تاثیر فعالیت ضدباکتریایی عصاره جفت میوه بلوط (*Quercus brantii var. persica*) بر رشد لاکتوکوکوس گارویه (*Lactococcus garvieae*) در شرایط آزمایشگاهی

- **صبا حسینی:** گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکدهٔ علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی: ۶۶۹
- **مهدی سلطانی*:** گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۴۵۳
- **محسن حیدری:** گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۴۵۳
- **مهرنوش مسعودی:** گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکدهٔ علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی: ۶۶۹
- **الهام پورمعافی‌اصفهانی:** دانشگاه آزاد اسلامی علوم و تحقیقات واحد یزد، صندوق پستی: ۳۹۹۵

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۴

چکیده

هدف از این مطالعه ارزیابی تاثیر عصاره جفت میوه بلوط (لایه داخلی میوه بلوط) بر رشد *Lactococcus garvieae* در شرایط آزمایشگاهی بود. عصاره اتانولی و آبی جفت میوه بلوط به روش خیساندن تهیه و خواص ضدباکتریایی آن به‌روش‌های دیسک دیفیوژن و چاهک انجام شد. در روش دیسک دیفیوژن عصاره اتانولی با قطری معادل ۷/۷۲±۰/٦٤ میلی‌متر فعالیت ضدباکتریایی بهتری از خود نشان داد. عصاره آبی جفت میوه بلوط در روش چاهک با میانگین قطر هاله عدم رشدی برابر با ۷/۱۲±۰/۸۳ میلی‌متر ایجاد کرد. مقادیر حداقل غلظت ممانعت کنندگی برای عصاره‌های اتانولی و آبی به‌ترتیب برابر با ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد. اختلاف معنی‌داری بین فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های جفت میوه بلوط (آبی و هیدروالکلی) با آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل وجود داشت (P<۰/۰۵) . به‌طورکلی بیش‌ترین فعالیت ضدباکتریایی به‌ترتیب توسط عصاره هیدرو الکلی و سپس عصاره آبی به‌دست آمد.

کلمات کلیدی: ضدباکتریایی، میوه بلوط، عصاره اتانولی، لاکتوکوکوس گارویه

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: msoltani@ut.ac.ir

مقدمه

عفونت‌های باکتریایی باعث بالاترین نرخ مرگ و میر در میان جوامع انسانی و موجودات با قابلیت آبزی‌پروری می‌شوند (Kandhasamy و Arunachalam، ۲۰۰۸). امروزه به‌دلیل عفونت‌های سنگین باکتریایی و استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها، باکتری‌های بیماری‌زا تبدیل به گونه‌های مقاوم شده‌اند (Lavanya و Veerappan، ۲۰۱۱). درمان پاتوژن‌های مقاوم، تبدیل به یکی از بزرگ‌ترین مشکلات در صنعت آبزی‌پروری شده است(Sieradzki و همکاران، ۱۹۹۹). کاهش بازده آنتی‌بیوتیک‌ها و افزایش مقاومت پاتوژن‌ها در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها بشر را ناگزیر به جایگزین کردن آنتی‌بیوتیک‌های قدیمی با آنتی‌بیوتیک‌های جدید نموده است (Smith و همکاران، ۱۹۹۴). از این‌رو تحقیقات در رابطه با عوامل ضدمیکروبی جدید که به‌طورطبیعی تولید می‌شوند، برای دستیابی به منابع نوین دارویی از اهمیت فراوانی بر خوردار است (Okeke و همکاران، ۲۰۰۵؛ Gonzalez و همکاران، ۲۰۰۱).

مطالعات انجام شده در ایران نمایانگر گسترش استرپتو کوکوزیس در مزارع پرورش قزل‌آلاست (Soltani و همکاران، ۲۰۰۹؛ Soltani و همکاران، ۲۰۰۸a؛ Soltani و همکاران، ۲۰۰۵) در این بررسی‌ها، استرپتوکوکوس اینیایی (Soltani و همکاران، ۲۰۰۵) و لاکتوکوکوس گارویه (Soltani و همکاران، ۲۰۰۸b) به‌منزلهٔ عمده‌ترین گونه‌های بیماری‌زای مزارع کشور مطرح شده‌اند.

از وقتی عوارض جانبی مواد شیمیایی به‌خصوص سرطان‌زا بودن آن‌ها شناخته شد، علاقه برای استفاده از مواد نگه‌دارنده طبیعی بیش‌تر گردید (Hong و همکاران، ۲۰۱۲). امروزه مردم با توجه به اثرات مضر نگه‌دارنده‌های شیمیایی و سنتتیک خواهان استفاده از نگه‌دارنده‌های طبیعی مشتق شده از منابع گیاهی، حیوانی و میکروبی هستند تا علاوه بر افزایش زمان ماندگاری غذا از اثرات مضر نگه‌دارنده‌های غذایی شیمیایی مصون باشند (Hyldgaard و همکاران،۲۰۱۲).

