مقایسه اثرات آنتی‌باکتریال و هم‌افزایی برخی گیاهان دارویی علیه باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*

ساناز حکمتی نیا[1]، سیده ام‌البنین قاسمیان*[2]، حمید محمودی پور[3]

١- گروه دامپزشکی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران.
٢- گروه دامپزشکی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران.
٣- گروه پرستاری و مامایی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران.

دریافت مقاله: ٢٣ آبان ١۴٠١، بازنگری: ٢٨ دی ١۴٠١، پذیرش نهایی: ٢٧ فروردین ١۴٠٢

چکیده

باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* یک باکتری فرصت‌طلب است که با استفاده از گیاهان دارویی می‌تواند موجب کاهش روند استفاده از داروهای شیمیایی و سنتزی جهت مهار رشد آن در مواد غذایی گردد. با توجه به خاصیت آنتی‌باکتریال سه گیاه بومادران، اسطوخودوس و آویشن، این مطالعه با هدف بررسی اثرات آنتی‌باکتریال و هم‌افزایی این سه گیاه علیه باکتری آئروموناس هیدروفیلا صورت گرفت. برای انجام این مطالعه ابتدا باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* از نمونه‌های ماهی تهیه و با روش‌های بیوشیمیایی و PCR تأیید گردید. سپس عصاره‌گیری به روش ماسراسیون انجام شد و میزان حساسیت باکتری‌های جداشده به روش انتشار از دیسک در محیط کشت مولر هینتون بررسی گردید. همچنین حداقل غلظت مهاری گیاهان دارویی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده میزان شیوع باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* ۵ درصد بود. باکتری‌های جداشده نسبت به همه آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاومت داشتند. کمترین غلظت مهاری و کمترین غلظت کشندگی مربوط به گیاه بومادران بود که نشان از اثرات آنتی‌باکتریال قوی‌تر آن نسبت به دو گیاه دیگر دارد. بیشترین غلظت کشندگی برای گیاه اسطوخودوس گزارش شد که این اختلاف نسبت به دو گیاه دیگر از نظر آماری معنی‌دار ($p<0/05$) بود. به‌طور کلی، ردیابی میزان شیوع این عوامل بیماری‌زا در آبزیان در کنار بررسی میزان شیوع مقاومت دارویی و بکارگیری درمان‌های جایگزین همچون استفاده از گیاهان دارویی دارای خواص ضد میکروبی که بتواند بر مقاومت‌های دارویی غلبه نماید و از شیوع بیشتر این عوامل در صنعت پرورش آبزیان جلوگیری نماید ضروری به نظر می‌رسد.

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

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: ghasemian1249@yahoo.com

مقدمه

باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* یک باکتری فرصت‌طلب بیماری‌زا در انسان‌ها و آبزیان می‌باشد، که 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 (۱، ۲). بررسی متون علمی نشان داده که آئروموناس‌ها به‌عنوان پاتوژن‌های ماهی‌ها بوده و تشخیص پاتوژن اولیه از فرصت‌طلب یا آلاینده اغلب دشوار است. همچنین این باکتری از منابع متعددی همچون گوشت، آب، شیر خام و سبزیجات جدا شده است و به علت توانایی بالای تعدادی از سویه‌های آن در دماهای بسیار پایین، 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 با حرارت ملایم نیز از بین می‌رود. لذا آلودگی ناشی از این باکتری به‌وسیله محصولات خام و یا آب آلوده به مواد غذایی منتقل می‌گردد. اما اصلی‌ترین منبع این باکتری محیط‌های آبی همچون دریاچه‌های آب شیرین، چشمه‌ها و سیستم فاضلاب است (۲- ۵).

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 ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها رخ می‌دهد (۶). 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 بتالاکتازمازها هستند، در حال افزایش است (۷). از زمان پیدایش آنتی‌بیوتیک‌های مختلف شاهد روند ایجاد مقاومت در باکتری‌های بیماری‌زا نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها بوده‌ایم (۸، ۹). از این جهت 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 داشته‌اند. به دنبال شکل‌گیری مقاومت دارویی علیه آنتی‌بیوتیک‌های رایج و وجود مشکلات معمول در ساخت داروهای نوین و همچنین عوارض پایین گیاهان دارویی، استفاده از درمان‌های طبیعی طی سال‌های گذشته روند افزایشی داشته است. در حال حاضر چنین برآورده می‌شود که ۸۰ درصد از جمعیت جهان در راستای بهبود سلامت خود از گیاهان دارویی منطقه جغرافیایی خویش بهره می‌گیرند (۸).

بومادران یک 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 (۱۰، ۱۱). عصاره به دست آمده از این گیاه دارای خواص دارویی از جمله خواص ضد باکتریایی و ضد التهابی و ضد تورم می‌باشد که در تهیه لوازم آرایشی و بهداشتی و دارویی از جمله کرم و پمادهای پوستی کاربرد دارد (۱۲). عصاره‌ای که از بومادران به دست می‌آید برای درمان طیف گسترده‌ای از عفونت‌های ناشی از پاتوژن‌های انسانی و حیوانی کاربرد دارد (۱۳).

