Archive of SID

اثر برون‌تنی عصاره هیدروالکلی پوست درخت گردو بر برخی پاتوژن‌های باکتریایی ماهی

نغمه موری‌بختیاری[۱*]، زهرا طولابی‌دزفولی[۲]، بهاره سلیمانی[۲] و تکاور محمدیان[۳]

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۱۲

خلاصه

پرورش دهندگان ماهی، سالیانه به دلیل تلفات ناشی از عفونت‌های ایجادی توسط باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک متحمل میلیون‌ها دلار خسارت می‌شوند. فعالیت متابولیت‌های ثانویه گیاهان بر گونه‌های مختلفی از باکتری‌های گرم مثبت در مقیاس میکرومولار و کم‌تر از آن گزارش شده است و عصاره‌ی گیاهان به عنوان عوامل مهمی در جلوگیری از توسعه‌ی مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشند. از این جهت در مطالعه‌ی حاضر، اثر ضد باکتریایی عصاره‌ی پوست درخت گردو بر برخی باکتری‌های بیماری‌زای مهم جداسازی شده از ماهی مانند: *آئرومونـاس هیدروفیلا*، *یرسینیا راکری*، *استرپتوکوکوس اینیایی*، *استافیلوکوکوس آرئوس* و *سالمونلاتایفی موریوم* مورد بررسی قرار گرفته است. جهت انجام این تحقیق در ابتدا عصاره‌ی هیدروالکلی پوست درخت گردو در آزمایشگاه فارماکولوژی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران بر اساس دستورالعمل استاندارد، تهیه گردید. سپس جهت تعیین کنترل مثبت برای هر باکتری از روش کربی- باور با دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی استاندارد استفاده گردید. ارزیابی برون‌تنی اثر عصاره‌ی هیدروالکلی پوست درخت گردو نیز با روش کربی-باور انجام و حداقل غلظت مهاری عصاره با روش انتشار دیسک (E-test) و ماکرودایلوشن (رقت‌سازی در لوله) تعیین گردید. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، منطقه‌ی عدم رشد واضح در مقایسه با کنترل مثبت، تنها در مورد *آئرومونـاس هیدروفیلا* و *یرسینیا راکری* مشاهده گردید. اما واکنش واضحی در خصوص باکتری‌های دیگر مشاهده نگردید. حداقل غلظت مهاری با روش انتشار دیسک در خصوص *یرسینیا راکری* و *آئرومونـاس هیدروفیلا* به ترتیب ۳/۹ و ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و با روش ماکرودایلوشن به ترتیب ۳/۹ و ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت باکتری‌کشی آن به ترتیب ۷/۸۱ و ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ارزیابی گردید. *یرسینیا راکری* و *آئرومونـاس هیدروفیلا* از باکتری‌های مهم در صنعت پرورش آبزیان می‌باشند و تأثیر عصاره‌ی پوست درخت گردو بر آن‌ها مثبت ارزیابی گردید اما قطعاً کارهای بیش‌تری در خصوص بررسی ایمنی و سمیت آن مورد نیاز می‌باشد. در خصوص باکتری‌های دیگری که تأثیر مناسبی از این عصاره بر آن‌ها مشاهده نگردید، پیشنهاد می‌گردد که از عصاره پوست درخت گردو که با روش‌های دیگر تهیه شده‌اند، استفاده شود زیرا نوع حلال و روش تهیه‌ی عصاره می‌تواند اثر ضد باکتریایی آن را تحت تأثیر قرار دهد.

کلمات کلیدی: درخت گردو، عصاره‌ی هیدروالکلی، ماهی، پاتوژن‌های باکتریایی

مقدمه

طی دو دهه‌ی گذشته تکثیر و پرورش آبزیان توسعه‌ی زیادی یافته به طوری که براساس گزارش سازمان خوار و بار و کشاورزی سازمان ملل متحد (فائو)، تولید آبزیان در ۱۵ سال گذشته حدود ۴۰۰ درصد رشد داشته است (Fao 2010). از اصول اولیه در پرورش آبزیان، تولید زیاد در حداقل زمان و در کم‌ترین مساحت است که این امر خود زمینه‌ساز بروز استرس و بسیاری از بیماری‌های عفونی است. بیماری‌های باکتریایی در بین ماهی‌های پرورشی چه به صورت اولیه و چه به صورت ثانویه به عنوان علت اصلی مرگ و میر ماهی مورد توجه می‌باشند (Nielsen et al.