آبزی‌پروری با تولیدی بیش از ۱۵۴ میلیون تن در سال ۲۰۱۱ به‌عنوان فعالیت اقتصادی مهم در بیش‌تر کشورها محسوب می‌شود (FAO، ۲۰۱۲). محدودیت‌های قانونی، وجود مشکلات در دستورالعمل‌های تجویز، سختی کار و گران بودن داروها، تجمع آن‌ها در محیط زیست و کاهش اثر داروها، محققان را بر آن داشت تا از ترکیبات گیاهی و محرک‌های ایمنی و غذایی استفاده کنند. استفاده از ترکیبات گیاهی به‌علت ارزان بودن، در دسترس بودن و آسانی رشد وکشت آن‌ها از نظر اقتصادی به‌صرفه‌تر هستند. آن‌ها دوست‌دار محیط زیست بوده و در آبزی‌پروری قابل استفاده می‌باشند (Costa و همکاران، ۲۰۱۲).

اسانس‌های گیاهی، روغن‌های فراری هستند که اثرات میکروبی آن‌ها شناخته شده و از بخش‌های مختلف گیاه به‌دست می‌آیند (Abdollahzadeh و همکاران، ۲۰۱۴). اگر مواد نگه‌دارنده طبیعی به‌جای مواد شیمیایی در مواد غذایی استفاده شوند لازم است که ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها در آزمایشگاه و سپس در مدل‌های غذایی صورت گیرد (Norhana و همکاران، ۲۰۱۲). محمودی (۱۳۹۱) تاثیر اسانس آویشن شیرازی در مدل غذایی روی فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان برای مهار لاکتوکوکوس گارویه در یک دوره ۹ روزه را مورد مطالعه قرار داد و اثرگذاری این گیاه را در تمامی غلظت‌ها مورد تایید قرار گرفت. Mahmoodi و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه خود عصاره و اسانس ۴ گیاه (*Rosmarinus officinalis, Zataria multiflora, Anethum graveolens, Eucalyptus globulus*) را علیه باکتری لاکتوکوکوس گارویه مطالعه کردند. فریدونی و همکاران (۲۰۱۳) نیز در مطالعه خود اثر ضدباکتریایی ۸ گونه گیاه بومی ایران را علیه باکتری لاکتوکوکوس گارویه در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند. مقیمی و همکاران (۱۳۹۲) رفتار رشد تعداد مشخصی از جدایه‌های باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی و لاکتوکوکوس گارویه، در غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰ و ۳۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر، از اسانس‌های اوکالیپتوس کامالدولنسیس، پونه معطر و آلوئه ورا و غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱۲، ۱ ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از داروی کلرآمین T در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و نیز حداقل غلظت مهارکنندگی آن‌ها مشخص کردند. سلطانی و همکاران (۱۳۹۰) در مطالعه خود موارد بروز لاکتوکوکوزیس (استرپتوکوکوزیس) با عامل لاکتوکوکوس گارویه در مزارع پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان استان چهارمحال و بختیاری را مورد مطالعه قرار دادند. در این مطالعه تعداد ۱۹۲ جدایه باکتریایی از بافت کلیه ماهیان بیمار مربوط به ۳۲ مزرعه پرورشی در محیط آگار خون‌دار در ۳۰ درجه سانتی‌گراد جداسازی شد که پس از انجام آزمون‌های بیوشیمیایی تعداد ۶۸ جدایه آن خصوصیات لاکتوکوکوس گارویه را نشان دادند. هدف از این مطالعه ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی جفت میوه بلوط روی عامل عفونی لاکتوکوکوس گارویه جدا شده از نمونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره‌های گیاهی میوه بلوط(جفت): میوه بلوط از کوه‌های جنوبی زاگرس جمع‌آوری و شناسایی آن در هرباریوم گیاه‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه انجام و عصاره‌گیری به‌روش Harikrishnan و همکاران (۲۰۱۲) با کمی تغییر انجام شد. از ۱۰۰گرم جفت بلوط پودر شده برای عصاره‌گیری با اتانول ۷۰ درصد و آب مقطر استفاده شد. جداسازی حلال با استفاده از روتاری تبخیرکننده انجام و عصاره باقی‌مانده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگه‌داری شدند.

باکتری: از گونه لاکتوکوکوس گارویه جدا شده از ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی تهران استفاده شد. باکتری مورد مطالعه در محیط کشت مایع براث کشت تا این‌که جذب نوری آن بین ۰/۸-۰/۱۳ با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر بود (Milton Roy Company, USA). این میزان کدورتی برابر با ۱/۵×۱۰۸ CFU/mL دارد (Mc Manus و همکاران، ۲۰۰۲).

فعالیت ضدباکتریایی: ۱- روش دیسک دیفیوژن (Disk diffusion): از روش توصیه شده (NCCLS، ۲۰۰۰) استفاده شد. برای این کار ابتدا لاکتوکوکوس گارویه را به‌مدت ۲۴ در ژلوز خون‌دار کشت داده و سپس در سرم فیزیولوژی استریل میکروبی معادل نیم مک‌فارلند تهیه و میزان ۱۰۰ ماکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده در محیط کشت جامد به روش کشت سطحی پخش و صفحات دیسک بلانک آغشته به ۲۰ ماکرولیتر محلول عصاره در آن قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ تا ۳۷ درجه نگه‌داری شدند. فعالیت ضدباکتریایی با کنترل مثبت مقایسه و براساس قطر هاله عدم رشد مجاور دیسک تعیین گردید (Celiktas و همکاران، ۲۰۰۷).

