بررسی *in vitro* فعالیت ضد باکتریایی عصاره و نانوعصاره مرزنگوش (*Origanum vulgare*) در مقایسه با فلورفنیکل و نانوفلورفنیکل بر ضد استرپتوکوکوس اینیایی (*Streptococcus iniae*)

مسعود حقیقی[1*]، سید محمد اسماعیل فخار زاده[1]، سلطنت نجار لشگری[1]، بهنام پور مولایی[2]

*Email: masoud126@yahoo.com

۱- مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تنکابن،ایران
۲- دپارتمان دامپزشکی علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۶

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد باکتری عصاره آبی- الکلی سرشاخه‌های گیاه مرزنگوش و نانو عصاره آن روی باکتری استرپتوکوکوس اینیایی، *Streptococcus iniae*، عامل استرپتوکوکوزیس در ماهیان و مقایسه آن با اثر فلورفنیکل و نانو فلورفنیکل بود. نتایج نشان داد که غلظت مهار رشد و کشندگی با عصاره مرزنگوش ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود، در حالی که غلظت مهار رشد نانو عصاره مرزنگوش، ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و غلظت کشندگی آن ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. این نتایج نشان می‌دهد که اثر مهار رشد و باکتری‌کشی عصاره مرزنگوش ضعیف‌تر از نانو عصاره مرزنگوش بود. غلظت مهار رشد و باکتری‌کشی فلورفنیکل ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. غلظت مهار رشد نانوفلورفنیکل ۰/۶۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و غلظت باکتری‌کشی آن ۱/۲۵ میکروگرم در میلیلیتر بود. نتایج نشان دادند که اندازه قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی با عصاره مرزنگوش، ۰/۶±۲۱/۷ میلی‌متر، با نانو عصاره مرزنگوش، ۰/۷±۲۶/۰۶ میلی‌متر، با فلورفنیکل، ۰/۴±۳۱/۶۳ میلی‌متر و با نانو فلورفنیکل ۱/۱±۳۲/۸۰ میلی‌متر بود. در مجموع، نتایج این تحقیق نشان می‌دهند که عصاره مرزنگوش دارای اثر ضد باکتری است، ولی اثر ضد باکتریایی آن ضعیف‌تر از نانو عصاره مرزنگوش و نیز دو داروی فلورفنیکل و نانو فلورفنیکل است. در تحقیق حاضر، نانو فلورفنیکل بیشترین اثر را در کنترل عفونت استرپتوکوکوس اینیایی نشان داد و این مواد می‌توانند مبنای پایش گونه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها قرار گیرند.

کلمات کلیدی: عصاره مرزنگوش، فلورفنیکل، استرپتوکوکوس اینیایی، قزل‌آلای رنگین‌کمان، نانو

* نویسنده مسئول

مقدمه

حضور پاتوژن های بیماری زا نه تنها تهدیدی برای صنعت آبزی‌پروری است، بلکه می‌تواند موجب مسمومیت‌های غذایی در انسان شوند. آنتی‌بیوتیک های محرک رشد و مکمل‌های غذایی نقش مهمی در تولید، رشد و سلامت آبزیان ایفاء می‌کنند. ولی مصرف بیش از حد و اشتباه آنتی‌بیوتیک ها موجب باقی مانده دارویی در فرآورده‌های غذایی حاصل از آبزیان خوراکی و ظهور سویه‌های میکروبی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها می شود. امروزه به دلیل افزایش مقاومت میکروبی و هزینه‌های سنگین درمان بیماری ها و نیز محدودیت استفاده از داروها در صنعت آبزی‌پروری جهت تولید فرآورده‌های غذایی عاری از دارو، محققین به دنبال ترکیبات طبیعی و گیاهی هستند که بتوانند از آن ها به عنوان جایگزین مناسب آنتی‌بیوتیک های صناعی در رژیم غذایی آبزیان استفاده کنند. تحقیقات نشان داده است که افزودن گیاهان دارویی به رژیم غذایی آبزیان موجب تعدیل میکروفلور روده‌ای آنان می شود (Velmurugan and Citarasu, 2010). ثابت شده است که برخی از فرآورده‌های گیاهی (اسانس ها و عصاره‌ها) دارای اثرات بیولوژیک و فارماکولوژیک متعددی هستند (Bent, 2008; Gue *et al*., 2014; Haghighi *et al*., 2017) و نیز تعدادی اثرات ضد عفونی و ضد میکروبی دارند (Velmurugan and Citarasu, 2010; Madhuri *et al*., 2012; Pannu *et al*., 2014؛ عزیزی و همکاران، ۱۳۹۶؛ بازاری مقدم و همکاران، ۱۳۹۵). تاکنون محققین مختلفی اثر ضد میکروبی فرآورده‌های گیاهی را بررسی نموده‌اند. تحقیقات نشان می‌دهد که تیمول و کارواکرول موجود در فرآورده‌های گیاهی مانند آویشن، مرزنگوش و دارچین دارای اثرات ضد باکتریایی هستند (Helander *et al*., 1998). گیاه مرزنگوش از خانواده لامیاسه Lamiaceae، تیره نعنا Labiatae با نام علمی *Origanum Vulgare* L و نام انگلیسی Wild marjoram و Oregano marjoram و نام‌های فارسی مرزنگوش، مرزنجوش، آویشن کوهی، پونه کوهی، و نام های عربی فودنج جبلی، صعتر می‌باشد. این گیاه به دلیل داشتن عطر خاص و کیفیت آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریایی در دنیا شناخته شده است. در ایران، سه گونه مرزنگوش به حالت وحشی با نام های *Origanum vulgare* L.، *Origanum Strobilaceum* و *Origanum viride* Boiss انتشار دارند (قهرمان، ۱۳۸۳). مرزنگوش وحشی حاوی تانن، صمغ، اسانس روغنی فرار، ماده تلخ، تیمول، کارواکرول، گلوکوزید و سابونوزید است (Koukoulitsa *et al*., 2006; Prathyusha *et al*., 2009; Gottumukkala Venkateswara *et al*., 2011) که از آنها در ترکیبات جوشانده های ضد سرفه استفاده می‌شوند. مواد اصلی این گیاه تیمول و کارواکرول هستند که خواص آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریایی دارند (Drãgan *et al*., 2008).

