

تأثیر اسانس‌های اوکالیپتوس کامالدولنسیس (*Eucalyptus camaldulensis*)، پونه معطر (*Mentha pulegium*) و آلوئه‌ورا (*Aloe vera*) در رفتار رشد باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی (*Streptococcus iniae*) و لاکتوکوکوس گارویه (*Lactococcus garvieae*)، عامل استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس در مزارع قزل‌آلای رنگین‌کمان کشور و مقایسه آن با کلرآمین T

- ◆ سیده مهسا مقیمی؛ گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
- ◆ مهدی سلطانی؛ گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
- ◆ سید سعید میرزرگر؛ گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
- ◆ مریم قدرت‌نما؛ گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

در این مطالعه، رفتار رشد تعداد مشخصی از جدایه‌های باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه، در غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰ و ۳۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر، از اسانس‌های اوکالیپتوس کامالدولنسیس، پونه معطر و آلوئه‌ورا و غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱۲، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از داروی کلرآمین T در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و نیز حداقل غلظت مهارکنندگی آنها مطالعه شد. نتایج نشان داد با افزایش غلظت اسانس‌های اوکالیپتوس کامالدولنسیس و پونه معطر از رشد اکثر جدایه‌های باکتری‌ها ممانعت شد؛ به طوری که، در غلظت‌های ۱۶۰ و ۳۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر از آن اسانس‌ها، طی زمان‌های ۶۰ و ۹۰ دقیقه پس از انکوباسیون، رشد اکثر جدایه‌ها متوقف شد، اما اسانس آلوئه‌ورا تأثیر چشمگیری در توقف رشد جدایه‌های باکتری‌ها نداشت. با افزایش غلظت داروی کلرآمین T، ممانعت درخور توجهی در رشد پرگنه‌ها دیده شد؛ به طوری که، در غلظت‌های ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از دارو، طی زمان‌های ۴ و ۱۰ ساعت پس از انکوباسیون، هیچ کدام از جدایه‌ها رشد نداشتند. بنابراین، نتایج نشان داد که اولاً، تأثیر ضدباکتری اسانس‌های گیاهی مذکور علیه باکتری‌های مورد نظر بسیار کمتر از کلرآمین T است؛ ثانیاً، تأثیرات ضدباکتری اسانس‌های اوکالیپتوس کامالدولنسیس و پونه معطر بیشتر از تأثیرات ضدباکتری اسانس آلوئه‌ورا بوده است. بنابراین، در صنعت آبزی‌پروری می‌توان از اسانس‌های پونه معطر و اوکالیپتوس کامالدولنسیس و نیز داروی کلرآمین T، به‌منزله ضدعفونی‌کننده آب، برای پیشگیری از بیماری استفاده کرد.

واژگان کلیدی: اسانس، کلرآمین T، استرپتوکوکوس اینیایی، لاکتوکوکوس گارویه، قزل‌آلای رنگین‌کمان.

۱. مقدمه

امروزه، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مهم‌ترین گونهٔ اکثر کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی، در بیشتر نقاط دنیا، به شمار می‌رود. گرایش روزافزون به تکثیر و پرورش این ماهی باعث افزایش بروز بیماری‌های مختلف، از جمله بیماری‌های باکتریایی، شده است. در این بین، آلودگی به استرپتوکوکوزیس در سطح وسیعی از جهان گزارش شده است و، به‌منزلهٔ یکی از مهم‌ترین بیماری‌ها در آبی‌پروری، سبب مرگ و میر بالایی (حتی بیش از ۷۵ درصد) شده است (Eldar et al., 1997). این بیماری در بسیاری از گونه‌های ماهیان دریایی (Eldar Ghittino, 1999; Romalde Toranzo, 1999; Colorni et al., 2002)، ماهیان آب شیرین (Woo Bruno, 1999) و ماهیان وحشی و پرورشی (Colorni et al., 2002; Baya et al., 1990) گزارش شده است. در ایران نیز این بیماری در بین مولدین ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در استان مازندران (Ghiasi et al., 2001)، ماهی هامور در استان خوزستان (Mazloumi, 2003) و مزارع پرورش ماهی قزل‌آلا در استان‌های جنوب غربی، شمال و شمال غربی کشور (Soltani et al., 2005 Soltani et al., 2008) گزارش شده است. با توجه به مشترک بودن بیماری، خسارات بالای آن و متنوع بودن منابع باکتری و از طرفی، ضرورت استفاده نکردن از داروهای شیمیایی در آب برای حفظ محیط زیست، روش‌های پیشگیری با استفاده از داروهای دوستدار طبیعت ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این مطالعه بررسی تأثیرات ضدباکتری اسانس‌های اوکالیپتوس کامالدولنسیس، پونهٔ معطر و آلوئه‌ورا علیه تعدادی از سویه‌های عامل بیماری استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس و مقایسهٔ آن با داروی کلرامین T است. همچنین، رفتار رشد این سویه‌ها در غلظت‌های مختلف اسانس‌ها و داروی مذکور ارزیابی شده است. شایان ذکر است که در مورد تأثیرات ضدباکتری اسانس‌های اوکالیپتوس کامالدولنسیس، پونهٔ معطر و آلوئه‌ورا و نیز داروی کلرامین T، مطالعات دیگری در زمینهٔ انواع باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی انجام

شده است، ولی در خصوص انواع جدایه‌های باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه سوابق زیادی موجود نیست.

۲. مواد و روش کار

۱.۲. جدایه‌های باکتریایی مورد استفاده

نمونه‌های مورد استفاده در این مطالعه از تعدادی از مزارع قزل‌آلای کشور به دست آمدند که در آزمایشگاه تخصصی میکروبیولوژی گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه تهران، پس از جداسازی و شناسایی، به روش مولکولی (PCR) لیوفیلیزه شدند. در ابتدا ۲۱ جدایهٔ باکتریایی لیوفیلیزه شده زیر هود میکروبی و در کنار شعله باز شدند و مقداری از آنها با آنس استریل شده با شعله به آرامی روی محیط ژلوز خوندار به شکل خطی کشت داده شدند. سپس، در دمای ۲۵-۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۲-۲۴ ساعت پاستاز داده شدند و در نهایت، مطالعه و بررسی شدند.

