مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۴، دوره ۷۰، شماره ۴، ۴۶۲-۴۵۵
Journal of Veterinary Research. 70,4: 455-462, 2015
Original Article

بررسی تأثیرعصاره گیاهان جغجغه، تاتوره و استبرق بر سه گونه باکتری بیماریزای ماهی

نرجس سنچولی* مهین ریگی
پژوهشکده تالاب بین المللی‌هامون، گروه شیلات، دانشگاه زابل، زابل – ایران

(دریافت مقاله: ۲۴ مرداد ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۲۹ مهر ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: استفاده مکرر از آنتی بیوتیک‌ها در زمینه‌های مختلف (دامپزشکی و پزشکی) ظهور و بروز پدیده مقاومت را در باکتری‌های بیماریزا بهبود می‌بخشد. با توجه به مشکل مقاومت میکروبی، نیاز فوری به کشف داروهای جدید و درمان‌های جایگزین برای کنترل بیماریهای باکتریایی در زمینه آبزی پروری وجود دارد. **هدف:** هدف از این مطالعه، بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های متانولی و هگزانی گیاهان دارویی جغجغه (*Prosopis farcta*)، تاتوره(*Datura stramunium* L) و استبرق (*Calotropis procera* L)، بر باکتری‌های بیماریزای مهم ماهی از جمله آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*)، یرسینیا رکری (*Yersinia ruckeri*) و استرپتو کوکوس اینیایی (*Streptococcus iniae*) است. **روش کار:** عصاره گیری با استفاده از دستگاه روتاری(تقطیر در خلا) انجام شد. برای تعیین حداقل غلظت مهار رشد (MIC) از روش استاندارد رقیق سازی در محیط مایع استفاده شده و میزان حداقل غلظت باکتری کشی(MBC) با استفاده از مقادیر MIC هر عصاره تعیین شد. **نتایج:** نتایج نشان داد که قوی ترین عصاره، عصاره متانولی میوه جغجغه بر هر سه باکتری مورد مطالعه با میزان MIC ، MBC، به ترتیب ۲۵،۵۰mg/mL بود. حساس ترین باکتری نسبت به عصاره‌های متانولی و هگزانی گیاهان، باکتری استرپتو کوکوس اینیایی بوده و باکتری آئروموناس هیدروفیلا و یرسینیا رکری مقاوم بودند و عصاره‌های مورد بررسی، خواص ضد باکتریایی قوی تری بر باکتری گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی داشتند. **نتیجه گیری نهایی:** بر طبق نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که استفاده از عصاره متانولی میوه جغجغه برای درمان بیماریهای باکتریایی در آبزی پروری مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: فعالیت ضد باکتریایی، عصاره هگزانی، عصاره متانولی

مقدمه

پرورش آبزیان به عنوان یکی از فعالیت‌های مهم تولیدی در بسیاری از کشورهای جهان محسوب می‌شود. در این ارتباط کمبود منابع آبی سبب شده که در اکثر کشورها پرورش انبوه و متراکم جایگزین روش‌های نیمه متراکم و غیر متراکم گردد. وقتی ماهی در شرایط تراکم بالا پرورش داده می‌شود اساساً در معرض شرایط استرس‌زا و خطر عفونت با باکتری‌ها قرار دارد، شیوع بیماری باعث بالارفتن نرخ مرگ و میر و کاهش بازده تولید شده و ضررهای اقتصادی بالایی را برای پرورش دهنده به وجود می‌آورد(۱۰). *Aeromonas hydrophila* به عنوان یک عامل بیماریزا برای بسیاری از گونه‌های مختلف ماهیان آب شیرین و گاهی ماهیان آب شور محسوب می‌شود. این باکتری در کپور، مارماهی، شیر ماهی، گربه ماهی، تیلاپیا و قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث ایجاد سپتی سمی هموراژیک می‌شود و بیماری حاصله از این باکتری در سراسر دنیا گسترش دارد (۲۶). *Yersinia ruckeri* عامل بیماری دهان قرمز روده‌ای (Enteric Redmouth Disease) است. یکی از بیماریهای عفونی است که تولید مرگ بالا و زیان اقتصادی شدید در مزارع پرورش ماهی به خصوص در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی آزاد اقیانوس اطلس می‌کند(۸) و یک پاتوژن فرصت طلب بوده که معمولاً در آبها موجود است و نسبت به درمان‌های آنتی بیوتیکی مقاومت نشان داده است(۲۴). *Streptococcus iniae* عامل بیماری استرپتوکوکوزیس در ماهیان بوده که در ایران مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف در باکتری استرپتو کوکوس اینیایی، عامل بیماری استرپتوکوکوزیس قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش گردیده است، به طوری که امروزه این مقاومت دارویی به عنوان یک معضل بزرگ در درمان این بیماری مطرح می‌باشد(۷). عفونت‌های باکتریایی یکی از عوامل اصلی مرگ و میر ماهیان پرورشی به شمار می‌روند و استفاده از آنتی بیوتیک‌ها و مواد ضد میکروبی روش معمول درمان این گونه عفونت‌ها در پرورش آبزیان می‌باشد، استفاده زیاد و مداوم از آنتی بیوتیک‌ها ایجاد سویه‌های مقاوم در میکروارگانیزم‌ها، مسئله باقیماندن دارو در بافت‌های ماهی و مشکلات زیست محیطی را به دنبال دارد از طرف دیگر این مواد شیمیایی موجب ممانعت از رشد فلور باکتریایی دستگاه گوارش ماهی می‌شوند که خود دارای اثرات مفیدی بر سلامتی موجود هستند. بیشتر آنتی بیوتیک‌ها اثرات طولانی مدت در کنترل بیماریهای باکتریایی در آبزی پروری به ویژه بیماریهای باکتریایی سیستمیک ماهی را ندارند و باعث افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتری‌های بیماریزا می‌شوند، بنابراین بیشتر کشورها استفاده از آنتی بیوتیک‌ها را در آبزی پروری به منظور اهمیت سلامت عمومی و در معرض خطر بودن محیط زیست توقیف کرده‌اند (۱۶). توسعه مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری‌های *Aeromonas salmonicida*

