



## بررسی اثرات ضد باکتریایی برخی از اسانس‌های گیاهان بومی کشور علیه باکتری *Streptococcus iniae* در شرایط آزمایشگاهی

رضا صفری<sup>۱</sup>، میلاد عادل<sup>۱\*</sup>، هادی منجی<sup>۲</sup>، حسین ریاحی چلیچه<sup>۲</sup>، امین نعمت الهی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>گروه بهداشت و بیماری آبزیان، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری

<sup>۲</sup>گروه بهداشت و بیماری آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد

| نوع مقاله:                 | چکیده |
|----------------------------|-------|
| پژوهشی                     |       |
| تاریخچه مقاله:             |       |
| دریافت: ۹۳/۰۳/۱۳           |       |
| اصلاح: ۹۳/۰۷/۱۶            |       |
| پذیرش: ۹۳/۰۷/۲۲            |       |
| کلمات کلیدی:               |       |
| اثرات ضدباکتری             |       |
| اسانس‌های گیاهی            |       |
| <i>Streptococcus iniae</i> |       |

باکتری *Streptococcus iniae* مهم‌ترین عامل عفونی ایجاد کننده خسارات اقتصادی در مزارع پرورشی کشور است. در این مطالعه اثر ضد باکتریایی اسانس‌های گیاهی زولنگ (*Eryngium campestre*)، اناریجه (*Pimpinella affinis*)، آویشن شیرازی (*Zataria multiflora Boiss*)، زیره سیاه (*Bunium persicum*) و سیر (*Allium sativum*) بر باکتری زئونوز استرپتوکوکوس اینیایی مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین قدرت ضد باکتریایی اسانس‌ها از روش‌های استاندارد انتشار در دیسک، تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) استفاده گردید و استرپتومایسین به عنوان استاندارد به کار گرفته شد. حداقل غلظت کشندگی اسانس‌های زولنگ، اناریجه، آویشن شیرازی، زیره سیاه و سیر بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی به ترتیب ۱،  $>1$ ، ۰/۲۵، ۰/۱۲ و ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و مقادیر حداقل بازدارندگی برای اسانس‌های مذکور به ترتیب ۰/۵، ۰/۵، ۰/۰۶، ۰/۰۶ و ۰/۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و قطر هاله رشد به ترتیب  $0.7 \pm 1.8$ ،  $1.8 \pm 0.4$ ،  $1.7 \pm 1.3$ ،  $2.2 \pm 1.1$ ،  $2.7 \pm 1.7$  میلی‌متر تعیین شد. در این بررسی اسانس‌های زیره سیاه، آویشن شیرازی و سیر اثرات ضد باکتریایی مناسبی علیه *S. iniae* از خود نشان دادند. بنابراین اسانس‌های مذکور پس از انجام مطالعات تکمیلی می‌توانند جایگزین مناسبی برای آنتی بیوتیک‌های تجاری رایج برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری باشند.

### مقدمه

بیماری استرپتوکوکوزیس ناشی از باکتری *Streptococcus iniae* سبب بروز خسارت‌های اقتصادی فراوانی به صنعت آبی‌پروری جهان گردیده است، به طوریکه این بیماری از ۲۷ گونه ماهیان آب شیرین، لب شور و شور گزارش شده است (Akhlaghi and Mahjoor, 2000). نکته مهم در مورد این باکتری این است که محدوده میزبانی این باکتری محدود به آبزیان نبوده و به عنوان یک عامل ایجاد کننده بیماری مشترک در جوامع انسانی مطرح می‌باشد (Milani et al., 2010). باکتری مذکور از افراد مبتلا به اندوکاردیت گزارش شده است و گزارشات متعددی از بروز بیماری توسط *S. iniae* در انسان با علائمی از قبیل سپتی سمی، کوری، التهاب سلولی، تهوع و مشکلات گوارشی در دست می‌باشد (Wang et al., 2007). مقاومت‌های دارویی روز افزون علیه این باکتری و افزایش دوز مصرفی داروهای متداول از یک سو و افزایش عوارض جانبی ناشی از استفاده

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: [miladadel85@yahoo.com](mailto:miladadel85@yahoo.com)

از این داروها از سوی دیگر، موجب شده است تا در سال‌های اخیر بیشترین توجه به موادی با پایه طبیعی مانند گیاهان دارویی معطوف شود که دارای حداقل اثرات سوء ذکر شده می‌باشند. آثار ضد باکتریایی اسانس یا عصاره گیاهان مختلف از قبیل پونه معطر، اکالیپتوس، رزماری، آلوئورا، سیاه دانه، پوست انار، زیتون، گلپوره و خار مریم روی باکتری *S. iniae* توسط محققین مختلف کشور مورد بررسی قرار گرفته شده است (Roomiani et al., 2013; Soltani et al., 2013).