۲.۲. اسانس‌های گیاهی

اسانس‌های به‌کاررفته در این مطالعه شامل اسانس‌های اوکالیپتوس کامالدولنسیس (*Eucalyptus camaldulensis*)، پونهٔ معطر (*Mentha pulegium*) و آلوئه‌ورا (*Aloe vera*) است که استخراج آنها، به روش تقطیر با بخار داغ، در محل پژوهشکدهٔ گیاهان دارویی جهاد کشاورزی بوده است. درصد خلوص اسانس‌ها تقریباً ۱۰۰ درصد در نظر گرفته می‌شود. به منظور تشخیص اجزای اسانس‌ها، برای بررسی انواع ترکیبات ضد میکروبی آنها، آنالیز با دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌نگار جرمی (GC/MS) انجام شد.

۳.۲. بررسی رفتار رشد جدایه‌های باکتری و تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی اسانس‌های اوکالیپتوس کامالدولنسیس، پونهٔ معطر و آلوئه‌ورا در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد

نخست، مخلوطی حاوی ۲۵ میلی‌لیتر روغن آفتابگردان همراه با ۳/۵ گرم سود سوزآور (NaOH)

۴.۲. بررسی رفتار رشد جدایه‌های باکتری و تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی اثر داروی ضد عفونی‌کننده کلرآمین T در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

نخست، ۱۰ گرم (۱۰,۰۰۰ میلی‌گرم) از داروی کلرآمین T با مقدار مناسبی از آب مقطر به حجم نهایی ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس، مقدار ۶/۴ میلی‌لیتر از آن برداشته و با ۳/۶ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد و مخلوط حاصل با استفاده از فیلتر میلی‌پور ۰/۲ فیلتر، سپس، اقدام به تهیه رقت‌های زیر شد. به هر لوله آزمایش استریل به میزان ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل افزوده و در لوله اول میزان ۵ میلی‌لیتر از رقت فوق‌الذکر کلرآمین T مخلوط بالا اضافه شد و رقت‌های متوالی شامل ۰/۰۵، ۰/۱۲، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶ و ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس، از پرگنه‌های کشت ۳۶ ساعته در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد هر یک از جدایه‌های باکتریایی مورد مطالعه، در سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیون باکتریایی معادل مک فارلند ۰/۵ تهیه شد. سپس، به میزان ۵ میکرولیتر از آن به هر لوله اضافه شد. در نهایت، در فواصل زمانی ۱، ۲، ۴ و ۱۰ ساعت از لوله‌های با رقت ۰/۰۵، ۰/۱۲، ۰/۲۵، ۰/۵، او ۲ میزان ۱۰ میکرولیتر روی پلیت ژلوز خون کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. به‌منزله کنترل هم‌زمان ۵ میکرولیتر از همان سوسپانسیون باکتری مخلوط با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل بدون دارو در فواصل زمانی ۱، ۲، ۴ و ۱۰ ساعت روی ژلوز خوندار کشت داده و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. در مرحله بعدی، تعداد پرگنه‌های رشدیافته پس از ۲۴ ساعت در زیر لوپ شمارش شدند. همچنین، حداقل رقتی از دارو که در هر یک از زمان‌های مورد اشاره مانع از رشد جدایه‌های باکتریایی مذکور شد، به‌منزله حداقل غلظت مهارکننده محسوب شد.

و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد. سپس، این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. در مرحله بعد، از مایع قسمت پایین ظرف برداشته و به نسبت ۱ به ۱ با اسانس مورد نظر مخلوط شد. به این ترتیب استوک اولیه به دست آمد. به منظور تهیه استوک کاری، به میزان نسبت ۶/۴ میلی‌لیتر از استوک اولیه همراه با میزان نسبت ۳/۶ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. برای بررسی رفتار رشد جدایه‌های باکتریایی مورد نظر و نیز تعیین حداقل غلظت‌های مهارکنندگی، از محیط مایع تربیتیک سویا و روش تهیه رقت‌های متوالی استفاده شد. بدین منظور لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط مایع استریل تهیه شد؛ سپس، از پرگنه‌های کشت ۳۶ ساعته هر یک از جدایه‌های باکتریایی در دمای ۲۵ درجه در سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیون باکتریایی معادل مک فارلند ۰/۵ تهیه شد. سپس، از اسانس مورد نظر در محیط‌های مایع تهیه‌شده، غلظت‌های معینی از آن اسانس شامل ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰ و ۳۲۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر تهیه شد. در مرحله بعد، به هر یک از این لوله‌ها میزان ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی تهیه‌شده اضافه شد و پس از به‌هم‌زدن، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون صورت گرفت و از هر تیمار در فواصل زمانی ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه مقدار ۱۰ میکرولیتر برداشته و به روش کشت سطحی روی ژلوز خون کشت داده شد. در مرحله بعدی، تعداد پرگنه‌های رشدیافته پس از ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در زیر لوپ شمارش شدند. به علاوه، از هر یک از رقت‌های مذکور در محیط ژلوز خوندار کشت داده شد و به دقت به شمارش پرگنه‌های رشدیافته اقدام شد تا رفتار رشد ایزوله‌ها در رقت‌های مختلف اسانس‌های مذکور مشخص شود. حداقل رقتی از اسانس مورد نظر که در هر یک از زمان‌های مورد اشاره مانع از رشد جدایه‌های باکتریایی مذکور شد، به‌منزله حداقل غلظت مهارکننده محسوب شد.

۳. نتایج

۱.۳. آنالیز اسانس‌های اوکالیپتوس کامالدولنسیس، پونهٔ معطر و آلوئه‌ورا

نتیجهٔ آنالیز ترکیبات اسانس‌های مورد استفاده در این مطالعه در جداول ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است. با توجه به نتایج، بیشترین ترکیب تشکیل‌دهندهٔ اسانس‌های اوکالیپتوس کامالدولنسیس، پونهٔ معطر و آلوئه‌ورا به ترتیب، ۱ و ۸ سینئول، پیریتول و سیتوسترول است (جدول ۱، ۲ و ۳).

