه* تیمار شده با اسانس مرزه بختیاری و مرزه خوزستانی در شکل ۳ نشان داده شده است که پیک اصلی برای ژن *epsD* در دمای ۸۴ الی ۸۶ درجه سانتی گراد رخ می‌دهد. نتایج Ct ژن *epsD* در مواجهه با اسانس مرزه در جدول ۵ آورده شده است.

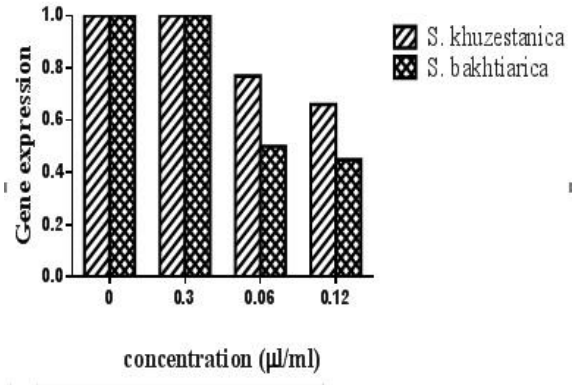


شکل ۳- منحنی ذوب ژن epsD

نتایج نشان داد که اسانس مرزه خوزستانی با غلظت ۱۲ µg/ml بیان ژن کپسول باکتری *لاکتوکوکوس گاروییه* را به میزان ۰/۶۶ درصد کاهش داد که این میزان در مورد مرزه بختیاری برابر با ۰/۴۵ درصد بود. لذا به‌طور کلی اسانس مرزه بختیاری در مقایسه با اسانس مرزه خوزستانی اثر مهاری بهتری بر ژن *epsD* داشته است. نتایج تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس گیاهان مرزه بختیاری و مرزه خوزستانی بر میزان بیان ژن *epsD* در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳: تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس گیاهان مرزه بختیاری و مرزه خوزستانی بر میزان بیان ژن *epsD*

نام گیاه	غلظت اسانس گیاه (µg/ml)	درصد بیان ژن کپسول
مرزه خوزستانی	۰	۱
مرزه خوزستانی	۰/۰۳	۱
مرزه خوزستانی	۰/۰۶	۰/۷۷
مرزه خوزستانی	۰/۱۲	۰/۶۶
مرزه بختیاری	۰	۱
مرزه بختیاری	۰/۰۳	۱
مرزه بختیاری	۰/۰۶	۰/۵
مرزه بختیاری	۰/۱۲	۰/۴۵



شکل ٤- تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس گیاهان مرزه بختیاری و مرزه خوزستانی بر میزان بیان ژن *epsD* به روش ΔΔCT

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری لاکتوکوکوزیس یک سپتی‌سمی حاد یا فوق-حاد ماهیان است که در گونه‌های مختلفی از ماهیان آب شیرین و شور بروز می‌یابد. این بیماری دارای پراکندگی جهانی است و در ایران نیز به کرات گزارش شده است (۹)، به‌طوری‌که این بیماری را به همراه استرپتوکوکوزیس مهم‌ترین بیماری‌های باکتریائی ماهیان قزل‌آلای پرورشی در ایران می‌دانند (۵). گونه-های مختلفی به این بیماری مبتلا می‌شوند ولی آزاد-ماهیان و بخصوص قزل‌آلای رنگین‌کمان حساسیت بیشتری دارد (۴، ۷).

میزان علائم و تلفات بیماری بستگی به فاکتورهای حدت باکتری دارد (۴). یکی از عوامل موثر در حدت باکتری‌های خانواده استرپتوکوکاسه، حضور کپسول است (۲۳). به‌طوری‌که کپسول به‌واسطه فراهم کردن امکان اتصال باکتری به بافت میزبان، حفظ آب در سلول باکتری و محافظت در برابر فاژها امکان بقای بیشتر و بیماری‌زائی را برای باکتری فراهم می‌کند (۲۰). ژن مورد آزمون در این مطالعه یکی از چند ژن *eps* است که قادر به ساخت پلی‌ساکارید خارجی باکتری می‌باشد (۲۶).