زیره سیاه *Bunium persicum* گیاهی دو لپه، چند ساله و معطر، از خانواده چتریان (Apiaceae) می‌باشد (Moravej et al., 2009). دامنه انتشار این گیاه در ایران مربوط به استان‌های کرمان، خراسان (مشهد، سبزوار) و دامنه شرقی زاگرس می‌باشد. بذره‌های این گیاه دارای ۴ تا ۷ درصد اسانس می‌باشند که حاوی کومین آلدئید، گاما-ترپینن، پارا سیمین، بتا-پینن، آلفا-پینن، میرسن و لیمونن است (Foroumadi et al., 2002). از این گیاه معطر به منظور طعم بخشی به غذا، تسهیل کننده هضم غذا و به عنوان یک ترکیب ضد آسم و ضد سرطان، رفع کننده اسپاسم‌های معده و کاهش دهنده قند خون استفاده می‌شود (Moravej et al., 2009).

زولنگ با نام علمی *Eryngium campestre* از خانواده چتریان و از گیاهان بومی استان مازندران می‌باشد، که دارای مصرف خوراکی روزانه می‌باشد (Roomiani et al., 2013). اسانس برگ این گیاه حاوی مشتقات متیله فیل پروپانوئید، اوژنول، متیل ایزواوژنول و بنزآلدئید است. در طب سنتی از این گیاه برای درمان سیاه سرفه، عفونت‌های ادراری، افزایش ترشح ادرار و از بین بردن سنگ‌های کلیوی استفاده می‌شود (Sun et al., 2007).

آویشن شیرازی *Zataria multiflora Boiss* از تیره نعناعیان، گیاهی پایا با ارتفاع ۸۰-۴۰ سانتیمتر، دارای ساقه‌های متعدد و برگ‌های کوچک دارای دم‌برگ کوتاه، مدور یا بیضی شکل است که در ایران، افغانستان و پاکستان می‌روید (Amin et al., 2010). از این گیاه به منظور معطر کردن غذا، به عنوان یک ماده ضد عفونی کننده، ضد میکروب، بی‌حس کننده و ضد اسپاسم استفاده می‌گردد (Abcollahy et al., 2004; Moosavy et al., 2007). سرشاخه‌های روغنی آن حاوی تیمول، کارواکرول و اسید روزمارینیک می‌باشد که جزو مواد اصلی تشکیل دهنده این گیاه محسوب می‌شوند و اثرات ضد باکتری، ضد ویروسی، آنتی اکسیدانی و ضد التهابی آن‌ها به اثبات رسیده است (Moosavy et al., 2007).

اناریجه با نام علمی *Pimpinella affinis* گیاهی دو ساله با ارتفاع ۱۱۰-۲۰ سانتیمتر از خانواده چتریان و از گیاهان بومی، مرکز و شمال ایران می‌باشد (Gulcin et al., 2003). در طب سنتی از این گیاه به عنوان ضد نفخ، اشتها آور، ضد عفونی کننده، ضد اسپاسم، ادرار آور، آرامبخش و افزایش دهنده ترشح شیر استفاده شده است. از جمله خواص اناریجه می‌توان به خواص آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی آن اشاره داشت (Sivam, 2001).

گیاه سیر *Allium sativum* از خانواده چتریان دارای ترکیبات متنوعی از انواع اسیدهای آمینه، مواد معدنی، ویتامین‌ها، فلاونوئیدها، ترکیبات فرار و غیرفرار با ارزش دارویی و درمانی قابل توجه است (Tabanca et al., 2007). اسانس سیر مایع قهوه‌ای مایل به زرد با خواص ضد میکروبی و قارچی، بهبود دهنده شاخص‌های تغذیه‌ای، رشد و محرک سیستم ایمنی و دارای اثرات آنتی اکسیدانی و متعادل کننده فشار خون می‌باشد (Whitemore and Naidu, 2000; Abd-Elallatif and Ebraheem, 1996).

این مطالعه به منظور بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی زیره سیاه، زولنگ، آویشن شیرازی، اناریجه، و سیر بر باکتری *S. iniae* در مقایسه با داروی شیمیایی استرپتومایسین صورت گرفت.

## مواد و روش‌ها

### تهیه و آماده سازی اسانس‌های گیاهی

در این مطالعه ۱۰۰ گرم از قسمت‌های هوایی گیاهان پس از جمع آوری از رویشگاه‌های طبیعی در استان مازندران (اناریجه و زولنگ)، خراسان (زیره سیاه) و فارس (آویشن شیرازی) و پس از تایید توسط بخش گیاه‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه ساری (جدول ۱)، در محیط خشک و تاریک (به دور از نور خورشید) و در جریان هوا خشک شد و سپس آسیاب و به صورت پودر در آمد. پودر به دست آمده در بالن یک لیتری ریخته شده و به آن ۶۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل افزوده شد. اسانس‌ها

با استفاده از دستگاه کلونجر (Clevenger) استخراج و توسط فیلتر استریل (۰/۴ میکرومتر) صاف و تا زمان استفاده در یخچال (دمای ۴ درجه سانتیگراد) نگهداری شدند (Sivam, 2001). در این مطالعه اسانس سیر به صورت آماده از شرکت باریج اسانس کاشان با درصد خلوص ۹۹٪ خریداری گردید.