استرپتوکوکوس اینیایی باکتری گرم مثبت کروی شکل، متعلق به جنس استرپتوکوک است. این باکتری غیر متحرک، کاتالاز منفی و بدون اسپور است (Plumb, 1999). تاکنون گزارش شده است که ۲۷ گونه از ماهیان پرورشی از جمله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مستعد به عفونت استرپتوکوکوس اینیایی می باشند (Agnew and Barnes, 2007). این بیماری به شکل مننگو آنسفالیت، سپتی سمی و ضایعات پوستی تظاهر می‌نماید.

فلورفنیکل آنتی‌بیوتیک وسیع الطیفی است که از طریق اتصال به تحت واحد 50S ریبوزوم باکتری عمل می‌کند و در نتیجه از ساخت پروتئین باکتریایی جلوگیری می‌کند (Plumb, 1999). ثابت شده است که فلورفنیکل بر علیه استرپتوکوکوس اینیایی گونه های زیادی از ماهیان مؤثر است (Bowker *et al*., 2010; Darwish, 2010; Gaunt *et al*., 2010). هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد باکتری عصاره آبی-الکلی سرشاخه‌های گیاه مرزنگوش روی باکتری استرپتوکوکوس اینیایی، (*Streptococcus iniae*)، عامل استرپتوکوکوزیس ماهیان و مقایسه آن با نانو عصاره مرزنگوش، فلورفنیکل و نانو فلورفنیکل بود.

مواد و روش کار

گیاه مرزنگوش پس از شناسایی و تعیین گونه جمع‌آوری و خشک گردید و در شرکت کشت و صنعت سها جیسا عصاره‌گیری آبی-الکلی با اتانول۸۰% انجام شد. عصاره

تغلیظ شده حاصله به پودر تبدیل گردید. اجزای عمده عصاره مرزنگوش با استفاده از روش کروماتوگرافی گاز مشخص شد (جدول ۱). پودر عصاره مرزنگوش و نیز پودر ۷۳۳۶۰ داروی فلورفنیکل به دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی زنجان ارسال گردید و بر اساس ثبت اختراع شماره حمیدی و همکاران (۱۳۹۰) به نانو پودر عصاره مرزنگوش و نانو فلورفنیکل تبدیل گردید.

جدول ۱: اجزای عمده تشکیل دهنده عصاره مرزنگوش

Table 1: Major components of *Origanum vulgare* extract

نوع ماده	درصد
کارواکرول (Carvacrol)	۵۵/۶
تیمول (Thymol)	۱/۱
پی سیمن (p-Cymene)	۱۲/۶
ترپینن (Terpinene)	۳/۶
ترپینولن (Terpinolene)	۳/۲

فعال سازی سوش میکروبی

در این مطالعه از سوش میکروبی استرپتوکوکوس اینیایی جدا شده از ماهی قزل آلای رنگین کمان مبتلا به استرپتوکوکوزیس استفاده شد. جهت فعال‌سازی سوش میکروبی، سوسپانسیون میکروبی به صورت تازه تهیه گردید. برای انجام این عمل ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش، مقدار ۱ میلی‌لیتر محیط کشت خالص نوترینت براث (کمپانی مرک آلمان) به داخل ویال لیوفیلیزه باکتری تزریق و سپس ویال برای مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور یخچال دار در دمای ۳۷ درجه ساتتی گراد قرار داده شد. سپس به وسیله میکروسمپلر مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول داخل ویال برداشته و در لوله آزمایش حاوی نوترینت براث کشت داده شد و برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد. پس از آن کدورت آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و با استفاده از محلول فیزیولوژی استریل کدورت آن با کدورت لوله استاندارد ۰/۵ مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ واحد کلنی در میلی-لیتر) تنظیم گردید و تا زمان مصرف در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Alizadeh Behbahani *et al*., 2013)

