

بررسی مقایسه اثرات ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی گیاهان بومادران، اسطوخودوس و آویشن شیرازی علیه باکتری *اُتروموناس هیدروفیلا* در ماهی قزل آلا رنگین کمان

سیده ام البنین قاسمیان^{*1}

1. گروه دامپزشکی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران

* مسئول مکاتبات: Ommolbanin.Ghasemian@iau.ac.ir

چکیده

بررسی و مقایسه اثرات آنتی‌باکتریال و هم‌افزایی برخی گیاهان دارویی علیه باکتری *اُتروموناس هیدروفیلا* و اینکه استفاده از این گیاهان دارویی می‌تواند به کاهش روند استفاده از داروهای شیمیایی و سنتزی که جهت مهار رشد عوامل پاتوژن در مواد غذایی به کار می‌روند، کمک نماید. نمونه‌های کلینیکی قزل‌آلای رنگین‌کمان دارای علائم مشکوک به *اُتروموناس هیدروفیلا* با انجام آزمون PCR به تایید رسید. سپس عصاره‌گیری به روش ماسراسیون انجام شد و میزان حساسیت باکتری‌های جدا شده به روش انتشار از دیسک در محیط کشت مولر هیتون بررسی شد. همچنین حداقل غلظت مهاری گیاهان دارویی و آنتی‌بیوتیک‌هایی که نسبت به آن‌ها مقاومت مشاهده شد و اثرات سینرژیک داروهای مختلف با آنتی‌بیوتیک‌های رایج و مهار تشکیل بیوفیلم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان شیوع این باکتری 5 درصد است. در بررسی مقاومت چندگانه همه آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاومت چندگانه باکتریایی داشتند. در ادامه کمترین غلظت مهاری مربوط به گیاه بومادران بود. در بررسی کمترین غلظت مهاری، کمترین غلظت کشندگی مربوط به گیاه بومادران بوده است که نشان از اثرات آنتی‌باکتریال قوی‌تر این گیاه نسبت به دو گیاه دیگر دارد. بیشترین غلظت کشندگی مربوط به گیاه اسطوخودوس است به طوری که این اختلاف نسبت به دیگر گیاهان دارویی معنی دار ($p > 0/05$) بوده است. به عنوان یک نتیجه کلی می‌توان این گونه بیان کرد که انتخاب نادرست و سوء استفاده از عوامل ضد میکروبی می‌تواند سبب بروز مقاومت نسبت به باکتری‌های مختلف گردد.

واژگان کلیدی: بومادران، آویشن شیرازی، اسطوخودوس، *اُتروموناس هیدروفیلا*، عصاره هیدروالکلی.

مقدمه

مصرف بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند بتالاکتاماز، آمینوگلیکوزیدها، سولفونامیدها و تتراسایکلین‌ها در انسان و سایر جانداران موجب شکل‌گیری و پیشرفت مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌ها شده است. این فرایند از طریق کسب به ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها رخ می‌دهد (Herrera et al., 2006). نتایج حاصل از تحقیقات مشخص نموده است که حیوانات مختلف مخازن بالقوه باکتری‌هایی هستند که ممکن است واجد ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها باشند (Zong et al., 2002). ژن‌هایی که دارای خاصیت ضد میکروبی، علیه عوامل ضد میکروبی بسیاری رمزگذاری می‌گردند (Igbinsosa et al., 2012). در حال حاضر گزارشات متعددی مبنی بر وجود مقاومت چندگانه دارویی در بسیاری از گونه‌های باکتریایی وجود دارد. اخیراً موارد مقاومت نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف همچون سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفتازیدیم و سفتی‌زوکسیم که غالباً از گروه بتالاکتامازها هستند، در حال افزایش است (Janda and Abbott, 2010). از زمان پیدایش آنتی‌بیوتیک‌های مختلف شاهد روند ایجاد مقاومت در باکتری‌های بیماری‌زا نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها بوده‌ایم، از این جهت همه روزه شانس درمان بیماری‌ها با داروهای فعلی در حال کاهش است.

از قرن‌ها پیش استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان بیماری‌های مختلف در جوامع بشری رواج داشته است. به دنبال شکل‌گیری مقاومت دارویی علیه آنتی‌بیوتیک‌های رایج و وجود مشکلات معمول در ساخت داروهای نوین و همچنین عوارض دارویی پایین گیاهان دارویی، استفاده از درمان‌های طبیعی طی سال‌های گذشته روند افزایشی داشته است. در حال حاضر چنین برآورده می‌شود که 80 درصد از جمعیت



جهان در راستای بهبود سلامت خود از گیاهان دارویی منطقه جغرافیایی خویش بهره می‌گیرند (Kaskhedikar and Chhabra, 2010).

باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* به عنوان یک ارگانیسم فرصت‌طلب در گونه‌های متعددی از ماهیان آب شیرین و لب‌شور به ویژه ماهی کپور و قزل آلا سبب بیماری‌زایی می‌گردد. از یک سو افزایش پرورش ماهی به شکل متراکم سبب بالا رفتن میزان شیوع عفونت ناشی از این باکتری و سایر عفونت‌ها و بیماری‌ها گردیده است و از سوی دیگر عوارض ناشی از ابتلا به عفونت ناشی از این باکتری، طیف وسیعی از تظاهرات بالینی از زخم‌های پوستی تا عفونت‌های سیستمیکی که با تلفات بالایی همراه است، را شامل می‌شود (پیغان و محمدیان، 1393). نتایج حاصل از مطالعات اخیر نشان می‌دهد که باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* که یک باکتری فرصت‌طلب بیماری‌زا برای انسان و آبزیان است، می‌تواند در مواد غذایی با منشأ آب همچون ماهی، صدف، میگو و ... مسمومیت ایجاد نماید. این باکتری یک کوکوباسیل گرم منفی و متحرک هوازی و بی‌هوازی اختیاری می‌باشد که در محیط‌های آبی و دستگاه گوارش ماهیان سالم یافت می‌شود (جمشیدیان، 1372). بررسی متون علمی نشان داده که *آئروموناس*‌ها به عنوان پاتوژن‌های ماهی‌ها بوده و تشخیص پاتوژن اولیه از فرصت‌طلب یا آلاینده اغلب دشوار است. زمانی که ماهی تحت تنش و استرس قرار می‌گیرد، می‌تواند از علل مهم مرگ و میر ماهی‌ها بوده و سبب سپتی سمی همراه با خونریزی‌های جلدی و شکمی، تورم روده و در نهایت سبب مرگ شود. این باکتری از منابع متعددی همچون گوشت، آب، شیر خام و سبزیجات جدا شده است و به علت توانایی بالایی که تعدادی از سویه‌های آن در رشد در دماهای بسیار پایین دارند، تعداد این ارگانیسم در شرایط سرد افزایش پیدا می‌کند. به شکلی که این باکتری‌ها قادر هستند قسمت مهمی از فلور میکروبی که سبب فاسد شدن گوشت می‌گردد را تشکیل دهند. اما لازم به ذکر است که باکتری مذکور در طی فرایند پخت حتی در دمای پایین و حرارت ملایم نیز از بین می‌روند. لذا آلودگی ناشی از آن به وسیله محصولات خام و یا آب آلوده به مواد غذایی وارد می‌گردند. اما اصلی‌ترین منبع این باکتری محیط‌های آبی همچون دریاچه‌های آب شیرین، چشمه‌ها و سیستم فاضلاب است. تعداد *آئروموناس هیدروفیلا*هایی که در منابع مذکور وجود دارند به عواملی همانند مقدار مواد مغذی و دما وابسته است (حبیبی و راعی، 1391؛ ستاری، 1387).