جدول ۱. مشخصات اسانس‌های گیاهی مورد استفاده در این مطالعه

| اسانس        | نام علمی                        | خانواده   | بخش‌های مورد استفاده | ترکیبات اصلی  |
|--------------|---------------------------------|-----------|----------------------|---|
| زیره سیاه    | <i>Bunium persicum</i>          | Apiaceae  | بذر                  | کومین آلدئید، گاما- ترپینن، پارا سیمین، بتا- پینن، آلفا- پینن، میرسن و لیمونن |
| زولنگ        | <i>Eryngium campestre</i> L.    | Apiaceae  | بخش هوایی            | فلاونوئید، فنیل پروپانوئید، اوژنول، متیل ایزواوژنول و بنزالدهید               |
| آویشن شیرازی | <i>Zataria multiflora</i> Boiss | Lamiaceae | بخش هوایی            | تیمول، کارواکرول  |
| اناریچه      | <i>Pimpinella affinis</i> L.    | Apiaceae  | بخش هوایی            | لیمونن، جیجرین و جرماسرین دی  |
| سیر          | <i>Allium sativum</i>           | Alliaceae | میوه                 | آلیسین، تری سولفید، دی-۲- پروپینیل  |

### سنجش ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌های گیاهی

آنالیز اسانس‌ها توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی انجام شد. برنامه دمایی مورد استفاده در دستگاه GC/MS شامل: ۵ دقیقه در دمای 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 بود. دمای اتاق تزریق ۲۹۰ درجه سانتیگراد و سرعت گاز هلیوم ۰/۸ میلی متر در دقیقه بود. دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتیگراد و میزان انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت بود (Roomiani et al., 2013; Soltani et al., 2013).

### بررسی قدرت ضد باکتریایی اسانس‌های گیاهی به روش انتشار در دیسک

برای انجام مطالعات خواص ضد باکتریایی اسانس‌ها از باکتری استرپتوکوکوس اینیایی LMG 14520 استفاده شد. برای مطالعه فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های زیره سیاه، زولنگ، آویشن شیرازی، اناریچه و سیر از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. به این منظور ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری (حاوی  $10^7$  باکتری) بر روی محیط ژلوز خون کشت داده شد. سپس، ۱۰ میکرولیتر از اسانس‌های رقیق نشده به دیسک‌های بلانک (قطر ۶ میلی‌متر) اضافه شده و دیسک‌ها بر روی محیط کشت باکتری قرار داده شدند (Roomiani et al., 2013; Soltani et al., 2013). در این مطالعه، از دیسک استرپتوماپسین (۱۰ میکروگرم) برای کنترل مثبت استفاده شد. همچنین به عنوان کنترل منفی، ۵ میکرولیتر DMSO ۴٪ به دیسک‌های فیلتر اضافه شده و سپس در دمای ۲۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. پس از گذشت این زمان قطر هاله‌ی عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه گیری شد (۳ تکرار برای هر اسانس در نظر گرفته شد).

### تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC)

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد هر یک از اسانس‌ها از روش ماکرودایلوژن استفاده گردید. به این منظور ابتدا رقت متوالی از اسانس‌ها در لوله‌های ونوجکت حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت TSB (تریپتوس سوی براث) و ۴ درصد DMSO قرار داده شد. رقت‌های تهیه شده شامل ۰/۰۱۷، ۰/۰۳۵، ۰/۰۰۷، ۰/۰۱۵، ۰/۰۳، ۰/۰۶، ۰/۰۱۲، ۰/۰۲۵، ۰/۰۵ و ۱ (میکرولیتر/ میلی لیتر) بود. از کشت ۴۸ ساعته، سوسپانسیون باکتریایی با تراکم  $10^7$  تهیه و به میزان ۱۰ میکرولیتر به هر یک از رقت‌ها اضافه گردید. سپس محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرما گذاری شد. گروه کنترل در این آزمایش

شامل کنترل مثبت (محیط کشت فاقد اسانس، حاوی DMSO و باکتری) و کنترل منفی (محیط کشت با رقت متوالی اسانس و فاقد باکتری) نیز لحاظ شد. پس از ۲۴ ساعت، کمترین غلظتی از اسانس که در آن کدورت مشاهده نشد به عنوان MIC در نظر گرفته شد. از رقت های MIC و بیشتر از آن به میزان ۱۰ میکرولیتر روی محیط زلوز خون در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد و کمترین غلظتی که در آن هیچ کلنی باکتری رشد نکرد به عنوان MBC لحاظ شد (Soltani et al., 2013). مقایسه آماری داده‌ها بر اساس آزمون t-test و در سطح احتمال ۵ درصد تعیین گردید ( $P < 0.05$ ).