تعیین حداقل غلظت مهار رشد(MIC) [1] و حداقل غلظت کشندگی(MBC) [2]

جهت تعیین و ارزیابی حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) از روش رقت سازی در لوله (ماکرودایلوشن)[3] و طبق استاندارد NCCLS (2002) استفاده شد. برای انجام این کار از یک سری لوله‌های آزمایشگاهی که اتوکلاو و استریل شده بودند از سری دو برابر رقت‌های متوالی از داروها (عصاره و نانو عصاره مرزنگوش و نیز از فلورفنیکل و نانوفلورفنیکل) در محدوده غلظت‌های ۰/۶۲۵-۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر با سه تکرار استفاده شد. برای هر دارو از یک سری ۱۰ تایی از لوله‌هایی آزمایش استفاده شد. ۹ لوله برای آزمایش رقت‌های مختلف هر دارو و یک لوله به عنوان کنترل منفی (فاقد هر گونه دارو) در نظر گرفته شد. برای انجام این کار ابتدا مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت نوترینت براث به درون ۱۰ لوله ریخته شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از هر یک از رقت‌های دارو به لوله‌های جزء لوله شاهد اضافه شد. پس از آن ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی که کدورتی برابر با ۰/۵ مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/ml) باکتری بود، به

[1] Minimum Inhibition Concentration (MIC)
[2] Minimum Bactericidal Concentration (MBC)
[3] Macro dilution

لوله‌هایی هر سری رقت اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در گرم خانه نگهداری شدند. سپس، لوله‌های از نظر رشد باکتری تلقیح شده مورد بررسی قرار گرفتند. اولین لوله در هر سری که در آن باکتری رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) تعیین گردید. این روش برای هر سه ماده مورد نظر تکرار شد.

برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)، از رقت‌هایی که در آن باکتری رشد نکرده بود به روش کشت سطحی در محیط مولرهینتون آگار استفاده شد. برای انجام این عمل ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف در محیط کشت مولرهینتون آگار ریخته و پخش شد سپس، برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در گرم خانه قرار داده شد. اولین رقتی که در آن ۹۹% کلنی ها رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC) در نظر گرفته شد (Espinel-Ingroff *et al.*, 2002)

تعیین قطر هاله عدم رشد با استفاده از روش انتشار دیسک

برای تعیین حساسیت سویه باکتری استرپتوکوکوس اینیایی نسبت به مواد مورد اشاره، از آزمون انتشار دیسک به روش کربی- بوئر، Kirby-Bauer استفاده شد. در این روش ابتدا ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون استرپتوکوکوس اینیایی معادل ۰/۵ مک فارلند ($1/5\times10^8$ CFU/ml) بر سطح محیط کشت مولرهینتون آگار ریخته و بوسیله اسپریدر شیشه‌ای استریل روی آگار پخش شد. سپس، دیسک های بلانک به ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از مواد مربوطه با غلظتی برابر با حداقل غلظت کشندگی آنها و نیز دیسک‌های بلانک شاهد به ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر آغشته شده و در اتوکلاو قرار داده شدند تا استریل شوند. پس از آن، دیسک‌های آماده شده به کمک پنس استریل با فواصل معین از یکدیگر بر سطح محیط کشت آماده با کمی فشار قرار داده شدند و برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در گرم خانه قرار گرفتند. اثر ضد میکرو.بی هر یک از مواد بر اساس اندازه قطر هاله عدم رشد در مقیاس میلی‌متر اندازه‌گیری و ثبت شد. این آزمایش برای هر یک از مواد سه بار تکرار شد.

تجزیه و تحلیل آماری

جهت بررسی توزیع نرمال داده‌ها در تیمارهای مورد مطالعه از آزمون کولموگوروف-اسمیرنو Kolmogorov-smirnov استفاده شد. در صورت نرمال بودن داده‌ها، جهت مقایسه آماری بین تیمارها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. برای مقایسه میانگین‌ها از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan Multiple Rang Tests) در سطح احتمال ۵ درصد ($P<0/05$) استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS۱۳ و برای رسم نمودارها از برنامه Excel 2007 استفاده شد.

