دومین همایش ملی
صنعت و تجاری سازی کشاورزی
با تاکید بر پژوهش و توسعه در بنگاه‌های اقتصادی و صنایع وابسته
۲۲ اردیبهشت ماه ۱۴۰۰
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان
سازمان صنعت، معدن و تجارت خوزستان

بررسی خصوصیات ضدمیکروبی اسانس گیاه برازمبل علیه باکتری بیماریزای *آئروموناس هیدروفیلا* به روش میکروبراث دایلوشن

کتایون احمدی، محمد محسن زاده*

گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

* Email: mohsenzadeh@um.ac.ir

چکیده:

باکتری های گرم منفی از عوامل مهم ایجاد بیماری های عفونی آبزیان می باشند. در این بین باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* از عوامل مهم عفونی در ماهی و سایر آبزیان می باشد. این پاتوژن به طور طبیعی و گسترده در رسوبات آب های شیرین و دستگاه گوارش ماهیان وجود دارد. امروزه تحقیقات گسترده ای در رابطه با استفاده از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی جهت مقابله با عوامل بیماری زا با منشاء غذایی انجام شده است و مشخص شده است این ترکیبات جایگزین مناسبی برای ترکیبات ضد میکروبی شیمیایی می باشند. اسانس های طبیعی همانند گیاه برازمبل به دلیل محتوای گروه هایی از ترکیبات پلی فنلی دارای خواص آنتی اکسیدانی هستند و از تشکیل رادیکال های آزاد جلوگیری می کنند. در این مطالعه، پس از تهیه ی اسانس، ترکیبات تشکیل دهنده ی آن با استفاده از دستگاه گازکروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی(GC-MS)، مورد شناسایی قرار گرفت. سپس حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس برازمبل برعلیه باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* با روش میکرودایلوشن تعیین شد. براساس نتایج بدست آمده حداقل غلظت بازدارندگی اسانس برازمبل بر روی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* ۴ mg/ml و حداقل غلظت کشندگی آن ۸ mg/ml گزارش شد. بر طبق این نتایج، اسانس برازمبل دارای اثر ضد باکتریایی مناسبی بر علیه باکتری پاتوژن *آئروموناس هیدروفیلا* بوده و می توان از آن جهت حفظ ویژگی های کیفی و خواص ارگانولپتیکی مواد غذایی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: *آئروموناس هیدروفیلا، اسانس برازمبل، حداقل غلظت بازدارندگی، حداقل غلظت کشندگی*

مقدمه:

توزیع و فراوانی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*(*Aeromonas hydrophila*) در اکوسیستم آبی به خوبی اثبات شده و مشخص شده است این باکتری بخشی از فلور روده ی آبزیان می باشد. این باکتری از آبشش، کلیه و کبد ماهی جداسازی شده که می تواند به هنگام ایجاد تنش، بیماری زا گردد. *آئروموناس هیدروفیلا* یکی از باکتری های مهم در پرورش ماهیان گرمابی محسوب می شود و در کپور، مار ماهی، شیر ماهی، گربه ماهی، تیلاپیا و قزل آلای رنگین کمان سبب ایجاد سپتی سمی هموراژیک(Haemorrhagic Septicaemia) می شود. *آئروموناس هیدروفیلا* یک باکتری همه جایی، فرصت طلب، گرم منفی، میله ای شکل، به طور عمده متحرک، بی هوازی اختیاری، اکسیداز و کاتالاز مثبت

و تخمیر کننده گلوکز است و از دو گروه مجزای غیرمتحرک سرمادوست و متحرک مزوفیلیک تشکیل شده اند. این باکتری سبب آلودگی زخم ها، عفونت خون و با هجوم به لایه های مخاطی روده ها و در برخی سویه ها از طریق تولید آئرولیزین، سبب گاستروانتریت با منشاء آب و غذا و اسهال مسافرتی در انسان میگردد. همچنین انواعی از عوامل حدت و توکسین ها در این باکتری ها شناسایی شده اند. به طورکلی باکتری های جنس آئروموناس از طریق تولید سموم خارجی نظیر انتروتوکسین، همولیزین (آئرولیزین)، لیپاز و پروتئاز سبب بروز بیماری می گردند. (یوگانانت و همکاران، ۲۰۰۹.؛ اخلاقی و وفایی، ۲۰۰۲.؛ ون و همکاران، ۱۹۹۸.؛ اسماعیلی و پیغان، ۱۹۹۷.؛ رحیمی و همکاران، ۲۰۱۷).

گزارشات بسیاری بر مبنای فعالیت ضد میکروبی، ضدقارچی، ضد ویروسی و ضد انگلی گیاهان دارویی وجود دارد. اسانس های گیاهی ترکیبات فرار، آب گریز و معطری هستند که توسط روش های فیزیکی از بخش های مختلف گیاهان به دست می آیند. (تاج کریمی و همکاران، ۲۰۱۰).