۲.۳. اسانس اوکالیپتوس کامالدولنسیس

نتایج حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی اسانس اوکالیپتوس کامالدولنسیس علیه باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در جدول ۴ نشان داده شده است. بر اساس این نتایج، حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی این اسانس طی زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه به ترتیب $320 > 320$ ، $320 > 160$ و $320 > 160$ بوده است. کمترین میزان حداقل غلظت مهارکنندگی برای جدایهٔ $196A$ در زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه و جدایهٔ $172B$ در ۶۰ و ۹۰ دقیقه و جدایهٔ $201A$ در ۹۰ دقیقه بوده است. بیشترین میزان حداقل غلظت مهارکنندگی برای جدایهٔ $191A$ طی هر سه زمان مذکور بوده است. به علاوه، نتایج رفتار رشد جدایه‌های استرپتوکوکوس اینیایی در حضور غلظت‌های مختلف این اسانس نشان داد که در غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر با گذشت زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه همهٔ جدایه‌ها قادر به رشد بوده‌اند. فقط جدایهٔ $196A$ در غلظت ۱۶۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر با گذشت هر سه زمان فوق‌قادر به رشد نبود و در غلظت ۳۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر نیز رشد جدایه‌های $172B$ و $196A$ با گذشت هر سه زمان ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه متوقف شد. همچنین، نتایج حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی اسانس اوکالیپتوس کامالدولنسیس علیه باکتری لاکتوکوکوس گارویه در جدول ۵ نشان داده شده است. بر اساس این نتایج، حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی این اسانس طی زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه به ترتیب 320 -

$320 < 320$ ، $320 < 320$ و $160 < 320$ بوده است. در نتیجه، کمترین میزان حداقل غلظت مهارکنندگی برای جدایه‌های $170A$ ، $190A$ و $194B$ طی زمان ۹۰ دقیقه و بیشترین حداقل غلظت مهارکنندگی برای جدایهٔ $165B$ طی زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه بوده است. علاوه بر این، نتایج رفتار رشد جدایه‌های لاکتوکوکوس گارویه در حضور غلظت‌های مختلف این اسانس نشان داد که تمامی جدایه‌ها، در غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر با گذشت زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه، رشد داشته‌اند. در حالی که در غلظت ۱۶۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر در زمان‌های مذکور، اکثر جدایه‌ها رشد کمی داشتند و در غلظت ۳۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر، جدایه‌های 141 ، $195B$ ، 3 ، 175 و $167B$ فقط با گذشت زمان ۹۰ دقیقه، جدایه‌های 6 ، $200A$ ، 162 و $194B$ با گذشت زمان‌های ۶۰ و ۹۰ دقیقه و در نهایت جدایه‌های $170A$ ، $161A$ و $190A$ با گذشت سه زمان ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه رشد پرگنه‌ها متوقف شد. فقط جدایهٔ $165B$ در غلظت‌ها و زمان‌های مذکور، رشد درخور توجهی داشته است.

۳.۳. اسانس پونهٔ معطر

نتایج حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی اسانس پونهٔ معطر علیه باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در جدول ۶ نشان داده شده است. بر اساس این نتایج، حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی این اسانس طی زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه به ترتیب $320 > 320$ ، $320 > 20$ و $320 > 20$ بوده است. در نتیجه، کمترین میزان حداقل غلظت مهارکنندگی برای جدایهٔ $199A$ طی زمان ۶۰ دقیقه و بیشترین حداقل غلظت مهارکنندگی برای جدایهٔ $201A$ طی زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه بوده است. به علاوه، نتایج رفتار رشد جدایه‌های استرپتوکوکوس اینیایی در حضور غلظت‌های مختلف اسانس پونهٔ معطر نشان داد که، در غلظت ۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر، همهٔ جدایه‌ها به جز جدایهٔ $199A$ رشد داشته‌اند. در غلظت ۴۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر همهٔ جدایه‌ها به جز جدایهٔ $196A$ با گذشت هر سه زمان، جدایه‌های D و $199A$ در دو

جدول ۱. آنالیز دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌نگار جرمی (GC/MS) مربوط به اسانس اوکالیپتوس کامالدولنسینس (*Eucalyptus camaldulensis*)

ترکیبات	اندیس بازدارنده	درصد
-Thujane	۸۹۹	۰/۱۲
-Pinene	۹۰۵	۵/۴۷
Camphene	۹۲۲	۰/۰۳
-Pinene	۹۴۶	۰/۲۱
-Myrcene	۹۵۷	۰/۳۰
1,8-Cineole	۹۹۸	۶۹/۴۶
-Ocimene	۱۰۰۷	۰/۰۱
-Terpinene	۱۰۲۸	۱۵/۱۰
Terpinolene	۱۰۵۷	۰/۵۳
1-Terpineol	۱۱۰۶	۰/۰۳
Limonene Oxide(cis)	۱۱۱۲	۰/۰۱
-Terpineol	۱۱۶۲	۱/۲۹
<i>trans</i> -Carveol	۱۱۸۹	۰/۰۲
Geraniol	۱۲۲۲	۰/۱۳
Geranial	۱۲۴۰	۰/۰۴
-Terpienyl Acetate	۱۳۲۷	۱/۳۱
-Gurjunene	۱۳۷۶	۰/۳۴
-Gurjunene	۱۴۰۱	۰/۱۰
Aromadendrene	۱۴۱۰	۱/۷۲
-Selinene	۱۴۵۷	۰/۰۶
-Cadinene	۱۴۸۳	۰/۰۵
-Cadinene	۱۴۹۱	۰/۰۷
-Calacorene	۱۵۱۹	۰/۰۳
Epi Globulol	۱۵۴۱	۰/۲۹
Globulol	۱۵۵۹	۲/۰۰
Viridiflorol	۱۵۶۵	۰/۶۱
-Eudesmol	۱۶۲۳	۰/۲۳

