

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی  
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی

عنوان:

**بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره و نانو  
عصاره مرزنگوش (*Origanum vulgare*) به روش  
برون تنی و درون تنی و مقایسه آن با  
فلور فنیکل و نانو فلور فنیکل در  
ماهی قزل آلائی رنگین کمان  
(*Oncorhynchus mykiss*)**

مجری:

مسعود حقیقی

شماره ثبت

۵۴۴۳۶

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی  
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی

---

عنوان طرح/پروژه: بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره و نانو عصاره مرزنگوش (*Origanum vulgare*) به روش برون تنی و درون تنی و مقایسه آن با فلورفینیکل و نانو فلورفینیکل در ماهی قزل آلابی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)  
کد مصوب: ۲-۱۲-۱۲-۹۴۱۰۸

نام و نام خانوادگی نگارنده/نگارندگان: مسعود حقیقی

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرح های ملی و مشترک دارد):

نام و نام خانوادگی مجری /مجریان: مسعود حقیقی

نام و نام خانوادگی همکار(ان): مصطفی شریف روحانی، سید محمد اسماعیل فخار زاده، سلطنت نجار لشگری، رحمت یوسفی، فرهاد قنبری، ابوالفتح رضوانی، بهنام پور مولائی

نام و نام خانوادگی مشاور(ان): -

نام و نام خانوادگی ناظر(ان): -

محل اجرا: استان مازندران

تاریخ شروع: ۹۴/۲/۱

مدت اجرا: ۲ سال و ۲ ماه

ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار: سال ۱۳۹۷

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است. نقل مطالب، تصاویر، جداول، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است.

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسؤل / مجری»

طرح/پروژه : بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره و نانو عصاره  
مرزنگوش (*Origanum vulgare*) به روش برون تنی و درون تنی و  
مقایسه آن با فلورفینکل و نانو فلورفینکل در ماهی قزل آلابی رنگین

کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

کد مصوب : ۲-۱۲-۱۲-۹۴۱۰۸

شماره ثبت (فروست) : ۵۴۴۳۶ تاریخ : ۱۳۹۷/۸/۹

با مسؤلیت اجرایی جناب آقای مسعود حقیقی دارای مدرک  
تحصیلی دکتری تخصصی در رشته فارماکولوژی می باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان در

تاریخ ۹۷/۶/۲۱ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده □ مرکز ■ ایستگاه □

با سمت مسؤل گروه بیماریهای ویروسی و باکتریایی در مرکز

تحقیقات ماهیان سردآبی مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه
چکیده		۱
۱. مقدمه		۴
۱-۱. معرفی گیاه مرزنگوش ( <i>Origanum vulgare</i> )		۴
۱-۲. نام های گیاه مرزنگوش		۴
۱-۳. ریخت شناسی گیاه مرزنگوش		۴
۱-۴. ترکیبات گیاه مرزنگوش		۵
۱-۵. آثار فارماکولوژیک گیاه مرزنگوش		۵
۱-۶. اثرات ضد میکروبی گیاه مرزنگوش		۵
۱-۷. فلورفینکول		۶
۱-۸. نانو تکنولوژی		۷
۱-۸-۱. روش های تهیه نانو سوسپانسیون ها		۸
۱-۸-۲. تعیین خصوصیات نانو ذرات		۹
۱-۸-۳. خواص نانو ذرات		۱۰
۱-۸-۴. ویژگی های نانو فناوری در طراحی دارو		۱۰
۱-۸-۵. فناوری نانو و دارو رسانی		۱۱
۱-۸-۶. دارو رسانی با نانو سوسپانسیون ها		۱۴
۲. مواد و روش ها		۱۶
۲-۱. تهیه عصاره مرزنگوش		۱۶
۲-۲. تعیین وزن خشک عصاره مرزنگوش		۱۶
۲-۳. تعیین درصد مواد تشکیل دهنده پودر و نانو پودر عصاره مرزنگوش		۱۶
۲-۴. تولید نانو پودر عصاره مرزنگوش		۱۷
۲-۵. بررسی ویژگی های نانو ذرات تولید شده از پودر عصاره مرزنگوش		۱۸
۲-۵-۱. تعیین اندازه نانو ذرات پودر عصاره مرزنگوش		۱۹
۲-۵-۲. تعیین بار سطحی نانو ذرات (Zeta potential)		۱۹
۲-۶. اندازه گیری مقادیر ترکیبات موجود در پودر و نانو پودر عصاره مرزنگوش		۲۰
۲-۷. تهیه نانو سوسپانسیون فلورفینکول		۲۱

