Archive of SID

مطالعه‌ی برون‌تنی اثر ضدباکتریایی چند گونه‌ی گیاهی بر باکتری‌های *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، *ویبریو هاروی* و *ویبریو دامسلا* در محیط کشت

افسانه نارویی[۱*]، جواد میردارهریجانی[۲]، احمد قرایی[۳] و نرجس سنچولی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲۶

چکیده

به دلیل عوارض جانبی داروهای شیمیایی و محدودیت استفاده از آن‌ها، گرایش به استفاده از گیاهان دارویی افزایش یافته است. هدف از این تحقیق، بررسی اثرات ضدباکتریایی اسانس گیاهان دارویی نعناع، میخک هندی و زیره‌ی سبز بر باکتری‌های *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، *ویبریو هاروی* و *ویبریو دامسلا* در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. به منظور مقایسه‌ی اثرات اسانس، از روش انتشار دیسک (Disk diffusion) استفاده شد. تعیین حداقل غلظت مهار رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) با استفاده از روش استاندارد رقیق‌سازی در محیط مایع (Broth-microdilution) انجام شد. در بین سه گیاه مورد مطالعه، میخک هندی بیش‌ترین تأثیر را از خود نشان داد. بزرگ‌ترین قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری، ۱۲ میلی‌متر مربوط میخک هندی برای باکتری *ویبریو دامسلا* به دست آمد و حداقل غلظت باکتری‌کشی در غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای گیاهان میخک هندی و نعناع بر باکتری *ویبریو پاراهمولیتیکوس* به دست آمد. *ویبریو هاروی* در مقابل همه‌ی اسانس‌ها از خود مقاومت نشان داد. بر اساس این مطالعه می‌توان گفت که گیاه میخک هندی به عنوان دارو برای درمان بیماری‌های باکتریایی ماهی می‌توان مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: باکتری *ویبریو هاروی*، میخک، اثرات ضدباکتریایی، حداقل غلظت بازدارندگی، روش میکرودایلوشن

مقدمه

ایران از نظر وجود گیاهان دارویی بسیار غنی است (Sonboli et al. 2006). گیاهان دارویی به عنوان یک جانشین سالم و بی خطر به جای داروهای صناعی[۱] معرفی شده‌اند. یکی از مشکلات استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها ایجاد سویه‌های مقاوم باکتریایی می‌باشد (Cowan 1999). اسانس‌ها موادی معطر با رایحه‌ی قوی و اجزای تشکیل دهنده‌ی آن‌ها مؤثرترین عوامل ضدمیکروبی هستند (Cowan 1999). اسانس‌ها از ساخت DNA، RNA، پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها در سلول‌های قارچی و باکتریایی جلوگیری می‌کنند (Kalemba and Kunicka 2003). یوگنول تقریبا ۸۵ درصد ترکیب اسانس میخک را تشکیل می‌دهد. این ترکیب، از تولید آمیلاز و پروتئاز در سلول باکتری جلوگیری و باعث تخریب دیواره‌ی سلولی می‌گردد (Alma et al. 2007). مؤثرترین ترکیب ضدمیکروبی نعناع، ترکیبی به نام کارون[۲] است که درصد بالایی از اسانس را شامل می‌شود (Feo et al. 1998).

[۱*] دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده‌ی منابع طبیعی، دانشگاه زابل E-mail: Asalnarouie@gmail.com (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] استادیار گروه شیلات، دانشکده‌ی منابع طبیعی، دانشگاه زابل

