DOI: 10.22055/IVJ.2022.341161.2464

بررسی تأثیر اسانس انیسون (*Pimpinella anisum*) بر جدایه‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* تعیین هویت شده به روش PCR

فریدون حسنی[1*]، رحیم پیغان[2]، طاهره عبیاوی[1]، مجتبی علیشاهی[2] و علی طاهری‌میرقائد[3]

[1] دانش‌آموخته دکتری بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[2] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[3] استاد گروه بهداشت و بیماری آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

دریافت: ۱۴۰۱/۲/۱۶ پذیرش: ۱۴۰۱/۳/۱۸

چکیده

اسانس‌ها ترکیبی از روغن‌های فراری هستند که به عنوان یک متابولیت ثانویه در گیاهان ساخته می‌شوند. اسانس انیسون به دلیل فعالیت ضدمیکروبی خود در برابر چندین باکتری بیماری‌زا شناخته شده است. پاتوژن‌های باکتریایی آبزیان از جمله عوامل تأثیرگذار بر میزان تولید در مزارع پرورش ماهیان به حساب می‌آیند. هدف از تحقیق حاضر، تشخیص عوامل بیماری‌زای باکتریایی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و همچنین بررسی فعالیت ضدباکتریایی اسانس انیسون بر روی این باکتری‌ها بود. در این مطالعه دو باکتری بیماری‌زا شامل *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* از کلیه قدامی ماهیان زنده پس از آسان‌کشی جداسازی و خالص‌سازی شد و به وسیله آزمایش PCR تعیین هویت شدند، سپس فعالیت ضد باکتریایی اسانس انیسون علیه این عوامل بیماری‌زا به روش ماکرودایلوشن براث مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس یافته‌ها، نتایج PCR نشان‌دهنده میزان شیوع بالای *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* در استخرهای پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است، تأثیر اسانس انیسون بر روی باکتری‌های مورد آزمایش حاکی از حداقل غلظت بازدارندگی از رشد برای *استرپتوکوکوس اینیایی* ۰/۱۹µl/ml و این مقدار برای *لاکتوکوکوس گارویه* µl/ml ۰/۳۱۲ بود. قطر هاله عدم رشد تحت تأثیر اسانس انیسون برای این باکتری‌های گرم مثبت با قطر هاله عدم رشد تحت تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد مقایسه قرار گرفت و نتایج بیان‌گر اختلاف معنی‌دار اسانس انیسون در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌ها بود که نشان‌دهنده پتانسیل قابل توجه اسانس انیسون در مهار رشد باکتری‌های مذکور بوده است و به همراه تشخیص سریع عوامل بیماری‌زا در موفقیت آبزی‌پروری نقش مؤثری داشته باشد.

کلمات کلیدی: باکتری، ماهی، PCR، اسانس انیسون، آنتی‌بیوتیک

مقدمه

با توجه به افزایش موارد مقاومت دارویی در میکروارگانیسم‌ها، راه حل مناسب در این موضوع جایگزینی کردن موادی با عملکرد مناسب و متفاوت علیه میکروب‌ها می‌باشد. از جمله این مواد دارویی که می‌تواند مورد مصرف انسان قرار گیرد و دارای حداقل اثر جانبی باشند، اسانس‌های گیاهی می‌باشند. اسانس‌ها به دلیل دارا بودن ترکیبات منحصر به فرد خود توانایی مقابله علیه طیف گسترده‌ای از میکروب‌ها، تک‌یاخته‌ها و حشرات را دارا

*نویسنده مسئول: فریدون حسنی، دانش‌آموخته دکترای بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
E-mail: Fredunhassani@yahoo.com

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

می‌باشند (Kalemba and Kunicka, 2003; Bakkali et al, 2008). انیسون (Anise) معروف به بادیان یک ادویه معروف و از گیاهان دارویی متعلق به خانواده Apiaceae است که در صنایع غذایی، داروسازی و عطرسازی استفاده می‌شود (Abdel-Reheem and Oraby, 2015). اسانس انیسون عمدتاً حاوی فنیل پروپانوئیدهای فرار مانند آنتول (تقریباً ۹۰ درصد اسانس) به عنوان عامل فعال، انیسالدئید، استراگول و اوژنول است (Ullah and Honermeier, 2013). *استرپتوکوکوس اینیایی* عامل بیماری استرپتوکوکوزیس در ماهیان است که منجر به زیان اقتصادی فراوانی در حدود ۲۳ میلیارد دلار در سال می‌شود (Zheng et al, 2018; Wang et al, 2020). *استرپتوکوکوس اینیایی* به خاطر زئونوز بودن (مشترک بین دام و انسان) از اهمیت زیادی برخوردار است و باعث تأثیرات زیان‌آوری برای پرورش‌دهندگان و افرادی که با ماهی آلوده سر و کار دارند می‌شود و در نهایت ایجاد کننده عواقب مضر در سلامت عمومی است (Sun et al, 2012).

