

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

مهدی سلطانی<sup>۱\*</sup>، مریم قدرت نما<sup>۱</sup>، علی طاهری میرقائد<sup>۱</sup>، اشکان زرگر<sup>۱</sup>، شقایق روح الهی<sup>۱</sup>

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

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

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

### چکیده

هدف از این مطالعه تعیین سروتیپ و کپسول سویه‌های استرپتوکوکوس اینیایی عامل استرپتوکوکوزیس در مزارع قزل آلای کشور و نیز تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی اسانس آویشن شیرازی و رزماری علیه این سویه‌ها بوده است. به‌علاوه رفتار رشد برخی از این سویه‌ها در حضور اسانس‌های مذکور مطالعه گردیده است. براساس نتایج، بیشتر سروتیپ‌های عامل استرپتوکوکوزیس در مزارع قزل آلای کشور از نوع سروتیپ I بوده و همه آنها دارای کپسول می‌باشند. نتایج نشان داد که حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی (MIC) اسانس آویشن شیرازی علیه جدایه‌های سروتیپ I و II  $0.06 \mu\text{l/ml}$  و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) آنها به ترتیب  $0.15 \mu\text{l/ml}$  و  $0.12-0.25 \mu\text{l/ml}$  بود، میزان MIC اسانس رزماری علیه جدایه‌های سروتیپ I  $\mu\text{l/ml}$   $0.12-0.25$  و برای جدایه‌های سروتیپ II برابر  $0.12 \mu\text{l/ml}$  محاسبه گردید. MBC رزماری علیه سروتیپ I و II به ترتیب بالاتر از  $1 \mu\text{l/ml}$  و  $1-0.5$  برآورد گردید. به‌علاوه در روش دیسک مشخص شد خاصیت ضد میکروبی آویشن شیرازی علیه سروتیپ‌های استرپتوکوکوس اینیایی بطور معنی‌دار بیشتر از اسانس رزماری می‌باشد. از سوی دیگر روند رشد سویه‌های مورد استفاده با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی و رزماری کاهش یافته و در غلظت‌های بالاتر از MIC رشد بطور کامل متوقف می‌گردد. براساس نتایج بدست آمده از این مطالعه می‌توان از اسانس‌های گیاهی مذکور، بویژه آویشن شیرازی بعنوان مهارکننده بیماری استرپتوکوکوزیس در مزارع پرورش قزل آلای رنگین کمان استفاده نمود.

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

\* نویسنده مسئول: مهدی سلطانی

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

پست الکترونیک: msoltani@ut.ac.ir

## مقدمه

بیماری استرپتوکوکوزیس ناشی از استرپتوکوکوس / اینیایی سبب بروز خسارات اقتصادی فراوان به صنعت آبی پروری در سراسر جهان از جمله ایران گردیده است (۲۱ و ۲۲)، بطوریکه تاکنون استرپتوکوکوزیس در ۲۷ گونه ماهیان آب شیرین، آب شور و یوری هالین گزارش شده و نیز بعنوان پاتوژن زئونوز سبب بروز عفونت استرپتوکوکی در انسان می شود (۳). مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها برای درمان بیماری منجر به بروز مقاومت دارویی در جدایه های باکتریایی و کاهش کار آیی داروها می گردد. از سوی دیگر امکان انتقال مقاومت دارویی به باکتری های بیماری زای محیط زیست و انسان وجود دارد (۱۳)، بعلاوه سبب تجمع آنتی بیوتیک در بدن ماهی و در نتیجه در مصرف کنندگان ماهی شده است، لذا یافتن راههای پیشگیری برای به حداقل رساندن خسارات اقتصادی ناشی از تلفات در مزارع پرورش ماهی و نیز کاهش مشکلات زیست محیطی ناشی از مصرف گسترده آنتی بیوتیک ها ضروری به نظر می رسد. در سالهای اخیر استفاده از داروهای گیاهی به عنوان داروهای دوستدار محیط زیست برای مقابله با باکتری های بیماریزا مورد توجه قرار گرفته است (۱۷، ۲). رزماری گیاه همیشه سبز و معطر بوده که در اغلب مناطق جهان رشد می نماید و دارای خاصیت ضد میکروبی، آفت کشی (۲۴) و ضد سرطان (۲۳) می باشد. آویشن شیرازی بومی ایران، افغانستان و پاکستان بوده (۱) و از اسانس آن بعنوان ماده ضد باکتریایی، ضد قارچ، آنتی اکسیدان و ضد التهاب استفاده می شود (۲۰، ۱۹). ویژگی ضد میکروبی اسانس های گیاهی آویشن شیرازی و رزماری علیه دامنه وسیعی از باکتری های بیماریزا به اثبات رسیده است (۲۳، ۱۶، ۱۱، ۹، ۴، ۲). وجود مواد فنولیک در اسانس

رزماری و آویشن شیرازی مهمترین عامل مهارکننده باکتری های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ ها شناخته شده است (کابارا، ۱۹۹۱ بیان شده در ۱۰). بدیهی است که استفاده از این اسانس های گیاهی به صورت خوراکی یا حمام مستلزم اطلاع از قدرت ضدباکتریایی آنها می باشد. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر غلظت های مختلف اسانس رزماری و آویشن شیرازی علیه برخی از جدایه های درگیر بیماری استرپتوکوکوزیس می باشد.