نتایج

در این مطالعه اثرات بازدارندگی رشد و باکتری کشی مواد مورد نظر بر روی باکتری استرپتوکوکوس اینیایی، *S. iniae* در جدول ۲ ارائه شده است. این نتایج نشان می‌دهد که قدرت اثر عصاره مرزنگوش در مهار رشد و باکتری کشی استرپتوکوکوس اینیایی ضعیف‌تر از قدرت اثر دیگر مواد بکار رفته است. طوری که قدرت مهار رشد عصاره مرزنگوش (۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) یک چهارم قدرت مهار رشد نانو عصاره مرزنگوش (۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، یک چهار صدم قدرت مهار رشد داروی فلورفنیکل (۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و یک هزار و شش صدم قدرت مهار رشد داروی نانو فلورفنیکل (۰/۶۲۵ میکرو گرم بر میلی‌لیتر) بود. هم چنین، قدرت باکتری کشی عصاره مرزنگوش (۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نصف قدرت باکتری کشی نانو عصاره مرزنگوش (۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، یک چهار صدم داروی فلورفنیکل (۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و یک هشتصدم داروی نانو فلورفنیکل (۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود. این نتایج حساسیت باکتری استرپتوکوکوس به این مواد را به درجات مختلف نشان می‌دهد.

جدول ۲: حداقل غلظت های بازدارندگی رشد (MIC) و باکتری کشی (MBC) مواد مورد آزمایش

Table 2: Minimum inhibition concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) materials tested

ماده	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
عصاره مرزنگوش	۱۰۰۰	۱۰۰۰
نانو عصاره مرزنگوش	۲۵۰	۵۰۰
فلورفنیکل	۲/۵	۲/۵
نانو فلورفنیکل	۰/۶۲۵	۱/۲۵

MIC: Minimum Inhibition Concentration
MBC: Minimum Bactericidal Concentration

جدول ۳: اندازه قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی، *S. iniae* با مواد مورد آزمایش

Table 3: The zones of inhibition of *Streptococcus iniae* with the tested materials

ماده	قطر هاله عدم رشد (میلی متر)
عصاره مرزنگوش	۲۱/۷۰±۰/۶^{a}
نانو عصاره مرزنگوش	۲۶/۰۶±۰/۷^{b}
فلورفنیکل	۳۱/۶۳ ±۰/۴^{c}
نانو فلورفنیکل	۳۲/۸۰±۱/۱^{c}

حروف ناهمنام در هر ستون به معنی وجود اختلاف معنی دار می باشد (P<۰/۰۵)

قدرت مهار رشد و باکتری کشی عصاره مرزنگوش بمراتب کمتر از نانو عصاره مرزنگوش و سایر مواد بود.

نتایج بررسی اندازه قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی به مواد مورد آزمایش در جدول ۳ ارائه داده شده است.

اندازه قطر هاله عدم رشد این باکتری با عصاره مرزنگوش (۲۱/۷۰±۰/۶ میلی‌متر) کمتر از اندازه قطر آن با نانو عصاره مرزنگوش (۲۶/۰۶±۰/۷ میلی‌متر) بود که اختلاف آماری معنی‌داری بین آنها وجود داشت (P<۰/۰۵). اندازه قطر هاله عدم رشد با فلورفنیکل (۳۱/۶۳±۰/۴ میلی‌متر) و با نانو فلورفنیکل (۳۲/۸۰±۱/۱ میلی‌متر) بودند. ولی اختلاف آماری معنی دار بین آنها وجود نداشت (P>۰/۰۵). این نتایج نشان می‌دهد که عصاره مرزنگوش دارای اثر ضد باکتریایی است، ولی به اندازه اثر ضد باکتریایی نانو عصاره مرزنگوش، فلورفنیکل و نانوفلورفنیکل نمی‌باشد.

بحث

در برابر انواع آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از معضلات شایع در صنعت آبزی‌پروری است که در سال‌های اخیر رو به افزایش است. مقاومت دارویی از جمله دلایل رویکرد محققان جهت یافتن ترکیبات جدید ضد میکروبی بویژه با منشاء گیاهی که دارای کمترین اثرات جانبی باشند، می-باشد. تحقیقات متعدد نشان می‌دهند که عصاره گیاه مرزنگوش روی تعدادی از باکتری‌های بیماری زای انسانی، حیوانی و گیاهی و نیز باکتری‌های مولد فساد مواد غذایی مؤثر بوده است (ممبینی و همکاران، ۱۳۸۷؛ شریعت و همکاران، ۱۳۹۲؛ جامه دار و همکاران، ۱۳۹۴؛ Brdanin *et al.*, 2015). در این پژوهش از عصاره و نانو عصاره مرزنگوش به عنوان مواد ضد باکتری با منشاء گیاهی و از فلورفنیکل و نانو فلورفنیکل به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. نتایج نشان دادند که عصاره و نانو عصاره مرزنگوش دارای اثر مهار رشد و باکتری کشی روی باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس اینیایی بودند. ولی این اثرات در مقایسه با فلورفنیکل و نانو فلورفنیکل بمراتب ضعیف‌تر