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه
۲-۸. بررسی ویژگی های نانو سوسپانسیون فلورفینیکول.....		۲۱
۲-۸-۱. تعیین اندازه نانو ذرات فلورفینیکل.....		۲۱
۲-۸-۲. تعیین بار سطحی نانو ذرات فلورفینیکل (Zeta potential).....		۲۲
۲-۸-۳. بررسی پراکندگی مجدد نانو پودر فلورفینیکل در آب مقطر.....		۲۲
۲-۸-۴. اندازه گیری طیف عبور یا جذب نوری در ناحیه طیفی مادون قرمز، Fourier Transform Infrared		
۲-۸-۵. گرماسنجی افتراقی (DSC) Differential scanning calorimetry نانو پودر فلورفینیکل.....		۲۳
۲-۹. تعیین مقدار فلورفینیکل در نانو پودر فلورفینیکل (Assay).....		۲۴
۲-۱۰. آزمون انحلال سنجی.....		۲۵
۲-۱۱. تهیه و فعال سازی باکتری استرپتوکوکوس اینیایی.....		۲۵
۲-۱۲. آماده سازی سوسپانسیون باکتری استرپتوکوکوس اینیایی.....		۲۶
۲-۱۳. روش های مورد استفاده جهت تعیین اثر ضد باکتری.....		۲۶
۲-۱۳-۱. بررسی کمی حساسیت میکروبی به روش رقیق سازی در محیط مایع (Macrodilutions).....		۲۷
۲-۱۳-۲. بررسی کمی حساسیت میکروبی به روش انتشار دیسک (Disk diffusion).....		۲۷
۲-۱۴. عملیات ماهی داری.....		۲۸
۲-۱۵. عملیات اجرایی و تیمار بندی.....		۲۸
۲-۱۶. آماده سازی جیره غذایی حاوی دارو.....		۲۹
۲-۱۷. آزمون های میکروبی.....		۳۰
۲-۱۸. آزمون های خون شناسی.....		۳۱
۲-۱۹. آسیب شناسی بافتی (هیستوپاتولوژی).....		۳۲
۲-۲۰. آزمون بار باکتریایی بافت طحال.....		۳۳
۲-۲۱. بررسی های آماری.....		۳۳
۳- نتایج.....		۳۴
۳-۱. نتایج MIC و MBC.....		۳۵
۳-۲. نتایج آزمایش های سرم شناسی.....		۳۵
۳-۲-۱. نتایج آنالیز میزان کورتیزول خون.....		۳۶
۳-۲-۲. نتایج آنالیز میزان گلوکز خون.....		۳۶
۳-۲-۳. نتایج آنالیز فعالیت آنزیم لیزوزیم.....		۳۹
		۴۱