اسطوخودوس یا لاوندر با نام علمی *لاوندولا آگوستفولیا* غالباً به‌منظور 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 به‌طور معمول در گیاهان دارویی از جمله اسطوخودوس یافت می‌شوند فلاونوییدها هستند. طبق مطالعات صورت گرفته، فلاونوئیدها اثرات دارویی متعددی مانند 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 کارآیی مناسبی دارند (۱۴- ۱۶).

آویشن گیاهی علفی است که شاخه‌های متعدد و چوبی دارد. گیاه آویشن به شکل محدود و برای مصارف دارویی در برخی مناطق ایران کشت می‌گردد. این گیاه به علت تأثیرات ضدگرفتگی و خلط‌آور در اختلالات تنفسی و سرماخوردگی کاربرد دارد (۱۷). نتایج مطالعات نشان می‌دهد که گیاه آویشن یک ضد قارچ، ضد درد و التهاب، برطرف کننده آفت‌های دهانی، اثرات آنتی‌اکسیدانی و مؤثر بر مشکلات گوارش و قلبی است. به علاوه مشخص شده است که آویشن دارای خاصیت آنتی‌باکتریال، ضد ویروسی و ضد انگلی نیز می‌باشد (۱۸).

با توجه به خاصیت آنتی‌باکتریال سه گیاه بومادران، اسطوخودوس و آویشن این مطالعه با هدف بررسی و مقایسه اثرات آنتی‌باکتریال و هم‌افزایی این سه گیاه دارویی علیه باکتری زئونوز آئروموناس هیدروفیلا صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره‌های مورد مطالعه: جهت به دست آوردن عصاره از گیاهان بومادران، اسطوخودوس و آویشن از روش ماسراسیون استفاده شد (۱۹). به این منظور بعد از تأیید اصالت و کیفیت، گیاهان توسط آسیاب برقی پودر شدند و بعد از اضافه نمودن آب به میزان کافی اتانول ۷۰ درصد به نسبت ۱ به ۴ اضافه گردید، سپس محلول به‌دست آمده به مدت ۳ روز نگهداری گردید. در مرحله بعد با استفاده از دستگاه روتاری از محلول حاصله عصاره‌گیری صورت گرفت و از طریق گرمخانه‌گذاری خشک و تراشیده شدند. در مرحله آخر برای به‌دست آوردن غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هر عصاره میزان مناسبی از عصاره در محلول نرمال سالین حل گردید.

تهیه باکتری و ذخیره سازی: باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* از نمونه‌های ماهی تهیه و با روش‌های بیوشیمیایی و PCR تأیید گردید، تعداد چهار تا پنج کلنی از باکتری به محیط TSB که به آن مقدار ۲۰ درصد گلیسرول افزوده شده است، انتقال داده شد و به مدت زمان ۲ ساعت در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید، کدر شدن محیط کشت نشانگر رشد باکتری بود. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در دمای ۷۰- نگهداری شدند.

بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن: روش دیسک دیفیوژن آگار که یک روش معمولی و رایج برای ارزیابی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی است. به این منظور پس از تهیه سوسپانسیون باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* به روش نیم مک فارلند آن را بر روی پلیت مولر هینتون آگار منتقل نموده و سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک را به‌ترتیب به‌وسیله پنس استریل بر سطح پلیت قرار داده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه مقاومت یا حساسیت را بر اساس اندازه‌گیری منطقه عدم رشد بررسی نمودیم (۲۰).

تعیین کمترین غلظت کشندگی (MIC) عصاره حاصل از سه گیاه بومادران، آویشن شیرازی و اسطوخودوس بر مبنای نتایج به‌دست آمده در روش MIC و بر اساس روش توصیه شده CLSI صورت پذیرفت و پایین‌ترین غلظت از آنتی‌بیوتیک که مانع رشد باکتری می‌شد به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد.

بررسی اثرات هم‌افزایی گیاهان دارویی و آنتی‌بیوتیک: اثرات آنتی‌باکتریال عصاره حاصل از سه گیاه دارویی بومادران، اسطوخودوس و آویشن شیرازی با آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل علیه باکتری‌های *آئروموناس هیدروفیلا* جداسازی شده در سه تکرار بررسی گردید. جهت ارزیابی اثرات هم‌افزایی عصاره‌های مذکور، از روش صفحه شطرنجی بهره گرفتیم. در این روش اثرات آنتی‌باکتریال ترکیب داروهای مختلف با آنتی‌بیوتیک‌های

رایج در سه تکرار بررسی می‌شود. غلظت‌های مورد نظر شامل ۳ غلظت کمتر از MIC، مساوی با آن و ۳ غلظت بیشتر از آن در نظر گرفته می‌شوند. در روش صفحه شطرنجی، اثر هم‌افزایی با محاسبه اندیس کمترین غلظت کسری مهاری (FIC) تعیین می‌گردد. 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 به‌اضافه کمترین غلظت کسری مهاری داروی دوم. در صورتی که این مقدار کمتر از ۰/۵ باشد شاهد اثر هم‌افزایی بوده و در صورتی که این مقدار بیشتر از ۴ باشد شاهد اثرات آنتاگونیسم هستیم (۱۴).

تجزیه تحلیل داده‌ها: پس از اتمام گردآوری داده‌ها و کسب اطمینان از صحت ورود داده‌ها، تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نسخه ۲۵ نرم‌افزار SPSS انجام شد. داده‌ها بر اساس میانگین ± انحراف استاندارد ارائه شد. همچنین داده‌ها کمی با استفاده از واریانس یک طرفه از نظر معنی‌دار بودن مورد بررسی قرار گرفتند. در آزمون‌های انجام شده ضریب اطمینان ۹۵ درصد در نظر گرفته شد.