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۵۴-۳۲۲۲۴۵۱۰ نمابر: ۰۵۴-۳۲۲۲۴۵۱۰ Email: Sanchoolin@yahoo.com

Edwardsiella tarda، *Vibrio anguillarum*، *Aeromonas hydrophila*، *Edwardsiella icttaluri*، *Yersinia ruckeri*، *Vibrio salmonicida*، دیده شده است(۲۲). اثرات دارویی مفید مواد گیاهی به طور معمول از ترکیب محصولات ثانویه در گیاهان است. در گیاهان، این ترکیبات عمدتاً متابولیت‌های ثانویه از قبیل آلکالوئیدها، استروئید، تانن و ترکیبات فنلی هستند که توسط گیاه ساخته شده و در نقاط خاص یا در تمام قسمت‌های گیاه رسوب و ذخیره می‌شوند، این ترکیبات در شرایط آزمایشگاهی دارای خواص ضد میکروبی هستند. این ترکیبات پیچیده و خاص در گروه‌های خاصی از قبیل خانواده، جنس و گونه یافت می‌شوند اما ناهمگونی ترکیبات ثانویه را در گونه‌های وحشی می‌توان یافت (۵). مطالعات متعدد اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های گیاه جغجغه (۴،۱۷،۲۱)، عصاره‌های گیاه تاتوره (۹،۱۱) و گیاه استبرق (۲۸،۲۹،۳۰) را بر باکتری‌های بیماریزای انسان و دیگر حیوانات خونگرم گزارش کرده‌اند. در مطالعه‌ای توسط Velmurugan و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثرات ضد باکتریایی مفید عصاره‌های برگ گیاه استبرق بر باکتری و قارچ و ویروس‌های جدا شده از ماهی و میگو گزارش شده است (۲۹). فعالیت ضد میکروبی تاتوره به ترکیب متابولیت‌های ثانویه مانند آلکالوئید، فلاونوئیدها، فنل، تانن، ساپونین، استروئید، گلیکوزیدها و رزین‌هایی که فعالیت ضد باکتریایی با مکانیزم‌های فعال متفاوت دارند نسبت داده شده است (۶) و بخش‌های آلکالوئیدی و سسکوئیترپن‌های موجود در گیاه جغجغه دارای فعالیت ضد میکروبی است (۱۳). برخی گزارشات فعالیت ضد باکتریایی بالای عصاره متانولی برگ استبرق بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را به وجود ترکیباتی چون فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و استروئیدها (۲۸) همچنین فعالیت ضد باکتریایی استبرق را به وجود تانن در این گیاه نیز نسبت دادند (۱۹). با توجه به مزایای متعدد استفاده از گیاهان دارویی در آبزی پروری، استفاده از این داروها بسیار مورد توجه بوده و احتمال جایگزین شدن بسیاری از داروهای شیمیایی با داروهای گیاهی وجود دارد لذا با توجه به تنوع گیاهی بسیار بالا و وجود گیاهان دارویی با کاربردهای متعدد در کشور، تحقیقات در این زمینه ضروری می‌باشد و با توجه به اثرات ضد باکتریایی گزارش شده از گیاهان مورد بررسی در این پژوهش، اثر عصاره‌های متانولی و هگزانی آنها بر سه باکتری بیماریزای ماهی (آئروموناس هیدروفیلا، یرسینیا رکری و استرپتو کوکوس اینیایی) به منظور تعیین امکان کاربرد آنها به عنوان جایگزین آنتی بیوتیک‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

تهیه گیاهان مورد مطالعه: گیاهان مورد مطالعه از کلکسیون گیاهان دارویی پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل در مهر ماه ۹۲ تهیه شدند.

تهیه عصاره متانولی و هگزانی: گیاهان مورد نظر پس از جمع‌آوری و شستن و خشک شدن در سایه توسط آسیاب برقی پودر شده و برای عصاره گیری، مقدار ۵۰g از پودر خشک و آسیاب شده قسمت‌های مختلف گیاهان(برگ تاتوره و برگ استبرق، دانه و میوه جغجغه و دانه و غلاف میوه تاتوره) در ۲۵۰mL حلال هگزان و متانول ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق روی شیکر قرار داده شدند و پس از آن توسط کاغذ واتمن شماره ۴۲ صاف شده و بعد از اتمام عملیات عصاره گیری، عصاره‌های به دست آمده توسط دستگاه روتاری (تقطیر در خلا) در دمای ۵۰°C-۴۰ تغلیظ شده و سپس‌عصاره غلیظ شده در آون در دمای ۴۰°C به مدت دو روز خشک گردیده و پس از اضافه شدن حلال دی متیل سولفوکساید(DMSO) و عبور از فیلتر میکروبی ۰/۴۵µ برای آزمایش‌های ضد باکتریایی مورد استفاده قرار گرفتند (۲).

