بررسی اثر عصاره مرزنگوش (*Origanum vulgare*) در پیشگیری از آلودگی تجربی به استرپتوکوکوس اینیایی در ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

سیدمحمداسماعیل فخارزاده[۱]، مسعود حقیقی[۱*]، مصطفی شریف روحانی[۲]، عیسی شریف پور[۲]

*masoud126@yahoo.com

۱-مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تنکابن، ایران

۲- مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۵

کلمات کلیدی: ماهی، استرپتوکوزیس، فلورفنیکل، مرزنگوش، مواجهه باکتریایی

استرپتوکوزیس یکی از مهمترین بیماری های باکتریایی در صنعت پرورش ماهیان سرد آبی کشور است (Soltani *et al*., 2005)، که با استفاده از آنتی بیوتیک های مختلف همانند فلورفنیکل تیمار می شود (Bowker *et al*., 2010). با توجه به مشکلات آنتی بیوتیک ها، استفاده از منابع جایگزین می بایست جهت جلوگیری از رشد این باکتری مورد توجه قرار گیرد (Fereidoni & Akhlaghi, 2009). این منابع می توانند عصاره های گیاهانی همانند مرزنگوش باشند.

گیاه مرزنگوش از خانواده نعناعیان بوده و خواص آنتی بیوتیکی عصاره آن به جهت دارا بودن ترکیبات آنتی بیوتیکی فاتالات شامل کارواکرول و تیمول شناخته شده است (Gottumukkala Venkateswara *et al*., 2011). مطالعاتی در زمینه استفاده از اسانس گیاه مرزنگوش بر ۴ گونه باکتری (Ozkalp *et al*., 2010) و یا اثر آن برلاکتوباسیل ها (Horosova *et al*., 2006) تا کنون انجام گرفته است. با این حال تا کنون مطالعه ای میدانی در زمینه استفاده از ترکیبات حاصل از این گیاه در آبزی پروری انجام نشده است. در این بررسی، مطالعه اثر گذاری عصاره مرزنگوش در پیشگیری از استرپتوکوکوزیس تجربی مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این بررسی نخست تعیین اثر گذاری عصاره مرزنگوش در فاز میدانی و پس از آن مقایسه تأثیر آن با یک آنتی بیوتیک صناعی (فلورفنیکل) بوده است.

عصاره گیری از گیاه به روش پرکولاسیون انجام شد (Ozakan *et al*., 2007). باکتری استرپتوکوکوس اینیایی نیز از پژوهشکده دریای خزر (ساری) اخذ شد. بسته لیوفیلیزه این باکتری ابتدا فعال شده (Austin & Austin, 1993) و در شرایط استریل در محیط کشت نوترینت براث (Nutrient Broth) کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در فاز لگاریتمی رشد باکتری با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر با لوله استاندارد مک فارلن شماره ۱ (۳×۱۰^{۸}) تنظیم گردید.

جهت تهیه سوسپانسیون باکتری، ابتدا لوله های آزمایش حاوی ۱۰ سی سی محیط کشت نوترینت براث و باکتری به مدت ۱۰ دقیقه تحت سانتریفیوژ در rpm ۵۰۰۰ قرار داده شدند. پس از آن محلول فوقانی جدا شده

و دور ریخته شد. سپس ۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل به محیط اضافه شد. محیط مجدداً تحت شرایط قبل سانتریفیوژ شده و مایع فوقانی دور ریخته شد. در نهایت به هر لوله آزمایش سرم فیزیولوژی استریل اضافه شد تا غلظت هر لوله برابر با لوله استاندارد شماره ۱ مک فارلن باشد. تنظیم لوله ها با استاندارد مک فارلن با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر انجام پذیرفت.

