



اثر ضد باکتریایی عصاره های برگ، میوه و ساقه گیاه تاج ریزی پیچ (*Solanium*) *nigrum*) بر باکتریهای بیماری زای ماهی در شرایط آزمایشگاهی

مهین ریگی^{*}، نرجس سنچولی

گروه شیلات، پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون، دانشگاه زابل

نوع مقاله:	چکیده
کوتاه	هدف از این تحقیق بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره برگ، میوه و ساقه گیاه تاج ریزی پیچ (<i>Solanium</i>) بر باکتری‌های بیماری‌زای ماهی می باشد. عصاره‌گیری با دستگاه سوکسله انجام شد. طبق نتایج، عصاره متانولی برگ و عصاره استونی میوه به ترتیب با میزان MIC، MBC ۱۲/۵، ۲۵ خواص ضدباکتریایی قوی‌تری داشتند. مقاوم‌ترین باکتری نسبت به عصاره‌ها، باکتری استرپتوکوکوس اینیایی بود و مقاوم‌ترین باکتری به عصاره متانولی و هگزانی میوه، باکتری آئروموناس هیدروفیلا بودند. بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به عصاره استونی ساقه و برگ بر باکتری‌های یرسینیا راکری و آئروموناس هیدروفیلا با غلظت ۵۰ ppm و کمترین قطر هاله عدم رشد باکتری مربوط به عصاره هگزانی برگ بر باکتری یرسینیا راکری با غلظت ۲۵ ppm بود. استفاده از عصاره متانولی برگ و عصاره استونی میوه در این گیاه برای درمان بیماری‌های باکتریایی در آبزی پروری موثر می باشد.
تاریخچه مقاله: دریافت: ۹۵/۰۶/۲۷ اصلاح: ۹۵/۰۸/۱۵ پذیرش: ۹۵/۱۱/۰۲	
کلمات کلیدی: تاج ریزی پیچ عصاره MIC	

مقدمه

اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی دارای ترکیباتی با فعالیت‌های زیستی متفاوت از جمله خواص ضد میکروبی می‌باشند (Roy and Ruth, 2013). یک ماده ضد میکروبی ماده‌ای است که میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتریها، قارچ‌ها و یا پروتوزوآها را می‌کشد و یا مانع از رشد و توسعه آنها می‌شود (Penna et al., 2001). فعالیت ضد میکروبی گیاهان به خاطر اهمیت دارویی و از طرفی به دلیل افزایش بیماری‌های عفونی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها که باعث افزایش مشکلات درمانی شده در سالهای اخیر مورد توجه قرار گرفته است (Austin et al., 2005). بخش‌های مختلف گیاهان (ریشه، دانه، برگ، ساقه، میوه و ...) به صورت عصاره، پودر، تزریق برای درمان بیماری‌های انسانی، گیاهی و حیوانی استفاده شده است (Nostro et al., 2000). *Streptococcus iniae* باکتری گرم مثبت و میله‌ای شکلی است که باعث مرگ و میر بالا در آبزیان در یک دوره ۳ تا ۷ روزه می‌شود. علائم کلینیکی این بیماری عبارتند از شنای نامنظم و بی‌هدف به چپ و راست، از دست دادن کنترل شناوری، بی‌حالی، تیره شدن بدن، آگزوفتالمی یک یا دوطرفه، کدورت قرنیه، خونریزی در داخل یا اطراف چشم، صفحه آبشش و پایه باله‌ها، مقعد و یا دیگر نقاط بدن است (Singh et al., 2003). بیماری سیتی سمی آئروموناس‌های متحرک که عامل آن باکتری آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) و گاهی دیگر گونه‌های آئروموناس می‌باشد (Austin, 2005)

