فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال پنجم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۶

اثرات سمیت حاد (LC_{50}) عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس بر بافت کبد و بافت آبشش ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*) و فعالیت ضدباکتریایی آن علیه *Aeromonas hydrophila*

سید محمد صادق رودبارکی[۱]*، هادی ارشاد [۲]، حسین خارا [۳]، مهدی معصوم‌زاده[۴]

تاریخ دریافت: بهمن ۹۴ تاریخ پذیرش: خرداد ۹۵

چکیده

هدف از مطالعه حاضر، تعیین سمیت حاد یا غلظت کشندگی (LC_{50} ۹۶ ساعته) عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس در بچه‌ماهیان آمور *Ctenopharyngodon idella* و بررسی تاثیر این عصاره بر روی باکتری *Aeromonas hydrophila* بوده است. ۱۸۰ قطعه بچه ماهی آمور با میانگین وزنی ۵ گرم به صورت تصادفی در ۵ گروه تیمار با غلظت‌های ۲۰۰۰، ۲۳۰۰، ۲۶۰۰، ۳۰۰۰ و ۳۵۰۰ppm عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس و یک گروه شاهد تقسیم شدند (هر گروه با سه تکرار). محدوده کشندگی مقادیر عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس در مدت زمان ۹۶ ساعت به روش لگاریتمی برابر ppm ۲۴۷۸/۵۶ تعیین شد. مطالعات آسیب‌شناسی بافت‌های آبشش و کبد بچه‌ماهیان آمور که در معرض غلظت تحت کشنده عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس قرار داشتند نشان دهنده بیشترین ضایعات شامل پرخونی و خونریزی بود. برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) از روش رقت لوله‌ای و برای تعیین حداقل غلظت کشندگی ماده ضدمیکروبی (MBC) از محیط کشت استفاده شد. نتایج حاصل مشخص کرد که عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس دارای حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد (MIC) ۰/۲۵ mg/mL و حداقل غلظت کشندگی (MBC) ۰/۵ mg/mL بود. در مجموع، عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس از رشد باکتری *A. hydrophila* در محیط کشت جلوگیری کرد و با توجه به تاثیرات سوء آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند به عنوان جایگزین آن‌ها در کنترل و نابودی باکتری *A. hydrophila* مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: *آمور، اکالیپتوس*، Aeromonas hydrophila، *سمیت حاد*.

۱- کارشناس ارشد شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.
۲- استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.
۳- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.
۴- دکتری دامپزشکی، بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان، موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، رشت، ایران.
* نویسنده مسئول: sadegh.roudbaraki@gmail.com

مقدمه

داروهای گیاهی طی قرن‌های متمادی تنها منبع قابل دسترس برای درمان دردها و بیماری‌ها بوده‌اند و امروزه نیز با وجود پیشرفت علم و توسعه کاربرد داروهای شیمیایی، هنوز گیاهان دارویی در مقیاس وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به مشکلات استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل ایجاد مقاومت‌های دارویی، مشکلات زیست‌محیطی و غیره گرایش به جایگزینی آن‌ها با موادی با منشا طبیعی را تقویت کرده است. از بین مواد مختلف جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها، اخیرا فرآورده‌هایی با منشا گیاهی جایگاه ویژه‌ای یافته‌اند (علیشاهی و همکاران، ۱۳۸۸).

اکالیپتوس یکی از معروفترین گیاهان دارویی است که از دیرباز اثرات ضدمیکروبی و خواص دیگر آن مورد توجه بوده است. برگ‌های اکالیپتوس (به ویژه برگ‌های مسن) اندام دارویی گیاه هستند که اسانس و عصاره‌گیری از آن‌ها انجام می‌شود (زرگری، ۱۳۶۸). ۵۴ ترکیب در اسانس و عصاره اکالیپتوس شناسایی شده است که ترکیبات اصلی آن شامل ۱/۸سینوئول، لیمونن، سولانول، β- پنین، ترانسوربنول، ol-۴- ترپنن، آریستولن، ترپینل استات، ایزوساتیون، سابینن، α- مایرسن، α- ترپینوئل است (Derwich etal., 2009). این گیاه منبع غنی از پلی‌فنل‌ها و ترپنوئیدها بوده، ترکیب اصلی برگ آن اکالیپتول ($C_{10}H_{18}O$) یا سینئول است (صمصام شریعت و همکاران، ۱۳۷۰). عصاره برگ این گیاه دارای خواص ضدسرطان، ضدالتهاب، ضددرد، آنتی‌اکسیدان، ضد ازدیاد قند خون، ضدمالاریا، ضدقارچ و ضدویروس است (Takasaki et al., 2000). عصاره گیاه اکالیپتوس بر طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مانند *Staphylococcus aureus*، *Shigella dysenteriae*، *Salmonella paratyphi*، *Escherichia coli*، *Bacillus cereus* و نیز قارچ *Candida albicans* فعالیت ضدمیکروبی از خود نشان داده است (Srinivasan et al., 2001). در مورد استفاده و کاربرد اسانس و عصاره اکالیپتوس در آبزی‌پروری اطلاعات بسیار اندکی در دسترس است. در مطالعات انجام گرفته، اثرات اسانس اکالیپتوس در کنترل آلودگی‌های قارچی در تخم‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان تا مرحله چشمزدگی مورد ارزیابی قرار گرفت و در تیمارهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر در لیتر اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد مشاهده شد (ابراهیم‌زاده موسوی و همکاران، ۱۳۸۵).