تهیه باکتری و ذخیره سازی: باکتری‌های *Aeromonas hydrophila* جداسازی شده از ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بیمار مورد تایید دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شده، *Yersinia ruckeri* دارای کد PCR با شماره (KEC ۲۹۶۵۳) و *Streptococcus iniae* جداسازی شده از ماهیان مبتلا به استرپتوکوکوزیس در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر که با روش PCR جنس و گونه آن مشخص شده بود تهیه شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰°C در محیط مایع نوترینت براث گرمخانه گذاری شدند و بعد از ۲۴ ساعت در محیط کشت نوترینت براث حاوی ۱۰٪ گلیسرول استریل در فریزر با دمای ۲۱°C- برای استفاده بعدی ذخیره سازی شدند.

تهیه سوسپانسیون باکتریایی: باکتری‌های آئروموناس هیدروفیلا، یرسینیا رکری و استرپتو کوکوس اینیایی را پس از انجماد زدایی در دمای ۳۰°C، در محیط نوترینت براث و همچنین به منظور بررسی کلنی‌های خالص، از نمونه‌های باکتریایی روی محیط جامد TSA کشت خطی داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰°C در انکوباتور قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت از کلنی‌های خالص هر باکتری برداشته و در آب مقطر استریل کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند ساخته و بعد برای اطمینان از غلظت باکتری‌ها با اسپکتوفتومتر UV visible جذب آن با طول موج ۶۰۰nm قرائت شده، تراکم باکتری‌ها با غلظت $1/5\times10^{6}$cfu/mL جذبی معادل ۰/۱-۰/۰۸ دارد.

تعیین حداقل غلظت باکتریایی(MIC): آزمایش حداقل غلظت بازدارندگی در پلیت ۹۶ خانه‌ای میکروتیتر استریل و با روش استاندارد براث میکرودایلوشن (رقیق سازی در محیط مایع) انجام شد و میزان ۱۰۰µL از دو برابر بالاترین غلظت عصاره‌ها به اولین چاهک پلیت‌های میکروتیتر ۹۶ خانه ای که قبلا حاوی ۱۰۰µL محیط کشت مولر هینتون براث بوده اضافه شده و پس از مخلوط کردن محتویات چاهک اول ۱۰۰µL برداشته و به چاهک دوم انتقال داده و این کار را تا چاهک هشتم انجام داده تا به ترتیب غلظت‌های mg/mL ۵۰-۲۵-۱۲/۵-۶/۲۵-۳/۱-۱/۵۶-۰/۷۸ با روش رقیق سازی از چاهک دوم تا هشتم تهیه شود و از چاهک هشتم ۱۰۰µL

برداشــته و دور ریخته و بعد از آن ۱۰۰µL از سوسپانسیون باکتریایی cfu/ mL ۱/۵×۱۰^۶ (معادل نیم مک فارلند) به پلیت‌ها اضافه شده و یک چاهک حاوی محیط کشت و حلال DMSO و سوسپانسیون باکتریایی به عنوان شــاهد منفی و یک ردیف کنترل برای هر ردیف آزمایش مربوط به عصاره در نظر گرفته شد و مراحل رقت سازی عصاره‌ها مانند ردیف آزمایش بوده و به ردیف کنترل باکتری اضافه نشد. سپس پلیت‌های میکروتیتر به مدت ۲۴ ســاعت در دمای ۳۰°C در انکوباتور قرار داده شــدند. بعد از ۲۴ ساعت کدورت و عدم کدورت چاهک‌ها به صورت چشمی مورد ارزیابی قرار گرفت و وجود کدورت (در مقایسه با ردیف کنترل عصاره‌ها) حاکی از رشد باکتری و شفافیت، نشان دهنده عدم رشد باکتری می‌باشد. پایین ترین غلظتی که در آن هیچ گونه رشد باکتری مشاهده نشد (فاقد کدورت ناشی از رشد باکتری) به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی تعیین شد (۲۰).

تعیین حداقل غلظت باکتری کشــی(MBC): حداقل غلظت باکتری کشــی با توجه به مقادیر MIC هر یک از عصاره‌ها تعیین شد، به طوری که میزان ۵ lµ از چاهک‌هایی که رشد باکتری در آنها متوقف شده بود، به پلیت‌های حاوی محیط کشــت اختصاصی باکتری‌ها (تریپتک سوی آگار TSA) انتقال داده شده و به مدت ۲۴-۲۲ ساعت در دمای ۳۰°C در انکوباتور نگهداری شــدند. پایین ترین غلظت عصاره که در آن ۹۹/۹ ٪ باکتری‌ها رشد نداشتند به عنوان MBC در نظر گرفته شد (۲۰). تمام آزمایشات برای ۳ بار تکرار گردیده و میانگین داده‌های بدست آمده به عنوان نتایج MIC و MBC ارائه گردید.