نتایج

در کل از ۶۰ مزرعه بررسی شده در ۳ مورد میزان شیوع باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهی قزل‌آلا با استفاده از روش‌های میکروبیولوژی ردیابی شد و مورد تأیید PCR قرار گرفت. همچنین از کل نمونه‌ها تنها در ۳ نمونه تشخیص قطعی *آئروموناس هیدروفیلا* داده شد.

میزان حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها به روش انتشار از دیسک: آنتی‌بیوتیک‌های فلورفنیکل، انروفلوکساسین، تتراسایکلین و تریمتوپریم و سولفامتوکسازول به‌عنوان آنتی‌بیوتیک‌های معمول در صنعت آبزیان و تأثیرگذار بر باکتری‌های گرم‌منفی مورد سنجش قرار گرفت، که نتایج مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها در سه دسته حساس، متوسط و مقاوم در جدول شماره ۱ ارائه شده است. میزان حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داد که دو مورد از سه باکتری جدا شده حساسیت به آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل داشته، در خصوص انروفلوکساسین یک سویه حساس یک سویه با مقاومت نسبی و یک سویه مقاوم بوده و برای آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین دو سویه دارای مقاومت نسبی و یک سویه مقاوم بوده است و در نهایت برای آنتی‌بیوتیک تریمتوپریم به همراه سولفامتوکسازول هر سه سویه به این آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند.

جدول ۱- وضعیت مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد سنجش (تعداد: ۳)

نام آنتی‌بیوتیک	حساس	مقاومت نسبی	مقاوم
فلورفنیکل	۲	۱	۰
انروفلوکساسین	۱	۱	۱
تتراسایکلین	۰	۲	۱
تریمتوپریم + سولفامتوکسازول	۰	۰	۳

اندیس مقاومت چندگانه یا Multiple antibiotic resistance : اندیس مقاومت چندگانه به نسبت آنتی‌بیوتیک‌های مقاوم به تعداد کل آنتی‌بیوتیک‌ها گفته می‌شود و متوسط آن برای باکتری‌های جدا شده محاسبه می‌گردد. لازم به ذکر است باکتری‌هایی که در آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی در دسته متوسط قرار می‌گیرند،

در اندیس مقاومت چندگانه به‌عنوان مقاوم در نظر گرفته شدند. مقادیر بالاتر از ۰/۲ نشانه‌ای از وجود مقاومت چندگانه باکتریایی تلقی می‌شود. جدول شماره ۲ اندیس مقاومت چندگانه را نشان می دهد. بر اساس نتایج به‌دست آمده در سه باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و تریمتوپریم به همراه سولفامتوکسازول مقاوم بوده‌اند.

جدول ۲- اندیس مقاومت چندگانه در آنتی‌بیوتیک‌های مورد سنجش علیه باکتری *ائروموناس هیدروفیلا*

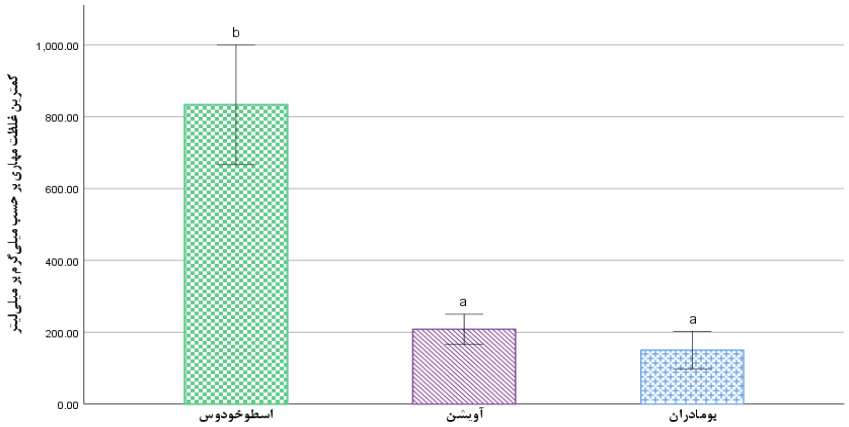
نام آنتی‌بیوتیک	تعداد باکتری‌های مقاوم	تعداد کل باکتری‌ها	اندیس مقاومت چندگانه
انروفلوکساسین	۲	۳	۰/۶۶
فلورفنیکل	۱	۳	۰/۳۳
تتراسایکلین	۳	۳	۱
تریمتوپریم + سولفامتوکسازول	۳	۳	۱

کمترین غلظت مهاری یا Minimum inhibitory concentrations: نتایج اثر ضد باکتریایی عصاره گیاهان دارویی اسطوخودوس، بومادران و آویشن به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه آنالیز گردید و نتایج در جدول شماره ۳ و نمودار شماره ۱ 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. همچنین بیشترین غلظت مهاری مربوط به گیاه اسطوخودوس است، به طوری‌که این اختلاف نسبت به گیاهان دیگر معنادار ($p<۰/۰۵$) بوده است. بنابراین گیاه اسطوخودوس کمترین خواص آنتی‌باکتریال را نسبت به گیاهان دیگر دارد.

