Archive of SID

مطالعه اثر عصاره‌های آبی و اتانولی گل نر گیاه گردو بر باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* جدا شده از گوشت ماهی قزل آلای رنگین کمان

پروین محسنی سی سخت[۱]، امین نعمت الهی[۲*]، عبدالناصر محبی[۳]، روح اله رحیمی[۴]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲. گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۳. بخش علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۴. گروه شیلات ،دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

***نویسنده مسئول:** *anematolahi@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۱۰

چکیده

باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* عامل بیماری لاکتوکوکوزیس در ماهی است که قابلیت انتقال به انسان در صورت تماس یا مصرف ماهی آلوده را دارد. در تحقیق حاضر، حساسیت باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* نسبت به عصاره‌های اتانولی و آبی گیاه گل نر گردو مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا عصاره اتانولی و آبی از گیاه گل نر گردو تهیه و در رقت‌های متوالی جهت به دست آوردن حداقل غلظت مهار رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) در برابر باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* به روش تهیه رقت متوالی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، با استفاده از روش انتشار دیسک، هاله مهار رشد باکتری نیز اندازه‌گیری و مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که، عصاره اتانولی گل نر گردو، در غلظت ۳۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، اثر کشندگی و در غلظت ۱۸/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر خاصیت ممانعت از رشد و عصاره آبی گل نر گردو، در غلظت‌های ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر کشندگی و در غلظت ۳۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر خاصیت ممانعت از رشد را در برابر رشد باکتری از خود نشان داد. با توجه به اثر مناسب عصاره‌های فوق روی باکتری *لاکتوکوکوس گارویه*، لازم است که مطالعات وسیع‌تری در شرایط بالینی در مزارع پرورش آبزیان صورت گیرد و پس از مشخص شدن غلظت موثر، غیر سمی بودن و مکانیسم اثر آن‌ها، می‌توان پیشنهاد نمود که از عصاره‌های فوق در درمان و پیشگیری از بیماری استفاده نمود.

کلید واژه ها: لاکتوکوکوس گارویه، عصاره، گیاه گل گردو، ماهی قزل آلای رنگین کمان.

مقدمه

در سال‌های اخیر پرورش آبزیان یکی از بخش‌های مهم تولید غذا در جهان به شمار می‌آید که با سرعت زیاد در حال رشد است. دلیل این امر استقبال مردم به استفاده از این منابع پروتئینی و در پی آن گسترش صنایع مرتبط است. *لاکتوکوکوس گارویه* عامل بیماری لاکتوکوکوزیس، کوکوباسیل گرم مثبت، فاقد تحرک با همولیز آلفا است که از بسیاری از گونه‌های ماهی و بخصوص قزل‌آلای‌رنگین‌کمان به عنوان عامل بیماری‌زا گزارش شده است (Ravelo, 2003). مشاهدات کارگاهی و گزارشات مختلف نشان می‌دهد که بیماری اکنون در اکثر نقاط کشور وجود دارد و عامل مهم مرگ و میر و بروز تلفات در ماهیان پرورشی قزل‌آلای‌رنگین-کمان به خصوص در استان‌های پر تولید کشور (Raissy and Ansari, 2011). استان چهارمحال و بختیاری با تولیدی بالغ بر ۲۳۰۰۰ تن ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در سال، رتبه اول کشور در تولید ماهی سردآبی را دارا است (سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۱) ولی به وفور بیماری‌های باکتریایی در این مزارع مشاهده می‌شود؛ از جمله این بیماری‌ها می-توان به لاکتوکوکوزیس اشاره کرد. این باکتری سبب بروز خسارات اقتصادی فراوانی به صنعت آبزی‌پروری جهان گردیده است، بطوری‌که این بیماری از گونه‌های متعددی از ماهیان آب‌شیرین، لب‌شور و شور مناطق مختلف دنیا گزارش شده است (Carson et al., ,

