مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۷، شماره ۴، ۱۴۰۱، ۲۲۰-۲۱۳
Homepage: jvr.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: 2251-6190
انتشارات دانشگاه تهران
مقاله پژوهشی

مطالعه اثر ضد باکتریایی ترکیب اسانس مرزنجوش (*Origanum vulgare*) و سرخارگل (*Echinaceae purpurea*) روی باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* (*Lactococcus garvieae*) در شرایط آزمایشگاهی

اشکان زرگر[۱]، مهرداد اردشیری[۱]، علیرضا خسروی[۲]، علی طاهری‌میرقائد[۱]، حسام‌الدین اکبرین[۳]، مهران احمدپور[۴]، علی حدادی[۴]

[۱] گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۲] گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۳] گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۴] دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۶ مهر ماه ۱۴۰۱، **تاریخ پذیرش:** ۵ آذر ماه ۱۴۰۱
10.22059/jvr.2022.276558.2910 20.1001.1.20082525.1401.77.4.2.3

چکیده

زمینهٔ مطالعه: افزایش روزافزون مقاومت باکتریایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به علاوه تجمع آن‌ها در بدن ماهی به دنبال افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان بیماری‌های باکتریایی، در کنار عوارض جانبی این ترکیبات بر محیط‌زیست و انسان موجب شده است تا در سال‌های اخیر مطالعات متعددی روی جایگزین‌های احتمالی سالم‌تر مانند ترکیبات گیاهی و اثرات مثبت آن‌ها انجام شود.

هدف: بررسی اثر ضد باکتریایی ترکیب اسانس مرزنجوش و سرخارگل علیه باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* در شرایط آزمایشگاهی.

روش‌کار: رقت‌های متوالی از ترکیب اسانس جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) به روش میکرودایلوشن تهیه گردید. همچنین با استفاده از روش انتشار دیسک حاوی ترکیب اسانس‌ها و نیز آنتی بیوتیک‌ها، قطر هاله عدم رشد باکتری سنجیده شد.

نتایج: غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی، خاصیت کشندگی و غلظت ۶/۲۵ به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی، خاصیت مهارکنندگی رشد را دارند. از طرفی هرچند باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* مورد مطالعه نسبت به دو آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین ۵ میکروگرم و تریمتوپریم سولفومتوکسازول حساس‌تر بوده ($P<۰/۰۵$) ولی ترکیب اسانس‌های مرزنجوش و سرخارگل علی‌رغم تأثیرات ضعیف‌تر نسبت به دو آنتی‌بیوتیک مذکور نسبت به آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل عملکرد بهتری داشت ($P<۰/۰۵$). همچنین نتایج حاصل از اندازه‌گیری هاله عدم رشد باکتری نیز با نتایج حاصل از MIC و MBC مطابقت داشت و حاکی از تأثیر مثبت این ترکیب گیاهی بر باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* بود. به علاوه اثر ضدقارچی عصاره اتانولی برگ گل لاله عباسی بر روی گونه‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس، فوزاریوم، کاندیدا‌آلبیکنس و کاندیدا کروزه‌ای در کشت روی سابورو دکستروزآگار نشان داده شد.

نتیجه‌گیری نهایی: نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان از اثرات مثبت باکتری کشی اسانس‌های مذکور در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های تجاری موجود در شرایط آزمایشگاهی داشت. مطالعات بالینی (In vivo) بیشتری در زمینه استفاده از ترکیب اسانس‌های مذکور به جهت مقابله با بیماری لاکتوکوکوزیس مورد نیاز بوده و پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: اثر ضد باکتریایی، اسانس سرخارگل، اسانس مرزنجوش، *لاکتوکوکوس گارویه*، MIC، MBC

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: *اشکان زرگر، گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران*

مقدمه

صنعت آبزی‌پروری با رشد سالیانه بیش از ۱۰ درصد دارای سریع‌ترین میزان رشد در بین تولیدات دامی در جهان است. در این ارتباط کمبود منابع آبی سبب شده است که پرورش متراکم، جایگزین روش‌های سنتی و نیمه متراکم شود. در این شرایط معمولاً به‌علت بروز استرس، نزدیکی مزارع به یکدیگر و عدم رعایت اصول بهداشتی خطر ابتلا به بیماری‌ها افزایش یافته است که این خود سبب ضررهای اقتصادی کلان در این صنعت شده است (۱). از جمله این بیماری‌ها لاکتوکوکوزیس بوده که عامل آن *لاکتوکوکوس گارویه* است. این باکتری یک کوکسی گرم مثبت، آلفا همولیتیک، بی‌هوازی و غیر متحرک است که توانایی تولید اسپور را ندارد و به صورت جفت یا زنجیره‌های کوتاه قابل مشاهده است (۲). این بیماری تاکنون در بسیاری از گونه‌های مختلف آب شیرین و شور گزارش شده است و هنگامی که درجه حرارت آب به بیش از ۱۵ درجه سانتی‌گراد برسد شدت بیماریزایی بیشتر می‌شود (۳). استفاده مداوم و نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان و کنترل لاکتوکوکوزیس باعث پیدایش سویه‌های مقاوم باکتری شده است (۴). از طرف دیگر استفاده از این آنتی‌بیوتیک‌ها علاوه بر تحمیل هزینه‌های اقتصادی زیاد منجر به باقی ماندن دارو در بافت‌ها و افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مصرف کنندگان انسانی و مشکلات زیست محیطی نیز شده است (۵). از این رو در سال‌های اخیر استفاده‌های درمانی و پیشگیرانه از ترکیبات گیاهی که اثرات سوء ترکیبات آنتی‌بیوتیکی را ندارند رو به افزایش است (۶).

