JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره دوازدهم، شماره اول، ۱۳۹۵، پیاپی ۳۲: ۱۰-۱

بررسی اثرات ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی روی برخی از باکتری‌های پاتوژن ماهی در محیط آزمایشگاهی

نرجس سنچولی

مربی پژوهشکده تالاب بین المللی هامون، گروه شیلات، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: ۲۰ مرداد ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: ۲۵ مهر ۱۳۹۴

چکیده: *مصرف بی رویه آنتی بیوتیک‌ها برای درمان بیماری‌های باکتریایی در آبزی پروری سبب بروز مقاومت دارویی در سویه‌های باکتریایی شده و کارایی داروها را کاهش می‌دهند. همچنین سبب تجمع آنتی بیوتیک‌ها در بدن ماهی و مصرف کنندگان ماهی نیز شده‌اند، لذا جایگزین کردن مواد کم ضررتر از جمله فرآورده‌های گیاهی ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه اثرات ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی میخک هندی، زیره سبز، رزماری و نعناع بر باکتری‌های آئروموناس هیدروفیلا، پرسینیا روکری و استرپتوکوکوس اینیایی مورد مطالعه قرار گرفته است. برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی اسانس‌ها از روش استاندارد میکرودایلوشن استفاده شد و حداقل غلظت باکتری کشی اسانس‌ها براساس مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی آن‌ها به دست آمد. نتایج نشان داد که اسانس میخک هندی در مقایسه با اسانس‌های دیگر قوی تر و دارای قدرت مهار کنندگی بالاتری بوده و میزان حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت باکتری کشی بر هر سه باکتری به ترتیب ۱/۵۶، ۳/۲۱ mg/ml به دست آمد. اسانس رزماری دارای قدرت کمتری در مقایسه با اسانس‌های دیگر بوده و میزان حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت باکتری کشی بر هر سه باکتری مورد مطالعه به ترتیب ۶/۲۵، ۱۲/۵ mg/ml بدست آمد. باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس اینیایی در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی آئروموناس هیدروفیلا و پرسینیا روکری حساسیت بیشتری نسبت به اسانس‌های مورد مطالعه داشت. بیشترین مقاومت را باکتری آئروموناس هیدروفیلا به اسانس نعناع نشان داد. بر اساس نتایج این مطالعه استفاده از اسانس میخک هندی برای کنترل بیماری‌های باکتریایی ایجاد شده با سویه‌های مورد بررسی پیشنهاد می‌شود.*

کلمات کلیدی: *اسانس‌های گیاهی، ضدباکتریایی، آئروموناس هیدروفیلا، پرسینیا روکری، استرپتوکوکوس اینیایی*

* نویسنده مسئول: نرجس سنچولی

آدرس: پژوهشکده تالاب بین المللی‌هامون، گروه شیلات، دانشگاه زابل، زابل، ایران. تلفن: ۰۵۴۳۲۲۲۴۵۱۰

پست الکترونیک: sanchoolin@yahoo.com

مقدمه

عفونت‌های باکتریایی یکی از عوامل اصلی مرگ و میر ماهیان پرورشی به شمار می روند. استفاده از آنتی بیوتیک‌ها و مواد ضدمیکروبی روش معمول درمان این گونه عفونت‌ها در پرورش آبزیان میباشد که استفاده زیاد و مداوم از آنتی بیوتیک‌ها ایجاد سویه‌های مقاوم در میکروارگانیزم‌ها، مسئله باقیماندن دارو در بافت‌های ماهی و مشکلات زیست محیطی را به دنبال دارد، از طرف دیگر این مواد شیمیایی موجب ممانعت از رشد فلور باکتریایی دستگاه گوارش ماهی می شوند که خود دارای اثرات مفیدی بر سلامتی موجود هستند. ظهور و استفاده مداوم از آنتی بیوتیک‌ها در قرن گذشته به موفقیت در محدود کردن بسیاری از بیماری‌های شایع باکتریایی که باعث همه‌گیری در انسان و حیوانات شده بود منجر شد. در همان زمان به طور ناخواسته استفاده بیش از حد آنتی بیوتیک‌ها منجر به ظهور مقاومت در ارگانیسم‌ها در برابر آنتی بیوتیک‌های عمومی شده و ضرورت‌ها و الزامات استفاده از آنتی بیوتیک‌های جدیدتر برای بررسی عفونت‌های غالب معمولا در حال توسعه می‌باشد. ظهور مقاومت به چند دارو ضرورت جستجو برای منبع جایگزین عوامل ضد میکروبی را باعث شد (۱۵). با توجه به مشکل مقاومت میکروبی، نیاز فوری به ایجاد قوانین برای استفاده منطقی از آنتی بیوتیک‌ها و کشف داروهای جدید و درمان‌های جایگزین برای کنترل بیماری‌های باکتریایی در زمینه آبزی پروری وجود دارد. طبیعت یک منبعی از عوامل دارویی برای هزاران سال بوده است و تعداد قابل توجه از داروهای مدرن از منابع طبیعی جدا شده است، که بسیاری از آن‌ها بر اساس استفاده از آن‌ها در طب سنتی بوده است. گیاهان دارویی مختلف سالهاست که در زندگی روزمره برای درمان بیماری‌ها در سراسر جهان استفاده شده است. آن‌ها به عنوان منبع دارو استفاده شده است (۱۰).

آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) یکی از باکتری‌های مهم در پرورش ماهی می‌باشد که یک باکتری گرم منفی، متحرک هوازی و بی هوازی اختیاری بوده، در محیط‌های آبی و دستگاه گوارش ماهیان سالم یافت می‌شود. این باکتری در شرایط استرس‌زا عامل اصلی مرگ و میر در ماهیان آب شیرین بوده و موجب سپتی سمی‌همراه خونریزی‌های جلدی و احشایی، تورم روده و مرگ می‌شود (۴). توجه ویژه به *آئروموناس هیدروفیلا* به دلیل ارتباط آن با طیف گسترده‌ای از بیماری‌های انسان است (۹).

یکی از شایع ترین بیمارهای باکتریائی در مزارع پرورش ماهی قزل آلا، بیماری یرسینیوزیس (Yersiniosis) یا بیماری دهان قرمز روده ای است این بیماری اولین بار در دهه ۱۹۵۰ و از یک کارگاه پرورش ماهی قزل آلا در ایداهو آمریکا گزارش شد (۲۲). باکتری *یرسینیا روکری* (*Yersinia ruckeri*) یک باکتری گرم منفی و میله ای شکل با دنباله‌های شفاف وگرد بی هوازی می باشد (۲۶). باکتری *یرسینیا روکری* یک پاتوژن فرصت طلب که معمولاً در آبها موجود است و نسبت به درمان‌های آنتی- بیوتیکی مقاومت نشان می‌دهد و موجب سپتی سمی همراه با خونریزی سطحی و داخلی در ماهی قزل آلا و خسارات اقتصادی قابل توجه به صنعت پرورش آبزیان می گردد (۲۰).

باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* (*Streptococcus iniae*) عامل بیماری استرپتوکوکوزیس در ماهیان بوده که سبب بروز خسارات اقتصادی فراوان به صنعت آبزی پروری در سراسر جهان از جمله ایران گردیده است (۲۴). به طوری که تاکنون استرپتوکوکوزیس در ۲۷

گونه ماهیان آب شیرین، آب شور و یوری هالین گزارش شده و نیز به عنوان پاتوژن زئونوز سبب بروز عفونت استرپتوکوکی در انسان می‌شود (۵). Pintore و همکاران (۲۰۰۲) فعالیت ضدمیکروبی اسانس رزماری علیه طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها مثل *اشرشیا کلی* (*Escherchia coli*)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) و *سودوموناس آئروزینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) را گزارش کردند (۱۹). Gislene و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که عصارهٔ اتانولی میخک دارای بازدارندگی بر رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروزینوزا*، *باسیلوس سابتیلیس* (*Bacillus subtilis*)، *سالمونلا کلراسوئیس* (*Salmonella cholerasuis*) و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* (*Candida albicans*) می‌باشد (۱۳). Iacobellis و همکاران (۲۰۰۵) خاصیت ضدباکتریایی متوسط زیره سبز را بر برخی از باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی گزارش نمودند (۱۴). Rozman و Jersec (۲۰۰۹) نشان دادند که اسانس نعناع دارای اثرات ضدمیکروبی بر گونه‌های مختلف جنس *لیستریا* می‌باشد (۲۱). با توجه به مزایای متعدد استفاده از گیاهان دارویی در آبزی پروری استفاده از این داروها بسیار مورد توجه بوده و احتمال جایگزین شدن بسیاری از داروهای شیمیایی با داروهای گیاهی وجود دارد، لذا با توجه به تنوع گیاهی بسیار بالا و وجود گیاهان دارویی با کاربردهای متعدد در کشور، تحقیقات در این زمینه ضروری می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضدباکتریایی اسانس‌های میخک هندی، رزماری، زیره سبز و نعناع بر باکتری‌های بیماری‌زای مهم ماهی *آئروموناس هیدروفیلا*، *یرسینیا روکری* و *استرپتوکوکوس اینیایی* در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش کار