www.SID.ir

Akhlaghi and Mahjoor, 2000, 1993). بروز این گونه باکتریایی معمولاً با علائم حادی همانند رفتارهای عصبی، تیرگی بدن، بیرون زدن چشم‌ها همراه با خونریزی داخل چشم یا خونریزی داخلی یا سطحی بخصوص در نواحی آبششی، باله‌ها ظهور پیدا میکند (Chen et al., 2002). این باکتری در انسان نیز بیماری‌زائی ایجاد کرده و به همین دلیل آن را در گروه عوامل مشترک بیماری‌زای انسان و ماهی قرار می‌دهند چراکه این باکتری یکی از عوامل بروز اندوکاردیت بخصوص در افراد مسن، کودکان و یا افراد دارای سیستم ایمنی ضعیف بوده و موارد وقوع آن قبلا گزارش شده است (Fefer et al., 1998). همانگونه که می دانید، درمان آنتی‌بیوتیکی به عنوان یک روش مؤثر برای کنترل عفونت‌های ایجاد شده بوسیله میکرو-ارگانیسم‌هایی از جنس *لاکتوکوکوس* در ماهی استفاده می شود.از طرف دیگر، استفاده بی‌رویه از این ترکیبات باعث افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میزبان شده است. در ایران نیز در سال‌های اخیر همزمان با توسعه مزارع پرورش ماهی قزل‌آلا شاهد بروز همه‌گیری با عوامل فوق در مراکز پرورش ماهی هستیم (موسوی وهمکاران، ۱۳۸۸). هم چنین گزارشات زیادی از ایجاد مقاومت‌های شدید دارویی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری وجود دارد (Smith, 2015). بیماری‌های عفونی باکتریایی، با توجه به محدودیت‌های استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ماهی و انسان، مشکلات زیست‌محیطی و قیمت بالای برخی آنتی‌بیوتیک‌ها، گرایش به جایگزینی آن‌ها با مواد کم‌ضررتر و ارزان‌تر را تقویت نموده است. از بین مواد مختلف جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها، اخیرا فرآورده‌هایی با منشا گیاهی جایگاه ویژه‌ای یافته‌اند (Morteza-Semnani et al., 2007). مطالعات نشان‌دهنده آن است که خاصیت ضد میکروبی گیاهان عموما به دلیل وجود ترکیبات فنلی، ساپونین، تانن و فلاونوئیدهای موجود در ساختارهای آن ها می‌باشد که با تاثیر بر روی غشای پلاسمایی و سلولی میکروارگانیسم‌ها و یا با مهار آنزیم‌های ساختاری غشای سلولی آن ها خاصیت ضد میکروبی خود را اعمال می‌کنند(علیشاهی و همکاران، ۱۳۸۸). گردو (*Juglans regia*) علاوه بر مصارف تغذیه‌ای در طب سنتی نیز کاربرد دارد و از برگ‌های آن برای درمان دردهای رماتیسمی، تب، دیابت، کم‌خونی و بیماری‌های تنفسی استفاده می‌شود (Kasper et al., 2005). از ریشه آن نیز برای درمان دیابت و از مغز آن به خاطر داشتن امگا ۳ برای تقویت حواس و مغز و قوای جنسی استفاده می‌شود (Pereira et al., 2007). حدودا ۱۵ درصد از چربی‌های گردو از نوع چربی‌های غیر اشباع و مفید برای سلامت قلب است. گل نر گردو به دلیل فراوانی و در دسترس بودن و امکان تهیه ارزان در صورت انجام آزمایشات بالینی بر روی عصاره های آن و موثر بودن این ترکیبات بر روی عوامل بیماریزا مانند *لاکتوکوکوس*، می‌تواند جانشین مناسبی برای داروهای سنتیک و غیر سنتیک باشد. با توجه به اینکه تاکنون مطالعه ای در زمینه تاثیر عصاره اتانولی و آبی گل نر گردو علیه باکتری‌های بیماری‌زای ماهی صورت نگرفته است، هدف از این مطالعه بررسی حساسیت باکتری زئونوز *لاکتوکوکوس گارویه* عامل بیماری لاکتوکوکوزیس در ماهیان قزل‌آلای پرورشی نسبت به عصاره‌های اتانولی و آبی گیاه گل گردو است.

روش کار

جمع‌آوری گیاه

بعد از شناسایی و جمع‌آوری گیاهان موردنظر، قسمت موردنیاز گیاه جهت عصاره‌گیری (گل) جدا شده و در شرایط مناسب (تاریک و خشک) نگهداری و کاملا خشک گردید. بعد از خشک شدن و آسیاب کردن قسمت‌های مورد استفاده گیاه گردو، عصاره‌گیری انجام شد (شکل ۱).

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱- گیاه گل نر گردو

چگونگی تهیه عصاره اتانولی و عصاره آبی

۵۰ گرم از پودر گل نر گردو را در ۲۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه و در ظرف جداگانه ۵۰ گرم از پودر را به ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کرده و ارلن‌ها به مدت ۷۲ ساعت ۷۲ ساعت روی شیکر قرار داده شد تا استخراج عصاره به طور کامل انجام گیرد، سپس مخلوط حلال و گیاه توسط صافی از هم جدا شد و عصاره صاف شده توسط دستگاه تقطیر در خلا تقطیر شد. عصاره‌ها را در پلیت‌های استریل ریخته شدند. سپس در شرایط استریل ۳ گرم از هرکدام از عصاره‌ها را با ۷ میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط کرده و توسط دستگاه ورتکس خوب مخلوط شدند، آن گاه عصاره را از فیلتر میکروبیولوژی ۰/۲۲ میکرون عبود داده شدند و در ظرف دردار استریل در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (نیستانی و همکاران، ۱۳۸۶).