مخازن پلی اتیلن به حجم ۲۰۰ لیتر با ورودی و خروجی مجزا برای ماهی داری استفاده. نمونه های مورد استفاده در این بررسی، ۳۶۰ عدد بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان با وزن متوسط ۱±۱۵ گرم بود. ابتدا جهت تایید سلامت بچه ماهی ها از بافت کلیه و طحال ماهی ها برروی محیط مولرهینتون اگار (Muller Hinton Agar) کشت تهیه گردید که هیچ گونه آلودگی در نمونه ها مشاهده نشد. عملیات اجرایی این بررسی در قالب یک طرح تصادفی با ۳ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار انجام شد. تعداد ۴۰ عدد ماهی به هر تانک وارد گردید. بچه ماهی ها به مدت دو هفته با جیره آزمایشی خود به میزان ۱٪ وزن بیومس (Biomass) مورد تغذیه قرار گرفتند. پس از نمونه برداری از خون و بافت طحال بچه ماهی ها، مواجهه باکتریایی با استرپتوکوکوس اینیایی به روش تزریق داخل صفاقی به میزان ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری با غلظت ۱ مک فارلن انجام پذیرفت. پس از اثبات وجود عامل بیماری زا در بدن ماهی ها با استفاده از کشت بکتریایی بر روی محیط کشت نوترینت براث از بافت کلیه، در ادامه به مدت دو هفته تلفات و علائم بچه ماهی ها ثبت گردید. در پایان از بافت طحال و کلیه و خون تعدادی از بچه ماهی ها در هر تکرار نمونه برداری شد. دوز مصرفی فلورفنیکل ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن ماهی زنده در نظر گرفته شد (Torkildsen *et al*., 2000). همچنین دوز مصرفی عصاره مرزنگوش به میزان ۱٪ وزن جیره روزانه انتخاب گردید.

خون گیری در بچه ماهی ها از ساقه دمی و با استفاده از سرنگ در دو مرحله انجام شد. مرحله اول خون گیری، پس از تیمار و پیش از مواجهه باکتریایی به جهت تعیین اثر تیمار با استفاده از فلورفنیکل و عصاره مرزنگوش انجام شد. مرحله دوم دو هفته پس از مواجهه باکتریایی انجام گرفت. جهت شمارش افتراقی گلبول های خونی از لام گیمسا با استفاده از میکروسکوپ نوری استفاده شد (Blaxhall & Daisley, 1973). همچنین فعالیت آنزیم لیزوزیم بر اساس روش ارائه شده توسط (Clerton *et al*., 2001) بر مبنای انهدام باکتری گرم مثبت *Micrococcus lysodeikticus* حساس به آنزیم لیزوزیم اندازه گیری شد.

جهت مطالعات بافت شناسی از بافت طحال و کلیه بچه ماهی ها در دو مرحله نمونه برداری شد. نمونه های بافت پس از تثبیت در فرمالین۱۰٪، آماده سازی شده روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی شدند و در ادامه با استفاده از میکروسکوپ دوربین دار Nikon Eclipse مدلE200 مورد بررسی قرار گرفتند.

به منظور مطالعه شمارش کلی باکتری استرپتوکوس اینیایی در بافت بچه ماهی های تیمار شده از روش ارائه شده توسط Barquero-Calvo *et al*. (2011) استفاده گردید. شمارش کلنی ها در ادامه با استفاده از کلنی کانتر انجام پذیرفت (Peter, 1986).

به منظور بررسی توزیع نرمال داده ها در تیمارهای مورد مطالعه از آزمون Kolmogorov-smirnov استفاده و به منظور مقایسه آماری بین تیمارها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-way Anova) استفاده گردید. جهت تجزیه و تحلیل داده ها پس از انجام آزمون Test of Homogeneity of Variances از آزمون دانکن (Duncan) در سطح ۹۵ درصد نیز به منظور مقایسه گروه ها با یکدیگر استفاده گردید. تمامی آنالیز های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۰ و جهت رسم نمودار ها، نرم افزار Excel ۲۰۰۷ مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج شمارش افتراقی گلبول های خون (جدول ۱) و نتایج تعداد گلبول های سفید خون (جدول ۲) نشان داد که تعداد لنفوسیت ها و مونوسیت ها در مرحله اول نمونه برداری (قبل از آلودگی) در تیمار عصاره مرزنگوش و فلورفنیکل نسبت به شاهد به طور معنی داری بالاتر بود ($p<0.05$, $F=6.1$). در مرحله دوم نمونه برداری (پس از آلودگی) تعداد مونوسیت ها در تیمار شاهد به نسبت سایر تیمار ها به طرز معنی داری کمتر بود ($p<0.05$,

(F=3.95,3.82). با این حال در بررسی تعداد گلبول های سفید و همچنین مونوسیت ها تفاوت معنی داری بین تیمارها قبل و پس از آلودگی وجود نداشت (p>0.05).