لاکتوکوکوس گارویه یکی از جنس‌های *لاکتوکوکوس* محسوب می‌شود (Cai et al, 2016). جنس لاکتوکوکوس شامل ۲۱ گونه است که *لاکتوکوکوس لاکتیس* و *لاکتوکوکوس گارویه* شناخته شده‌ترین آن‌ها هستند. *لاکتوکوکوس لاکتیس* برای انسان و حیوانات بی خطر است و معمولاً در صنایع لبنی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Allende et al, 2020; Francés et al, 2022). *لاکتوکوکوس گارویه* که تنها گونه بیماری‌زای جنس لاکتوکوکوس است باعث یک فرآیند سپتی‌سمی به نام لاکتوکوزیس می‌شود و اولین بار در قزل‌آلای رنگین‌کمان در ژاپن گزارش شد (Vendrell et al, 2006). گونه‌های *Oncorhynchus* متعلق به خانواده آزادماهیان است و معمولاً به عنوان قزل‌آلای رنگین‌کمان شناخته می‌شوند و بومی سواحل اقیانوس آرام، آمریکای شمالی و روسیه است که به منظور تأمین غذا و ماهی‌گیری تفریحی پرورش می‌یابد (Bhandari et al, 2019). از بین گونه‌های مختلف آزادماهیان، ماهی قزل‌آلای رنگین کمان از حساسیت بیش‌تری برخوردار بوده، بنابراین خسارات اقتصادی ناشی از بیماری در بسیاری از مناطقی که آزادماهیان به ویژه قزل‌آلای رنگین کمان پرورش داده می‌شود، قابل توجه است (Austin and Austin, 2016; Carson and Wilson, 2009). گزارش‌های مختلفی حاکی از پراکنش بیماری و توسعه آن در مزارع پرورشی آبزیان وجود دارد (Vazirzadeh et al, 2019; Soltani et al, 2020). با توجه به اهمیت تأمین نیازهای غذایی بشر، ارزش غذایی بالا و ضریب تبدیل غذایی پایین‌تر صنعت پرورش ماهیان نسبت به دام و طیور، لازم است اقدامات مؤثری در شناسایی، تعیین هویت عوامل بیماری‌زا با روش‌های تشخیصی دقیق و سریع مانند روش‌های مولکولی (PCR) و همچنین پیش‌گیری و درمان آن‌ها جهت رشد این صنعت انجام شود، بدین جهت این تحقیق در راستای تشخیص و تعیین هویت برخی از عوامل بیماری‌زای باکتریایی و بررسی استفاده از اسانس‌ها به عنوان ترکیبات طبیعی برای مبارزه با این باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

این تحقیق از آبان ۱۳۹۸ تا اردیبهشت ۱۳۹۹ انجام شد. نمونه‌برداری از مزارع فعال پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در استان‌های البرز، چهارمحال و بختیاری و کهگیلویه و بویراحمد به صورت موردی (در صورت اطلاع‌رسانی مدیر مزرعه) و به مدت شش ماه از ماهیان به ظاهر سالم و بیمار (دارای علایم اگزوفتالمی، شنای نامنظم، تیرگی بدن و زخم‌های پوستی) صورت گرفت. مزارع سردآبی فعال که از آن‌ها نمونه‌برداری صورت گرفت، شامل ۹ مجموعه پرورش ماهی بود.

به منظور جداسازی عوامل بیماری‌زای باکتریایی، از هر مزرعه ۲۰ ماهی به صورت زنده پس از آسان‌کشی، کشت باکتری تحت شرایط استریل و زیر هود از کبد، کلیه، مغز و طحال آن‌ها طبق روش‌های استاندارد (Buller, 2014) انجام گرفت. پس از کالبدگشایی از ماهیان لوپ حاوی

نمونه‌برداری از هر اندام جداگانه بر روی پلیت‌های حاوی محیط مغذی Tryptic Soy Agar (TSA) تلقیح و سپس در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرم-خانه‌گذاری شدند. بعد از طی زمان گرم‌خانه‌گذاری کلونی‌های رشد یافته بر روی هر محیط کشت بررسی و کلنی‌های مشکوک به هر باکتری بر روی محیط TSA به روش کشت چهار منطقه‌ای خالص‌سازی شد.

پس از خالص‌سازی، تشخیص اولیه باکتری‌ها با استفاده از آزمایش‌های مرسوم بیوشیمیایی برای هر پرگنه‌های خالص‌سازی شده، انجام شد. پس از رنگ‌آمیزی گرم جدایه‌های گرم مثبت که کاتالاز و اکسیداز منفی جهت بررسی‌های مولکولی، ژنوم آن‌ها با حرارت استخراج گردید. برای این کار، از دو تا سه کلنی از کشت ۲۴ ساعته باکتری، در آب مقطر سوسپانسیونی تهیه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموبلاک (کیاژن، ایران) جوشانده شد و پس از ۲ دقیقه سانتریفوژ در دور ۶۰۰۰ rpm، مایع رو به عنوان DNA در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با به کارگیری پرایمرهای اختصاصی استفاده شد (Buller, 2014;Tarr et al, 2007).

برای شناسایی جدایه‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* از روش توصیه شده توسط Mata و همکاران سال ۲۰۰۴ استفاده شد. برای این کار از یک جفت پرایمر که ناحیه ۸۷۰bp ژن lctO باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* را شناسایی می‌نماید استفاده شد (Table 1).