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر بازدارندگی غلظت‌های مختلف اسانس گیاه مرزه بختیاری و مرزه خوزستانی بر بیان ژن مولد کپسول (*epsD*) باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* عامل بیماری لاکتوکوکوزیس ماهیان انجام پذیرفت. مطالعات قبلی حاکی از آثار ضدمیکروبی عصاره و اسانس گیاهان مختلف بخصوص مرزه بختیاری و مرزه خوزستانی بر ضد *لاکتوکوکوس گارویه* است (۲، ۶، ۱۶). سفیدکن و همکاران، قدرت مهارکنندگی و میکروب‌کشی زیاد اسانس گیاه مرزه، ازجمله مرزه بختیاری را گزارش کرده و گزارش کردند که این خواص به دلیل حضور تیمول و کارواکرول زیاد در اسانس این گیاهان باشد (۲۲). خواص ضدمیکروبی کارواکرول و تیمول و گیاهان حاوی آنها در مطالعات مختلفی گزارش شده است (۷، ۱۴، ۱۶، ۱۹، ۲۰). نتایج این مطالعه نیز نشان داد که کارواکرول (مرزه خوزستانی ۴۱/۳۳ درصد و مرزه بختیاری ۵۷/۱۶ درصد) و تیمول (۲/۶۴، ۰/۸۵) جز مهم اسانس مرزه هستند که در راستای یافته‌های تحقیقات پیشین است (۳).

بر اساس نتایج آنالیز اسانس‌ها که مقدار حداقل غلظت ممانعت از رشد اسانس‌ها قادر به کاهش بیان ژن کپسول باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* بود. به‌طوری‌که اسانس مرزه خوزستانی با غلظت µg/ml ۱۲ بیان ژن کپسول باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* را به میزان ۰/۶۶ درصد کاهش داد که این رقم در مورد مرزه بختیاری برابر با ۰/۴۵ درصد بود. همچنین میزان بیان ژن با افزایش غلظت اسانس کاهش یافت که نشانگر این است که میزان بیان ژن، وابسته به دز اسانس گیاهی مورد استفاده است. به‌طوریکه در غلظت‌های کمتر مثلا" در غلظت معادل با ۰/۰۳ µl/ml اثر بازدارندگی در مورد هیچ کدام از اسانس‌ها دیده نشد.

در مطالعه مشابهی که سلطانی و همکاران، اثر اسانس آویشن شیرازی را بر بیان ژن کپسول *لاکتوکوکوس گارویه* مورد مطالعه قرار دادند. در این مطالعه حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری را ۰/۱۲ µl/ml گزارش شد. ایشان همچنین گزارش نمودند که اسانس آویشن شیرازی قادر به مهار ژن کپسول باکتری می-باشد(۲۴).

در تحقیق Esmaeili و همکاران (۲۰۱۲) اثر مهاری مرزه خوزستانی بر روی ژنهای اگزو آنزیمS ، اگزوتوکسینA ، سیستم‌های ترشحی و افلوکس

پمپ‌های آنتی بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا با تکنیک RT-PCR نیمه کمی بررسی گردید و مشخص گردید که دارای اثر مهاری علیه ژنهای مذکور بود (۱۵).

در مطالعه‌ای دیگر که توسط Soltani و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام گرفت بیان ژن *sagA* و *streptolysin S* باکتری *استرپتوکوکوس اینیه* (*Streptococcus iniae*) در مجاورت با اسانس آویشن شیرازی و رزماری مورد بررسی قرار گرفت که نشان داد بیان این دو ژن تحت تاثیر اسانس رزماری و آویشن شیرازی کاهش می‌یابد (۲۵). توجه به تشابه اسانس‌های مورد استفاده در این مطالعه با دو مطالعه فوق تشابه نتایج را توجیه می‌کند. بدین صورت که کارواکرول و تیمول که از ترکیبات اصلی دارای خواص ضد میکروبی در مرزه بختیاری و خوزستانی است به میزان زیادی در آویشن شیرازی نیز یافت می‌شود. از طرف دیگر ترکیب gamma-Terpinene نیز هم در مرزه بختیاری و خوزستانی و هم در رزماری وجود دارد که دلیلی بر همسو بودن نتایج مطالعات فوق‌الذکر است.

بطور کلی نتایج این مطالعه حاکی از خواص مهار-کنندگی رشد اسانس‌های مورد استفاده بر باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* بود. همچنین مقدار MIC اسانس‌ها توانست به‌شکل موثری بیان ژن کپسول که نقش مهمی در حدت باکتری دارد را مهار کند. این اثر بخصوص در مورد اسانس مرزه بختیاری مشهودتر بود. با در نظر گرفتن نتایج این مطالعه و مطالعات پیشین استفاده از این ترکیبات جهت مهار بیماری ناشی از *لاکتوکوکوس گارویه* توصیه می‌شود. نویسندگان بر این عقیده‌اند که تحقیقات آتی می‌تواند توان مهاری اسانس‌ها بر سایر ژن‌های باکتری را نیز آشکار نماید.