افزایش درصد گلبول های سفید با استفاده از گیاهان دارویی مختلف مانند پودر زنجبیل (Haghighi & Sharif Rohani, 2013) و همچنین عصاره گیاه سرخارگل و گون (پور غلام و همکاران، ۱۳۹۴) بر روی ماهی قزل آلای رنگین کمان گزارش شده اند. با این حال در تحقیقاتی که بر روی گیاه مرزنگوش در ماهی قزل آلای رنگین کمان در اوزان ۲ و ۱۰ گرمی در طی مدت ۸ هفته انجام گرفت نشان داد که عصاره مرزنگوش تأثیری بر تعداد گلبول های سفید و شمارش افتراقی آن ها نداشت (Haghighi *et al*., 2014). تفاوت میان نتایج بررسی حاضر با نتایج حقیقی و همکاران (۲۰۱۴) احتمالاً بدلیل تفاوت در وزن، فصل، درجه حرارت، نژاد و نیز تأثیر اندازه و سن ماهی بوده است. بالا رفتن تعداد گلبول های سفید خون و افزایش مونوسیت ها نسبت به نوتروفیل ها و لنفوسیت ها در ماهی قزل آلا به عنوان یکی از علائم افزایش فعالیت فاگوسیتوزی در ماهی می باشد (Harikrishnan *et al*., 2003). افزایش فعالیت فاگوسیتوزی می تواند بیانگر بروز آلودگی و یا بروز واکنش ایمنی در ماهی باشد. با توجه به اینکه در مرحله اول نمونه برداری هیچ گونه آلوگی در ماهی ها وجود نداشت، می توان گفت که تیمار با استفاده از عصاره مرزنگوش باعث بالا رفتن ایمنی عمومی در بعد هماتولوژیک شده است.

جدول ۱: نتایج آنالیز داده های شمارش افتراقی گلبول های خون قبل و بعد از آلودگی ماهی ها به باکتری استرپتوکوکوس اینیایی

Table 1: Results of blood cells counting before and after the challenge with *S.iniae*

	قبل از مواجهه			بعد از مواجهه		
تیمار	نوتروفیل	لنفوسیت	مونوسیت	نوتروفیل	لنفوسیت	مونوسیت
شاهد	۷/۵۲±۰/۱۸^{a}	۸۸/۹۶±۰/۲۸^{a}	۳/۵±۰/۱۶^{a}	۸/۳±۰/۶^{ab}	۸۷/۸۳±۰/۶۴^{a}	۳/۷۰±۰/۴۵^{a}
مرزنگوش	۷/۳۶±۰/۳۲^{a}	۸۹/۸۳±۰/۴۱^{b}	۲/۸±۰/۱۷^{b}	۷/۷۳±۰/۳^{a}	۸۸/۲۶±۰/۵۶^{a}	۴±۰/۲۶^{b}
فلورفنیکل	۶/۸۳±۰/۶۰^{a}	۹۰/۵±۰/۷۰^{b}	۲/۶۶±۰/۲^{b}	۹/۲۶±۰/۷۵^{b}	۸۷/۱±۰/۶۰^{a}	۳/۶۶±۰/۵۸^{ab}

جدول ۲: تعداد کل گلبول های سفید در تیمارهای مختلف قبل و پس از آلودگی ماهی ها به باکتری استرپتوکوکوس اینیایی ($x10^3$±SD)

Table 2: Total count of leucocytes before and after the challenge with *S.iniae*

تیمار	قبل از آلودگی	بعد از آلودگی
مرزنگوش	۴±۰/۵^{a}	۳/۹± ۰/۴^{a}
فلورفنیکل	۴/۱±۰/۸^{a}	۴±۰/۷^{a}
شاهد	۳/۹±۰/۶^{a}	۴/۱±۰/۲^{a}

بررسی میزان تلفات نشان داد که درصد تلفات تجمعی در تیمار عصاره مرزنگوش و فلورفنیکل طور معنی داری کمتر از شاهد بودند (p<0.05). این مساله احتمالا بدلیل اثر گذاری مرزنگوش بر سیستم ایمنی ماهی بوده است. تیمار بوسیله سرخار گل و گون در مطالعه ای که توسط پورغلام و همکاران (۱۳۹۲) صورت پذیرفت باعث کاهش تلفات ناشی از آلوده سازی با استرپتوکوکوس اینیایی در ماهی قزل آلای رنگین کمان گردید. در این بررسی نیز تلفات به طرز معنی داری کاهش یافت. این مساله بیانگر اثرگذاری مرزنگوش در درمان عفونت ناشی از استرپتوکوکوس اینیایی بوده است.