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: mahin.rigi@uoz.ac.ir

گسترش جهانی دارد و در پرورش ماهیان سردابی مانند قزل‌آلای رنگین‌کمان یک مشکل اقتصادی مهم است (Fang et al., 2000). این باکتری یک پاتوژن فرصت طلب، گرم منفی و میله‌ای شکل است. از علائم کلینیکی این بیماری عدم اشتها، اختلالات شنا، آبشش رنگ پریده، زخم‌های پوستی و مرگ ناگهانی در ماهی می‌باشد. همچنین اندام‌های داخلی مانند کبد، کلیه، طحال و پانکراس درگیر می‌شوند (Swann and Randy, 1989). باکتری *Yersinia ruckeri* عامل بیماری *yersiniosis* در مزارع پرورش ماهی قزل‌آلا است و متعلق به خانواده انتروباکتریاسه، میله‌ای گرم منفی و تاژک‌دار که باعث ایجاد خسارات اقتصادی جبران‌ناپذیری در سراسر دنیا شده است (Méndez and Guijarro, 2013). یک پاتوژن فرصت طلب بوده که معمولاً در آبها موجود است و نسبت به درمان‌های آنتی‌بیوتیکی مقاوم است. از علائم کلینیکی این بیماری در ماهی، قرمز شدن پایه باله‌ها و امتداد خط جانبی و خونریزی در منطقه سر و حفره دهانی، تغییرات رفتاری از جمله شنا کردن در نزدیکی سطح و به آرامی حرکت کردن ماهیان مبتلا می‌باشد. طحال بزرگ شده و ماهیان مبتلا اشتهای خود را از دست داده و در سطح کبد و لوزالمعده خونریزی دیده می‌شود (Toback, 2009). اثرات ضد باکتریایی مفید عصاره‌های برگ گیاه استبرق بر باکتری و قارچ و ویروس‌های جدا شده از ماهی و میگو گزارش شده است. بخش‌های آلكالوئیدی و سسکوئیت‌رین‌های موجود در گیاه جغجغه دارای فعالیت ضد میکروبی است و فعالیت ضد میکروبی تاتوره به ترکیب متابولیت‌های ثانویه مانند آلكالوئید، فلاونوئیدها، فنل، تانن، ساپونین، استروئید، گلیکوزیدها و رزین‌هایی که فعالیت ضد باکتریایی با مکانیزم‌های فعال متفاوت دارند نسبت داده شده است (Velmurugan et al., 2012).

طی تحقیقی که روی فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های اتیل‌استات، اتانول، متانول، دی‌اتیل‌اتر، کلروفورم و هگزان برگ، ریشه و دانه گیاه *S. nigrum* بر ۷ گونه باکتری *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas putrida*, *klebsiella pneumonia*, *E.coli*, ریزی پیچ فعالیت ضد باکتریایی قوی بر این میکروارگانیسم‌ها دارد و عصاره اتیل‌استات دانه این گیاه نسبت به عصاره ریشه و برگ تاثیر بیشتری داشته است (Sridhar et al., 2011). باکتری‌های مورد آزمون در این مطالعه یکی از عوامل اصلی مرگ و میر ماهیان پرورشی به شمار می‌روند و بیماری‌های باکتریایی در آبی پروری بیشتر به وسیله آنتی‌بیوتیک‌ها کنترل می‌شوند. از این رو بررسی اثرات ضد میکروبی گیاهان طبیعی می‌تواند راه را برای به دست آوردن آنتی‌بیوتیک‌های بی‌ضرر هموار سازد. با توجه به اثرات ضد باکتریایی گزارش شده از گیاه مورد بررسی در این پژوهش، اثر عصاره‌های متانولی و هگزانی، استونی و اتیل‌استات آن بر سه باکتری بیماری‌زای ماهی (*Yersinia ruckeri* و *Streptococcus iniae*، *Aeromonas hydrophila*) به منظور تعیین امکان کاربرد آنها به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه

بخش‌های مختلف گیاه (برگ، میوه و ساقه) از هم جدا شده، پس از شسته شدن در دمای اتاق خشک و سپس به ذرات ریز آسیاب شدند. مقدار ۵ گرم از پودر قسمت‌های مختلف گیاه با ۵۰ میلی‌لیتر از هر حلال (هگزان، استون، اتیل‌استات، متانول) ترکیب شده و همه عصاره‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد روی شیکر قرار داده شدند (Aibinu et al., 2007)، سپس با دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و عصاره‌های به دست آمده توسط دستگاه روتاری (تقطیر در خلا) تغلیظ و به منظور خشک شدن در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس عصاره‌های خشک شده درون DMSO حل شده و برای سنجش فعالیت ضد باکتریایی به کار رفتند (Austin, 2005).

