Journal of Marine Medicine
Winter 2024, Volume 5, Issue 4
Pages: 223-230
10.30491/5.4.223

Evaluation of the Antioxidant, Cytotoxic, and Antibacterial Activities of the Ethanolic Extract of *Terminalia catappa* Against *Zoonotic Vibrio* Species

Roya Azm [1], Mohsen Gozari [2], Mohammad Niroomand [1 *]

[1] *Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran*
[2] *Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran*

Received: 30 December 2023 **Accepted:** 25 February 2024

Abstract

Background and Aim: The use of plant extracts as an alternative to antibiotics is gaining popularity. This study aimed to assess the antimicrobial, antioxidant, and toxicity properties of the ethanolic extract obtained from Terminalia catappa leaves against zoonotic Vibrio species.

Methods: The ethanolic extract was prepared using the solvent soaking extraction method. The antimicrobial activity was evaluated to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) through the microdilution method. Additionally, the antioxidant activity was assessed using the DPPH free radical scavenging activity assay. The cytotoxicity of the extract was tested on Artemia using the microdilution brine shrimp toxicity assay and on shrimp larvae based on cumulative mortality.

Results: The MIC of the extract against Vibrio harveyi and Vibrio parahaemolyticus was 312 and 625 µg/mL, respectively, with an MBC of 625 µg/mL for both strains. The extract exhibited DPPH free radical inhibition with an IC50 of 228.1 µg/mL. Furthermore, no toxicity was observed in Artemia franciscana and Penaeus vannamei shrimp larvae at various concentrations compared to the control.

Conclusion: The results indicate the potential of the ethanolic extract from T. catappa leaves as a promising candidate for further in vivo studies on prebiotic products.

Keywords: Antioxidant activity, Antimicrobial activity, *Terminalia catappa*, Plant extracts, *Vibrio parahaemolyticus*

[*]**Corresponding author:** Mohammad Niroomand, **Email**: mohamad_niromand@yahoo.com
Address: Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

مجله طب دریا
دوره ۵، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۲
صفحات: ۲۳۰-۲۲۳
10.30491/5.4.223

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، سیتوتوکسیک و ضد باکتریایی عصاره الکلی گیاه گارم زنگی (*Terminalia catappa*) علیه برخی گونه‌های زئونوز باکتری ویبریو

رویا ازم [۱]، محسن گذری [۲]، محمد نیرومند [۱] *

[۱] گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
[۲] پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۱۰/۰۹ **پذیرش مقاله:** ۱۴۰۲/۱۲/۰۶

چکیده

زمینه و هدف: امروزه استفاده از عصاره‌های گیاهی به عنوان یک راهبرد جایگزین برای مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها مورد توجه قرار گرفته است. هدف از مطالعه حاضر سنجش فعالیت‌های ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و سمیت عصاره اتانولی استخراج شده از برگ گیاه گارم زنگی *Terminalia catappa* بومی استان هرمزگان در مقابل برخی گونه‌های بیماریزای زئونوز ویبریو بود.

روش‌ها: در این مطالعه ابتدا عصاره اتانولی با استفاده از روش استخراج خیساندن در حلال تهیه شد. سپس فعالیت ضد میکروبی آن برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) با استفاده از روش میکرودایلوشن انجام شد. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره مذکور با استفاده از روش سنجش مهار رادیکال‌های آزاد دی فنیل۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) تعیین گردید. در نهایت فعالیت سیتوتوکسیک این عصاره در مقابل آرتمیا با استفاده از روش سنجش سمیت میگوی آب شور بصورت میکرودایلوشن و در مقابل لارو میگو بر اساس محاسبه مرگ و میر تجمعی ارزیابی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد میزان MIC عصاره استخراج شده در مقابل *Vibrio harveyi* و *Vibrio parahaemolyticus* به ترتیب g/mL µ ۳۱۲ و ۶۲۵ و MBC آن در مقابل هر دو سویه µg/mL ۶۲۵ ثبت شد. این عصاره رادیکال‌های آزاد DPPH را در غلظت میانه (IC_{50}) به میزان µg/mL ۲۲۸/۱ مهار نمود. همچنین در غلظت‌های مورد آزمون علیه *Artemia franciscana* و لارو میگوی *Penaeus vannamei* در مقایسه با شاهد سمیتی نشان نداد.