سرخارگل (*Echinacea purpurea*) یکی از گیاهان دارویی با ارزش از خانواده کاسنی (Asteraceae) است که توانسته در دو دهه اخیر جایگاه مهمی در صنایع داروسازی پیدا کند (۷). سرخارگل یکی از مهم‌ترین گیاهان دارای اثر تحریک ایمنی ثابت شده است که در درمان و پیشگیری از سرماخوردگی و دیگر بیماری‌های عفونی استفاده می‌شود (۸). اسید کافئیک و اسید شیکوریک در سرخارگل دارای خاصیت ضد ویروسی و ترکیب اکیناکوزید آن دارای خاصیت ضدمیکروبی است. به‌نظر می‌رسد ترکیبات گلیکوپروتئینی، پلی‌ساکاریدی، مشتقات اسید کافئیک و آلکیل آمیدی موجود در این گیاه فعالیت سیستم ایمنی را افزایش می‌دهد (۹،۱۱).

گیاه مرزنجوش (*Origanum vulgare*) که با نام‌های پونه کوهی یا آویشن کوهی نیز شناخته می‌شود، گیاهی یک ساله و علفی و در برخی مواقع دو ساله است. ترکیب اسانس آن بسیار پیچیده و در گونه‌های مختلف متفاوت است. ترکیبات اصلی آن شامل تیمول، کارواکرول، گاما تریپسین، متیل کارواکرول و آلفا بیسابولن است که بر اساس فصل، مکان و شرایط اکولوژیکی این ترکیبات می‌توانند متفاوت باشند (۱۲). مطالعات زیادی بر روی خواص ضد باکتریایی مرزنجوش انجام گرفته است. از جمله آن‌ها می‌توان به مطالعه Saeed و Tariq در سال ۲۰۰۹ اشاره کرد که به تأثیرات ضد باکتریایی این ترکیب گیاهی دلالت داشته است (۱۳). همچنین در مطالعه دیگری که بر روی اثر ضد میکروبی اسانس مرزنجوش انجام گرفت نتایج حاکی از آن بود که این اثرات ناشی از اجزای آن خصوصاً تیمول و کارواکرول است (۱۴). Stojković و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی اثرات سینرژیستی مرزنجوش و آویشن باغی مطالعه‌ای انجام دادند که نتایج این مطالعه نیز حاکی از آن بود که استفاده از این مواد به‌صورت ترکیبی بیشترین اثرات ممانعت کنندگی را در برابر باکتری‌ها دارد (۱۵).

مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی ترکیب اسانس‌های گیاهی مرزنجوش و سرخارگل در برابر باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* صورت گرفته است.

مواد و روش کار

تهیهٔ عطرمایه‌ها: اسانس‌های مورد استفاده در مطالعه حاضر از شرکت پارس ایمن دارو تهیه، ترکیب و تحت عنوان آنتی بیوفین در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه باکتری: جدایه *لاکتوکوکوس گارویه* مورد استفاده در این مطالعه از کلکسیون قطب علمی بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران در اختیار قرار گرفت. این ایزوله قبلاً از ماهیان قزل‌آلای بیمار جداسازی شده و به روش‌های ژنتیکی و مولکولی شناسایی شده است.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (Minimum Inhibitory Concentration): برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) از روش میکرودایلوشن (Broth Micro Dilution) استفاده گردید. برای آزمایش MIC از میکروپلیت ۹۶ چاهکی استریل درب‌دار استفاده شد. این میکروپلیت‌ها دارای هشت ردیف ۱۲ چاهکی به حجم ۲۵۰ میکرولیتر هستند. ابتدا از محیط کشت TSB به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به داخل چاهک‌ها ریخته شد. سپس به اولین چاهک هر ردیف میزان ۱۰۰ میکرولیتر از

ترکیب گیاهی به همراه ۳ درصد دی متیل سولفاکساید (DMSO) اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته شد و در چاهک دوم ریخته شد و بعد از چند بار پر و خالی کردن توسط سمپلر، ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک دوم برداشته و به چاهک سوم ریخته شد. این کار تا چاهک دهم ادامه یافت و در نهایت از چاهک دهم ۱۰۰ میکرولیتر دور ریخته شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی باکتری معادل با مک‌فارلند شماره ۱، به تمام چاهک‌ها اضافه شد. چاهک ۱۱ ام به‌عنوان کنترل منفی (فاقد باکتری) و چاهک ۱۲ ام به‌عنوان کنترل مثبت (فقط حاوی باکتری) در نظر گرفته شد. پس از تلقیح باکتری‌ها، میکروپلیت به مدت ۳۰ ثانیه بر روی شیکر قرار گرفت تا به‌طور یکنواخت مخلوط گردد. سپس جذب نوری با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در ساعت صفر و با طول‌موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. در مرحله آخر میکروپلیت در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. بعد از اتمام انکوباسیون، دوباره کدورت یا عدم کدورت در چاهک‌ها، هم به‌صورت چشمی و هم توسط جذب نوری توسط الایزا ریدر خوانده شد و کمترین غلظتی که کدورتی در آن مشاهده نشد به‌عنوان MIC منظور گردید.