## مواد و روش ها

### ۱- تشخیص سروتیپ جدایه های باکتریایی و بررسی وجود کپسول

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

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

## ۲- تهیه اسانس‌ها و آنالیز آن‌ها

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

## ۳- آزمایش قدرت ضدباکتریایی به روش دیسک

برای انجام مطالعات خواص ضدباکتریایی اسانس‌ها از ۵ جدایه شامل دو جدایه از سروتیپ I، یک جدایه از سروتیپ II و دو جدایه از سروتیپ‌های بینابینی استفاده شد. برای مطالعه میزان فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های آویشن شیرازی و رزماری از روش دیسک استفاده گردید (۱۰، ۲). بدین منظور ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌ها معادل مک فارلند شماره ۱ حاوی  $10^8$  cfu/ml بر روی محیط ژلوز خون کشت داده شد. ۵ میکرولیتر از اسانس‌های رقیق نشده به دیسک‌های

## ۴- تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی

### (MIC) و باکتری کشی (MBC) اسانس‌ها

برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی آویشن شیرازی و رزماری از روش ماکرودیلوشن استفاده گردید (۸). بدین منظور ابتدا رقت‌های متوالی از اسانس‌ها در لوله‌های ونوجکت حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت TSB و ۴٪ DMSO گردید. رقت‌های تهیه شده شامل  $10^{-1}$ ،  $10^{-2}$ ،  $10^{-3}$ ،  $10^{-4}$ ،  $10^{-5}$ ،  $10^{-6}$ ،  $10^{-7}$ ،  $10^{-8}$  بود. از کشت ۴۸ ساعته هر یک از جدایه‌ها سوسپانسیون باکتریایی معادل مک فارلند شماره یک با تراکم  $10^8$  cfu/ml تهیه و به میزان ۱۰ μl به هر یک از رقت‌ها تلقیح گردید. محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. گروه کنترل در این آزمایش شامل کنترل مثبت (محیط کشت فاقد اسانس و حاوی DMSO و باکتری) و کنترل منفی (محیط کشت با رقت‌های متوالی اسانس و فاقد باکتری) نیز لحاظ شد. پس از ۲۴ ساعت، رشد باکتری به روش چشمی از طریق مقایسه کدورت لوله‌های حاوی اسانس تلقیح شده با کنترل منفی مطالعه گردید. کمترین غلظتی از اسانس که در آن، کدورت مشاهده نشد بعنوان

196A, CH18-3, F5C, F8, L2B, F6B CH18-1 به عنوان سروتیپ I (آرژنین مثبت و ریپوز مثبت) و جدایه CH18-4 سروتیپ II (آرژنین منفی و ریپوز منفی) تشخیص داده شدند. در حالیکه جدایه L6 و LG5 آرژنین منفی و ریپوز مثبت بودند. نتایج رنگ آمیزی کپسول نشان داد که تمامی جدایه های مورد بررسی دارای کپسول کامل بودند.

### ۳- نتایج آزمایش دیسک

اسانس آویشن شیرازی و رزماری دارای خاصیت ضدباکتریایی علیه جدایه های استرپتوکوکوس اینیایی می باشد (جدول ۲). براساس نتایج، اندازه منطقه مهار رشد جدایه های سروتیپ I و II تحت تأثیر اسانس آویشن شیرازی بطور معنی دار در سطح  $P < 0.05$  بیشتر از اسانس رزماری می باشد. منطقه مهار رشد ناشی از آنتی بیوتیک انروفلوکسازین بطور معنی دار کمتر از اسانس آویشن شیرازی بوده در حالیکه اختلاف معنی داری در سطح  $P > 0.05$  بین منطقه مهار رشد جدایه های سروتیپ I و II تحت تأثیر انروفلوکسازین و اسانس رزماری مشاهده نمی شود. از سوی دیگر DMSO ۴٪ بعنوان حلال اسانس رزماری و آویشن شیرازی سبب مهار رشد هیچ کدام از جدایه ها نمی گردد.

### ۴- حداقل غلظت ممانعت کنندگی و حداقل

#### غلظت باکتری کشی اسانس ها

نتایج خاصیت ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی و رزماری نشان داد MIC اسانس آویشن شیرازی علیه جدایه های مورد استفاده  $0.06 \mu\text{l/ml}$  و MBC آن  $0.12-0.25 \mu\text{l/ml}$  می باشد. همچنین MIC و MBC این اسانس رزماری علیه جدایه ها به ترتیب  $0.12-0.25 \mu\text{l/ml}$  و  $0.5-1 \mu\text{l/ml}$  محاسبه گردید (جدول ۳).