[۱*] استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز E-mail: n.moori@scu.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] دانش‌آموخته‌ی دکترای حرفه‌ای دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۳] استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

www.SID.ir

Archive of SID

2001) . در حال حاضر راه اصلی کنترل بیماری‌های باکتریایی آبزیان درمان آنتی‌بیوتیکی و اعمال اصول مدیریتی می‌باشد (Ismail 2010, Peyghan 2010). استفاده از داروهای شیمیایی اگرچه در مراحل اولیه‌ی بیماری می‌تواند مؤثر واقع شود اما در صورت نیاز به تکرار درمان در زمان شیوع بیماری، میزان محدود آنتی-بیوتیک‌های در دسترس و مشکلات زیست‌محیطی ناشی از باقی‌ماندن دارو در بدن ماهی، استفاده از این مواد را محدود و احساس نیاز به معرفی روش جایگزین را بارزتر می‌نماید (Osman et al. 2009).

خانواده Juglandaceae مشتمل بر گونه‌های با ارزش و مفید از نظر پزشکی می‌باشد، *Juglans regia* Linn که از نظر عوام درخت گردو شناخته می‌شود، درختی بزرگ و برگریز است که در بلوچستان، شمال ایران، قفقاز، جنگل-های هیمالیا در هند (Chopra 1986)، ارمنستان و دیگر مناطق معتدل (Chopra 1958) یافت می‌شود. از ریشه، پوست ساقه، برگ‌ها، دانه‌ها و روغن دانه‌ی آن جهت درمان مشکلات جسمانی استفاده می‌گردد. پوست ساقه‌ی این درخت به عنوان ضد انگل، قابض، باکتری‌کش، ادرارآور، مسهل، دترجنت، محرک و حشره‌کش در نظر گرفته می‌شود (Chopra 1986) و در تحقیق انجام شده توسط Wren و همکاران آثار درمانی مثبت درخت گردو در موارد اگزما، تب‌خال، جراحات سلی غدد لنفاوی و بریدگی‌ها گزارش گردیده است (Wren 1956). ساقه‌ی خشک این درخت به عنوان تمیز کننده‌ی دندان استفاده می‌شود (Duke 1983) . آثار باکتری‌کشی گردو در تحقیقات انجام شده توسط Moori Bakhtiari در سال ۲۰۱۶ و Largange در سال ۱۹۵۴ گزارش شده است. همچنین اثر مثبت این گیاه در درمان عفونت‌های قارچی مانند رینگ‌ورم (Ringworm) نیز گزارش شده است (Clark et al. 1990) . اهمیت مطالعه‌ی تأثیر گیاهان در زمینه‌ی میکروبیولوژی با مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها، عوارض جانبی مواد ضد باکتریایی شیمیایی و قیمت بالای آن‌ها در کشورهای در حال توسعه مرتبط می‌باشد. آنالیز و تجزیه‌ی ترکیبات شیمیایی قسمت‌های مختلف درخت گردو که اساس خاصیت ضد باکتریایی آن‌ها می‌باشد در مطالعات متعددی صورت گرفته است. پوست درخت گردو شامل ترکیبات شیمیایی مختلف از جمله : بتا سیتواسترول، آسکوربیک اسید، فولیک اسید، گالیک اسید، جوگلون، رجیولون و کوئرستین تری الفا ال آرابینوزید می‌باشد (Bhunimba 2002, Joshi 2007).

با عنایت به اهمیت استفاده از گیاهان به عنوان جایگزین طبیعی آنتی‌بیوتیک‌ها و با توجه به این که اطلاعات محدودی در زمینه‌ی تأثیر این گیاه بر باکتری-های پاتوژن ماهی وجود دارد، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی تأثیر عصاره‌ی هیدروالکلی پوست درخت گردو بر برخی پاتوژن‌های ماهی از جمله : *آئرومونا‌س هیدروفیلا*، *یرسینیا راکری*، *استرپتوکوکوس اینیایی*، *استافیلوکوکوس آرئوس* و *سالمونلاتایفی موریوم* انجام گردید.