تعیین حداقل غلظت باکتری کشی (Minimum Bactericidal Concentration): برای اندازه‌گیری MBC، از چاهک‌های فاقد کدورت (MIC و بیشتر از آن) مقدار ۱۰ میکرولیتر در شرایط کاملاً استریل و در نزدیکی شعله برداشته شد و بر روی محیط بلاد آگار تلقیح و کشت داده شد. پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، پلیتی که هیچ باکتری در آن رشد نکرد به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد. کلیه آزمایشات با سه تکرار انجام شدند (۱۶).

اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد: به‌منظور سنجش خاصیت ضد باکتریایی این ترکیب گیاهی، روش انتشار دیسک و اندازه‌گیری هاله عدم رشد انجام شد. بدین منظور پس از تهیه سوسپانسیون باکتریایی معادل مک فارلند شماره یک (cfu ۱۰۸×۳ در هر میلی لیتر)، با استفاده از سمپلر به میزان ۲۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون بر روی محیط ژلوز خون ریخته شد. سپس به‌وسیله پیپت پاستور خم‌شده به‌صورت چمنی کشت داده شد. برای تعیین قطر هاله عدم رشد، ۱۵ میکرولیتر از مخلوط اسانس بر اساس MIC به‌دست آمده بر روی دیسک خالی تلقیح شده و یک دیسک استاندارد آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل نیز به پلیت اضافه گردید. همچنین برای کنترل منفی ۱۵ میکرولیتر DMSO4% به یک دیسک خالی دیگر تلقیح شد. سپس محیط‌های کشت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون شدند. پس از گذشت این مدت‌زمان هاله منطقه مهار رشد به‌وسیله کولیس اندازه‌گیری شد و قطر چاهک از آن کسر شد. آزمایش در سه تکرار انجام گرفت و قطر هاله‌های به‌دست آمده ثبت گردید (۱۶،۱۷).

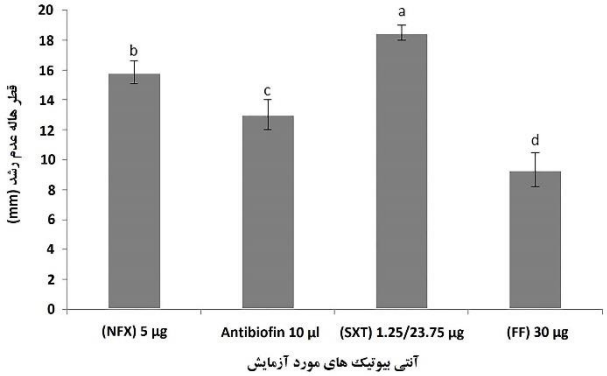
تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به نتایج مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۷، از طریق آنالیز واریانس یک‌طرفه و بر اساس آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ (mean±SD)، انجام گرفت.

نتایج

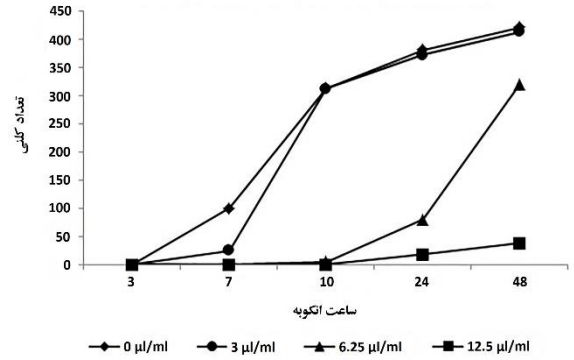
بر اساس نتایج به‌دست‌آمده توسط روش میکرودایلوشن، غلظت‌های ۶/۲۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر و ۱۲/۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر از این ترکیب اسانس گیاهی به ترتیب به‌عنوان MIC و MBC تعیین شدند.

نتایج حاصل از اثر ۱۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر ترکیب اسانس مرزنجوش و سرخارگل بر روی میانگین هاله‌های عدم رشد باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های تجاری تریمتوپریم سولفومتوکسازول، فلورفنیکل، و انروفلوکساسین در نمودار (۱) نشان داده شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* مورد مطالعه نسبت به دو آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین ۵ میکروگرم و تریمتوپریم سولفومتوکسازول حساس می‌باشد ($P<0/05$) ولی ترکیب اسانس مرزنجوش و سرخارگل علی‌رغم تأثیرات ضعیف‌تر نسبت به دو آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین ۵ میکروگرم و تریمتوپریم سولفومتوکسازول نسبت به فلورفنیکل عملکرد بهتری داشته است ($P<0/05$) (نمودار ۱).