جدول ۲. آنالیز دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌نگار جرمی (GC/MS) مربوط به اسانس پونه معطر (*Mentha pulegium*)

ترکیبات	اندیس بازدارنده	درصد
1,8-Cineole	۱۰۰۶	۴/۰
Menthon	۱۱۳۰	۳/۰
Borneol	۱۱۴۳	۲/۹
4-Terpineol	۱۱۵۳	۰/۵
α -Terpineol	۱۱۶۷	۴/۷
m-Ethyl cumene	۱۲۰۸	۰/۶
Pulegon	۱۲۱۵	۲/۳
Carvol	۱۲۱۷	۰/۶
Piperitone	۱۲۴۴	۰/۳۸
Isophorene	۱۲۵۱	۰/۶
Bornyl acetate	۱۲۵۹	۰/۸
Piperitenone	۱۳۳۱	۳۳/۰
Piperitenone oxide	۱۳۴۶	۳/۴
1-Phenyl-1,4-butanediol	۱۳۶۷	۰/۷
<i>trans</i> -Caryophyllene	۱۳۹۹	۰/۵
Caryophyllene oxide	۱۵۶۴	۰/۵

جدول ۳. آنالیز دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌نگار جرمی (GC/MS) مربوط به اسانس آلونهورا (*Aloe vera*)

ترکیبات	اندیس بازدارنده	درصد
1-Tetradecyne	۱۶/۰۵	۰/۵۴
Tridecanoic acid, methyl ester	۱۷/۶۷	۰/۷۹
n-Hexadecanoic acid	۱۸/۷۰	۵/۰۷
Hexadecanoic acid, ethyl ester	۱۸/۹۳	۸/۸۱
Phytol	۲۱/۰۷	۱۰/۰۱
Oleic acid	۲۱/۸۵	۱۱/۷۴
9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester	۲۲/۰۶	۱۱/۳۶
Oxalic acid, allyl pentadecyl ester	۲۴/۱۳	۰/۲۹
Oxalic acid, allyl hexadecyl ester	۲۵/۷۳	۰/۵۲
9-Octadecenal	۲۷/۱۱	۲/۲۸
1-Octanol,2-butyl	۲۷/۲۸	۱/۹۲
Didodecyl phthalate	۲۸/۰۸	۰/۵۶
1-Octadecyne	۲۸/۴۸	۰/۲۹
Sulfurous acid, hexyl pentadecyl ester	۲۸/۷۷	۱/۵۸
1-Iodo-2-methylundecane	۳۰/۲۱	۱/۷۸
Eicoane	۳۱/۶۰	۲/۴۸
Squalene	۳۱/۹۰	۱/۲۴
Octadecane, 2-methyl	۳۲/۹۵	۳/۴۵
Nonadecane, 2-methyl	۳۴/۲۶	۳/۹۷
a-Tocopherol	۳۴/۹۱	۴/۲۴
Vitamin E	۳۶/۰۹	۲/۳۹
Sulfurous acid, butyl heptadecyl ester	۳۹/۸۰	۲/۴۸
9,12-Octadecadienoic acid, phenylmethyl ester	۳۷/۳۸	۱/۱۵
Tetracontane,3,5,24-trimethyl	۳۸/۲۵	۱/۶۰
Sitosterol	۳۸/۷۸	۱۳/۱۹
Lupeol	۴۰/۲۸	۶/۷

جدول ۵. حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی اوکالیپتوس کامالدولنسیس (l/ml μ) علیه تعدادی از جدایه‌های لاکتوکوکوس گارویه

جدایه باکتری	۳۰ دقیقه	۶۰ دقیقه	۹۰ دقیقه
<i>L. garvieae</i> 200A	>۳۲.	۳۲.	۳۲.
<i>L. garvieae</i> 195B	>۳۲.	۳۲.	۳۲.
<i>L. garvieae</i> 170A	۳۲.	۳۲.	۱۶.
<i>L. garvieae</i> 161A	۳۲.	۳۲.	۳۲.
<i>L. garvieae</i> 141.3	>۳۲.	>۳۲.	>۳۲.
<i>L. garvieae</i> 190A	۳۲.	۳۲.	۱۶.
<i>L. garvieae</i> 175	>۳۲.	>۳۲.	۳۲.
<i>L. garvieae</i> ALS6	>۳۲.	۳۲.	۳۲.
<i>L. garvieae</i> 162	>۳۲.	۳۲.	۳۲.
<i>L. garvieae</i> 194B	>۳۲.	۳۲.	۱۶.
<i>L. garvieae</i> 167B	>۳۲.	>۳۲.	۳۲.
<i>L. garvieae</i> 165B	>۳۲.	>۳۲.	>۳۲.

جدول ۴. حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی اوکالیپتوس کامالدولنسیس (l/ml μ) علیه تعدادی از جدایه‌های استرپتوکوکوس اینیایی

جدایه باکتری	۳۰ دقیقه	۶۰ دقیقه	۹۰ دقیقه
<i>S. iniae</i> D	>۳۲.	۳۲.	۳۲.
<i>S. iniae</i> 172B	۳۲.	۱۶.	۱۶.
<i>S. iniae</i> 196A	۱۶.	۱۶.	۱۶.
<i>S. iniae</i> 199A	>۳۲.	>۳۲.	۳۲.
<i>S. iniae</i> 201A	>۳۲.	>۳۲.	۱۶.
<i>S. iniae</i> LG5	>۳۲.	>۳۲.	۳۲.
<i>S. iniae</i> 183	>۳۲.	۳۲.	۳۲.
<i>S. iniae</i> 191A	>۳۲.	>۳۲.	>۳۲.