فعالیت ضدباکتریایی عصاره متانولی برگ اکالیپتوس علیه باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus pyogenes* و *Escherichia coli* در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت و نتیجه آزمایش نشان دهنده فعالیت ضدباکتریایی بالای عصاره متانولی گونه‌های مختلف اکالیپتوس علیه بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا بود (سلطانی‌نژاد و همکاران، ۱۳۸۹). بررسی اثر اسانس اکالیپتوس بر برخی شاخص‌های ایمنی کپور معمولی نشان داد اسانس اکالیپتوس اثرات بسیار کمی بر روی سیستم ایمنی ماهی کپور داشت هر چند افزایش معنی‌داری را در شاخص‌های تیتر آنتی‌بادی، جمعیت لوکوسیتی و قدرت باکتری‌کشی سرم نشان داد (شیخ‌زاده و همکاران، ۱۳۸۸). بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس‌های آویشن، مرزنجوش، مرزه و اکالیپتوس بر باکتری‌های *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* و قارچ‌های *Aspergillus niger* و *Aspergillus flavus* نشان دهنده اثر ضدمیکروبی این اسانس‌ها بود و همچنین اسانس‌های آویشن، مرزنجوش و مرزه از اسانس اکالیپتوس اثر ضدمیکروبی بیشتری داشتند (محبوبی و فیض‌آبادی، ۱۳۸۸).

باکتری‌هایی که در ماهی بیماری ایجاد می‌کنند، اعضای باکتری‌های حقیقی (یوباکتری‌ها)، ری‌باکتری‌ها (اکتینومیست‌ها) و باکتری‌های سرخورنده (سیتوفاگاها) هستند. بیشتر عوامل بیماری‌زا، باکتری‌های میله‌ای گرم منفی هستند (ستاری، ۱۳۷۸). باکتری‌های *Aeromonas hydrophila* باسیل‌های گرم منفی از گروه آئروموناس‌های متحرک هستند که در آب‌های شیرین میکروفلور جانوران آبزی بوده، در جانوران خونسرد، خونگرم و حتی انسان بیماری‌زا هستند. این باکتری‌ها همانند سایر آئروموناس‌های متحرک عامل سپتی‌سمی هموراژیک در ماهیان آب شیرین است. در مورد نقش آئروموناس‌های متحرک به عنوان پاتوژن اولیه شک و تردید وجود دارد اما نقش مهمی را در روند بیماری در ماهیان مبتلا ایفا می‌کنند (مخیر، ۱۳۸۵). هدف از این مطالعه، تعیین غلظت نیمه کشنده ($LC_{۵۰}$) عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس طی مدت زمان ۹۶ ساعت بر بچه‌ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*) و بررسی اثر مهاری رشد و کشندگی آن است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر به انجام رسید. عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس (اتانول ۷۰ درصد) مورد استفاده در این پژوهش نیز از شرکت زردبند، تهیه شد (جدول۱).

شرایط نگهداری بچه ماهیان

به منظور تعیین مقادیر LC_{50} عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس در بچه‌ماهیان آمور (*Ctenopharyngodon idella*) ۵ گرمی، بچه‌ماهیان مورد نیاز از مرکز تکثیر ماهیان گرمابی تعاونی ۱۲ رشت به انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان انتقال داده شد. آزمایش یک هفته پس از سازگاری بچه ماهیان با محیط و شرایط جدید بر اساس روش ایستا در طی ۹۶ ساعت انجام شد. آزمایش‌ها در آکواریوم‌های ۲۵ لیتری که از ۲۴ ساعت قبل از انتقال بچه‌ماهیان به آن‌ها، آبگیری و هوادهی شده بودند، انجام شد. آب مورد استفاده در این بررسی ترکیبی از آب رودخانه و چاه با نسبت ۸۰ به ۲۰ بود که میزان سختی آن در حدود ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر کربنات‌کلسیم تعیین شد. به منظور انجام آزمایش در هر آکواریوم ۱۰ عدد بچه‌ماهی آمور معرفی و برای هر یک از گروه‌های تیمار و شاهد سه تکرار در نظر گرفته شد. طی دوره آزمایش، شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب شامل دما، pH (AZ، تایوان) و اکسیژن محلول (WTW، آلمان) به طور روزانه اندازه‌گیری می‌شد.