بومادران یکی از گیاهانی است که از دیرباز به عنوان داروی گیاهی مورد استفاده قرار می‌گرفته است. این گیاه خودرو بوده و در دشت‌ها، مراتع، اطراف جاده‌ها، دامنه کوه و مناطق مرتفع کوهستانی نواحی مختلفی از دنیا شامل کشورهای اروپا و ایران رشد می‌کند (Coenye and Vandamme, 2003; Zhao and Hu, 2010). عصاره بدست آمده از این گیاه دارویی واجد خواص ضدباکتریایی و ضد التهابی و ضد تورم می‌باشد که در تهیه لوازم آرایشی و بهداشتی و دارویی از جمله کرم و پمادهای پوستی کاربرد دارد (Paulsen, 2002). در طب سنتی بومادران جهت درمان بیماری‌هایی مثل اختلالات معده و روده، اسپاسم، التهابات پوستی و اختلالات کبدی و صفراوی کاربرد دارد (Benedek and Kopp, 2016; شمس‌اردکانی و همکاران، 1384). در طب نوین از این گیاه دارویی به صورت خوراکی به منظور درمان بیماری‌هایی مثل التهاب، اسپاسم، فشار خون، تب کارایی دارد. این گیاه همچنین به عنوان یک ترکیب با اثرات ضد عفونی‌کنندگی برای دستگاه ادراری کاربرد دارد. به علاوه از آن به صورت موضعی جهت برطرف نمودن شوره سر و مرطوب نمودن پوست سر استفاده می‌شود (Andersen, 2001). عصاره‌ای که از بومادران بدست می‌آید برای درمان طیف گسترده‌ای از عفونت‌های ناشی از پاتوژن‌های انسانی و حیوانی کاربرد دارد (Raut and Karuppaiyil, 2014). عصاره بومادران موجب بهبود واکنش‌های اضطرابی می‌شود. در مطالعه‌ای که به وسیله توزیو و همکاران در سال 1994 انجام شد، مشخص گردید که برخی از ترکیبات طبیعی که در عصاره بومادران وجود دارند دارای مثبتی بر سلول‌های سرطانی هستند. آن‌ها همچنین اعلام کردند که این گیاه واجد خواص آنتی باکتریال و ضد التهابی می‌باشد (Asgary et al., 2000). در مطالعات دیگر مشخص شده است که ترکیبات حاصل از این گیاه دارای عملکرد ضد دیابتی هستند. علاوه بر موارد ذکر شده تایید شده است که بومادران یک گیاه دارویی با اثرات ضد تشنج، ترمیم‌کننده زخم و جراحات و نیروبخش است. جوشانده حاصل از شاخه‌های گلدار بومادران در رفع گاستریت حاد و مزمن، رفع نفخ و تسکین دردهای معده کارآیی بسیار بالایی دارد (Javidnia et al., 2004).

اسطوخودوس یا لاوندر با نام علمی *لاوندولا آگوستفولیا* غالباً به منظور برطرف نمودن اضطراب و بی‌خوابی، افسردگی، زوال عقل، درد پس از جراحی و موارد متعدد دیگری کاربرد دارد. امروزه گل و عصاره این گیاه جهت تهیه دارو به کار می‌رود. یکی از ترکیباتی که به طور

معمول در گیاههای دارویی از جمله اسطوخودوس یافت می‌شوند فلاونوئیدها هستند که ترکیباتی تاثیرگذار برای سلول‌های بدن مهره‌داران هستند. طبق مطالعات صورت گرفته بر روی تاثیرات فلاونوئیدها مشخص گردیده است که فلاونوئیدها اثرات دارویی متعددی همچون جلوگیری از اکسیداسیون لیپوپروتئین‌های با وزن مولکولی کم، ممانعت از تجمع پلاکت‌ها و پایداری سلول‌های ایمنی هستند، از این رو در برطرف نمودن مشکلات روحی، عفونت‌های ناشی از ویروس‌ها و باکتری‌ها، التهاب و آلرژی کارایی مناسبی دارند (Saeidnia *et al.*, 2011; Asgary *et al.*, 2000; Andersen, 2001).

آویشن از دسته گیاهان علفی است و شاخه‌های متعدد و چوبی دارد که ارتفاع آن تا سی سانتی‌متر می‌رسد. گیاه آویشن به شکل محدود و برای مصارف دارویی در برخی مناطق ایران کشت می‌گردد. این گیاه در کشور ما با تک گونه آویشن شیرازی با نام علمی زاتاریا مولتی فلورا شناخته می‌گردد. آویشن در نواحی جنوبی ایران رویش دارد که جدای از مصارف خوراکی به عنوان چاشنی در بهبود بیماری‌های گوارشی و جراحات موضعی تاثیر گذار است. از این رو به علت تاثیرات ضدگرفتگی و خلط آور در اختلالات تنفسی و سرماخوردگی کاربرد دارد (Raut and Karuppayil, 2014). نتایج مطالعات نشان می‌دهد که گیاه آویشن یک ضد قارچ ضد درد و التهاب، برطرف کننده افت‌های دهانی، اثرات آنتی اکسیدانی و موثر بر مشکلات گوارش و قلبی است. به علاوه مشخص شده است که آویشن تاثیرات آنتی باکتریال، ضد ویروسی و ضد انگلی می‌باشد (Yuan *et al.*, 2007). این گیاه دارویی برای درمان تشنج، تبخال، بیماری‌های کبدی و مشکلات مغزی کاربرد دارد. دمنوش آویشن برای درمان سرفه‌های سخت و برونشیت بسیار سودمند است. حمام کردن با جوشانده این گیاه جهت بهبود دردهای ناشی از رماتیسم بسیار پرکاربرد است و به رفع لاغری موضعی کمک می‌نماید. استفاده از این گیاه فواید متعددی دارد و برای بهبود عملکرد معده و تقویت قوه بینایی موثر است. آویشن بسیار مقوی بوده و خستگی را از بین می‌برد. در صورتی که پس از وعده‌های غذایی استفاده شود، اشتها را تقویت نموده و نفاخت را برطرف می‌نماید. در صورتی که پیش از خواب مصرف گردد برطرف کننده بی‌خوابی است. استفاده بیش از حد این گیاه سبب آسیب کلیوی و ایجاد آلومین، سرگیجه و ضعیف شدن قلب می‌گردد. در خانم‌های باردار مصرف بیش از حد این گیاه سبب سقط جنین می‌گردد (Kalemba and Kunicka, 2003; Rao *et al.*, 2010).

مواد و روش‌ها

جهت به دست آوردن عصاره از گیاهان بومادران، اسطوخودوس و آویشن از روش ماسراسیون استفاده شد (Anthonin *et al.*, 2021). در این روش در گام اول گیاهان مورد نظر از منبع مطمئن تهیه شد و بعد از تایید اصالت و کیفیت گیاهان، گیاه توسط آسیاب برقی پودر شد و پس از آن میزان کافی آب به پودر به دست آمده اضافه شد و در ظرف دیگری اتانول 70 درصد تهیه و با نسبت 1 به 4 به محلول بالا اضافه گردید و برای مدت زمان 3 روز در همین مرحله نگهداری شد. پس از این مدت زمان توسط دستگاه روتاری از محلول حاصله عصاره گیری صورت گرفت و عصاره به دست آمده از طریق گرمخانه گذاری خشک و تراشیده شد. در مرحله آخر میزان مناسبی از عصاره در محلول نرمال سالین حل شد تا غلظت 1000 میلی گرم بر میلی لیتر به دست آید.