نتایج تعداد کلنی‌های شمارش شده باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* در غلظت‌های مختلف ترکیب اسانس‌های مرزنجوش و سرخارگل پس از گذشت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در نمودار (۲) نشان داده شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده با افزایش زمان تعداد کلنی‌های تشکیل‌شده افزایش یافته که بیشترین کلنی تشکیل شده مربوط به تیمار شاهد و کمترین تعداد کلنی تشکیل شده مربوط به غلظت ۱۲/۵ میکرو لیتر بر میلی لیتر می‌باشد.



نمودار ۱. مقایسه قطر هاله‌های عدم رشد روی باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* به تفکیک آنتی‌بیوتیک‌ها و آنتی بیوفین ($P<۰/۰۵$). NFX: انروفلوکساسین؛ SXT: تری‌متوپریم سولفومتوکسازول؛ FF: فلورفنیکل.



نمودار ۲. نتایج تعداد کلنی‌های شمارش‌شده باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* در غلظت‌های مختلف.

بحث

در سال‌های اخیر، استفاده از انواع بی‌خطر محرک‌های ایمنی با منشأ گیاهی به دلیل مزیت‌های متعدد آن‌ها از جمله در دسترس بودن، آسیب نرساندن به محیط‌زیست، عدم تجمع در بدن، امکان تولید در مقیاس وسیع با قیمت مناسب توجهات زیادی را در سطح جهان به خود اختصاص داده است و به یکی از موضوعات مورد توجه در مطالعات علمی تبدیل شده است (۱۵).

به همین دلیل در مطالعه حاضر از ترکیب اسانس‌های گیاهی مرزنجوش و سرخارگل که در ایران در سال‌های اخیر در دسترس هستند استفاده شد.

مطالعات زیادی روی عملکرد اسانس‌ها در صنعت آبزی‌پروری صورت گرفته است بر اساس این مطالعات از اسانس‌ها می‌توان به‌عنوان محرک سیستم ایمنی (۱۸،۱۹)، باکتری‌کشی (۱۶،۲۰)، محرک رشد (۱۹،۲۱)، کاهش‌دهنده استرس اکسیداتیو (۲۲)، ممانعت‌کننده از بیان ژن (۲۳،۲۴)، کنترل‌کننده آلودگی‌های قارچی (۲۵) و به‌عنوان یک ماده ضدعفونی برای تجهیزات و استخرها (۲۶) استفاده کرد.

در مطالعه حاضر حداقل غلظت مهارکنندگی ۶/۲۵ و حداقل غلظت کشندگی ۱۲/۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر تعیین شد. همچنین نتایج آزمایش هاله عدم رشد باکتری نشان‌دهنده افزایش اثر ضد باکتریایی با افزایش دوز اسانس بود و نتایج آزمایشات MIC و MBC را تأیید کرد. Mahbobi و Feizabadi در سال ۲۰۰۹ اظهار داشتند که اثر ضد میکروبی اسانس مرزنجوش بیشتر ناشی از اجزای تیمول و کارواکرول آن است (۱۴). همچنین در مطالعه Soltani و همکاران در سال ۲۰۱۵ که در زمینه تأثیر اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) روی باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* انجام شد غلظت ۰/۱۲ میکرولیتر به‌عنوان MIC بیان ژن‌های حاد pavA و Hly را به صورت معنی‌داری کاهش داد (۲۴).

در مورد هاله عدم رشد باکتری در مطالعه حاضر باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* نسبت به دو آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین ۵ میکروگرم و تریمتوپریم سولفومتوکسازول حساس بود. ولی ترکیب اسانس مرزنجوش و سرخارگل علی‌رغم تأثیرات ضعیف‌تر نسبت به دو آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین ۵ میکروگرم و تریمتوپریم سولفومتوکسازول نسبت به فلورفنیکل عملکرد بهتری داشتند ($P<۰/۰۵$). Kav و Erganis در سال ۲۰۰۸ گزارش کردند که *لاکتوکوکوس گارویه* به اریترومایسین حساس است اما نسبت به کلیندامایسین، لینکومایسین و اسپیرامایسین مقاوم می‌باشد. این مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به کلیندامایسین را می‌توان به‌عنوان کلید شناسایی *لاکتوکوکوس گارویه* عنوان کرد (۲۶). مغایرت نتایج حاضر را می‌توان در متفاوت بودن سویه مورد مطالعه دانست.

Saeed و Tariq در سال ۲۰۰۹ اثر ضد باکتریایی اسانس مرزنجوش را روی تعداد زیادی از سویه‌های باکتری‌های گرم مثبت مورد مطالعه قرار دادند که در تمام موارد مورد آزمایش در این مطالعه قطر هالهٔ عدم رشد باکتری به‌طور مشخص مشاهده شد (۱۳). Sivropoulou و همکاران در سال ۱۹۹۶ در مطالعه‌ای با بیان این‌که تیمول و کارواکرول در اسانس مرزنجوش بیشترین اثرات ضد باکتریایی را دارند، بیان داشتند که این اسانس اثرات ضد باکتریایی قوی در برابر طیفی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی دارد (۲۷).