Table 1: Primers used for PCR and sequencing of the Lactate oxidase

Primer	(5'- 3') Sequence	Target gene	Amplicon size (bp)	Pathogen	Reference
LOX-1	AAG GGG AAA TCG CAA GTG CC	lctO	870	*S. iniae*	Mata *et al*. (2004)
LOX-2	ATA TCT GAT TGG GCC GTC TAA				

برای شناسایی جدایه‌های *لاکتوکوکوس گارویه* از روش توصیه شده توسط Zlotkin و همکاران در سال ۱۹۹۸ استفاده شد. که ناحیه ۱۱۰۰bp ژن 16S rRNA باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* را شناسایی می‌نماید (Table 2).

Table 2: Primers used for PCR and sequencing of the 16S rRNA

Primer	Sequence (5'- 3')	Target gene	Amplicon size (bp)	Pathogen	Reference
pLG -1	CGC AAT GAG AAT AAC CAT	16S rRNA	1100	*garvieae L*	Zlotkin et al (1998)
pLG -2	G GTT CGG TCG CCC GCA				

مراحل و مواد برای آزمایش PCR، در هر واکنش از ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (سیناژن، ایران)، ۶/۵ میکرولیتر آب مخصوص PCR، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکومول، سیناژن، ایران) و ۴ میکرولیتر (۱۰ پیکومول) از DNA استخراج شده برای رسیدن به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر استفاده گردید. با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (اپندورف آلمان) برنامه دمایی طبق Table 3 برای باکتری‌ها انجام شد.

Table 3: Temperature program

Bacteria / Step	*Streptococcus iniae*			*Lactococcus garvieae*		
	Temperture	Time	Number of cycles	Temperture	Time	Number of cycles
Initial denaturation	95 C°	5 Min	1	95 C°	5 Min	1
Denaturation Annealing Extension	95 C° 55 C° 72 C°	30 Sec 30 Sec 1 Min	35	94 C° 56 C° 72 C°	45 Sec 1 Min 1 Min	30
Final extension	72 C°	5 Min	1	72 C°	5 Min	1

پس از طی چرخه‌های دمایی و تکثیر ژن مورد هدف، محصول PCR همراه با کنترل‌های مثبت *استرپتوکوکوس اینیایی* GQ850377 و *لاکتوکوکوس گارویه* GQ850376 و کنترل منفی، به مقدار ۵ میکرولیتر در کنار نردبان ژنی bp ۱۰۰ (سیناژن، ایران) به طور جداگانه به چاهک‌های ژل آگارز ۱ درصد، حاوی رنگ Safe Stain (سیناژن، ایران) اضافه شد و در ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۳۵ دقیقه الکتروفورز گردید در نهایت به منظور بررسی تشکیل باندها بر روی آن، ژل الکتروفورز شده به آرامی به دستگاه ژل داک (Uvitec، انگلستان) دارای نور UV منتقل شد.

در این مطالعه ۱۰۰ گرم از دانه گیاه انیسون پس از خریداری از رویشگاه‌های طبیعی و تأیید، به طور طبیعی خشک و آسیاب شد پودر به دست آمده در بالن یک لیتری ریخته شد و ۶۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به آن افزوده شد. اسانس با استفاده از دستگاه کلونجر (Clevenger) استخراج و توسط فیلتر استریل (۰/۴ میکرومتر) صاف و تا زمان استفاده در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Sivam, 2001).

برای تعیین MIC و MBC از روش ماکرودایلوشن براث استفاده شد. بدین منظور، ابتدا ۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع (TSB) در لوله‌های آزمایشگاهی استریل گردید سپس رقت‌های متوالی از اسانس تهیه شد (۱۰ تا ۰/۰۰۹ میکرولیتر بر میلی‌لیتر)، پس از تلقیح ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل مک فارلند یک (غلظت تقریبی CFU/ml $۱۰^{۸}\times$ ۳) به محیط آبگوشت رقیق شده ۲۴ ساعت انکوباسیون شد و با کدورت‌سنجی چشمی و اسپکتروفتومتری، پایین‌ترین غلظتی که هیچ‌گونه کدورتی در آن مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت‌مهارکنندگی از رشد (MIC) تعیین گردید. برای مشخص کردن حداقل غلظت‌کشندگی (MBC) از رقت MIC، یک رقت بالاتر و یک رقت پایین‌تر به مقدار ۱۰ میکرولیتر به محیط ژلوز خون‌دار اضافه و با پیپت پاستور استریل کشت سطحی انجام شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری و پس از آن کم‌ترین رقتی که در آن هیچ‌گونه باکتری رشد نکرد به عنوان حداقل غلظت باکتری‌کشی تعیین شد (Soltani et al, 2013).