تهیه اسانس‌های مورد مطالعه

اسانس‌های میخک هندی (*Eugenia caryophillata*)، زیره سبز (*Cuminum cyminum*)، رزماری (*Rosmarinus officinalis*) و نعناع (*Mentha spicata*) از شرکت باریج اسانس کاشان تهیه شد.

تهیه باکتری و ذخیره‌سازی

باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* جداسازی شده از ماهی قزل آلای رنگین کمان مورد تایید دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. همچنین دو باکتری *یرسینیا روکری* دارای کدPCR با شماره (KEC 29653) و *استرپتوکوکوس اینیایی* جداسازی شده از ماهیان مبتلا به استرپتوکوکوزیس در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر تهیه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰°C در محیط مایع نوترینت براث (Nutrient broth) گرمخانه گذاری شدند و بعد از ۲۴ ساعت با گلیسرول ۱۰ ٪ در فریزر با دمای ۲۱° C- ذخیره‌سازی شدند.

تهیه سوسپانسیون باکتریایی

باکتری‌های *آئروموناس هیدروفیلا*، *یرسینیا روکری* و *استرپتوکوکوس اینیایی* را پس از انجماد زدایی در دمای ۳۰°C، در محیط نوترینت براث و همچنین به منظور بررسی کلنی‌های خالص، از نمونه‌های باکتریایی روی محیط جامد ترپتیک سوی آگار (TSA) کشت خطی داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ °C در انکوباتور قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت از کلنی‌های خالص هر باکتری برداشته و در آب مقطر استریل کدورتی معادل نیم مک فارلند ساخته و بعد برای اطمینان از غلظت باکتری‌ها با اسپکتوفتومتر UV visible جذب آن با طول موج ۶۰۰nm قرائت شد.

تراکم باکتری‌ها با غلظت $1/5\times10^{6}$ CFU/ml جذبی معادل ۰/۱-۰/۰۸ دارد.

تعیین اثرات ضدمیکروبی حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum Inhibitory Concentration)

آزمایش حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) در پلیت ۹۶ خانه‌ای میکروتیتر استریل و با روش استاندارد براث میکرودایلوشن (رقیق‌سازی در محیط مایع) انجام شد و میزان ۱۰۰µl از دو برابر بالاترین غلظت اسانس به اولین چاهک پلیت‌های میکروتیتر ۹۶ خانه‌ای که قبلا حاوی ۱۰۰µl محیط کشت مولر هینتون براث بوده اضافه شده و پس از مخلوط کردن محتویات چاهک اول ۱۰۰µl میکرولیتر برداشته و به چاهک دوم انتقال داده و این عمل تا آخرین غلظت مورد نظر انجام شد و بعد از آن ۱۰۰µl از سوسپانسیون باکتریایی CFU/ml $1/5\times10^{6}$ به پلیت‌ها اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ °C در انکوباتور قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت وجود کدورت (در مقایسه با ردیف کنترل اسانس‌ها) حاکی از رشد باکتری و شفافیت، نشان دهنده عدم رشد باکتری می‌باشد. پایین ترین غلظتی که در آن هیچ گونه رشد باکتری مشاهده نشد (فاقد کدورت ناشی از رشد باکتری) به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی تعیین شد (۱۸).