جدول ۱: مشخصات عصاره اکالیپتوس تهیه شده از شرکت زردبند

ویژگی	دامنه	دسته
ظاهر	شفاف	شفاف
رنگ	قهو ه‌ای	قهو ه‌ای
pH	۴/۵-۰۰/۵۰	۵/۲۱
چگالی	۱/۰۲۲-۱/۰۴۵	۱/۰۳۷
ضریب شکست	۱/۳۸۸-۱/۳۹۵	۱/۳۸۸
ماده خشک	۳/۴-۰/۶	۴/۰

شرایط نگهداری بچه‌ماهیان

به منظور تعیین مقادیر LC_{50} عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس در بچه‌ماهیان آمور (*Ctenopharyngodon idella*) ۵ گرمی، بچه‌ماهیان مورد نیاز از مرکز تکثیر ماهیان گرمابی تعاونی ۱۲ رشت به انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان انتقال داده شد. آزمایش یک هفته پس از سازگاری بچه ماهیان با محیط و شرایط جدید بر اساس روش ایستا در طی ۹۶ ساعت انجام شد. آزمایش‌ها در آکواریوم‌های ۲۵ لیتری که از ۲۴ ساعت قبل از انتقال بچه‌ماهیان به آن‌ها، آبگیری و هوادهی شده بودند، انجام شد. آب مورد استفاده در این بررسی ترکیبی از آب رودخانه و چاه با نسبت ۸۰ به ۲۰ بود که میزان سختی آن در حدود ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر کربنات‌کلسیم تعیین شد. به منظور انجام آزمایش در هر آکواریوم ۱۰ عدد بچه‌ماهی آمور معرفی و برای هر یک از گروه‌های تیمار و شاهد سه تکرار در نظر گرفته شد. طی دوره آزمایش، شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب شامل دما، pH (AZ، تایوان) و اکسیژن محلول (WTW، آلمان) به طور روزانه اندازه‌گیری می‌شد.

تیماربندی بچه‌ماهیان

ابتدا با انجام چند آزمایش مقدماتی از غلظت‌های متفاوت عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس غلظت‌های حداقل و حداکثر کشندگی آن به ترتیب برابر ۲۰۰۰ppm و ۳۵۰۰ppm تعیین و سپس با استفاده از روابط لگاریتمی غلظت‌های بین حداقل و حداکثر تعیین شد. بر این اساس در این مطالعه ۵ تیمار شامل غلظت‌های ۲۰۰۰ppm، ۲۳۰۰ppm، ۲۶۰۰ppm، ۳۰۰۰ppm و ۳۵۰۰ppm به منظور تعیین مقادیر LC_{50} مورد مطالعه قرار گرفتند. در طول مدت زمان انجام آزمایش (۹۶ ساعت) روزانه بچه‌ماهیان تلف شده از هر تکرار جمع‌آوری و پس از اطمینان از مرگ تعداد آن‌ها شمارش و ثبت می‌شد. در پایان، داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۷ به روش Probit Analysis تجزیه و تحلیل شد و LC_{50} برای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت محاسبه و نمودارهای رگرسیون آن‌ها به کمک نرم‌افزار Microsoft Excel 2003 ترسیم شد.

مطالعات بافت‌شناختی

به منظور بررسی اثرات سمیت حاد با عصاره اکالیپتوس از بافت آبشش و بافت کبد ماهیانی که در معرض غلظت تحت کشنده عصاره اکالیپتوس قرار داشتند مقاطع بافتی تهیه شد.

برای این امر از هر تکرار ۳ عدد ماهی به صورت تصادفی انتخاب و نسبت به تهیه نمونه‌هایی به ابعاد ۱×۱ سانتی‌متر مربع از آبشش و کبد آن‌ها اقدام شد. سپس نمونه‌ها به داخل ظروف محتوی فرمالین ۱۰٪ منتقل شدند. پس از مدت ۲۴ ساعت مجددا فرمالین نمونه‌ها تعویض شد. نمونه‌های تثبیت شده در فرمالین آب‌گیری، شفاف‌سازی و پارافینه شدند و مقاطع میکروسکوپی به ضخامت ۵ میکرون از آن‌ها تهیه شد. سپس نمونه‌ها به روش هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند. مطالعه لام‌های تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری صورت پذیرفت (شریف‌پور و همکاران، ۱۳۹۱).

تیمار باکتریایی

باکتری *Aeromonas hydrophila* مورد استفاده در این مطالعه که از بخش بهداشت و بیماری‌های انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان تهیه شد از ماهیان خاویاری جداسازی شده بود. در این مطالعه به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (Minimum Inhibitory Concentration) باکتری *A. hydrophila* توسط عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس از روش رقت لوله‌ای استفاده شد (Sindambiwe et al., 1999). در این روش برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد عصاره اکالیپتوس از یک سری ۱۰ تایی از لوله‌های آزمایش استفاده شد. ۸ لوله برای آزمایش رقت‌های مختلف عصاره و یک لوله به عنوان شاهد مثبت (C^+) و یک لوله به عنوان شاهد منفی (C^-) به کار رفت. پس از رشد باکتری *A. hydrophila* در محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB؛ Merck، آلمان) طی مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد، باکتری مذکور به ۸ لوله آزمایش حاوی محیط کشت مولر هینتون براث (Merck، آلمان) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در هر لوله آزمایش اضافه شد. سپس به لوله‌های مذکور عصاره اکالیپتوس با غلظت‌های ۳۲، ۶۳، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکرولیتر اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور (Memert، آلمان) نگهداری شدند. بعد از سپری شدن زمان فوق، کدورت ایجاد شده در اثر رشد باکتری بررسی و میزان کدورت با استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند (۱/۵×۱۰^۸CFU/mL) مقایسه شد. لوله‌ای که در مقایسه با شاهد، حاوی کمترین غلظت عصاره و کمترین کدورت قابل ملاحظه (شفاف‌ترین) بود به عنوان حداقل غلظت