صفحه	«فهرست مندرجات»	عنوان
۴۳	.....	۳-۳. نتایج آزمایش های خون شناسی
۴۳	.....	۳-۳-۱. آنالیز درصد هماتوکریت خون
۴۵	.....	۳-۳-۲. نتایج آنالیز شمارش کلی گلبول های سفید خون
۴۶	.....	۳-۳-۳. نتایج آنالیز شمارش افتراقی گلبول های سفید خون
۴۹	.....	۳-۴. نتایج آنالیز درصد تلفات بچه ماهی های آلوده شده به باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در پایان مراحل پیشگیری و درمانی
۴۹	.....	۳-۵. نتایج آنالیز بار باکتریایی طحال بچه ماهی های آلوده شده به باکتری استرپتوکوکوس اینیایی
۴۹	.....	۳-۵-۱. مرحله پیشگیری
۵۰	.....	۳-۵-۲. مرحله درمانی
۵۱	.....	۳-۶. نتایج بررسی های کیفی آسیب شناسی
۵۱	.....	۳-۶-۱. مرحله پیشگیری
۵۲	.....	۳-۶-۲. مرحله درمانی
۵۲	.....	۳-۷. بررسی نمونه های بافت کلیه بچه ماهی های تیمار شاهد
۵۷	.....	۴. بحث
۵۷	.....	۴-۱. بررسی های آزمایشگاهی
۵۹	.....	۴-۲. بررسی های سرمی در مرحله میدانی
۵۹	.....	۴-۲-۱. هورمون کورتیزول
۶۱	.....	۴-۲-۲. غلظت گلوکز خون
۶۳	.....	۴-۲-۳. فعالیت آنزیم لیزوزیم
۶۴	.....	۴-۲-۴. درصد هماتوکریت خون
۶۵	.....	۴-۲-۵. شمارش کلی گلبول های سفید خون
۶۶	.....	۴-۲-۶. شمارش افتراقی گلبول های سفید خون
۶۷	.....	۴-۳. بار باکتریایی بافت طحال
۶۹	.....	۴-۴. آسیب شناسی بافتی
۷۱	.....	۴-۵. تلفات
۷۲	.....	۵- نتیجه گیری نهایی
۷۳	.....	پیشنهادها
۷۴	.....	منابع
۸۲	.....	چکیده انگلیسی

## چکیده

هدف این پژوهش، بررسی اثر ضد باکتریایی پودر معمولی و نانو پودر عصاره مرزنگوش (فرمولاسیون جدید) به روش آزمایشگاهی (کشت باکتری استرپتوکوکوس اینیایی) و روش میدانی (پیشگیری و درمان) در بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) آلوده شده به باکتری استرپتوکوکوس اینیایی (*Streptococcus iniae*) و مقایسه اثرات آن با فلورفینیکل و نانو فلورفینیکل (فرمولاسیون جدید) بود. همچنین، اثرات این مواد بر روی برخی از شاخص های خونی، بیوشیمیایی خون و بافتی در هر دو مرحله پیشگیری و درمانی بود. در روش آزمایشگاهی، حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) و نیز اندازه قطر هاله عدم رشد مورد بررسی قرار گرفتند. در روش میدانی، در هر مرحله از ۴۵۰ عدد بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان با میانگین وزنی  $1 \pm 15$  گرم استفاده شد و در ۵ گروه (هر گروه با سه تکرار) شامل: (۱) گروه جیره پایه فاقد دارو (شاهد منفی)، (۲) گروه جیره پایه حاوی ۱٪ پودر معمولی عصاره مرزنگوش، (۳) گروه جیره پایه حاوی ۱٪ نانو پودر عصاره مرزنگوش، (۴) گروه جیره پایه حاوی ۱۰ میلی گرم فلورفینیکل به ازای هر کیلوگرم وزن ماهی (شاهد مثبت) و (۵) گروه جیره پایه حاوی ۱۰ میلی گرم نانو پودر فلورفینیکل به ازای هر کیلوگرم وزن ماهی تقسیم شدند. جهت آلوده نمودن بچه ماهی ها از ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری استرپتوکوکوس اینیایی ( $3 \times 10^8$  cfu) استفاده شد. در طول مدت آزمایشات، تلفات به صورت روزانه جمع آوری و ثبت گردید و در پایان مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نمونه گیری از خون و بافت بچه ماهی ها در دو مرحله یکی در پایان هفته دوم پس از دارو درمانی و دیگری در پایان هفته دوم پس از قطع دارو درمانی انجام شد.