نتایج

میــزان حداقل غلظــت بازدارندگی(MIC) و حداقــل غلظت باکتری کشــی(MBC) عصاره‌هــای متانولی و هگزانی گیاهــان دارویی جغجغه، تاتوره و اســتبرق بر باکتری‌های مورد مطالعه به ترتیــب در جداول ۱ تا ۳ نشــان داده شده است. عصاره متانولی میوه جغجغه با غلظت ۲۵mg/mL و عصاره‌های متانولــی و هگزانی دانه جغجغه با غلظت ۵۰mg/mL مانع از رشــد هر سه باکتری شدند. عصاره هگزانی میوه جغجغه با غلظت/mg ۲۵mL تنها توانســت مانع از رشد باکتری *Streptococcus iniae* شود و در غلظت‌های مورد اســتفاده نتوانست رشد باکتری‌های *Aeromonas hydrophila* و *Yersinia ruckeri* را کنتــرل کنــد. عصــاره متانولی میوه جغجغه در مقایســه با عصاره متانولی دانه آن با میزان حداقل غلظت بازدارندگــی پایین تر بر باکتری‌های مــورد مطالعه، خواص ضد باکتریایی بهتری را نشان داده و عصاره متانولی میوه جغجغه بهتر از عصاره هگزانی میــوه آن خواص ضد باکتریایی داشــته و عصاره متانولــی و هگزانی دانه جغجغه خواص مشابهی را بر هر سه باکتری نشان دادند. از بین عصاره‌های قســمت‌های مختلف گیاه تاتوره، عصاره متانولی و هگزانی برگ و عصاره هگزانی دانه و میوه تاتوره با غلظت ۵۰mg/mL قادر به مهار رشد باکتری

تصویر ۱. گیاه جغجغه (Prosopis farcta).

تصویر۲. گیاه استبرق (Calotropis procera L).

تصویر ۳. گیاه تاتوره (Datura stramunium).

Aeromonas hydrophila و عصاره متانولی دانه و میوه با غلظت‌های مورد آزمایش نتوانســتند رشــد باکتری *Aeromonas hydrophila* را کنتــرل کنند. تمامــی عصاره‌های متانولی و هگزانی بــرگ و میوه و دانه با غلظت ۵۰mg/mL قادر به مهار رشــد باکتــری *Yersinia ruckeri* شــده و عصاره هگزانــی و متانولی برگ با غلظــت ۲۵mg/mL و عصاره متانولــی و هگزانی دانه و میوه تاتوره با غلظــت ۵۰mg/mL قادر به مهار

جدول ۱. نتایج حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) عصاره‌های متانولی و هگزانی گیاه جغجغه بر باکتری‌های آئروموناس هیدروفیلا، یرسینیا رکری و استرپتو کوکوس اینیایی.

باکتری‌ها عصاره‌های گیاهی (Mg/mL)	*Streptococcus iniae* MBC	*Streptococcus iniae* MIC	*Yersinia ruckeri* MBC	*Yersinia ruckeri* MIC	*Aeromonas hydrophila* MBC	*Aeromonas hydrophila* MIC
میوه (متانولی)	۵۰	۲۵	۵۰	۲۵	۵۰	۲۵
دانه (متانولی)	۱۰۰	۵۰	۱۰۰	۵۰	۱۰۰	۵۰
میوه (هگزانی)	۵۰	۲۵	>۱۰۰	>۱۰۰	>۱۰۰	>۱۰۰
دانه (هگزانی)	۱۰۰	۵۰	۱۰۰	۵۰	۱۰۰	۵۰

جدول ۲. نتایج حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) عصاره‌های متانولی و هگزانی گیاه تاتوره بر باکتری‌های آئروموناس هیدروفیلا، یرسینیا رکری و استرپتو کوکوس اینیایی.

باکتری‌ها عصاره‌های گیاهی (Mg/mL)	*Streptococcus iniae* MBC	*Streptococcus iniae* MIC	*Yersinia ruckeri* MBC	*Yersinia ruckeri* MIC	*Aeromonas hydrophila* MBC	*Aeromonas hydrophila* MIC
برگ (متانولی)	۵۰	۲۵	۱۰۰	۵۰	۱۰۰	۵۰
میوه (متانولی)	۱۰۰	۵۰	۱۰۰	۵۰	>۱۰۰	>۱۰۰
دانه (متانولی)	۱۰۰	۵۰	۱۰۰	۵۰	>۱۰۰	>۱۰۰
برگ (متانولی)	۵۰	۲۵	۱۰۰	۵۰	۱۰۰	۵۰
میوه (هگزانی)	۱۰۰	۵۰	۱۰۰	۵۰	۱۰۰	۵۰
دانه (هگزانی)	۱۰۰	۵۰	۱۰۰	۵۰	۱۰۰	۵۰

جدول ۳. نتایج حداقل غلظت بازدارندگی(MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) عصاره‌های متانولی و هگزانی گیاه استبرق بر باکتری‌های آئروموناس هیدروفیلا، یرسینیا رکری و استرپتو کوکوس اینیایی.