تعیین حداقل غلظت باکتری کشی (Minimum Bactericidal Concentration)

حداقل غلظت باکتری کشی با توجه به مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی هر یک از اسانس‌ها تعیین شد، به طوری که میزان ۵µl از چاهک‌هایی که رشد باکتری در آن‌ها متوقف شده بود، به پلیت‌های حاوی محیط کشت اختصاصی باکتری‌ها (تریپتک سوی آگار TSA) انتقال داده شده و به مدت ۲۴-۲۲ ساعت در دمای ۳۰°C در انکوباتور نگهداری شدند. پایین ترین غلظت عصاره که در آن ۹۹/۹ ٪ باکتری‌ها رشد نداشتند به عنوان حداقل غلظت باکتری کشی در نظر گرفته شد (۱۸). تمام آزمایشات برای ۳ بار تکرار گردیده و میانگین داده‌های بدست آمده به عنوان نتایج MIC و MBC ارائه گردید

نتایج

اثرات ضدباکتریایی اسانس‌ها بر باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در جدول ۱، بر باکتری *یرسینیا روکری* در جدول ۲ و باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* در جدول ۳ و مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت باکتری کشی اسانس‌ها بر باکتری‌های مورد مطالعه در جدول ۴ نشان داده شده است. با توجه به جداول ۱-۴ میزان حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس میخک هندی بر هر سه باکتری مورد مطالعه به ترتیب ۱/۵۶ و ۳/۱۲ میلی گرم در میلی لیتر و اسانس رزماری بر هر سه باکتری ۶/۲۵ و ۱۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر تعیین شد. میزان MIC و MBC اسانس زیره سبز بر باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* به ترتیب ۶/۲۵ و ۱۲/۵، باکتری *یرسینیا روکری* ۳/۱۲ و ۶/۲۵ و برای باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* ۱/۵۶ و ۳/۱۲ تعیین شد. همچنین میزان MIC و MBC اسانس نعناع بر باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* به ترتیب ۱۲/۵و ۲۵، باکتری *یرسینیا روکری* ۶/۲۵ و ۱۲/۵ و برای باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* ۳/۱۲ و ۶/۲۵ تعیین شد.

جدول ۱: اثرات ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی بر باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* (-: عدم رشد باکتری +: رشد باکتری)

غلظت (mg/ml)	۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۳/۱۲	۱/۵۶	۰/۷۸	۰/۳۹
میخک هندی	-	-	-	-	MIC	+	+
زیره سبز	-	-	MIC	+	+	+	+
نعناع	-	MIC	+	+	+	+	+
رزماری	-	-	MIC	+	+	+	+

جدول ۲: اثرات ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی بر باکتری *یرسینیا روکری* (-: عدم رشد باکتری +: رشد باکتری)

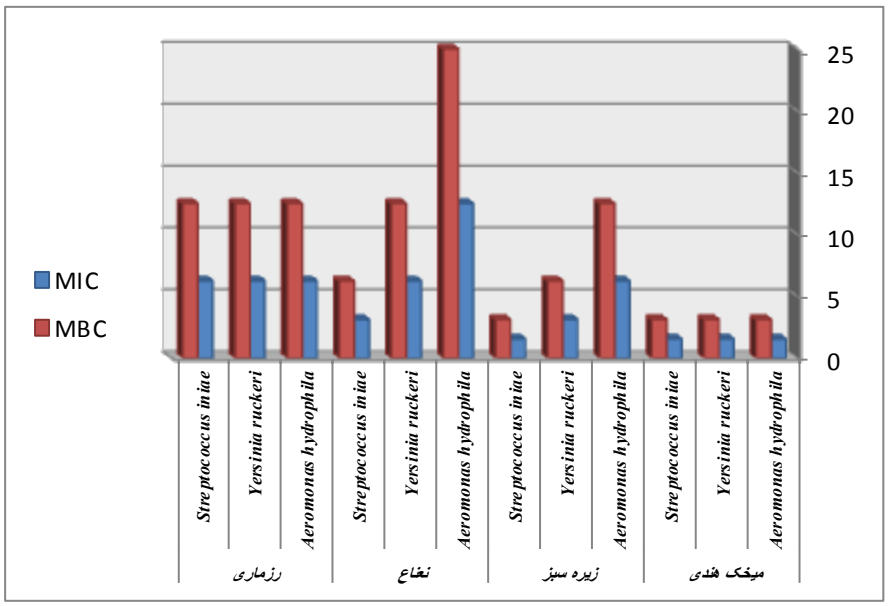
غلظت (mg/ml)	۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۳/۱۲	۱/۵۶	۰/۷۸	۰/۳۹
میخک هندی	-	-	-	-	MIC	+	+
زیره سبز	-	-	-	MIC	+	+	+
نعناع	-	-	MIC	+	+	+	+
رزماری	-	-	MIC	+	+	+	+