نتیجه‌گیری: این نتایج پتانسیل بالای عصاره اتانولی استخراج شده از برگ *T. catappa* را به عنوان کاندیدای نویدبخش در مطالعات درون‌تنی نشان داد.

کلیدواژه‌ها: فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضد میکروبی، عصاره‌های گیاهی، *Terminalia catappa*، *Vibrio parahaemolyticus*

*نویسنده مسئول: **محمد نیرومند**. پست الکترونیک: mohamad_niromand@yahoo.com
آدرس: گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

مقدمه

صنعت آبزی‌پروری به سرعت در حال رشد بوده و نقش قابل توجهی در تامین غذا، تغذیه و امنیت غذایی بشر ایفا نموده است. پرورش میگو به عنوان بخش مهمی از این صنعت چند میلیاردی به دلیل ضرورت افزایش مقیاس تولید به شدت وابسته به توسعه فناوری است. از این‌رو پژوهشگران در زمینه‌های علمی مرتبط مطالعات خود را بر توسعه دانش بنیان این صنعت متمرکز نموده‌اند. در حال حاضر *Penaeus vannamei* گونه غالب میگوهای پرورشی می‌باشد. تولید میگوی وانامی ۴/۹۶ میلیون تن می‌باشد که ۵۲/۹ درصد از کل تولید سخت پوستان را تشکیل می‌دهد (۱). این‌گونه بدلیل داشتن ارزش غذایی بالا به صورت گسترده در جهان پرورش داده می‌شود. افزایش فعالیت‌های صنعت پرورش میگو منجر به شیوع بیماری‌های استرس‌زا، از جمله بیماری‌های باکتریایی و ویروسی شده که خسارات جدی در سطح بین‌المللی ایجاد نموده است (۲). برخی از گونه‌های باکتری‌های جنس ویبریو مانند *V. parahaemplyticus* و *Vibrio harveyi* بیماریزای میگو بوده و عامل بیماری‌هایی نظیر نکروز حاد هپاتوپانکراس AHPND و سندرم مرگ زودرس EMS می باشند (۳). با توجه به زئونوز بودن گونه‌های باکتری ویبریو از قبیل *V. parahaemplyticus* و ایجاد مسمومیت غذایی برای انسان ضرورت مقابله با آن در مراکز پرورش میگو احساس می‌شود. به علت حساسیت بالای میگو، پرورش‌دهندگان مجبور به استفاده از آنتی‌بیوتیک و سایر داروهای مصنوعی شده‌اند که پیامدهای فاجعه باری از قبیل ظهور عوامل میکروبی مقاوم به آنتی‌بیوتیک برای انسان و محیط زیست به وجود می‌آورند (۴،۵). یکی از زمینه‌های مورد نیاز برای توسعه و به کارگیری فناوری مقابله یا چالش شیوع بیماری‌ها بویژه از طریق استراتژی پیشگیری است. از ابزارهای این راهبرد تقویت سلامت میگو با استفاده از محرک‌های سیستم ایمنی، ترکیبات آنتی‌اکسیدان و ترکیبات ضد میکروبی طبیعی است. اخیراً در آبزی‌پروری استفاده از ترکیبات گیاهی به عنوان محرک‌های ایمنی جهت تقویت سیستم ایمنی رایج شده است (۶). بکارگیری برخی از عصاره‌های گیاهی به منظور تحریک اشتها و افزایش رشد، تقویت ایمنی و کاهش استرس به‌علت داشتن بسیاری از ترکیبات فعال، مانند ساپونین‌ها، فلانوئیدها، فنول‌ها و غیره، مورد توجه محققین در صنعت آبزی‌پروری قرار گرفته است (۷). برخی از گیاهان دارویی می‌توانند مستقیماً تولید آنتی‌بادی‌ها را تقویت نموده و در پاسخ ایمنی در مقابل فرآیند عفونت ناشی از عوامل بیماریزا شرکت کنند (۸). همچنین مطالعات بسیاری فعالیت ضد باکتریایی گیاهان دارویی و ترکیبات فعال آنها را از طریق مکانیسم‌های متعددی از جمله مهار سنتز پروتئین، تخریب غشای سلولی، جلوگیری از تشکیل بیوفیلم و تکثیر DNA، ممانعت از بیوسنتز دیواره سلولی و مهار مسیرهای متابولیک نشان داده‌اند (۹). ویژگی‌هایی مانند عدم سمیت، زیست‌تخریب‌پذیر و زیست‌سازگار بودن این ترکیبات موجب برتری و اولویت استفاده از آنها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی می‌باشد (۱۰). از این ویژگی عصاره‌های گیاهی در صنعت آبزی‌پروری نیز استفاده شده است برای نمونه جیره‌های غذایی حاوی عصاره برگ گیاهان دارویی از قبیل *Mitracarpus scaber*، *Tridax procumbens* عملکرد رشد، آنتی‌اکسیدان‌ها، ایمنی غیراختصاصی و مقاومت ماهی تیلاپیا نیل در برابر عفونت انگلی را افزایش داد (۱۱). پژوهشگران همچنین از این ترکیبات گیاهی به عنوان محرک رشد و ایمنی، جذب‌کننده تغذیه، تقویت‌کننده و همچنین عامل ضد استرس استفاده نموده‌اند (۱۲). در مطالعه دیگری مشخص شد گیاه *Acanthopanax senticosus* عملکرد رشد، ایمنی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را با تنظیم متابولیسم لیپید در *Oreochromis niloticus* بهبود بخشید (۱۳). عصاره برگ سنبل آبی مقاومت به بیماری ناشی از عفونت *Vibrio harveyi* را در *Channa punctata* افزایش داد (۱۴).