جدول ۳- کمترین غلظت مهاری عصاره هیدروالکلی گیاهان دارویی علیه باکتری *ائروموناس هیدروفیلا*

نام گیاه	کم‌ترین غلظت مهاری برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	خطای استاندارد	P-value
اسطوخودوس	۸۳۳/۳	۱۶۶/۶	<۰/۰۵
آویشن	۲۰۸/۳	۴۱/۶	
بومادران	۱۵۰/۰	۹۰/۱	

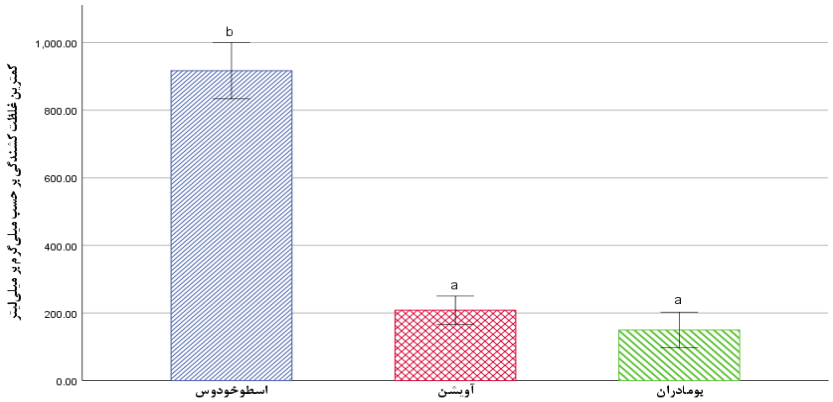


نمودار ۱- کمترین غلظت مهاری عصاره هیدروالکلی اسطوخودوس، بومادران و آویشن علیه باکتری *ائروموناس هیدروفیلا* جداسازی شده ($p<۰/۰۵$).

کمترین غلظت کشندگی یا Minimum bactericidal concentrations : اثر کشندگی باکتریایی، پس از آنالیز آماری به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه در جدول شماره ۴ و نمودار شماره ۲ ارائه شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده کمترین غلظت کشندگی مربوط به گیاه بومادران بوده است که نشان از اثرات آنتی‌باکتریال قوی‌تر این گیاه نسبت به دو گیاه دیگر دارد. همچنین بیشترین غلظت کشندگی مربوط به گیاه اسطوخودوس بود، به‌طوری‌که این اختلاف نسبت به دیگر گیاهان دارویی معنادار ($p<۰/۰۵$) بوده است.

جدول ۴- کمترین غلظت کشندگی عصاره هیدروالکلی گیاهان دارویی علیه باکتری *ائروموناس هیدروفیلا* جدا شده

نام گیاه	کم‌ترین غلظت مهاری برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	خطای استاندارد	P-value
اسطوخودوس	۹۱۶/۷	۸۳/۳	<۰/۰۵
آویشن	۲۰۸/۳	۴۱/۶	
بومادران	۱۵۰/۰	۹۰/۱	



نمودار ۲- کمترین غلظت کشندگی عصاره هیدروالکلی اسطوخودوس، بومادران و آویشن علیه باکتری *ائروموناس هیدروفیلا* جداسازی شده ($p<۰/۰۵$).

بررسی اثرات هم‌افزایی گیاهان دارویی و آنتی‌بیوتیک: اثرات آنتی‌باکتریال گیاهان دارویی با آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل علیه باکتری‌های *ائروموناس هیدروفیلا* در سه تکرار بررسی گردید. علت انتخاب فلورفنیکل از بین داروهای مورد بررسی پایین بودن اندیس مقاومت چندگانه آن نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی بوده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده در بین ترکیبات مورد سنجش اثر هم‌افزایی مشاهده نشد. جدول شماره ۵ نتایج این بخش را نشان می‌دهد.

جدول ۵- بررسی خواص هم‌افزایی گیاهان دارویی مختلف در ترکیب با آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل

نام	ترکیبات دارویی	کمترین غلظت مهاری برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر		کمترین غلظت کسری مهاری	اندیس کمترین غلظت کسری مهاری
		به‌تنهایی	در ترکیب		
ترکیب اول	فلورفنیکل	۰/۰۰۰۷۵	۰/۰۰۰۷۵	۱/۰	۱/۹۱
	اسطوخودوس	۸۳۳/۳	۷۵۵/۲	۰/۹۱	
ترکیب دوم	فلورفنیکل	۰/۰۰۰۷۵	۰/۰۰۰۵۰	۰/۶۷	۱/۶۳
	بومادران	۲۰۸/۳	۲۰۰/۹	۰/۹۶	
ترکیب سوم	فلورفنیکل	۰/۰۰۰۷۵	۰/۰۰۰۷۵	۱/۰	۱/۸۴
	آویشن	۱۵۰/۰	۱۲۵/۳	۰/۸۴	