بودند این نتایج با نتایج سایر محققینی که در ارتباط با اثرات ضد باکتریایی فرآورده‌های گیاهی یا فلورفنیکل بررسی نموده‌اند، مطابقت دارد. محبوبی و فیض آبادی (۱۳۸۸) نشان دادند که اسانس مرزنگوش دارای اثرات ضد میکروبی است. تیمول و کارواکرول از اجزای اصلی عصاره و اسانس گیاه مرزنگوش می‌باشند که نقش مهمی در خاصیت ضد باکتریایی این گیاه دارند که در این ارتباط نقش تیمول برجسته‌تر از کارواکرول می‌باشد. تاکنون، تحقیقات زیادی انجام شده است که نشان می‌دهند فرآورده‌های گیاهی حاوی تیمول و فلانوئیدها خاصیت ضد باکتریایی دارند. تاکنون تحقیقات متعدد و زیادی با فرآورده‌های گیاهی دارای ترکیبات فنلی بر روی انواعی از باکتری های بیماری زای انسانی، حیوانی، گیاهی و مواد غذایی انجام شده است. به برخی از این فرآورده‌ها شامل عصاره الکلی ساقه و برگ سیاه گینه (علم هلو و ناظری، ۱۳۹۳)، اسانس گیاهان آویشن، مرزنجوش، مرزه، اکالیپتوس (محبوبی و فیض آبادی، ۱۳۸۸)، اسانس آویشن تالشی (شهنازی و همکاران، ۱۳۸۶)، عصاره آویشن شیرازی (حسین زاده و همکاران، ۱۳۹۰) و اسانس زنیان (خسروی پور و رضائیان دلوئی، ۱۳۹۳) می باشند. بسیاری از مطالعات نشان می‌دهند که حداقل غلظت مهار رشد این نوع فرآورده‌های گیاهی با توجه به نوع باکتری بین ۱۵۰۰-۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر است که مؤید نتایج تحقیق حاضر است. مطالعات نشان می‌دهند که حداقل غلظت باکتری کشی بسیاری از فرآورده‌های گیاهی بیشتر یا برابر با حداقل غلظت مهار رشد می‌باشد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. هم چنین، در این تحقیق نشان داده شده است که عصاره مرزنگوش با ایجاد حدود ۲۲ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد دارای اثر ضد استرپتوکوکوس اینیایی نسبتاً خوبی می‌باشد، ولی قدرت اثر آن در مقایسه با سایر مواد مصرفی در این تحقیق ضعیف‌تر بود. نتایج اندازه قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی با عصاره مرزنگوش در مقایسه با آنتی‌بیوتیک شیمیایی فلورفنیکل به اندازه ۱۰ میلی‌متر کمتر بود. این امر نشان می‌دهد که قدرت اثر ضد باکتری عصاره مرزنگوش تقریباً نصف قدرت اثر ضد باکتری فلورفنیکل بوده است. لذا، با بکارگیری عصاره مرزنگوش در صنعت آبزی‌پروری می‌توان از مصرف آنتی‌بیوتیک‌های شیمایی کاسته و در نتیجه از مقاومت دارویی کاسته خواهد شد. نتایج تحقیقی نشان می‌دهد که حداقل غلظت مهار رشد فلورفنیکل روی سه گونه از باکتری‌های ویبریوآنگیلارم جدا شده از ماهی کاد بیمار، ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است (Samuelsen *et al*., 2003). همچنین، حداقل غلظت مهار رشد باکتری ادواردزیلا ایکتالوری در گربه ماهی کانال با داروی فلورفنیکل، ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شده است (Schering-Plough, 2007). در مطالعه‌ای دیگر، MIC فلورفنیکل در گونه‌های مختلف آئروموناد‌های متحرک ۱۶-۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شده است (Godoy *et al*., 2008). در مطالعه دیگری که روی ۷۴ گونه از باکتری‌های *Photopacterium* subsp. *piscicida* *damselae* در کشور ژاپن انجام شد، همگی به فلورفنیکل حساس بودند و MIC فلورفنیکل، ۰/۵- ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش گردید (Kawanishi *et al*., 2006). در مطالعه‌ای دیگر حداقل غلظت مهاری فلورفنیکل روی انواعی از پاتوژن های جدا شده از ماهیان Koi Carp و Threespot Gourami (*Trichogaster trichopterus*)، ۲-۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شده است (Yanong and Curtis, 2005). تعدادی از تحقیقات در آبزیان نشان می‌دهند که حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) فلورفنیکل چندین برابر حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) آن است که با نتایج تحقیق ما مطابقت ندارد. Choi و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که MBC فلورفنیکل ۳۲-۸ برابر MIC آن، روی انواع گونه-های باکتری‌های حیوانی بوده است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که اندازه قطر هاله عدم رشد باکتری با فلورفنیکل کمتر از نانوفلورفنیکل بود، ولی از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵). نتایج تحقیق Godoy و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که قطر هاله عدم رشد انواعی از باکتری‌ها با فلورفنیکل ۳۲≥ میلی‌متر بود که این با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. مایکل و همکاران (2013) نشان دادند که به رغم استفاده گسترده

از داروی فلورفنیکل در مزارع پرورش ماهی فرانسه، مقاومت باکتریایی نسبت به این دارو زیاد نبوده، بلکه مقاومت دارویی با داروی کلرامفنیکل معمولاً شایع‌تر است.