گیاه گاروم‌زنگی با نام علمی *Terminalia catappa* متعلق به خانواده *Combretaceae* است که به طور وسیعی در مناطق گرمسیری دنیا انتشار دارد. گاروم‌زنگی، درختی بلند به ارتفاع ۲۵ متر با شاخه‌های افقی، میوه آن تخم مرغی شکل و پهن و ۵ سانتی‌متر طول دارد. رنگ آن سبز یا قرمز می‌باشد و دو گوشه بال‌دار دارد (۱۵, ۱۶). گزارش هایی از اثرات ضد میکروبی برگ و پوست تنه این درخت گزارش شده است. فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی (۱۷) و ضدمیکروبی (۱۸) از این گیاه وجود دارد. برگ این گیاه حاوی متابولیت‌های غنی مانند ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، الکالوئیدها، تری‌ترپن‌ها، تانن‌ها، ساپونین‌ها، فیتواسترول‌ها و گلیکوزیدهای استروئیدی می‌باشد (۱۹). افزودن عصاره برگ گاروم‌زنگی به آب لارو ماهی گورامی هم باعث بهبود بقا و رشد این ماهیان شد (۲۰). هدف از مطالعه حاضر ارزیابی برون‌تنی فعالیت‌های ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسیک عصاره اتانولی برگ گارم زنگی بومی استان هرمزگان در راستای استفاده از آن برای پیشگیری با شیوع سویه‌های زئونوز ویبریو در مزارع پرورش میگوی وانامی بود.

روش‌ها

آماده سازی عصاره برگ گارم‌زنگی

برگ سبز گاروم‌زنگی بعد از شستشو به‌منظور از بین رفتن مواد ضدتغذیه‌ای مثل تانن، به مدت ده دقیقه در آب جوش قرار داده‌شده و بعد بیرون آوردن از آب، در دمای اتاق، خشک و سپس آسیاب گردید. عصاره‌گیری با نسبت یک به ده، با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت خیساندن برگ‌ها در دمای اتاق انجام شد. در طی این مدت محلول به‌طور مرتب باید هم زده شد. این مرحله توسط دستگاه شیکر (همزن) انجام شد. سپس محلول صاف شده، پس از رسوب‌گیری با دستگاه روتاری عصاره‌گیری شد و عصاره حاصل

در ظرف‌های شیشه‌ای با حجم مناسب قرار گرفت. سپس در زیر هود و در دمای اتاق تغلیظ و خشک شد. تا زمان استفاده در دمای فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شد (۲۱).