مهارکنندگی رشد در نظر گرفته شد (علیشاهی و همکاران، ۱۳۸۹). برای تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری (Minimum Bactericidal Concentration) عصاره اکالیپتوس، از آن دسته از غلظت‌هایی که در محیط کشت مولر هینتون براث فاقد کدورت بودند، باکتری برداشت و در پلیت‌های محتوی محیط کشت مولرهیلتون آگار انتشار داده شد. سپس عصاره اکالیپتوس با غلظت‌های ۳۲، ۶۳، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ میکرولیتر به پلیت‌های مذکور اضافه شد. پلیت‌ها در درون انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از بررسی نتایج کمترین غلظتی از عصاره که باکتری در آن رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد.

نتایج

شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب

در طول مدت آزمایش میانگین دمای آب ۲۴/۶۴ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۷/۰۸ میلی‌گرم در لیتر و pH ۷/۸۸ بود.

اثر سمیت حاد عصاره اکالیپتوس بر بافت‌های کبد و آبشش بچه‌ماهیان آمور

در این مطالعه بچه‌ماهیان آمور ۵ گرمی به مدت ۹۶ ساعت در معرض غلظت‌های مختلف عصاره اکالیپتوس قرار گرفتند و بر اساس سه تکرار (جدول۲)، مقادیر LC_{50} عصاره اکالیپتوس در آن‌ها، طی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب برابر ۳۲۳۸/۱۷، ۲۹۴۳/۷۴، ۲۶۷۴/۸۵ و ۲۴۷۸/۵۶ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه شد (جدول ۳). پس از ثبت تلفات، با استفاده از جدول Probit Value اثر تیمارهای مختلف عصاره اکالیپتوس روی مرگ و میر بچه‌ماهیان آمور مقایسه و با استفاده از خط رگرسیون و ضرایب خاص آن مقادیر LC_{10}، LC_{50} و LC_{90} در ۹۶ ساعت تعیین شد (شکل ۱ تا ۴).

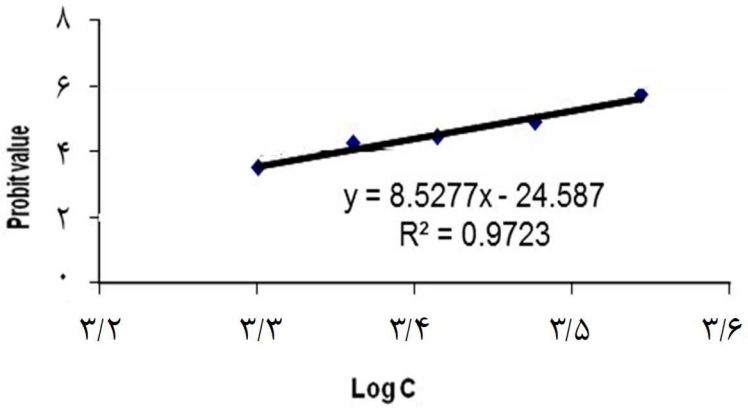
بررسی آسیب‌های بافتی نمونه‌های بافتی آبشش و کبد ماهیان در تیمارهای مورد مطالعه نشان دهنده عوارضی مانند چسبندگی، هیپرتروفی و نکروز سلولی در آبشش و همچنین وجود خونریزی و پرخونی، آتروفی سلولی و نکروز سلولی در بافت کبد ماهیان در غلظت‌های مختلف عصاره اکالیپتوس در مقایسه با نمونه شاهد بود.

جدول ۲: مقایسه اثر تیمارهای مختلف اکالیپتوس روی مرگ و میر بچه‌ماهیان ۵ گرمی آمور در طی ۹۶ ساعت