## نتایج

غلظت اسانس‌های زولنگ، اناریجه، آویشن شیرازی، زیره سیاه و سیر به ترتیب ۲۳، ۲۶، ۲۷، ۲۸ و ۲۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تعیین شد. بر اساس نتایج حاصل از آنالیز اسانس های گیاهی، بورتیل استات (۰.۱۷/۹)، کارواکرول (۰.۶۰/۳)، آلفا-کومین آلدئید (۰.۱۶/۷)، جیجرین (Geijerene، ۰.۱۵/۷)، و آلیسین (۰.۳۸/۷) به ترتیب بیشترین ترکیب تشکیل دهنده اسانس‌های زولنگ، آویشن شیرازی و زیره سیاه حاوی ۳۳ ترکیب، اناریجه دارای ۳۸ ترکیب و سیر حاوی ۲۷ ترکیب بودند. غلظت اسانس‌های زولنگ، اناریجه، آویشن شیرازی، زیره سیاه و سیر به ترتیب ۲۳، ۲۶، ۲۷، ۲۸ و ۲۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تعیین شد. نتایج این مطالعه نشان دهنده اثرات ضد باکتریایی مناسب برخی از اسانس‌های مورد استفاده روی باکتری *S. iniae* بود، به طوریکه این اثر قابل مقایسه با آنتی بیوتیک رایج مورد استفاده بر علیه این باکتری می‌باشد. نتایج اندازه گیری قطر هاله مهاري نشان داد که قطر هاله مهاري استرپتومایسین  $0.4 \pm 16/9$  میلی‌متر و اسانس‌های زولنگ، اناریجه، زیره سیاه، آویشن شیرازی و سیر به ترتیب  $0.7 \pm 18/5$ ،  $0.4 \pm 17$ ،  $0.3 \pm 32/8$ ،  $1/1 \pm 22/8$ ،  $1/7 \pm 27/3$  میلی‌متر تعیین شد (جدول ۲). بر اساس نتایج، اندازه هاله‌ی عدم رشد *S. iniae* تحت تاثیر اسانس‌های زیره سیاه، آویشن شیرازی و سیر به طور معناداری در سطح بالاتری بیشتر از استرپتومایسین بود ( $P < 0.05$ ). از طرف دیگر اندازه هاله ی عدم رشد این باکتری تحت تاثیر اسانس‌های اناریجه و زولنگ در سطوح نزدیک به استرپتومایسین بود و اختلاف معناداری بین آنها مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). از سوی دیگر DMSO ۴٪ اضافه شده به دیسک‌های فیلتر (به عنوان کنترل منفی) سبب مهار رشد باکتری نشد. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که محدوده MIC اسانس‌های مورد مطالعه بین ۰/۵-۰/۰۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار داشت (جدول ۲). MIC اسانس زولنگ و اناریجه برای *S. iniae* ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، برای آویشن شیرازی و زیره سیاه ۰/۰۶ و برای سیر نیز ۰/۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. همچنین مقادیر MBC برای اسانس‌های زولنگ، اناریجه، آویشن شیرازی، زیره سیاه و سیر به ترتیب ۱،  $> 1$ ، ۰/۲۵، ۰/۱۲ و ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. این در حالی است که مقدار MIC و MBC استرپتومایسین برای این باکتری به ترتیب ۰/۵ و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد (جدول ۲).

جدول ۲. فعالیت ضد باکتریایی اسانس‌های گیاهی بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در شرایط آزمایشگاهی

| اسانس        | میزان MIC<br>μg/ml | میزان<br>MBC<br>μg/ml | کنترل منفی<br>(DMSO/۴) | میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد<br>(میلی‌متر) | کنترل مثبت            | اسانس |
|--------------|--------------------|-----------------------|------------------------|--|-----------------------|-------|
| زولنگ        | ۰/۵                | ۱                     | -                      | <sup>a</sup> ۱۸/۵±۰/۷                    | <sup>a</sup> ۱۶/۹±۰/۲ | اسانس |
| اناریجه      | ۰/۵                | >۱                    | -                      | <sup>a</sup> ۱۷/۰±۰/۳                    | <sup>a</sup> ۱۷/۰±۰/۳ | اسانس |
| زیره سیاه    | ۰/۰۶               | ۰/۱۲                  | -                      | <sup>b</sup> ۳۲/۸±۱/۳                    | <sup>a</sup> ۱۶/۹±۰/۲ | اسانس |
| سیر          | ۰/۱۲               | ۰/۵                   | -                      | <sup>b</sup> ۲۲/۲±۱/۱                    | <sup>a</sup> ۱۷/۱±۰/۲ | اسانس |
| آویشن شیرازی | ۰/۰۶               | ۰/۲۵                  | -                      | <sup>b</sup> ۲۷/۳±۱/۷                    | <sup>a</sup> ۱۶/۸±۰/۱ | اسانس |