بحث

عفونت‌های باکتریایی از جمله عوامل اصلی مرگ و میر در آبزیان می‌باشند. باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* یکی از این عوامل است که در گونه‌های متعددی از ماهیان آب شیرین موجب بیماری می‌گردد. عفونت ناشی از این باکتری در همه نقاط جهان شایع است. شیوع جهانی این باکتری در کنار مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی که به شکل روزافزونی در حال افزایش است، لزوم طرح‌ریزی سیاست‌های کارآمد درمانی را مشخص می‌نماید (۲۱، ۲۲). با توجه به اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های گیاهی می‌توان از این گیاهان به‌عنوان ترکیباتی جایگزین برای مهار باکتری‌ها در صنایع غذایی استفاده نمود (۲۳). نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر نشان دهنده شیوع ۵ درصدی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* می‌باشد. میزان حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داد که هر سه سویه جدا شده نسبت به آنتی‌بیوتیک تریمتوپریم به همراه سولفامتوکسازول مقاوم بودند. همچنین نسبت به همه آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاومت چندگانه باکتریایی داشتند. کمترین غلظت مهاری و کمترین اثر کشندگی باکتریایی مربوط به گیاه بومادران بود که نشان از اثرات آنتی‌باکتریال قوی‌تر این گیاه نسبت به دو گیاه دیگر دارد. همچنین بیشترین غلظت مهاری و بیشترین اثر کشندگی باکتریایی مربوط به گیاه اسطوخودوس بود، آنالیز آماری نشان داد که اسطوخودوس به‌طور معنی‌داری کمترین خواص آنتی‌باکتریال را نسبت به دو گیاه دیگر دارد. در نهایت در بین ترکیبات مورد سنجش، اثر هم‌افزایی مشاهده نشد.

Abd-El-Malek و همکاران *آئروموناس هیدروفیلا* را در ۲۲ نمونه از ۳۵ نمونه ماهی خام شناسایی کرده‌اند (۲۴). Hussien و همکارش شیوع *آئروموناس هیدروفیلا* را در نمونه‌های تازه ماهی ۹ درصد (۲۵) و Elshahid و همکاران ۱۶ درصد در ماهی‌های آب شیرین (۲۶) گزارش کردند. به‌طور مشابه، بسیاری از محققین اشاره کردند که *آئروموناس هیدروفیلا* رایج‌ترین ایزوله در غذاهای با منشاء حیوانی است (۲۷). همچنین در داخل کشور فدایی‌فرد *آئروموناس هیدروفیلا* را در ماهیان قرمز آکواریومی و قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی استان چهارمحال و بختیاری شناسایی کردند (۲۸). گیلانی و همکاران با مراجعه به ۷۱ مزرعه پرورش ماهی گرم مختلف استان گیلان ۱۵ مورد *آئروموناس هیدروفیلا* را شناسایی نمودند (۲۹). نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر نشان‌دهنده شیوع ۵ درصدی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در میان ماهیان می‌باشد. به‌طور کلی تراکم بسیار ماهی‌ها، تغییرات ناگهانی درجه حرارت آب، دستکاری ماهی، حمل و نقل، کم شدن اکسیژن، کمبودهای تغذیه‌ای، آلودگی انگلی و قارچی در پوست ماهی‌ها زمینه‌ساز حمله *آئروموناس هیدروفیلا* می‌باشد، که در صورت رعایت نکردن اصول مدیریت بهداشتی در آبزی پروری این باکتری می‌تواند منجر به شیوع تلفات ماهی‌ها و همچنین انتقال آنها به انسان‌ها گردد (۳۰).

احمدی و همکاران نشان دادند که بیش از نیمی از باکتری‌های جدا شده از مدفوع ۹ بیمار (۸/۸ درصد) به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، آموکسی‌کلاو، سفوتاکسیم، سفازیدیم، سفیکسیم، کاناماسین، تتراسایکلین و نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند. تمامی سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک ایمیپنم حساس بوده و پس از آن آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، سفتری‌اکسون، استرپتومایسین، سیپروفلوکساسین و تریمتوپریم سولفامتوکسازول در رده‌های بعدی قرار داشتند (۳۱). در مطالعه دیگری Roges و همکاران ۳۰ ایزوله باکتریایی *آئروموناس هیدروفیلا* از نمونه‌های انسانی شامل خون، مدفوع، ریه، ترشحات چرکی و ترشحات مفصلی و ۲۸ ایزوله از نمونه‌های خوراک شامل گوشت، مرغ، ماهی و حلزون جدا نمودند. در نمونه‌های انسانی بیشترین تعداد باکتری را از مدفوع بیماران درگیر با مشکلات گوارشی جدا نمودند که میزان آن به ۸۶/۷ درصد می‌رسد. در بین نمونه‌های خوراکی بیشترین میزان آلودگی مربوط به پستانداران مهاجر با میزان آلودگی ۸۱/۱ درصد و پس از

آن ماهی با ۶۷/۸ درصد بوده است. در میان این باکتری‌ها بیشترین میزان مقاومت دارویی به‌ترتیب مربوط به آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین، نالیدیکسیک اسید، سفازیدیم و تتراسایکلین بوده و کمترین میزان مقاومت به‌ترتیب در داروهای کلورامفنیکل، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین و آمیکاسین مشاهده شد (۳۲). در مطالعه‌ای دیگر Türe و همکاران نشان دادند که *آئروموناس هیدروفیلا* جدا شده از آبزیان نسبت به فلورفنیکل، تریمتوپریم+ سولفامتوکسازول، اکسی‌تتراسایکلین و انروفلوکساسین حساس و نسبت به لینکومایسین، پنی‌سیلین جی، آموکسی‌سیلین مقاوم هستند (۳۳). نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که هر سه سویه نسبت به آنتی‌بیوتیک تریمتوپریم به همراه سولفامتوکسازول مقاوم هستند. همچنین نسبت به همه آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاومت چندگانه باکتریایی داشتند. مطالعات زیادی در خصوص بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *آئروموناس هیدروفیلا* جدا شده از حیوانات انجام شده است (۳۴). اما باید به این نکته توجه داشت که تفاوت نمایی آنتی‌بیوگرام در مناطق مختلف جغرافیایی بر روی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی منطقه‌ای تأثیر دارد که در درمان تجربی و اختصاصی باید به این مسئله توجه ویژه گردد.