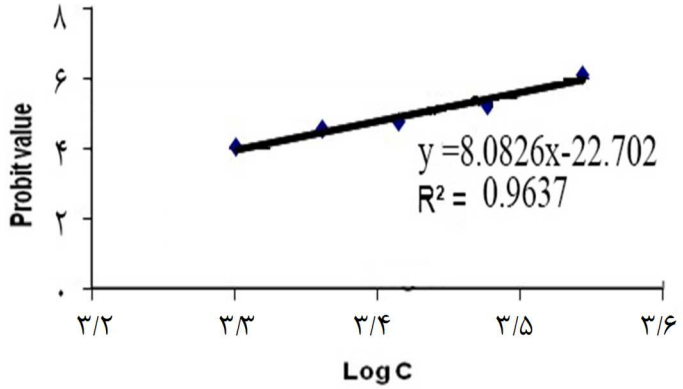
غلظت اکالیپتوس (ppm)	۲۴ ساعت		۴۸ ساعت		۷۲ ساعت		۹۶ ساعت		تغییرات نسبت به شاهد				لگاریتم غلظت اکالیپتوس
	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت	
۰ (شاهد)	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۱۰	۰	۰	۰	۰	۰
۲۰۰۰	۰/۳۳	۹/۶۷	۰/۶۶	۹/۳۴	۱/۶۶	۸/۳۴	۲/۳۳	۷/۶۷	-۳/۳	-۶/۶	-۱۶/۶	-۲۳/۳	۳/۳۰۱۰
۲۳۰۰	۱/۶۶	۸/۳۴	۲/۳۳	۷/۶۷	۳/۳۳	۶/۶۷	۴	۶	-۱۶/۶	-۲۳/۳	-۳۳/۳	-۴۰	۳/۳۶۱۷
۲۶۰۰	۲/۳۳	۷/۶۷	۳	۷	۴	۶	۵	۵	-۲۳/۳	-۳۰	-۴۰	-۵۰	۳/۴۱۵۰
۳۰۰۰	۳/۶۶	۶/۳۴	۴/۶۶	۵/۳۴	۶/۳۳	۳/۶۷	۷/۳۳	۲/۶۷	-۳۶/۶	-۴۶/۶	-۶۳/۳	-۷۳/۳	۳/۴۷۷۱
۳۵۰۰	۶	۴	۷/۶۶	۲/۳۴	۸/۶۶	۱/۳۴	۹/۳۳	۰/۶۷	-۶۰	-۷۶/۶	-۸۶/۶	-۹۳/۳	۳/۵۴۴۱

جدول ۳: غلظت‌های کشنده اکالیپتوس در طی ۹۶ ساعت بر بچه‌ماهیان آمور

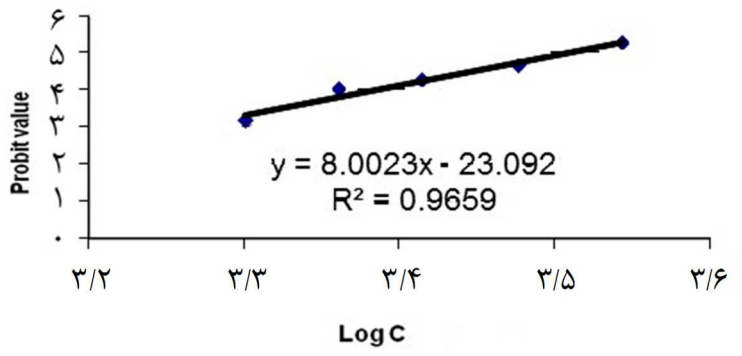
مقدار LC اکالیپتوس	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
$LC_{۱۰}$	۲۲۳۹/۷۵	۲۰۸۲/۵۷	۱۸۵۶/۵۲	۱۷۸۰/۳۲
$LC_{۵۰}$	۳۲۳۸/۱۷	۲۹۴۳/۷۴	۲۶۷۴/۸۵	۲۴۷۸/۵۶
$LC_{۹۰}$	۴۶۸۲/۷۳	۴۱۶۱/۰۲	۳۸۵۳/۸۹	۳۴۵۰/۶۴



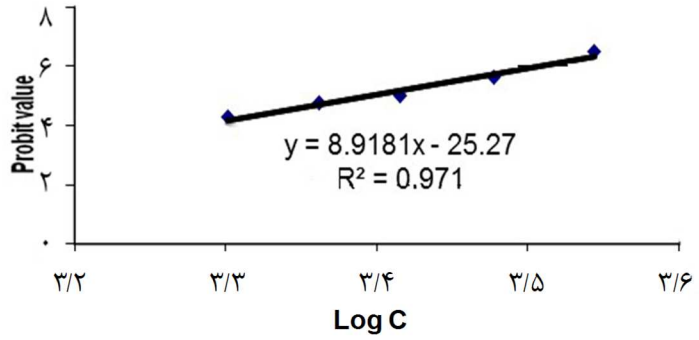
شکل ۱: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی Probit Value با لگاریتم غلظت اوکالیپتوس بر روی بچه آمور در ۲۴ ساعت



شکل ۲: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی Probit Value با لگاریتم غلظت اوکالیپتوس بر روی بچه آمور در ۴۸ ساعت



شکل ۳: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی Probit Value با لگاریتم غلظت اوکالیپتوس بر روی بچه آمور در ۷۲ ساعت



شکل ۴: معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی Probit Value با لگاریتم غلظت اوکالیپتوس بر روی بچه آمور در ۹۶ ساعت

بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC)

بر اساس نتایج به دست آمده از این مطالعه حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری *Aeromonas hydrophila* توسط عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس به ترتیب برابر ۰/۲۵ میلی‌گرم و ۰/۵ میلی‌گرم تعیین شد (جدول۴).