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ گارم‌زنگی

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره مورد نظر بر اساس روش میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH به صورت مایکرودایلوشن انجام شد. بدین منظور ابتدا عصاره‌های استخراج شده توزین و به دنبال آن غلظت‌های متوالی با غلظت نهایی µg/ml ۱۹/۵، ۳۹، ۷۸/۱۲، ۱۶۵/۲۵، ۳۱۲/۵، ۶۲۵ تهیه گردید. به منظور اجرای آزمون ۱۹۵ میکرولیتر از محلول DPPH با غلظت ۱۰۰ میکرومولار در میکروپلیت ۹۶ خانه ای ریخته شد و ۵ میکرولیتر از هر غلظت عصاره به آن افزوده شد. پس از قرار دادن میکروپلیت در دمای اتاق و دور از نور به مدت ۳۰ دقیقه جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از میکروپلیت ریدر خوانش شد. درصد فعالیت مهار رادیکال های آزاد DPPH با اسفاده از فرمول ذیل محاسبه شد. آزمون بر اساس انجام سه تکرار طراحی شد (۲۲). از آسکوربیک اسید به عنوان شاهد و از متانول به عنوان کنترل منفی استفاده شد. IC_{50} هر ترکیب با استفاده از نرم افزار Graphpad prism 6 تعیین شد.

درصد فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH = $(I_0) - (I_{sample})/I_0 \times ۱۰۰$

I_0: جذب در چاهک حاوی DPPH ۱۹۵ µl + ۵ µl متانول

I_{sample} جذب در چاهک نمونه یا کنترل

تعیین حداقل غلظت‌های بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC) عصاره برگ گارم‌زنگی

حداقل غلظت‌های بازدارنده و کشنده عصاره‌های استخراج شده در مقابل سویه‌های مورد آزمون بر اساس روش استاندارد مایکرودایلوشن براثانجام شد (۲۳). عصاره به وسیله محیط کشت مولر هینتون براث (MHB) در رقت های نهایی ۱۰۲۵ ، ۶۲۵، ۳۱۲، ۱۵۶، ۷۸ و ۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر به روش تهیه رقت‌های متوالی تهیه گردید. سویه‌های باکتری مورد بررسی در این مطالعه شامل باکتری‌های بیماریزای میگوی پرورشی شامل *Vibrio parahaemolyticus*، *Vibrio harveyi* بود. جهت اجرای آزمون تعداد باکتری‌های موجود در لوله نیم مک فارلند برابر CFU/ml ۸ ۱۰×۱/۵ تهیه شد. بدنبال آن از هر کدام از غلظت‌های عصاره‌ها به میزان µl ۵۰ به هر چاهک در میکروپلیت افزوده شد. سپس از هر نمونه باکتری با کدورت مناسب نیز به میزان µl ۵۰ به چاهک های مورد نظر حاوی هر غلظت از عصاره اضافه شد. میکروپلیت‌ها را در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ ساعت گرماگذاری شد. پس از اتمام دوره گرماگذاری کدورت چاهک‌های میکروپلیت توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شد. کمترین غلظتی که رشد باکتری در آن متوقف شد به عنوان MIC گزارش گردید. به منظور تعیین غلظت کشندگی عصاره‌ها، از چاهک‌هایی که رشد باکتریایی و کدورت نداشتند در محیط کشت بلاد آگار کشت داده شد. جهت تعیین MBC از چاهک‌های فاقد رشد در محیط کشت MHA تلقیح گردید. کمترین غلظت بدون رشد به عنوان میزان MBC ثبت شد. از آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین به عنوان کنترل مثبت در جهت تضمین کیفیت و اعتبار بخشی به نتایج استفاده شد.

سنجش سمیت عصاره برگ گارم‌زنگی در مقابل آرتمیا

فعالیت سیتوتوکسیک متابولیت‌های استخراج شده از برگ گیاه گارم‌زنگی، با استفاده از روش Brine shrimp cytotoxicity method microwell مورد غربالگری قرار گرفت (۲۴). ۱۰۰میکرولیتر از سوسپانسیون ناپلی *Artemia franciscana* تهیه شده از شرکت INVE بلژیک (حاوی ۱۵-۱۰ ناپلی در۱۰۰ میکرولیتر) به ۱۰۰ میکرولیتر محلول عصاره با غلظت‌های نهایی ۱۰، ۵، ۲/۵ و ۱/۲۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر در هر چاهک افزوده شد. پس از گرماگذاری در $۲۵^{\circ}C$ به‌مدت ۲۴ ساعت، تعداد ناپلی‌های زنده و مرده ثبت شد. از متانول به عنوان کنترل مثبت شد. در رابطه ذیل N_{test} معادل تعداد ناپلی زنده در چاهک تیمار شده و $N_{control}$ معادل تعداد ناپلی زنده در چاهک تیمار نشده محاسبه شد.