باکتری‌ها عصاره‌های گیاهی (Mg/mL)	*Streptococcus iniae* MBC	*Streptococcus iniae* MIC	*Yersinia ruckeri* MBC	*Yersinia ruckeri* MIC	*Aeromonas hydrophila* MBC	*Aeromonas hydrophila* MIC
برگ (متانولی)	۵۰	۲۵	۱۰۰	۵۰	۱۰۰	۵۰
برگ (هگزانی)	۵۰	۲۵	۱۰۰	۵۰	۱۰۰	۵۰

رشد باکتری *Streptococcus iniae* شدند عصاره متانولی و هگزانی برگ آن بهتر از عصاره‌های دانه و میوه دارای خواص ضد باکتریایی بر باکتری‌های *Yersinia ruckeri*، *Aeromonas hydrophila* و *Streptococcus iniae* بودند و نتایج مشابهی با میزان حداقل غلظت بازدارندگی ۵۰mg/mL-۲۵ را بر هر سه باکتری نشان داد و عصاره متانولی دانه و میوه و همچنین عصاره هگزانی دانه و میوه تاتوره بر باکتری‌های مورد مطالعه خواص ضد باکتریایی مشابهی را نشان دادند و عصاره هگزانی میوه و دانه تاتوره بر باکتری *Aeromonas hydrophila* در مقایسه با عصاره متانولی آن خواص بهتری را نشان داد. عصاره متانولی و هگزانی برگ استبرق نتایج مشابهی را بر هر سه باکتری نشان داد و با غلظت ۲۵mg/mL مانع از رشد باکتری *Streptococcus iniae* و با غلظت ۵۰mg/mL قادر به مهار رشد باکتری *Aeromonas hydrophila* و *Yersinia ruckeri* شدند.

بحث

حداقل غلظت بازدارندگی در آزمایشات تشخیصی برای تأیید مقاومت میکروارگانیسم‌ها به یک عامل ضد میکروبی و همچنین نمایش فعالیت یک عامل ضد میکروبی جدید می‌باشد(۲۵). نتایج نشان داد که از بین عصاره‌های مورد بررسی، تنها عصاره هگزانی میوه جغجغه و همچنین عصاره متانولی دانه و میوه تاتوره در غلظت‌های مورد آزمایش نتوانستند اثرات باکتریواستاتیک و باکتریسیدی را بر باکتری‌های *Aeromonas hydrophila* و *Yersinia ruckeri* نشان دهند اما بقیه عصاره‌ها اثرات ضد باکتریایی روی سه باکتری مورد مطالعه داشتند. در مورد باکتری استرپتو کوکوس اینیایی، مؤثرترین عصاره، عصاره‌های متانولی و هگزانی میوه جغجغه، برگ تاتوره و برگ استبرق و در مورد باکتری‌های آئروموناس هیدروفیلا و یرسینیا رکری مؤثرترین عصاره تنها عصاره متانولی میوه جغجغه با میزان MIC=۲۵ mg/mL بود. دامنه حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های متانولی و هگزانی بخش‌های مختلف گیاهان مورد بررسی بر باکتری‌های مورد مطالعه بین ۱۰۰mg/mL<-۲۵ به دست آمد و قوی ترین عصاره، عصاره متانولی میوه جغجغه بر هر سه باکتری مورد مطالعه با میزان مشابه MIC و MBC، ۲۵ mg/mL و ۵۰ بود. حساس ترین باکتری نسبت به برخی عصاره‌های متانولی و هگزانی گیاهان مورد مطالعه، باکتری *Streptococcus iniae* وباکتری‌های *Yersinia ruckeri*، *Aeromonas hydrophila* به

نسبت تقریباً مقاومتر بودند که با نتایج قبلی در خصوص حساسیت باکتری *Streptococcus iniae* و مقاومت باکتری *Yersinia ruckeri*، *Aeromonas hydrophila* در مواجهه با عصاره‌های گیاهان مورد بررسی مطابقت دارد(۳،۲۷).

عصاره‌های مورد بررسی خواص ضد باکتریایی قوی تری بر باکتری گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی در پژوهش حاضر داشتند که مطابق با مطالعات قبلی می‌باشد (۱۱،۲۳،۲۷). دامنه حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های متانولی و هگزانی بخش‌های مختلف تاتوره بر باکتری‌های مورد مطالعه بین ۱۰۰mg/mL > - ۲۵ به دست آمد که بیشتر از مقدار MIC مطالعه Gul و همکاران در سال ۲۰۱۲ در بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره‌های کلروفرمی، اتانولی و بنزنی برگ گیاه تاتوره بر تعدادی از باکتری‌های بیماریزای انسانی بود که دامنه حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های کلروفرمی و بنزنی بر باکتری‌های مورد مطالعه بین ۱۲/۵mg/mL - ۳/۱۲ و دامنه MIC عصاره اتانولی بین ۱۲/۵mg/mL - ۶/۲۵ به دست آمد و Gul و همکاران در سال ۲۰۱۲ بیان داشتند که فعالیت ضد باکتریایی گیاه تاتوره با توجه به بخش گیاهی مورد استفاده، سن، مرحله رشد و حلالی که برای استخراج آن مورد استفاده قرار می‌گیرد متفاوت است. به نظر می‌رسد که برگ‌های جوان گیاه تاتوره دارای میزان نسبتاً بالای ترکیبات فیتو شیمیایی بوده که فعالیت ضد باکتری به ویژه مربوط به ترکیبات آلکالوئید است (۶). در مطالعه Al-Sorchee و همکاران در سال ۲۰۱۰ دامنه MIC عصاره‌های اتانولی و آبی گیاه جغجغه بر چهار سروتیپ باکتری *E.Coli* و باکتری‌های سالمونلا تیفی، شیگلا دینستریا، ویبریو کلر و سالمونلا آیزونا ۵-۲/۵ و MBC نیز برای عصاره‌های اتانولی و آبی به ترتیب ۲۰mg/mL-۵ و ۱۰-۵ به دست آمد که میزان MIC آنها کمتر از مقدار به دست آمده عصاره‌های متانولی و هگزانی گیاه جغجغه در پژوهش حاضر بوده همچنین در گزارشی توسط Maoz و Neeman در سال ۱۹۹۸، میزان MIC عصاره آبی قسمت‌های فوقانی گیاه جغجغه با روش *Agar dilution* برای باکتری‌های باسیلوس سابتلیس، سارسینا لوتئا، استافیلو کوکوس اورئوس (W/V) ۵٪ به دست آمد. در گزارشی دیگر توسط Mahasneh و همکاران در سال ۱۹۹۶ عصاره‌های پترولیم اتر و عصاره بوتانول کل بخش‌های هوایی گیاه جغجغه در مقایسه با عصاره‌های آبی و متانولی و هگزانی قطرهاله عدم رشد بیشتری را در گونه‌های *Bacillus cereus* و *Staphylucoccus aureuss* نشان دادند. در گزارشی توسط Iranbakhsh در سال ۲۰۰۶ دلیل تفاوت بین مقادیر MIC و MBC مطالعات گوناگون بر باکتری‌های مختلف، تفاوت در روش عصاره گیری گیاهان دارویی، روش مطالعه فعالیت ضد باکتریایی، تفاوت ژنتیکی گیاهان، تفاوت غلظت ترکیبات شیمیایی بین گونه‌ها و محیط‌های جغرافیایی بیان شد.