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

### ۵- مطالعه رشد جدایه ها

برای مطالعه رشد میزان ۱۰ میکرولیتر از هر یک از جدایه ها با تراکم  $10^8 \text{ cfu/ml}$  به محیط کشت TSB حاوی رقت های متوالی از اسانس های مورد اشاره اضافه و در زمان های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد پس از تلقیح باکتری میزان جذب نوری با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری گردید. گروه کنترل در این بررسی محیط کشت تلقیح شده فاقد اسانس بود.

### نتایج

#### ۱- آنالیز اسانس های آویشن شیرازی و

#### رزماری

براساس نتایج حاصل از آنالیز اسانس آویشن شیرازی و رزماری با استفاده از GC/MS، اسانس آویشن شیرازی دارای ۳۳ ترکیب بوده و بیشترین ترکیب تشکیل دهنده آن کارواکرول ( $62/86\%$ ) می باشد. اسانس رزماری نیز از ۴۸ ترکیب تشکیل گردیده که بیشترین ترکیب تشکیل دهنده اسانس رزماری مربوط به آلفا پینن ( $19/15\%$ ) می باشد. برخی از ترکیبات این اسانس ها در جدول شماره ۱ آورده شده است.

#### ۲- تشخیص سروتیپ های باکتریایی و بررسی

#### کپسول باکتریایی

از ۱۵ جدایه جداسازی شده از مزارع پرورش قزل آلای رنگین کمان، ۹ جدایه شامل 201A و 201C



۵- رشد

در غلظت‌های MIC و بالاتر از آن رشد جدایه‌ها متوقف گردیده است. همچنین در غلظت‌های کمتر از MIC با گذشت زمان روند رشد تمامی جدایه‌های باکتریایی افزایش یافته است.

تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی و رزماری بر رشد جدایه‌های سروتیپ I و II استرپتوکوکوس اینیایی در نمودار ۱ و ۲ آمده است. روند رشد جدایه‌های باکتریایی مورد استفاده با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی کاهش یافته بطوری که

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

اسانس آویشن شیرازی		اسانس رزماری	
نام ترکیب	اندیس بازدارنده	درصد	نام ترکیب
آلفا- پینن	۱۱/۳۶	۱/۴۱	آلفا پینن
بنزن	۱۶/۱۱	۱۱/۱۶	کامفن
کارواکروول	۳۰/۰۸	۶۲/۸۲	بتا - پینن
اوکالیپتول	۱۶/۳۲	۱/۰۳	اکتانون
گاما - ترپینن	۱۷/۸۰	۳/۷۸	بتا - میرسن
لینالول	۱۹/۹۸	۲/۵۱	۱.۸ سینئول
بورنئول	۲۳/۱۱	۱/۷۶	لینالول
فنل	۳۰/۲۷	۵/۰۳	کامفور
ترانس - کاربوفیلین	۳۴/۸۱	۲/۵۷	بورنئول
تیمول متیل اتر	۲۶/۳۷	۰/۱۴	آلفا - ترپینئول
کارواکروول متیل اتر	۲۶/۸۱	۰/۳۷	وربنون

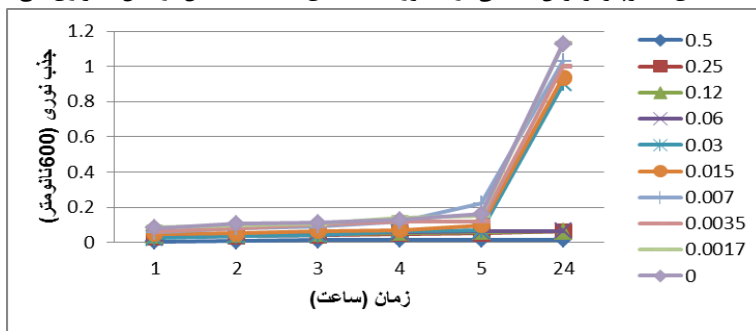
جدول ۲- میانگین منطقه مهار رشد تعدادی از سویه‌های استرپتوکوکوس به روش دیسک

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

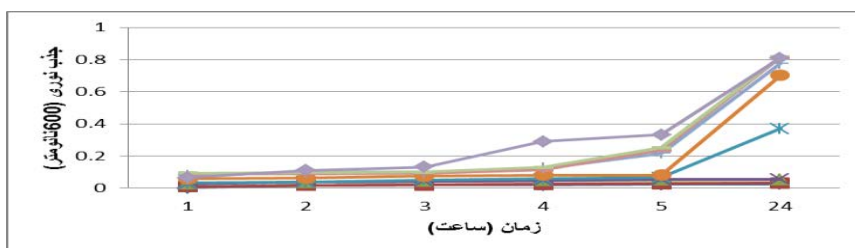
جدول ۳- میزان MIC(μl/ml) و MBC(μl/ml) اسانس‌های آویشن شیرازی و رزماری علیه جدایه‌ها در دمای ۲۵°C.