روش تهیه سوسپانسیون باکتری

باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت؛ از شیوع بیماری در مزارع پرورش ماهی استان چهارمحال و بختیاری جداشده و با روش PCR، جنس و گونه آن مشخص گردید. باکتری در محیط تریپتیکاز سوی براث (TSB) کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سپس در شرایط استریل بذر باکتری به محیط مولر هینتون براث (MHB) اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در فاز لگاریتمی رشد باکتری، میزان کدورت ایجاد شده حاصل از رشد باکتری با استفاده از اسپکتروفوتومتر با لوله استاندارد مک فارلند شماره ۰/۵ ($۱/۵\times۱۰^{۸}$) تنظیم شد. این سوسپانسیون به عنوان ذخیره در نظر گرفته شده و در هنگام مصرف (در همان روز) به نسبت ۱:۱۰۰ در همان محیط رقیق شد ($۱/۵\times۱۰^{۶}$) (Heidari-Sureshjani et al., 2013).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) از روش Broth Micro dilution استفاده گردید. آزمایش MIC در پلیت ۹۶ خانه استریل و با روش براث میکرودایلوشن انجام شد. بدین ترتیب که ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌های مذکور را به چاهک‌های حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره گل نر گردو و ۱۰۰ میکرولیتر مولر هینتون براث (MHB) اضافه شد، سپس از خانه اول توسط سمپلر، ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و در خانه دوم ریخته شد، به همین ترتیب تا آخرین خانه این کار ادامه پیدا کرد و در نهایت از خانه آخر ۱۰۰ میکرولیتر به بیرون ریخته شد. تنها چاهک اول (کنترل مثبت) حاوی سوسپانسون میکروبی و محیط مولر هینتون براث، چاهک دوم (کنترل منفی) حاوی محیط مولر هینتون براث و عصاره‌ها و سه چاهک آخر حاوی آنتی‌بیوتیک‌ها (استرپتومایسین، اریترومایسین و جنتامایسین) برای مقایسه اثر ضد باکتریایی بود.

تعیین قطر هاله‌های عدم رشد برای مقادیر MIC و MBC

برای تعیین قطر هاله عدم رشد، بوسیله پیپت پاستور استریل و پمپ خلا چاهک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر در شرایط استریل در روی محیط مولرهینتون آگار ایجاد گردید. سپس ذخیره باکتری اولیه با کدورت‌سنجی بوسیله اسپکتوفوتومتر (با غلظت ۰/۵ مک فارلند) تهیه

www.SID.ir

شده و به روش کشت سفره‌ای در سه جهت کشت داده شد. میزان ۲۵ میکرولیتر از مقادیر بدست آمده MIC برای هر عصاره در سه تکرار به گودی‌ها اضافه گردید و بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه، هاله عدم رشد باکتری با خط کش اندازه‌گیری و ثبت گردید (Goudarzi et al., 2011).

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج با استفاده از نرم افزارهای آماری Excel ۲۰۱۳ و SPSS نسخه ۱۶ مورد بررسی قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل آماری، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) برای مقایسه بین تیمارها و از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۵ درصد برای بررسی وجود و عدم وجود اختلاف معنی داری بین میانگین تیمارها استفاده شد.

جدول ۱: حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره ها علیه باکتری *لاکتوکوکوس گارویه*.

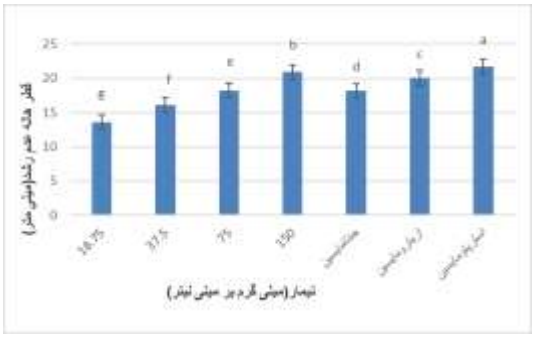
غلظت عصاره	میلی گرم بر میلی لیتر	۱۵۰	۷۵	۳۷/۵	۱۸/۷۵	۹/۳۷	۴/۶	۲/۳
عصاره الکلی گل نر گردو	باکتری *لاکتوکوکوس گارویه*	-	-	*MBC*	MIC	+	+	+
عصاره آبی گل نر گردو	باکتری *لاکتوکوکوس گارویه*	-	*MBC*	MIC	+	+	+	+

+ نشان دهنده رشد باکتری در محیط کشت می‌باشد.
- نشان دهنده عدم رشد باکتری در محیط کشت می‌باشد.