مواد و روش کار

در این تحقیق از باکتری‌های جداسازی شده از نمونه-های کلینیکی ارجاعی به آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز که از حوضچه‌های واقع در شهرستان اهواز ارسال شده بودند، استفاده گردید. جداسازی و تعیین هویت هر یک از این باکتری‌ها بر اساس مورفولوژی باکتری، رنگ‌آمیزی گرم و انجام تست‌های بیوشیمیایی استاندارد در آزمایشگاه صورت گرفت . جهت تعیین حساسیت هر یک از باکتری‌ها و انتخاب کنترل مثبت، از دیسک‌های آنتی-بیوتیک تجاری استاندارد (شرکت پادتن طب) متناسب با هر یک از باکتری‌ها و به روش انتشار دیسک کربی-باور ارائه شده توسط کمیته‌ی ملی استانداردهای آزمایشگاهی کلینیکی (NCCLS 2000) استفاده گردید.

جهت تهیه‌ی عصاره‌ی هیدروالکلی، ابتدا گیاه خشک از فروشگاه‌های محلی استان خریداری گردید. سپس به ازای هر ۱۰۰ گرم پودر گیاه خشک ۵۰۰ میلی‌لیتر الکل

www.SID.ir

Archive of SID

اتانول ۸۰ درصد (۴۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد + ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) اضافه گردید و به مدت ۴۸ ساعت در دمای آزمایشگاه بر روی شیکر قرار داده شد. پس از این زمان جهت حذف ذرات کوچک‌تر و دکانته در محلول مورد نظر از کاغذ صافی استفاده گردید. عصاره‌ی به دست آمده در مجاورت هوا خشک و از پودر آن در آب مقطر استریل به عنوان عصاره‌ی هیدروالکلی استفاده گردید (Haghighati 2003).

برای تعیین حداقل غلظت مهاری عصاره‌ی هیدروالکلی پوست درخت گردو از روش انتشار دیسک استفاده شد. در این روش ابتدا هر یک از باکتری‌های مورد مطالعه در محیط آبگوشت مغز و قلب (BHI) کشت و تا زمان رسیدن به کدورت مناسب (برابر با ۰/۵ مک فارلند) در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. در این مدت غلظت‌های سریال از عصاره‌ی تهیه (شامل ۱۰۰۰–۵۰۰–۲۵۰–۱۲۵–۶۲/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) و به میزان ۳۰ میکرولیتر از هر رقت بر روی دیسک بلانک استریل (شرکت پادتن طب) قرار داده شد. پس از ایجاد کدورت مناسب از هر باکتری در محیط آبگوشت مغز و قلب (BHI) ابتدا یک کشت چمنی از آن بر روی محیط مولر هینتون یا آگار خون‌دار تهیه و سپس دیسک‌های آغشته شده با رقت مشخص از هر عصاره، به ترتیب رقت (از کم به زیاد)، در سطح محیط کشت شده با باکتری مورد نظر قرار داده شد. در این تست برای هر پلیت، از دیسک حاوی آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی و از دیسک آنتی‌بیوتیک استاندارد که در ابتدای کار با روش کربی–باور برای هر باکتری مورد بررسی، مشخص شده بود به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. در این مطالعه جهت تعیین حداقل غلظت مهاری و باکتری‌کشی (MIC, MBC) عصاره از روش براث ماکرودایلوشن و محیط BHI استفاده گردید.