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

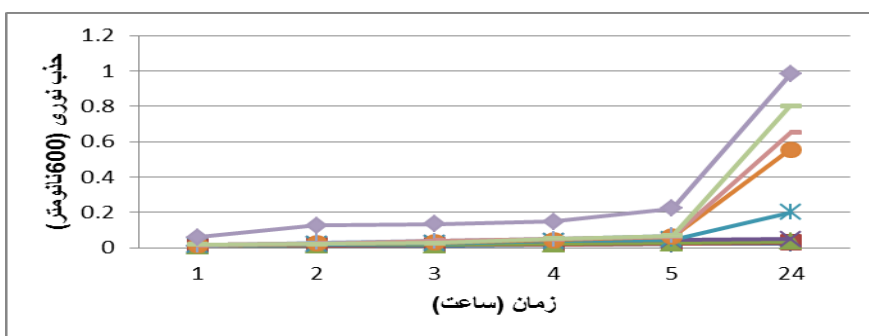
نمودار ۱- رفتار رشد برخی جدایه های استرپتوکوکوس اینیابی در حضور غلظت های مختلف اسانس آویشن شیرازی طی ۲۴ ساعت در دمای ۲۵°C.



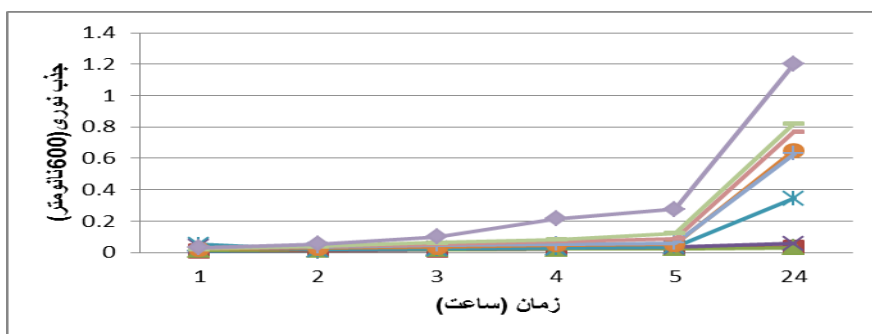
نمودار ۱-۱- جدایه 201C



نمودار ۱-۲- جدایه L2B

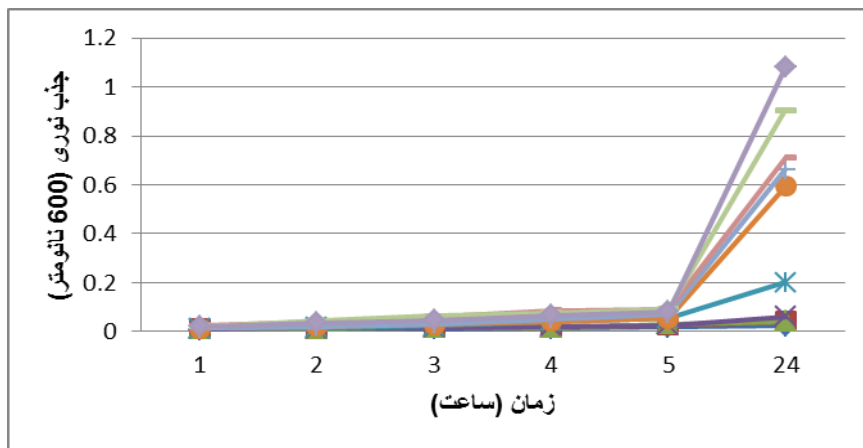


نمودار ۲-۱- جدایه CH18-4



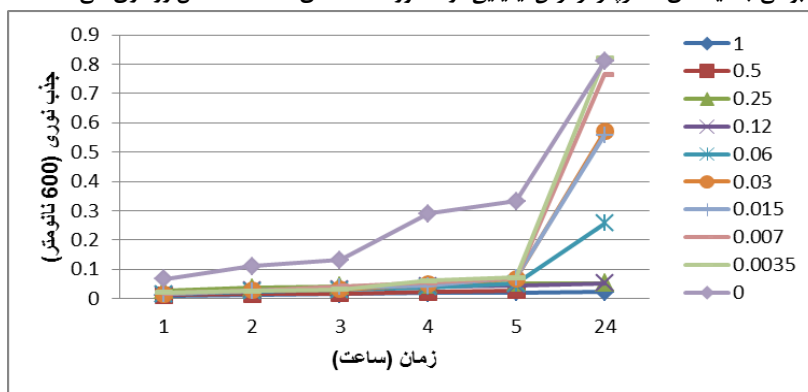
نمودار ۲-۲- جدایه L6

۷ مطالعه تأثیر اسانس آوبشن شیرازی... ۷

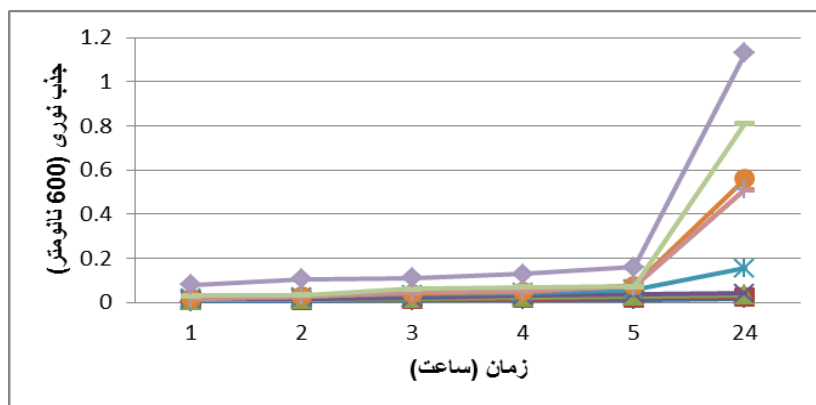


نمودار ۵-۱- جدایه LG5