اعدادی که در هر ردیف با حروف متفاوت مشخص شده اند، نشان دهنده اختلاف معناداری در سطح ۰/۰۵ درصد می‌باشند ( $P < 0.05$ )

## بحث

باکتری *S. iniae* به عنوان یکی از مهمترین باکتری‌های صنعت پرورش آبزیان کشور مطرح می‌باشد. از آنجایی که این باکتری توانایی ایجاد بیماری در انسان و ایجاد عوارض متعددی را داراست، بنابراین لزوم توجه و اتخاذ سیاست‌های موثر و عملی برای کنترل این باکتری بیش از پیش احساس می‌شود (Milani et al., 2010). مقاومت دارویی میکروارگانیسم‌ها که حاصل مصرف بی‌رویه داروها، خود درمانی و تجویز دارو توسط افراد غیر متخصص است یکی از معضلات مهم جامعه آبی پروری کشور می‌باشد. مقاومت دارویی منجر به افزایش مرگ و میر، ناتوانی و افزایش هزینه‌های مراقبت بهداشتی می‌شود که پیشگیری از بروز مقاومت و انتشار میکروارگانیسم مقاوم می‌تواند منجر به کاهش اثرات زیان آور و هزینه‌های وابسته به آنها شود (Wang et al., 2007). عدم موفقیت در درمان بسیاری از بیماری‌های مزمن و حاد، اثرات جانبی مضر داروهای شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومت روزافزون میکروارگانیسم‌های مختلف از جمله *S. iniae* در برابر بسیاری از داروها به ویژه آنتی‌بیوتیک‌ها گرایش محققین را نسبت به مطالعه در زمینه استفاده از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی به دلیل تاثیرگذاری بهتر و عوارض جانبی کمتر در صنعت تکثیر و پرورش کشور افزایش داده است (Soltani et al., 2013). خاصیت ضد میکروبی گیاهان عموماً به دلیل وجود ترکیبات فنلی، ساپونین، تانن و فلاونوئیدهای موجود در ساختارهای آنها می‌باشد که با تاثیر بر روی غشای پلاسمایی و سلولی میکروارگانیسم‌ها و یا با مهار آنزیم‌های ساختاری غشای سلولی آنها خاصیت ضد میکروبی خود را اعمال می‌نمایند (Soltani et al., 2013).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که در بین پنج اسانس گیاهی مورد مطالعه، اسانس زیره سیاه بیشترین اثر مهارکنندگی باکتری *S. iniae* را با قطر هاله بازدارندگی  $3/1 \pm 2/8$  میلی‌متر داشته است. نتایج بررسی Syed و همکاران (۱۹۸۵) نیز تأییدکننده اثرات ضد میکروبی قابل توجه این گیاه بر علیه باکتری‌های گرم مثبت *Staphylococcus aureus* و *Staphylococcus epidermidis* با قطر هاله بازدارندگی رشد ۳۲ و ۲۹ میلی‌متر) و باکتری‌های گرم منفی *Shigella flexner*، *Klebsiella pneumoniae*، *Serratia Marcescens* و *Escherichia coli*، با قطر هاله بازدارندگی رشد به ترتیب ۳۰، ۲۴، ۲۱، ۲۰ و ۲۸ میلی‌متر بوده است. علاوه بر آن مطالعه صورت گرفته توسط Ranjbaran و همکاران (۲۰۰۵) نیز مؤید اثرات ضد میکروبی قابل توجه اسانس زیره سیاه بر روی ۸ باکتری گرم مثبت و منفی بود، به طوریکه بیشترین میزان مهارکنندگی و کشندگی بر روی اشریشیاکلای دیده شد. بررسی‌های صورت گرفته نشان دهنده آن است که اثر ضد میکروبی اسانس زیره سیاه بیشتر در ارتباط با حضور ترکیبات تریپونین و کومین آلدئیدی آن است (Zargari, 1997).