گیاه برازمبل یا گل کبود با نام علمی (*Proveskia abrotanoides Karel*) جنس کوچکی از خانواده lamiaceae است که در شمال ایران(استان گلستان و مازندران)، اصفهان، خراسان، سیستان و بلوچستان و برخی کشورهای همسایه مانند افغانستان و پاکستان به صورت اندمیک وجود دارد و اغلب به صورت خودرو در حاشیه ی جاده‌های کوهستانی با اقلیم سرد و خشک می‌روید، گونه ی ارزشمند دارویی است که خواص درمانی آن جهت دردهای روماتیسمی، بیماری سالک، اثرات ضددرد، خنک‌کننده و ضدالتهاب از دیرباز مورد توجه مردم بوده است و این گیاه به دلیل مواد مؤثره ی آن که شامل: ۱و۸ –سینئول(۴/۳۲ درصد)، میرسن (۱۳ درصد)، آلفا–پینن (۲/۱۰ درصد)، کامفور (۱/۹درصد)، بتا–کاریوفیلن (۹/۷ درصد)، آلفا–هومولن (۴/۶ درصد)، کامفن (۵ درصد) و آلفا بیزابولول (۶/۲درصد) می باشند، کاربرد وسیعی در صنایع داروسازی، آرایشی و... دارد. عصاره ی این گیاه دارای ترکیباتی مانند سزکویی ترپن ها و مونوترپن ها می باشد که سبب ایجاد خواص ضدباکتریایی و ضد قارچی علیه پاتوژن ها میشوند. (شهرکی و همکاران، ۱۳۹۲.؛ زارعی و همکاران، ۱۳۹۲.؛ محبی، ۱۳۹۰.؛ پورحسینی و همکاران، ۲۰۱۸.؛ استکینی و همکاران، ۱۹۹۳).

در این پژوهش اثر ضد میکروبی غلظت های مختلف اسانس برازمبل بر علیه باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* با استفاده از روش میکروبراث دایلوشن مورد بررسی قرار گرفت و حداقل غلظت مهار کنندگی و کشندگی آن تعیین گردید.

روش کار:

استخراج و تهیه ی اسانس:

پس از تهیه ی گیاه برازمبل، با قرارگرفتن در دمای محیط خشک گردید. میزان ۱۵۰ گرم از نمونه ی خشک شده توسط روش تقطیر آبی(Hydro distillation) به مدت ۲ساعت اسانس گیری شد و در شیشه های غیرقابل نفوذ به نور و در دمای یخچال تا زمان تجزیه نگه داری شد. اجزای تشکیل دهنده ی اسانس توسط دستگاه گاز کروکاتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی(GC-MS) تعیین گردید (شهرکی و همکاران، ۱۳۹۲).

آماده سازی محیط کشت آبگوشت قلب-مغز(BHI) :

برای تعیین (MIC) و (MBC) محیط کشت BHI براث و BHI آگار تهیه شد. محیط های کشت طبق روش آماده سازی، در ارلن ۲۵۰ میلی لیتری توزیع و به حجم رسانده شدند. برای تهیه ی محیط کشت BHI آگار، محتویات ارلن به مدت ۲ دقیقه(تا زمان جوشیدن) حرارت داده شدند. سپس هر دو محیط در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه ی سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند.

تهیه ی باکتری:

باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* از گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. در ابتدا از سویه ی باکتری نگهداری شده در آزمایشگاه در محیط کشت BHI آگار کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه ی سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد.

تهیه ی سوسپانسیون میکروبی:

برای تهیه ی سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک فارلند از دستگاه اسپکتروفوتومتر استفاده گردید. در لوله ی آزمایش مقداری آب مقطر ریخته شد. سپس توسط لوپ استریل و در کنار شعله، از باکتری های کشت داده شده در آب مقطر حل شد. برای یکنواخت شدن از دستگاه ورتکس استفاده شد. سپس میزان جذب نوری در ۱-۰/۰۸ و طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین گردید. جذب بین ۱-۰/۰۸ معادل میزان cfu/ml $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ می باشد. سپس از سوسپانسیون تهیه شده غلظت معادل cfu/ml $۱۰^{۶}$ تعیین شد.