از سوسپانسیون باکتریایی با کدورت استاندارد نیم مک فارلند (غلظت تقریبی CFU/ml $۱۰^{۸}\times$ ۱/۵) در شرایط کاملاً سترون با سوآب به صورت سطحی بر روی محیط ژلوز خون‌دار کشت داده شد. سپس، ۱۰ میکرولیتر از اسانس انیسون به دیسک بلانک اضافه شد. در این مطالعه، از دیسک‌های آنتی بیوتیکی مختلف (۱۰میکروگرم در هر دیسک) برای کنترل مثبت استفاده شد. سپس در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. پس از گذشت این زمان قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد (Soltani et al, 2013).

برای محاسبات آماری از نرم افزار SSPS 21 استفاده گردید. برای مقایسه بین تیمارها از آنالیز واریانس یک طرفه و برای معنی‌دار بودن تفاوت قطر هاله‌ها از تست تکمیلی دانکن (Duncan) در سطح معنی‌دار $P<۰/۰۵$ استفاده گردید.

نتایج

نتایج آزمایش PCR با استفاده از جفت پرایمرهای مورد اشاره که منجر به تشکیل باند با وزن مولکولی ۸۷۰bp شد به عنوان سویه‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* (در مجموع ۷ سویه) و تشکیل باند در ناحیه ۱۱۰۰bp *به عنوان سویه‌های لاکتوکوکوس گارویه* (در مجموع ۴ سویه) در نظر گرفته شد، برای نمونه‌های کنترل مثبت (Positive control) نیز باندهای مورد نظر تشکیل گردید، در صورتی که در کنترل منفی (Negative control) هیچ باندی تشکیل نشد (Figure 1 & 2).

در این پژوهش حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد (MIC)، حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) و فعالیت ضدباکتریایی اسانس انیسون بر تمامی باکتری‌های تعیین هویت شده *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار گفت. نتایج نشان داد که MIC اسانس انیسون بر تمامی باکتری‌های گرم مثبت *استرپتوکوکوس اینیایی* به طور میانگین ۰/۰۱۹µl/ml و *لاکتوکوکوس گارویه* ۰/۳۱۲ µl/ml بود. MBC این اسانس برای باکتری‌های فوق‌الذکر به ترتیب ۰/۰۳۹ و ۰/۶۲۵ µl/ml بود (Table 4).

قطر هاله عدم رشد تحت تأثیر اسانس انیسون برای این باکتری‌های گرم مثبت با قطر هاله عدم رشد تحت تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، تتراسایکلین و پنی‌سیلین مورد مقایسه قرار گرفت (Table 5).

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، قطر هاله عدم رشد باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* به واسطه تأثیر اسانس انیسون در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده دارای اختلاف معنی‌داری بود (P<۰/۰۵) و هاله عدم رشد تحت تأثیر اسانس انیسون در سطح بالاتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده مشاهده شد. قطر هاله عدم رشد باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* تحت تأثیر اسانس انیسون در مقایسه با آنتی‌بیوتیک اریترومایسین در سطح پایین‌تری بود و اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و پنی‌سیلین مقاوم بود و هاله عدم رشد مشاهده نگردید.

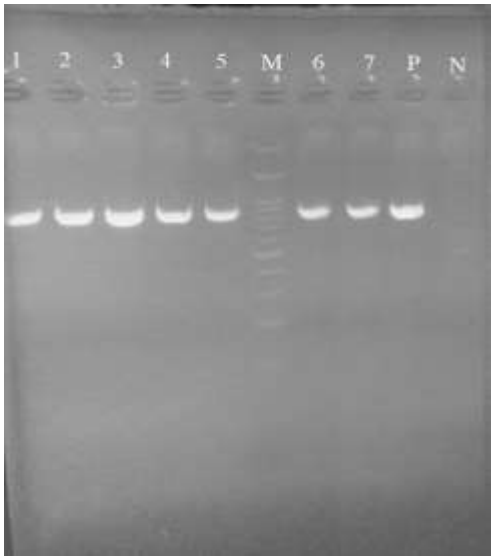

Figure 1: agarose gel PCR analysis of *Streptococcus iniae* DNA, M: 100 bp indicator, 1-7: samples, P: positive control , N-: negative control.

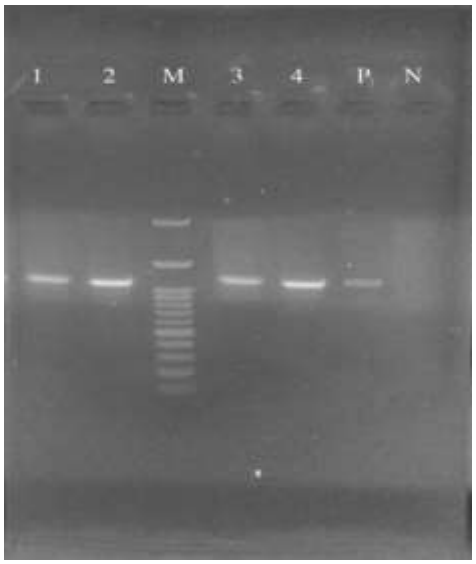

Figure 2: agarose gel PCR analysis of *Lactococcus garvieae* DNA, M: 100 bp indicator, 1-4: samples, P: positive control, N-: negative control

Table 4: Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of anise essential oil