نتایج

با انجام روش دیسک دیفیوژن کربی باور و به کارگیری دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مختلف تجاری، قطر هاله‌ی عدم رشد ایجاد شده توسط دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۲۰ میلی‌متر میانگین) در تمامی جدایه‌ها، در منطقه‌ی حساس قرار داشته و بنابراین به عنوان کنترل مثبت تمامی جدایه‌ها در نظر گرفته شد. رقت‌های مختلف از عصاره‌ی هیدروالکلی با مقادیر یکسان، بر باکتری‌های مورد مطالعه، تأثیر داده شد و خاصیت ضدباکتریایی مؤثر، تنها در مورد برخی از جدایه‌ها مشاهده گردید. در جدول ۱ اثر رقت‌های مختلف عصاره بر باکتری‌های مورد نظر و میزان هاله‌ی عدم رشد آن‌ها در مقایسه با کنترل مثبت هر باکتری آورده شده است. بر اساس نتایج، *یرسینیا راکری* با غلظت‌های ۱۰۰۰ تا ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره، دارای منطقه‌ی عدم رشد واضح و بزرگ‌تر از قطر هاله‌ی عدم رشد کنترل مثبت بود.

حداقل غلظت مهاری و باکتری‌کشی این عصاره برای دو باکتری *یرسینیا راکری* و *آئرومونـاس هیدروفیلا* با روش براث ماکرودایلوشن بررسی گردید. بر اساس نتایج مشاهده شده، حداقل غلظت مهاری برای *یرسینیا راکری* با عصاره‌ی هیدرالکلی ۳/۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت باکتری‌کشی آن ۷/۸۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ارزیابی گردید. در خصوص *آئرومونـاس هیدروفیلا* حداقل غلظت مهاری این عصاره ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت باکتری‌کشی این عصاره نیز، ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ارزیابی گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: مقایسه‌ی قطر هاله‌ی عدم رشد بر حسب میلی‌متر به دنبال استفاده از غلظت‌های مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی پوست درخت گردو در باکتری‌های مورد مطالعه

باکتری مورد مطالعه	جنتامایسین (کنترل مثبت)	غلظت‌های مختلف عصاره (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)				
		۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵	۶۲/۵
استافیلوکوکوس آرئوس	۲۱mm	-	–	–	–	–
یرسینیا راکری	۲۰mm	۳۳	۳۱	۳۰	۲۸	۲۵
آئروموناس هیدروفیلا	۲۰mm	۱۵	۱۵	۱۴	۱۳	۱۲
استرپتوکوکوس اینیایی	۲۲mm	-	-	-	-	-
سالمونلاتایفی موریوم	۲۰mm	-	–	–	–	–

بحث

شیوع پاتوژن‌های میکروبی، خصوصاً از نوع باکتریایی یکی از مهم‌ترین فاکتورهای تأثیرگذار بر صنعت پرورش آبزیان می‌باشد (Zorrilla et al. 2003) ماهی‌ها در ارتباط مداوم با باکتری‌ها می‌باشند و معمولاً پس از قرار گرفتن در معرض استرس‌های مختلف، از جمله تغییر فصل و دمای آب (Ortega 1995) و غیره، مبتلا به عفونت می‌گردند. عفونت‌های باکتریایی در آبزیان، خصوصاً ماهی‌ها از دو جنبه حائز اهمیت می‌باشد: ایجاد تلفات در ماهی و متعاقب آن ضرر اقتصادی به پرورش‌دهندگان در این صنعت و دیگری ایجاد عفونت ساده یا کشنده در انسان متعاقب مصرف ماهی و فراورده‌های خام یا نیم‌پخته آن. از مهم‌ترین عوامل باکتریایی عفونت‌زا در ماهی‌ها می‌توان به *آئروموناس هیدروفیلا*، *یرسینیا راکری*، *استرپتوکوکوس اینیایی*، *استاف آرئوس* و *سالمونلاتایفی موریوم* اشاره کرد که برخی از عوامل بیماری‌زای قطعی و برخی فرصت‌طلب محسوب می‌گردند. *آئروموناس هیدروفیلا* از عوامل پاتوژن فرصت‌طلب می‌باشد که گرچه به دلیل حضور مداوم در آب و دستگاه گوارش آبزیان، به عنوان فلور طبیعی آن‌ها در نظر گرفته می‌شود اما مسبب ایجاد مشکلات بسیاری در ماهیان پرورشی و غیر پرورشی بوده و در نهایت با ایجاد مرگ و میر و یا کاهش کیفیت، ضررهای اقتصادی فراوانی را به این صنعت وارد می‌سازد. بر اساس مطالعات صورت گرفته توسط Noga و همکاران ۸۰ درصد مرگ و میر ماهیان در استرس دمایی، ناشی از آلودگی با این باکتری می‌باشد (Noga 1996).