بعد از شناسایی باکتری *اثرموناس هیدروفیلا* از نمونه‌های اخذ شده از ماهی با روش‌های بیوشیمیایی و PCR، تعداد چهار الی پنج کلنی از باکتری به محیط TSB که به آن مقدار 20 درصد گلیسرول افزوده شده است، انتقال داده و در این محیط تلقیح شد. در مرحله بعد میکروتیوپ‌های حاوی موارد مذکور را برای مدت زمان 2 ساعت در دمای 24 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. کدر شدن محیط کشت نشانگر رشد باکتری می‌باشد. قبل از قرار دادن نمونه در دمای 70- درجه سانتی‌گراد، به منظور ممانعت از شوک سرمایی میکروتیوپ‌ها را برای مدت زمان یک الی چهار ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در طول دوره نگهداری نمونه‌ها در فریزر 70- درجه سانتی-گراد، تعدادی از نمونه‌ها به صورت تصادفی و در بازه‌های زمانی مشخصی از فریزر خارج و بعد از دفریز شدن دوباره کشت داده شدند، تا مطمئن شویم، طی دوره نگهداری باکتری در این دما، قدرت رشد کم نشده باشد.

طبق پروتکل شرکت سازنده محیط کشت مولر هینتون ساخته شد. پس از آن جهت تهیه تلقیح از تعلیق به دست آمده از باکتری در محلول نرمال سالین با کدورت و چگالی نیم مک فارلند ایجاد گردید. در همین راستا از کلنی‌های کشت تازه روی محیط TSA استفاده شد. برای



تهیه این کدورت از باکتری از پرگنه‌هایی که از نظر ظاهری مشابه یکدیگر هستند استفاده کرده و کلنی‌ها را در محلول نرمال سالین حل کرده و تا تهیه کدورت نیم مک فارلند به حل کردن باکتری ادامه دادیم. بررسی میزان کدورت محلول به شکل چشمی و از طریق مقایسه کدورت تعلیق باکتری مورد نظر و محلول استاندارد تهیه شده با کدورت نیم مک فارلند روی یک صفحه سفید با خطوط سیاه صورت گرفت. در گام بعدی پس تهیه محلول با کدورت نیم مک فارلند، محلول استاندارد در لوله‌هایی با اندازه برابر با لوله‌های حاوی تعلیق باکتری تقسیم نمودیم. به منظور بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن قبل از کشت دادن باکتری روی محیط، پلیت‌های محیط مولر هیتون در دمای اتاق قرار داده شد. به منظور کشت باکتری، به وسیله یک سوآپ استریل از سوسپانسیون به دست آمده از باکتری باکتری روی محیط مولر هیتون کشت می‌دهیم به طوری که سوآپ در 3 جهت مختلف بر تمام سطح پلیت کشیده شد. پس از کشت باکتری روی محیط، دیسک‌ها را ظرف مدت پانزده دقیقه پس از تلقیح روی محیط پلیت قرار داد. در صورتی که محیط تلقیح شده حاوی دیسک آنتی‌بیوتیکی مدت زمانی بیش از پانزده دقیقه در دمای اتاق قرار گیرند، احتمال دارد باکتری روی محیط شروع به رشد کند و این امر سبب کم شدن سایز ناحیه مهاری شود. همانند محیط کشت لازم است که دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی قبل از قرارگرفتن روی محیط تلقیح شده به دمای اتاق برسند و پس از آن دیسک‌ها را روی سطح پلیت قرار دهیم. در این مطالعه آنتی‌بیوتیک‌های فلورفینیکل، انروفلوکساسین، تتراسایکلین و تریمتوپریم‌سولفامتوکسازول به‌عنوان آنتی‌بیوتیک‌های معمول در صنعت آبزیان و تأثیرگذار بر باکتری‌های گرم منفی جهت ارزیابی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی مورد سنجش قرار گرفت. بعد از قرار دادن دیسک‌ها بر سطح محیط، پلیت را برای مدت زمان 24 ساعت در دمای 24 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. گرمخانه گذاری برای مدت زمانی بیشتر از زمان توصیه شده منجر به رشد در ناحیه مهاری و گزارش همراه با خطای ایزوله به عنوان مقاوم می‌شود. تلقیح صحیح باید یک رشد پیوسته، سراسری و یکدست ایجاد کند. برای اندازه‌گیری ناحیه مهاری لبه ناحیه در نقطه مهار کامل و توسط چشم غیر مسلح و در فاصله 30 سانتی‌متر از چشم خوانده می‌شود. پلیت را با زاویه 45 درجه نگه داشته و اندازه ناحیه مهاری از نزدیک‌ترین ناحیه با یک خط کش یا یک کالی‌پر اندازه‌گیری گردید (Ferraro, 2000).

در روش میکروداپلوشن از لوله‌های با حجم کم همچون پلیت‌های 96 خانه استفاده می‌شود (Lorian, 2005). در این روش از کشت تازه باکتری‌های *اثرموناس هیدروفیلیا* جدا شده در محیط TSB کدورتی برابر با نیم مک فارلند تهیه و چندین بار رقیق شد، تا کدورتی معادل 10^7 CFU/ml حاصل شود. عصاره به دست آمده از گیاهان مورد بررسی توسط فیلتر سرسرنگی با قطر منفذ ۰/۴۵ استریل گردید. از عصاره‌های مذکور رقت‌های سریالی یک دوم ($1/4, 1/2, \dots$) در محیط TSB ایجاد شد. به پلیت ۹۶ خانه حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری اضافه شد. همچنین چاهک‌هایی حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط براث به عنوان کنترل منفی و چاهک‌هایی حاوی ۱۹۰ میکرولیتر از محیط کشت و ۱۰ میکرولیتر از باکتری به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. چاهک‌هایی نیز به عنوان شاهد کدورت حاوی ۱۰۰ میکرو لیتر محیط و ۱۰۰ میکرو لیتر از هر رقت در نظر گرفته شد. برای هر نمونه سه بار تکرار در نظر گرفته شد. سپس لوله‌ها برای مدت زمان ۱۸ الی ۲۰ ساعت در دمای 24 درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. در لوله کنترل مثبت حتماً باید رشد مشاهده شود. به علاوه در لوله‌هایی که غلظت ترکیبات ضد میکروبی عصاره برای مهار شد باکتری به مقدار کافی وجود نداشته است نیز شاهد رشد باکتری خواهیم بود. به منظور گزارش حداقل غلظت مهاری، اولین گوده‌ای که در مقایسه با گوده حاوی کنترل منفی در آن کدورت مشاهده نشود، به عنوان حداقل غلظت مهاری گزارش می‌گردد.

حداقل غلظت کشندگی عصاره حاصل از سه گیاه بومادران، آویشن شیرازی و اسطوخودوس بر مبنای نتایج به دست آمده در روش MIC مشخص گردید. در همین راستا پنج میکرولیتر از چاهک‌هایی که رشد باکتری در آن‌ها کاملاً مهار شده بود به پلیت‌های حاوی محط کشت مولر هیتون اگر تلقیح شد. این پلیت‌ها برای مدت زمان 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در تعیین حداقل غلظت کشندگی گوده‌ای که منجر به مرگ 99/9 درصد باکتری‌های تلقیح شده گردد را به عنوان MBC یا حداقل غلظت کشندگی در نظر می‌گیرند.