نتایج

همانطور که در جدول شماره ۱ مشخص است، عصاره اتانولی گیاه گل نرگردو بیشترین اثر ضد باکتریایی علیه باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* را از خود نشان داد. غلظت ۳۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، عصاره اتانولی اثر کشندگی (MBC) در برابر رشد باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* و در غلظت ۱۸/۷۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر خاصیت ممانعت از رشد (MIC) از خود نشان داد. نتایج بازگو کننده افزایش اثر ضد باکتریایی عصاره به ازای افزایش غلظت آن‌ها می‌باشد ($P<0.05$). عصاره آبی گل نرگردو در غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر خاصیت کشندگی و در غلظت ۳۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر خاصیت ممانعت از رشد از خود نشان داد.

بر طبق شکل۳، با توجه به اختلاف معنی‌دار غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی گل نر گردو، نتایج بازگوکننده افزایش اثر ضدباکتریایی عصاره به ازای افزایش غلظت آن‌ها می‌باشد؛ می‌توان گفت با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله بازدارندگی نیز افزایش می‌یابد ($P<0.05$).

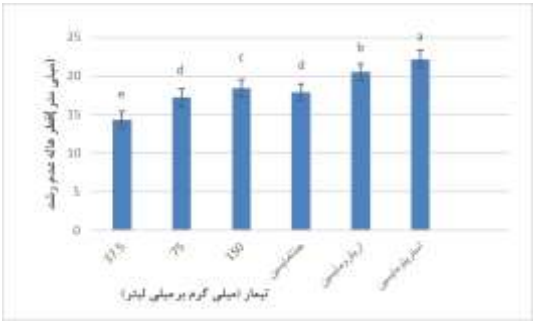


شکل ۳. نمودار مقایسه اثر ضد باکتریایی عصاره اتانولی گل نر گردو با آنتی‌بیوتیک‌های رایج علیه باکتری لاکتوکوکوس گارویه. حروف غیر همسان دارای اختلاف معنی دار می باشند. ($P<0.05$).

قطر هاله عدم رشد در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی-لیتر عصاره اتانولی، با میانگین هاله ۲۰/۹۳ میلی‌متری بیشتر از قطر هاله عدم رشد جنتامایسین و اریترومایسین و کمتر از هاله عدم رشد استرپتومایسین با میانگین۲۱/۷۵ میلی‌متر بود؛ با توجه به نتایج شکل ۳ عصاره اتانولی گل نر گردو در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی-بیوتیک‌های اریترومایسین و جنتامایسین باشد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴. نمودار مقایسه اثر ضد باکتریایی عصاره آبی گل نر گردو با آنتی‌بیوتیک‌های رایج علیه باکتری لاکتوکوکوس گارویه. حروف غیر همسان دارای اختلاف معنی دار می باشند. ($P<0.05$).

بر طبق شکل ۴، با توجه به اختلاف معنی‌دار غلظت-های مختلف عصاره نتایج بازگو کننده افزایش اثر ضد باکتریایی عصاره به ازای افزایش غلظت آن‌ها می‌باشد ($P<0.05$). هاله عدم رشد در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر عصاره آبی، کمتر از هاله عدم رشد آنتی بیوتیک اریترومایسین و استرپتومایسین و بیشتر از هاله عدم رشد جنتامایسین بود.

بحث

مقاومت میکروبی روزافزون باکتری‌ها نسبت به آنتی-بیوتیک‌ها، شیوع بیماری‌های عفونی و توانایی برخی از گیاهان برای تولید مواد ضد میکروبی، محققان را بر آن داشت تا عصاره‌های گیاهی را به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها مدنظر قرار دهند؛ از جمله این مواد درخت گردو می‌باشد. آثار باکتری‌کشی گیاه گردو توسط Bakhtiari Moori در سال 2016 گزارش شده است (Bakhtiari Moori, 2016). آنالیز و تجزیه ترکیبات شیمیایی قسمت‌های مختلف درخت گردو اساس خاصیت ضدباکتریایی آن‌ها است. آنتی-اکسیدان‌های طبیعی ترکیبات فنولی هستند که در همه بخش‌های گیاه گردو وجود دارد (Pereira et al., 2007). . فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی به دلیل خصوصیات اکسایشی و کاهشی آن‌ها است که این امکان را به آن‌ها می‌دهد که به عنوان یک عامل احیا-کننده، دهنده هیدروژن و خنثی‌کننده اکسیژن یگانه عمل کنند (Bilger et al., 2007). مغز گردو دارای چند اسید آلی، مقدار کمی اسانس، اگزالات آهک و ویتامین می‌باشد (Bilger et al., 2007). برگ درخت گردو دارای ۳ درصد اینوزیت، اسید الاژیک، اسید گالیک و اسانسی با بوی مخصوص و مقداری پارافین، تانن، مواد چرب و املاح معدنی است (Rezai et al., 2015). عصاره برگ درخت گردو خاصیت باکتری‌کشی دارد. شرافتی و همکاران در سال ۱۳۸۸ با بررسی اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی برگ درخت گردو بر روی *پروپیونی باکتریوم آکنه*، دریافتند که عصاره اتانولی برگ درخت گردو دارای اثر مهاری روی باکتری بوده است و MIC برابر ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و MBC برابر ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (شرافتی و همکاران، ۱۳۸۸).