۲- روش چاهک (Well method): ابتدا میزان ۶۰ میکرو لیتر از هریک از عصاره‌ها به گوده‌های ۶ میلی‌متری ایجاد شده در روی محیط ژلوز خون‌دار اضافه و محیط‌ها در دمای ۳۰ تا ۳۷ درجه به‌مدت ۲۴ ساعت نگه‌داری و سپس میزان قطر هاله ایجاد شده (عدم رشد) با خط‌کش در حد میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

تعیین حداقل غلظت مهارکننده: برای این کار ابتدا به همه چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه میزان ۹۵ میکرولیتر محیط کشت TSB (تریپتیک سویا براث) اضافه و به چاهک‌های اول مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول‌های مواد ضدباکتریایی با غلظت مشخص اضافه شد و پس از مخلوط کردن ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته و به چاهک دوم اضافه کرده و بدین ترتیب تا آخرین چاهک این کار را ادامه داده و سپس از چاهک آخر مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت خارج کرده و سپس مقدار ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری معادل CFU/mL ۱۰۷ به محیط اضافه کرده تا مقدار باکتری در کل چاهک معادل CFU/mL ۵×۱۰۵ شود سپس پلیت‌ها درون انکوباتور ۳۷-۳۰ درجه به‌مدت ۲۴ ساعت نگه‌داری و کم‌ترین رقتی که در آن عدم کدورت یا عدم رشد انجام گرفت به‌عنوان MIC لحاظ گردید. عدم کدورت به‌صورت چشمی و عدم رشد با استفاده از سنجش میزان جذب نوری در بلافاصله پس از افزودن باکتری و پس از ۲۴ ساعت تعیین گردید (Sagdic و همکاران، ۲۰۰۷).

آنالیز آماری: از آزمون T-test جهت مقایسه خواص ضدباکتریایی عصاره‌های مورد مطالعه استفاده شد. نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون Shapiro-Wilk مورد بررسی قرار گرفته و گروه‌ها در سطح ($p<0/05$) معنی‌دار اعلام شدند. در صورت معنی‌دار بودن آنالیز داده‌ها با استفاده از روش‌های آنالیز آماری Anova یک‌طرفه با استفاده از بسته نرم‌افزاری SPSS نسخه ۱۸ برای بررسی نتایج آزمون‌ها و مقایسه میانگین عصاره‌های مختلف استفاده شد. تمامی اندازه‌گیری‌ها برای هر نمونه سه بار تکرار و مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد.

نتایج

۱- روش دیسک دیفیوژن: نتایج فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌ها به‌روش دیسک دیفیوژن در جدول ۱ آمده است، براساس این جدول عصاره آبی جفت میوه بلوط قطری برابر با ۶/۳۳±۰/۵۹ میلی‌متر درحالی‌که عصاره اتانولی با قطری معادل ۷/۷۲±۰/۶۴ میلی‌متر فعالیت ضد اکتریایی بهتری از خود نشان داد. میان فعالیت ضدباکتریایی دو نوع عصاره با روش دیسک دیفیوژن با کنترل مثبت اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p<0/05$).

۲- روش چاهک: نتایج فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌ها به روش چاهک در جدول ۱ آمده است، براساس این جدول، عصاره آبی جفت میوه بلوط با قطری برابر با ۷/۱۲±۰/۸۳ میلی‌متر داشت درحالی‌که عصاره اتانولی با قطری معادل ۷/۸۳±۰/۷ میلی‌متر فعالیت ضدباکتریایی بهتری از خود نشان داد. میان فعالیت ضدباکتریایی دو نوع عصاره با روش دیسک دیفیوژن با کنترل مثبت (میانگین قطر هاله‌های عدم رشد

آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده) اختلاف معنی‌داری وجود داشت. نتایج آزمون MIC در جدول ۱ نشان می‌دهد که مقدار MIC برای عصاره اتانولی و آبی علیه باکتری لاکتوکوکوس گارویه به‌ترتیب برابر با ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است.

جدول۱: قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی‌لیتر) و مقادیر MIC (بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر) عصاره اتانولی و آبی جفت میوه بلوط علیه (*L. garvieae*)

گونه گیاه	روش دیسک			روش چاهک			MIC
غلظت	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۵	۵۰	۱۰۰	
عصاره اتانولی	۱/۷۰±۵/۷۵^{a}	۱/۸۴± ۷/۶۸^{a}	۲ ۱/±۹/۷۵^{a}	۰/۸±۵ ^{A,B}	۰/۵±۸/۷۵ ^{A,B}	۰ ۲/±۹/۷۵ ^{A,B}	۰/۷۵
عصاره آبی	۰/۹۵±۴/۲۵^{a}	۱/۸۲±۷^{a}	۱/۵±۷/۷۵^{a}	۳/۱±۵/۵^{B}	۲/۳۰±۷/۱۲^{B}	۳/۲۰±۸/۷۵^{B}	۱/۵
کلرامفنیکل		۰/۷۶±۱۴/۵^{c}			۱±۱۶^{D}		–
انروفلوکسازین		۰/۵۰±۹/۵^{ba}			۰/۲۵±۱۲/۱۵ ^{C,D}		–
اریترومایسین		۰/۵±۱۳/۵^{cb}			۰/۸۶±۱۴/۵ ^{C,D}		–
تتراسایکلین		۰			۰		–
آمپی سیلین		۲/۵۱±۱۷/۵^{c}			۱±۱۸/۱ ^{B,C}		–
دی‌متیل‌سولفوکساید		–					-
آب مقطر		–			-		-

(میانگین±انحراف معیار) گروه‌ها در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار می‌باشند.