تهیه باکتری و ذخیره سازی

باکتری‌های *ACCTP* جداسازی شده از ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بیمار، مورد تایید دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران می‌باشد، *Yersinia ruckeri* دارای کد PCR با شماره (KEC 29653) و *Streptococcus iniae* جداسازی شده از ماهیان مبتلا به استرپتوکوکوزیس در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر که با روش PCR جنس و گونه آن مشخص شده بود تهیه شده و هر

سه باکتری بعد از کشت در محیط مایع نوترینت براث به مدت ۲۴ ساعت در دمای 25°C گرماگذاری و بعد از ۲۴ ساعت در محیط کشت نوترینت براث حاوی 10% گلیسرول استریل در فریزر با دمای 21°C - برای استفاده بعدی ذخیره سازی شدند.

تهیه سوسپانسیون باکتریایی

باکتری های آئروموناس هیدروفیلا، یرسینیا راکری و استرپتوکوکوس اینیایی، پس از انجماد زدایی در دمای 25°C ، در محیط تریپتیک سوی براث (TSB) کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 25°C درجه سانتی گراد گرمای گذاری شدند و در شرایط استریل بذر هر یک از باکتری ها به محیط مولر هینتون براث اضافه شد و بعد از ۲۴ ساعت گرمای گذاری در دمای 25°C درجه سانتی گراد در فاز لگاریتمی رشد باکتری، میزان کدورت ایجاد شده حاصل از رشد باکتری با استفاده از لوله استاندارد مک فارلند شماره $0/5$ ($10^6 \times 1/5$) تنظیم و این سوسپانسیون به عنوان ذخیره در نظر گرفته شد و در هنگام مصرف (در همان روز) به نسبت $1:100$ در همان محیط رقیق شدند ($10^6 \times 1/5$) (Mainasarsa et al., 2012).

تعیین حداقل غلظت باکتریایی (MIC)

آزمایش حداقل غلظت بازدارندگی در پلیت ۹۶ خانه ای میکروتیتر استریل و با روش استاندارد براث میکروداپلوشن (رقیق سازی در محیط مایع) انجام شد (Marzouk et al., 2011). میزان $100 \mu\text{l}$ از دو برابر بالاترین غلظت عصاره ها به اولین چاهک پلیت های میکروتیتر ۹۶ خانه ای که قبلا حاوی $100 \mu\text{l}$ محیط کشت مولر هینتون براث بوده اضافه شده و پس از مخلوط کردن محتویات چاهک اول $100 \mu\text{l}$ میکرولیتر برداشته به چاهک دوم انتقال داده و این کار تا چاهک هشتم انجام شد تا به ترتیب غلظت های 50 ، 25 ، $12/5$ ، $6/25$ ، $3/12$ ، $1/56$ ، $0/78$ با روش رقیق سازی از چاهک دوم تا هشتم تهیه شود و از چاهک هشتم 100 میکرولیتر برداشته و دور ریخته شد و بعد از آن $100 \mu\text{l}$ از سوسپانسیون باکتریایی $10^6 \times 1/5$ (معادل نیم مک فارلند) به چاهک ها اضافه شده و یک چاهک حاوی محیط کشت مولر هینتون براث و حلال DMSO و سوسپانسیون باکتریایی به عنوان شاهد منفی و یک ردیف کنترل برای هر ردیف آزمایش مربوط به عصاره در نظر گرفته شد و مراحل رقت سازی عصاره ها مانند ردیف آزمایش بود و به این ردیف کنترل، باکتری اضافه نشد. سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای 30°C در انکوباتور قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت کدورت و عدم کدورت چاهک ها به صورت چشمی مورد ارزیابی قرار گرفت و وجود کدورت (در مقایسه با ردیف کنترل عصاره ها) حاکی از رشد باکتری و شفافیت، نشان دهنده عدم رشد باکتری می باشد. پایین ترین غلظتی که در آن هیچ گونه رشد باکتری مشاهده نشد (فاقد کدورت ناشی از رشد باکتری) به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum Inhibitory Concentration) تعیین شد (Méndez and Guijarro, 2013).

تعیین حداقل غلظت باکتری کشی (MBC)

حداقل غلظت باکتری کشی (Minimum Bactericidal Concentration) با توجه به مقادیر MIC هر یک از عصاره ها تعیین شد، به طوری که میزان 5 میکرولیتر از چاهک هایی که رشد باکتری در آنها متوقف شده بود، به پلیت های حاوی محیط کشت باکتری ها (تریپتیک سوی آگار TSA) انتقال داده شد و به مدت $22-24$ ساعت در دمای 30°C در انکوباتور نگهداری شدند. پایین ترین غلظت عصاره که در آن $99/9\%$ باکتری ها رشد نداشتند به عنوان MBC در نظر گرفته شد (Muyima et al., 2004). تمام آزمایش ها ۳ بار تکرار و میانگین داده های به دست آمده به عنوان نتایج MIC و MBC ارائه گردید.