دامنه MIC عصاره‌های استبرق بر باکتری‌های مورد مطالعه ۲۵mg/mL و ۵۰ به دست آمد که مطابق با نتایج قدرت ضد باکتریایی عصاره برگ استبرق بر باکتری‌های *Escherchia coli* و *Streptococcus pyogenes* در مطالعه Adamu و همکاران در سال ۲۰۱۳ بود. همچنین Vadlapudi و همکاران در سال ۲۰۱۲ میزان حداقل و حداکثر غلظت بازدارندگی عصاره متانولی برگ استبرق را بر باکتری‌های بیماریزای مهم انسانی به ترتیب ۶۶mg/mL و ۱۵۲ به دست آوردند که مقدار آن بیشتر از میزان حداقل وحداکثر غلظت بازدارندگی عصاره متانولی برگ استبرق (۲۵mg/mL و ۵۰) در پژوهش حاضر بود که این تفاوت در مقادیر به دست آمده با توجه به نظر Adamu و همکاران در سال ۲۰۱۳ حاکی از تفاوت در ویژگی‌های باکتری‌های مورد استفاده و تفاوت در گونه‌های گیاهی می‌باشد. در گزارشی توسط Velmurugan و همکاران در سال ۲۰۱۲، عصاره اتیل استات برگ استبرق بر باکتری اگروموناس هیدروفیلا، ویبریوهاروی و سودوموناس اگروژینوز جدا شده از ماهی و میگو قطرهاله عدم رشد بیشتری در مقایسه با عصاره متانولی و هگزانی این گیاه بر باکتری‌های مذکور داشت و عصاره متانولی بهتر از عصاره هگزانی بوده ولی در مطالعه حاضر خواص ضد باکتریایی دو عصاره برگ استبرق مشابه یکدیگر بود. فعالیت ضد باکتریایی بالای عصاره متانولی برگ استبرق علیه باکتری استافیلو کوکوس اورئوس را به وجود ترکیباتی چون فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و استروئیدها نسبت دادند. همچنین Mainasara و همکاران در سال ۲۰۱۲ فعالیت ضد باکتریایی استبرق را به وجود تانن در این گیاه نسبت دادند.

از بین عصاره‌های قسمت‌های مختلف گیاهان عصاره متانولی در گیاه جغجغه بهتر از عصاره هگزانی بوده و در گیاه تاتوره عصاره‌های هگزانی بهتر از عصاره‌های متانولی خواص ضد باکتریایی را نشان دادند که بیانگر این مسئله است که مواد تشکیل دهنده فعال در گیاه جغجغه را می‌توان با متانول و در گیاه تاتوره را با هگزان استخراج کرد و در گیاه استبرق تفاوتی بین نتایج به دست آمده در دو عصاره متانولی و هگزانی وجود ندارد بنابراین مواد مؤثره این گیاه توسط هر دو حلال جدا می‌شود. در گزارشی توسط Iranbakhsh و همکاران در سال ۲۰۰۶ بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره‌های مختلف از بخش‌های مختلف گیاه تاتوره در مراحل رویشی و زایشی و با استفاده از روش‌های مختلف بررسی خواص ضد باکتریایی نتایج متفاوتی را نشان داد و بیان شد که خواص ضد باکتریایی متفاوت عصاره‌ها در مطالعات گوناگون ممکن است به عواملی از جمله استفاده از گیاه در مراحل مختلف رشد، استفاده از حلال‌های مختلف برای عصاره‌گیری، استفاده از روش‌های مختلف بررسی خواص ضد باکتریایی و همچنین نحوه عمل باکتری‌های مختلف در مواجهه با عصاره‌ها و استفاده از بخش‌های مختلف گیاهان و مناطق جغرافیایی متفاوت و روش‌های عصاره گیری مربوط باشد.