شکل ۱: درصد تلفات تجمعی بعد از آلودگی ماهی ها به استرپتوکوکوس اینیایی

Figure 1:Total mortality in fishes after the challenge

در تحقیق حاضر، فعالیت آنزیم لیزوزیم قبل از آلودگی ماهی ها به باکتری اسرپتوکوکوس اینیایی در تیمار فلورفنیکل نسبت به شاهد کاهش نشان داد ($p<0.05$). این نتیجه موافق با نتیجه بدست آمده در تحقیقات مشابه می باشد (Caipang *et al*., 2009). در مرحله دوم نمونه برداری میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم در تیمار فلورفنیکل در بالاترین حد خود قرار داشت. این مساله می تواند ناشی از اثر گذاری فلورفنیکل در کنترل میزان آلودگی باکتریایی و در نتیجه عملکرد بهتر سیستم ایمنی بدن بچه ماهی ها در این تیمار باشد. افزایش میزان فعالیت لیزوزیم در زمانی که ماهی تحت مواجهه باکتریایی قرار گرفته و سپس با استفاده از آنتی بیوتیک تیمار گردد پیش از این مشاهده شده است (Caipang *et al*., 2009; Manal *et al*., 2011). با این حال فعالیت آنزیم لیزوزیم در هر دو مرحله نمونه برداری در ماهی ها به طرز معنی داری کمتر بود. این مساله مغایر با تحقیقات دیگر می باشد (Walter & Bilkei, 2004). کاهش معنی دار فعالیت آنزیم لیزوزیم در این بررسی احتمالا بدلیل کوتاه بودن زمان بررسی و یا تفاوت گونه بوده است.

جدول ۳: میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم (µml/min) در تیمارهای مختلف قبل و بعد از آلودگی ماهی ها به استرپتوکوکوس اینیایی

Table 3: Lysozyme activity analysis in fishes before and after the challenge

تیمار	قبل از آلودگی F=۱۹۰/۲۴	بعد از آلودگی F=۳۸/۷۶
شاهد	۱۰۲/۶۶±۲/۵۱^{a}	۱۰۷/۳۳±۲/۵۱^{a}
مرزنگوش	۷۲±۱^{b}	۸۲/۶۶±۶/۴۲^{b}
فلورفنیکل	۶۳±۲/۵۱^{c}	۱۲۰±۵^{c}

بررسی میزان شمارش کلی باکتری نشان دهنده کاهش معنی دار بار آلودگی در تیمارهای عصاره مرزنگوش و فلور فنیکل بود.، هرچند میزان این کاهش در تیمار فلورفنیکل بیشتر از تیمار عصاره مرزنگوش بود. این مساله نشان داد که هرچند اثرگذاری مرزنگوش در مقایسه با فلورفنیکل در کنترل Load باکتری، کمتر بوده است با این حال مرزنگوش نیز در کنترل باکتری در میزبان موثر بوده است. تاثیر آنتی بیوتیکی تیمول و کارواکرول به عنوان اصلی ترین مواد موجود در عصاره مرزنگوش، پیش از این در مطالعات مختلف نشان داده شده بود (Dadaliglu & Evrendilek, 2004). مواردی نیز از اثر گذاری گیاهان مشابه مرزنگوش همانند آویشن، بر روی استرپتوکوکوس اینیایی نیز پیش از این نشان داده شده بود (علیشاهی و همکاران، ۱۳۸۹). بنابراین نتایج این تحقیق با بررسیهای پیشین همخوانی داشته است.

جدول۴: نتایج آنالیز شمارش کلی باکتری در مرحله بعد از آلودگی با استرپتوکوکوس اینیایی (CFU/gr Spleen)

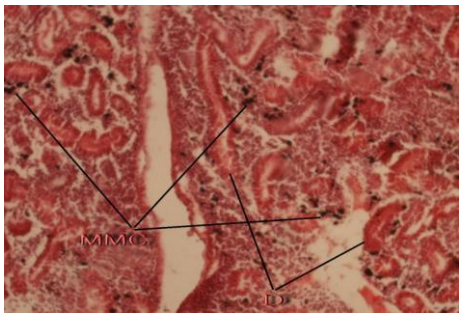
Table 4: Bacterial total count in spleen after the challenge