روش چاهک (Well method)

در روش چاهک از سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند ($10^6 \times 1/5$) بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار به صورت یکنواخت کشت داده شد و سپس با استفاده از چوب پنبه سوراخ کن چاهک هایی با قطر 7 میلی متر حفر شده و با سمپلر، 100 میکرولیتر از غلظت های مختلف عصاره ها در چاهک ها ریخته شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای 30°C درجه سانتی گراد گرمای گذاری شدند. قطر هاله عدم رشد با استفاده از خط کش در دو جهت عمود بر هم اندازه گیری شد و این عمل با سه تکرار برای هر غلظت عصاره انجام گرفت. با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک ها حساسیت یا مقاومت باکتری های مورد نظر به عصاره ها تعیین شد (Johnde Britto et al., 2011).

آنالیز آماری

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS استفاده شد. جهت مقایسه داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و برای مقایسه میانگین متغیرها در تیمارهای مختلف از پس آزمون Tukey استفاده شد. اختلاف میانگین داده‌ها در سطح ۵ درصد بررسی شد.

نتایج

میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) عصاره‌های متانولی، هگزانی، استونی و اتیل استات برگ، میوه و ساقه گیاه تاج ریزی بر باکتری‌های مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان دادند که عصاره متانولی برگ گیاه تاج ریزی (*Solanum nigrum*) با میزان حداقل غلظت بازدارندگی پایین تر ۱۲/۵ ppm خواص ضد باکتریایی بهتری بر باکتری *Streptococcus iniae* نسبت به دیگر باکتریها داشته است و در غلظت ۲۵ ppm باعث مهار رشد باکتری *Aeromonas hydrophila* و *Yersinia ruckeri* شده است. عصاره هگزانی برگ گیاه تاج ریزی در غلظت‌های مورد استفاده نتوانست رشد باکتری *Streptococcus iniae* را مهار کند اما در غلظت ۲۵ ppm نتوانست رشد باکتری *Aeromonas hydrophila* و *Yersinia ruckeri* را مهار کند. همچنین نتایج نشان داد که عصاره استونی و اتیل استات برگ گیاه تاج ریزی با میزان ۲۵ ppm خواص ضد باکتریایی بر هر سه باکتری مورد مطالعه داشته است. عصاره متانولی و هگزانی میوه گیاه تاج ریزی با غلظت‌های مورد آزمایش نتوانسته‌اند رشد باکتری *Aeromonas hydrophila* را مهار کنند ولی با غلظت ۲۵ppm نتوانسته است باعث مهار رشد باکتری *Streptococcus iniae* و *Yersinia ruckeri* شود. عصاره استونی میوه گیاه تاج ریزی با میزان حداقل غلظت بازدارندگی پایین تر ۱۲/۵ppm خواص ضد باکتریایی بهتری در باکتری *Streptococcus iniae* نسبت به دیگر باکتری‌های مورد مطالعه داشته است. نتایج نشان داد که عصاره اتیل استاتی میوه این گیاه در غلظت‌های مورد آزمایش تاثیر باکتریواستاتیک و باکتریسیدی در باکتری *Streptococcus iniae* نداشته است اما در غلظت ۲۵ppm رشد باکتری *Aeromonas hydrophila* و *Yersinia ruckeri* را مهار کرده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد عصاره متانولی، هگزانی و استونی ساقه گیاه تاج ریزی در غلظت ۲۵ppm خواص ضد باکتریایی بر هر سه باکتری دارد. عصاره اتیل استات میوه این گیاه تاثیر ضد باکتریایی علیه باکتری *Streptococcus iniae* نداشته است اما در غلظت ۲۵ppm رشد باکتری *Aeromonas hydrophila* و *Yersinia ruckeri* را مهار کرده است. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که حساسترین باکتری به همه عصاره‌های گیاه تاج ریزی در غلظت ۲۵ppm باکتری *Yersinia ruckeri* بوده است.