در مطالعه حاضر اثر ضدمیکروبی گل گیاه گردو بررسی گردید تا در تکمیل یافته‌های فارماکولوژیکی بتوان اطلاعات کامل‌تری از خواص گل گیاه گردو را فراهم آورد. در این مطالعه از عصاره‌های اتانولی و آبی گل نر گیاه گردو علیه باکتری *لاکتوکوکوس اینیایی* استفاده شد که نتایج نشان داد؛ عصاره اتانولی گل نر گردو، در غلظت ۳۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اثر کشندگی و در غلظت ۱۸/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر خاصیت ممانعت از رشد و عصاره آبی گل نر گردو، در غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اثر کشندگی و در غلظت ۳۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر خاصیت ممانعت از رشد را در برابر رشد باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* از خود نشان داد. نوع حلال، در استخراج ترکیب‌های فعال گیاه موثر است و عصاره در حلال‌های مختلف می‌تواند اثرات متفاوتی در کنترل عوامل بیماری‌زا داشته باشد. عصاره آبی دارای مواد محلول در آب می‌باشد و عصاره اتانولی می‌تواند شامل مواد مختلف با قطبیت کمتر نیز باشد. عصاره‌های اتانولی میزان بالاتری از مواد موثره گیاه را استخراج می‌کنند. هاله عدم رشد در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی گیاه گل نر گردو، با میانگین هاله ۲۰/۹۳ میلی‌متری بیشتر از هاله