بحث

آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی که برای جلوگیری از بروز بیماری و گسترش پاتوژن‌ها در یک دوره زمانی استفاده می‌شدند باعث ایجاد مقاومت باکتریایی شدند (Sahoo و Mukherjee، ۱۹۹۷). در مطالعه حاضر عصاره اتانولی جفت بلوط فعالیت ضدباکتریایی بیش‌تری نسبت به عصاره آبی از خود نشان دادند. در این مطالعه با افزایش غلظت عصاره‌ها از ۲۵ به ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حلال توانایی تاثیر ضدباکتریایی با افزایش دز و غلظت متابولیت‌ها افزایش می‌یافت. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره جفت با افزایش غلظت از رشد لاکتوکوکوس گارویه جلوگیری کرده که با مطالعه صفری و همکاران (۲۰۰۹) که تاثیر ضدباکتریایی عصاره بلوط را روی ۸ عامل باکتریایی شامل (*Salonella typhy, Proteus mirabilis Shigella dysenteriae, E. coli, Klebsiella pneumonia, Brucella melitensis, Bordetella bronchiseptica, Psseudomonas aeruginosa*) انجام و نشان دادند که افزایش قطر هاله عدم رشد متناسب با افزایش متابولیت‌های عصاره بلوط است کاملاً مطابقت دارد.

به‌علاوه در این مطالعه اختلاف معنی‌داری بین فعالیت ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف عصاره‌های اتانولی و متانولی جفت بلوط در هر دو روش چاهک و دیسک با آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده مشاهده شد (P<۰/۰۵). درحالی‌که میان فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های مورد استفاده فاقد اختلاف معنی‌دار بود. Harborne (۱۹۹۸) در مطالعه خود نشان داد اختلاف معنی‌داری بین خواص ضدباکتریایی عصاره‌های الکلی و آبی بلوط با روش چاهک وجود نداشت.

خواص ضدقارچی، ضدباکتریایی، ضدویروسی بعضی گونه‌های بلوط از جمله بلوط ایرانی و گال بلوط به‌وسیله برخی محققان گزارش شده (Khosravi و Behzadi، ۲۰۰۶). به‌طوری که ترکیباتی مانند فلانوئیدها، تانین‌ها و پلی‌سیانیدها از عصاره این گیاه جداسازی شده است (Sakar و همکاران، ۲۰۰۵). گزارش شده که الکالوئیدهای مسطح اروماتیک با کلیت داخلی DNA سلول فعالیت ضدباکتریایی از خود نشان می‌دهند (Cowan، ۱۹۹۹). احتمالاً فعالیت ضدمیکروبی بلوط به‌خاطر تانن‌های موجود در عصاره آن‌ها می‌باشد، زیرا تانن‌ها از ترکیبات مهم در درختان بلوط هستند و اهمیت این درختان بیش‌تر به‌خاطر تاننی است که در اجزای مختلف آن‌ها یافت می‌شود. تانن‌ها می‌توانند برای باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای و حتی ویروس‌ها سمی باشند (Basri و Fan، ۲۰۰۵).

تانن‌ها با رسوب پروتئین‌های میکروبی مانع از رشد آن‌ها می‌شوند. تانن‌ها از دسترسی عوامل میکروبی به پروتئین‌های غذایی جلوگیری می‌نمایند به‌علاوه از طریق مکانیسم به دام انداختن آهن، باندشدن هیدروژن و پراکنش اختصاصی با پروتئین‌های حیاتی مانند آنزیم‌ها ایفای نقش می‌کنند. تانن‌ها حتی قادرند با مهار آنزیم ترانس کریپتاز معکوس در ویروس‌های انسانی مانع از تکثیر این آنزیم شوند (Nair و همکاران، ۲۰۰۷).

در این مطالعه آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل و اریترومایسین بیش‌ترین تاثیر را روی باکتری لاکتوکوکوس گارویه از خود نشان دادند. بین فعالیت ضدباکتریایی عصاره گیاه بلوط به‌روش دیسک دیفیوژن با آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل و اریترومایسین اختلاف معنی‌داری وجود داشت به‌طوری‌که میزان قطر هاله عدم رشد برای عصاره‌های الکلی و آبی به‌ترتیب برابر و درحالی‌که این مقادیر برای آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل و اریترومایسین به‌ترتیب برابر بودند.