جدول ۱. نتایج MIC و MBC عصاره قسمت‌های مختلف گیاه تاج ریزی پیچ بر باکتری‌های مورد بررسی

<i>Streptococcus iniae</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	باکتریها		عصاره‌های گیاهی (ppm)
			MIC	MBC	
۲۵	۵۰	۱۲/۵	۲۵	۵۰	متانول
۲۵	۵۰	>۵۰	>۵۰	۵۰	هگزان
۲۵	۵۰	۲۵	۲۵	۵۰	استون
۲۵	۵۰	۲۵	۲۵	۵۰	اتیل استات
>۵۰	>۵۰	۲۵	۲۵	۵۰	متانول
>۵۰	>۵۰	۲۵	۲۵	۵۰	هگزان
۲۵	۵۰	۱۲/۵	۲۵	۵۰	استون
۲۵	۵۰	>۵۰	>۵۰	۵۰	اتیل استات
۲۵	۵۰	۲۵	۲۵	۵۰	متانول
۲۵	۵۰	۲۵	۲۵	۵۰	هگزان
۲۵	۵۰	۲۵	۲۵	۵۰	استون
۲۵	۵۰	>۵۰	>۵۰	۵۰	اتیل استات

نتایج میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری ها در جدول ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می شود بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به عصاره استونی ساقه و برگ گیاه تاجریزی با قطر هاله 3 ± 0.50 و 2.8 ± 0.25 میلی متر به ترتیب بر باکتری های یرسینیا راکری و آئروموناس هیدروفیلا با غلظت ۵۰ ppm بوده است.

جدول ۲. فعالیت ضد باکتریایی عصاره تاجریزی پیچ (قطر هاله عدم رشد باکتری ها بر حسب mm) بر باکتریهای مورد بررسی

باکتریها	<i>Streptococcus iniae</i>		<i>Yersinia ruckeri</i>		<i>Aeromonas hydrophila</i>		عصاره های گیاهی (ppm)
	۲۵	۵۰	۲۵	۵۰	۲۵	۵۰	
برگ	متانول	۱/۵±۰/۲۰	.	.	۱/۵±۰/۲۰	۲/۰±۰/۵۰	
	هگزان	.	۱/۵±۰/۳۰	۱/۰±۰/۳۰	.	.	
	استون	۲/۵±۰/۲۸	
	اتیل استات	.	۱±۰/۲۰	۱/۶±۰/۱۰	.	.	
میوه	متانول	
	هگزان	
	استون	
	اتیل استات	.	۰/۸۳±۰/۱۶	۱/۵±۰/۵۰	.	.	
ساقه	متانول	.	.	۱/۳±۰/۳۰	.	.	
	هگزان	
	استون	.	۱/۵±۰/۳۰	۳±۰/۵۰	.	.	
	اتیل استات	.	.	۱/۵±۰/۵۰	.	.	

بحث

در تحقیق حاضر عصاره متانولی برگ گیاه تاجریزی نسبت به عصاره هگزانی، اتیل استات و استونی برگ فعالیت ضدباکتریایی بهتری با میزان ۱۲/۵ppm بر باکتری *Streptococcus iniae* نشان داد و در باکتری *Aeromonas hydrophila* و *Yersinia ruckeri* این میزان ۲۵ ppm بود. اثرات ضد باکتریایی گیاه تاجریزی روی باکتریهای گرم منفی *Xanthomonas* و *Aeromonas hydrophila* نشان داده که عصاره متانولی برگ این گیاه فعالیت بازدارندگی بر این گونه های باکتریایی در دامنه غلظت ۶۴ μg/ml تا ۱۲۸ دارند و قطر هاله عدم رشد به ترتیب ۱۵ و ۱۲ میلی متر بوده است (JohndeBritto et al., 2011). همچنین عصاره هگزانی برگ گیاه تاجریزی بر باکتری *Streptococcus iniae* و عصاره هگزانی میوه این گیاه بر باکتری *Aeromonas hydrophila* تاثیر باکتریواستاتیکی و باکتریسیدی نداشتند. عوامل متعددی در اثرات ضد میکروبی یک گیاه موثر است عواملی چون میزان اسانس یا عصاره گیاه، روش عصاره گیری و نوع حلال مورد استفاده، نوع محیط کشت و مواد موجود در آن می تواند بر اثرات ضد میکروبی گیاه اثر بگذارد (Rastogi and Mehrotra, 2002). حلال های قطبی مانند متانول درصد بالاتری از مواد استخراج شده به همراه ترکیبات قطبی را در مقایسه با دیگر حلال ها دارند (Marzouk et al., 2011). یافته های تحقیق حاضر نشان داد که عصاره اتیل استات میوه و ساقه گیاه تاجریزی در غلظت های مورد آزمایش تاثیر ضد باکتریایی بر باکتری *Streptococcus iniae* نشان ندادند ولی در غلظت ۲۵ppm مانع از رشد باکتری *Aeromonas hydrophila* و *Yersinia ruckeri* شده است. همچنین نتایج نشان داد که عصاره اتیل استات برگ این گیاه بر باکتری *Streptococcus iniae* تاثیر ضد باکتریایی در غلظت ۲۵ ppm داشته است و باکتری *Yersinia ruckeri* نسبت به همه عصاره های بخش های برگ، ساقه و میوه گیاه تاجریزی در غلظت ۲۵ ppm حساسیت نشان داده است. در تحقیقی اثر ضد باکتریایی عصاره اتانولی، هگزانی و کلروفورمی برگ و ریشه گیاه تاجریزی بر پاتوژن های باکتریایی *Escherchia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* و *Staphylococcus aureus* مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد عصاره اتانولی این گیاه فعالیت بازدارندگی بهتری بر رشد گونه های پseudomonas ارجینوس و استافیلوکوکوس آئوروس داشته و این عصاره حداقل بازدارندگی