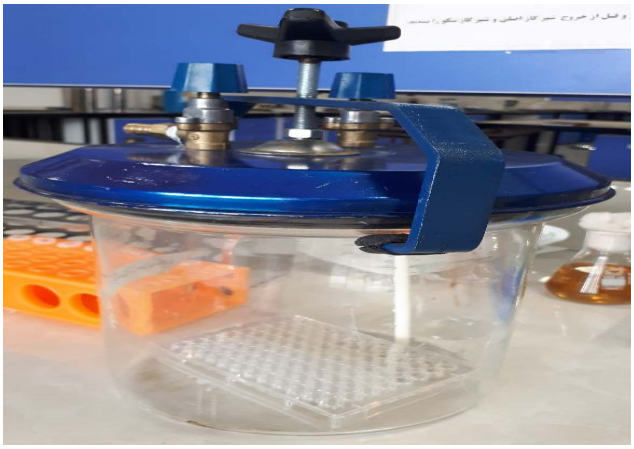
تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) به روش میکرودایلوشن(Microdilution):

برای تعیین MIC اسانس برازمبل، از روش میکروبراث دایلوشن در محیط کشت BHI براث در میکروپلیت ۹۶ خانه ای با چاهک ته گرد استفاده شد. غلظت های مختلف اسانس از mg/ml ۰/۲۵ ، ۰/۵۰، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، تهیه گردید. همانطور که در تصویر شماره ی ۱ مشاهده می شود برای تعیین MIC اسانس، در ۳ ردیف(در ۳ تکرار) از میکروپلیت ۹۶ خانه ای با چاهک ته گرد استفاده شد. ستون های ۸-۱ را با ۱۶۰ میکرولیتر محیط کشت BHI براث و ۲۰ میکرولیتر باکتری با میزان cfu/ml $۱۰^{۶}$ و ۲۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف اسانس(mg/ml ۰/۲۵۰ ، ۰/۵۰، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲) اضافه گردید. ستون شماره ی ۱۱ و ۱۲ نیز گروه کنترل در نظر گرفته شدند و در ۳ ردیف، میزان ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت BHI براث به آن ها افزوده شد. سپس در شماره ی ۱۱، میزان ۲۰ میکرولیتر اسانس(کنترل منفی) و در شماره ی ۱۲، میزان ۲۰ میکرولیتر از باکتری(کنترل مثبت) افزوده شد.

تصویر ۱: تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) اسانس برازمبل به روش میکرودایلوشن

علیه باکتری آئروموناس هیدروفیلا

میکروپلیت ۹۶ خانه ای به ارامی روی میز تکان داده شد سپس در جار با شمع (برای ایجاد شرایط بی هوازی) و سپس انکوباتور با دمای ۳۷ درجه ی سلسیوس و به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت (تصویر ۲).



تصویر ۲: انکوبه گذاری میکروپلیت ۹۶ خانه ای در جار بی هوازی

پس از طی زمان انکوباسیون، جهت بررسی رشد و عدم رشد باکتری در مقایسه با گروه های کنترل، به پلیت ها ۲۰ میکرولیتر معرف تری فنیل تترازولیوم(TTC)(Triphenyltetrazolium) افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه ی سلسیوس انکوبه گردید. در صورت رشد باکتری، معرف به رنگ قرمز تغییر می یابد. برای تهیه ی معرف نیز، میزان ۰/۲ گرم از آن با میزانی آب مقطر مخلوط شد. کمترین غلظتی که در آن هیچ گونه رشد باکتری (عدم تغییر رنگ به رنگ قرمز) مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی(MIC) در نظر گرفته شد.

تعیین حداقل غلظت کشندگی(MBC):

برای این منظور، از غلظت های بالاتر MIC که در آن ها رشد باکتری کنترل شده است، به پلیت های حاوی محیط کشت BHI آگار به روش خطی کشت داده و در دمای ۳۷ درجه ی سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از زمان انکوباسیون، کمترین غلظت اسانس که در آن باکتری رشد نداشته(کمتر از پنج کلونی)، به عنوان MBC در نظر گرفته می شود.

نتایج:

نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC) اسانس برازمبل بر باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- MIC و MBC تعیین شده ی اسانس برازمبل بر باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*

میکروارگانیسم	اسانس	MIC(mg/ml)	MBC(mg/ml)
آئروموناس هیدروفیلا-گرم منفی	برازمبل(گل کبود)	4	8

بحث و نتیجه گیری:

طبق پژوهش های مختلفی که در رابطه با بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس برازمبل صورت گرفته است، این اسانس توانایی بسیاری در مهار رشد میکروارگانیسم ها دارد که این خاصیت به درصد ترکیبات عمده ی موجود در این گیاه بستگی دارد و میزان این ترکیبات هم به عواملی مثل ژنتیک، محل رویش، بخش های مختلف گیاه و... وابسته است. (پورحسینی و همکاران، ۲۰۱۸).