تاکنون تحقیقات متعدد توانسته‌اند خواص آنتی‌بیوتیک بلوط‌ها را به اثبات برسانند که در این‌جا به برخی از آن‌ها اشاره می‌شود، خسروی و بهزادی (۱۳۸۴) نشان دادند که عصاره متانولی میوه‌های گونه‌ای بلوط ایرانی (*Quercus brantii*) دارای اثری مشابه و حتی در برخی غلظت‌ها قوی‌تر از آنتی بیوتیک نایلیدیسک اسید و کوتریموکسازول (co-trimoxazole) روی باکتری‌های *Proteus mirabilis* و *E. coli* می‌باشد. هم‌چنین عصاره هیدروالکلی *Q. infectoria* با غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی باکتری *Staphylococcus aureus* دارای اثری مشابه با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین بوده و حتی قوی‌تر از آنتی‌بیوتیک توبرامایسین عمل می‌نماید (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۹۰؛ ابراهیمی و همکاران، ۱۳۸۸).

عصاره‌های آبی و الکلی مورد مطالعه در غلظت ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کم‌ترین فعالیت ضدباکتریایی را از خود نشان دادند و با کاهش غلظت عملاً فعالیت ضدباکتریایی قابل چشم‌پوشی بود. این درحالی است که عصاره اتانولی حداکثر قطر هاله عدم رشدی برابر با ۱۱میلی‌متر در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از خود نشان دادند. مقایسه این دو روش کمی چاهک پلیت و دیسک دیفیوژن نشان داد که روش چاهک پلیت در مقایسه با روش دیسک دیفیوژن، اثر مهارکنندگی بیش‌تری علیه این باکتری دارد.

هم‌چنین نتایج این مطالعه نشان داد که مقادیر MIC بین ۰/۷۵-۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای هردو عصاره به‌دست آمد. در این مطالعه به‌هرحال عصاره اتانولی با میزان MIC کم‌تری از خود نشان داد که بیانگر اثر مهارکنندگی بهتر این عصاره در مقایسه با عصاره آبی جفت می‌باشد.

نتایج فعالیت پاکسازی باکتریایی علیه پاتوژن باکتریایی در جدول ۱ نشان داده شده است. این پاتوژن باکتریایی ماهی یکی از رخ دادهای معمولی بخشی از صنعت آبزی‌پروری هست که باعث بیماری‌های عفونی و مرگ و میرهایی در ماهی‌ها می‌شود (Buller و همکاران، ۲۰۰۴).

نتایج آزمون در روش دیسک دیفیوژن نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین عصاره اتانولی و آبی جفت میوه بلوط علیه لاکتوکوکوس گارویه وجود نداشت یکی از دلایل این امر به این خاطر است که هر دو نوع عصاره بیش‌تر شامل ترکیبات قطبی می‌شود. طبق نظر Basri و Fan (۲۰۰۵) عصاره‌های گیاهی معمولاً بیش‌تر در برابر باکتری‌های گرم مثبت فعال هستند تا باکتری‌های گرم منفی و به‌نظر می‌رسد که این فعالیت ضدمیکروبی به‌خاطر تانن‌های موجود در عصاره گیاهی باشد. برخی اظهار عقیده نموده‌اند که این ماده را باید یکی از شاخص‌ترین موادی دانست که در عالم گیاهان به‌وجود می‌آید (Motevaselian و Farahi، ۱۹۷۹). خصوصیات ضدمیکروبی تانن‌ها در سال ۱۹۹۱ مورد بررسی قرار گرفت، طبق این مطالعات تانن‌ها می‌توانند برای قارچ‌های رشته‌ای، مخمرها و باکتری‌ها سمی باشند (Cowan، ۱۹۹۹). بررسی اثرات ضد باکتریایی تانن‌های بافت و گیاه کامل نیز توسط کیارستمی (۱۳۷۷) صورت گرفت (Kiarostami، ۱۹۹۸).

به‌طورکلی بالاترین فعالیت ضدباکتریایی برای عصاره اتانولی و بعد از آن عصاره آبی به‌دست آمد که در مشابه با کارهای دیگر (Martin، ۱۹۹۵؛ Paz و همکاران، ۱۹۹۵؛ Vlientinck و همکاران، ۱۹۹۵) که گزارش دادند عصاره آبی گیاهان کم‌تر فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌ها داشتند. عصاره‌گیری با حلال‌های با قطبیت بیش‌تر باعث افزایش خاصیت ضدمیکروبی می‌شود.

با توجه به عدم وجود اختلاف معنی‌داری بین نتایج فعالیت ضدباکتریایی آنتی‌بیوتیک انروفلوکسازین با عصاره‌های مورد مطالعه می‌توان این عصاره‌ها را از نظر درمانی با این آنتی‌بیوتیک قابل مقایسه دانست و با توجه به این‌که مصرف عصاره‌های گیاهی دوست‌دار طبیعت می‌باشد، لذا نتایج این مطالعه می‌تواند برای صنعت آبزی‌پروری مفید واقع شود.