را بر گونه های استافیلوکوکوس آئوروس و شیگلا فلکسینری نشان داده است. همچنین فعالیت ضد باکتریایی عصاره هگزانی این گیاه حداقل بازدارندگی را بر علیه باکتری شیگلا فلکسینری، کلبسیلا پنومونیا، استافیلوکوکوس آئوروس و پseudomonas ارجینویس داشته است و در مورد عصاره کلروفورمی حداکثر بازدارندگی بر باکتری ویبریو کلرلا، pseudomonas و انتروکوکوس فسالیس مشاهده شده است (Yogananth *et al.*, 2012). در تحقیقی فعالیت ضد باکتریایی به ترتیب عصاره متانولی میوه، دانه، پوست و میوه گیاهان دارویی (*Terminalia chebula*, *Syzygium cumini*, *Solanum nigrum*, *Albizi lebbeck*) بر علیه باکتریهای روده ای با تاکید بر گونه ویبریو بررسی و نشان داده شده که همه گونه های گیاهی فعالیت ضد باکتریایی داشته اند و حداقل غلظت بازدارندگی عصاره ها از رنج ۰/۱۲۵ تا ۳۲ و MBC آن ها از رنج ۰/۲۵ تا ۳۲ بوده است (Alishahi *et al.*, 2009). فعالیت ضد باکتریایی عصاره متانولی میوه گیاه تاج ریزی دارای حداقل غلظت بازدارندگی ۸ ppm بوده است و در مقایسه با حداقل غلظت بازدارندگی عصاره متانولی میوه این گیاه بر علیه باکتریهای مورد آزمایش در تحقیق حاضر (۲۵ppm) کمتر بوده است. این یافته ها مشابه تحقیقات دیگران فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی محصولات طبیعی بر علیه طیف گسترده ای از میکروارگانسیم ها را مخصوصاً اعضای خانواده Solanaceae را نشان می دهد (Marzouk *et al.*, 2011). ترکیبات فعال گلیکوالکالوئیدها، گلیکوپروتئین ها، پلی ساکاریدها، تریپنئوئیدها، فلاونوئیدها، تانین ها ترکیبات پلی فنلی در برگ و میوه و تریپنئوئیدها، استرول ها، ساپونین ها و فلاونوئیدها در ساقه این گیاه می باشد (Penna *et al.*, 2001). احتمالاً این ترکیبات لپیدهای غشای سلول باکتری و میتوکندری آنها را تخریب کرده که باعث خروج مولکول های حساس و یونها و مرگ باکتری می شود (Rodriguez *et al.*, 2005). نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره متانولی برگ و عصاره استونی میوه گیاه تاج ریزی بیشترین تاثیر را علیه باکتری آئروموناس هیدروفیلا دارد که در این میان می توان با آزمایش های تکمیلی به ترکیبات گیاهی موثری دست یافت امید است نتایج این تحقیق در کنار سایر آزمایش ها در رسیدن به اهداف مدیریت بیماری در آبزیان مثمر ثمر باشد.