www.SID.ir

عدم جنتامایسین و اریترومایسین و کمتر از هاله عدم رشد استرپتومایسین با میانگین ۲۱/۷۵ میلی‌متر بود و هاله عدم رشد در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی، کمتر از هاله عدم رشد اریترومایسین و استرپتومایسین و بیشتر از هاله عدم رشد جنتامایسین بود. رحیمی و همکاران در سال ۱۳۹۶ با مطالعه اثر ضد باکتریایی گل درخت گردو علیه باکتری آئروموناس هیدروفیلا در شرایط آزمایشگاهی دریافتند که، غلظت ۵ /۳۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، عصاره اتانولی اثر کشندگی در برابر رشد باکتری آئروموناس هیدروفیلا و در غلظت ۱۸/۷۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر خاصیت ممانعت از رشد و عصاره آبی گل گردو درغلظت ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر خاصیت کشندگی و در غلظت ۳۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر خاصیت ممانعت از رشد از خود نشان داد که نتایج شبیه تحقیق حاضر بوده است(رحیمی و همکاران، ۱۳۹۶). Rafiee pour و همکاران ۲۰۱۴، با بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره و اسانس زیره سبز و رزماری علیه *لاکتوکوکوس گارویه* جداسازی شده از قزل‌آلای‌رنگین‌کمان در شرایط آزمایشگاهی، به این نتیجه رسیدند که عصاره زیره سبز و رزماری علیه *لاکتوکوکوس گارویه* فاقد اثر است ولی اسانس‌شان دارای اثر مهاری بر *لاکتوکوکوس گارویه* می‌باشد که اثر باکتری‌کشی عصاره‌های پژوهش حاضر بر باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* بیشتر بود (Rafiee pour et al Mokarami, 2014)؛ همچنین انصاری و همکاران در سال ۱۳۹۳ با مطالعه اثر عصاره مرزه خوزستانی بر ممانعت از رشد باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* در گوشت قزل‌آلای رنگین‌کمان در دمای یخچال دریافتند که، اسانس این گیاه منجر به کاهش جمعیت باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* در فیله شده به طوری که غلظت ۵/. میکروگرم در گرم مرزه خوزستانی دارای بیشترین اثر بود که در مقایسه با عصاره‌های تحقیق حاضر، دارای اثر باکتری‌کشی بیشتری بود (انصاری و همکاران، ۱۳۹۳). رحیمی و همکاران در سال ۱۳۹۴ با مطالعه اثرات ضد باکتریایی برخی اسانسهای گیاهی علیه باکتریهای *لاکتوکوکوس گارویه* و *یرسینیا راکری* دریافتند که همه اسانس ها دارای اثر کشندگی بر باکتری ها بودند که نسبت به نتایج تحقیق حاضر گیاهان اثر کشندگی بیشتری بر باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* داشتند (رحیمی و همکاران، ۱۳۹۴). ژوگلون ترکیبی نفتوکینونی بوده که در برگ تازه و پوست سبز میوه گردو یافت می‌شود و مهم‌ترین ترکیب ضد میکروبی گردو می‌باشد که این ترکیب پیش‌ساز اکسی‌تتراسایکلین است (Kamkar et al., 2004). Ansari و همکاران (۲۰۱۴)، با بررسی اثر ضد باکتریایی اسانس پونه معطر بر لاکتوکوکوس گارویه جدا شده از فیله ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان ، به این نتیجه رسیدند اسانس پونه معطر سبب مهار رشد *لاکتوکوکوس گارویه* در فیله ماهی قزل آلا شده است (Ansari et al., 2014). Raki و همکاران (۲۰۰۴)، با بررسی فعالیت ضد میکروبی برخی از گیاهان از جمله نعنا (*Mentha longifolia*)؛ مورد (*Mytrus comminus*)، مرزه بختیاری (*Satureja bachtiarica*) و مرزه خوزستانی (*Satureja khuzestanic*a) در رابطه با *لاکتوکوکوس گارویه* به این نتیجه رسیدند که اسانس مرزه بختیاری بهترین اثر ضد باکتریایی را در برابر *لاکتوکوکوس گارویه* را از خود نشان داد که در مقایسه با تحقیق حاضر دارای اثر باکتری‌کشی کمتری بوده است (Raki and Khullar., 2004). تانن ها هم یکی از ترکیبات پلی‌فنلی یا پلیمری با وزن مولکولی بالا است که می‌توانند برای باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای سمی باشند و با رسوب پروتئین‌های میکروبی مانع از رشد آن‌ها می‌شوند (Carson et al., 1993). فعالیت کم عصاره‌های آبی به علت غلظت کم ترکیبات فنولی محلول در آب آن‌ها است(Rezazadeh et al., 2006). باکتری‌های گرم مثبت نسبت به ترکیبات ضدباکتریایی، حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی هستند. به دلیل وجود غشای

www.SID.ir

Archive of SID

خارجی احاطه کننده دیواره سلولی در باکتری‌های گرم‌منفی به نظر می‌رشد که این باکتری‌ها در برابر اثر عصاره‌ها حساسیت کمتری از خود نشان دهند که این غشا انتشار مواد آب گریز از میان لایه پوشاننده لیپوپلی ساکاریدی را محدود می‌کند (Austin, 1999).

نتیجه گیری

در خاتمه باتوجه به نتایج بدست آمده از این بررسی، میتوان بیان نمود که عصاره اتانولی گیاه گل نر گردو دارای اثر باکتری‌کشی قوی‌تری بر روی باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* در شرایط آزمایشگاهی بود و همچنین در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی، هاله عدم رشد ایجاد شده بیشتر از هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و اریترومایسین بوده است. همچنین پیشنهاد می شود که با انجام مطالعات وسیع‌تری در شرایط بالینی در مزارع پرورش ماهی و مشخص شدن غلظت موثر، غیر سمی بودن و مکانیسم اثر عصارهای مورد بررسی، می‌توان این عصارها را به عنوان مواد ضد باکتریایی طبیعی و جدید به صنعت آبزی پروری و شیلات کشور معرفی کرده و به عنوان جایگزین مناسب آنتی بیوتیک‌ها در درمان و پیشگیری از بیماری‌های باکتریایی ماهی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بدین وسیله از کارکنان بخش بهداشت آبزیان، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشگاه شهرکرد، که در مراحل مختلف این پژوهش همکاری نموده اند سپاسگزاری می نمایند.

منابع

۱. انصاری، م.، سلطانی، م و حسینی، ا. (۱۳۹۳). مطالعه اثر اسانس مرزه خوزستانی بر ممانعت از رشد باکتری *لاکتوکوکوس گارویه* در گوشت قزل آلای رنگین کمان در دمای یخچال. *مجله میکروب شناسی مواد غذایی*، سال اول، شماره۳، صفحه ۳۳-۳۹.