اثرات آنتی‌باکتریال عصاره حاصل از سه گیاه دارویی بومادران، اسطوخودوس و آویشن شیرازی با آنتی‌بیوتیک فلورفینیکل علیه باکتری‌های *اثرموناس هیدروفیلیا* جداسازی شده در سه تکرار بررسی شده است. جهت ارزیابی اثرات هم افزایی عصاره‌های مذکور، از روش صفحه



شطرنجی بهره می‌گیریم (Doern, 2014). در این روش اثرات آنتی‌باکتریال ترکیب داروهای مختلف با آنتی‌بیوتیک‌های رایج در سه تکرار بررسی می‌شود. غلظت‌های موردنظر شامل 3 غلظت کمتر از MIC، مساوی با آن و 3 غلظت بیشتر از آن در نظر گرفته می‌شوند. در روش صفحه شطرنجی، در چاهک‌های ستون اول پلیت 96 خانه ته صاف غلظت مشخص آنتی‌بیوتیک ریخته شده و در راستای محور افقی رقت‌های سریالی تهیه می‌شود. غلظت مشخص از گیاه دارویی نیز در اولین ردیف از پلیت ریخته شده و در راستای محور عمودی رقت سازی می‌شود. اثر هم افزایی با محاسبه اندیس کمترین غلظت کسری مهاری (FIC) تعیین می‌گردد (Leber, 2020). نتایج به این روش محاسبه می‌گردند: کمترین غلظت کسری مهاری برای داروی اول مساوی است با کمترین غلظت مهاری داروی اول در ترکیب تقسیم بر کمترین غلظت مهاری داروی اول به تنهایی. کمترین غلظت کسری مهاری برای داروی دوم مساوی است با کمترین غلظت مهاری داروی دوم در ترکیب تقسیم بر کمترین غلظت مهاری داروی اول به تنهایی. اندیس کمترین غلظت کسری مهاری مساوی است با جمع کمترین غلظت کسری مهاری داروی اول + کمترین غلظت کسری مهاری داروی دوم. در صورتی که این مقدار کمتر از 0/5 باشد شاهد اثر هم افزایی بوده و در صورتی که این مقدار بیشتر از 4 باشد شاهد اثرات آنتاگونیسم هستیم.

نتایج

در 3 مزرعه از 60 مزرعه موردبررسی باکتری *اثرموناس هیدروفیلا* به روش‌های میکروبیولوژی ردیابی شده و مورد تأیید PCR قرار گرفته است. از کل نمونه‌ها 3 نمونه تشخیص قطعی *اثرموناس هیدروفیلا* داده شد. آنتی‌بیوتیک‌های فلورفنیکل، انروفلوکساسین، تتراسایکلین و تریمتوپریم سولفامتوکسازول به‌عنوان آنتی‌بیوتیک‌های معمول در صنعت آبریان و تأثیرگذار بر باکتری‌های گرم منفی موردسنجش قرار گرفته و نتایج مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها در سه دسته حساس، متوسط و مقاوم دسته‌بندی و در جدول 1 ارائه شده است.

جدول 1: وضعیت مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد سنجش.

نام آنتی‌بیوتیک	حساس	مقاومت نسبی	مقاوم
فلورفنیکل	2	1	0
انروفلوکساسین	1	1	1
تتراسایکلین	0	2	1
تریمتوپریم + سولفامتوکسازول	0	0	3

در این جدول تعداد باکتری‌های حساس، مقاومت و با مقاومت نسبی به آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده ارائه شده است. تعداد کل باکتری‌های جداسازی شده 3 عدد است.

اندیس مقاومت چندگانه به نسبت آنتی‌بیوتیک‌های مقاوم به تعداد کل آنتی‌بیوتیک‌ها گفته شده و متوسط آن برای باکتری‌های جدا شده محاسبه شده است. لازم به ذکر است باکتری‌هایی که در آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی در دسته متوسط قرار می‌گیرند، در اندیس مقاومت چندگانه به‌عنوان مقاوم محسوب شده‌اند. مقادیر بالاتر از 0/2 نشانه‌ای از وجود مقاومت چندگانه باکتریایی تلقی می‌شود. جدول 2 اندیس مقاومت چندگانه را نشان می‌دهد.

جدول 2: اندیس مقاومت چندگانه در آنتی‌بیوتیک‌های مورد سنجش علیه باکتری *اثرموناس هیدروفیلا*.

نام آنتی‌بیوتیک	تعداد باکتری‌های مقاوم	تعداد کل باکتری‌ها	اندیس مقاومت چندگانه
انروفلوکساسین	2	3	0/66
فلورفنیکل	1	3	0/33
تتراسایکلین	3	3	1
تریمتوپریم + سولفامتوکسازول	3	3	1

مقادیر بالاتر از 0/2 نشانه‌ای از وجود مقاومت چندگانه باکتریایی است.



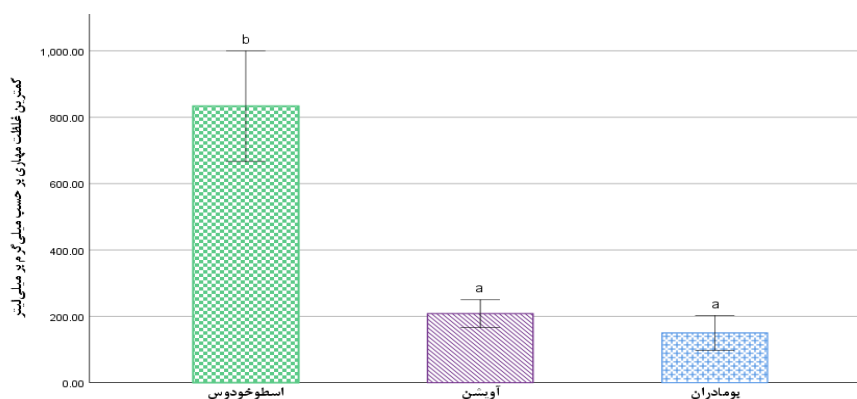
اثر ضد باکتریایی عصاره گیاهان دارویی اسطوخودوس، بومادران و آویشن با استفاده از روش میکرودايلوشن براث و محاسبه کمترین غلظت مهاری (میلی گرم در میلی لیتر) در باکتری‌های *اثرموناس هیدروفیلا* جدا شده، اندازه‌گیری شده و به روش آنالیز واریانس یک طرفه آنالیز و نتایج در جدول 3 و شکل 1 ارائه شده است.

کمترین غلظت مهاری مربوط به گیاه بومادران بوده است که نشان از اثرات آنتی‌باکتریال قوی‌تر این گیاه نسبت به دو گیاه دیگر دارد. بیشترین غلظت مهاری مربوط به گیاه اسطوخودوس است به‌طوری‌که این اختلاف نسبت به گیاهان دیگر معنادار ($p > 0/05$) بوده است از این رو کمترین خواص آنتی‌باکتریال در این گیاه نسبت به گیاهان دیگر مشاهده شده است.

جدول 3: کم‌ترین غلظت مهاری عصاره هیدروالکلی گیاهان دارویی بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر علیه باکتری *اثرموناس هیدروفیلا*.

نام گیاه	کم‌ترین غلظت مهاری بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر	خطای استاندارد
اسطوخودوس	833/3 ^b	166/6
آویشن	208/3 ^a	41/6
بومادران	150/0 ^a	90/1

حروف مختلف در هر ستون نشان از اختلاف معنادار ($p < 0/05$) دارد.



شکل 1: کم‌ترین غلظت مهاری عصاره هیدروالکلی اسطوخودوس، بومادران و آویشن بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر علیه باکتری *اثرموناس هیدروفیلا* جدا سازی شده.