منابع

۱. احمدی، ش.، سفیدکن، ف.، باباخانلو، پ.، عسگری، ف.، خادمی، ک.، ولی‌زاده، ن. و کریمی‌فر، م.ع. (۱۳۸۸). مقایسه ترکیب‌های موجود در اسانس مرزه بختیاری در مراحل قبل از گلدهی و گلدهی کامل در رویشگاه مزرعه. *فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی ایران*، دوره ۲۵، شماره ۲، صفحات ۱۵۹-۱۶۹.

۲. انصاری، م.، سلطانی، م.، حسینی، ا و کمالی، ا. (۱۳۹۳). مطالعه اثر اسانس مرزه خوزستانی (*Satureja khuzestanica*) بر ممانت از رشد باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* در گوشت قزل آلای رنگین کمان در دمای یخچال. *مجله میکروب شناسی مواد غذایی*، دوره دوم، شماره ۳، صفحات ۳۳-۳۹.

۳. بهادر، ع.، ساقی، ح.، عطایی، ر. و اسماعیلی، د. (۱۳۹۴). بررسی تاثیر اسانس الکلی گیاه مرزه خوزستانی بر روی بیان ژن مرتبط با بیوفیلم اسینتوباکتربومانی (bap) به روش Real time PCR. *مجله میکروب شناسی پزشکی ایران*، دوره ۹، شماره ۱، صفحات ۴۹-۴۲.

۴. سلطانی، م. (۱۳۸۰). *بیماریهای آزاد ماهیان*. انتشارات دانشگاه تهران، تهران، صفحه ۱۷۵.

۵. سلطانی، م. و ترحمی، م. (۱۳۸۷). مطالعه استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس در برخی مزارع پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان در استان فارس، اولین کنگره بین المللی بهداشت و بیماری‌های آبزیان، تهران، ایران.

۶. رحیمی پردنجانی، م.، رئیسی، م. و علیشاهی، م. (۱۳۹۴). مطالعه اثرات ضد باکتریایی برخی اسانسهای گیاهی علیه باکتری‌های *Lactococcus garvieae, Yersinia ruckeri* و *Aeromonas hydrophila*. *مجله علمی شیلات ایران*، دوره ۲۴، شماره ۴، صفحات ۶۴-۵۵.

۷. مقیمی، م.، سلطانی، م.، میرزرگر، س. و قدرت نما، م. (۱۳۹۲). تأثیر اسانس‌های اوکالیپتوس کامالدولنسیس، پونهٔ معطر و آلوئه ورا در رفتار رشد باکتری‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه*، عامل استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس در مزارع قزل آلای رنگین کمان کشور و مقایسهٔ آن با کلرآمین. *نشریه شیلات (مجله منابع طبیعی ایران)*، دوره ۶۶، شماره ۲، صفحات ۱۰۵-۱۱۸.

۸. موری بختیاری، ن.، طولابی دزفولی، ز.، سلیمانی، ب. و محمدیان، ت. (۱۳۹۵). اثر برونتنی عصاره هیدروالکلی پوست درخت گردو بر برخی پاتوژن‌های باکتریایی ماهی. *مجله دامپزشکی ایران*، دوره ۱۲، شماره ۲، صفحات ۱۰۸-۱۰۳.