Concentration µl/ml / Bacteria	10	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0.078	0.039	0.019	0.009
Streptococcus iniae	−	−	−	−	−	−	−	−	MBC	MIC	+
Lactococcus garvieae	−	−	−	−	MBC	MIC	+	+	+	+	+

Table 5: diameter of growth inhibition zone (in millimeters) of anise essential oil on gram-positive bacteria compared to antibiotics

Essence and Antibiotics / Bacteria	Essential oil of anise (10µl)	*Erythromycin*	*Tetracycline*	*Penicillin*
		Concentration of antibiotics is 10 micrograms per disc		
Streptococcus iniae	33 ± 1 [a]	25.33 ± 0.57 [b]	11.66± 0. 57[c]	15 ± 1[d]
Lactococcus garvieae	20.66 ± 1.15 [a]	23.33 ± 0.57 [b]	0 ± 0 [c]	0 ± 0 [c]

Different letters indicate statistically significant differences (P≤0.05).

بحث

فعالیت‌های آبزی‌پروری نقش مهمی در امنیت زیستی و تأمین نیازهای غذایی بشر از جمله پروتئین دارد. با توجه به شرایط اقلیمی مناسب ایران، دسترسی به آب‌های دریایی (برای پرورش ماهی در قفس) و رودخانه‌های فراوان، پرورش ماهی می‌تواند نقش مهمی در تأمین نیازهای غذایی و فعالیت‌های اقتصادی ایفا کند. از آن جایی که بیماری مهم‌ترین عامل عدم گسترش و موفقیت در این صنعت می‌باشد، پیش‌گیری با تشخیص سریع عوامل بیماری‌زا و کنترل به منظور جلوگیری از تلفات در ماهیان می‌تواند به رونق بخشیدن این صنعت کمک فراوانی کند. با توجه با این که نشانه‌های بالینی در اکثر بیماری‌های خون-ریزی‌دهنده غیراختصاصی است جهت تعیین هویت و کنترل سریع عوامل بیماری‌زا برای کاهش تلفات ناشی از آن، استفاده از تست‌های بیوشیمیایی باکتری‌شناسی و آزمایش مولکولی PCR ضروری است. بنابراین پیش‌گیری، کنترل و ریشه‌کنی این بیماری ضروری است. تحقیق حاضر به منظور بررسی آلودگی مزارع قزل‌آلای رنگین کمان به باکتری‌های گرم مثبت *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* انجام گرفت و با تشخیص مولکولی وجود باکتری‌ها در تلفات مزارع مورد مطالعه محرز گردید، سپس تأثیر اسانس انیسون بر تمامی باکتری‌ها در مقایسه با تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های رایج بر آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفت. در مطالعه Soltani و همکاران (۲۰۱۵) که بر روی بررسی شیوع استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس در مزارع پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در استان‌های فارس و لرستان با استفاده از روش‌های باکتریولوژی و مولکولی انجام شد نتایج بیان‌گر وقوع این بیماری‌ها در ۳۰ مزرعه (۱۵ مزرعه پرورش ماهی در استان فارس و ۱۵ مزرعه پروش ماهی در استان لرستان) و همچنین مقدار لاکتوکوکوزیس بالاتر از استرپتوکوکوزیس گزارش شد. در تحقیقی که توسط Taheri Mirghaed و همکاران در سال ۱۳۹۵ بر روی مطالعه وضعیت ابتلا ماهیان قزل آلای رنگین کمان پرورشی به *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* در برخی میادین عرضه ماهی تهران و کرج انجام شد نمونه‌برداری از ماهیان با علایم ظاهری غیرطبیعی و آزمون‌های میکروبی بر روی آن‌ها انجام گرفت پس از جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌ها، شناسایی و تعیین هویت آن‌ها با استفاده از پرایمرهای 16SrRNA که ژن‌های باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* را در ناحیه ۱۱۰۰bp شناسایی می‌کند استفاده شد، نتایج حاصل حاکی از میزان بالای آلودگی ماهیان عرضه شده به استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس بود. در پژوهشی که توسط Hassani و همکاران در سال ۱۳۹۹ با عنوان بررسی مولکولی و بیوشیمیایی نقش *استرپتوکوکوس اینیایی* در تلفات باس دریایی آسیایی پرورشی (*Lates calcarifer*) در قفس‌های پرورشی خلیج فارس انجام گرفت بعد از جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌ها، با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و روش مولکولی (با پرایمرهای اختصاصی ژن lctO) حضور باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* مورد بررسی قرار گرفت، نتایج آزمایش PCR با استفاده از جفت پرایمر مورد اشاره منجر به تشکیل باند با وزن مولکولی ۸۷۰bp گردید، همچنین بررسی نتایج تعیین توالی

قطعه تکثیر شده با استفاده از بانک ژنی NCBI، نشان داد که عامل بیماری استرپتوکوکوزیس در ماهیان مراکز پرورش ماهیان در قفس در استان‌های حاشیه خلیج فارس *استرپتوکوکوس اینیایی* می‌باشد. در این تحقیق به کارگیری روش‌های نمونه‌برداری و تشخیصی باکتری با استفاده از پرایمرهای ژن 16SrRNA و lctO برای شناسایی باکتری‌های *لاکتوکوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوس اینیایی* با مطالعات انجام شده تطبیق دارد و از یافته‌های موجود به این نتیجه می‌توان رسید که عامل استرپتوکوزیس و لاکتوکوزیس در ماهیان، در فلور آب‌های ایران موجود میباشد و استفاده از روش‌های تشخیصی سریع می‌تواند به کنترل و درمان بیماری در ابتدای ظهور در سیستم‌های پرورشی کمک شایانی کند.