[۳] دانشیار گروه شیلات، دانشکده‌ی منابع طبیعی، دانشگاه زابل

[۴] مربی گروه شیلات، پژوهشکده‌ی تالاب بین‌المللی هامون، دانشگاه زابل

1- Synthetic
2- Carvon

www.SID.ir

Archive of SID

زیره دارای تانن[1]، اسانس[2] و کومین آلدهید[3] می‌باشد که داری خاصیت ضدباکتریایی است. (Demirci et al. 2008). باکتری‌های جنس ویبریو در خانواده‌ی ویبریوناسه[4] قرار دارند و بیش‌تر اعضای این خانواده فرصت طلب و بیماری‌زا هستند (Alsina and Blank 1994). *ویبریو هاروی* یک پاتوژن فرصت طلب می‌باشد که برای ماهی بیماری‌زا است (سلطانی ۱۳۸۰). *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، یک باکتری غیراسپورزا، دارای تاژک قطبی و متحرک است، که به طور طبیعی در آب‌های ساحلی و دریاها وجود دارد (Zhen-quan et al. 2008) دوز عفونی آن بیش از 10^6 سلول باکتری در هر گرم ماده‌ی غذایی، دوره‌ی کمون آن ۷۶-۳ ساعت و طول دوره‌ی بیماری در این باکتری بین ۸-۱ روز است. این باکتری به فراوانی از انواع مختلف فراورده‌های دریایی شامل ماهی کد، ساردین، صدف خوراکی، میگو، خرچنگ، لابستر، ماکرل و اختاپوس جداسازی شده است (Yi-cheng and Chengchu 2007). مصرف فراورده‌های دریایی خام و یا کم‌پخته به ویژه صدف‌های آلوده به *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، منجر به ایجاد گاستروآنتریت حاد با علایم اسهال، سردرد، استفراغ، تهوع، دل پیچه و تب مختصر می‌شود (Zhen-quan et al. 2008). *ویبریو دامسلا* یک پاتوژن فرصت طلب است که در شرایط استرس باعث ایجاد بیماری در ماهی و میگو می‌شود. این عامل بیماری برای اولین بار از دامسل فیش (*Chromis punctipinnis*) جداسازی و شناسایی شد (Love et al. 1981). همچنین باعث عفونت مهلک در انسان و آبزی می‌شود (Kothary and Kreger 1985). با عنایت به موارد اشاره شده در بالا، در این تحقیق از اسانس گیاهان برای درمان بیماری‌های آبزیان، با توجه به عدم ایجاد مقاومت دارویی در پاتوژن‌ها، استفاده شد.

مواد و روش کار

برای تهیه‌ی میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه، سویه‌های استاندارد *ویبریو هاروی* PTCC 1755 از مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ و باکتری ایران، سویه‌ی استاندارد *ویبریو پاراهمولیتیکوس* IBRC-M 10706 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و سویه‌ی *ویبریو دامسلا* با کد KF529965 از ماهی کفال خاکستری در سواحل چابهار جداسازی شد (Naseri et al. 2013).

اسانس‌های میخک هندی، نعناع و زیره‌ی سبز از شرکت کشت و صنعت گلکاران کاشان (باریج اسانس) با درصد خلوص ۱۰۰ درصد تهیه شدند.

جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی[5] (MIC) در پلیت ۹۶ گوده‌ای استریل و با روش براث میکرودایلوشن انجام شد (Fereidoni and Akhlaghi 2009). ابتدا از محیط کشت مولر هینتون براث (مرک آلمان) ۱۰۰ میکرولیتر در داخل ردیف اول تا آخرین غلظت مورد نظر گوده‌ها ریخته شد (در تمام محیط‌های کشت مورد استفاده در این تحقیق درصد نمک مورد نیاز هر باکتری افزوده گردید). سپس به اولین گوده‌ی هر ردیف ۱۰۰ میکرولیتر اسانس اضافه گردید (قبلاً غلظت‌های مورد نظر اسانس توسط حلال DMSO (Dimthylsulfoxide) ساخته شد). بعد از مخلوط نمودن محتویات گوده‌ی اول، ۱۰۰ میکرولیتر از آن برداشته و به گوده‌ی بعدی اضافه گردید. از گوده‌ی آخر ۱۰۰ میکرولیتر دور ریخته شد. برای هر ردیف آزمایش (مربوط به یک اسانس) یک ردیف کنترل در نظر گرفته شد. مراحل تهیه‌ی رقت از اسانس به همان روش ردیف آزمایش انجام شد. سپس به گوده‌های ردیف آزمایش ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون آماده‌ی باکتری مورد نظر (با تراکم $1/5\times10^6$ باکتری در میلی‌لیتر) اضافه گردید، ولی به ردیف کنترل باکتری اضافه نگردید.

1- Tannins
2- Essences
3- cumin aldehyde
4- *vibrionacea*
5- Minimum Inhibitory Concentration

www.SID.ir

Archive of SID

بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای مناسب برای هر باکتری نتایج توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر قرائت شد. وجود کدورت (در مقایسه با ردیف کنترل) حاکی از رشد باکتری و شفافیت، نشان دهنده‌ی عدم رشد باکتری می‌باشد (Vasudeva et al. 2004).