یرسینیوزیز، بیماری حاصل از عفونت با *یرسینیا راکری*، یکی دیگر از عفونت‌های باکتری‌های مهم در ماهیان می‌باشد. این باکتری در مناطق مختلف جغرافیایی حضور داشته و سپتی‌سمی، اگزوفتالمی و خونریزی قاعده باله‌ها حاصل از آن، از کشورهای اروپایی و آسیایی متعددی از جمله: ایران، استرالیا، کانادا، فرانسه، آلمان، ایتالیا، نیوزیلند و غیره گزارش گردیده است (diagnostic procedure 2009). *استرپتوکوکوس اینیایی* یکی از پاتوژن‌های اصلی ماهی در بسیاری از مناطق جهان می‌باشد. این باکتری باعث ایجاد عفونت‌های مرتبط با حمل و فراوری ماهی‌های آلوده، در انسان می‌گردد (Weinstein 1997). جراحات بافت نرم که در طی آماده‌سازی ماهی تازه در فروشگاه‌های مواد غذایی، در دست افراد ایجاد می‌شود در نهایت منجر به ایجاد سلولیت در موضع و سپس اندوکاردیت، مننژیت، آرتریت، پنومونی، استئومیلیت و شوک توکسیک می‌گردد (Sun 2007). علائم کلینیکی یرسینیوز در ماهیان درگیر شامل اگزوفتالمی دو طرفه، پیگمنته و تیره شدن بدن و آسیت می‌باشد. شیوع حاد این عفونت در ماه‌های گرم و تلفات

www.SID.ir

Archive of SID

ناشی از آن تا ۷۰ درصد نیز گزارش شده است (Perera 1994). انتروتوکسین‌های تولید شده توسط *استافیلوکوکوس آرئوس* و سالمونلاهای دفع شده از ماهی و نرم‌تنان صدف‌دار بدون علائم کلینیکی، به عنوان یک حامل غیرفعال از دیگر عوامل مهم ایجاد گاستروانتریت در افراد مصرف کننده ماهی و محصولات آن می‌باشد. در سال ۲۰۰۲ Ling و همکاران گزارشی از شیوع سالمونلا انتریکا تحت گونه‌ی تایفی موریوم در سنگاپور را که عامل آن مصرف ماهی دودی تشخیص داده شد بود، اعلام کردند. بیش‌ترین مسمومیت‌های غذایی ناشی از مصرف ماهی‌ها از طریق مصرف ماهی خام و یا نیم پخته بوده است که از طریق آب و یا خاک و یا در طی فراوری آلوده شده‌اند. استفاده از روش‌های فراوری مانند دودی کردن و غلظت کم نمک، مانع رشد باکتری‌ها در طی ذخیره-سازی نخواهد شد. بنابراین، استفاده از ماهی تازه و رعایت شرایط بهداشتی و نگهداری آن‌ها در دمای ۲ درجه‌ی سانتی‌گراد توصیه می‌گردد (Novotny 2004).

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات شیمیایی مختلف در درمان بیماری‌های باکتریایی و یا پیش‌گیری از آن‌ها، علاوه بر در بر داشتن هزینه برای پرورش‌دهندگان، منجر به ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های پاتوژن و متعاقب آن افراد مصرف‌کننده می‌گردد، با توجه به این نکته و همچنین وجود شرایط مناسب جهت رویش و پرورش گیاهان دارویی مختلف که خاصیت ضد باکتریایی و همچنین اجزای مؤثر بسیاری از آن‌ها تا کنون مورد بررسی (Djeussi 2013, Reverter 2014) و به اثبات رسیده است، توصیه می‌گردد که از این ترکیبات گیاهی در قالب پوشش و یا افزودنی‌های فراورده‌های ماهی و یا جیره‌ی غذایی ماهیان پرورشی که احتمال ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها را به حداقل و ماندگاری محصولات را افزایش می‌دهد، به موازات رعایت بهداشت، جهت کاهش ضررهای اقتصادی این صنعت، استفاده گردد.