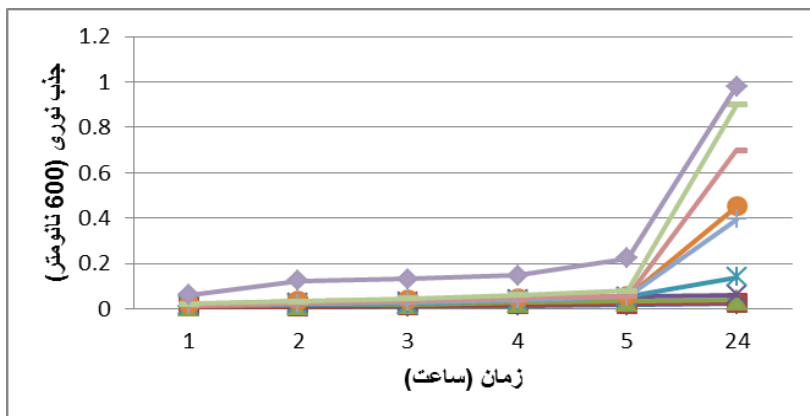
نمودار ۲- رفتار رشد برخی جدایه های استرپتوکوکوس اینیایی در حضور غلظت های مختلف اسانس رزماری طی ۲۴ ساعت در دمای ۲۵°C.



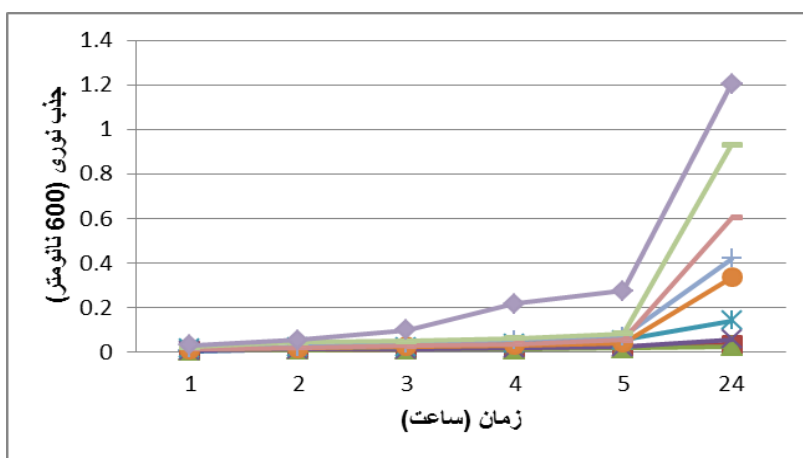
نمودار ۱-۲- جدایه 201C



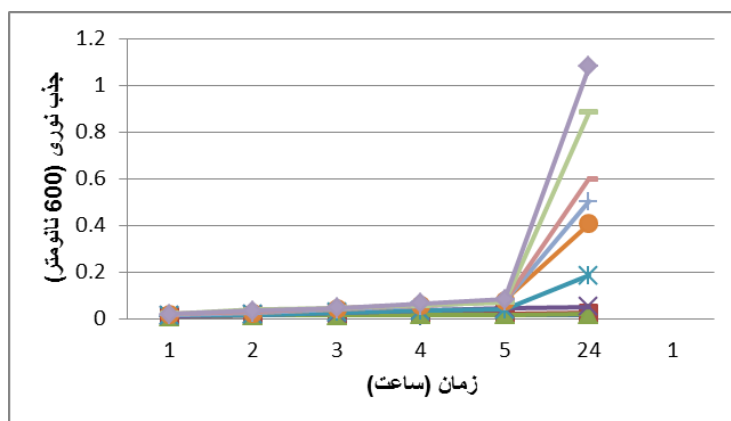
نمودار ۲-۲- جدایه L2B



نمودار ۲-۲ - جدایه CH18-4



نمودار ۲-۴ - جدایه L6



نمودار ۲-۵ - جدایه LG5

آزمایش‌های انجام شده جهت شناسایی سروتیپ ۱۵ جدایه استرپتوکوکوس اینیایی جداسازی شده از مزارع پرورش قزل آلاي رنگين کمان ايران نشان دهنده وجود دو سروتیپ I و II بود، علاوه بر این،