ترکیب مرزنجوش و سرخارگل رشد باکتری را به‌طور مؤثری مهار می‌کند که میزان آن به غلظت ماده مؤثره، دما و زمان بستگی

دارد. کارواکرول که جز اصلی این ترکیب می‌باشد از طریق کاهش، سنتز ATP و افزایش هیدرولیز، غشاء را نفوذپذیرتر می‌کند همچنین سطوح بالای کارواکرول با کاهش pH داخلی باکتری، خروج پتاسیم داخل باکتری را افزایش می‌دهد که در نهایت باعث تخریب غشاء و متلاشی شدن دیواره باکتری می‌شود (۲۸). Izadi و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که اسانس سرخارگل دارای اثرات ضد میکروبی فراوانی بر روی ۱۳ گونه باکتری است (۷). خواص ضد میکروبی اسانس سرخارگل می‌تواند به دلیل وجود ترکیبات اکیناسن، اکیناکوزید و آل کیل آمیدی باشد. Jamshidi و همکاران در سال ۲۰۱۴ طی مطالعه‌ای نشان دادند که اسانس و عصاره‌های اتانولی قسمت‌های مختلف گیاه سرخارگل اثر مهارکنندگی و کشندگی بر باکتری *Xanthomonas arboricola pv. juglandis* دارد (۲۹). همچنین با افزایش زمان تعداد کلنی‌های تشکیل شده افزایش یافته است که بیشترین کلنی تشکیل شده مربوط به تیمار شاهد و کمترین تعداد کلنی تشکیل شده مربوط به غلظت ۱۲/۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر بود. در مطالعه‌ای دیگر توسط Mora-Sánchez و همکاران در سال ۲۰۲۰ تأثیر عصاره چند گونه مرکبات در مقابله با باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* در ماهی قزل‌آلا را مورد ارزیابی قرار دادند و اذعان داشتند که این عصاره مقاومت ماهی را در مواجهه با باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* به شکل معنی‌دار افزایش می‌دهد ($P<۰/۰۰۱$) (۳۰). علاوه بر عصاره‌های گیاهی از پوست میوه‌ها نیز به دلیل خاصیت پره بیوتیکی آن‌ها می‌توان در تغذیه آبزیان و مقابله با باکتری‌های بیماریزایی مثل *لاکتوکوکوس گارویه* کمک گرفت. Zargar و همکاران در سال ۲۰۱۹ اثر اسانس آویشن باغی بر رشد، پاسخ ایمنی و مقاومت به بیماری آئروموناس هیدروفیلا در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) را ارزیابی کردند که نتایج بیانگر اثرات مثبت اسانس یاد شده است (۳۱). Patel و همکاران در سال ۲۰۲۰ از عصاره پوست میوه‌های پرتقال، لیمو شیرین، آناناس و انار در تغذیه تیلاپیای نیل و مواجه ساختن با باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* بهره جستند که نتایج این مطالعه اثربخشی عصاره‌گیری صنعتی از پوست میوه‌ها به عنوان پسماند را تأیید کرد (۳۲). عصاره شیرین بیان را Zaheri Abdevand و همکاران در سال ۲۰۲۱ بر شاخص‌های رشد و بازماندگی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان واکسینه شده با واکسن لاکتوکوکوزیس مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن ادجوانت مونتاناید و عصاره شیرین بیان متعاقب استفاده از واکسن لاکتوکوکوزیس موجب بهبود برخی از شاخص‌های رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌گردد (۳۳). Gholamhosseini و همکاران در سال ۲۰۲۰ عصاره ترخون را بر پاسخ ایمنی، فاکتورهای بیوشیمیایی خون و رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد مطالعه قرار دادند و نتایج حاصله از این مطالعه نشان داد که استفاده از عصاره گیاه ترخون می‌تواند علاوه بر افزایش رشد ماهی، موجب بهبود فاکتورهای ایمنی و پارامترهای خونی شود (۳۴). در مطالعه‌ای دیگر Said و همکاران در سال ۲۰۲۲ خواص آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریایی عصاره‌های قسمت‌های مختلف انار و کاج سیاه آناتولی را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تمام میوه انار را می‌توان به عنوان یک منبع آنتی اکسیدان و آنتی باکتریال در نظر گرفت. همچنین عصاره مخروط کاج سیاه آناتولی را می‌توان یک ترکیب آنتی باکتریال نسبت به پاتوژن‌های ماهی دانست (۳۵).