نتایج نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) پودر معمولی عصاره مرزنگوش  $1000 \mu\text{g/ml}$ ، نانو پودر عصاره مرزنگوش به ترتیب  $250 \mu\text{g/ml}$  و  $500 \mu\text{g/ml}$ ، پودر فلورفینیکل به ترتیب  $3/9 \mu\text{g/ml}$  و  $7/8 \mu\text{g/ml}$ ، و نانو پودر فلورفینیکل  $1/9 \mu\text{g/ml}$  و  $3/9 \mu\text{g/ml}$  بودند. اندازه قطر هاله عدم رشد در تیمار پودر معمولی عصاره مرزنگوش  $21/7 \pm 0/8$  میلی متر، نانو پودر عصاره مرزنگوش  $26/06 \pm 0/3$  میلی متر، پودر فلورفینیکل  $31/63 \pm 0/4$  میلی متر و نانو پودر فلورفینیکل،  $32/80 \pm 1/1$  میلی متر بودند که بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی دار وجود داشت ( $p < 0/05$ ). این نتایج نشان می دهد که باکتری استرپتوکوکوس اینیایی نسبت به پودر معمولی عصاره مرزنگوش حساس می باشد ولی حساسیت آن به نانو پودر عصاره مرزنگوش بیش تر است. حساسیت باکتری استرپتوکوکوس اینیایی به نانو پودر فلورفینیکل، بیش از سایر مواد بود. این نشان می دهد که این باکتری نسبت به فرم نانو داروها حساسیت بیشتری نشان داده اند.

نتایج بررسی های سرم شناسی در پایان هفته دوم پس از دارو درمانی در مرحله پیشگیری نشان داد که غلظت کورتیزول خون بچه ماهی های غیر آلوده به باکتری استرپتوکوکوس اینیایی تحت تأثیر پودر معمولی و نانو پودر عصاره مرزنگوش قرار نداشتند؛ ولی در پایان هفته دوم پس از قطع دارو درمانی، غلظت کورتیزول خون بچه ماهی های آلوده شده به این باکتری در تمامی تیمارها به طور چشمگیری افزایش داشت. این افزایش غلظت

کورتیزول خون در تیمارهای پودر معمولی و نانو پودر عصاره مرزنگوش کمتر از تیمارهای فلور فنیکل و نانوفلورفنیکل و شاهد بودند. تفاوت آماری معنی داری در افزایش غلظت کورتیزول خون بین تیمارهای پودر معمولی و نانو پودر عصاره مرزنگوش وجود نداشت ( $p > 0.05$ ). این نتایج نشان می‌دهد که باکتری استرپتوکوکوس اینیایی می‌تواند موجب افزایش غلظت کورتیزول خون گردد. اما در پایان هفته دوم پس از دارو درمانی، این مواد تأثیری بر غلظت کورتیزول خون بچه ماهی‌های آلوده شده به باکتری استرپتوکوکوس اینیایی نداشتند. همچنین، در پایان هفته دوم پس از قطع دارو درمانی، غلظت کورتیزول خون در تیمارهای پودر معمولی و نانو پودر عصاره مرزنگوش در مقایسه با دیگر تیمارهای دارویی و تیمار شاهد کاهش داشتند ( $p < 0.05$ ). این نشان می‌دهد که احتمالاً پودر معمولی و نانو پودر عصاره مرزنگوش تا حدودی در کنترل استرس و کاهش ترشح کورتیزول خون مؤثر بوده‌اند.

غلظت گلوکز خون بچه ماهی‌های غیر آلوده به باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در تیمارهای دارویی (به استثنای تیمار پودر معمولی عصاره مرزنگوش) در مقایسه با تیمار شاهد منفی در پایان هفته دوم پس از دارو درمانی افزایش نشان دادند ( $p < 0.05$ ). این نشان می‌دهد که این مواد موجب افزایش غلظت گلوکز خون شدند. همچنین، در پایان هفته دوم پس از قطع دارو درمانی، غلظت گلوکز خون بچه ماهی‌های آلوده شده به این باکتری در تیمارهای دارویی در مقایسه با تیمار شاهد افزایش داشتند؛ ولیکن این افزایش کمتر از پایان هفته دوم پس از دارو درمانی بود. احتمالاً مصرف این مواد با گذشت زمان سبب کنترل استرس و کاهش ترشح گلوکز شده‌اند. همچنین، غلظت گلوکز خون بچه ماهی‌های آلوده شده به این باکتری در تیمارهای دارویی نسبت به تیمار شاهد منفی در پایان هفته دوم پس از دارو درمانی، افزایش داشتند. این نشان می‌دهد که این باکتری سبب افزایش غلظت گلوکز خون بچه ماهی‌ها شده است. غلظت گلوکز خون بچه ماهی‌های آلوده شده به باکتری در تیمارهای دارویی در پایان هفته دوم پس از قطع دارو درمانی، بیشتر از تیمار شاهد منفی بودند؛ ولی این افزایش غلظت گلوکز در تمامی تیمارها نسبت به پایان هفته دوم پس از دارو درمانی کمتر بودند. این نتایج نشان می‌دهد که احتمالاً مصرف این مواد با گذشت زمان سبب کاهش بار باکتریایی در بچه ماهی‌ها شده است.