تیمار	کشت خالص	رقت ۰/۱	رقت ۰/۰۱	رقت ۰/۰۰۱	رقت ۰/۰۰۰۱
شاهد	> ۳۰۰	> ۳۰۰^{a}	> ۳۰۰	۲/۵±۰/۱×۱۰^{۲}	۵/۶۳±۰/۳۷×۱۰
عصاره مرزنگوش	> ۳۰۰	۲/۵۵±۰/۱×۱۰^{۲b}	۱/۱±۰/۳۳×۱۰^{۲}	< ۳۰	< ۳۰
فلورفنیکل	> ۳۰۰	۱/۱۹±۰/۳۵×۱۰^{c}	< ۳۰	< ۳۰	< ۳۰

اعداد بزرگتر از ۳۰۰ بیانگر آلودگی شدید و غیر قابل اندازه گیری و کمتر از ۳۰ بیانگر کلنی بسیار کم و محدود می باشد.

در بررسی های بافت شناسی در مرحله قبل از آلودگی تفاوتی در بافت طحال و کلیه ماهی های تیمار شده و شاهد مشاهده نشد. تنها موارد محدودی پرخونی در بافتها مشاهده گردید که با توجه به ارائه دارو به ماهی ها قابل انتظار بود. این مساله به معنی فقدان آثار هیستوپاتولوژی در تیمار عصاره مرزنگوش بوده است. در تحقیقات پیش از این نیز تیمار بوسیله عصاره مرزنگوش آثار هیستوپاتولوژیک مهمی در موجودات از خود نشان نداده بود. در مرحله بعد از آلودگی عوارض بافتی ناشی از استرپتوکوکوس اینیایی در عصاره مرزنگوش و فلورفنیکل کمتر از شاهد بود. این مساله به معنی اثربخشی عصاره مرزنگوش بر پیشگیری از استرپتوکوکوزیس بوده است. بر

اساس تحقیقات به عمل آمده بیشتر عوارض بافتی ناشی از استرپتوکوکوزیس در بافت کلیه شامل دژنراسیون بافت خونساز و نکروز و در بافت کبد شامل تجمع مراکز ملانوماکروفاژها می باشد (Noga, 2010). این علائم پس از مواجهه سازی در نمونه ها مشاهده گردید. کاهش این علائم در نمونه های مورد بررسی به معنی اثر بخشی تیمار ها بر کنترل بیماری بوده است. در این مرحله عصاره مرزنگوش اثر بخشی کمتری از فلورفنیکل داشته است.



شکل ۲: تغییرات بافت طحال بعد از آلودگی

Figure 2:Spleen tissue after the challenge

D=دژنره شدن

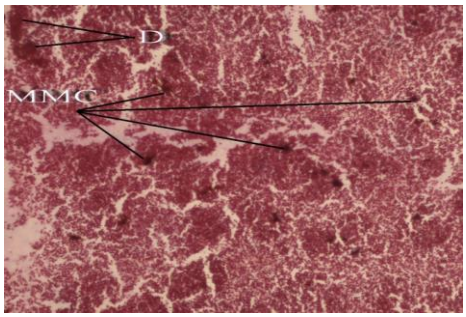
نتایج بررسی طحال ماهی ها قبل از آلودگی به استرپتوکوکوس اینیایی (شکل ۲) نشان از سالم بودن بافت داشت. ولیکن، تغییراتی در طحال بعد از آلودگی به استرپتوکوکوس اینیایی به صورت دژنره شدن و تجمع مراکز ملانوماکروفاژها (MMC) مشاهده شد (شکل ۳) (بزرگنمایی ۴۰×).

با توجه به نتایج این بررسی می توان گفت که عصاره مرزنگوش در پیشگیری از استرپتوکوکوزیس مؤثر است. با این حال اثر گذاری آن از آنتی بیوتیک های صناعی بسیار پایین تر می باشد. می توان در تحقیقات آتی بر روی استفاده از داروهای ترکیبی با استفاده از عصاره مرزنگوش تاکید نمود. همچنین امکان بالابردن عملکرد عصاره مرزنگوش با استفاده از تبدیل آن به اشکال نوین دارویی مرزنگوش در این حالات می بایست مورد بررسی قرار گیرد.