منابع

- Aibinu, I.E., Akinsulier, R.O., Adenipekun, T., Adelowotan, T., Odugbemi, T. 2007. Invitro antimicrobial activity of crude extracts from plants *Bryophyllum pinnatum* and *Kalanchoe crenata*. African Journal of Traditional. 4: 338-344.
- Alishahi, M., Soltani, M., Zargar, A. 2009. Study of bacterial mortality of grass carp in Khuzestan, Iranian Veterinary Journal. 5(1): 25- 34.(in Persian).
- Austin, B. 2005. Bacterial pathogens of marine fish. In: Oceans and Health, Pathogens in the Marine Environment. Belkin, S., Colwell, R.R., (eds.). Springer, New York, USA. pp. 391-413.
- Fang, H.M., Ling, K.C., Ge, R., Sin, Y.M. 2000. Enhancement of productive immunity in blue gourami, *Tichogastertrichopterus* (Pallas), against *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio anguillarum* by *A. hydrophila* major adhesion. Journal of Fish Diseases. 23(2):137-145.
- JohndeBritto, A., Gracelin, D., Jeyarathnakumar, P. 2011. Antimicrobial activity of a few medicinal plants against gram negative bacteria. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutigal Technology. 2(3):457-461.
- Marzouk, B., Marzouk, Z., Mastouri, M., Fenina, N., Aouni, M. 2011. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of *Citrullus colocynthis* immature fruit and seed organic extracts. African Journal Biology. 10: 2130-2134.
- Méndez, J., Guijarro, A. 2013. *In vivo* monitoring of *Yersinia ruckeri* in fish tissues: progression and virulence gene expression. Environmental Microbiology Reports. 5(1): 179-185.
- Mainasarsa, M.M., Aliero, B.L., Aliero, A.A., Yakubu, M. 2012. Phytochemical and antibacterial properties of root and leaf extracts of *Calotropis procera*. Nigerian Journal of Basic Applcal Science. 20: 1-6.
- Muyima, N.Y.O., Nziweni, S., Mabinya, L.V. 2004. Antimicrobial and antioxidant activities of *Tagetesmimuta*, *Lippiajavanica*, and *Foeniculum vulgare* essential oils from eastern capeprovince of South Africa. Journal of Essential Oil-Bearing Plants. 7: 68-78.

- Nostro, A., Gernano, M.P., Angelo, V.A., Marino, A., Cannatelli, M.A. 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Applied Microbiology*. 30: 379-384.
- Penna, C., Marino, S., Viroto, E., Cruanes, M.C., Munoz, J., Cruanes, J. 2001. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases, Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*, *Journal Ethnopharmacol.* 77: 37- 40.
- Rastogi, R.P., Mehrotra, B.N. 2002. Glossary of Indian Medicinal Plants. National Institute of science communication, New Delhi, India. pp: 20-25.
- Rodriguez, D.J., Castillo, D.H., Garcia, R.R., Sanchez, J.L.A. 2005. Antifungal activity of *Aloe Vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*. 21: 81-87.
- Roy, P.E., Ruth, F.F. 2013. Streptococcal infections of fish. *Institute of Food and Agriculture Sciences*. p. 57. <https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/FA/FA05700>.
- Singh, A., Singh, R.K., Bhunia, A.K., Singh, N. 2003. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against, *Listeria monocytogenes* in hotdogs, *Lebensmittel- Wissenschaft und-Technologie*. 36(8): 787-799.
- Sridhar, T.M., Josthna, P., Naidu, C.V. 2011. *In vitro* antibacterial activity and phytochemical analysis of *Solanum nigrum* (Linn.) - An important antiulcer medicinal plant. *Journal of Experimental Sciences*. 2(8): 24-29.
- Swann, L., Randy, M. 1989. Diagnosis and treatment of *Aeromonas hydrophila* infection of fish, aquaculture extension. Indiana Sea Grant Program. Fact Sheet AS-461.
- Tobback, E. 2009. Early pathogenesis of *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, walbaum). PhD thesis. Veterinary sciences. Faculty of veterinary medicine. Ghant University. pp:1-55.
- Velmurugan, S., Viji, V.T., Babu, M.M., Punitha, M.J., Citarasu, T. 2012. Antimicrobial effect of *Calotropis procera* active principles against aquatic microbial pathogens isolated from shrimp and fishes. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedical*. 2: 812-817.
- Yogananth, N., Buvaneswari, S., Muthezhilan, R. 2012. Larvicial and antibacterial activities of different solvent extracts of *Solanumnigrum* LINN. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistery*. 7(3): 86-89.