مطالعات متعددی به اثربخش بودن عصاره سرخارگل اشاره کرده است. در مطالعه‌ای دیگر Alinezhad در سال ۲۰۱۹ عصاره سه گیاه سرخارگل، بومادران و نعناع تند را در بهبود فاکتورهای خونی و ایمنی ماهی کپور معمولی مورد بررسی قرار داد و نتایج استخراج شده از این مطالعه، بر مؤثر بودن عصاره هر سه گیاه فوق الذکر صحه گذاشته است (۳۶). Khajehpour و Javadian در سال ۲۰۲۱ اثر عصاره سرخارگل را روی شاخص‌های رشد، هماتولوژی و ایمنی ذاتی ماهی خاویاری سیبری مورد بررسی قرار دادند و شاهد بهبود شاخص‌های ذکر شده بودند (۳۷). Akbari و Kakoolaki در سال ۲۰۱۹ گیاه سرخارگل را در ماهی کفال خاکستری مورد مصرف به صورت خوراکی قرار دادند و با باکتری *Photobacterium damselae* مواجه ساختند. نتایج نشان از تأثیر مثبت گیاه سرخارگل بر کاهش تلفات ناشی از عفونت و همچنین افزایش رشد و فاکتورهای ایمنی داشت (۳۸).

نتیجه‌گیری نهایی: با توجه به اثرات ضد باکتریایی حاصل از ترکیب اسانس‌های مرزنجوش و سرخارگل در شرایط آزمایشگاهی بر باکتری *لاکتوکوکوس گارویه*، به نظر می‌رسد که استفاده ترکیبی این دو اسانس باعث افزایش کارایی در شرایط آزمایشگاهی می‌شود. همچنین احتمالاً بتوان از ترکیب این دو اسانس به‌عنوان کاهش‌دهنده مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها به‌منظور پیشگیری و حتی برای درمان بیماری لاکتوکوکوزیس استفاده کرد. البته لازمه انجام این کار، مطالعات گسترده‌تر در شرایط مزرعه و درون‌تنی (invivo)، مشخص کردن دوز مؤثر آن، مکانیسم اثر و بررسی اثرات سوء احتمالی آن است.

سپاسگزاری

نویسندگان از همکاری و حمایت‌های شرکت پارس ایمن دارو در اجرای مطالعه حاضر تقدیر و تشکر به عمل می‌آورند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Hatha M, Vivekanandhan A A, Joice G J. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. Int J Food Microbiol. 2005; 98(2): 131-134. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.017
2. Vendrell D, Balcázar J L, Ruiz-Zarzuela I, De Blas I, Gironés O, Múzquiz J L. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2006; 29(4): 177-198. doi: 10.1016/j.cimid.2006.06.003
3. Soltani M, Nikbakht G, Ebrahimzadeh Moussavi H A, Ahmadzadeh N. Epizootic outbreak of lactococcosis caused by Lactococcus garvieae in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. Bull Eur Assoc Fish Pathol. 2008; 28(5): 95-106.
4. Seyfried E E, Newton R J, Rubert K F, Pedersen J A, McMahon K D. Occurrence of tetracycline resistance genes in aquaculture facilities with varying use of oxytetracycline. Microb Ecol. 2010; 59(4): 799-807. doi: 10.1007/s00248-009-9624-7
5. Cabello F C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Environ Microbiol. 2006; *8*(7): 1137-1144. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x
6. Syahidah A, Saad C R, Daud H M, Abdelhadi Y M. Status and potential of herbal applications in aquaculture: A review. Iran J Fish Sci. 2015; 14(1): 27-44. doi: 20.1001.1.15622916.2015.14.1.3.0
7. Yavari A, Shokrpour M, Tabrizi L, Hadian J. Analysis of morphological variation and general combining ability in half sib families of *Echinacea purpurea* L. Iran J Hortic Sci. 2017; 47(4), 617-630. doi: 10.22059/IJHS.2017.119292.723
8. Linde K, Barrett B, Wolkart K, Bauer R, Melchart D. Echinacea for preventing and treating the common cold. Cochrane Database Syst Rev. 2006; Issue 1. Art. No.: CD000530. doi: 10.1002/14651858.CD000530.pub2
9. Burger R A, Torres A R, Warren R P, Caldwell V D, Hughes B G. Echinacea-induced cytokine production by human macrophages. Int J Immunopharmacol. 1997; 19(7): 371-379. doi: 10.1016/s0192-0561(97)00061-1
10. See D M, Broumand N, Sahl L, Tilles J G. In vitro effects of echinacea and ginseng on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients. Immunopharmacology. 1997; 35(3): 229-235. doi: 10.1016/s0162-3109(96)00125-7
11. Babaalian Amiri A, Azari Takami G, Afsharnasab M, Zargar A, The effect of different levels of Mix oil on growth performance and survival rate of Oncorhynchus mykiss in challenging with Yersinia ruckeri. J Anim Environ. 2020; 12(3): 259-264. doi: 10.22034/aej.2020.117943
12. Vazirian M, Mohammadi M, Farzaei M H, Amin G, Amanzadeh Y. Chemical composition and antioxidant activity of *Origanum vulgare subsp. vulgare* essential oil from Iran. Res J Pharmacogn. 2015; 2(1): 41-46.
13. Saeed S, Tariq P. Antibacterial activity of oregano (*Origanum vulgare* Linn.) against gram positive bacteria. Pak J Pharm Sci. 2009; 22(4): 421-424. PMID: 19783523
14. Mahboubi M, Feizabadi M. The antimicrobial activity of thyme, sweet marjoram, savory and eucalyptus oils on *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*. JMP. 2009; 2 (30): 137-144.
15. Stojković D, Glamočlija J, Ćirić A, Nikolić M, Ristić M, Šiljegović J, Soković M. Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils. Arch Biol Sci. 2013; 65(2): 639-643. doi: 10.2298/ABS1302639S
16. Soltani M, Ghodratnama M, TAHERI M A, Zargar A, Rouhollahi S H. The effect of *Zataria multiflora Boiss* and *Rosmarinus officinalis* essential oil on *Streptococcus iniae* isolated from rainbow trout farms. J Vet Microbiol. 2013; 9(26): 1-13.
17. Roomiani L, Soltani M, Akhondzadeh Basti A, Mahmoodi A, Taheri Mirghaed A, Yadollahi F. 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. Iran J Fish Sci. 2013; 12(3): 702-716.
18. Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo MS. Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. Fish Shellfish Immunol. 2010; 28: 354-361. doi: 10.1016/j.fsi.2009.11.013
19. Soltani M, Zarifmanesh T, Zorriehzahra S.J. Effect of *Zataria multiflora* essential oils on rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) complement component activity and lysozyme. I S Fish Sci. 2012; 4: 13-23. doi: 10.22092/ISFJ.2017.110083
20. Davood N. Antibacterial activity of some medicinal plants against fish pathogenic *Aeromonas sp*. isolated from farmed common carp (*Cyprinus carpio*). J Tishreen edu sy Biol Sci Series. 2011; 33(3): 181-193.
21. Zheng Z L, Tan J Y W, Liu H Y , Zhou X H, Xiang X, Wang K Y. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum L.*) on growth, antioxidant effect and resistance against Aeromonas hydrophila in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) .Aquac. 2009; 292: 214–218. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.04.025
22. Mahmoodi A, Roomiani L, Soltani M, AkhondzadeBasti A, Kamali A, Tehrani S. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils and extracts from *Rosmarinusofficinalis*, *Zataria multiflora*, *Anethumgraveolens* and *Eucalyptus globulus*. Glob Vet, 2012; 9: 73-79.
23. Soltani M, Mohamadian S, Ebrahimzahe-Mousavi H A, Mirzargar S S, Taheri-Mirghaed A, Rouholahi S M, Ghodratnama M. Shirazi thyme (*Zataria multiflora*) essential oil suppresses the expression of the epsD capsule gene in *Lactococcus garvieae*, the cause of lactococcosis in farmed fish .Aquac. 2014; 433:143–147. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.05.024
24. Soltani M, Mohamadian S, Rouholahi S H, Soltani E, Rezvani S. Shirazi thyme (*Zataria multiflora*) essential oil