به‌طورکلی اهمیت درمانی درختان بلوط بیش‌تر مربوط به تاننی است که در اعضای مختلف آن‌ها از جمله برگ‌ها فراهم می‌شود. تانن یک نام کلی برای گروهی از مواد پلیمری فنولی

با وزن مولکولی بالا (۵۰۰-۳۰۰۰ دالتون) است که جزء یکی از کلاس‌های مهم متابولیت‌های ثانویه در گیاهان محسوب می‌شوند (KazemiNajafi، ۲۰۰۰؛ Cowan، ۱۹۹۹؛ Mallika و Dhar، ۱۹۸۰). با توجه به توسعه صنعت آبزی‌پروری در کشور و استفاده بی‌رویه از مواد شیمیایی و نظر به اهمیت اثرات مضر این مواد بر محیط زیست و بهداشت مصرف‌کنندگان استفاده از جفت میوه بلوط می‌تواند به‌عنوان یک ماده گیاهی دوست‌دار طبیعت در صنعت آبزی‌پروری و به‌ویژه علیه بیماری لاکتوکوکوزیس مورد استفاده قرار گیرد به‌علاوه این ترکیب (عصاره) به‌لحاظ خواص آنتی‌اکسیدانی، تحریک ایمنی و ضدباکتریایی نه تنها خاصیت ضدمیکروبی بلکه خاصیت کاهش استرس و افزایش رشد نیز دارد (Bohlouli و همکاران، ۲۰۱۵؛ Ghaderi Ghahfarokhi و همکاران، ۲۰۱۱؛ Safary و همکاران، ۲۰۰۹؛ Khosravi و Behzadi، ۲۰۰۶؛ Kaur و همکاران، ۲۰۰۴).

تشکر و قدردانی

این پژوهش مستخرج از طرح شماره ۹۳۰۲۰۳ مصوب بنیاد نخبگان استان کهگیلویه و بویراحمد بوده است. در انجام این تحقیق از حمایت قطب علمی بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران خوردار بوده که بدین‌وسیله تشکر و قدردانی می‌نماید و هم‌چنین در انجام این تحقیق از کمک و راهنمایی کارشناسان آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱. **ابراهیمی، ا.؛ خیامی، م. و نجاتی، و.، ۱۳۸۸.** ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی میوه بلوط ایرانی در روش انتشار دیسک. فصل‌نامه گیاهان دارویی. دوره ۳۳، شماره ۱، صفحات ۲۶ تا ۳۴.

۲. **ابراهیمی، ا.؛ خیامی، م. و نجاتی، و.، ۱۳۹۰.** مقایسه اثر ضدمیکروبی اجزای مختلف بلوط ایرانی علیه باکتری اشرشیاکلی. فصل‌نامه دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گناباد. دوره ۱۷، شماره ۴، صفحات ۱۱ تا ۱۷.

۳. **سلطانی، م.؛ رئیسی، م.؛ گودرزی، م.ع.؛ ممتاز، ح. و مومنی، م.، ۱۳۹۰.** تعیین فراوانی لاکتوکوکوس گارویه عامل بیماری لاکتوکوکوزیس در مزارع پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان استان چهار محال و بختیاری و تعیین توالی ژن 16S rRNA جدایه‌های حاصله. مجله دامپزشکی ایران. دوره هشتم، شماره۱، صفحات ۶۱ تا ۶۷.

۴. **محمودی، آ.، ۱۳۹۱.** مطالعه تاثیر اسانس آویشن شیرازی و نیسین بر رفتار رشد لاکتوکوکوس گارویه روی فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. پایان‌نامه دکتری شیلات. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران. ۱۴۶ صفحه.

۵. **مقیمی، م.؛ سلطانی، م.؛ میرزرگر، س. و قدرت‌نما، م.، ۱۳۹۲.** تاثیر اسانس‌های اوکالیپتوس کامالدولنسیس (*Eucalyptus camaldulensis*)، پونه معطر(*Mentha pulegium*)، و آلوئه ورا (*Aloe vera*) در رفتار رشد باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی (*Streptococcus iniae*) و لاکتوکوکوس گارویه (*Lactococcus garviae*)، عامل استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس در مزارع قزل‌آلای رنگین‌کمان کشور و مقایسه آن با کلر آمین T. نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران، دوره ۶۶، شماره۱، صفحات ۱۰۵ تا ۱۱۸.

6. **Abdollahzadeh E.; Rezaei M. and Hosseini H., 2014.** Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. Journal of Food Control. Vol. 35, No. 1, pp: 177-183.
7. **Basri, D.F. and Fan, S.H., 2005.** The potential of aqueous and acetone extracts of galls of Quercus infectoria as antibacterial agents. Indian. J. Pharmacol. Vol. 37, No. 1, pp: 26-29.
8. **Bohlouli, G.; Ghaedi, G.; Heydari, M.; Sadeghi, E. and Rahmani, M., 2015.** Effects of dietary Persian oak (*Quercus brantii var. persica*) fruit extract on survival, growth performance, hematological and immunological parameters in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss, fingerlings. Aquacultuer Nutrition. Vol. 21, No. 1, pp: 98-104.
9. **Buller, N.B., 2004**. Bacteria from fish and other aquatic animals: A practical identification manual. CABI Publishing, UK.248 p.
10. **Celiktas, O.; Kocabas Bedir, E.; Sukan, E.; Ozek, F. and Baser, K., 2007.** Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis, depending on location and seasonal variations. Journal of Food Chemistry. Vol. 100, pp: 553-559.
11. **Costa, G.; Danz, H.; Kataria, P. and Bromage, E., 2012.** A holistic view of the dynamisms of teleost IgM: A case study of *Streptococcus iniae* vaccinated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of developmental and comparative immunology. Vol. 36, pp: 298-305.
12. **Cowan, M., 1999.** Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. Vol. 12, No. 4, pp: 564-582.
13. **Eldar, A.; Horovitcz, A. and Bercovier, H., 1997.** Development and efficacy of a vaccine against Streptococcus iniae infection in farmed rainbow trout. Journal of Veterinary Immunology and Immunopathology. Vol. 56, No. 1-2, pp: 175-183.
14. **FAO. 2014.** The state of world fisheries and aquaculture (SOFIA). FAO, Rome.342 p.
15. **FAO. 2012.** The state of world fisheries and aquaculture. www. FAO.org. 281 p.
16. **Fereidouni, M.S.; Akhlaghi, M. and Khadem Alhosseini, A., 2013.** Antibacterial effects of medicinal plant extracts against *Lactococcus garvieae*, the