9. Akhlaghi, M., Keshavarzi, M. (2003). Occurrence of streptococcosis in rainbow trout fish farms in Fars Province. *Iranian Journal of Veterinary Research*, **3**: 183-189.
10. Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International journal food microbiology*.; **94**:223-53.
11. Carvalho, M.G., Vianni, M.C., Elliot, J.A., Reeves, M., Facklam, R.R., Teixeira, L.M. (1997). Molecular analysis of *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus gallinarum* isolated from water buffalos with subclinical mastitis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **418**: 401-404.
12. Chen, S.C., Liaw, L.L., Su, H.Y., Ko, S.C**.,** Wu, C.Y. (2002). *Lactococcus garvieae*, a cause of disease in grey mullet, *Mugil cephalus* L, in Taiwan. *Journal of Fish Disease*, **25**: 727-32.
13. Chen, S.C., Lin, Y.D. (2001). *Lactococcus garvieae* infections in the giant fresh water prawn *Macrobranhium rosenbergii* confirmed by polymerase chain reaction and *16S rRNA* sequencing. *Diseases of aquatic organisms*, 45: 45-52.
14. Du, E., Gan, L., Li, Z., Wang, W., Liu, D., Guo, Y. (2015). In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, **24**: 58-59.
15. Esmaeili D, Mobarez AM, Tohidpour A. (2012). Anti-helicobacter pylori activities of shoya powder and essential oils of thymus vulgaris and eucalyptus globulus. *Open Microbiology Journal*, **6**: 65-9.
16. Ghasemi Pirbalouti, A., Nikobin, V., Momeni, M., Malek Poor, F., Hamedi, B. (2011). Antibacterial Activity of Iranian Medicinal Plants Against *Streptococcus iniae* Isolated from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Archives of Biological Sciences*, **63**: 59-66.
17. Goudarzi, M.A., Hamedi, B., Malekpoor, F., Abdizadeh, R., Ghasemi Pirbalouti, A. Raissy, M. (2011). Sensitivity of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout to some Iranian medicinal herbs. *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**: 3067-3073.
18. Mahmoodi, A., Roomiani, L., Solatni, M., Akhondzadeh Basti, A., Kamali, A., Taheri, Sh. (2012). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils and extracts from Rosmarinus officinalis, Zataria multiflora, *Anethum graveolens* and *Eucalyptus globulus*. *Global Veterinaria*, **9**: 73-79.
19. Magi, G., Marini, E., Facinelli, B. (2015). Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci. *Frontiers in microbiology*, **6**: 165-169
20. Nostro, A., Papalia, T. (2012). Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future prospective. Recent Patent of Anticencer *Drug Discovery*, **7**: 28-35.
21. Nwodo, U.U., Green, E., Okoh, A.I. (2012). Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *International Journal of Molecular Science*, **13**: 14002-14015.
22. Raissy, M., Ansari, M. (2011). Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *African Journal of Biotechnology*, **8**: 1473-1476.
23. Sefidkon, F., Jamzad, Z., and Mirza, M. (2004). Chemical variation in the essential oil of *Satureja sahandica* from Iran. *Food Chemistry*, **88**: 325-328.
24. Soltani, M., Mohamadian, S., Ebrahimzahe-Mousavi, H. A., Mirzargar, S., Taheri-Mirghaed, A., Rouholahi, S., & Ghodratnama, M. (2014). Shirazi thyme (Zataria multiflora) essential oil suppresses the expression of the epsD capsule gene in Lactococcus garvieae, the cause of lactococcosis in farmed fish. *Aquaculture*, **433**: 143-147.

25. Soltani, M., Ghodratnama, M., Ebrahimzade-Mosavi, H., Nikbakht Borojeni, G., Mohamadian, S., Ghasemian, M. (2014). Shirazi thyme (*Zataria multiflora* Boiss) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils repress expression of *sagA*, a *streptolysin S*-related gene in *Streptococcus iniae*. *Aquaculture*, **433**: 248-252.
26. Soltani, M., Nikbakht, G.H., Mousavi, H., Ahmadzadeh, N. (2008). Epizootic outbreak of *lactococcosis* caused by *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. Bulletin of European *Association of Fish Pathologists*, **28**: 207-712.
27. Zarrin, M., Amirrajab, N., Sadeghi-Nejad, B. (2010). In vitro antifungal activity of *Satureja Khuzestanica* jamzad against *Cryptococcus neoformans*. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, **26**: 880-882.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 15, Issue 1, 2019

Study of inhibitory effects of *Satureja bachtiarica* and *Satureja khuzestanica* essential oils against expression of capsule gene (*epsD*) of *Lactococcus garvieae* by Real Time PCR

Moumeni, H.[1], Raissy, M. [2*], Ghasemiyan Safaei, H.[3], Momtaz, H.[4]

1- Graduated of Aquatic Animal Health, ShahidChamran University, Ahwaz, Iran

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

3- Professor of Microbiology, Isfahan University of Medical Sciences, Iran

4- Professor of veterinary Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Received: 22 December 2017 Accepted: 5 May 2019

Abstract

Lactococcus garvieae, the causative agent of lactococcosis, is one of the most important fish pathogens all around the world. The aim of this study was to investigate the inhibitory effects of Satureja bachtiarica and Satureja khuzestanica essential oils against the expression of capsule gene (epsD) of L. garvieae. Bacterial isolates containing epsD gene were exposed to the minimum inhibitory concentrations of the essential oils (0.12 µl/ml) and the expression of epsD gene was investigated by real-time PCR. The results showed that the expression of epsD gene was suppressed in the studied bacterial isolates under MIC concentration of the essential oils. The results also revealed that the gene expression was decreased by increasing the essential oil concentration. However, S. khuzestanica was more effective on the expression of epsD gene than S. khuzestanica. Therefore, the use of S. bachtiarica and S. khuzestanica essential oils can be recommended to prevent lactococcosis in aquaculture via suppression of capsule gene.

Keywords: Capsule gene, Lactococcus garvieae, essential oil, Real Time PCR

**Corresponding author: Raissy, M.*

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

E-mail: mehdi.raissy@iaushk.ac.ir