نتایج آزمایشگاهی این مطالعه نشان داد که اسانس آویشن شیرازی پس از زیره سیاه، دارای خاصیت ضد باکتری مناسبی روی باکتری بیماریزای استرپتوکوکوس اینیایی بوده است. به طوریکه حداقل غلظت کشندگی آن ۰/۰۶ میکروگرم در میلی‌لیتر، حداقل MBC ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و هاله ی عدم رشد در محدوده ۲۷-۲۹ میلی‌متر بوده است. در مطالعات صورت گرفته قبلی، اثرات ضد میکروبی عصاره یا اسانس آویشن شیرازی بر روی تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی از قبیل *S. aureus*، *Bacillus cereus*، *Escherichia coli*، *Salmonella typhi*، *Sh. flexneri*، *Proteus vulgaris* مشخص شده است (Fazeli et al., 2007; Misaghi and Akhundzadeh Basti, 2007). مطالعه Alishahi و همکاران (۲۰۱۰) نشان دهنده قدرت ضد باکتری مناسب عصاره الکلی آویشن شیرازی بر روی باکتری‌های بیماریزای *Aeromonas hydrophila*، *Yersinia ruckeri* و استرپتوکوکوس اینیایی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. در این مطالعه، محدوده MBC و MIC به ترتیب ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تعیین شد که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر نزدیکی و مشابهت دارد. در مجموع، خاصیت ضد میکروبی آویشن شیرازی بیشتر به دلیل حضور ترکیبات تیمول و کارواکرول آن می‌باشد، که موجب افزایش نفوذ پذیری و از هم گسستگی دیواره سلولی باکتری و در نهایت تخلیه محتویات و مواد داخل سلولی آن می‌گردد (Moosavy et al., 2007).

در مطالعه حاضر، قطر هاله بازدارندگی رشد اسانس سیر برای استرپتوکوکوس اینیایی  $1/1 \pm 2/2$  میلی‌متر تعیین شد، که از قدرت باکتری کشی کمتری نسبت به اسانس‌های زیره سیاه و آویشن شیرازی برخوردار بود ولی تفاوت معناداری را با داروی استرپتومايسين نشان داد ( $P < 0/05$ ). مهمترین جزء موثر سیر ترکیب آلی سولفورداری به نام آلیسین (Allicin) می‌باشد که

خواص ضد میکروبی این گیاه بر روی قارچ‌ها، انگل‌ها و باکتری‌ها از جمله استرپتوکوکوس اینیایی به آن نسبت داده می‌شود (Harris et al., 2001). بررسی Hussein و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که گیاه سیر دارای اثرات ضد باکتریایی قوی بر علیه باکتری استرپتوکوکوس اینیایی و گونه‌های *Aeromonas sp.* در ماهی نیل تیلاپیا می‌باشد، که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر همخوانی دارد. در مطالعه مذکور میزان MIC برای استرپتوکوکوس اینیایی ۶۳ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای گونه‌های *Aeromonas* ۲۵۰-۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد، این در حالی است که در مطالعه حاضر میزان MIC این اسانس برای استرپتوکوکوس اینیایی ۰/۱۲ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد. همچنین، میزان MIC عصاره آبی گیاه سیر برای *Aeromonas* ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر (Pachanawan et al., 2008) و برای *Streptococcus agalactiae* در ماهی هیبرید تیلاپیا قرمز ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر تعیین شد (Alsaid et al., 2010).

پس از اسانس آویشن شیرازی، اسانس زولنگ دارای خاصیت ضد باکتری نسبتاً مناسبی نسبت به اسانس اناریجه روی استرپتوکوکوس اینیایی بود. آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس زولنگ نشان داد که اسانس تهیه شده از بخش‌های هوایی آن دارای مقادیر قابل توجه لیمونن (Limonene) و بورنیل استات (Bornyl acetate) بوده که خواص ضد میکروبی این اسانس را می‌توان به این ترکیبات نسبت داد (Tabanca et al., 2007). در مطالعه حاضر مقادیر MIC اسانس زولنگ برای استرپتوکوکوس اینیایی ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد، این در حالی است که این مقدار در گونه *Eryngium bungei* برای باکتری‌های *Streptococcus pyogenes* و *S. agalactiae* به ترتیب ۱۲/۵ و ۵۰ میلی گرم در میلی‌لیتر و در گونه *E. caucaseum* برای باکتری‌های *S. pyogenes* و *Streptococcus sanguinis* ۵۰ میلی گرم در میلی‌لیتر به دست آمد (Alipour Khanmohammadi, 2011). در لهستان مقدار MIC زولنگ (*E. campestre*) برای باکتری *S. aureus* و *Bacillus subtilis* ۱۹۰۰ و ۱۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد (Thiem et al., 2010)، که نشان دهنده قدرت باکتری‌کشی نسبتاً ضعیف این گیاه بوده و با مطالعه حاضر همخوانی دارد. تفاوت مشاهده شده در مقادیر MIC گونه‌های مختلف زولنگ ممکن است مرتبط با ترکیبات تشکیل دهنده متفاوت اسانس‌های گیاهی بر حسب منطقه جغرافیایی رویش، گونه گیاه، سن گیاه در هنگام تهیه اسانس، شرایط محیطی و فصلی، زمان برداشت، روش خشک کردن و استخراج اسانس یا عصاره، نوع اندام مورد اسانس‌گیری، تفاوت ژنتیکی و در نهایت متفاوت بودن سویه‌های میکروبی مورد مطالعه باشد (Sivam, 2001).