جدول ۶. حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی یونۀ معطر (l/ml μ) علیه تعدادی از جدایه‌های استرپتوکوکوس اینیایی

جدایه باکتری	۳۰ دقیقه	۶۰ دقیقه	۹۰ دقیقه
<i>S. iniae</i> ۲۰۱A	>۳۲.	>۳۲.	۳۲.
<i>S. iniae</i> 196A	۴.	۴.	۱۶.
<i>S. iniae</i> 172B	۱۶.	۸.	۸.
<i>S. iniae</i> LHK5	>۳۲.	۸.	۴.
<i>S. iniae</i> 191B	>۳۲.	۸.	۸.
<i>S. iniae</i> D	۱۶.	۴.	۴.
<i>S. iniae</i> LG5	۱۶.	۸.	۴.
<i>S. iniae</i> 199A	۱۶.	۲.	۴.

اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه در حضور غلظت‌های مختلف اسانس آلوئه‌ورا نشان داد که همهٔ جدایه‌ها در تمامی غلظت‌های اسانس، و طی گذشت زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه، رشد چشمگیری داشته‌اند.

۵.۳. کلرآمین T

در نهایت، نتایج حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی داروی کلرآمین T علیه باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی در جدول ۱۰ نشان داده شده است. بر اساس این نتایج، حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی کلرآمین T طی زمان‌های ۱، ۲، ۴ و ۱۰ ساعت، به ترتیب، $0/12 <$ ، $0/05 <$ ، $0/25 - 0/05 <$ ، $0/12 <$ ، کمترین حداقل غلظت مهارکنندگی مربوط به همهٔ جدایه‌ها در زمان‌های ۴ و ۱۰ ساعت و بیشترین حداقل غلظت مهارکنندگی مربوط به جدایه‌های ۱۹۶A و ۱۹۹A طی زمان ۱ ساعت بوده است. نتایج رفتار رشد جدایه‌های استرپتوکوکوس اینیایی در حضور غلظت‌های مختلف داروی کلرآمین T نشان داد که در غلظت $0/05$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، طی زمان‌های ۱ و ۲ ساعت جدایه‌های ۱۸۳ و LG۵ و در زمان‌های ۴ و ۱۰ ساعت همهٔ جدایه‌ها توقف رشد را نشان داده‌اند. در غلظت $0/12$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فقط در زمان ۱ ساعت رشد پرگنه‌ها در جدایه‌های ۱۹۶A و ۱۹۹A ادامه داشته است و بقیهٔ جدایه‌ها توقف رشد داشته‌اند.

در غلظت‌های $0/25$ ، $0/5$ ، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در همهٔ زمان‌های ۱، ۲، ۴ و ۱۰ ساعت توقف رشد در همهٔ جدایه‌ها نشان داده شد. همچنین، نتایج حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی داروی کلرآمین T علیه باکتری‌های لاکتوکوکوس گارویه در جدول ۱۱ نشان داده شده است. بر اساس این نتایج، حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی کلرآمین T طی زمان‌های ۱، ۲، ۴ و ۱۰ ساعت، به ترتیب، $0/25 - 0/5 <$ ، $0/25 - 0/12 <$ ، $0/25 - 0/12 <$ ، $0/12 <$ ، کمترین حداقل غلظت مهارکنندگی مربوط به جدایه‌های ۱۹۴B، ۱۶۱B، ۱۶۵B، و ALS۶ طی زمان‌های ۴ و ۱۰ ساعت و بیشترین حداقل غلظت مهارکنندگی مربوط به جدایه‌های ۱۶۷B

زمان و جدایه‌های LHK۵ و LG۵ در یک زمان توقف رشد داشته‌اند. از طرفی، اکثر جدایه‌ها در غلظت‌های ۸۰، ۱۶۰ و ۳۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر توقف رشد را نشان داده‌اند. نتایج حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی اسانس پونهٔ معطر علیه باکتری لاکتوکوکوس گارویه در جدول ۷ نشان داده شده است. بر اساس این نتایج، حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی این اسانس طی زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه به ترتیب $320 >$ ، $160 >$ ، $320 >$ و $40 >$ بوده است. کمترین میزان حداقل غلظت مهارکنندگی برای جدایهٔ ۱۷۵ در زمان ۹۰ دقیقه و بیشترین میزان آن برای جدایه‌های ۱۹۴B و ۱۷۰A در زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه بوده است. علاوه بر این، نتایج رفتار رشد جدایه‌های لاکتوکوکوس گارویه در حضور غلظت‌های مختلف اسانس پونهٔ معطر نشان داد که در غلظت ۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر فقط جدایهٔ ۱۷۵، و در غلظت ۴۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر جدایه‌های ۱۶۷B و ۱۹۵A با گذشت ۹۰ دقیقه و جدایهٔ ۱۴۱-۳ با گذشت زمان‌های ۶۰ و ۹۰ دقیقه توقف رشد را نشان داده‌اند. از طرفی، در غلظت ۸۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر، جدایه‌های ۱۶۱A، ۱۶۷B، ۱۶۵B و ۱۷۵ با گذشت زمان ۹۰ دقیقه و جدایه‌های ۱۹۵A و ۱۴۱-۳ با گذشت زمان‌های ۶۰ و ۹۰ دقیقه توقف رشد داشته‌اند. در غلظت ۱۶۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر، همهٔ جدایه‌ها به جز جدایه‌های ۱۶۲، ۱۷۰A و ۱۹۴B با گذشت زمان‌های ۶۰ و ۹۰ دقیقه توقف رشد را نشان داده‌اند و در غلظت ۳۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر، جدایه‌های توقف یافته با گذشت هر سه زمان، شامل جدایه‌های ALS۶، ۱۶۵A، ۱۶۱B، ۱۹۵A، ۱۷۵ و ۱۴۱-۳ است.