نتیجه‌گیری نهایی: بر طبق نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که

اســتفاده از عصاره متانولی میوه جغجغه با توجــه به میزان حداقل غلظت بازدارندگــی پایین و مشــابه بر هر ســه باکتری، برای درمــان بیماریهای باکتریایی ایجاد شده توســط باکتری‌های مورد مطالعه در آبزی پروری به جای آنتی بیوتیک‌هایی که باکتری‌ها نسبت به آنها مقاومت نشان داده‌اند مؤثر باشد. استفاده از این عصاره‌ها هم به صورت خوراکی و هم به صورت حمــام در ماهی در صورت اثبــات بی خطر بودن و کارایــی این عصاره‌ها قابل توصیه می‌باشــد ولی استفاده از این عصاره‌ها به صورت خوراکی نیاز به تحقیق بیشــتر در مورد اثرات ضد باکتریایی سیستمیک آنها در تجویز خوراکی دارد.

تشکر و قدر دانی

نویسندگان این مقاله از همکاری‌های ارزشمند اعضای هیئت علمی پژوهشکده تالاب بین المللی‌هامون و کارشناس پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی سرکار خانم حمیده خواجه و همه افرادی که در اجرای این طرح یاری رساندند کمال سپاس و قدردانی را دارند.

References

1. Adamu, L.G.O., Edeghagba, B., Abiola, O.M., Elijah, A.I. Ezeokoli, O.T. (2013) Antimicrobial activity of extracts of *Jatropha curcas* and *Calotropis procera* leaves against pathogenic isolates from motorcycle helmets in Lagos metropolis. Int J Curr Microbiol App Sci. 2: 292-302.
2. Aibinu, I.E., Akinsulier, R.O., Adenipekun, T., Adelowotan, T Odugbemi, T. (2007) Invitro Antimicrobial Activity of crude extracts from plants *Bryophyllum pinnatum* and *Kalanchoe crenata*. Afr J Tradit. 4: 338-344.
3. Alishahi, M., Ghorbanpour Najaf Abadi, M., Najaf-Zadeh, H., Pashm forosh, M. (2011) effects of some plant extracts against *Streptococcus iniae Yersinia ruckeri*, and *Aeromonas hydrophila*. J Vet Med. 6:21-30.
4. Al-Sorchee, S.M.A., Rabat, A.A.K., Juma, I.M. (2010) The effect of extract plants on the causative agents of diarrhoea in children of erbil Kurdistan Iraq. midd Erbil Kurdistan Iraq. 8: 1-9.
5. Balandrin, M.F.J., Kjocke, A., Wurtele, E. (1985) Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. Science. 228: 1154-1160.
6. Cowan, M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 12: 564-582.
7. Dugenci, S.K., Arda, N., Candan, A. (2003) Some medicinal plants as immunostimulant for fish. J Ethnopharmacol. 88: 99–106.
8. Ewing, E.w., Ross, A.j., Brenner, D.j., Fanning, G.R. (1978) *Yersinia ruckeri* sp. nov., the redmouth (RM) bacterium. Int J Syst Bacteriol. 28: 37-44.
9. Gul, H., Qaisrani, R.N., Ayaz Khan, M., Hassan, Sh., Younis, N. (2012) Antibacterial and antifungal activity of different extracts of *Datura stramonium* (branches and leaves sample). E3 J Biotechnol Pharm Res. 3: 141-148.
10. Hatha, M., Vivekanandhan, A.A., Joice, G.J. (2005) Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. Int J Food Microbiol. 98: 131-134.
11. Iranbakhsh, A.R., Ebadi, M. (2006) Inhibitory effects of methanolic extract of leaf explants of *Datura stramonium* and callus derived from detached leaf culture against bacteria and fungi. J Sci Islamic Azad Uni. 62: 92-104.
12. Jadhav, M.D., Deobhankar, K.P. (2013) Antibacterial Activity of Medicinal plants against Xanthomonas citri. Int J Adv Biotechnol Res. 4: 315-318.
13. Jawad, A.M., Jaffer, H.J., Alnaib, A., Naji, A. (1988) Antimicrobial activity of Sesquiterpene lactone and alkaloid fractions from Iraqi-plants. Pharm Biol. 26: 185-188.
14. Johnsona, D.B., Shringib, B.N., Patidara, D.K., Chalichema, N.S.S., Javvadia, A.K. (2011) Screening of Antimicrobial Activity of Alcoholic & Aqueous Extract of Some Indigenous Plants. Indo-Global J Pharm Sci. 1: 186-193.
15. Kumar, A., Garg, B.R., Rajput, G., Chandel, D., Muwalia, A., Bala, I., Singh, S. (2010) Antibacterial activity and quantitative determination of protein from leaf of *Datura stramonium* and *Piper betle* plants. Int J pharm Res. 1: 184-195.
16. Lee, S., Najiah, M., Wee Wendy, W., Nadirah, M. (2009) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* flower bud (Clove) against fish systemic

bacteria isolated from aquaculture sites Front. Agri. China. 3: 332-336.