مصرف گیاهان دارویی برای درمان، سابقه‌ای به قدمت عمر انسان دارد. در سال‌های اخیر، کاربرد گیاهان دارویی با توجه به عوارض و هزینه کمتر و سازگاری بیماران با این داروها و به لحاظ وجود اثرات جانبی شناخته شده برای داروهای شیمیایی، افزایش یافته است. اگر چه امروزه بخش عظیمی از داروهای مصرفی شیمیایی است اما دست کم یک‌سوم همه فرآورده‌های دارویی، منشأ گیاهی داشته و یا پس از استخراج از گیاه، تغییر شکل داده‌اند. مقاومت دارویی میکرو ارگانیسم‌ها که حاصل مصرف بی‌رویه داروها، خود درمانی و تجویز دارو توسط افراد غیرمتخصص است یکی از معضلات مهم صنعت آبزی‌پروری کشور می‌باشد (Buhner, 2012). 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 زیان‌آور و هزینه‌های وابسته به آن‌ها شود. مطالعه Abdel-Reheem در سال ۲۰۱۵ بر روی اثر ضدمیکروبی اسانس انیسون به روش انتشار در دیسک، علیه میکروارگانیسم‌های گرم مثبت و گرم منفی از جمله *استافیلوکوکوس ارئوس* (۱۵ میلی‌متر)، *اشرشیا کلی* (۱۵ میلی‌متر)، *سودوموناس آئروژینوزا* (۱۰میلی‌متر)، *کاندیدا آلبیکانس* (۱۰میلی‌متر)، *استرپتوکوکوس پیوژنس* (۱۲میلی‌متر)، *انتروکوکوس فیکالیس* (۱۶میلی‌متر)، *میکروکوکوس لوتئوس* (۱۴ میلی‌متر)، *سالمونلا تیفی* (۱۷ میلی‌متر) و حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد ۴-۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. در تحقیقی که توسط Fathi-Achachlouei در سال ۱۳۹۹، بر روی شناسایی ترکیبات انیسون و بررسی اثر آن بر روی برخی از پاتوژن‌های غذایی نظیر *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس ارئوس*، *اشرشیا کلی* و *سالمونلا تیفی موریوم* به روش میکرودایلوشن براث برای تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC) انجام شد، نتایج بیان‌گر دارا بودن قدرت ضدمیکروبی اسانس انیسون علیه پاتوژن‌های غذایی گزارش شد. MIC برای باکتری‌های گرم مثبت *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس ارئوس* به ترتیب برابر با ۰/۰۵ و ۰/۰۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از اسانس انیسون توانست از رشد باکتری‌های *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *اشرشیا کلی* ممانعت کند. در تحقیقی که توسط Al-Bayati و همکاران (۲۰۰۸) بر روی تأثیر هم‌افزایی اسانس آویشن‌باغی و انیسون و همچنین هم‌افزایی عصاره متانولی آن‌ها علیه ۹ باکتری بیماری‌زای گرم مثبت و گرم منفی به روش میکرودایلوشن براث جهت تعیین حداقل غلظت مهارکننده و کشنده باکتری (MIC، MBC) مورد بررسی قرار گرفت و نتیجه بیان‌گر فعالیت ضدباکتریایی علیه بیشتر باکتری‌ها گزارش شد.

در تحقیقی که توسط Chahardoli و همکاران در سال ۱۴۰۰ بر روی خواص ضدباکتریایی اسانس و عصاره‌ی الکلی انیسون علیه پاتوژن‌های باکتریایی *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در شرایط آزمایشگاهی به روش انتشار در دیسک آگار، حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) انجام گرفت اسانس انیسون در رقت‌های ۱/۳۲ گرم در میلی‌لیتر و عصاره الکلی آن در رقت‌های ۱/۴، ۱/۸ و ۱/۱۶ گرم در میلی‌لیتر به روش چاهک و دیسک، بیش‌ترین اثر ضدمیکروبی را

روی هر دو باکتری مورد مطالعه داشت. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) اسانس انیسون بر باکتری *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۱/۲۵۶ و ۱/۱۲۸ در میلی‌لیتر و MIC عصاره برای هر دو باکتری ۱/۱۶ و MBC عصاره برای *اشرشیا کلی* ۱/۸ و برای *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱/۴ میلی‌لیتر گزارش شد که طبق نتایج آن‌ها عصاره الکلی و اسانس انیسون تأثیر ضدمیکروبی خوبی از خود نشان داد.