جدول۵: شاخص کیفی طحال و کلیه در مراحل قبل و بعد از آلودگی (۱= خفیف، ۲= متوسط و ۳= شدید)

Table 5: Spleen and kidney quality index before and after the challenge

	بافت طحال		بافت کلیه	
تیمار	قبل از آلودگی	بعد از آلودگی	قبل از آلودگی	بعد از آلودگی
شاهد	۱	۳	۱	۳
مرزنگوش	۱	۲	۱	۲
فلورفنیکل	۱	۲	۱	۱



شکل ۳: کلیه ماهی ها در زمان مواجهه سازی (بزرگنمایی ۱۰x)

Figure 3: Kidney tissue after the challenge

MMC = تجمع مراکز ملانوماکروفاژ

منابع

پورغلام، ر.، شریف روحانی، م.، صفری، ر.، سعیدی، ع.، بینایی، م.، نجفیان، ر.، بانکه ساز، ز.، تقوی، م.ج. و سپهداری، ا.، ۱۳۹۲. اثر عصاره سرخارگل (*Echinacea purpurea*) بر برخی شاخص های ایمنی و بازماندگی قزل آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) در برابر با استرپتوکوک اینیایی (*Streptococcus iniae*)، مجله علمی شیلات ایران، ۲۲(۳): ۱-۱۲

حقیقی، م.، شریف روحانی، م.، صمدی، م.، طاولی، م.، اسلامی، م. و یوسفی، ر.، ۱۳۹۳. بررسی تاثیر عصاره صبر زرد و مرزنگوش بر تحریک سیستم ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان، گزارش نهایی پروژه موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، ۱۴۸صفحه.

علیشاهی، م، قربانپور نجف آبادی، م.، نجف زاده، ح. و پشم فروش، م.، ۱۳۸۹. مطالعه اثرات ضد

باکتریایی برخی عصاره های گیاهی علیه استرپتوکوکوس اینیایی، یرسینیا روکری و آئروموناس هیدروفیلا، مجله دامپزشکی ایران، دوره ششم، (۲): ۲۱-۳۰.

Ahmad, I., Zahin, M., Aqil, F., Hasan, S., Khan, M.S.A. and Owais, M., 2008. Bioactive compounds from (*Punica granatum)*, (*Curcuma longa*) and (*Zingiber officinale*) and their therapeutic potential. Drugs of the Future. 33(4): 329.

Austin, B. and Austin, D.A., 1993. Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish. Ellis Horwood Ltd. Puble, 384P.

Barquero- Calvo, E., Chacon-Diaz, C., Chaves-Olarte, E. and Moreno E., 2013. Bacterial counts in spleen, Bio-Protocol, 954(3):1-6. DOI: 10.21769

Blaxhall, P.C. and Daisley, K.W., 1973. Routine haematological methods for use with fish blood,Journal of Fish Biology, 5: 771-781.

Bowker, J.D., Ostland, V.E., Carty D. and Bowman, M.P., 2010. Effectiveness of aquaflor (50% florfenicol) to control mortality associated with Streptococcus iniae in freshwater-reared subadult sunshine bass, Journal of Aquatic Animal Health, 22(4): 254-265.

Caipang, C.M.A., Lazado, C.C., Brinchmann, M.F., Berg, I. and Kiron, V., 2009. In vivo modulation of immune response and antioxidant defense in Atlantic cod, Gadus morhua following oral administration of oxolinic acid and florfenicol, Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. 150: 459–464.

Clerton, P., Troutaud, D., Verlhac V., Gabraudan, J. and Deschaux, P., 2001, Dietary vitamin E and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and on head kidney leucocytes. Fish and Shellfish Immunology, 11:1-13.

Dadaliglu, I. and Evrendilek, G.A., 2004, Chemical Compositions and Antibacterial Effects of Essential Oils of Turkish Oregano (*Origanum minutiflorum*), Bay Laurel (*Laurus nobilis*), Spanish Lavender (*Lavandula stoechas* L.), and Fennel (*Foeniculum vulgare*) on Common Foodborne Pathogens, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(26): 8255-8260.

Fereidoni, M.S. and Akhlaghi, M., 2009. Resistant pattern of Streptococcus iniae to antibiotics in rainbow trout. 1st international congress on aquatic animal health management and disease, Tehran, Abstract, 81P.

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

Harikrishnan, R., Balasundaramb, C. and Heo, M.S., 2010. Herbal supplementation diets on hematology an innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. Fish Shellfish Immunology, 28: 354-361.