علیشاهی و همکاران گزارش کردند که عصاره آویشن، پوست انار با میزان حداقل غلظت مهارکنندگی برابر ۰/۱۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیشترین خاصیت ضد باکتریایی را روی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* دارد، همچنین عصاره سیاه‌دانه، اسکوتلاریا و زیتون حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی کمتر از ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در برابر این باکتری را داشته‌اند (۳۵). عادل و همکاران نشان دادند که باکتری‌های *استرپتوکوکوس اینیه*، *یرسینیا راکری*، *ویبریو انگویلاروم*، *آئروموناس هیدروفیلا* و *سودوموناس آئروجینوزا* و چهار قارچ بیماری‌زای *ساپرولگنیا*، *فوزاریوم سولانی*، *کاندیدیا آلبیکنز* و *آسپرژیلوس فلاوس* نسبت به اسانس بومادران حساسیت بیشتری را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کنترل دارند. علاوه بر این، حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس مورد مطالعه در محدوده ۱۲۵ تا ۸۰۰ میکروگرم بر لیتر تعیین شد که قادر به مهار رشد باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زای مذکور بود (۳۶). Deepika و همکاران گزارش کردند که هر چند فلاونوئید روتین به تنهایی هیچ اثر ضد باکتریایی علیه *آئروموناس هیدروفیلا* ندارد اما اثرات مهاری فلورفنیکل را تا چهار برابر افزایش داده است. همچنین تجویز فلورفنیکل به همراه روتین در بیماران مبتلا به *آئروموناس* باعث بهبود عملکرد سیستم ایمنی و فعالیت‌های ضد پروتئاز و ضد لیزوزیم و استرس اکسیداتیو شده است (۳۷). Bandeira Junior مشخص نمود که کارواکرول و تیمول بیشترین اثرات آنتی‌باکتریال را دارند و ترکیب‌های لینالئول + فلورفنیکل یا اکسی‌تتراسایکلین علیه *آئروموناس* و سیترات + اکسی‌تتراسایکلین علیه *سیتروباکتر فرونتی* الگوی هم‌افزایی نشان داده‌اند (۳۸). در مطالعه Kot و همکاران تمامی سویه‌های *آئروموناس سالمونیسیدا* به دنبال مصرف سینامالدهید کاهش یافته است به‌طوری که اثر مهاری آن با اکسی‌تتراسایکلین قابل مقایسه بوده است. به‌علاوه ترکیب‌های سینامالدهید به اضافه عصاره آویشن و سینامالدهید به اضافه عصاره میخک در مهار باکتری‌های مورد بررسی اثرات هم‌افزایی نشان داده‌اند. بیشترین خاصیت باکتری‌کشی در ترکیب سینامالدهید و عصاره آویشن مشاهده گردید (۳۹). نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان داد که گیاه بومادران اثرات آنتی‌باکتریال قوی‌تر نسبت به دو گیاه دیگر با کمترین غلظت مهاری و کمترین اثر کشندگی باکتریایی دارد. در پژوهش‌های متعدد دیگری خواص آنتی‌باکتریال عصاره‌های گیاهی بر باکتری‌های بیماری‌زا مورد مطالعه قرار گرفته و مشخص گردیده است که عفونت‌هایی که به دلیل مواد غذایی آلوده به عوامل پاتوژن ایجاد می‌شوند، تاثیر به‌سزایی در بهداشت و سلامت عمومی دارند. به منظور کاهش ضررهای اقتصادی و مرگ و میر ناشی از این عوامل، بکارگیری ترکیبات طبیعی به‌عنوان ترکیبات

ضد میکروبی یک رویکرد تأثیرگذار جهت کنترل عوامل بیماری‌زا و بالا بردن طول دوره نگهداری غذاهای فراوری شده است (۳۴، ۳۸، ۳۹). در این بین عصاره‌های به‌دست آمده از برخی گیاهان، یک منبع غنی از ترکیبات ضد میکروبی هستند که واجد اثرات ضد باکتریایی می‌باشند.