جدول ۳: اثرات ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی بر باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* (-: عدم رشد باکتری +: رشد باکتری)

غلظت (mg/ml)	۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۳/۱۲	۱/۵۶	۰/۷۸	۰/۳۹
میخک هندی	-	-	-	-	MIC	+	+
زیره سبز	-	-	-	-	MIC	+	+
نعناع	-	-	-	MIC	+	+	+
رزماری	-	-	MIC	+	+	+	+

جدول ۴: نتایج MIC و MBC اسانس‌های مختلف گیاهی برحسب mg/ml بر باکتری‌های مورد مطالعه (MIC: حداقل غلظت بازدارندگی اسانس‌ها از رشد باکتری‌ها MBC: حداقل غلظت کشندگی اسانس‌ها)

باکتری‌ها / اسانس‌های گیاهی	*Streptococcus iniae*		*Yersinia ruckeri*		*Aeromonas hydrophila*	
	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
میخک هندی	۳/۱۲	۱/۵۶	۳/۱۲	۱/۵۶	۳/۱۲	۱/۵۶
زیره سبز	۳/۱۲	۱/۵۶	۶/۲۵	۳/۱۲	۱۲/۵	۶/۲۵
نعناع	۶/۲۵	۳/۱۲	۱۲/۵	۶/۲۵	۲۵	۱۲/۵
رزماری	۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵



نمودار ۱: نتایج MIC و MBC اسانس‌های مختلف گیاهی برحسب mg/ml بر باکتری‌های مورد مطالعه

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده، اسانس‌های مختلف اثرات ضدباکتریایی متفاوت روی باکتری‌ها داشتند. قوی‌ترین اسانس، اسانس میخک هندی با میزان MIC=۱/۵۶ mg/ml بر هر سه باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*، *یرسینیا روکری* و *استرپتوکوکوس اینیایی* بود. گزارشات قبلی بیان کردند که غلظت‌های کمتر از کشندگی اسانس میخک، از تولید آمیلاز و پروتئاز در سلول باکتری *باسیلوس سرئوس* جلوگیری میکند. این ترکیب همچنین باعث تخریب دیواره سلولی و تجزیه سلول باکتری می‌گردد، گروه هیدروکسیل یوگنول با پروتئین ها پیوند شده، ازعمل آنزیم در سلول باکتری جلوگیری می‌کند (۲۵ و ۲۸). حساسترین باکتری به اسانس‌های مورد مطالعه، باکتری گرم مثبت *استرپتوکوکوس اینیایی* بوده و در مقابل باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* مقاومتر بود. باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* نسبت به اسانس نعناع مقاومتر از سه اسانس دیگر بوده و نسبت به اسانس میخک هندی حساس‌تر بود. باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* نیز نسبت به اسانس زیره سبز و نعناع در مقایسه با باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* حساسیت بیشتری را نشان داده و در مقابل اسانس رزماری ضعیف‌تر از اسانس‌های دیگر بوده است و باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* بیشترین مقاومت را در مقابل اسانس نعناع با میزان حداقل غلظت بازدارندگی ۱۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر از خود نشان داد. که علت حساسیت بیشتر باکتری گرم مثبت به اسانس‌ها در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد باکتری-های گرم منفی یعنی وجود غشای خارجی سلول می‌باشد که مسئول حفاظت از باکتری‌ها در برابر تخریب غشای داخلی و یا دیواره سلولی (پپتیدوگلیکان) می‌باشد. بنابراین، غشاء خارجی باکتری‌های گرم منفی ایجاد سد انتخابی در برابر مولکول‌های خارجی می‌کند (۶) که مشابه با نتایج پژوهش Tukmechi و همکاران (۲۰۱۰) (۲۷) و علیشاهی و همکاران (۱۳۸۹) (۳) که نشان دادند باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* حساس ترین و باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* مقاومترین باکتری در برابر عصاره‌های مورد بررسی بودند. دامنه MIC اسانس میخک هندی بر باکتری‌های مورد مطالعه ۱/۵۶ mg/ml به دست آمد که کمتر از مقدار به دست آمده توسط پژوهش Lopez و همکاران (۲۰۰۵) بود و میزان MIC این اسانس بر باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* (*Listeria monocytogenes*)، *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*) و باکتری‌های گرم منفی *اشرشیا کلی*، *سالمونلا کلراسوئیس* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* (*Yersinia enterocolitica*) بین ۱۷/۵ تا ۱۳۱ میلی گرم در میلی لیتر به دست آمده است (۱۷). Fu و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که میزان MIC این اسانس بر پاتوژن‌های انسانی شامل باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* بین ۰/۶۲mg/ml تا ۵ می‌باشد (۱۱) که مطابق با نتیجه پژوهش حاضر است. دامنه MIC اسانس رزماری بر باکتری‌های مورد مطالعه ۶/۲۵ mg/ml به دست آمد که بیشتر از مقدار به دست آمده در پژوهش Genena و همکاران (۲۰۰۸) که نشان دادند دامنه MIC این اسانس بر باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* بین ۰/۱۲۵ تا ۱ میلی گرم در میلی لیتر بوده است (۱۲). درخشان و همکاران (۱۳۸۹) نشان دادند که اسانس زیره سبز دارای فعالیت ضدباکتریایی خوبی بر باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *ویبریو کلرا* (*Vibrio chlorae*) بوده که به دلیل حضور