۲. رحیمی، م.، رییسی، م و علیشاهی، م. (۱۳۹۴). مطالعه اثرات ضد باکتریایی برخی اسانسهای گیاهی علیه باکتریهای *Lactococcus garvieae, Yersinia ruckeri*. مجله علمی شیلات ایران، سال ۲۴، شماره، صفحه ۶۵-۵۵.

۳. رحیمی، ر.، محسنی، پ و هاشمی، گ.(۱۳۹۶). مطالعه اثر ضد باکتریایی گل درخت گردو علیه باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در شرایط آزمایشگاهی. نشریه توسعه آبزی پروری، سال یازدهم، شماره چهارم، صفحه۵۱-۴۵.

۴. سالنامه آماری سازمان شیلات ایران. (۱۳۹۱-۱۳۹۵). صفحه ۳۴.

۵. شرافتی، ع و شرافتی، ر. (۱۳۸۸). بررسی اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی برگ درخت گردو بر روی *پروپیونی باکتریوم آکنه*. مجله علوم پزشکی دانشگاه زنجان، دوره ۱۸، شماره۷۱، تابستان ۸۹؛ صفحه ۴۹-۴۲.

۶. علیشاهی، م.، قربانپور نجف آبادی، م.، نجف زاده، ح و همکاران. (۱۳۸۸). مطالعه اثرات ضد باکتریایی برخی عصاره های گیاهی علیه *استرپتوکوکوس اینیایی، یرسینیا راکری و آئروموناس هیدروفیلا*. مجله دامپزشکی ایران، دوره ششم، شماره۲، صفحه ۳۰-۲۱.

۷. موسوی، س.، سعیدی, غ.، قیاسی، م و همکاران. (۱۳۸۸). بررسی بروز استرپتوکوکوزیس و شناسایی باکتری های مسبب آن در مزارع منتخب تکثیر و پرورش قزل آلای رنگین کمان استان مازندران. مجله علوم زیستی واحد لاهیجان، سال سوم، شماره اول، صفحه ۸۲-۷۳.

۸. نیستانی، ت و خلجی، ن. (۱۳۸۶). مطالعه اثر مهاری چای سیاه (*Camellia sinensis*) بر رشد باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز و مقایسه آن با چای سبز در محیط آزمایشگاه (In vitro). مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، سال دوم، شماره ۱، صفحه ۴۷-۴۱.

9. Austin, B. and Austin, D.A. 1999. Bacterial Fish Patogens. Disease of Farmed and Wild Fish ISBN 1852331208, Springer

www.SID.ir

aeruginosa and *Staphylococcus epidermidis*. Zahedan J Res in Med Sci. 6: 29-33.

18. Kamkar, J., Rezaei, M.B., Bagheri, P., Abolfazl, S.S., Malihe N. 2004. Determination of juglone from leaves and fresh peels of *juglans regia*. By high performance liquid chromatography. Iran J Men arom plants. 20: 323-331.

19. Morteza-Semnani, K., Saeedi, M., Mahdavi, M.R., Rahimi, F. 2007. Antimicrobial effects of methanolic extracts of some spices of *Stachys* and *Phlomis*. J Mazandaran Univ Med Sci. 57: 57-66.

20. Moori Bakhtiari, N., Jamshidian, J., Khalafi, E. 2016. Effect of *Juglans regia*. Stem Bark Hydroalcoholic Extract on Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. JJNPP. 11: 17795-17807.

21. Pereira, F., Ravelo, C., Toranzo, A.E., Romalde, J.L. 2004. *Lactococcus garvieae*, an emerging pathogen for the Portuguese trout culture. Bull Eur Ass Fish Pathol. 24:274–279.

22. Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentao, P., Andrade, P., Ferreira, I., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L. 2007. Walnut *(Juglans regia*) leaves: phenolic compound, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food Chem Toxicol. 45: 2287-2295.

23. Rezai, S., Jafari, M., Khamiri, M., Bayat, H. 2015. Effect of solvent and method extraction on antioxidant *activity* walnut green husk extraction (shahmirzad). Food Technol Nutr. 12: 85-95 [in Persian].

24. Raissy, M., and Ansari, M. 2011. Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss*). African J Biotechnol. 8: 1473-1476.

25. Ravelo, C. 2003. Molecular Fingerprinting of Fish-Patogenic *Lactococcus garvieae* Strains by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis Molecular Fingerprinting of Fish-Patogenic *Lactococcus garvieae* Strains by Random Praxis Pub. Chichester. 35-49, 198-199, 143-244.

10. Akhlaghi, M. and Mahjoor, M. 2000. Some histopathological aspects of Streptococcosis in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). B Eur Assoc Fish Pat. 24: 132-136.

11. Ansari, M., Rezaei, M., Hosseini, H. 2014. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha pulegium* on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chilled (4 ±1°C) storage. Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. 21: 32-36.