suppresses the expression of PavA and Hly genes in *Lactococcus garvieae*, the causative agent of lactococcosis in farmed fish. Aquac. 2015; 442: 74-77. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.03.001

25. Sharif Rohani M l, Dashtiannasab A, Ghaednia B, Mirbakhsh M, Yeganeh V, Vahabnezhad A. Investigation of the possibility use of *Zataria multiflora* (Avishan-e Shirazi) essence in control of fungal contamination of cultured shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Iran J Fish Sci. 2013; 12(2): 454-464.
26. Kav K, Erganis O. Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* in rainbow trout *(Oncorhyncus mykiss)* farms. Bull Vet Inst Pulawy. 2008; 52: 223-226.
27. Sivropoulou A, Papanikolaou E, Nikolaou C, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils. J Agric Food Chem. 1996; 44(5): 1202-1205. doi: 10.1021/jf950540t
28. Ultee A, Bennik M, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Appl Environ Microbiol. 2002; 68(4): 1561-1568. doi: 10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002
29. Jamshidi S, Andargani S, Oraei M. Antibacterial effect of flower essential oils and plant organs' extracts of purple coneflower on the bacterium *Xanthomonas arboricola pv. Juglandis*, Mod. Sci Sustain Agric J. 2014; 10(2): 11-19.
30. Mora-Sánchez B, Fuertes H, Balcázar J L, Pérez-Sánchez T. Effect of a multi-citrus extract-based feed additive on the survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following challenge with *Lactococcus garvieae.* Acta Vet Scand. 2020; 62: #38. doi: 10.1186/s13028-020-00536-0
31. Zargar A, Rahimi-Afzal Z, Soltani E, Taheri Mirghaed A, Ebrahimzadeh-Mousavi H A, Soltani M, Yuosefi P. Growth performance, immune response and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed Thymus vulgaris essential oils. Aquac Res. 2019; 50 (11): 3097-3106, doi: 10.1111/are.14243
32. Patel P, Patel B, Amarasen N, Joshi B, Shah R, Krishnamurthy R. Isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from the fish gut for in vitro fermentation with carbohydrates from agro-industrial waste. J Btre. 2020; 28: e00555. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00555
33. Zaheri Abdevand L, Soltani M, Shafiei S. Adjuvant effect of Licorice (*Glycyrrhiza glabra*) extract on the efficacy of lactococcosis vaccine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iran J Fish Sci. 2021; 20 (3): 646-662.
34. Gholamhosseini A, Hosseinzadeh S, Soltanian S, Banaee M, Sureda A, Rakhshaninejad M, Heidari A, Anbazpour H, Effect of dietary supplements of *Artemisia dracunculus* extract on the haemato-immunological and biochemical response, and growth performance of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquac Res. 2021; 52: 2097-2109. doi: 10.1111/are.15062
35. Saıd O, Aksut Y, Yardımcı R E, Karataş Steınum S, Yiğit H, Tel A Z, Arda N. Antioxidant and antibacterial activities of methanol extracts from various plant parts of pomegranate and pnatolian black pine. CUPMAP. 2022; 5(1): 50-62. doi: 10.38093/cupmap.1122429.
36. Alinezhad S. Effects of diets containing dry extracts of *Achillea millefolium*, *Mentha piperita* and *Echinacea purpurea* on growth, hematological and immunological indices in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). Iran J Aqua Anim Health. 2019; 5(1): 1-16.
37. khajehpour A, Javadian R. Effects of orally-administered *Echinacea purpurea* on growth indices, hematology and innate immunity in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). Aqua Anim Nutr. 2020; 6(1): 13-25. doi: 10.22124/janb.2020.17007.1094
38. Akbary P, Kakoolaki S. Growth, hematological, innate immune responses of *Mugil cephalus* fed with *Echinacea purpurea*-supplemented diet against *Photobacterium damselae* infections. Int J Environ Sci Technol. 2019; 16: 325-334. doi: 10.1007/s13762-017-1578-6