نتایج بررسی حاضر نشان داد که اسانس اناریجه دارای کمترین اثر مهارکنندگی رشد روی استرپتوکوکوس اینیایی در بین اسانس‌های مورد مطالعه بود. مقدار MIC اناریجه برای استرپتوکوکوس اینیایی ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد. بیشترین خواص ضد میکروبی اناریجه به حضور ترکیبات لیمونن، جیجرین (Geijerene) و جرماسرین دی (Germacrene D) نسبت داده می‌شود (Verdian-Rizi, 2008). در مطالعه صورت گرفته توسط Verdian-Rizi (۲۰۰۸) میزان MIC این اسانس برای *S. aureus* و *E. coli* به ترتیب ۶۴ و ۳۲ میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد، که در مقایسه با مطالعه حاضر از قدرت کمتری برخوردار بود، این در حالی است که نتایج این محقق نشان داد که این اسانس فاقد اثرات ضد میکروبی بر علیه باکتری مقاوم سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) بوده است.

در پایان با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، می‌توان بیان نمود که اسانس‌های گیاهان زیره سیاه، آویشن شیرازی و سیر دارای اثرات ضد باکتریایی مناسبی روی باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در شرایط *In vitro* (آزمایشگاهی) می‌باشند. لذا پیشنهاد می‌شود که مطالعات وسیع‌تر و دامنه‌دارتری در شرایط *In vivo* (بالینی) در مزارع پرورش آبزبان صورت گیرد و پس از مشخص شدن دوز مؤثر، ماده مؤثره اصلی، عامل آنتی باکتریال و مکانیسم اثر اسانس‌های زیره سیاه، آویشن شیرازی و سیر، اسانس گیاهان مذکور به عنوان مواد ضد میکروبی طبیعی و جدید به صنعت آبی پروری کشور معرفی و جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های مقاوم و داروهای شیمیایی مضر گردد.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بدین وسیله از کارکنان بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان، پژوهشکده اکولوژی خزر، که در مراحل مختلف این پژوهش همکاری نموده‌اند سپاسگزاری می‌نمایند.

## منابع

- Abcollahy, F., Ziaei, H., Shabankhani, B. 2004. Effect of essential oil of *Artemisia aucheri* Boiss and *Zataria multiflora* Boiss and *Myrtus communis* on *T. vaginalis*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2: 35-36.
- Abd-Elallatif, A., Ebraheem, K. 1996. Studies on the effects of *Hibiscus subdariffa*, *Allium sativum* and *Negella sativa* on some bacterial isolates of chickens. Egypt University Journal. 17: 245-251.
- Akhlaghi, M., Mahjoor, M. 2000. Some histopathological aspects of streptococcosis in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Bulletin of European Association of Fish Pathologists. 24: 132-136.
- Alipour, M., Khanmohammadi, O. 2011. Antibacterial activity of plant extracts against oral and skin pathogens. African Journal of Microbiology. 5(19): 2909-2911.
- Alishahi, M., Ghorbanpoor, M., Najafzadeh, H., Pashmforoosh, M. 2010. Antibacterial effects of some medical plant extracts on *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri* and *Streptococcus iniae*. Iranian Veterinary Journal. 2(27): 21-30.
- Alsaid, M., Daud, H., Bejo, S.K., Abuseliana, A. 2010. Antimicrobial activities of some culinary spice extract against *Streptococcus agalaciae* and its prophylactic uses to prevent streptococcal infection in red hybrid tilapia (*Oreochromis species*). World Journal of Fish and Marine Sciences. 2(6): 532-538.
- 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 Tropical Medicine. 439- 442.
- 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 Chemistry and Toxicology. 48: 1562-1567.
- Flamini, G., Tebano, M., Cion, P.L. 2007. Composition of the essential oils from leafy parts of the shoots, flowers and fruits of *Eryngium amethystinum* from Amiata Mount (Tuscany, Italy). Food Chemistry. 107 (2): 671 - 674.
- Foroumadi, A., Asadipour, A., Arabpour, R.F., Amanzadeh, Y. 2002. Composition of the Essential Oil of *Bunium persicum* (Boiss.) from Iran. Journal of Essential Oil Research. 14: 161-162.
- Gulcin, I., Oktay, M., Kirecc, M., Kufreviog'lu, O.I. 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. Food Chemistry. 83: 371-382.
- Harris, J.C., Cottrell, S.L., Plummer, S., Llyod, D. 2001. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). Applied Microbiology and Biotechnology. 57(3): 282-286.
- Hussein, M.M.A., Hamdy Hassan, W., Ibrahim Moussa, M. 2013. Potential use of allicin (garlic, *Allium sativum* Linn, essential oil) against fish pathogenic bacteria and its safety for monosex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Food Agriculture and Environment. 11(1): 696 - 699.
- Milani, C.J.E., Aziz, R.K., Locke, J.B., Dahesh, S., Nizet, N., Buchanan, J.T. 2010. The novel polysaccharide deacetylase homologue Pdi contributes to virulence of the aquatic pathogen *Streptococcus iniae*. Microbiology. 156: 543-554.
- 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.
- Moosavy, M.H., Akhundzadeh Basri, A., Misaghi, A., Zahraei Saleh, T., Abbasifar, R., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., Alipour, M., Emami Razavi, 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.