برای تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی[1] (MBC) از همه‌ی گودهایی فاقد کدورت در محیط کشت TSA کشت داده شد. محیط‌ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند. کم‌ترین غلظتی از اسانس که باعث کشته شدن حداقل ۹۹ درصد باکتری‌ها گردیده بود، به عنوان MBC گزارش گردید. آزمایش‌ها حداقل در سه تکرار جداگانه گزارش شد (درخشان و همکاران ۱۳۸۹، Marzouk et al. 2011).

برای تعیین قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری‌ها از روش انتشار در دیسک (Disk diffusion method) استفاده گردید و محیط کشت مولرهینتون آگار برای مرحله‌ی هاله‌گذاری تهیه شد و برای این مرحله تمامی سطح مولر هینتون آگار (MHA) موجود در هر کدام از پتری دیش‌ها را با سواپ استریل، آلوده به سوسپانسیون نیم مک فارلندی باکتری‌ها کرده؛ برای این کار کشت چمنی داده شد (Rankovic et al. 2010). دیسک‌های خالی استریل با قطر ۶ میلی‌متر روی سطح پلیت‌های تلقیح شده با باکتری‌ها قرار داده شد و میزان ۱۰ میکرولیتر از هر یک از اسانس‌ها روی دیسک‌ها تلقیح گردید و در دمای مناسب هر باکتری به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. قطر هاله‌های مهاری باکتری‌ها در اطراف دیسک‌ها به میلی‌متر اندازه‌گیری و یک دیسک تزریق شده با میزان ۱۰ میکرولیتر حلال DMSO (Dimthylsulfoxide) به عنوان دیسک شاهد در نظر گرفته شد (Rankovic et al. 2010, Bayoub et al. 2010).

به منظور مقایسه‌ی قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری در گروه‌های تحت بررسی از آنالیز واریانس یک طرفه استفاده گردید و مقایسه‌ی گروه‌ها به کمک آزمون دانکن انجام گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس‌ها روی باکتری‌های مورد بررسی در جدول ۱ آمده است. بر اساس این نتایج مشخص شد که میخک در غلظت‌های پایین قدرت مهار باکتری‌ها را داشته است و هاله‌ی تشکیل شده بزرگ‌تر بوده است. نعناع و زیره به طور میانگین قدرت متوسطی در مهار باکتری‌ها داشتند. مقاوم‌ترین و حساس‌ترین باکتری‌ها به ترتیب باکتری *ویبریو هاروی* و *ویبریو پاراهمولیتیکوس* بودند. بر اساس جدول ۱، کم‌ترین MIC مربوط به اسانس میخک با مقدار ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. بر اساس جدول ۲، با افزایش غلظت، اختلاف معنی‌داری بین قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری در سطح ($P<۰/۰۵$) دیده می‌شود به طوری که در غلظت‌های بالا قطر هاله‌ی تشکیل شده بیش‌تر است. همچنین بین اسانس‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) دیده می‌شود به طوری که اسانس میخک قدرت بیش‌تری نسبت به اسانس‌های نعناع و زیره داشت و باکتری‌ها نسبت به آن حساس‌تر بوده‌اند.

1- Minimum Bactericidal Concentration

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: فعالیت ضدباکتریایی (MIC و MBC بر حسب mg/ml) چهار اسانس گیاهی به روش میکرو دایلوشن

باکتری‌ها	*Vibrio parahaemolyticus*		*Vibrio harveyi*		*Vibrio damsela*	
اسانس‌های گیاهی (mg/ml)	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
میخک هندی	۴	۲	۸	۴	۸	۴
نعناع	۴	۲	۱۶	۸	۱۶	۸
زیره سبز	۸	۴	۱۶	۸	۴	۲