خطاهای روی هر نمودار نشان از میزان خطای استاندارد و حروف مختلف بر روی نمودارها نشان از اختلاف معنادار ($p < 0/05$) دارد.

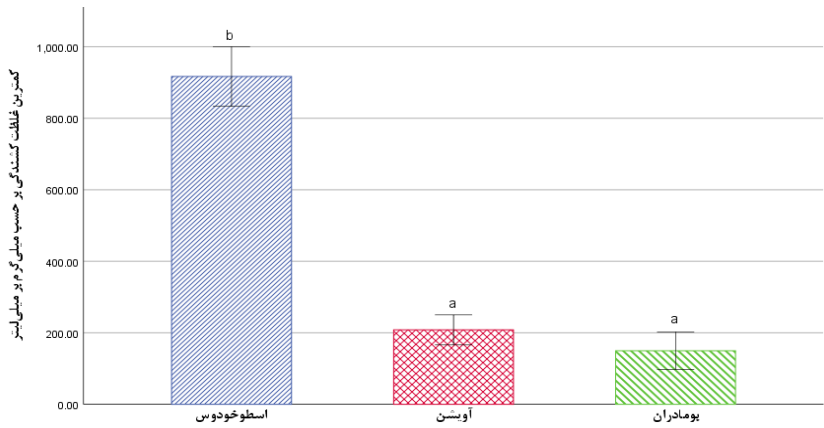
اثر کشندگی باکتریایی عصاره گیاهان دارویی اسطوخودوس، بومادران و آویشن با استفاده از روش کشت میکروبی محتوای چاهک مربوط به کمترین غلظت مهاری (میلی گرم در میلی لیتر) در باکتری‌های *اثرموناس هیدروفیلا*، اندازه‌گیری شده و پس از آنالیز آماری به روش آنالیز واریانس یک طرفه نتایج در جدول 4 و شکل 2 ارائه شده است.

کمترین غلظت کشندگی مربوط به گیاه بومادران بوده است که نشان از اثرات آنتی‌باکتریال قوی‌تر این گیاه نسبت به دو گیاه دیگر دارد. بیشترین غلظت کشندگی مربوط به گیاه اسطوخودوس است به‌طوری‌که این اختلاف نسبت به دیگر گیاهان دارویی معنادار ($p > 0/05$) بوده است.

جدول 4: کم ترین غلظت کشندگی عصاره هیدروالکلی گیاهان دارویی برحسب میلی گرم بر میلی لیتر علیه باکتری *اثرموناس هیدروفیلا* جدا شده.

نام گیاه	کم ترین غلظت کشندگی برحسب میلی گرم بر میلی لیتر	خطای استاندارد
اسطوخودوس	916/7 ^b	83/3
آویشن	208/3 ^a	41/6
بومادران	150/0 ^a	90/1

حروف مختلف در هر ستون نشان از اختلاف معنادار ($p < 0/05$) دارد.



شکل 2: کم ترین غلظت کشندگی عصاره هیدروالکلی اسطوخودوس، بومادران و آویشن برحسب میلی گرم بر میلی لیتر علیه باکتری *اثرموناس هیدروفیلا* جداسازی شده.

خطهای روی هر نمودار نشان از خطای استاندارد و حروف مختلف بر روی نمودارها نشان از اختلاف معنادار ($p < 0/05$) دارد.

در این قسمت اثرات آنتی باکتریال گیاهان دارویی با آنتی بیوتیک فلورفنیکل علیه باکتری های *اثرموناس هیدروفیلا* جداسازی شده در سه تکرار بررسی شده است. علت انتخاب فلورفنیکل از بین داروهای موردبررسی پایین بودن اندیس مقاومت چندگانه نسبت به دیگر آنتی بیوتیک های موردبررسی بوده است. در صورتی که اندیس کمترین غلظت کسری مهاری کمتر از 0/5 باشد شاهد اثر هم افزایی و در صورتی که این مقدار بیشتر از 4 باشد شاهد اثرات آنتاگونیسم هستیم. در بین ترکیبات مورد سنجش اثر هم افزایی مشاهده نشده است. جدول 5 نتایج این بخش را نشان می دهد.

جدول 5: بررسی خواص هم افزایی گیاهان دارویی مختلف در ترکیب با آنتی بیوتیک فلورفنیکل.

نام	ترکیبات دارویی	کمترین غلظت مهاری برحسب میلی گرم بر میلی لیتر		کمترین غلظت کسری مهاری	اندیس کمترین غلظت کسری مهاری
		به تنهایی	در ترکیب		
ترکیب اول	فلورفنیکل	0/00075	0/00075	1/0	1/91
	اسطوخودوس	833/3	755/2	0/91	
ترکیب دوم	فلورفنیکل	0/00075	0/00050	0/67	1/63
	بومادران	208/3	200/9	0/96	
ترکیب سوم	فلورفنیکل	0/00075	0/00075	1/0	1/84
	آویشن	150/0	125/3	0/84	



- در صورتی که اندیس کمترین غلظت کسری مهارى کمتر از 0/5 باشد شاهد اثر هم افزایی و در صورتی که این مقدار بیشتر از 4 باشد شاهد اثرات آنتاگونیسم هستیم.
- کمترین غلظت کسری مهارى برای داروی اول: کمترین غلظت مهارى داروی اول در ترکیب تقسیم بر کمترین غلظت مهارى داروی اول به تنهایی.
- کمترین غلظت کسری مهارى برای داروی دوم: کمترین غلظت مهارى داروی دوم در ترکیب تقسیم بر کمترین غلظت مهارى داروی اول به تنهایی.
- اندیس کمترین غلظت کسری مهارى: جمع کمترین غلظت کسری مهارى داروی اول + کمترین غلظت کسری مهارى داروی دوم.