globulus. Global Veterinaria. Vol. 9, No. 1, pp: 73-79.

31. **Mallika, M. and Dhar, S.C., 1980.** Studies on the oxidation of tannins by Aspergillus flavus. J Bio Sci. Vol. 2, No. 1, pp: 43-48.
32. **Martin, G.J., 1995.** Ethnobotany: A Methods Manual. Chapman and Hall, London.198 p.
33. **McManus, P.S.; Stockwell, V.O.; Sundin, G.W. and Jones, A.L., 2002.** Antibiotic use in plant agriculture. Annu. Rev. Phytopathol. Vol. 40, pp: 443-465.
34. **Motevaselian, M. and Farahi, F., 1979.** Measurement of Extractive Materiales of *Quercus infectoria* for Foodstuff and Medicinal Value of It. Doctoral thesis. Medical faculty. Tehran University. 136 p. (In Persian).
35. **Nair, R.; Kalariya, T. and Chanada, S., 2007.** Antibacterial activity of some plant extracts used in folk medicine. J Herb Pharmacother. Vol. 7, pp: 191-201.
36. **NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2000.** Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests. Approved Standard, M2-A7. 199 p.
37. **Norhana, M.N.W.; Poole, S.E.; Deeth, H.C.; Gary, A. and Dykes, A., 2012.** Effects of nisin, EDTA and salts of organic acids on *Listeria monocytogenes*, Salmonella and native microflora on fresh vacuum packaged shrimps stored at 4 ºC. Journal of Food Microbiology. Vol. 31, pp: 43-50.
38. **Okeke, I.N.; Laxmaninarayan, R.; Bhutta, Z.A.; Duse, A.G.; Jenkins, P.; Obrien, T.F.; Pablos-Mendez, A. and Klugman, K.P., 2005.** Antimicrobial resistance in developing countries, Part 1: recent trends and current status. LanInfedis. Vol. 5, pp: 481-493.
39. **Padulosi, S. and Hadj-Hassan, A., 1998.** Towards a comprehensive documentation of distribution and use of Pistacia: genetic diversity in Central and West Asia, North Africa and Mediterranean Europe., Report of the IPGRI Workshop. 211 p.
40. **Paz, E.A.; Cerdeiras, M.P.; Fernandez, J.; Ferreira, F.; Moyna, P.; Soubes, M.; Vázquez, A.; Vero, S. and Zunino, L., 1995.** Screening of Uruguayan medicinal plants for antimicrobial activity. J. Ethnopharm. Vol. 45, pp: 67-70.
41. **Safary, A.; Motamedi, H.; Maleki, S. and Seyyednejad, S.M., 2009.** A preliminary study on the antibacterial activity of *Quercus brantii* against bacterial pathogens, particularly enteric pathogens. Int. J. Bot. Vol. 5, No. 2, pp: 176-180.
42. **Sagdic, O.; Aksoy, A.; Ozkan, G.; Ekici, L. and Albayrak, S., 2007.** Biological activities of the extracts of two endemic Sideritis species in Turkey. Innovative Food Science and Emerging Technologies. Vol. 9, No. 1, pp: 80-84.
43. **Sahoo, P.K. and Mukherjee, S.C., 1997.** In-vitro susceptibility of three bacterial pathogens of catfish to 23 antimicrobial agents. Indian J. Fisheries. Vol. 44, pp: 393-397.
44. **Sakar, M.K.; Ohreto, D.; Ozalp, M.; Ekizo, M.; Piancete, S. and Pizza, C., 2005.** Polyphenolic Compounds and Antimicrobial Activity of *Quercus aucheri* Leaves. Turk J Chem. Vol. 29, pp: 555-559.
45. **Sieradzki, K.; Robert, R.B.; Haber, S.W. and Tomasz, A., 1999.** Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming. Ann. Rev. Fish Dis. Vol. 4, pp: 273-313.
46. **Smith, P.; Honey, M.P. and Samuelsen, O.B., 1994.** Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming. Ann. Rev. Fish. Dis. Vol. 4, pp: 273-313.
47. **Soltani, M.; Jamshidi, S.H. and Sharifpour, I., 2005.** Streptococcus iniae in farmed rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Iran, Biophysical characteristics and pathogenesis. Bulletin of the European etiological agent of rainbow trout lactococcosis. International Journal of Aquatic Biology. Vol. 1, No. 3, pp: 119-124.
17. **Gonzalez, A.; Basilio, A.; Cabello, A.; Gorrochategui, J.; Suay, I.; Visente, F.; Portilo, E.; Jimenez, M.; Garseia Reina, G. and Pelaez, F., 2001.** Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gram Canaria (Canary Islands, Spain). Int Mic. Vol. 4, pp: 35-40.
18. **Ghaderi-Ghahfarokhi, M.; Sadeghi-Mahonak, A.; Alami, M.; Gorbani, M. and Azizi, M.H., 2011.** The effect of acid, alkali and salt on Removal of phenolics compounds from the pulp of two varieties of oak. Iranian Food Science and TechnologyResearch Journal. Vol. 7, No. 1, pp: 50-59.
19. **Harborne, J.B., 1998.** Phytochemical methods. 3th Ed. New York: Chapman and Hall. pp: 5-7.
20. **Harikrishnan, R.; Kim, D.H.; Hong, S.H.; Mariappan, P.; Balasundaram, C. and Heo, M.S., 2012.** Non-pecific immune response and disease resistance induced by *Siegesbeckia glabrescens* against *Vibrio parahaemolyticus* in *Epinephelus bruneus*. Fish Shellfish Immunol. Vol. 33, No. 2, pp: 359-364.
21. **Hong, H.; Luo, Y.; Zhou, Z. and Shen, H., 2012.** Effects of low concentration of salt and sucrose on the quality of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) fillets stored at 4 ºC. Journal of Food Chemistry. Vol. 133, pp: 102-107.
22. **Hyldgaard, M.; Mygind, T. and Meyer, R.L., 2012.** Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies and interactions with food matrix components. Journal of frontiers in microbiology. Vol. 3, No. 2, pp: 24-37.
23. **Immanuel, G.; Vicncybai, V.C.; Sivaram, V.; Palavesam, A. and Marian, M.P., 2004.** Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweed on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp Penaes indicus juveniles. Aquaculture. Vol. 236, pp: 53-65.
24. **Kandhasamy, M. and Arunachalam, K.D., 2008.** Evaluation of in vitro antibacterial property of seaweeds of southeast coast of India. Afr. J Biotechnol. Vol. 7, No. 12, pp: 1958-1961.
25. **Kaur, G.; Hamid, H.; Ali, A.; Alam, M.S. and Athar, A., 2004.** Antiinflammatory evaluation of alcoholic extract of galls of *Quercus infectoria*. J Ethnopharmacol. Vol. 90, pp: 285-292.
26. **Kazemi Najafi, S. and Doosthoseini, K., 2000.** The use of gall flour as the filler of phenol-formaldehyde resin in plywood manufacturing. Iranian J Nat Res. Vol. 53, No. 2, pp: 155-164. (In Persian).
27. **Khosravi, A. and Behzadi, A., 2006.** Evaluation of the antibacterial activity of the seed hull of *Quercus brantii* on some gram-negative bacteria. Pak. J. Med. Sci. Vol. 22, pp: 429-432.
28. **Kiarostami, K.H., 1998.** Evaluation of the antibacterial effects of *Quercus persica* and *Quercus castaneifolia* in tissue culture and perfect plant. J. Sci. Vol. 11, No. 1, pp: 1-8.
29. **Lavanya, R. and Veerappan, N., 2011.** Antibacterial Potential of Six Seaweeds Collected from Gulf of Mannar of the Southeast Coast of India. Adv. Biol. Res. Vol. 5, pp: 38-44.
30. **Mahmoodi, A.; Roomiani, L.; Soltani, M.; Akhondzadeh Basti, A.; Kamali, A. and Taheri, S., 2012.** Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils and Extracts from*Rosmarinus officinalis, Zataria multiflora, Anethum graveolens* and *Eucalyptus*