جدول ۲: آنالیز مربوط به اندازه‌گیری قطر هاله‌ی عدم رشد به روش آزمون دانکن

گیاه	غلظت	*Vibrio parahaemolyticus*	*Vibrio harveyi*	*Vibrio damsela*
میخک	۱۶	۱۰/۳۳ ±۰/۳۳^{Ba}	۸/۹۰ ±۰/۳۳^{Ca}	۱۱/۶۶ ±۰/۳۳^{Aa}
	۸	۸/۳۳ ±۰/ ۳۳ ^{Ab}	۵/۸۳ ±۰/۱۶^{Bc}	۵/۸۳ ±۰/۱۶^{Bc}
	۴	۵/۶۶ ±۰/۳۳^{Ac}	۲/۸۳ ±۰/۱۶^{Be}	۲/۸۳ ±۰/۱۶^{Bd}
	۲	۱/۳۳ ±۰/۶۶^{Ae}	۰/۰۰ ±۰/۰۰^{Bf}	۰/۰۰ ±۰/۰۰^{Bg}
زیره	۱۶	۱۰/۸۳ ±۰/۱۶^{Aa}	۶/۸۳ ±۰/۱۶^{Cb}	۸/۸۳ ±۰/۱۶^{Bb}
	۸	۵/۶۶ ±۰/۳۳^{Ac}	۴/۳۳ ±۰/۳۳^{Bd}	۲/۸۳ ±۰/۱۶^{Cd}
	۴	۲/۸۳ ±۰/۱۶^{Ad}	۰/۰۰ ±۰/۰۰^{Cf}	۱/۶۶ ±۰/۱۶^{Be}
	۲	۰/۰۰ ±۰/۰۰^{Bf}	۰/۰۰ ±۰/۰۰^{Bf}	۰/۶۶ ±۰/۳۳^{Af}
نعناع	۱۶	۷/۶۶ ±۰/۳۳^{Ab}	۵/۵۰ ±۰/۵۰^{Bc}	۵/۶۶ ±۰/۳۳^{Bc}
	۸	۳/۰۰ ±۰/۰۰^{Ad}	۲/۶۶ ±۰/۳۳^{Be}	۲/۸۳ ±۰/۱۶^{Bd}
	۴	۱/۳۳ ±۰/۱۶^{Ae}	۰/۰۰ ±۰/۰۰^{Bf}	۰/۰۰ ±۰/۰۰^{Bg}
	۲	۰/۳۳ ±۰/۱۶^{Af}	۰/۰۰ ±۰/۰۰^{Bf}	۰/۰۰ ±۰/۰۰^{Bg}

حروف بزرگ نشان دهنده‌ی اختلاف در ردیف و حروف کوچک نشان دهنده‌ی اختلاف در ستون هستند (mean ±S.E)

بحث

بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی، بیش‌تر مردمی که در کشورهای توسعه یافته زندگی می‌کنند کم و بیش برای درمان از گیاهان دارویی استفاده می‌کنند. اجزای اسانس‌ها خاصیت ضدباکتریایی مختلفی دارند. کارواکرول[1]، تیمول[2]، سایمن[3] و منتول[4]، گروه هیدروکسیل موجود در مولکول اجزای اسانس می‌باشند که نقش مهمی در بروز خاصیت ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی دارند (Celiktas et al. 2007). بر اساس آزمایش‌هایی که روی اسانس میخک هندی انجام شد MIC, MBC و هاله‌ی رشد این گیاه به ترتیب در محدوده‌ی ۴-۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۱۲-۲ میلی‌متر بود. در مطالعه‌ی Bayoub و همکارانش در سال ۲۰۱۰، MIC به دست آمده از عصاره‌ی الکلی میخک هندی علیه باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و قطر هاله‌ی عدم رشد ۱ ۲۵t میلی-متر به دست آمد. احتمالاً تأثیر عصاره‌ی الکلی در مهار رشد باکتری در مقابل تأثیر اسانس متفاوت بوده است.