در مطالعه‌ای که توسط Elshafie و همکاران (۲۰۲۲) انجام شد فعالیت ضدمیکروبی چهار اسانس گیاهی شامل آویشن، رازیانه، انیسون و مرزنجوش علیه برخی پاتوژن‌های جدا شده از فرآورده‌های گوشتی در پنج استان مصر مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج بیان‌گر فعالیت ضدمیکروبی وابسته به دوز در تمامی اسانس‌های مورد مطالعه در برابر برخی جدایه‌های میکروبی گزارش شد، بالاترین فعالیت ضدباکتریایی در برابر *سودوموناس فلورسنس* و *اشرشیا کلی* مربوط به اسانس آویشن و در برابر باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* بیش‌تر تأثیر ضدمیکروبی مربوط به اسانس مرزنجوش بود.

با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه که برای ارزیابی تأثیر اسانس انیسون بر روی باکتری‌های *لاکتوکوکوس گارویه* و *استرپتوکوکوس اینیایی* به روش ماکرودایلوشن براث و انتشار در دیسک در شرایط آزمایشگاهی انجام شد و تطبیق آن با مطالعات انجام شده مشخص شد اسانس انیسون دارای خواص ضدباکتریایی است و با مطالعات انجام شده همخوانی دارد و از این اسانس می‌توان برای ساخت داروهای ضد استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوزیس در آبزیان می‌توان استفاده نمود.

به طور کلی تفاوت در مقدار نتایج با سایر مطالعات انجام گرفته به عواملی نظیر محیطی و اقلیمی منطقه‌ای که گیاه در آن رشد می‌کند، روش‌های اسانس و عصاره‌گیری، روش تست میکروبی و تفاوت در سویه‌های مورد استفاده است.

اسانس انیسون با توجه به اثرات ضدباکتریایی مناسب روی باکتری‌های آسیب‌رسان ماهی در شرایط آزمایشگاهی، قابل رقابت با آنتی‌بیوتیک‌های مورد مصرف در آبزیان است لذا از اسانس گیاه انیسون می‌توان پس از آزمایش در شرایط طبیعی پرورش ماهیان، به عنوان یک عامل ضدباکتری در درمان عفونت‌های باکتریایی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه در اعطای پژوهانه (شماره SCU.vC98.413) کمک به اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع مالی

این پژوهش با استفاده از اعتبار تحقیقاتی شماره SCU.vC98.413 انجام گردید.

منابع

Abdel-Reheem, M. A., & Oraby, M. M. (2015). Anti-microbial, cytotoxicity, and necrotic ripostes of Pimpinella anisum essential oil. *Annals of Agricultural Sciences, 60*(2), 335-340.

Austin B., Austin D.A. 2016. Bacterial fish pathogens, disease of farmed and wild fish (6th Ed.). Switzerland: Springer. Bahadori N., Soltani M., Farahmand M., Mohammadan S., Soltani E. 2016. Protein pattern of Yersinia ruckeri isolates in some farmed rainbow trout (onchorhynchus mykiss). *Iranian Journal of Veterinary Research 12* (1), 5-12

Bakkali, F. Averbeck, S.Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils: a review. Food Chem Toxicol 2008;46(2):446-75.

Bhandari, A., Bhat, R. A. H., Tandel, R. S., Dash, P., Shah, T. K., Ganie, P. A., & Sarma, D. (2019). Investigation of acute toxicity and behavioural changes on Oncorhynchus mykiss, rainbow trout fry in response to ethanolic extract of Myrica esculenta. Phar. Inno. J, 8, 807-810.

Buhner, SH. Herbal antibiotics: natural alternatives for treating drug-resistant bacteria. 2nd ed. North Adams: Storey Publishing; 2012.

Buller, N. (2014). Bacteria and fungi from fish and other aquatic animals: a practical identification manual, Department of Agriculture and Food Western Australia. (2nd edi.). Includes bibliographical references and index. ISBN 978-1-84593-805-5

Carson, J. Wilson, T. (2009). Yersiniosis in fish. Aust New Zeal Stand Diagnostic Procedure 1-19.

Chahardoli, A. Foroughi,A. Nooriyan-soroor, M. E. (2020). in vitro Effects of essential oil and alcoholic extract of Anise (Pimipinella anisum) on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. In Persia

Elshafie, S. S., Elshafie, H. S., El Bayomi, R. M., Camele, I., & Morshdy, A. E. (2022). Evaluation of the antimicrobial activity of four plant essential oils against some food and phytopathogens isolated from processed meat products in Egypt. *Foods, 11*(8), 1159.

Fathi-Achachlouei, B. Babolanimogadam, N. Zahedi, Y. (2020). Identification of Anise (Pimpinella anisum L.) Essential Oil Compounds and Investigation of its Effect on Some Foodborne Pathogens: Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Escherichia coli O157: H7and Salmonella typhimurium

Hassani, F. Payghan, R. Alishahi,M. Ghorpanpour,M. Ahangarzadeh, M. (2020). Molecular and biochemical investigation of the role of streptococcus iniae in mortality of Lates calcarifer cages culturing in the Persian Gulf. In Persia

Kalemba, D. A. A. K., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry, 10*(10), 813-829

Mata, A. I, Gibello. A, Casamayor. A, Blanco. M. M. Domínguez, L. & Fernández-Garayzábal, J. F. (2004). Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. *Appl. Environ. Microbiol., 70*(5), 3183-3187.