جدول ۴: حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) *Aeromonas hydrophila*

غلظت عصاره اکالیپتوس	۰/۰۳۲mg	۰/۰۶۴mg	۰/۱۲۵mg	۰/۲۵mg	۰/۵mg	۱mg	۲mg	۴mg	C^-	C^+
رشد باکتری در محیط کشت	+	+	+	- MIC	-	-	-	-	+	-
	+	+	+	+	- MBC	-	-	-	+	-

«+»: رشد باکتری در محیط کشت؛ «– »: عدم رشد باکتری در محیط کشت.

C^+: شاهد مثبت؛ C^-: شاهد منفی.

نتایج به دست آمده نشان دهنده اثر ضدباکتریایی عصاره اکالیپتوس بر روی باکتری *A. hydrophila* است و نشان می‌دهد که عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس می‌تواند در حداقل رقت دارای اثر مهاری و کشندگی بر روی باکتری *A. hydrophila* باشد.

بحث

بیماری باکتریایی آئرومونازیس در ماهیان پرورشی از مهمترین بیماری‌های باکتریایی در طی دوره پرورش به شمار می‌آید به طوری که بر اساس بررسی‌های جامع صورت گرفته باکتری *Aeromonas hydrophila* می‌تواند در طی مراحل مختلف پرورش، ماهیان را آلوده کند و بر اساس شدت آلودگی و سن ماهیان مبتلا، منجر به بروز علائم کلینیکی متفاوت و حتی تلفات شود. با توجه به این که باکتری *A. hydrophila* به طور طبیعی در بیشتر منابع آبی حضور دارد، ضروری است به منظور کنترل و حذف این باکتری در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان گرمابی اقدام کرد. برای این منظور در حال حاضر از مواد ضدعفونی‌کننده شیمیایی و نیز از انواع آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان ماهیان بیمار استفاده می‌شود که نتایج متفاوتی در ارتباط با هر کدام از آن‌ها حاصل شده است. این امر می‌تواند ناشی از تغییر شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب مانند دما، pH، اکسیژن محلول، مواد آلی و مواد معلق باشد (شریف روحانی، ۱۳۸۴). تاثیرات سوء زیست‌محیطی مواد شیمیایی ضدعفونی کننده و آنتی‌بیوتیک‌ها در کنار اثرات منفی آن‌ها بر مصرف کنندگان ماهیان تحت درمان، مانند ایجاد مقاومت دارویی

در برابر عوامل باکتریایی، موجب شده است امروزه استفاده از مواد طبیعی مانند گیاهان دارویی مورد توجه ویژه قرار گیرد. با وجود تاثیرات ضدباکتریایی گیاه اکالیپتوس و کاربرد آن در طب انسانی، مطالعات اندکی درباره تاثیرات و سمیت آن بر روی آبزیان صورت پذیرفته است. نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که غلظت نیمه کشنده (LC_{50}) ۹۶ ساعته عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس بر روی بچه‌ماهیان آمور برابر ۲۴۷۸/۵۶ppm بود و با افزایش مدت زمان آزمایش، مقدار غلظت عصاره اکالیپتوس برای ایجاد ۵۰ درصد تلفات در جمعیت ماهی‌ها، کمتر شد. یعنی بین غلظت و زمان رابطه معکوس وجود داشت. در این مطالعه مشخص شد که عصاره اکالیپتوس در بافت‌های آبشش و کبد عوارضی مانند خونریزی، پرخونی، چسبندگی، هیپرتروفی، آتروفی سلولی و نکروز ایجاد می‌کند اما ضایعات به وجود آمده در بافت‌های کبد و آبشش ماهیانی که در معرض عصاره اکالیپتوس قرار گرفته بودند به حدی شدید و خطرناک نبود که بتواند موجب مرگ ماهیان در مدت زمان آزمایش شود.

بررسی نتایج مطالعات آزمایشگاهی انجام شده درباره تاثیرات عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس بر باکتری *A. hydrophila* نشان داد میزان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی باکتری به ترتیب برابر ۰/۲۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۰/۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. مقایسه نتایج حاصل از این بررسی با مطالعه انجام شده توسط علیشاهی و همکاران در سال ۱۳۸۹ از پایین بودن مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی باکتری تعیین شده در ارتباط با عصاره سیاه‌دانه (با حداقل غلظت مهارکنندگی رشد ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، عصاره *Scutellaria* sp. (با حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی به ترتیب برابر ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، عصاره خارمریم (با حداقل غلظت مهارکنندگی رشد ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، عصاره زیتون (با حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، عصاره کلپوره (با حداقل غلظت مهارکنندگی رشد ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و برابر بودن با عصاره‌های پوست انار و آویشن شیرازی بر روی باکتری *A. hydrophila* حکایت دارد. همچنین مقایسه نتایج به دست آمده از این بررسی با مطالعات انجام شده توسط Prasatporn و همکاران (۲۰۰۵) از پایین بودن مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی

باکتری تعیین شده در ارتباط با عصاره‌های آبی و الکلی چای‌ترش (با حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی به ترتیب ۲ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و گل زرد تایلندی (با حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی به ترتیب ۴ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) حکایت دارد. در مطالعات دیگر اثرات ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و الکلی اکالیپتوس بر روی باکتری *Streptococcus mutans* (Fani and Kohanteb, 2011)، *Pseudomonas aeruginosa* (ستاری و همکاران، ۱۳۸۴)، *Escherichia coli*، *Streptococcus pyogenes*، *Staphylococcus aureus* (سلطانی‌نژاد و همکاران، ۱۳۸۹) و *Listeria monocytogenes* (جلالی و همکاران، ۱۳۸۵) گزارش شده است.

در این مطالعه، در ارتباط با سمیت حاد LC_{50}. عصاره اکالیپتوس مشخص شد که با کمترین افزایش غلظت این عصاره ممکن است علائم مسمومیت ظاهر شود. علائم مسمومیت با رفتار غیرطبیعی ماهی شامل افزایش فعالیت، افزایش تحریک‌پذیری، شنای با شتاب و بی هدف در جهات مختلف و در مسیرهای کوتاه، عدم تعادل و قرار گرفتن ماهی به پشت و فرو رفتن ماهی در عمق آب، انقباض شدید عضلات و به دنبال آن ایجاد انحنای ستون فقرات و بالاخره مرگ همراه باشد. بنابراین، برای جلوگیری از ایجاد مسمومیت، لازم است که در به کارگیری عصاره اکالیپتوس در صنعت پرورش ماهی به مقدار و مدت زمان مصرف آن توجه کافی شود. با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه و نیز نتایج سایر پژوهشگران می‌توان به این نتیجه رسید که عصاره هیدروالکلی اکالیپتوس در مقایسه با بسیاری از عصاره‌های گیاهی دارای بیشترین قدرت مهار کنندگی رشد (MIC) و کشندگی (MBC) باکتری *A. hydrophila* و بسیاری از باکتری های دیگر است. به عنوان نتیجه‌گیری کلی می توان عنوان کرد که با توجه به اثرات ضد باکتریایی عصاره اکالیپتوس می‌توان با خالص‌سازی مواد موثره این عصاره، از آن به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده کرد. همچنین با توجه این که گیاه اکالیپتوس برای مصارف دارویی و غذایی در انسان استفاده می‌شود، از این رو مصرف آن در صنعت پرورش ماهی مشکلی را برای مصرف کنندگان ماهی به همراه نخواهد داشت.

منابع

ابراهیم‌زاده موسوی ح.، شریف روحانی م.، خسروی ع.، مهرابی ی. و آخوندزاده بستی ا. ۱۳۸۵. ارزیابی اسانس اکالیپتوس در کنترل آلودگی‌های قارچی تخم قزل‌آلای رنگین‌کمان. فصلنامه گیاهان دارویی، ۵(۲۰): ۴۷-۴۲.

جلالی م.، عابدی د.، قاسمی دهکردی ن. و چهارمحالی ا. ۱۳۸۵. بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره‌های هیدروالکلی تعدادی از گیاهان دارویی علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز. دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، ۸(۳): ۳۳-۲۵.

زرگری ع. ۱۳۶۸. گیاهان دارویی، جلد سوم. انتشارات دانشگاه تهران. ۹۷۶ص.

ستاری م. ۱۳۷۸. بهداشت ماهی. انتشارات دانشگاه گیلان. ۳۰۴ص.

ستاری م.، شهبازی ن. و نجارپیرایه ش. ۱۳۸۴. ارزیابی اثر ضدباکتریای عصاره‌های آبی و الکلی اکالیپتوس بر سودوموناس آیروژینوزا. مجله علوم پزشکی مدرس، ۸(۱): ۲۳-۱۹.

سلطانی‌نژاد ش.، ستایی‌مختاری ط. و سلطانی‌نژاد م. ۱۳۸۹. بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره متانولی برگ اکالیپتوس بر علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی و استرپتوکوکوس پیوژنز در شرایط آزمایشگاهی. مجله زیست‌فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی، ۲(۴): ۲۸-۲۱.

شریف‌پور ع.، حلاجیان ع. و کاظمی ر. ۱۳۹۱. روش‌های آزمایشگاهی بافت‌شناسی. مرکز جامع علمی کاربردی. ۲۱۲ص.

شریف روحانی م. ۱۳۸۴. بررسی کاربرد برخی اسانس‌ها گیاهی در کنترل آلودگی‌های قارچی تخم ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان به عنوان جایگزین احتمالی مالاشیت گرین در شرایط کارگاهی. پایان‌نامه دکترای تخصصی بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشگاه تهران. ۱۰۰ص.