فعالیت آنزیم لیزوزیم در بچه ماهی‌های غیر آلوده به باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در پایان هفته دوم پس از دارو درمانی در تیمارهای دارویی در مقایسه با تیمار شاهد منفی افزایش داشت ( $p < 0.05$ ). ولی در پایان هفته دوم پس از قطع دارو درمانی، فعالیت این آنزیم در تیمارهای پودر معمولی و نانو پودر عصاره مرزنگوش در مقایسه با دیگر تیمارهای دارویی و تیمار شاهد کمتر بود. همچنین، نتایج در مرحله درمانی نشان داد که فعالیت آنزیم لیزوزیم خون در پایان هفته دوم پس از دارو درمانی در بچه ماهی‌های آلوده به این باکتری در تیمارهای دارویی بیشتر از تیمار شاهد منفی بود ( $p < 0.05$ )؛ ولی این افزایش کمتر از پایان هفته دوم پس از قطع دارو درمانی بود. این نتایج نشان می‌دهد که با توجه به پیشرفت درمان و کاهش بار باکتریایی از میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم کاسته شده است.



تغییری در درصد هماتوکریت و شمارش کلی گلبول های سفید خون در تیمار پودر معمولی عصاره مرزنگوش مشاهده نشد ( $p > 0/05$ )؛ ولی در گروه نانو پودر عصاره مرزنگوش افزایش نشان دادند ( $p < 0/05$ ). هیچیک از داروهای مصرفی تأثیری بر درصد شمارش افتراقی گلبول های سفید خون نداشتند. درصد مونوسیت ها در تیمار پودر معمولی عصاره مرزنگوش و تیمار شاهد منفی نسبت به سایر تیمارهای دارویی کاهش داشت ( $p < 0/05$ ). تأثیر مثبت این مواد در کاهش بار باکتریایی طحال از دیگر نتایج این تحقیق بود.

پودر معمولی عصاره مرزنگوش تأثیر منفی قابل توجه ای بر روی بافت های مورد نظر تحقیق نداشت. این نشان می دهد که افزودن ۱٪ پودر معمولی عصاره مرزنگوش به غذا، برای ماهی سمی نمی باشد. درصد تلفات در تیمارهای دارویی کم تر از تیمار شاهد منفی بود.

در مجموع می توان نتیجه گرفت که پودر معمولی عصاره مرزنگوش به عنوان یک داروی ضد باکتری مکمل در آبزیان می تواند مد نظر قرار گیرد. لذا، از آنجا که آنتی بیوتیک های شیمیایی موجب مقاومت روز افزون باکترهای بیماری زا، آلودگی زیست محیطی و عوارض جانبی بر روی ماهی و انسان (مصرف کننده ماهی) می شوند؛ مصرف پودر معمولی عصاره مرزنگوش در صنعت آبزی پروری بسیار مفید و ارزشمند خواهد بود. زیرا اولاً عوارض جانبی آنتی بیوتیک های شیمیایی را نداشته و ثانیاً موجب کاهش مصرف آنتی بیوتیک های شیمیایی و به دنبال آن کاهش مقاومت دارویی در آبزیان می شود.

**کلمات کلیدی:** عصاره آبی-الکلی، مرزنگوش، ضد باکتری، استرپتوکوکوس اینیایی، فلورفنیکل، نانو