درصد فعالیت سیتوتوکسیک $= [(N_{control}) - (N_{test})/ (N_{control})] \times 100$

سنجش سمیت عصاره برگ گارم‌زنگی در مقابل لارو میگو

در این آزمون لاروهای میگوی وانامی در PL9 تهیه و در یک تانک ۵ لیتری حاوی ۲ لیتر آب دریا نگهداری شد. در هر تانک ۲۵ پست لارو ذخیره شد. سویه‌های باکتری برتر با تراکم CFU /ml ۱×۱۰^{۷} و همچنین متابولیت‌های ثانویه استخراج شده با غلظت‌های نهایی µg/ml ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵ و ۶۲/۵ به تانک‌های محتوی لارو تلقیح شد. میزان مرگ و میر لاروهای مورد آزمون تا ۶ روز بررسی شد و LC50 ناشی از عصاره متابولیت‌های ثانویه با استفاده از معادله زیر محاسبه شد. این آزمون با سه تکرار انجام شد. عصاره آلی محیط کشت به عنوان کنترل مثبت استفاده شد(۲۵). در فرمول ذیل N_{test} معادل تعداد لارو زنده در تانک تیمار شده و $N_{control}$ تعداد لارو زنده در تانک تیمار نشده در نظر گرفته شد.

درصدفعالیت سیتوتوکسیک $= [(N_{control}) - (N_{test})/ (N_{control})] \times 100$

آنالیز آماری

تمامی آزمون‌ها با سه بار تکرار انجام شد. نتایج سنجش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسیک به صورت میانگین±خطای استاندارد (SE) ارائه گردید. IC_{50} و LC_{50} در سطوح اطمینان ۹۵٪ به‌وسیله رگرسیون غیرخطی با استفاده از نرم‌افزار Graphpad (GraphPad Software, Inc.) prism 6 محاسبه شد.

نتایج

نتایج سنجش فعالیت ضد باکتریایی بیانگر فعالیت ضد باکتریایی قوی عصاره اتانولی استخراج شده از برگ گیاه گارم زنگی در مقابل سویه‌های ویبریو بیماریزا بود. نتایج نشان داد حداقل غلظت بازدارنده عصاره استخراج شده معادل ۳۱۲ µg/ml در مقابل *V. harveyi* بود. در حالیکه کمترین غلظت ممانعت کننده از رشد سویه *V. parahaemolyticus* معادل ۶۲۵ µg/ml بود (جدول-۱). این نتایج همچنین نشان داد فعالیت حداقل غلظت کشنده عصاره استخراج شده در مقابل هر دو سویه *V. harveyi* و *V. parahaemolyticus* برابر با ۶۲۵ µg/ml ثبت شد (جدول-۲).

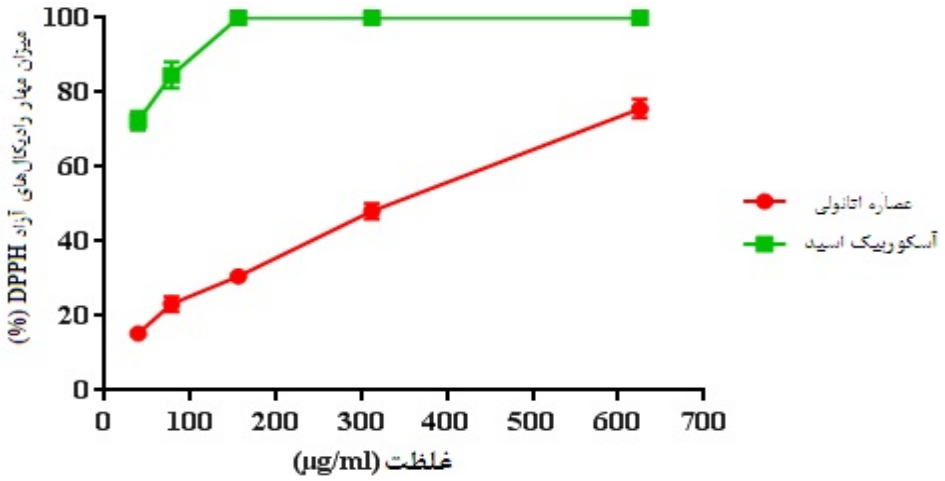
جدول-۱. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره اتانولی برگ گارم زنگی *T. catappa* در مقابل باکتری‌های مورد آزمون