با توجه به نتایج بدست آمده بنظر می‌رسد که عصاره مرزنگوش بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی، مؤثر باشد که پیشنهاد می‌شود تحقیقات بیشتری در این زمینه انجام شود. تأثیر بیشتر نانو عصاره مرزنگوش که با اثر داروی فلورفنیکل برابری می‌کند، احتمالاً به دلیل افزایش محلولیت در آب و تسهیل در ورود آن به سلول باکتری می‌باشد. بنابراین، شاید بتوان از عصاره مرزنگوش یا نانو عصاره مرزنگوش به عنوان یک آنتی‌بیوتیک مکمل جهت کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک-های شیمیایی و کاهش مقاومت دارویی در صنعت آبزی-پروری استفاده نمود.

منابع

بازاری مقدم، س.، حقیقی، م.، شریف روحانی، م.، حمیدی، م. و قاسمی، م.، ۱۳۹۵. بررسی اثرات عصاره آلوئه ورا (*Aloe vera*) بر شاخص های رشد، ترکیب لاشه و فلور باکتریایی روده تاسماهی سیبری (*Acipencer baerii*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۵(۱): ۵۲-۳۹.

جامه دار، ص.، ضرابی، م.، مهر نژاد، ف. و یاور پور کردستانی، و.، ۱۳۹۴. بررسی اثر ضد باکتری عصاره-های آبی گیاهان بومی ایران بر روی سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران، ۸(۲): ۵۴-۵۰.

حسین زاده، ا.، مهاجرفر، ط.، آخوندزاده بستی، ا.، جنجری، ع.، گندمی نصرآبادی، ح.، میثاقی، ع. و صدقی، س.، ۱۳۹۰. تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) لیزوزیم و آویشن شیرازی بر باکتری *Escherichia coli* O157: H7. فصلنامه گیاهان دارویی، ۱۱(۱): ۲۱۸ -۲۰۸.

حمیدی، م.، رستمی زاده، ک.، مصلحی، م.، سواری، ج.، نظیری مهربانی، ا.ح. و صنعتی، ا.، ۱۳۹۰. فرآیند تولید نانوذرات از ترکیبات نامحلول در آب. ثبت اختراع به شماره ۷۳۳۳۶۰. دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی زنجان.

خسروی پور، س. و رضائیان دلوئی، ر.، ۱۳۹۳. فعالیت ضد باکتریایی اسانس گیاه زنیان بر باکتری‌های *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* و *Escherichia coli* در محیط کشت آگار مغذی. فصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی، ۳(۲): ۵۶-۴۳.

شریعت، ا.، حسینی، ه. و پور احمد، ر.، ۱۳۹۲. بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره آبی گزنه و مرزنگوش بر *Escherichia coli*، *Salmonella typhi* و *Pseudomonas aeruginosa*. مجله نوآوری در علوم و فناوری غذایی، ۵(۴): ۱۵-۹.

شهنازی، س.، خلیقی سیگارودی، ف.، اجنی، ی.، یزدانی، د.، اهوازی، م. و تقی زاد فرید، ر.، ۱۳۸۶. بررسی ترکیب‌های شیمیایی و خواص ضد میکروبی اسانس حاصل از گیاه دآویشن تالشی (*Thymus trautvetteri* Klokov & Desj.-Shost.). فصلنامه گیاهان دارویی، ۶(۲): ۸۸-۸۰.

عزیزی، ا.، یگانه، س.، فیروزبخش، ف. و جانی خلیلی، خ.، ۱۳۹۶. بررسی اثر اسانس مرزنجوش (*Origanum vulgare* L.) بر شاخص های رشد و کیفیت فیله ی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در زمان نگهداری در دمای یخچال (۴±۱°C). مجله علمی شیلات ایران، ۲۶(۱): ۱۰۹-۹۳.

علم هولو، م. و ناظری، س.، ۱۳۹۳. ارزیابی اثرات آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی عصاره‌های الکلی ساقه و برگ گیاه سیاه گینه. مجله دنیای میکروب ها، ۴(۲۱): ۲۹۸-۲۸۹.

قهرمان، ا.، ۱۳۸۳. فلور ایران. جلد دوم، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع.