1- Carvacrol
2- Tymol
3- Cumen
4- Menthol

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین در تحقیقاتشان مشخص شد قدرت اسانس در غلظت‌های بالا بیش‌تر بوده که در این مطالعه نیز این نکته به اثبات رسیده است. در مطالعه‌ای دیگر ثابت شد که اسانس گیاه نعناع فلفلی، زنیان، رازیانه و شوید بر باکتری‌های *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، *ویبریو هاروی* و *ویبریو دامسلا* دارای اثر مهارکنندگی می‌باشند و رشد باکتری را کاهش و در غلظت‌های بالا مهار می‌کنند (آماره ۱۳۹۳). در مطالعه‌ی Lee و همکاران در سال ۲۰۰۹ میزان MIC اسانس میخک هندی روی باکتری‌های جنس ویبریو جداسازی شده از گونه‌های مختلف میگو در محدوده‌ی ۰/۱۵ تا ۰/۳۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، که با نتایج این مطالعه اختلاف دارد. احتمالاً نوع متفاوت سویه‌ی باکتری و تفاوت در مقاومت آن باعث ایجاد اختلاف شده است (Tassou et al. 1995). در نتایج تحقیقات سنچولی و همکارانش در سال ۱۳۹۱ مشخص شد، اسانس‌های نعناع و میخک دارای اثر بازدارندگی بر باکتری‌های بیماری‌زای آبزیان از جمله *ویبریو آلجینولیتیکوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشرشیاکلی* هستند. در مطالعه‌ای دیگر قطر هاله‌ی عدم رشد گیاه میخک بر باکتری *سالمونلا تیفی* ۲۲ میلی‌متر و MBC به دست آمده ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که بیش‌ترین قدرت میخک را به دلیل وجود یوگنول تشخیص داده است (Joshi et al. 2011). درصد بالای فعالیت ضدمیکروبی اسانس میخک هندی مربوط به ترکیبات فنلی (فنیل پروپانوئیدها) مثل یوگنول می‌باشد. وجود این ترکیب از تولید آمیلاز و پروتئاز در سلول باکتری جلوگیری کرده و باعث تخریب دیواره‌ی سلولی و تجزیه‌ی سلول می‌گردد (Bayoub et al. 2010). میزان تانن در میخک (۱۹-۱۰ درصد) می‌باشد که فعالیت ضدباکتری نیز از این ترکیب گزارش شده است (Farag et al. 1989). اسانس میخک قدرت مهاری بالایی در کنترل فعالیت باکتری *v. parahaemolyticus* دارد (Ullah et al. 2011). مطالعاتی که روی گیاه نعناع انجام شد مشخص کرد که این گیاه قدرت ضدباکتریایی در مهار باکتری‌های مورد مطالعه داشته است. در مطالعه‌ی Sokovic و همکاران که در سال ۲۰۰۷ صورت گرفت مشخص شد که میزان MIC اسانس نعناع بر هر دو باکتری *اشرشیا کلی* و *لیستریا مونوسیتوژنز* ۲/۵ mg/ml و میزان MBC این اسانس بر باکتری‌های مذکور به ترتیب ۳ و ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمده است. تجزیه و تحلیل توسط GC/MS از عصاره‌ی نعناع نشان داد حضور اکسید piperitenone است که مونوترپن اکسیژن با عملکرد بیولوژیکی خود از فعالیت باکتری و قارچ جلوگیری می‌کند (Brada et al. 2007). بسیاری از خواص ضدمیکروبی اسانس‌ها مربوط به ترکیبات غیر-اشباع و آروماتیک گیاهان است (Cowan 1999). در مطالعه‌ی ایزدی و همکاران که در سال ۱۳۸۸ مشخص شد که نعناع نسبت به مریم‌گلی خاصیت ضدباکتریایی بیش‌تری داشته که این به دلیل وجود ترکیبات مونوترپنی موجود در ترکیبات شیمیایی این گیاه می‌باشد و اثر ضد میکروبی این گیاه به اثبات رسیده است (Lis-Balchin et al. 1998).

آزمایش‌هایی که روی گیاه زیره‌ی سبز انجام شده نشان دهنده‌ی قدرت ضدباکتریایی زیره در کنترل فعالیت باکتری‌های مورد مطالعه می‌باشد. Soniya و همکارانش اثرات ضدباکتریایی زیره‌ی سبز را روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت در سال ۲۰۱۳ مطالعه کردند، نتایج حاصل از اندازه‌گیری هاله‌ی عدم رشد ۳ تا ۲۰ میلی‌متر بود که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. بر اساس نتایج به دست آمده توسط Gachkar و همکاران در سال ۲۰۰۷ مشخص شد که MIC به دست آمده از اسانس زیره‌ی سبز علیه باکتری‌های *اشیرشیا کلی* و *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به تریتب ۱، ۲، ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و میزان MBC نیز ۱، ۴، ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می‌باشد. اسانس زیره‌ی سبز مؤثرتر از اسانس اکلیل کوهی است (Misaghi and Akhondzadeh Basti 2007). در مطالعه‌ی پژوهی و همکاران در سال ۱۳۸۹، میزان MIC دانه‌ی زیره‌ی سبز ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر باکتری *باسیلوس سرئوس* و ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