میزان بالای کومین آلدهید (حدود ۲۵ درصد) در اسانس این گیاه می‌باشد (۱) که مطابق با نتایج به دست آمده این پژوهش است. در مطالعه Sokovic و همکاران (۲۰۰۷)، اسانس نعناع دارای خواص ضدباکتریایی بر باکتری‌های مورد مطالعه با دامنه MIC ۱ تا ۳ میکروگرم در میلی لیتر بوده (۲۳) که کمتر از مقدار به دست آمده این پژوهش می‌باشد. ترکیب تشکیل دهنده اسانس یک گونه در شرایط منطقه‌ای مختلف ممکن است اختلاف داشته باشد و این اختلافات می‌تواند ناشی از تفاوت در فصل برداشت، زمان استخراج اسانس، مناطق مختلف جغرافیایی حتی بخش‌های مختلف گیاه باشد (۷). ترکیبات مونوترپن اکسیژن دار دارای فعالیت ضدباکتریایی بالقوه بالاتر، به ویژه ترکیباتی از نوع فنل به عنوان مثال یوگنول، تیمول و کارواکرول در حالی که مونوترپن هیدروکربن پایین ترین فعالیت ضدباکتری را دارا می‌باشند (۱۶) که یوگنول با ۸۸/۵۸٪ بیشترین میزان مواد موثره را در اسانس میخک هندی به خود اختصاص داده است (۸) که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد وگویای فعالیت ضدباکتریایی قوی اسانس میخک هندی دارای ترکیب یوگنول می‌باشد همچنین مطابق با تحقیقات قبلی در مورد اثرات ضدباکتریایی قوی این اسانس بر باکتری‌های *ویبریو آلجینولیتیکوس* (*Vibrio alginolyticus*)، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشرشیا کلی* می‌باشد (۲). نتایج این پژوهش در شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*) نشان داد که همه اسانس‌ها قادر به کنترل باکتری‌های مورد مطالعه هستند ولی از بین اسانس‌ها، اسانس میخک هندی و زیره سبز دارای بیشترین تاثیر به منظور کنترل و از بین بردن باکتری‌ها بودند. بنابراین استفاده از این اسانس‌ها برای کنترل بیماری‌های باکتریایی ایجاد شده توسط این باکتری‌ها موثر بوده ولی لازم است به منظور به دست آوردن بهترین نتیجه، از این اسانس‌ها در شرایط *In vivo* استفاده شود و با جدا کردن ماده موثره آن‌ها جایگزین مناسبی برای آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده باشند.