محبوبی، م. و فیض آبادی، م. م.، ۱۳۸۸. بررسی اثر ضد میکروبی اسانس‌های آویشن، مرزنجوش، مرزه و اکالپتوس بر باکتری‌های اشریشیاکلی، سالمونلا تیفی موریوم و قارچ های آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فلاووس. فصلنامه گیاهان دارویی، ۲(۳۰): ۱۴۴-۱۳۷.

ممبینی، ت.، ممبینی، م. و آقایی، م.، ۱۳۸۷. بررسی آثار فارماکولوژیک جنس مرزنجوش (*Origanum* spp.). فصلنامه گیاهان دارویی، ۴(۲۹): ۳۵-۱۸.

Agnew, W. and Barnes, A.C., 2007. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. Veterinary Microbiology, 122(1-2):1-15. Doi: 10.1016/j.vetmic.2007.03.002

Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, A., Zendeboodi, F., Golian, M.M. and Vasiee, A., 2013. Effect of aqueous and ethanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* L. on food infection and intoxication microorganisms "in vitro". Journal of Paramedical Sciences, 4(3):89-99.

Bent, S., 2008. Herbal medicine in the United States: Review of efficacy, safety, and regulation: grand rounds at University of California, San Francisco Medical Center. Journal of General Internal Medicine, 23(6):854-859. Doi: 10.1007/s11606-008-0632-y

Bowker, J., Ostland, V.E., Carty, D. and Bowman, M.P., 2010. Effectiveness of Aquaflor (50% florfenicol) to control mortality associated with *Streptococcus iniae* in freshwater-reared subadult sunshine bass. Journal of Aquatic Animal Health, 22:254-265. Doi: 10.1577/H09-010.1

Brdanin, S., Bogdanovic, N., Kolundzic, M., Milenkovic, M., Golic, N., Kojic, M. and Kundakovic, T., 2015. Antimicrobial activity of oregano (*Orinanum vulgare* L.) and basil (*Ocimum basilicum* L.) extracts. Advanced Technologies, 4(2):5-10.

Choi, M.j., Lee, E.M., Lee, S.J., Reza, Md. A., Lee, J.S., Gebru, E., Rhee, M.H. and Park, S.C., 2011. The *in vitro* antibacterial activity of florfenicol in combination with amoxicillin or cefuroxime against pathogenic bacteria of animal origin. Pakistan Veterinary Journal, 31(2):141-144.

Darwish, A., 2010. Effectiveness of intervention with florfenicol on a *Streptococcus iniae* infection in blue tilapia. North American Journal of Aquaculture, 72:354-360.

Drăgan, S., Gergen, I. and Socaciu, C., 2008. Food functional with natural bioactive component in metabolic syndrome. Ed. Eurostampa, Timişoara, 314:200-202.

Gaunt, P., Endris, R.G., Baumgartner, W., McGinnis, A., Camus, A., Steadman, J., Sun, F. and Sweeney, D., 2010. Determination of florfenicol dose rate in feed for control of mortality in Nile tilapia infected with *Streptococcus iniae*. Journal of Aquatic Animal Health, 22:158-166. Doi.org/10.1080/15222055.2013.786006

Godoy, T.D., Mian, G.F., Zanolo, R., Yuhara, T.Y., Faria, F.C. and Figueiredo, H.C.P., 2008. Patterns of resistance to florfenicol and bicyclomycin in Brazilian strains of motile aeromonads. Aquaculture, 285:255-259. Doi:10.1016/j.aquaculture.2008.08.014

Gottumukkala Venkateswara, R., Mukhopadhyay, T., Annamalai, T.,

Radhakrishnan, N. and Sahoo, M.R., 2011. Chemical constituents and biological studies of *Origanum vulgare*. Pharmacognosy Researches, 3(2):143-145.

Gue, C., Liang, L., Cao, K., 2014. Application Chinese herbal medicine additives in aquaculture. International Conference on Economic Management and Social Science. 180-183.

Haghighi, M., Sharif Rohani, M., Pourmoghim, H., Samadi, M., Tavoli, M., Eslami, M. and Yusefi, R., 2017. Enhancement of immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykis*) fed a diet supplemented with *Aloe vera* extract. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 16(3):884-896.