منابع

Complementary and Alternative Medicine, 3:164. DOI: 10.1099/jmm.0.47180-0

Duke, J.A. (1983). Handbook of Energy Crops, 269.

FAO (2010). Fisheries and Aquaculture Department. Food and Agriculture Organisation of the United Nation, Rome.

Haghighati, F.; Jaafari, S. and Beitollahi, J.M. (2003). Comparison of antimicrobial effects of ten herbal extracts with chlorhexidine on three different oral pathogens; an *in vitro* study. Hakim, 6: 71-76.

Ismail, N.E.I.D.A.; Atta, N.S. and Mohamed Ahmed, A.E.A. (2010). Oral vaccination of Nile tilapia (*Orechromis niloticus*) against Motile Aeromonas Septicaemia. Report and Opinion, 2(1): 46-51.

Joshi, S.G. (2007). *Medicinal Plants*, Oxford & IBH Publishing, New Delhi, India.

Largange, E. (1954). C. R. Academy of Science. 5OC. Biology. 148:2097.

Sharma, P.C.; Yelne, M.B. and Dennis, T.J. (2002). Data Base on Medicinal Plants Used in Ayurveda. Central Council for Research in Ayurveda and Siddha, New Delhi, India. Vol. 4, Pp: 34-60.

Carson, J. and Wilson, T. Part 1 – Diagnostic Overview. (2009). Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedure Pp:1-19.

Clark, A.M., T.A. Jurgens, & C.D. Hufford. 1990. Antimicrobial activity of juglone. Phytotherapy Research, 4(1):1–14

Chopra, R.N.; Chopra, I.C.; Handa, K.L. and Kapur, L.D. (1958). Indigenous drugs of India, 2nd ed. UN Dhur & Sons, Private Ltd., Calcutta.

Chopra, R.N.; Nayar, S.L. and Chopra R.C. (1986). Glossary of Indian Medicinal Plants (Including the Supplement). Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, 1986, 11.

Djeussi, D.E.; Noumedem, J.A.K.; Seukep, J.A.; Fankam, A.G.; Voukeng, I.K.; Tankeo, S.B. et al. (2013). Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. Djeussi et al. BMC

www.SID.ir

Archive of SID

Ling, M.L.; Goh, K.T.; Wang, G.C.Y.; Neo, K.S. and Chua, T. (2002). An outbreak of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. enterica serotype Typhimurium, DT104L linked to dried anchovy in Singapore. Epidemiology and Infection, 128: 1-5.

Moori Bakhtiari, N.; Jamshidian, J. and Khalafi, E. (2016). Effect of Juglans regia Li. Stem Bark Hydroalcoholic Extract on Methicillin Resistant Staphylococcus aureus. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, 11(1): e29095. doi: 10.17795/ jjnpp. 29095.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova: PA; 2000.

Nielsen, M.E.; Høi, L.; Schmidt, A.S.; Qian, D.; Shimada, T.; Shen, J.Y. et al. (2001). Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile Aeromonas species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang Province of China? Disease of Aquatic Organisms. 46: 23-29.

Noga, E.J. (1996). Fish Disease: diagnosis and treatment. Moshy-Year book, Inc, Naples, Tokyo, New York Pp: 294.

Novotny, L.; Dvorska, L.; Lorencova, A.; Beran, V. and Pavlik, I. (2004). Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. Veterinary Medicine – Czech, 49 (9): 343-358.

Ortega, C.; Muzquiz, J.L.; Docando, J.; Planas, E.; Alonso, J.L. and Simon, M.C. (1995). Ecopathology in aquaculture: risk factors in infectious disease outbreak. Veterinary Research; 26 (1): 57-62.

Osman, K.M.; Mohamed, L.A.; Abdel Rahman, E.H. and Soliman, W.S. (2009). Trials for vaccination of *Tilapia* fish against *Aeromonas* and *Pseudomonas* Infections using monovalent, bivalent and polyvalent vaccines. World Journal of Fish and Marine Sciences, 1 (4): 297-304.