بحث و نتیجه گیری

عفونت‌های باکتریایی از جمله عوامل اصلی مرگ و میر در آبریان است. باکتری *اثرموناس هیدروفیلا* یکی از این عوامل است که در گونه‌های متعددی از ماهیان آب شیرین بیماری‌زا است. عفونت ناشی از این باکتری در همه نقاط جهان شایع است. شیوع جهانی این باکتری در کنار مقاومت‌های آنتی بیوتیکی که به شکل روزافزونی در حال افزایش است، لزوم طرح ریزی سیاست‌های کارآمد درمانی را مشخص می‌نماید در این میان گیاهان دارویی خواص مهارکنندگی علیه باکتری‌های پاتوژن نشان دادند (Ultee et al., 2002; Raa, 1996). با توجه به اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های گیاهی می‌توان آن گیاهان را به عنوان ترکیباتی جایگزین برای مهار باکتری‌ها در صنایع غذایی استفاده نمود (American Public Health Association, 1998).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که در 3 مزرعه از 60 مزرعه مورد بررسی، باکتری *اثرموناس هیدروفیلا* جداسازی شد. از این رو میزان شیوع این باکتری 5 درصد گزارش می‌شود. در بررسی میزان حساسیت به آنتی بیوتیک‌ها، در دو مورد از سه باکتری جدا شده حساسیت به آنتی بیوتیک فلورفنیکل مشاهده شد، در خصوص انروفلوکساسین یک سویه حساس یک سویه با مقاومت نسبی و یک سویه مقاوم بود و برای آنتی بیوتیک تتراسایکلین دو سویه دارای مقاومت نسبی و یک سویه مقاوم بود و در نهایت برای آنتی بیوتیک تریمتوپریم سولفامتوکسازول هر سه سویه به این آنتی بیوتیک مقاوم بودند. در بررسی مقاومت چندگانه همه آنتی بیوتیک‌های مورد بررسی مقاومت چندگانه باکتریایی داشتند. اثر ضد باکتریایی عصاره گیاهان دارویی اسطوخودوس، بومادران و آویشن با استفاده از روش میکرودیالوشن براث و محاسبه کمترین غلظت مهارى (میلی گرم در میلی لیتر)، کمترین غلظت مهارى مربوط به گیاه بومادران بوده است که نشان از اثرات آنتی باکتریال قوی تر این گیاه نسبت به دو گیاه دیگر دارد. بیشترین غلظت مهارى مربوط به گیاه اسطوخودوس است به طوری که این اختلاف نسبت به گیاهان دیگر معنادار ($p > 0/05$) بوده است از این رو کمترین خواص آنتی باکتریال در این گیاه نسبت به گیاهان دیگر مشاهده شده است. اثر کشندگی باکتریایی عصاره گیاهان دارویی اسطوخودوس، بومادران و آویشن با استفاده از روش کشت میکروبی محتوای چاهک مربوط به کمترین غلظت مهارى (میلی گرم در میلی لیتر) در باکتری‌های *اثرموناس هیدروفیلا*، اندازه گیری شد و کمترین غلظت کشندگی مربوط به گیاه بومادران بوده است که نشان از اثرات آنتی باکتریال قوی تر این گیاه نسبت به دو گیاه دیگر دارد. بیشترین غلظت کشندگی مربوط به گیاه اسطوخودوس است به طوری که این اختلاف نسبت به دیگر گیاهان دارویی معنادار ($p > 0/05$) بوده است. در بررسی اثرات آنتی باکتریال گیاهان دارویی با آنتی بیوتیک‌های مورد بررسی علیه باکتری‌های *اثرموناس هیدروفیلا* جداسازی شده در بین ترکیبات مورد سنجش، اثر هم افزایی مشاهده نشده است. در مطالعه Ahmed و همکاران در سال 2018 شیوع باکتری *اثرموناس هیدروفیلا* در انسان مورد ارزیابی قرار گرفت. مدفوع 9 بیمار از 102 بیمار (8/8 درصد) مراجعه کرده به بیمارستان بیمارهای بومی در مصر آلوده به این باکتری بوده که بیش از نیمی از باکتری‌ها به آنتی بیوتیک‌های آموکسی سیلین، آموکسی کلاو، سفوتاکسیم، سفازیدیم، سفیکسیم، کانامایسین، تتراسایکلین و نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند. تمامی سویه‌ها به آنتی بیوتیک ایمپینم حساس بوده و پس از آن آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین، سفتری اکسون، استرپتومایسین، سیپروفلوکساسین و تریمتوپریم سولفامتوکسازول در رده‌های بعدی قرار



داشتند. در مطالعه Roges و همکاران در سال 2020 الگوی مقاومت به آنتی بیوتیک در باکتری ائروموناس جدا شده از انسان و غذاهای مورد مصرف انسان مورد ارزیابی قرار گرفت. در این پژوهش 30 ایزوله باکتریایی *ائروموناس هیدروفیلا* از نمونه های انسانی شامل خون، مدفوع، ریه، ترشحات چرکی و ترشحات مفصلی و 28 ایزوله از نمونه های خوراک شامل گوشت، مرغ، ماهی و حلزون جدا شد. در نمونه های انسانی بیشترین تعداد باکتری از مدفوع بیماران درگیر با مشکلات گوارشی جدا که میزان آن به 86/7 درصد می رسید. در بین نمونه های خوراک بیشترین میزان آلودگی مربوط به پستانداران مهاجر با میزان آلودگی 81/1 درصد و پس از آن ماهی با 67/8 درصد بوده است. در میان این باکتری ها بیشترین میزان مقاومت دارویی به ترتیب مربوط به آنتی بیوتیک سفوکسیتین، نالیدیکسیک اسید، سفازیدیم و تتراسایکلین بوده و کمترین میزان مقاومت به ترتیب در داروهای کلورامفنیکل، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین و آمیکاسین مشاهده شد. در مطالعه Alp و Türe در سال 2016 الگوی مقاومت به آنتی بیوتیک و ژن های مربوطه بر روی برخی باکتری های بیماری زا در آبزیان از جمله *ائروموناس هیدروفیلا* بررسی شد. این باکتری ها نسبت به فلورفنیکل، تریمتوپریم+سولفامتوکسازول، اکسی تتراسایکلین و انروفلوکساسین حساس و نسبت به لینکومایسین، پنسیلین جی، آموکسی سیلین مقاوم بودند. به علاوه ژن مقاومت به آنتی بیوتیک floR از تمامی این باکتری ها جدا شده است. در مطالعه علیشاهی و همکاران در سال 1389 اثرات ضد باکتریال گیاهان دارویی آویشن، آلوئه ورا، اکیناسه پورپورا، سیاه دانه، اسکوتلاریا، خارمریم، کلپوره، زیتون و پوست انار بر باکتری های *استرپتوکوکوس اینیه*، *یرسینیا راکری* و *ائروموناس هیدروفیلا* بررسی شدند. در بین عصاره های استفاده شده عصاره آویشن، پوست انار با میزان حداقل غلظت مهارکنندگی برابر 0/125 میلی گرم در میلی لیتر بیشترین خاصیت ضدباکتریایی را روی باکتری های مورد بررسی داشته اند، عصاره سیاه دانه، اسکوتلاریا و زیتون میزان حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی کمتر از 2 میلی گرم در میلی لیتر در مورد سه باکتری مورد بررسی داشته، ولی بقیه عصاره ها تأثیر ضدباکتریایی چندانی نشان ندادند. عادل و همکاران در سال 1394 اثرات آنتی باکتریال و ضد قارچ بومادران را بر روی باکتری های *استرپتوکوکوس اینیه*، *یرسینیا راکری*، *ویبریو انگویلا*، *ائروموناس هیدروفیلا* و *سودوموناس آنروجینوزا* و چهار قارچ بیماری زای ساپروولگنیا، *فوزاریوم سولانی*، *کاندیدا آلبیکنز* و *آسپرژیلوس فلاوس* مورد ارزیابی قرار دادند. همه میکروارگانیسم های مورد مطالعه نسبت به اسانس بومادران حساسیت بیشتری را نسبت به آنتی بیوتیک های کنترل نشان دادند. علاوه بر این، حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس مورد مطالعه در محدوده 125 تا 800 میکروگرم بر لیتر تعیین شد که قادر به مهار رشد باکتری ها و قارچ های بیماری زای مذکور بود. Deepika و همکاران در سال 2019 اثرات هم افزایی فلاونوئید روتین همراه با آنتی بیوتیک فلورفنیکل علیه *ائروموناس هیدروفیلا* را مورد ارزیابی قرار دادند. در این مطالعه مشخص شد که هرچند روتین به تنهایی هیچ اثر ضدباکتریایی علیه *ائروموناس هیدروفیلا* نداشته، اثرات مهار فلورفنیکل را تا چهار برابر افزایش داده است. به علاوه تجویز فلورفنیکل به همراه روتین در بیماران مبتلا به *ائروموناس* باعث بهبود عملکرد سیستم ایمنی و فعالیت های ضد پروتاز و ضد لیزوزیم و استرس اکسیداتیو شده است. Bandeira در سال 2018 اثرات آنتی باکتریال و هم افزایی سیترات، لینالول، کارواکرول و تیمول و داروهای آنتی بیوتیک فلورفنیکل و تتراسایکلین را مورد ارزیابی قرار دادند. در این پژوهش مشخص شد که کارواکرول و تیمول بیشترین اثرات آنتی باکتریال را داشته اند و ترکیب های لینالول + فلورفنیکل یا اکسی تتراسایکلین علیه *ائروموناس* و سیترات + اکسی تتراسایکلین علیه *سیتروباکتر فروتسی* الگوی هم افزایی نشان داده اند. در مطالعه Kot و همکاران در سال 2019 اثرات آنتی باکتریال ترکیبات شیمیایی گیاهی شامل سینامالدهید، فرولیک اسید، کوماریک اسید، کافئیک اسید، کلروژنیک اسید و عصاره آویشن، میخک و درخت جای علیه سویه های مختلف *ائروموناس* مورد ارزیابی قرار گرفت. تمامی سویه های *ائروموناس سالمونسیلا* به دنبال مصرف سینامالدهید کاهش یافت به طوری که اثر مهار آن با اکسی تتراسایکلین قابل مقایسه بود. به علاوه ترکیب های سینامالدهید + عصاره آویشن و سینامالدهید + عصاره میخک در مهار باکتری های مورد بررسی اثرات هم افزایی نشان دادند. بیشترین خاصیت باکتری کشی در ترکیب سینامالدهید و عصاره آویشن مشاهده گردید.