www.SID.ir

Archive of SID

بر باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* به دست آمد. احتمالاً ترکیب تشکیل‌دهنده‌ی اسانس یک گونه از گیاهان نسبت به همان گونه در شرایط منطقه‌ای مختلف ممکن است اختلاف داشته باشد و این اختلافات می‌تواند ناشی از تفاوت در فصل برداشت، زمان استخراج اسانس، مناطق مختلف جغرافیایی و حتی بخش‌های مختلف گیاه باشد (Burt 2004). بر اساس نتایج به دست آمده توسط Iacobellis و همکاران در سال ۲۰۰۵ ترکیبات زیره‌ی سبز cumin aldehyde(16.1%)، *p*-mentha-1,4-dien-7-al (27.4%) و *c*-terpinene (12.8%) و *a*-pinene (11.4%) می‌باشد. این ترکیبات عامل خاصیت ضد-باکتریایی گیاه زیره در مقابل باکتری‌های گرم منفی و مثبت می‌باشد. زیره نسبتاً فعالیت ضد باکتریایی خوبی دارد که این به دلیل وجود آلدهید می‌باشد (Lis-Balchin et al. 1998). فعالیت ضدمیکروبی اسانس زیره‌ی سبز بر پاتوژن‌های انتقال یابنده از طریق مواد غذایی از جمله *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشرشیاکلی* به خوبی نشان داده شده است (Gachkar et al. 2007). به عنوان نتیجه‌ی کلی، با توجه به اثرات ضدباکتریایی بالای اسانس میخک هندی و اثرات متوسط نعناع و زیره‌ی سبز در مورد باکتری‌های مورد مطالعه می‌توان با خالص‌سازی و مطالعه روی این اسانس‌ها از آن‌ها به عنوان جایگزین گیاهی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها (به ویژه آنتی‌بیوتیک‌هایی که باکتری‌ها نسبت به آن‌ها مقاومت یافته‌اند یا آنتی‌بیوتیک-های ممنوع در دامپزشکی) استفاده نمود. امکان استفاده از این اسانس‌ها به صورت خوراکی نیاز به تحقیق بیش‌تر در مورد اثرات ضدباکتریایی سیستمیک این عصاره‌ها در تجویز خوراکی دارد.

تشکر و قدردانی

از مسئولین آزمایشگاه‌های پژوهشکده‌ی تالاب هامون دانشگاه زابل که صمیمانه ما را در انجام این کار یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

آماره، مرضیه (۱۳۹۳). اثر ضد باکتریایی اسانس گیاه نعناع فلفلی، زنیان، رازیانه و شوید بر باکتری‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس، ویبریو هاروی و ویبریو دامسلا در محیط آزمایشگاهی، پایان نامه، دانشگاه زابل.

ایزدی، زهرا؛ احمدوند، گودرز؛ اثنی‌عشری، محمود؛ پیری، خسرو و داودی، پوراندخت (۱۳۸۸). فعالیت بیوشیمیایی و ضدمیکروبی روغن‌های اسانس مریم گلی و نعناع. مجله ارمغان دانش، دوره ۱۵، شماره ۱، شماره پی در پی ۵۷.

پژوهی، محمدرضا؛ تاجیک، حسین؛ آخوندزاده، افشین؛ گندمی، حسن؛ علی‌احسانی، علی و شکوهی‌ثابت-جلالی، فرنود (۱۳۸۹). ارزیابی ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضدمیکروبی اسانس پونه‌ی کوهی (*Mentha longifolia L.*) و دانه‌ی زیره‌ی سبزه (*Cuminum cyminum L.*) به تنهایی و توأم با نیسین. مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و یکم، شماره چهارم، صفحه ۳۳۱.

درخشان، صفورا؛ ستاری، مرتضی؛ بیگدلی، محسن و زارعی‌اسکی‌کند نسرین (۱۳۸۹). ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ی گیاهان آرتمیزیا و زیره‌ی علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* و *ویبریو کلرا*. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، سال پانزدهم ۱(۵۸): ۷-۱۴.

سلطانی، مهدی (۱۳۸۰). بیماری آزاد ماهیان. انتشارات دانشگاه تهران، صفحه ۹۸-۸۵.

www.SID.ir

Archive of SID

سنچولی، نرجس؛ غفاری، مصطفی و قرایی، احمد (۱۳۹۱). اثرات ضدباکتری اسانس چندگونه گیاهی بر باکتری‌های ویبریوآلجینولیتیکوس، لیستریا مونوسیتوژنز و اشرشیاکلی . پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، مجله علمی- پژوهشی، سال نهم، ۳: ۷۵۴-۷۴۹.