Perera, R.P.; Johnson, S.K.; Collins, M.D. and Lewis, D.H. (1994). *Streptococcus iniae* associated with mortality of Tilapia nilotica X aurea hybrids. Journal of Aquatic Animal Health, 6: 335-340.

Peyghan, R.H.; Khadjeh, G.H.; Mozarmnia, N. and Dadar, D. (2010). Effect of intraperitoneal and intramuscular injection of killed aeromonas *hydrophila* on lymphocytes and serum proteins of common carp, cyprinus carpio. Advances in Bioscience and Biotechnology, 1, 26-29.

Reverter, M.; Bontemps, N.; Lecchini, D.; Banaigs, B. and Sasal, P. (2014). Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. Aquaculture, 433: 50-61.

Sun, J.R.; Yan, J.C.; Yeh, C.Y.; Lee, S.Y. and Lu, J.J. (2007). Invasive infection with *Streptococcus iniae* in Taiwan. Journal of Medical Microbiology. 56: 1246-1249.

Weinstein, M.R.; Litt, M.; Kertesz, D.A.; Wyper, P.; Rose, D.; Coulter, M. et al. (1997). Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae. S. iniae* study group. N Engl Journal of Medicine, 337: 589-594.

Wren, R.C. (1956). Potters new cyclopedia of botanical drugs and preparations. Sir Isaac Pitman & Sons Ltd., London.

Zorrilla, I.; Chabrillon, M.; Arijo, S.; Diaz-Rosales, P.; Martinz-Manzanares, E.; Balebona, M.C. et al. (2003). Bacterial recovered from diseased cultured gilhead sea bream (*Sparus aurata L.*) in southeastern Spain. Aquaculture, 218: 112.

www.SID.ir

Archive of SID

Vol. 12, No. 2, Summer, 2016

Invitro effect of *juglans regia li*. stem bark hydroalcoholic extract on some bacterial pathogens of fish

Moori Bakhtiari, N.[1]; Tulabi Dezfuli, Z.[2]; Soleimani, B.[2] and Mohammadian, T.[3]

Received: 09.05.2015 Accepted: 04.10.2015

Abstract

Fish farmers are losing millions of dollars annually due to the large scale mortality of fish due to diseases caused by antibiotic resistance pathogens. Plant secondary metabolites show activity in the micro to submicromolar range to Gram-positive species. Plant extracts decrease the selective pressure for developing antibiotic resistance. Hence, in the present study antibacterial effect of hydroalcoholic extract of *Juglans regia Li*. compound against *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri*, *Streptococcus iniae*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* were screened. By standard protocol, hydroalcoholic extract of *Juglanse regia Li*. stem bark in pharmacology department of Shahid Chamran Veterinary School was prepared. To determine the positive control for each bacterial, antibiogram was done. In vitro evaluation of antibacterial effect of extract was done by disc diffusion method (Kirby bauer) and minimum inhibitory concentration was determind by E-test and macrodilution method. According to result in this study, clear inhibition zone compared with the positive control was seen about *A.hydrophila* and *Y.ruckerii*. But no strong effect on other studied bacteria was observed. By E-test, minimum inhibitory concentration of extract in *Y.ruckerii* and *A.hydrophila* was evaluated, 3.9 and 12 mg/ml, respectively. Minimum inhibitory concentration of extract in *Y.ruckerii* and *A.hydrophila* by macrodilution was 3.9 and 62.5 mg/ml and minimum bactericidal concentration was 7.81 and 125 mg/ml, respectively. *Y.ruckerii* and *A.hydrophila* are important bacteria in the aquaculture industry and hydroalcoholic extract of this plant was effective on them but more work should be done on its safety and toxicity. Other studied bacteria which extract had any effect on them, should be examined with other form (alcoholic or aqueous) of stem bark *Juglans regia Li*. extract because type of solvent or the method of preparation can affect antibacterial activity of extract.

Key words: *Juglans regia Li*., Hydroalcoholic extract, Fish, Bacterial pathogens

1- Asistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- DVM Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Moori Bakhtiari, N., E-mail: n.moori@scu.ac.ir

www.SID.ir