Association of Fish Pathogenesis. Vol. 25, No. 3, pp: 95-106.

48. **Soltani, M.; Fadaifard, F.; Sharifpour, I. and Zargar, A., 2008a.** The experimental pathology of Streptococcus sp. in *Onchorhynchus mykiss*. Iranian Journal of Fisheries Science. Vol. 17, No. 4, pp: 81-88.

49. **Soltani, M.; Nikbakht, G.H.; Mousavi, H.A.E. and Ahmadzadeh, N., 2008b.** Epizootic outbreaks of Lactococcosis caused by *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Iran. Bulletin of the European Association of Fish Pathogenesis. Vol. 28, pp: 207-212.

50. **Soltani, M.; Alishahi, M.; Khazrainia, P. and Satari, A., 2009.** Investigation of some immunological parameters of *Onchorhynchus mykiss* on some antigens of Streptoccus iniae. Iranian Journal of Veterinary Science. Vol. 62, No. 1, pp: 1-10.

51. **Vlientinck, A.J.; Van Hoof, L.; Totté, J.; Lasure, A.; Vanden Berghe, D.; Rwangabo, P.C. and Mvukiyumwami, J., 1995.** Screening of hundred Rwandese medicinal plants for antimicrobial and antiviral properties. J. Ethnopharm. Vol. 46, pp: 31-47.