سویه‌های باکتری	عصاره اتانولی برگ گارم‌زنگی (µg/ml)	تتراسیکلین (µg/ml)
V. harveyi	۳۱۲	۳۹
V. parahaemolyticus	۶۲۵	۳۹

جدول-۲. حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره اتانولی برگ گارم زنگی *T. catappa* در مقابل باکتری‌های مورد آزمون

سویه‌های باکتری	عصاره اتانولی برگ گارم‌زنگی (µg/ml)	تتراسیکلین (µg/ml)
V. harveyi	۶۲۵	۳۹
V. parahaemolyticus	۶۲۵	۳۹

نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی استخراج شده از برگ گارم زنگی بیانگر توانایی بالای این عصاره در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH بود. بررسی منحنی دوز-پاسخ این عصاره نشان داد میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به صورت وابسته به دوز بود (نمودار-۱). میزان IC_{50} این عصاره معادل ۲۲۸/۱ µg/ml ثبت شد. در حالیکه این میزان برای اسکوربیک اسید برابر با ۲۲/۲۰µg/ml محاسبه شد.



نمودار-۱. منحنی دوز پاسخ مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی برگ گارم زنگی

نتایج سنجش فعالیت سیتوتوکسیک عصاره اتانولی استخراج شده از برگ گارم زنگی بیانگر عدم سمیت آن در مقابل آرتمیا و لارو میگوی وانامی بود. این نتایج نشان داد LC_{50} عصاره مورد بررسی در مقابل *Artemia salina* و لارو میگوی *Penaeus vannamei* در غلظت‌های مورد استفاده سمیتی نشان نداد.

جدول-۳. فعالیت سیتوتوکسیک عصاره اتانولی برگ گارم زنگی *T. catappa* در مقابل ارگانیسم های هدف

ارگانیسم هدف	IC_{50}± SE (µg/ml)	سطوح اطمینان ۹۵٪
Artemia salina	ND*	–
Penaeus vannamei	ND	–

*ND: در غلظت‌های مورد آزمون فعالیت سیتوتوکسیک مشاهده نشد.