در پژوهش های متعدد دیگری خواص آنتی باکتریال عصاره های گیاهی بر باکتری های بیماری زا مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص گردید که عفونت هایی که به دلیل مواد غذایی آلوده به عوامل پاتوژن ایجاد می شوند، تأثیر بسزایی در بهداشت و سلامت عمومی دارند. به منظور کاهش ضررهای اقتصادی و مرگ میر ناشی از این عوامل، به کارگیری ترکیبات طبیعی به عنوان ترکیبات ضد میکروبی یک رویکرد



تاثیرگذار جهت کنترل عوامل بیماری‌زا و بالا بردن طول دوره نگهداری غذاهای فراوری شده است. در این بین عصاره‌های به دست آمده از برخی گیاهان، یک منبع غنی از ترکیبات ضد میکروبی هستند که واجد اثرات ضد باکتریایی می‌باشند.

از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که ظهور و گسترش چشمگیر مقاومت ضد میکروبی در باکتری‌های پاتوژن، بهداشت و سلامت عمومی را با چالش مواجه نموده است. نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر و سایر پژوهش‌های مشابه نشان می‌دهد که انتخاب نادرست و نابه جا از ترکیبات آنتی بیوتیکی می‌تواند مقاومت‌های آنتی بیوتیکی را در باکتری‌های مختلف گسترش دهد. به کارگیری ترکیبات آنتی بیوتیک جهت درمان عفونت‌ها در آبزیان به علت مواجهه‌ی مستقیم دارو با محیط زیست و تهدیدی که برای سلامت جوامع دارد توجهات زیادی را به خود جلب نموده است و سبب بروز نگرانی در صنعت پرورش آبزیان گردیده است. امروزه به علل نامشخصی استفاده از داروها و ترکیبات سنتزی بدون تجویز و خارج از سیستم درست تشخیص بدون توجه به بقایای دارویی به جامانده و اثرات مخرب آنها بر محیط زیست و عوارض منفی که این بقایا بر سلامت انسان‌ها دارند همچون واکنش‌های ازدیاد حساسیت، آثار سمی، ایجاد عفونت‌های ثانویه و بروز اختلال در متابولیسم با حضور مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها و انتقال این مقاومت به عوامل بیماری‌زای انسانی سلامت و بهداشت عموم با تهدیدی جدی مواجه می‌گردد و به دنبال آن ممکن است خسارات غیرقابل جبرانی رخ بدهد. مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها در صنعت پرورش آبزیان نیز منجر به مختل شدن درمان و تحمیل خسارت‌های اقتصادی هنگفت بر پرورش دهندگان می‌گردد. استفاده از آنتی بیوتیک‌ها ممکن است به خودی خود آثار سمی برجای نگذارد اما به استفاده از این ترکیبات برای مدت زمان طولانی و بیش از حد نیاز در آبزیان سبب افزایش جمعیت سویه‌های مقاوم در آبزیان، سخت‌پوستان و میکروفلور آب می‌گردد. مصرف بی رویه ترکیبات ضد میکروبی به ویژه آنهایی که در انسان نیز کاربرد درمانی دارند زمینه بروز مقاومت‌های باکتریایی را فراهم می‌نماید و امنیت غذایی و سلامت و بهداشت عموم را با چالش مواجه می‌کند. سویه‌های باکتریایی مقاوم سبب ایجاد عفونت‌هایی می‌گردند که درمان آن‌ها بسیار چالش برانگیز است و در برخی موارد حتی عفونت‌هایی غیرقابل درمان ایجاد می‌کنند. لذا، نظارت بر مقاومت فنوتیپی و ژنوتیپی در برابر آنتی بیوتیک‌ها در گونه‌های ائروموناس جدا شده از آبزیان به عنوان منبعی از مواد غذایی، جهت محافظت از سلامت عموم مهم است. در نقاط مختلف جهان موارد بی‌شماری از مقاومت باکتریایی به وسیله برنامه‌های نظارتی گزارش گردیده است. با این وجود این پژوهش‌ها عمدتاً به عوامل بیماری‌زای انسانی منحصر شده است و موارد بسیار محدودی در زمینه بروز مقاومت در مواد غذایی و محیط‌های فرآوری مواد غذایی و باکتری‌های بیماری‌زا با منشأ آبزیان وجود دارد. لذا با توجه به آنچه پیش از این عنوان گردید، ردیابی میزان شیوع این عوامل بیماری‌زا در آبزیان در کنار بررسی میزان شیوع مقاومت دارویی و به کارگیری درمان‌های جایگزین همچون استفاده از گیاهان دارویی دارای خواص ضد میکروبی که بتواند بر این مقاومت‌های دارویی غلبه نماید و از شیوع بیشتر این عوامل در صنعت پرورش آبزیان جلوگیری نماید ضروری به نظر می‌رسد. لذا پژوهش‌های جامع‌تر پیرو رویکردهای درمانی کارآمد جهت طرح ریزی سیاست‌های درمانی و پیشگیرانه ضروری است.

منابع

- پیغان، ر. و محمدیان، ت.، 1393. ماهی‌شناسی پایه. چاپ اول، انتشارات سپهر دانش، همدان، 429 ص.
- جمشیدیان، م.، 1372. راهنمای باکتریولوژی و میکولوژی درمانگاهی دامپزشکی. چاپ اول، انتشارات دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، 888 ص.
- حبیبی، ط. و راعی، م.م.، 1391. جانورشناسی عمومی مهره‌داران. انتشارات دانشگاه تهران، صفحات 75-78.
- ستاری، م.، 1387. بهداشت و بیماری‌های آبزیان. جلد اول، چاپ اول، انتشارات حق شناس، صفحات 223-259.
- شمس‌اردکانی، م.ر.، حاجی‌آخوندی، ع.، جمشیدی، الف. ح. و محمدرفیعی، پ.، 1384. تولید و نگهداری کشت سلولی گیاه بومادران مقایسه متابولیت‌های تولید شده در کالوس با گیاه کامل. فصلنامه گیاهان دارویی، (5)17: 21-26.
- عادل، م.، امیری، ع. و آرمین، و.، 1394. ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی اسانس بومادران علیه باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زای شایع در ماهی. مجله گیاهان دارویی، 6: 68-71.