## بحث

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



باکتری های گرم منفی در مقایسه با باکتری های گرم مثبت نسبت به آویشن شیرازی مقاوم تر بوده که احتمالاً به دلیل ویژگی هیدروفیلیک غشاء خارجی باکتری های گرم منفی و نفوذ ناپذیر بودن آن در مقابل ترکیبات لیپوفیلیک همچون اسانس های گیاهی می باشد (ارسیسلی و اوزتورک (۲۰۰۵) بیان شده در ۱۹)، اما شریفی فر و همکاران (۲۰۰۷) بیان داشتند که تأثیر مهارکنندگی اسانس آویشن شیرازی بر باکتری های گرم منفی بیشتر می باشد. نتایج آزمایشگاهی بدست آمده از این مطالعه نشان می دهد که اسانس آویشن شیرازی قدرت ضدباکتریایی علیه سویه های بیماریزای *استرپتوکوکوس/اینیایی* دارد، بطوریکه حداقل غلظت ممانعت کنندگی آن علیه سویه های سروتیپ I ۰/۰۶ میکرولیتر بر میلی لیتر، حداقل MBC ۰/۵ میکرولیتر بر میلی لیتر و منطقه مهار رشد در دامنه ۲/۱۱-۲/۶۳ سانتی متر بوده است. همچنین میزان MIC این اسانس برای جدایه های سروتیپ II ۰/۰۶ میکرولیتر بر میلی لیتر، MBC ۰/۲۵-۰/۱۲ میکرولیتر بر میلی لیتر و منطقه مهار رشد ۲/۱۵-۲/۳ سانتی متر محاسبه شد. افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی سبب کاهش رشد جدایه های مورد مطالعه می گردد، بطوریکه روند رشد باکتریایی در غلظت های MIC و بالاتر از آن متوقف گردید، همچنین رشد تمامی جدایه ها با گذشت زمان در غلظت های کمتر از MIC افزایش یافت. خاصیت ضد میکروبی آویشن شیرازی بیشتر از انروفلوکسازین می باشد، بطوری که منطقه مهار رشد ناشی از این اسانس بطور معنی دار بیشتر از آنتی بیوتیک بود. بطور کلی خاصیت ضد میکروبی آویشن شیرازی به دلیل حضور ترکیبات فنلی از جمله تیمول و کارواکرول است. کارواکرول لیپوفیلیک سبب افزایش نفوذ پذیری و از هم گسیختگی دیواره سلول باکتریایی و در نتیجه

نتایج مطالعه بیانگر وجود جدایه هایی غیر از دو سروتیپ مذکور در مزارع قزل آرای رنگین کمان می باشد که نیازمند مطالعات بعدی است، بهر حال باتوجه به اینکه واکنش آرژنین دهیدرولاز فاکتور قابل اطمینانی برای تعیین نوع سروتیپ نبوده و در برخی شرایط که آرژنین دهیدرولاز منفی می باشد، مثبت قرائت می گردد (۵)، احتمالاً دو جدایه L6 و LG5 نیز سروتیپ II می باشند. بوچانان و همکاران (۲۰۰۵) نیز دو سروتیپ را در بین جدایه های *استرپتوکوکوس/اینیایی* تشخیص داده و مشخص گردید فراوانی سروتیپ I در بروز بیماری استرپتوکوکوزیس بیشتر بوده، در حالیکه فراوانی سروتیپ II کمتر می باشد، با این حال به دلیل دارا بودن کپسول کامل تر سروتیپ II نقش مؤثرتری در بیماریزایی دارد. در مطالعه حاضر علی رغم فراوانی بیشتر سروتیپ I، از لحاظ دارا بودن کپسول هر دو سروتیپ دارای کپسول کامل بودند. در بررسی حاضر کارواکرول با ۶۲/۸۲٪ اصلی ترین ترکیب آویشن شیرازی بود. میثاقی و همکاران (۲۰۰۷) نیز کارواکرول را بعنوان اصلی ترین ترکیب آویشن شیرازی گزارش نمودند. اما شریفی فر و همکارانش (۲۰۰۷) مهمترین اجزای تشکیل دهنده اسانس آویشن شیرازی را تیمول و کارواکرول دانسته اند. وجود تفاوت در ترکیب اسانس گیاهان به دلیل اختلاف در منطقه جغرافیایی، سن گیاه در زمان برداشت، روش خشک نمودن و نحوه اسانس گیری می باشد (۱۲). تاکنون اثرات ضد میکروبی آویشن شیرازی بر مهار رشد باکتری های گرم مثبت و گرم منفی از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشریشیا کلی*، *سالمونلا تیفیموریوم*، *شیگلا فلکسنری*، *پروتئوس ولگاریس* مشخص گردیده است (۱۶، ۱۴، ۹، ۴). مطالعات ساعتی دهکردی و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد

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

تحقیقات مختلف اثر مهارکننده اسانس رزماری را بر باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و قارچها نشان داده اند که می‌توان به استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفیموریوم، باسیلوس سرئوس، پروتئوس ولگاریس، اشریشیا کلی، سودوموناس آئروژنیوزا، لیستریا مونوسیژنوز، کاندیدا آلبیکانس اشاره نمود (۲۳، ۱۲، ۱۱، ۱۰). جمعیت‌های وحشی رزماری دارای تفاوت‌هایی در فعالیت ضد میکروبی بوده که بعلاوه ترکیب شیمیایی مختلف و متغیر می‌باشد (۱۵، ۷). گچکار و همکاران (۲۰۰۷) مهمترین اجزای تشکیل دهنده اسانس رزماری را ۱، ۸ سینئول، آلفا پینن و لینالول دانسته اند، در حالیکه جیانگ و همکاران (۲۰۱۱)، ۱، ۸ سینئول، آلفا پینن، کامفور، کامفن و بتا-پینن را بعنوان اجزای اصلی اسانس رزماری شناسایی کردند. در مطالعه حاضر نیز اصلی ترین اجزای تشکیل دهنده به ترتیب آلفا-پینن، او ۸ سینئول، کامفور و کامفن بودند. فعالیت بیولوژیک اسانس را نمی‌توان تنها به یک یا تعدادی از اجزاء تشکیل دهنده آن نسبت داد زیرا ممکن است مواد با مقادیر اندک نیز تأثیر بسزایی بر فعالیت ضدباکتریایی اسانس داشته باشند که می‌تواند ناشی از اثرات سینرژیستی یا آنتاگونیستی مجموعه ای از این ترکیبات در یک گیاه باشد (۲۳). مطالعه حاضر بیانگر خاصیت ضدباکتریایی اسانس رزماری علیه جدایه‌های استرپتوکوکوس اینیایی می‌باشد، بطوری که MIC این اسانس علیه جدایه‌های سروتیپ I در دامنه ۰/۱۲-۰/۲۵ میکرولیتر بر میلی لیتر، MBC بالاتر از ۱ میکرولیتر بر

میلی لیتر و منطقه مهار رشد ۰/۷۱-۰/۹۳ سانتی متر اندازه گیری گردید. MIC اسانس رزماری برای جدایه‌های سروتیپ II ۰/۱۲ میکرولیتر بر میلی لیتر، MBC در دامنه ۱-۰/۵ میکرولیتر بر میلی لیتر و منطقه مهار رشد ۰/۹۵-۰/۸۴ سانتی متر بدست آمد. آبتول و همکاران (۲۰۰۴) مشخص کرد عصاره رزماری دارای خاصیت باکتروستات علیه استرپتوکوکوس اینیایی بوده و عصاره اتیل استات رزماری (۳۷/۵) در مقایسه با عصاره متانولی (۱۷/۰۵ mm/mg) و اتانولی (۲۳/۸۱ mm/mg) بیشترین اثر ضدباکتریایی را دارا می‌باشد، همچنین میزان مرگ و میر ماهیان تیلایای مبتلا به استرپتوکوکوس اینیایی که با عصاره رزماری تغذیه شده بودند به شدت کاهش یافته و یک روز پس از درگیری با باکتری، هیچ باکتری از ماهیان باقی مانده جداسازی نگردید. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که مصرف اسانس آویشن شیرازی و رزماری می‌تواند مانع از رشد و تکثیر سروتیپ‌های استرپتوکوکوس اینیایی شده و لذا به علت تأثیر ناچیز بر محیط زیست مصرف آن می‌تواند به عنوان یک ماده ضد میکروبی مؤثر در مزارع پرورش آبزیان برای ضد عفونی کردن ستون آب و نیز درمان ماهیان در گیر با عفونت‌های استرپتوکوکی به روش خوراکی و یا حمام توصیه گردد. مطالعات بیشتر برای مشخص نمودن مکانیزم عمل اسانس‌های مذکور و نیز تعیین دوز مؤثر اسانس رزماری و آویشن شیرازی در مزارع پرورش آبزیان جهت کاهش تلفات ماهیان درگیر استرپتوکوکوزیس نیاز می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