منابع

۱. درخشان، ص.، ستاری، م.، بیگدلی، م. زارعی اسکی کند، ن. (۱۳۸۹).ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی عصاره گیاهان آرتمیزیا وزیره علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی* و *ویبریو کلرا*. *مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین*، جلد ۵۸، شماره ۱، صفحات ۱۷-۱۴.

۲. سنچولی، ن.، غفاری، م.، قرایی، احمد. (۱۳۹۱). اثرات ضدباکتری اسانس چند گونه گیاهی بر باکتری‌های *ویبریو آلجینولیتیکوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشرشیا کلی*. *مجله علمی پژوهشی پاتوبیولوژی مقایسه‌ای*. شماره۳، صفحات ۷۵۴- ۷۴۹.

۳. علیشاهی، م.، قربانپور نجف آبادی، م.، نجف زاده، ح.، پشم فروش، م. (۱۳۸۹). مطالعه اثرات برخی عصاره‌های گیاهی علیه *استرپتوکوکوس اینیایی*، *پرسینیا راکری* و *آئرومونا هیدروفیلا*. *مجله دامپزشکی ایران*، جلد ۶، شماره ۲، صفحات ۳۰-۲۱.

۴. هادی، ف.، قاسمی، م.، فائزی قاسمی، م.، عیسی زاده، خ.، حقیقی کارسیدانی، س و خارا، ح. (۱۳۹۱). شناسایی باکتری *آئرومونا هیدروفیلا* (*Aeromonas hydrophila*) جدا شده از ماهیان فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) پرورشی به روش مولکولی. *دومین کنگره ملی علوم آزمایشگاهی دامپزشکی*. دانشگاه سمنان، ۲۳-۲۲ آذر.

5. Agnew, W., Barnes, A. (2007). *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and candidate for reliable vaccination. *Veterinary Micribiology* **122**: 1-15.

6. Baron, S. (1996). *Medical Microbiology*. 4th edition, University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas, USA.

7. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential

applications in food a review. *International Journal of Food Microbiology* **94**: 223-25.

8. Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. Ben., Rouabhia, M., Mahdouani, K., Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research* **21**:501-6.
9. Cumberbatch, N., Gurwith, M.J., Langston, Sack, R.B., Brunton, J.L. (1979). Cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*: relationship of toxigenic isolates to diarrhoeal disease. *Infection and Immunity* **23**: 829-37.
10. Essman, E.J. (1984). The medical uses of herbs, *Fitoterapia* **55**: 279-89.
11. Fu, Y.J., Zu, Y.G., Chen, L.Y., Shi, X.G., Wang, Z., Sun. S. (2007). Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research* **21**: 989-94.
12. Genena, A.K., Hensei, H., Artur, Junior, S., Machado, S. and Souza, de. (2008). Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxideCampinas **28**: 463-69.
13. Gislene, G.F., Nascimento, J., Locatelli, P.C., Freita Silva, G.L. (2000). Antibacterial activity of plant extract and phytochemicals on antibiotic-Resistantbacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* **31**: 247-256.
14. Iacobellis, N.S., Cantore, P.L. Capasso, F., Senatore, F. (2005). Antibacterial activity *of Cuminum cyminum* and *Carun carvi* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 57-61.
15. Johnsona, D.B., Shringib, B.N., Patidara, D.K., Chalichema, N.S.S., Javvadia, A.K. (2011). Screening of antimicrobial activity of alcoholic & aqueous extract of some indigenous plants. *Indo-Global Journal of Pharmaceutical Sciences* **1**: 186-93.
16. Knobloch, K., Weigand, H., Weis, N., Schwarm, H.M., Vigenschow, H. (1986). *Action of Terpenoids on Energy Metabolism*. *In: Brunke EJ (Ed) Progress in Essential Oil Research, Walter de Gruyter* , Berlin, Germany, pp 429-445.
17. Lopez, P., Snchez, C., Batle, R., Nern, C. (2005). Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected food borne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 6939-46.
18. Marzouk, B., Marzouk, Z., Mastouri, M., Fenina, N., Aouni, M. (2011). Comparative evaluation of the antimicrobial activity of *Citrullus colocynthis* immature fruit and seed organic extracts. *African Journal of Biotechnology* **10**: 2130-34.
19. Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Julino, C., Boatto Tomi, F., Chessa, M. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *R. officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal* **17**: 9-15.
20. Ross, A.J., Rucker, R.R., Ewing, W.H. (1966). Description of a bacterium associated with red mouth disease of rainbow trout. *Journal of Microbiology* **12**: 763-70.
21. Rozman, T., Jersec, B. (2009). Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* against different species of *Listeria*. *Acta agriculturae Slovenica* **1**: 14-20.
22. Rucker, R. (1966). Red mouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Bulletin de L_ Office. *International Dessies Epizooties* **65**:825-30.
23. Sokovic, M., Marin, P.D., Brkic, D., Van Griensven, L.J.L.D. (2007). *Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of Ten Aromatic Plants against Human Pathogenic Bacteria*. *Food © Global Science Books* **10**: 2-11.
24. Soltani, M., Jamshidi, Sh., Sharifpour, I. (2005). *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Iran, biophysical characteristics and pathogenesis. *Bulletin of the European Association of Fish Pathogenesis* **25**: 95-106.
25. Thoroski, J., Blank, G., Biliaderis, C. (1989). Eugenol induced inhibition of

extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection* **52**: 399-403.
26. Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Haesebrouck, F., Chiers, K. (2007). *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases* **30**: 257-68.
27. Tukmechi, A., Ownag, A.Gh., Mohebbat, A. (2010). *In vitro* anti bacterial activites of ethanol extract of Iranian Propolis (EEIP) against fish pathogenic bacteria (*Aeromonas hydrophila, Yersinia ruckeri and Streptococcus Iniae*). *Brazilian Journal of Microbiology* **41**: 1086-92.
28. Wendakoon, C.N. Sakaguchi, M. (1993). Combined effect of sodium chloride and clove on growth and biogenic amine formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract. *Journal of Food Protection* **56**: 410-41.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 12, Issue 1, 2016

In Vitro Antibacterial Effects of Essential Oils on Some Fish Pathogenic Bacteria

Sanchooli, N.

Instructor, Hamoun International Wetland Research Institute, Department of Fisheries, University of Zabol, Zabol, Iran

Received Date:11 August 2015 *Accepted Date: 17 October 2015*

Abstract: *Indiscriminate use of antibiotics to treat bacterial diseases in aquaculture causes drug resistant strains of bacteria and decrease the effectiveness of drugs, in addition, due to the accumulation of antibiotics in fish and fish consumers has led. Therefore, replaced with less harmful substances, such as herbal products is necessary. in this study, antibacterial effects of essential oils of Plant, Eugenia caryophyllata, Cuminum cyminum, Rosemarinus officinalis and Mentha spicata on the Aeromonas hydrophila, Yersinia ruckeri and Streptococcus iniae bacteria is studied. To determine the minimum inhibitory concentration of essential oils, standard microdilution method (Broth Microdilution) was used and the minimum bactericidal concentration of essential oils according to their MIC values were obtained. The results showed that the essential oil of Eugenia caryophyllata compared with other oils, the stronger and has a higher inhibitory power and the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal on all of the bacteria respectively 1.56, 3.12 mg/ml were obtained. Rosemarius officinalis oil has less power compared with other oils and the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal on all of the bacteria studied respectively 6.25, 12.5 mg/ml were obtained. Gram-positive bacterium Streptococcus iniae compared with Gram-negative bacteria Aeromonas hydrophila and Yersinia Ruckeri is more sensitive to essential oils was studied. Aeromonas hydrophila bacteria showed the highest resistance to Mentha spicata oil. Acording to the results of this study, the use of Eugenia caryophyllata oil to control bacterial infections caused by strains studied are suggested.*

Keywords: *Plant oils; Antibacterial; Aeromonas hydrophyila; Yersinia ruckeri Streptococcus iniae*

**Corresponding author: Sanchooli, N.*
Address: Hamoun International Wetland Research Institute, Department of Fisheries, University of Zabol, Zabol, Iran. Tel: 05432224510
Email: sanchoolin@yahoo.com