علیشاهی، م.، قربانپور نجفآبادی، م.، نجفزاده، ح. و پشمفروش، م.، ۱۳۸۹. مطالعه اثرات ضدباکتریایی برخی عصاره‌های گیاهی علیه استرپتوکوکوس اینیایی، یرسینیا راکری و آئروموناس هیدروفیلا. مجله دامپزشکی ایران، ۲: 21-30.

American Public Health Association, 1998. Standard Methods for Examination of Water and Waste water, American Public Health Association, Washington DC, USA, 20th edition,

Alcaide, E., Blasco, M.-D. and Esteve, C., 2010. Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans, water and eels. *Research in Microbiology*, 161: 40-45.

Ahmed, H. A., Mohamed, M. E. and Rezk, M. M., 2018. *Aeromonas hydrophila* in fish and humans; prevalence, virulotyping and antimicrobial resistance, *Slovenian Veterinary Research*, 55: 113-124.

Andersen, F.A., 2001. Final report on the safety assessment of Yarrow (*Achillea Millefolium*) extract. *International Journal of Toxicology*, 20(2): 79-84.

Anthonin, G., Benjamin, B. and Aurélien, R., 2021. Maxime Rome, Nicola Fuzzati, Marine Peuchmaur, Development of an innovative maceration technique to optimize extraction and phase partition of natural products, *Fitoterapia*, Volume 148, 104798.

Asgary, S., Naderi, G., Sarrafzadegan, N., Mohammadifard, N., Mostafavi, S. and Vakili, R., 2000. Antihypertensive and antihyperlipidemic effects of *Achillea wilhelmsii*. *Drugs under experimental and clinical research*, 26.

Bandeira Junior, G., Suttili, F. and Gressler, L., 2018. Antibacterial potential of phytochemicals alone or in combination with antimicrobials against fish pathogenic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 125: 655-665.

Benedek, B. and Kopp, B., 2007. *Achillea millefolium* L. revisited: Recent findings confirm the traditional use. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 157(13-14): 312-314.

Coenye, T. and Vandamme, P., 2003. Intragenomic heterogeneity between multiple 16s ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. *FEMS Microbiology letter*, 228: 45-49.

Doern, C.D., 2014. When does 2 plus 2 equal 5?. A review of antimicrobial synergy testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 52 (12) :4124-4128.

Deepika, M. S., Thangam, R. and Vijayakumar, T. S., 2019. Antibacterial synergy between rutin and florfenicol enhances therapeutic spectrum against drug resistant *Aeromonas hydrophila*, *Microbial pathogenesis*, 135: 103612.

Ferraro, M. J., 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard: seventh edition. National committee for clinical laboratory standards (NCCLS).

Herrera, F., Santos, J. and Otero, A., 2006. Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 527-536.

Igbinosa, I. H., Igumbor, E. U. and Aghdasi, F., 2012. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *The Scientific World Journal*.

Janda, J. M. and Abbott, S. L., 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical microbiology reviews*, 23: 35-73.

Javidnia, K. and Miri, R. and Sadeghpour, H., 2004. Composition of the volatile oil of *Achillea wilhelmsii* C. Koch from Iran.

Kaskhedikar, M. and Chhabra, D., 2010. Multiple drug resistance in *Aeromonas hydrophila* isolates of fish. *Food Microbiology*, 28: 157-168.

Kalemba, D. and Kunicka, A., 2003. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10 (10): 813-829.

Kot, B., Kwiatek, K. and Janiuk, J., 2019. Antibacterial activity of commercial phytochemicals against *Aeromonas* species isolated from fish. *Pathogens*, 8: 142.



- Lorian, V., 2005.** Antibiotics in Laboratory Medicine. Lippincott Williams & Wilkins. p. 149. ISBN 9780781749831. Retrieved 16 November 2014.
- Leber, A. L., 2020.** Clinical microbiology procedures handbook, John Wiley & Sons.
- Paulsen, E., 2002.** Contact sensitization from Compositae-containing herbal remedies and cosmetics. Contact Dermatitis, 47(4): 189-198.
- Raa, J., 1996.** The use of immuno-stimulatory substances in fish and shellfish farming. Fisheries Science, 4: 229-288.
- Roges, E. M., Gonçalves, V. D. and Cardoso, M. D., 2020.** Virulence-Associated Genes and Antimicrobial Resistance of *Aeromonas hydrophila* Isolates from Animal, Food, and Human Sources in Brazil. BioMedical Research International.
- Raut, J.S. and Karuppaiyl, S.M., 2014.** A status review on the medicinal properties of essential oils. Industrial Crops and Product, 62(2):250-64.
- Rao, A., Zhang, Y., Muend, S. and Rao, R., 2010.** Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 54(12): 5062-5069.
- Saeidnia, S., Gohari, A., Mokhber-Dezfuli, N. and Kiuchi, F., 2011.** A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achillea*. DARU: Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, 19(3):173.
- Türe, M. and Alp, H., 2016.** Identification of bacterial pathogens and determination of their antibacterial resistance profiles in some cultured fish in Turkey. Journal of Veterinary Research, 60: 141-146.
- Ultee, A., Bennik, M. and Moezelaar, R., 2002.** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology, 68(4): 1561-1568.
- Yuan, C., Li, D., Chen, W. and Sun, F., 2007.** Administration of herbal immunoregulation mixture enhances some immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*). Fish Physiology and Biochemistry, 10: 1007-1120.
- Zhao, W. H. and Hu, Z. Q., 2010.** b-Lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Medical Microbiology, 36: 245-258.
- Zong, Z., Lu, X. and Gao, Y., 2002.** *Aeromonas hydrophila* infection: clinical aspects and therapeutic options. Reviews in Medical Microbiology, 13 (4): 151- 162.



Effects of Hydroalcoholic extract medicinal plants Lavender, Achillea Millefolium, , Zataria multiflora Boiss against the bacterium (*Aeromonas hydrophila*) in Rainbow trout

Seyedeh Ommolbanin Ghasemian^{1*}

1. Department of Veterinary, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan, Iran

*Corresponding Author: Ommolbanin.Ghasemian@iau.ac.ir

Abstract

Aeromonas hydrophila bacteria is an opportunistic bacterium that can reduce the use of chemical and synthetic drugs by using medicinal plants to inhibit its growth in food. Considering the antibacterial properties of three plants, Yarrow, Lavender and Thyme, this study was conducted with the aim of investigating the antibacterial and synergistic effects of these three plants against *Aeromonas hydrophila* bacteria. In this study, *Aeromonas hydrophila* bacteria was first prepared from fish samples and confirmed by biochemical and PCR methods. Then extraction was done by maceration method and the sensitivity of isolated bacteria was checked by disk diffusion method in Mueller Hinton culture medium. Also, the minimum inhibitory concentration of medicinal plants was investigated. According to the results, the prevalence of *Aeromonas hydrophila* bacteria was 5%. The isolated bacteria were resistant to all the investigated antibiotics. The lowest inhibitory concentration and the lowest lethal concentration were related to the yarrow plant, which shows its stronger antibacterial effects than the other two plants. The highest lethality concentration was reported for lavender plant, and this difference was statistically significant compared to other two plants ($p < 0.05$). In general, tracking the prevalence of these pathogens in aquatic animals, along with investigating the prevalence of drug resistance and using alternative treatments such as the use of medicinal plants with antimicrobial properties that can overcome drug resistance and prevent the further spread of these factors in the aquaculture industry It seems necessary.

Keywords: *Aeromonas hydrophila* Lavender, Achillea Millefolium, Hydroalcoholic extract, *Zataria multiflora* Boiss.