Horosova, K., Bujnakova, D. and Kmet, V., 2006. Effect of Oregano Essential Oil on Chicken Lactobacilli and *E. coli*, Folioa Microbiology, 51(4): 278-280. DOI: 10.1007/BF02931812

Manal M.Z., Alaa, E.E. and Sherein, S., 2011. Assessment of the Immune Status in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Experimentally Challenged with Toxogenic / Septicemic Bacteria During Treatment Trial with Florfenicol and Enrofloxacin, World Journal of Fish and Marine Sciences. 3(1): 21-36.

Merrifield, D.L., Bradley, G., Harper, G.M., Baker, R.T.M., Munn, C.B. and Davies, S.J., 2011. Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Aquaculture Nutrition, 17: 73-79.

Noga, E.J., 2010, Fish Disease: Diagnosis and Treatment, Wiley-Blackwell, USA, 519P.

Ozakan G., Simsek B. and Kuleasan H., 2007. Antioxidant activities of *Satureja cilicica* essential oil in butter and in vitro. Journal of Food Engineering, 79: 1391-1396.

Ozkalp, B., Sevgi, F., Ozcan, M. and Ozcan, M.M., 2010. The Antibacterial Activity of Essential Oil of Oregano (*Origanum vulgare*), Journal of Food, Agriculture & Environment, DOI 8(2): 272-274.

Peter, H.A., 1986. Sneath. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, Williams & Wilkins, pp: 1047-1245

Soltani, M., Jamshidi, Sh. and Sharifpour, I., 2005. Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchys mykiss*) in Iran: piophysical characteristics and pathogenesis, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 25(3): 95-106.

Torkildsen, L., Samuelsen, O.B., Lunestad, B.T. and Bergh, O., 2000, Minimum inhibitory concentrations of chloramphenicol, florfenicol, trimethoprim/sulfadiazine and flumequine in seawater of bacteria associated with scallops (*Pecten maximus*) larvae, Aquaculture, 185:1-12. DOI: 10.1016/s0044

Walter, B.M. and Bilkei, G., 2004. Immunostimulatory effect of dietary oregano etheric oils on lymphocytes from growth-retarded, low-weight growing-finishing pigs and productivity. Tijdschr. Diergeneeskd. 129(6): 178-181. DOI: 15.52959

The effect of Oregano (*Origanum vulgare*) extract on prevention of *S.ineae* experimental infection in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Fakharzade S.M.E.[1]; Hghighi M.[1]*; Sharif Rohani M.[2]; Sharifpoor I.[2]

* mzamanpoore@gmail.com

1-Cold Water Fishes Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education & Extension Organization, Tonekabon
2-Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education & Extension Organization

Abstract

This study was performed in order to determine the effect of Oregano (Origanum vulgare) extract on Streptococcus ineae infection in rainbow trout. ۳۶۰ rainbow trout weighing 15±1 gr were randomly allocated into three treatment groups with three repetition, including: 1) Control group, 2) Oregano extract treated group (1% of diet), 3) Felorfenicol treated group (10mg/kg fish), all feed one time a day for two weeks. At the end of the second week, 5 fish of each repetition collected and sampled from their blood and tissue of spleen and kidney. After the bleeding, all the samples injected with *streptococcus ineae*. After two weeks mortality rate calculated and after the bleeding, sampled from the spleen and kidney of the samples. Total cunt analysis conducted on the spleen samples in 4 logarithmic concentrations. in the second phase all the samples primarily injected with S.ineae and then treated with Oregano concentration and Felorfenicol for two weeks. After the two steps of bleeding, in sterile qualifications, the spleen of the fishes sampled for total cunt analysis. Blood cells counting and lisosym activity indicated in all blood samples. The results shown that total mortality in both of the phases of experiment in Oregano extract (OE) treatment was significantly lower comparing to control group ($p<0.05$). Furthermore the results of blood cells counting shown that WBC and monocyts percents were significantly higher in Oe and Felorfenicol treatment groups ($p<0.05$). This phenomenon was because of the effects of Oe and Felorfenicol. Nevertheless the lysozym activity degreased comparing to control group ($p<0.05$). But total count analysis shown that bacterial audience in spleen degreased treating by Oe and felorfenicol. It was concluded that supplementation of Oe registered lower mortality and bacterial audience, and better hematological parameters in fishes, compared with control group. Therefore supplementation of Oe in fish diet would be effective in prevention and treatment of *S.iniae* in rainbow trout.

Keywords: Fish, Streptoccusis, Felorfenicol, Bacterial total count

*Corresponding author