۴.۳. اسانس آلوئه‌ورا

نتایج حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی اسانس آلوئه‌ورا علیه باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه در جداول ۸ و ۹ نشان داده شده است. بر اساس این نتایج، حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی این اسانس طی زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه، $320 >$ بوده است. از طرفی، نتایج رفتار رشد جدایه‌های استرپتوکوکوس

جدول ۷. حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی بونه معطر (l/ml μ) علیه تعدادی از جدایه‌های لاکتوکوکوس گارویه

جدایه باکتری	۳۰ دقیقه	۶۰ دقیقه	۹۰ دقیقه
<i>L. garvieae</i> 161A	>۳۲۰	>۳۲۰	۸۰
<i>L. garvieae</i> ALS6	۳۲۰	۳۲۰	۱۶۰
<i>L. garvieae</i> 167B	>۳۲۰	>۳۲۰	۴۰
<i>L. garvieae</i> 165B	۳۲۰	۱۶۰	۸۰
<i>L. garvieae</i> 161B	۳۲۰	۳۲۰	۱۶۰
<i>L. garvieae</i> 190A	>۳۲۰	۱۶۰	۱۶۰
<i>L. garvieae</i> 194B	>۳۲۰	>۳۲۰	>۳۲۰
<i>L. garvieae</i> 170A	>۳۲۰	>۳۲۰	>۳۲۰
<i>L. garvieae</i> 162	>۳۲۰	۳۲۰	>۳۲۰
<i>L. garvieae</i> 195A	۳۲۰	۸۰	۸۰
<i>L. garvieae</i> 175	۳۲۰	۱۶۰	۲۰
<i>L. garvieae</i> 141.3	۱۶۰	۴۰	۴۰

جدول ۸. حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی آلونهورا (l/ml μ) علیه تعدادی از جدایه‌های استرپتوکوکوس اینیایی

جدایه باکتری	۳۰ دقیقه	۶۰ دقیقه	۹۰ دقیقه
<i>S. iniae</i> LG5	>۳۲۰	>۳۲۰	>۳۲۰
<i>S. iniae</i> 172B	>۳۲۰	>۳۲۰	>۳۲۰
<i>S. iniae</i> LHK5	>۳۲۰	>۳۲۰	>۳۲۰
<i>S. iniae</i> 191B	>۳۲۰	>۳۲۰	>۳۲۰
<i>S. iniae</i> D	>۳۲۰	>۳۲۰	>۳۲۰

جدول ۹. حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی آلونهورا (l/ml μ) علیه تعدادی از جدایه‌های لاکتوکوکوس گارویه

جدایه باکتری	۳۰ دقیقه	۶۰ دقیقه	۹۰ دقیقه
<i>L. garvieae</i> 162	>۳۲۰	>۳۲۰	>۳۲۰
<i>L. garvieae</i> 161A	>۳۲۰	>۳۲۰	>۳۲۰
<i>L. garvieae</i> ALS6	>۳۲۰	>۳۲۰	>۳۲۰
<i>L. garvieae</i> 167B	>۳۲۰	>۳۲۰	>۳۲۰
<i>L. garvieae</i> 170A	>۳۲۰	>۳۲۰	>۳۲۰

جدول ۱۰. حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی کلرآمین T (mg/ml) علیه تعدادی از جدایه‌های استرپتوکوکوس اینیایی

جدایهٔ باکتری	۱ ساعت	۲ ساعت	۴ ساعت	۱۰ ساعت
<i>S.iniae</i> 201A	۰/۱۲	۰/۱۲	<۰/۰۵	<۰/۰۵
<i>S. iniae</i> 196A	۰/۲۵	۰/۱۲	<۰/۰۵	<۰/۰۵
<i>S. iniae</i> 183	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵
<i>S. iniae</i> 199A	۰/۲۵	۰/۱۲	<۰/۰۵	<۰/۰۵
<i>S. iniae</i> LG5	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵

جدول ۱۱. حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی کلرآمین T (mg/ml) علیه تعدادی از جدایه‌های لاکتوکوکوس گارویه

جدایهٔ باکتری	۱ ساعت	۲ ساعت	۴ ساعت	۱۰ ساعت
<i>L. garvieae</i> 194B	۰/۵	۰/۲۵	<۰/۱۲	<۰/۱۲
<i>L.garvieae</i> 161B	۰/۲۵	۰/۲۵	<۰/۱۲	<۰/۱۲
<i>L. garvieae</i> 165B	۰/۲۵	<۰/۱۲	<۰/۱۲	<۰/۱۲
<i>L. garvieae</i> 167B	۰/۵	۰/۵	۰/۲۵	۰/۲۵
<i>L. garvieae</i> ALS6	۰/۵	۰/۵	<۰/۱۲	<۰/۱۲

Soltani *et al.*, 2009; Soltani *etal.*, 2008;) (Soltani *et al.*, 2005). در این بررسی‌ها، استرپتوکوکوس اینیایی (Soltani *et al.*, 2005) و لاکتوکوکوس گارویه (Soltani *et al.*, 2008) به‌منزلهٔ عمده‌ترین گونه‌های بیماری‌زای مزارع کشور مطرح شده‌اند. بنابراین پیشگیری، کنترل و ریشه‌کنی این بیماری ضروری است. از طرفی، در حال حاضر باید مسئلهٔ مقاومت این دو گونهٔ بیماری‌زای عمده در ایران به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها نیز در نظر گرفته شود. نظر به موارد مطرح‌شده، استفاده از داروهای گیاهی و مواد ضدعفونی‌کنندهٔ دوستدار محیط زیست در مبارزه با این بیماری ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه، تأثیر اسانس‌های پونهٔ معطر، اوکالیپتوس کامالدولنسیس و آلوئه‌ورا، و مقایسهٔ آنها با تأثیر داروی کلرآمین T، در رفتار رشد برخی از جدایه‌های بیماری‌زای باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس‌ها و داروی