ظهور و گسترش چشمگیر مقاومت ضد میکروبی در باکتری‌های پاتوژن، بهداشت و سلامت عمومی را با چالش مواجه نموده است. نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر و سایر پژوهش‌های مشابه نشان می‌دهد که انتخاب نادرست و نابجا از ترکیبات آنتی‌بیوتیکی می‌تواند مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی را در باکتری‌های مختلف گسترش دهد. بکارگیری ترکیبات آنتی‌بیوتیک 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 بجا مانده و اثرات مخرب آنها بر محیط زیست و عوارض منفی که این بقایا بر سلامت انسان‌ها دارند، مانند واکنش‌های ازدیاد حساسیت، آثار سمی، ایجاد عفونت‌های ثانویه و بروز اختلال در متابولیسم با حضور مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و انتقال این مقاومت به عوامل بیماری‌زای انسانی سلامت و بهداشت عموم با تهدیدی جدی مواجه می‌گردد و به دنبال آن ممکن است خسارات غیر قابل جبرانی رخ بدهد. مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت پرورش آبزیان نیز منجر به مختل شدن درمان و تحمیل خسارت‌های اقتصادی زیادی بر پرورش دهندگان می‌گردد. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است به خودی خود آثار سمی برجای نگذارد، اما استفاده طولانی مدت و بیش از حد نیاز این ترکیبات در آبزیان سبب افزایش جمعیت سویه‌های مقاوم در آبزیان، سخت پوستان و میکروفلور آب می‌گردد. مصرف بی‌رویه ترکیبات ضد میکروبی به‌ویژه 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. بنابراین، نظارت بر مقاومت فنوتیپی و ژنوتیپی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در گونه‌های *آئروموناس* 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 به‌وسیله برنامه‌های نظارتی گزارش گردیده است. با این وجود این پژوهش ها عمدتاً به عوامل بیماری‌زای انسانی منحصر شده است و موارد بسیار محدودی در زمینه بروز مقاومت در مواد غذایی و محیط‌های فراوری مواد غذایی و باکتری‌های بیماری‌زا با منشأ آبزیان وجود دارد.

نتیجه‌گیری

بررسی اثر آنتی‌باکتریال و هم‌افزایی سه عصاره اسطوخودوس، بومادران و آویشن بر روی *آئروموناس هیدروفیلای* جدا شده نشان داد که گیاه بومادران اثرات آنتی‌باکتریال قوی‌تر نسبت به دو گیاه دیگر دارد و همچنین گیاه اسطوخودوس به‌طور معنی‌داری کمترین خواص آنتی‌باکتریال را نسبت به دو گیاه دیگر داشت. به‌طور کلی ردیابی میزان شیوع این عوامل بیماری‌زا در آبزیان در کنار بررسی میزان شیوع مقاومت دارویی و بکارگیری درمان‌های جایگزین مانند استفاده از گیاهان دارویی با 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. بنابراین پژوهش‌های جامع‌تر پیرو رویکردهای درمانی کارآمد جهت طرح ریزی سیاست‌های درمانی و پیشگیرانه ضروری است.

References

1- Jamshidian M. Veterinary Clinic Bacteriology and Mycology Guide. edition F, editor. Ahvaz: Ahvaz Shahid Chamran University Press. 1993. [In Persion]

2- Wray C, Wray C, Wray A. Salmonella in Domestic Animals: CABI Pub. 2000.

3- Habibi TR, Mohammad Mahdi. General Zoology of Vertebrates. Edition F, editor. Tehran 2012. 75-8 p. [In Persion]

4- Habibian RI, Khoshdel R. Medicinal Plants Research University of Shahrekord Medical Science. 2005: 63-99. [In Persion]

5- Satari M. Aquatic health and diseases. . Edition F, editor. *Rasht Haqshana Publications*. 1998. [In Persion]

6- Pezzella C, Ricci A, DiGiannatale E, Luzzi I, Carattoli A. Tetracycline and streptomycin resistance genes, transposons, and plasmids in Salmonella enterica isolates from animals in Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004; 48(3): 903-8.

7- Asperilla MO, Smego RA, Scott LK. Quinolone antibiotics in the treatment of Salmonella infections. *Reviews of Infectious Diseases*. 1990; 12(5): 873-89.

8- Kaskhedikar M, Chhabra D. Multiple drug resistance in Aeromonas hydrophila isolates of fish. *Food Microbiol*. 2010; 28: 157-68.

9- Paighan RM. Fishery Basics. edition F, editor. Hamedan: Sepehr Danesh publishing house; 2004. 429. [In Persion]

10- Zhao WH, Hu ZQ. Beta-lactamases identified in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. *Crit Rev Microbiol*. 2010; 36(3): 245-58.

11- Coenye T, Vandamme P. Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. *FEMS Microbiology Letters*. 2003; 228(1): 45-9.

12- Paulsen E. Contact sensitization from Compositae-containing herbal remedies and cosmetics. *Contact Dermatitis*. 2002; 47(4): 189-98.

13- Javidnia K, Miri R, Sadeghpour H. Composition of the volatile oil of Achillea wilhelmsii C. *Koch from Iran*. 2004. [In Persion]

14- Prusinowska R, Śmigielski KB. Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (Lavandula angustifolia L). A review. *Herba Polonica*. 2014; 60(2): 56-66.

15- Da Porto C, Decorti D, Kikic I. Flavour compounds of Lavandula angustifolia L. to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods. *Food Chem*. 2009; 112(4): 1072-8.

16- Cavanagh HM, Wilkinson JM. Lavender essential oil: a review. *Am J Infect Control* 2005; 10(1): 35-7.

17- Raut JS, Karuppayil SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*. 2014; 62: 250-64.

18- Yuan C, Li D, Chen W, Sun F, Wu G, Gong Y, *et al.* Administration of a herbal immunoregulation mixture enhances some immune parameters in carp (Cyprinus carpio). *Fish Physiology and Biochemistry*. 2007; 33(2): 93-101.