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 77, Number 4, 2023
Homepage: jvr.ut.ac.ir
Online ISSN: 2251-6190
University of Tehran Press
Original Article

Study of In-Vitro Antimicrobial Effects of *Origanum vulgare* and *Echinacea purpurea* Essential Oils on *Lactococcus garvieae*

Ashkan Zargar[1]✉, Mehrdad Ardeshiri[1]✉, Alireza Khosravi[2]✉, Ali Taheri Mirghaed[1]✉, Hessameddin Akbarein[3]✉, Mehran Ahmadpour[4]✉, Ali Haddadi[4]✉

[1] *Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[2] *Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[3] *Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[4] *Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*

10.22059/jvr.2022.276558.2910
Received: *28 September 2022,* ***Accepted:*** *26 November 2022*

Abstract

BACKGROUND: There is growing evidence that resistance to antibiotics is increasing, and because of their wide range of negative impacts on the environment and humans, also accumulative effects in fish meat and hazards for humans, there have been numerous studies conducted using medicinal plants as a healthier alternative to antibiotics.
OBJECTIVES: This study examined the antibacterial effect of two native medicinal herbs (oregano and echinacea mixed essential oil) on *Lactococcus garvieae* compared with some commercial antibiotics used in fish farms.
METHODS: The antibacterial activities against a fish bacterial pathogen (*Lactococcus garvieae*) were tested using the disk diffusion method, followed by the determination of minimum inhibitory (MIC) and bactericidal (MBC) concentrations via sequential dilution of essential oil by broth micro dilution method.
RESULTS: The results showed antimicrobial activities of mentioned mixed essential oil with MIC ≥ 6.25 μL/mL and MBC ≥ 12.5 μL/mL. Also, the measurements of the diameter of inhibitory zones are consistent with the results of MIC and MBC, indicating the positive effect of this plant mix oil *Lactococcus garvieae*. However, the *Lactococcus garvieae* was more sensitive to enrofloxacin (NFX 5), and sulfamethoxazole & trimethoprim (SXT) (P<0.05), but the combination of oregano and echinacea essential oils performed better than florfenicol (FF) despite the weaker effects against mentioned two antibiotics.
CONCLUSIONS: The results approved the antibacterial activity of the mixed essential oil of oregano and echinacea against *Lactococcus garvieae* on the laboratory scale. Using these compounds as a possible substitute for antibiotic compounds requires more clinical studies.
Keywords: *Antimicrobial Effects, Echinaceae purpurea,* MBC, MIC, *Lactococcus garvieae, Origanum vulgare*

Copyright © 2023. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author: Ashkan Zargar, Tel/Fax: 021-61117091 / 021-66933222

How to cite this article:

Zargar A, Ardeshiri M, Khosravi A, Taheri Mirghaed A, Akbarein H, Ahmadpour M, Hadadi A. Study of In-Vitro Antimicrobial Effects of *Origanum vulgare* and *Echinacea purpurea* Essential Oils on *Lactococcus garvieae*. J Vet Res, 2023; 77(4): 213-220. doi: 10.22059/jvr.2022.276558.2910

Figure Legends and Table Captions

Graph 1. Disc diffusion test compares antibiotics and antibiofin sensitivity against *Lactococcus garviae* (P<0.05). NFX: *Enrofloxacin, SXT:* Sulfamethoxazole and trimethoprim, FF: florfenicol.
Graph 2. Colony count results of *Lactococcus garvieae* in different densities of antibiofin.
Figure 2. C. The phenytoin treatment group on day 14.
Figure 2. D. The control group on day 14.