و ALS6 طی زمان‌های ۱ و ۲ ساعت و جدایهٔ ۱۹۴B طی زمان ۱ ساعت بوده است. به علاوه، نتایج رفتار رشد جدایه‌های لاکتوکوکوس گارویه در حضور غلظت‌های مختلف داروی کلرآمین T نشان داد که در غلظت ۰/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر طی گذشت ۱ و ۲ ساعت همهٔ جدایه‌ها، و طی گذشت ۴ و ۱۰ ساعت فقط جدایهٔ ۱۶۷B رشد داشته‌اند. در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پس از گذشت ۱ ساعت جدایه‌های ۱۶۱B و ۱۶۵B، و پس از ۲ ساعت جدایه‌های ۱۹۴B، ۱۶۱-۳ و ۱۶۵B و طی زمان‌های ۴ و ۱۰ ساعت همهٔ جدایه‌ها توقف رشد داشته‌اند. در غلظت‌های ۰/۵ تا ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در همهٔ زمان‌ها (۱، ۲، ۴ و ۱۰ ساعت) همهٔ جدایه‌ها توقف رشد داشته‌اند.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات انجام‌شده در ایران، نمایانگر گسترش استرپتوکوکوزیس در مزارع پرورش قزل‌آلاست

اسانس و زمان در معرض قرارگیری باکتری با اسانس مورد نظر است. درباره تأثیرات ضدباکتری اسانس پونه معطر، مطالعات انجام شده روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی (Joudi, 2003; Mahboubi Haghi, 2008)، نشان داد که تأثیرات ضدباکتری اسانس پونه معطر روی باکتری‌های گوناگون، متفاوت است، در حالی که، ترکیبات مؤثر اسانس‌های مورد استفاده مشابه است. مطالعات انجام شده درباره تأثیرات ضدباکتری اسانس آلوئه‌ورا (Lawrance *et al.*, 2009; Agaglu, 2009)، نشان داد که این اسانس علیه تعداد زیادی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی، تأثیرات مهاری دارد؛ در حالی که، در مطالعه حاضر اسانس آلوئه‌ورا هیچ گونه تأثیری در مهار رشد باکتری‌های گرم مثبت نداشته است که می‌توان این اختلاف را به علت وجود ماده مؤثر متفاوت در اسانس‌های به‌کاررفته، دانست. به طوری که، در مطالعه Lawrance و همکاران در سال ۲۰۰۹، بیشترین قسمت مربوط به خاصیت ضدباکتری آلوئه‌ورا، درباره ترکیبات Pyrocatechel, Cinnamic acid, P-ceumeric acid و در مطالعه Agaglu Alemdar در سال ۲۰۰۹ مربوط به قسمت‌های Aloine, Aloe-emodin و Barbaloin و همکاران در اسانس مورد استفاده در تحقیق حاضر موجود نیستند. مطالعه Giakowski و همکاران در سال ۲۰۰۸، در مورد تأثیرات ضدعفونی‌کننده داروی کلرآمین T، نشان داد که به منظور کاهش مرگ و میر ناشی از بیماری BKD بهتر است یک بار در روز به مدت ۶۰ دقیقه برای ۴ روز متوالی از غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر داروی کلرآمین T در ماهیان آب شیرین گرمابی و سردابی استفاده شود. این یافته‌ها با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد که روی باکتری‌های گرم مثبت در ماهی قرل‌آلا با حداقل غلظت مهارکنندگی ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر طی زمان‌های ۴ و ۱۰ ساعت بوده است. در نهایت نتایج این مطالعه نشان داد که اولاً، تأثیر ضدباکتری اسانس‌های گیاهی مذکور علیه باکتری‌های مورد نظر بسیار کمتر از کلرآمین T است؛ ثانیاً، تأثیرات ضدباکتری

مذکور بررسی شده است. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که اسانس‌های اوکالیپتوس کامالدولنسیس، پونه معطر و آلوئه‌ورا، قدرت ضد استریپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گاریه متفاوتی از خود نشان داده‌اند. به نحوی که، با افزایش غلظت اسانس‌های اوکالیپتوس کامالدولنسیس و پونه معطر از رشد اکثر جدایه‌های باکتری‌ها ممانعت به عمل آمد؛ به طوری که، در غلظت‌های ۱۶۰ و ۳۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر از اسانس‌های مذکور، طی زمان‌های ۶۰ و ۹۰ دقیقه پس از انکوباسیون، رشد اکثر جدایه‌ها متوقف شد. در حالی که، درباره اسانس آلوئه‌ورا تأثیر چشمگیری در توقف رشد جدایه‌های باکتری‌ها مشاهده نشد. به هر حال، با افزایش غلظت داروی کلرآمین T، ممانعت درخور توجهی در رشد پرگنه‌ها دیده شد، به طوری که، در غلظت‌های ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از دارو طی زمان‌های ۴ و ۱۰ ساعت پس از انکوباسیون، هیچ کدام از جدایه‌ها رشد نداشته‌اند. در خصوص اسانس اوکالیپتوس کامالدولنسیس، حداقل غلظت مهارکنندگی در غلظت ۱۶۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر طی زمان‌های ۶۰ و ۹۰ دقیقه پس از انکوباسیون به دست آمد. در حالی که، در مطالعه Kouhpaye و همکاران در سال ۲۰۰۹، حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس مذکور در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد. از جمله دلایل احتمالی این تفاوت را می‌توان اختلاف در نوع ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس و به علاوه زمان در معرض قرارگیری باکتری به اسانس برشمرد. به طوری که، در مطالعه Kouhpaye و همکاران در سال ۲۰۰۹، بیش از ۲۰ ساعت باکتری در معرض اسانس قرار گرفت، ولی در مطالعه حاضر تا ۹۰ دقیقه بوده است. علاوه بر این، بر اساس یک سری مطالعات انجام شده روی تأثیرات ضدباکتری گونه‌های مختلف اسانس اوکالیپتوس در تعدادی باکتری گرم مثبت و منفی (Kuta *et al.*, 2008; Salari *et al.*, 2006; Ghanbari *et al.*, 2009; Gilles *et al.*, 2009)، تأثیرات ضدباکتری این گونه‌ها تفاوت چشمگیری دارد که این تفاوت‌ها به علت وجود ماده مؤثر متفاوت در

تقدیر و تشکر

این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه تهران و با اعتبار گرنت معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و حمایت مالی قطب علمی بهداشت و بیماری‌های آبزبان دانشگاه تهران انجام گرفته است.