شیخ‌زاده ن.، سلطانی م.، ابراهیم‌زاده موسوی ح.، خسروی ع.، باقری ه.، فتحی ع. و زرگر ا. ۱۳۸۸. مطالعه اثر اسانس اکالیپتوس بر برخی از فاکتورهای ایمنی کپور معمولی. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۶۴(۱): ۵۳-۴۷.

صمصام شریعت ه. و معطر ف. ۱۳۷۰. گیاهان و داروهای طبیعی. انتشارات مشعت. ۵۰۰ص.

علیشاهی م.، سلطانی م. و زرگر ا. ۱۳۸۸. بررسی باکتریایی تلفات ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*) در استان خوزستان. مجله دامپزشکی ایران، ۵(۱): ۳۴-۲۵.

علیشاهی م.، قربانپور نجف‌آبادی م.، نجف‌زاده ح. و پشم‌فروش م. ۱۳۸۹. مطالعه اثر ضدباکتریایی برخی عصاره‌های گیاهی بر علیه استرپتوکوکوس اینیایی، آئروموناس هیدروفیلا، یرسینا راکری. مجله دامپزشکی ایران، ۶(۲): ۳۰-۲۱.

محبوبی م. و فیض‌آبادی م. ۱۳۸۸. بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس‌های آویشن، مرزنجوش، مرزه و اکالیپتوس بر باکتری اشرشیا کلی، سالمونلا تیفی‌موریوم و قارچ‌های آسپرژیلوس نایجر و آسپرژیلوس فلاووس. مجله گیاهان دارویی، ۹(۳۰): ۱۴۴-۱۲۷.

مخیر ب. ۱۳۸۵. بیماری‌های ماهیان پرورشی. انتشارات دانشگاه تهران. ۶۳۸ص.

Derwich E., Benziane Z. and Boukir A. 2009. GC/MS analysis of volatile constituents and antibacterial activity of the essential oil of the leaves of *Eucalyptus globulus* in Atlas Median from Morocco. Advances in Natural and Applied Sciences, 3(3): 305–313.

Fani M.M. and Kohanteb J. 2011. Inhibitory activity of *Cinnamon zeylanicum* and *Eucalyptus globulus* Oils on *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida* species isolated from patients with oral infections. Iranian Journal of Medical Sciences (IJMS), 11: 14–22.

Prasatporn B., Pithai K., Sompoth W., Kingkan S. and Sarthorn P. 2005. Anti-bacterial activity of Thai medicinal plant extracts on *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus agalactiae* Isolated from diseased tilapia (*Oreochromis niloticus*). 31st Congress on Science and Technology of Thailand, Suranaree University of Technology, Thailand. 1–4.

Sindambiwe J.B., Calomme M., Cos P., Totte J. and Pieters L. 1999. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for anti-microbial and antiviral activities. Journal of Ethnopharmacology, 65(1): 71–77.

Srinivasan D., Nathan S. and Suresh T. 2001. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. Journal of Ethnopharmacology, 74: 217–220.

Takasaki M., Konoshima T., Etoh H., Pal Singh I., Tokuda H. and Nishino H. 2000. Cancer chemo-preventive activity of euglobal-G1 from leaves of *Eucalyptus grandis*. Cancer Letters, 155(1): 61–65.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 5, No. 3, Autumn 2017

Acute toxicity (LC_{50}) of eucalyptus extract on the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) liver and gill tissues and its antibacterial effect against *Aeromonas hydrophila*

Seyed Mohammad Sadegh Roudbaraki[1]*, Hadi Ershad[2], Hossein Khara[3], Mahdi Masoumzadeh[4]

Received: January 2016 Accepted: June 2016

Abstract

The purpose of this study was to determine the acute toxicity or 50% lethal concentration within 96 hours (LC_{50} 96 h) of eucalyptus extract on the juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and the impact of the extraction on *Aeromonas hydrophila*. 180 grass carp with an average weight of 5g were distributed randomly in the five treatment groups with eucalyptus concentrations of 2000, 2300, 2600, 3000, 3500 ppm and one control group (with three replications). Lethal concentration of eucalyptus extract using logarithmic was found 2478.56ppm. Histopathological studies of gill and liver that were exposed to lethal concentrations of eucalyptus extracts, showed the lesions consisted of hyperemia and bleeding. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of the antimicrobial agent were determined using tube dissolution method. The MIC and MBC of extract of eucalyptus against *A. hydrophila* were recorded as 0.25mg/mL and 0.5mg/mL, respectively. In conclusion, the extract of eucalyptus can inhibit the growth of *A. hydrophila* in a culture medium. Due to the adverse effects of antibiotics, they can be used as an alternative to controlling and destroying *A. hydrophila*.

Key words: *Grass Carp*, *Eucalyptus*, Aeromonas hydrophila, *Acute Toxicity*.

1- M.Sc. in Fisheries, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.
2- Assistant Professor in Department of Fisheries, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.
3- Associate Professor in Department of Fisheries, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.
4- Ph.D. in Veterinary, International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.
*Corresponding Author: sadegh.roudbaraki@gmail.com