17. Mahasneh, A.M., Abbas, J.A., El-Oqlahm, A.A. (1996) Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of bahrain. Phytother Res. 10: 251-253.
18. Mako, G.A., Memon, A.H., Mughal, U.R., Pirzado, A.J. Bhatti, S.A. (2012) Antibacterial effects of leaves and root extrct of *Calotropis procera* Linn. Pak J Agric Eng Vet Sci. 28: 141-149.
19. Mainasarsa, M.M., Aliero, B.L., Aliero, A.A., Yakubu, M. (2012) Phytochemical and antibacterial properities of root and leaf extracts of *Calotropis procera*. Nigerian J Basi Appl Sci. 20: 1-6.
20. Marzouk, B., Marzouk, Z., Mastouri, M., Fenina, N., Aouni, M. (2011) Comparative evaluation of the antimicrobial activity of *Citrullus colocynthis* immature fruit and seed organic Extracts. African J Bio. 10: 2130-2134.
21. Moaz, M., Neeman, I. (1998) Antimicrobial effects of aqueous plant extracts on the fungi *Microsporum canis* and *Trichophyton rubrum* and on three bacterial species, Lett Appl Microbiol. 26: 61-63.
22. Petersen, A., Andersen, J.S., Kaewmak, T., Somsiri, T., Dalsgaard, A. (2002) Impact of integrated fish farming on antimicrobial resistance in a pond environment. App Environ Microbiol. 68: 6036-6042.
23. Rama prabha, M., Vasantha, K. (2012) Phytochemical and antibacterial activity of calotropis procera (AIT) R. BR. Flowers. Int J Pharmacol Biol Sci. 3: 0975-6299.
24. Ross, A.J., Rucker, R.R., Ewing, W.H. (1966) Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout. J Microbiol. 12: 763-770.
25. Sharma, R.A., Sharma, P., Yadavi, A. (2013) Antimicrobial Screening of sequential extract of Datura stramonium L. Int J Pharm Pharm Sci. 5: 401-404.
26. Tavakoli, E., Akhlaghi, M. (2009) Evaluation of serum lysozyme, immunoglobulins, blood cell count and hematocrit in rainbow trout to experimental infection with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. J Vet Res. 64: 157-162.
27. Tukmechi, A., Ownag, A.Gh., Mohebbat, A. (2010) Invitro anti bacterial activites of ethanol extract of Iranian propolis (EEIP) against fish pathogenic bacteria (*Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri* and *Streptococcus iniae*). Brazilian J Microbiol. 41: 1086-1092.
28. Vadlapudi, V., Behara, M., Kaladhar, D.S., Suresh kumar, S.V., Seshagiri, B., John, M. (2012) Antimicrobial profile of crude extracts *Calotropis procera* and *Centella asiatica* against some important pathogens. Indian J Sci Technol. 5: 3132- 3136.
29. Velmurugan, S., Viji,V.T., Babu, M.M., Punitha, M.J., Citarasu,T. (2012) Antimicrobial effect of *Calotropis procera* active principles against aquatic microbial pathogens isolated from shrimp and fishes. Asian Pac J Trop Biomed. 2: 812-817.
30. Yesmin, M.N., Uddin, S.N., Mubassara, S., Akond, M.A. (2008) Antioxidant and antibacterial activities of *Calotropis procera* linn. Am Eurasian J Agric Environ Sci. 4: 550-553.

The effect of plant extracts *Prosopis farcta*, *Datura stramunium* and *Calotropis procera* Against three species of Fish Pathogenic Bacteria

Sanchooli, N.*, Rigi, M.

Department of Fisheries, Institute Research of International Hamoun Wetland, University of Zabol, Zabol-Iran

(Received 15 August 2015, Accepted 21 October 2015)

Abstract:

BACKGROUND: The repetitive use of antibiotics in different fields (veterinary and medicine) improves the emergence and occurrence of the resistance phenomenon in pathogenic bacteria. Due to the problem of antimicrobial resistance, it is an urgent need to discover new drugs and alternative treatments for the control of bacterial diseases in aquaculture. **OBJECTIVES:** The purpose of this study is to investigate antibacterial effects of methanol and hexane extracts of medicinal plants Rattles (*Prosopis farcta*), datura (*Datura stramunium* L) and milkweed (*Calotropis procera* L), the major pathogenic bacteria of fish, including *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri* and *Streptococcus iniae*. **METHODS:** Extraction was performed using a rotary evaporator. To determine the minimum inhibitory concentration (MIC), the standard microdilution method (Dilution in broth) was used and the minimum bactericidal concentration (MBC) was determined based on MIC values obtained for each extract. **RESULTS:** The results showed that the effect of most potent extract, methanol extract obtained from fruit rattle on the three studied bacteria, with MIC and MBC are 25, 50mg/ml, respectively. The most sensitive bacteria to methanol and hexane plant extracts, is bacterium *Streptococcus iniae* and *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia-ruckeri bacteria* were resistant. The studied extracts had stronger antibacterial properties against gram-positive bacteria compared to gram-negative. **CONCLUSIONS:** According to the results, it seems that the use of methanol extract of Prosopis farcta fruit is effective for treatment of bacterial diseases in aquaculture.

Keyword: antibacterial activity, hexane extract, methanol extract

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. *Prosopis farcta.*

Figure 2. *Calotropis procera* L.

Figure 3. *Datura stramunium.*

Table 1. Effect of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of extracts of methanol and hexane plant Prosopis farcta on the bacteria *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri* and *Streptococcus iniae*.

Table 2. Effect of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of extracts of methanol and hexane plant *Datura stramunium* on the bacteria *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri* and *Streptococcus iniae*.

Table 3. Effect of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of extracts of methanol and hexane plant Calotropis procera on the bacteria *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri* and *Streptococcus iniae*.

***Corresponding author's email: Sanchoolin@yahoo.com, Tel: 054-32224510, Fax: 054-32224510**