سنچولی، نرجس (۱۳۹۱) . اثرات ضدباکتریایی اسانس زیره‌ی سبز، میخک هندی، رزماری و نعناع بر باکتری‌های *ویبریو آلجینولیتیکوس، لیستریا مونوسیتوژنز و اشرشیاکلی* در محیط کشت، پایان نامه، دانشگاه زابل.

Alma, H.M.; Ertas, M.; Nitz, S. and Kollmannsberger, H. (2007). Chemical composition and content of essential oil from the bud cultivated Turkish clove (*Syzygium aromaticum L.*). Bio Resources, 2(22): 265-269.

Alsina, M. and Blanch, A.R. (1994). A set of keys for biochemical identification of environmental Vibrio species. Journal of Applied Bacteriology, 76: 79-85.

Bayoub, K.; Baibai1, T.; Mountassif, D.; Retmane, A. and Soukri1, A. (2010). Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. African Journal of Biotechnology. 9 (27), Pp: 4251-4258.

Brada, M.; Bezzina, M.; Marlier, M.; Carlier, A. and Lognay, G. (2007). Variability of the chemical composition of *Mentha rotundifolia* from Northern Algeria. Biotechnology, Agronomy, Societe et Environment, 11(1): 3-7.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. International Journal of Food Microbiology, 94(3): 223-253.

Celikats, O.Y.; Hames Kocabas, E.E.; Bedir, E.; Faziler, V.S.; Ozek, T.; Baser, K.H.C. et al. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis,* depending on location and seasonal variations. Food Chemistry. 100: 553-559.

Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology. Reviews, 12: 564-582.

Demirci, F.; Guven, K.; Demirci, B.; Dadandi, M.Y. and Baser, K.H.C. (2008). Antibacterial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens. Food Control, 19: 1159-1164.

Farag, R.S.; Daw, Z.Y. and Abo-Raya S.H. (1989). Infiuence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxin in a synthetic medium, Journal of food science, 54: 74-76.

Feo, V.D.; Ricciardi, A.I.; Biscardi, D. and Senatore, F. (1998). Chemical composition and antimicrobial screening of the essential oil of *Minthostachys verticillate* (Griseb) Ep1 (Lamiaceae). Journal of Essential oil Research, 10(1): 61-65.

Fereidoni, M.S. and Akhlaghi, M. (2009). resistance pattern of S*treptococcus iniae* to antibiotics in rainbow trout. 1st international congress on aquatic animal health management and disease, Tehran, abstract, Pp: 81.

Gachkar, L.; Yadegari, D.; Rezaei, M.B.; Taghizadeh, M.; Astaneh, S.A. and Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Food Chemistery; 102: 898-904.

Iacobellis, N.S.; Cantore, F.L.; Capasso, F. and Senatore, F. (2005). Antibacterial activity of Cuminum cyminum, L. and Carum carvi L. essential oils. Journal of Agricullural and Food Chemistry, 53: 57-61.

Joshi, B.; Prasad Sah, G.P.; Basnet, B. B.; Bhatt, M.R.; Sharma, D.; Subedi, K. et al. (2011). Phytochemical extraction and antimicrobial properties of different medicinal plants: Ocimum sanctum (Tulsi), Eugenia caryophyllata (Clove), Achyranthes bidentata (Datiwan) and Azadirachta indica (Neem). Journal of Microbiology and Antimicrobials . 3(1): 1-7.

Kalemba, D. and Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry, 10: 813-829.

Kothary, M.H. and Kreger, A.S. (1985). Purification and characterization of an extracellular cytolysin produced by *Vibrio damsela*. Infection and Immunity, 49: 25-31.

Lee, S.; Najiah, M.; Wendy, W. and 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 Frontiers of Agriculture China, 3(3): 332-336.

www.SID.ir

Archive of SID

Lis-Balchin, M.; Deans, S.G. and Eaglesham, E. (1998). Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. Flavour and Fragrance Journal; 13: 98-104.

Love, M.; Fisher, D.T.; Hose, J.E.; Farmer, J.J.; Hickman, F.W. and Fanning, G.R. et al. (1981). *Vibrio damsela*, as a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*. Science, 214: 1139–1140.

Marzouk, B.; Marzouk, Z.; Mastouri1, M.; Fenina, N. and Aouni, M. (2011). Comparative evaluation of the antimicrobial activity of *Citrullus colocynthis* immature fruit and seed organic extracts. African Journal of Biotechnology, 10(10): 2130-2134.