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



- (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control* **18**: 646-649
10. Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M., Taghizadeh, M., Astaneh, S., Rasooli, I., (2007). Chemical and biological characteristic of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry* **102**: 898-904
  11. Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y., Wang, W., Luo, M., Zhao, C., Zu, Y., Liu, Z., (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of Rosmary. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **32**: 63-68
  12. Jordan, M., Lax, V., Rota, M., Loran, S., Sotomayor, J., (2013). Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis*. *Food Control* **30**: 463-468
  13. MacMillan, J., (2001). Aquaculture and antibiotic resistance: a negligible public health risk? *World Aquaculture* **32**: 49-68
  14. Misaghi, A., Akhundzadeh Basti, A., (2007). Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and nisin on *Bacillus cereus* ATCC 11778. *Food Control* **18**: 1043-1049
  15. Moghtader, M., Afzali, D., (2009). Study of the antibacterial properties of the essential oil of rosemary. *American-Eurasian Journal of Agriculture Environment Science* **5**: 393-397
  16. Moosavy, M. H., Akhundzadeh Basri, A., Misaghi, A., Zahraei Saleh, T., Abbasifar, R., Ebrahimzadeh Mousavi, H. A., Alipour, M., EmamiRazavi, N., Gandomi, H., Noori, N., (2007). Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in food model system and on the bacterial cell membrane. *Food Research International* **41**: 1050-1057
  17. Namiki, M., (1990). Antioxidants antimutagens in food. *Food Science* **29**: 273-300
  18. Oussalah, M., Caillet, S., Laroix, M., (2006). Mechanism of Action of Spanish Oregano, Chinese Cinnamon and Savory Essential Oils Against Cell Membrane and Walls of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food protection* **69**: 1046-1055
  19. Saei-Dehkordi, S. S., Tajik, H., Moradi, M., Khalighi-Sigaroodi, F., (2010). قطب علمی بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشگاه تهران انجام گرفته است.

#### منابع

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

2. Abutbul, S., Golan-Goldhirsh, A., Barazani, O., ZilbSrg, D., (2004). Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis sp.*). *Aquaculture* **238**: 97-105
3. Agnew, W., Barnes, A., (2007). *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and candidate for reliable vaccination. *Veterinary Microbiology* **122**: 1-15
4. Amin, M., Kalantar, E., Mohammad-Saeid, N., Ahsan, B., (2010). Antibacterial effect and physicochemical properties of essential oil of *Zataria multiflora* Boiss. *Asian Pacific Journal of Tropical medicine*, 439-442
5. Barnes, A. C., Ellise, A. E., (2003). Variation in arginine dihydrolase activity in *Streptococcus iniae* may be an artefact of the assay. *Bulletin of European association of Fish Pathologists* **23**: 163-166
6. Buchanan, J. T., Stannard, J. A., Lauth, X., Ostland, V. E., Powell, H. C., Westerman, M. E., Nizet, V., (2005). *Streptococcus iniae* phosphoglucomutase is a virulence factor and a target for vaccine development. *Infection and Immunity* **73**: 6935-6944
7. Celiktas, O. Y., HamesKocabas, E. E., Bedir, E., Vardersukan, F., Ozek, T., Baser, K. H. C., (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry* **100**: 553-559
8. Clinical and Laboratory Standards Institute, (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; approved standard, 7th edition. M7-A7 26, pp. 64
9. Fazeli, M. R., Amin, G., Ahmadian Attari, M. M., Ashtiani, H., Jamalifar, H., Samadi, N., (2007). Antimicrobial activities of Iranian sumac and Avishan-e shirazi

- Chemical composition of essential oil *Zataria multiflora* Boiss. From different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology* **48**:1562-1567
20. Sharififar, F., Moshafi, M. H., Mansuri, S. H., Khodashenas, M., Khoshnoodi, M., (2007). In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control* **18**: 800-805
21. Soltani, M., Jamshidi, S., Shafipour, I., (2005). Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran: biophysical characteristics and pathogenesis. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* **25**: 95-106
22. Soltani, M., Nikbakht, G., Ebrahimzadeh Mousavi, H. A., (2008). Epizootic outbreaks of Lactococcosis caused by *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* **28**: 207-212
23. Wang, W., Li, N., Luo, M., Zu, Y., Effert, T., (2012). Antimicrobial activity and Anticancer of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. *Molecules* **17**: 2704-2713
24. Zoubiri, S., Baaliouamer, A., (2011). Chemical composition and insecticidal properties of some aromatic herbs essential oils from Algeria. *Food Chemistry* **29**: 179-182

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

Soltani, M.<sup>1,2\*</sup>, Ghodratnama, M.<sup>1</sup>, Taheri Mirghaed, A.<sup>1</sup>, Zargar, A.<sup>1</sup>, Rooholahi, Sh.<sup>1</sup>

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

2- Center of Excellence of Aquatic Animal Health, University of Tehran, Tehran, Iran

Received Date: 19 Feb 2013

Accepted Date: 6 May 2013

---

### Abstract

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

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

---

\*Corresponding author: Soltani, M.

Address: Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. Tel: 021-61117094

Email: msoltani@ut.ac.ir