اسانس‌های اوکالیپتوس کامالدولنسیس و پونه معطر بیشتر از تأثیرات ضدباکتری اسانس آلوئه‌ورا بوده است؛ ثالثاً، تأثیرات ضدباکتری اسانس پونه معطر بیشتر از اسانس اوکالیپتوس کامالدولنسیس است. بنابراین، در صنعت آبی‌پروری می‌توان از اسانس‌های پونه معطر و اوکالیپتوس کامالدولنسیس و نیز داروی ضدعفونی‌کننده کلرامین T به‌منزله ضدعفونی‌کننده آب استفاده کرد.

References

- [1]. Alemdar, S., Agaglu, S., 2009. Investigation of in vitro antimicrobial activity of Aloe vera juice. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 8(1), 99–102.
- [2]. Baya, A.M., Lupiani, B., Hetirck, F.M., Roberson, B.S., Lukacovic, R., May, E., Poukish, C., 1990. Association of streptococcus sp. with fish mortalities in the Chesapeake Bay and its tributaries. *Journal of Fish Disease* 13, 251–253.
- [3]. Colorni, A.A., Diamant, A., Eldar, A., Kivitt, H., Zlotkin, A., 2002. Streptococcus iniae infections in Red sea cage – culture and wild fish. *Diseases of Aquatic Organism* 49, 165–202.
- [4]. Eldar, A., Horovitz, A., Bercovier, H., 1997. Development and efficacy of a vaccine against Streptococcus iniae infection in farmed rainbow trout. *Journal of Veterinary Immunology and Immunopathology* 56(1-2), 175–183.
- [5]. Eldar, A., Ghittino, C., 1999. Lactococcus garvieae and Streptococcus iniae infection in rainbow trout: similar but different disease. *Disease of Aquatic Organisms* 36, 227–231.
- [6]. Ghanbari, A., Mahdinezhad, N., Heidari, A., 2009. To study characteristics of antibacterial of seven medicinal plants on two bacteria: Bacillus cereus and Salmonella. *New Biotechnology* 25, 81.
- [7]. Ghiasi, M., Zahedi Tabarestani, A., Khoshbavar Rostami, H.A., 2001. Epidemiological survey of streptococcosis in generatings of Onchorhynchus mykiss in Mazandaran province, 1st the Congress of Aquatic Animals Health and Diseases, Ahvaz, Iran. pp. 56.
- [8]. Giakowski, M.P., Larson, W.J., Gingerich, W.h., 2008. Survival of cool and warm freshwater fish following chloramine T exposure. *Journal of Aquaculture* 175(1-4), 20–25.
- [9]. Gilles, M., Zhao, J., An, M., Agboola, S., 2009. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. *Food Chemistry* 119, 731–737.
- [10]. Joudi, L., 2003. Investigation of antibacterial effects and chemical compounds of extract and essence of Origanum majorana, Mentha pulegium and Mentha piperita. Master thesis. Basic Science, Herbal Science and Taxonomy group. Urmia University, Iran. 85 p.
- [11]. Kouhpaye, A., Pirbalouti, A., sharififar, Sh., Motaghi. M., Amirkhosravi, A., Ezatkah, M., Pourmohseni nasab, A. and Kouhpaye, Z., 2009. Investigation of antibacterial effects of metanolic extract of Eucalyptus and Conflunta amphibolips on Lactococcus garvieae in vitro condition. Congress of development of herbal medicine, Iran. pp. 33.
- [12]. Kuta, F.A., Ndamitso, M., Ibrahim, H., 2008. Antibacterial effect of Eucalyptus globulus leaves extract on antibiotic resistant strains of Streptococcus pneumonia. *Applied Medical Informatics* 22(1-2), 52–54.
- [13]. Lawrence, R., Tripathi, P., Jeyakumar, E., 2009. Isolation, purification and evaluation of antibacterial agents from Aloe vera. *Brazilian Journal of Microbiology* 40, 906–915.
- [14]. Mahboubi, M., Haghi, G., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of Mentha pulegium L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology* 119(2), 325–327.

- [15]. Mazloumi, M., 2003. Streptococcosis and enterococcosis: The important economic diseases in fish culture. Navid Shiraz press, Shiraz. pp 35.
- [16]. Romalde, J.L., Toranzo, A.E., 1999. ICES Identification leaflets for diseases and parasites of fish and shellfish. Streptococcosis of marine fish: Leaflet NO.56.
- [17]. Salari, M.H., Amine, G., Shirazi, M.H., Hafezi, R., Mohammadypour, M., 2006. Antibacterial effects of Eucalyptus globulus leaf extract on pathogenic bacteria isolated from specimens of patients with respiratory tract disorders. *Clinical Microbiology and Infection* 12(2), 194–196.
- [18]. Soltani, M., Jamshidi, Sh., Sharifpour, I., 2005. Streptococcus iniae in farmed rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Iran, Biophysical characteristics and pathogenesis. *Bulletin of the European Association of Fish Pathogenesis* 25, 95–106.
- [19]. Soltani, M., Nikbakht, Gh., Mousavi, H.A.E., Ahmadzadeh, N., 2008. Epizootic outbreaks of Lactococcosis caused by *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Iran. *Bulletin of the European Association of Fish Pathogenesis* 28, 207–212.
- [20]. Soltani, M., Fadaifard, F., Sharifpour, I., Zargar, A., 2008. The experimental pathology of *Streptococcus* sp. in *Onchorhynchus mykiss*. *Iranian Journal of Fisheries Science* 17(4), 81–88.
- [21]. Soltani, m., Alishahi, M., Khazrainia, P., Satari, A., 2009. Investigation of some immunological parameters of *Onchorhynchus mykiss* on some antigens of *Streptococcus iniae*. *Iranian Journal of Veterinary Science* 62(1), 1–10.
- [22]. Woo, P.T.K., Bruno, D.W., 1999. Fish diseases and disorders, Viral, bacterial and fungal infections. CABI publisher, pp. 309-317.