12. Bilger, B., and Solhaug, K. 2007. Phenolic contents and other health and sensory related properties of apple fruit (Malus domestica Borkh., cv. Aroma): Effect of postharvest UVβ irradiation. Postharvest Biol Tec. 45:1-10.

13. Chen, S.C., Liaw, L.L., Su, H.Y., Ko, S.C., Wu, C.Y. 2002. *Lactococcus garvieae*, a cause of disease in grey mullet, Mugil cephalus L, in Taiwan. J Fish Dis. 25: 727–732.

14. Carson, J., Gudkovs, N., Austin, B. 1993. Characterisitics of an *Enterococcus-like* bacterium from Australia and South Africa, pathogenic for rainbow trout. J Fish D. 16.

15. Fefer, J.J., Ratzan, K.R., Sharp, S.E., Saiz, E. 1998. *Lactococcus garvieae* endocarditic: report of a case and review of the literature. Diagn Microbiol Infect Dis. 32: 127–130.

16. Goudarzi, M.A., Hamedi, B., Malekpoor, F., Abdizadeh, R., Ghasemi Pirbalouti, A., Raissy, M. 2011. Sensitivity of *Lactococcus garvieae* isolate from rainbow trout to some Iranian medicinal herbs. J Med Plant Res. 5: 3067-3073.

17. Heidari-Sureshjani, M., Tabatabaei-Yazdi, F., Alizadeh-Behbahani, B., Mortazavi, A. 2013. Antimicrobial effect of aquous, ethanol, methanol and glycerin extracts of Satureja bachtiarica on *Streptococcus pyogenes, Pseudomonas*

www.SID.ir

Archive of SID

Amplified Polymorphic DNA Analysis. J Clin Microbiol. 41: 751-756.
26. Rafieepour, M. and Mokarami, A. 2014. Effect of antibacterial and Cumin (*Cuminum cyminum*) and (*Rosemary Rosmarinus*) officinalis against *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout. J Int Vet Res. 3: 137-142.
27. Raki, P. and Khullar, N. 2004. Antimicrobial evaluation of some medicinal plants for their anti-enteric potential against multi drug resistant *Salmonella typhi*. *Phytother. Res*. 18: 670–673.
28. Rezazadeh, S., Pirali Hamedani, M., Hajiakhoundi, A., et al. 2006. Chemical composition of the essential oils of *stachys athorecalyx c*. Koch. Collected from arasbaran prospected region. J Medicinal Plants. 5: 56 – 62.
29. Smith, P. 2015. Antimicrobial resistance in aquaculture. Pubmed Commons. 27: 1-12.
30. Wijngaard, H., Rle, H., Brunton, C. 2009. Survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants. Food Chemistry. 116: 202-207.

www.SID.ir

Study on the effect of aqueous and ethanolic extracts of *Juglans regia* plant on *Lactococcus garvieae* isolated from meat of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*)

Mohsenisisakht P[1], Nematollahi A[2*], Mohebbi A[3], Rahimi R[4]

1. Graduate of Aquatic Animal Health, Faculty of Specialised Veterinary Sciennce, Shahrekord Branch, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
2. Department of Food hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
3. Clinical Sciences Dept, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
4. Department of Fisheries Sciences, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

***Corresponding author:** *anematolahi@yahoo.com*

Received: 30 April 2019 Accepted: 1 August 2019

Abstract

Lactococcus garvieae (*L. garvieae*) is the causative agent of lactococcosis in fish. These diseases can be transmitted to humans by direct contact or consumption of infected fish meat. In this study, the susceptibility of *L. garvieae* to the ethanolic and aqueous extracts of *Juglans regia* (*J. regia*) was evaluated. Ethanolic and aqueous extract of the *J. regia* was prepared and successively diluted to obtain minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) against *L. garvieae* bacteria by successive dilution method. Also, the inhibition of bacterial growth was measured, using disk diffusion method. The results showed that the ethanolic extract of *J. regia* had bactericidal effect in concentrations of 37.5 mg/ml and also the bacteriostatic effect in the concentration of 18.75 mg/ml. However, the aqueous extract of *J. regia*, at concentrations of 75 mg/ml showed a bacterial effect and in the concentration of 37.5 mg/ml, the bacteriostatic effect was shown against bacterial growth. Considering the proper effect of these extracts on *L. garvieae*, more extensive studies was needed in clinical conditions in aquaculture farms. After determining the effective concentration, non-toxicity and the mechanism of their effect, extracts can be used in the treatment and prevention of disease.

Keywords: *Lactococcus garvieae*, extract, *Juglans regia*, rainbow trout.

www.SID.ir