19- Gori A, Boucherle B, Rey A, Rome M, Fuzzati N, Peuchmaur M. Development of an innovative maceration technique to optimize extraction and phase partition of natural products. *Fitoterapia*. 2021; 148: 104798.

20- Ferraro MJ. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: *NCCLS*. 2000.

21- Ultee A, Bennik M, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002; 68(4): 1561-8.

22- Raa J. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *Reviews in Fisheries Science*. 1996; 4(3): 229-88.

23- Association APH. Standard methods for the examination of water and wastewater: *American Public Health Association*. 1926.

24- Abd-El-Malek AM. Incidence and virulence characteristics of Aeromonas spp. in fish. *Veterinary World*. 2017; 10(1): 34.

25- Hussien A, Adil M. Aerobic bacterial contamination and shelf life of bagrus bayad fish stored in crushed ice in Khartoum state–Sudan. *Journal of Applied and Industrial Sciences*. 2014; 2(4): 158-65.

26- Elshahid Y, Ibrahim H, Samaha I. Some enteropathogenic bacteria isolated from freshwater fish at Alexandria Province. Proceedings of the 2nd Global Fisheries and Aquaculture Research Conference, Cairo International Convention Center, 24-26 October 2009: *Massive Conferences and Trade Fairs*.

27- Igbinosa IH, Igumbor EU, Aghdasi F, Tom M, Okoh AI. Emerging Aeromonas species

infections and their significance in public health. *The Scientific World Journal*. 2012.

28- Fadaeifard F. Molecular detection of Aeromonas hydrophila in the aquarium gold fish and cultured rainbow trout in Chaharmahal va Bakhtiary province. *Veterinary Clinical Pathology The Quarterly Scientific Journal*. 2014; 8(1): 401-9. [In Persion]

29- Tolouei Gilani J, Goudarztalejerdi A, Yavari M, Nouri Kalourazi M. Isolation and Identification of Aeromonas hydrophila from Cyprinidae Suspected with Hemorrhagic Septicemia in Pools of Warm Water Fishes in Gilan Province. *International Journal of Nutrition Sciences*. 2021; 6(1): 52-8. [In Persion]

30- Fazeli-Nasab B, Saeidi S, Fazeli F, Bidarnamani F, Beigomi Z. Investigation of antimicrobial and antioxidant activity of 4 medicinal plants on 10 standard strains. New Findings in Veterinary Microbiology. 2023;5(2):19-30. [In Persion]

31- Alcaide E, Blasco MD, Esteve C. Mechanisms of quinolone resistance in Aeromonas species isolated from humans, water and eels. *Research in Microbiology*. 2010; 161(1): 40-5.

32- Roges EM, Gonçalves VD, Cardoso MD, Festivo ML, Siciliano S, Berto LH, *et al.* Virulence-associated genes and antimicrobial resistance of Aeromonas hydrophila isolates from animal, food, and human sources in Brazil. *BioMed Research International*. 2020.

33- Türe M, Alp H. Identification of bacterial pathogens and determination of their antibacterial resistance profiles in some cultured fish in Turkey. *Journal of Veterinary Research*. 2016; 60(2): 141-6.

34- Moori Bakhtiari N, Peyghan R, Monzavi F. Determination of isolated Aeromonas hydrophila antibiotic resistance profile from farmed common carp (Cyprinus carpio) in khuzestan province. *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 2017; 25(5): 41-50. [In Persion]

35- Alishahi M, Masoud Q, Hossein N. Antibacterial effects of plant extracts against Streptococcus iniae, Yersinia ruckeri, and Aeromonas hydrophila. *Iranian Veterinary Journal*. 2010; 2: 21-30. [In Persion]

36- Adel M, Amiri A. Chemical compounds and antimicrobial activity of yarrow essential oil against common pathogenic bacteria and fungi in fish. *Journal of Medicinal Plants*. 2015; 6: 65-71. [In Persion]

37- Deepika MS, Thangam R, Vijayakumar TS, Sasirekha R, Vimala RTV, Sivasubramanian S, *et al*. Antibacterial synergy between rutin and florfenicol enhances therapeutic spectrum against drug resistant Aeromonas hydrophila. *Microb Pathog*. 2019; 135: 103612.

38- Bandeira Junior G, Sutili F, Gressler L, Ely V, Silveira B, Tasca C, *et al*. Antibacterial potential of phytochemicals alone or in combination with antimicrobials against fish pathogenic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2018; 125(3): 655-65.

39- Kot B, Kwiatek K, Janiuk J, Witeska M, Pękala-Safińska A. Antibacterial activity of commercial phytochemicals against aeromonas species isolated from fish. *Pathogens*. 2019; 8(3): 142.

Comparison of antibacterial and synergistic effects of some medicinal plants against the zoonotic bacterium (*Aeromonas hydrophila*)

Sanaz Hekmatinia[1], Seyedeh Ommolbanin Ghasemian[2]*, Hamid Mahmoodipour[3]

1 - Department of Veterinary, Shoushtar Branch, Islamic Azad University, Shoushtar, Iran.
2 - Department of Veterinary, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan, Iran.
3 - Department of Nursing and Midwifery, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan, Iran.

Receive: November 14, 2022; Revise: January 18, 2023; Accept: April 16, 2023

Summary

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, seems necessary.

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