Helander, IMHL., Alakomi, K., Latva-Kala, T., Mattila-Sandholm, I., Pol, EJ., Smid, LG., Gorris, M. and von Wright, A., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram negative bacteria. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 46(9):3590-3595. Doi:10.2298/ABS1404367G

Kawanishi, M., Kijima, M., Kojima, A., Ishihara, K., Esaki, H., Yagyu, K., Takahashi, T., Suzuki, S. and Tamuara, Y., 2006. Drug resistance and random amplified polymorphic DNA analysis of Photobacterium damselae ssp. piscicida isolates from cultured Seriola (yellowtail, amberjack and kingfish) in Japan. Letters in Applied Microbiology, 42:648–653. Doi:10.1111/j.1472-765X.2005.01820x

Koukoulitsa, **C., Kiroti, A., Bergonzi, C., Pescitelli, G., Bari, L.D. and Skaltsa, H., 2006.** Polar constituents from the aerial parts of *Origanum vulgare* growing wild in Greece. Jouranl of Agriculture and Food Chemistry, 54:5388-5392**.**

Madhuri, S., Mandloi, A.K., Govind, P. and Sahni, Y.P., 2012. Antimicrobial activity of some medicinal plants against fish pathogens. International Research Journal of Pharmacy, 3(4):28-30. Doi:10.7897

Michel, C., Kerouault, B. and Martin, C., 2003. Chloramphenicol and florfenicol susceptibility of fish-pathogenic bacteria isolated in France. Comparison of minimum inhibitory concentration, using recommended provisory standards for fish bacteria. Journal Applied Microbiology, 95(5):1008-1015. Doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02093.x

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2002. Performance tandards for antibacterial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved Standard Second edition. NCCLS document M31-A2 (ISBN 1-56238-461-9). CCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA. Volume 22. Number 6.

Pannu, R., Dahiya, S., Sabhlok, V.P., Kumar, D., Sarsar, V. and Gahlawat, S.K., 2014. Effects of probiotics, antibiotics and herba; extracts against fish bacterial pathogens**.** Ecotoxical Environmental Contamination, 9(1):13-20. Doi:10.5132/eec.2014.01.002

Plumb, J.A., 1999. Tilapia bacterial diseases. In-Health: maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Ames: Iowa State University, pp297-305. Doi:10.1111/peps.12017. 943

Prathyusha, P., Sabramanian, M.S., Nisha, M.C., Santhanakrishnan, R. and Seena, M.S., 2009. Pharmacognostical and phytochemical studies on *Origanum vulgare* (Laminacea), Ancient Science of Life, 29(2):17-23. Doi:10.4103/0257-7941.123916

Samuelsen, O. B., Øivind, B. and Arne, E., 2003. Pharmacokinetics of florfenicol cod *Gadus morhua* and *in vitro* antibacterial activity against *Vibrio anguillarum*. Diseases of Aquatic Organisms, 56:127-133.

Schering-Plough Animal Health Corporation. 2007. AQUAFLOR® (florfenicol) approved for freshwater-reared Salmonids.

Velmurugan, S. and Citarasu, Th., 2010. Effects of antibacterial extracts on the gut floral changes in Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Romanian Biotechnological Letters, 15(6):5709-5717.

Yanong, R.P.E. and Curtis, E.W., 2005. Pharmacokinetic studies of florfenicol in koi carp and threespot gourami Trichogaster trichopterus after oral and intramuscular treatment. Journal of Aquatic Animal Health, 17: 129–137. Doi.org/10.1577/H04-043.1

Assessment of antibacterial activity of *Origanum vulgare* extract and nanoform *Origanum vulgare* extract in comparison with florfenicol and nanoform florfenicol against *Streptococcus iniae*

Haghighi M.[1*]; Fakharzadeh S.M.E.[1]; Saltanat Najar Lashgari[1]; Pourmolaei B.[2]

[*]masoud126@yahoo.com

1- Iranian Fisheries Science Research Institute, Cold-water Fishes Research Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tonekabon-Iran

2- Department of Veterinary Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran-Iran

Abstract

The aim of this study was to evaluate *in vitro* the antibacterial effects of hydro-alcoholic extract of aerial parts of *Origanum vulgare* and nanoform *Origanum vulgare* extract on *Streptococcus iniae*, the causative agent of Streptococcosis in fish, in comparison with the effects of florfenicol and nonoform florfenicol on this bacteria. The results showed that the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of *Origanum vulgare* extract was 1000 µg/ml whereas, the MIC and MBC of nanoform *Origanum vulgare* extract were 250 and 500 µg/ml, respectively. These results indicated that the inhibitory and bactericidal effects of *Origanum vulgare* extract was less than the nanoform *Origanum vulgare* extract. The MIC and MBC of florfenicol was 2.5 µg/ml while, the MIC and MBC of nanoform florfenicol were 0.625 and 1.25 µg/ml respectively. The results showed that the zones of inhibition for *Origanum vulgare* extract, nanoform *Origanum vulgare* extract, florfenicol and nanoform florfenicol were 21.70±0.6, 26.06±0.7, 31.63±0.4 and 32.80±1.1 mm, respectively. These results indicated that *Origanum vulgare* extract had antibacterial effects which were less than the effects of nanoform *Origanum vulgare* extract, florfenicol and nanoform florfenicol on *Streptococcus iniae*. In this study, the nanoform florfenicol was the most effective substance for controlling *Streptococcus iniae* infection.

Keywords: *Origanum vulgare* extract, Florfenicol, *Streptococcus iniae*, Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Nano

[*]Corresponding author