Misaghi, A.; Akhondzadeh Basti, A. (2007). Effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and *nisin on Bacillus cereus* ATCC 11778. Food Control; 8(9): 1043-1049.

Naseri, F.; Heidarzadeh, M. and Zahedi, R. (2013). BCT 09-SEP.

Rankovic, B.; Rankovic, D.; Maric, D. (2010). Antioxidant and antimicrobial activity of some lichen species. Microbiology; 79(6): 809-815.

Sokovic, M.; Marin, P.D.; Brkic, D. and van Griensven, J.L.D. (2007). Chemical Composition and Antibacterial Activity of EssentialOils of Ten Aromatic Plants against Human Pathogenic Bacteria. Food © Global Science Books, 1: 1-7.

Sonboli, A.; Babakhani, B. and Mehrabian, A.R. (2006). Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from Salvia. Zeitschrift für Naturforschung C, 61: 160-164.

Soniya, M.; Kuberan, T.; Anitha, S. and Sankareswari, P. (2013). *In vitro* antibacterial activity of plant extracts against Gram positive and Gram negative pathogenic bacteria. International Journal of Microbiology and Immunology Research, 2(1): 001-005.

Su, Y.C.; Liu, C. (2007). *Vibrio parahaemolyticus*, A concern of sea food safety. Food Microbiology, 24: 549-558.

Tassou, C.C.; Drosinos, E.H, and Nychas, G.J. (1995). Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 degrees and 10 *degrees* C. Journal of Applied Microbiology, 78(6):593-600.

Ullah, N.; Khurram, M.; Usman Amin, M.; Afridi, H.H.; Ali Khan, F.; Umar Khayam, et al. (2011). Comparison of Phytochemical constituents and antimicrobial activities of *Mentha spicata* from four northern districts of Khyber pakhtunkhwa. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 1 (7): 72-76.

Vasudeva, Y.; Romesh, M.; Singh, A. and Chakrabarti, R. (2004). Potentiation of antibody production in Indian major carp *Labeo rohita*, rohu, by *Achyranthes aspera* as a herbal feed ingredient. Aquaculture, 238, 67-73.

Yang, Z.Q.; Jiao, X.A.; Zhou, X.H.; Cao, G.X.; Fang, W.M.; Gu, R.X. (2008). Isolation and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from fresh, low temperature preserved, dried and salted seafood products in two coastal areas of eastern China. International Journal of Food Microbiology, 125: 279-285.

www.SID.ir

Archive of SID

Vol. 12, No. 3, Autumn, 2016

In vitro antibacterial effects of several plant essential oils on *Vibrio parahaemolyticus* , *Vibrio harveyi* and *Vibrio damsela*

Narouie, A.[1]; Mirdar, J.[2]; Gharaie, A.[3] and Sanchooli, N.[4]

Received: 02.05.2015 Accepted: 16.01.2016

Abstract

For the charges effect of chemical drugs and limitation in their use, disposition use of medicinal plants has increased. In this study essentialoil of three medicinal plants *Mentha spicata*, *Eugenia caryophyllata* and *Cuminum cyminum* were subjected to in vitro antibacterial assay against fish pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* , *Vibrio harveyi* and *Vibrio damsel*. Disc diffusion method was used to test antibacterial activity. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined by using standard procedure Broth- microdilution. Among three plants tested, *E.caryophyllata* (clove) was found to be the most effective. All the plants were effective against all the tasted organisms. The largest zone of inhibition (12 mm) was obtained with *E.caryophyllata* against *V. damsel* and minimum bactericidal concentration (MBC) value of 4 mg/ml was obtained with *M. spicata* and *E.caryophyllata* against *V. parahaemolyticus* , and *V.harveyi* were found to be resistant with all the plant essential oils. On the basis of this investigation, we can say, *E. caryophyllata* could be used as a source of new antibacterial agent for developing drugs to inhibit some fish pathogenic bacteria.

Key words: *Vibrio harveyi*, *Eugenia caryophyllata*, Antibacterial, Minimum Inhibitory Concentration, Broth microdilution

1- MSc Graduated of Aquaculture Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran
2- Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran
3- Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol Iran
4- Instractor, Faculty Member of Hamon, Wetlands International Department of Fisheries University of Zabol, Zabol, Iran
Corresponding Author: Narouie, A., E-mail: Asalnarouie@gmail.com

www.SID.ir