- Moravej, G.H., Shahraki, Z., Azizi Arani, M., Yaghmaie, F. 2009. Fumigant Toxicity of *Bunium persicum* Boiss. Umbelliferae and *Elletaria cardamomum* Maton. Oils against *Tribolium castaneum*. Journal of Plant Protection. 23: 96-105.
- Pachanawan, A., Phumkhachorn, P., Rattanachaikunsopon, P. 2008. Potential of *Psidium guajava* supplemented fish diets in controlling *Aeromonas hydrophila* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Biotechnology. 5: 419-424.
- Ranjbaran, P., Sadeghian, S., Shirazi, M.H., Sarraf-Nejad, A., Fazeli, M.R., Amin, G.H. 2005. Antibacterial effects of *Cinnamon verum*, *Bunium persicum*, *Foeniculum vulgare* and *Anethum graveolens* extracts on *Helicobacter pylori* via disk diffusion and flow cytometry. Journal of Hamedan University of Medical Sciences. 33(3): 42-47.
- Roomiani, L., Soltani, M., Akhondzadeh Basti, A., Mahmoodi, A., Taheri Mirghaed, A., Yadollahi, F. 2013. Evaluation of the chemical composition and in vitro antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis*, *Zataria multiflora*, *Anethum graveolens* and *Eucalyptus globulus* against *Streptococcus iniae*; the cause of zoonotic disease in farmed fish. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 12(3): 702- 716.
- Sivam, G.P. 2001. Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as supplement. American Society of Nutrition Sciences. 131: 1106 -1108.
- Soltani, M., Ghodratnama, M., Taheri Mirghaed, A., Zargar, A., Rooholahi, Sh. 2013. The effect of *Zataria multiflora* Boiss and *Rosmarinus officinalis* essential oil on *Streptococcus iniae* isolated from Rainbow trout farms. Journal of Veterinary Microbiology. 9(1): 1-11.
- Sun, T., Xu, Z., Wu, C.T., Janes, M., Prinyawiwatkul, W., NO, H.K. 2007. Antioxidant Activities of Different Colored Sweet Bell Peppers (*Capsicum annuum* L.). Journal of Food Sciences. 72: 98 - 102.
- Syed, M., Hanif, M. 1985. Antimicrobial activity of the essential oil of the umbelliferae family part 1. *Cuminum cyminum*, *Coriandrum sativum*, *Foeniculum vulgare* and *Bunium persicum* oils. Paknist Journal of Scientific Industrial Research. 55:116-120.
- Tabanca, N., Ma, G., Pasco, D.S., Bedir, E., Kirimer, N., Husnu, K. 2007. Effect of Essential Oils and Isolated Compounds from *Pimpinella* Species on NF-B: A Target for Anti-inflammatory Therapy. Phytotherapical Research. 21: 741-745.
- Thiem, B., Goślińska, O., Kikowska, M., Budzianowski, J. 2010. Antimicrobial activity of three *Eryngium* L. species (*Apiaceae*). Herbal Polonica. 56(4): 52-58.
- Verdian-Rizi, M. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of *Pimpinella affinis* Ledeb. Essential oil growing in Iran. Research Journal of Biology Sciences. 3(8): 913-915.
- Wang, C.Y.C., Shie, H.S., Chen, S.C., Hung, J.P., Hsie, H.T.C., Wen, F.C., Wu, D. 2007. *Lactococcus garvieae* infections in human: possible association with aquaculture outbreaks. International Journal of Clinical Practice. 61(1): 68-73.
- Whitemore, A., Naidu, A.S. 2000. Thiosulfinates. In: Naidu, A.S., Natural Food Antimicrobial System. 3<sup>rd</sup> edition. Harpercollins College Div. 265 p.
- Zargari, A. 1997. Handbook of Medical Plants. 6<sup>th</sup> edition. University of Tehran Press, Iran. 128 p.