Sharirfpour, I. Soltani, M. & Mazandarani, M. (2020). Histopathological features of infection by Streptococcus iniae in Persian sturgeon, Acipenser persicus. *Iranian Journal of Aquatic Animal Health, 6*(2), 39-48.

Soltani, M. & Tarahomi, M. (2008). Study of streptococcosis/lactococcosis in some farmed rainbow trout in Fars province, Iran. The first International Congress on Aquatic Animal Health Management and Diseases, Tehran, Iran. p.124.

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. (in Persian)

Soltani, M., PIRALI, K. E., TAHERI, M. A., Zargar, A., Mohamadian, S., Roohollahi, S., & Zakian, M. (2015). Study on Streptococcosis and Lactococcosis outbreaks in rainbow trout farms in Fars and Lorestan Provinces.

Sun, Y., Hu, Y. H., Liu, C. S., & Sun, L. (2012). Construction and comparative study of monovalent and multivalent DNA vaccines against Streptococcus iniae. *Fish & shellfish immunology, 33*(6), 1303-1310.

Taheri Mirghaed, A. Soltani,M. Mahmoodi, Z. Hosseini Shekarabi, P. (2016). Study of cultured rainbow trout contamination with Streptococcus iniae and Lactococcus garvieae in some fish markets of Tehran and Karaj (orginal reserch article). In Persia

Ullah, H., & Honermeier, B. (2013). Fruit yield, essential oil concentration and composition of three anise cultivars (Pimpinella anisum L.) in relation to sowing date, sowing rate and locations. *Industrial Crops and Products, 42*, 489-499.

Vazirzadeh, A., Jalali, S., & Farhadi, A. (2019). Antibacterial activity of Oliveria decumbens against Streptococcus iniae in Nile tilapia (Oreochromis niloticus) and its effects on serum and mucosal immunity and antioxidant status. *Fish & Shellfish Immunology, 94*, 407-416.

Vendrell, D., Balcázar, J. L., Ruiz-Zarzuela, I., De Blas, I., Gironés, O., & Múzquiz, J. L. (2006). Lactococcus garvieae in fish: a review. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, 29*(4), 177-198.

Wang, Q. Zhang, C. Xu, L. Chen, J. Wang, X. (2020). Characterization of Streptococcus iniae ghost vaccine and its immunization in Nile tilapia (Oreochromis niloticus). Aquaculture Research. 2020;00:1–10. https://doi. org/10.1111/are.14990

Zheng, Y. Wu, W. Hu, G. Qiu, L. Meng, S. Song, C. Fan, L. Zhao, Z. Bing, X. & Chen, J. (2018). Gut microbiota analysis of juvenile genetically improved farmed tilapia (Oreochromis niloticus) by dietary supplementation of different resveratrol concentrations. *Fish & Shellfish Immunology, 77*, 200-207. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.03.040

Zlotkin, A. Eldar, A. Ghittino, C. & Bercovier, H. (1998). Identification of Lactococcus garvieae by PCR. *Journal of clinical microbiology, 36*(4), 983-985.

Received: 06.05.2022
Accepted: 08.06.2022

Vol. 19, No. 4, Winter, 2024 **Original Article**
DOI: 10.22055/IVJ.2022.341161.2464

Study of the effect of the essential oil of anise (Pimpinella anisum) on *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae* isolates identified by PCR

Fereidoon Hassani[1*], Rahim Payghan[2], Tahere Abyavi[1], Mojtaba Alishahi[2] and Ali Taheri Mirghaed[3]

[1] PhD Graduated from Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
[2] Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
[3] Professor, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 06.05.2022 Accepted: 08.06.2022

Abstract

The essential oils are a combination of volatile oils that are made into plants as a secondary metabolite. Anise essential oil is known for its antimicrobial activity to several bacteria pathogenic. Bacterial pathogens are one of the important factors in the aquaculture industry. The aim of this study was to identify the bacterial pathogens in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fish and also to investigate antibacterial activity of anise essential oil on these bacteria. In this study, two pathogenic bacteria in fish including *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garviae* were isolated from head kidney then purified from fish and identified by PCR; then, the antibacterial activity of anise essential oil against these pathogens was evaluated by macrodilution broth method. According to the findings PCR results indicate high prevalence of *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garviae* in rainbow trout culturing ponds. The effect of essential oil anise on bacteria showed a minimum growth inhibitory concentration for *Streptococcus iniae* about 0.19 µl/ml and this amount was 0.312 µl/ml for *Lactococcus garviae*. The diameter of the growth inhibition zone under the influence of essential oil of anise on these gram positive bacteria was compared with the diameter of the growth inhibition zone under the influence of common antibiotics the results showed a significant difference in anise essential oil compared with antibiotics. The result also showed significant potential of anise to inhibiting growth of these bacteria. so, identification by molecular methods can be an effective role in the success of aquaculture.

Key words: Bacteria, Fish, PCR, Essential oil of Anise, Antibiotic

[*] **Corresponding Author**: Fredun Hassani, PhD Graduated from Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
E-mail: Fredunhassani@yahoo.com

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).