در مطالعه ای اثر تلفیق پرتوی گاما با اسانس گیاه برازمبل بر روی حشرات کامل شپشه آرد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند هرگاه پرتو گاما به صورت تلفیقی با اسانس برازمبل روی حشرات کامل شپشه آرد در بازه ی زمانی مشخص مورد استفاده قرار گیرد، اثر سینرژیستی معنی‌دار ایجاد می‌نماید در حالی که اسانس برازمبل به تنهایی موجب بروز ۶/۲۵ درصد مهار رشد می‌گردد که این نتیجه حاکی از توانایی بسیار این اسانس در کنترل و مهار رشد میکروارگانیسم ها است. (احمدی و همکاران، ۱۳۸۸).

در مطالعه ای دیگر فعالیت ضد باکتریایی اسانس برازمبل بر بقای باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کاندیدا* بررسی شد و نتایج نشان داد این اسانس بر جلوگیری از آلودگی این میکروارگانیسم ها موثر بوده است.(صفایی قمی و همکاران، ۲۰۱۰).

بر طبق این پژوهش، میزان حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی حاصل با پژوهش های قبلی در این حوزه، نتایج مشابهی داشته است که به دلیل وجود ترکیبات مؤثره ی مختلفی در این گیاه است همانند کامفور که سبب توانایی مهار رشد باکتری ها می شود.

امروزه به دلیل آسیب های نگهدارنده های شیمیایی در صنعت غذا، استفاده از نگهدارنده های طبیعی رو به گسترش بیشتری است که نتایج این پژوهش و میزان تعیین شده برای حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC) اسانس برازمبل بر باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* که دارای اهمیت بسیاری برای صنعت پرورش ماهیان گرمابی و حتی انسان ها دارد، نشان دهنده ی حساسیت نسبتا بالای این باکتری بر اسانس برازمبل و خاصیت ضدمیکروبی بالای این اسانس است. بنابراین برازمبل می تواند نگهدارنده ی طبیعی موفق در صنعت غذا و کنترل رشد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* و عفونت باکتریایی حاصل از آن باشد.

منابع:

احمدی م.، محرمی پور س.، اردکانی م.، و مزدارانی ح. (۱۳۸۸). تاثیر تلفیق پرتو گاما با اسانس گیاه برازمبل بر میزان مرگ و میر شپشه آرد.

زارعی، غ. و زارع‌زاده، ع. و جعفری، ر. (۱۳۹۲). بررسی اثر سطوح مختلف کود فسفاته و ازته بر عملکرد و بازده اسانس گیاه دارویی براز مبل. اولین همایش ملی کاربرد علوم و فناوری های نوین در کشاورزی و منابع طبیعی یزد.

شهرکی، س. مهدوی، س. حسینی (حبیب)، س. و مازندرانی، م. (۱۳۹۲). بررسی فیتو شیمیایی گیاه برازمبل با نام علمی Proveskia abrotanoides karel(مطالعه موردی پارک ملی گلستان). اولین همایش منطقه ای گیاهان دارویی شمال کشور،گرگان.

محبی، ا. (۱۳۹۰). بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره گیاه برازمبل abrotanoides Perovskia بر روی تعدادی از باکتری ها و قارچ های پاتوژن . فصل نامه گیاهان دارویی.

Akhlaghi, M., & Vafaei, S. (2002). Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* in aquarium fish. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 3(1), 82-87.

Esmaili, F., & Peighan, R. (1997). Isolation of Aeromonas like bacteria from the grass carp (Ctenopharyngodon idella). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, *6*(2), 1-8.

Pourhosseini, S. H., Mirjalili, M. H., Nejad Ebrahimi, S., & Sonboli, A. (2018). Essential oil quantity and quality of different plant organs from Perovskia abrotanoides Karel in natural habitat of North Khorasan province. *Journal of Plant Productions (Agronomy, Breeding and Horticulture)*, *40*(4), 53-62.

Rahimi, R., Mohseni Sisakht, P., & Hashemi, G. (2017). In vitro antibacterial effects of Walnut (Juglans regia) extracts against *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Aquaculture Development*, *11*(4), 45-51.

Safaeighomi, J. A. V. A. D., & Batooli, H. (2010). Determination of bioactive molecules from flowers, leaves, stems and roots of *Perovskia abrotanoides* Karel growing in central Iran by nano scale injection. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, *5*, 551-556.

Stecchini, M. L., Sarais, I., & Giavedoni, P. (1993). Effect of essential oils on *Aeromonas hydrophila* in a culture medium and in cooked pork. *Journal of Food Protection*, *56*(5), 406-409.

Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*, *21*(9), 1199-1218.

Wan, J., Wilcock, A., & Coventry, M. J. (1998). The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*, *84*(2), 152-158.

Yogananth, N., Bhakyaraj, R., Chanthuru, A., Anbalagan, T., & Nila, K. M. (2009). Detection of virulence gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish samples using PCR technique. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*, *4*, 51-53.