بحث

شیوع بیماری‌های مرتبط با استرس ناشی از مدیریت نامناسب آبزی‌پروری و عوامل محیطی به عنوان بزرگ‌ترین چالش در صنعت میگو منجر به خسارات مالی قابل توجهی در سطح جهان شده است. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها نیز علاوه بر ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی با تجمع باقی‌مانده‌ها در بافت‌ها و محیط می‌تواند منجر به اختلال در میکروبیوتای طبیعی آبزی شده و همچنین سلامت مصرف‌کنندگان را با خطر مواجه سازد (۲۶). از سویه دیگر انتشار سویه‌های بیماریزای زئونوز از مزارع پرورش میگو به کارکنان این مزارع و مصرف‌کنندگان نه تنها شانس شیوع بیماری بلکه شانس بروز سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را افزایش می‌دهد. از این‌رو یک راهبرد پایدار و سازگار با محیط‌زیست برای اطمینان از ایمنی مواد غذایی، حفظ اکوسیستم، افزایش بازده تولید و تضمین عرضه مستمر محصولات آبزی‌پروری با کیفیت بالا مورد نیاز است. بنابراین در مطالعه حاضر، یک منبع طبیعی بومی مانند برگ‌های گیاه گارم زنگی *T.catappa* به عنوان جایگزینی احتمالی آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین عاملی برای تحریک ایمنی در مرحله برون‌تنی مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج مطالعه حاضر فعالیت‌های ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدان و سیتوتوکسیک عصاره اتانولی استخراج شده را در سطح برون تنی بررسی نمود. این نتایج نشان داد عصاره اتانولی استخراج شده دارای فعالیت ضد میکروبی بالایی با MIC و MBC بترتیب µg/ml ۳۱۲ و ۶۲۵ در مقابل *V. harveyi* و µg/ml ۶۲۵ و ۶۲۵ در مقابل *V. parahaemolyticus* بود. این میزان اگرچه از فعالیت آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین کمتر بود لیکن با توجه به وجود سایر ترکیبات غیر از ماده موثره در عصاره آلی این میزان فعالیت قابل ملاحظه بود. فعالیت ضد میکروبی عصاره گارم زنگی در سایر مطالعات نیز ارزیابی شده است. برای نمونه مطالعه یزدی و همکاران نشان داد عصاره متانولی استخراج شده از میوه گارم زنگی در مقابل سویه‌های عامل عفونت سوختگی بر علیه ۱۰۰ درصد جدایه‌های *Pseudomonas aeruginosa* و *Acinetobacter* spp.، بیش از ۸۰ درصد جدایه‌های *Staphylococcus* و ۵۰ درصد جدایه‌های *Escherichia coli* با MIC معادل mg/ml ۲۰ مؤثر بود. نتایج مطالعه آنها نشان داد عصاره متانولی میوه *Terminalia catappa* اثر ضد باکتریایی بالایی علیه اغلب باکتری‌های مولد عفونت زخم سوختگی داشت (۲۷). از مقایسه نتایج مطالعه حاضر با مطالعه یزدی و همکاران می‌توان نتیجه‌گیری نمود فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی برگ گارم زنگی حداکثر ۶۴ برابر عصاره متانولی میوه این گیاه بود. اگرچه باید به تفاوت حلال استخراج و نوع باکتری بیماریزای هدف نیز توجه داشت. در سایر مطالعات نیز اثر ضد باکتریایی برگ این گیاه نشان داده شده است. مثلاً در یک مطالعه عصاره متانولی برگ *T.catappa* علیه چندین سویه بالینی *Staphylococcus* موثر بود. در حالی که در مقابل سویه‌های *Pseudomonas* و *E. coli* تاثیری نشان نداد (۲۷). در مطالعه دیگری اثر بازدارندگی عصاره متانولی برگ *T. catappa* در مقابل باکتری *V. parahaemolyticus* آزمون درون‌تنی گزارش شد. نتایج Haridevamuthu و همکاران نشان داد پس از ۲۸ روز تغذیه با جیره حاوی عصاره آبی *T. catappa* بازماندگی پست لاروهای میگوی وانامی در مقابل *V. parahaemolyticus* بطور معناداری ($p<0/0021$) نسبت به گروه کنترل افزایش یافت (۲۸).

نتایج سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس میزان مهار رادیکال‌های ازاد DPPH نشان داد عصاره اتانولی این گیاه در غلظت µg/ml ۲۲۸/۱ نیمی از رادیکال های آزاد DPPH را مهار نمود. در حالی که میزان IC_{50} اسکوربیک اسید معادل µg/ml ۲۲/۲۰ ثبت شد. به دلیل خلوص ترکیب آسکوربیک اسید مقایسه فعالیت ان با عصاره اتانولی خام گیاه منطقی نمی‌باشد لیکن استفاده از آسکوربیک‌اسید برای کنترل کیفی آزمون در نظر گرفته شد. در همین زمینه نتایج مطالعه صالحی بالاشهری و همکاران نشان داد خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره استونی برگ گارم زنگی۸۲/۳۱ درصد ثبت شد. در حالی که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی آن معادل ۸۲/۰۷ درصد بود. نتایج مطالعه آنها نشان داد کنار و گارم زنگی موثرترین گیاه از لحاظ حضور مواد آنتی‌اکسیدان و خاصیت آنتی‌اکسیدانی بود (۲۹). نوع حلال مورد استفاده تاثیر قابل‌ملاحظه‌ای بر میزان استخراج ترکیبات طبیعی از قبیل آنتی‌اکسیدان دارد. نتایج مطالعات مختلف نشان داده است نوع حلال بر بازده استخراج فلاونوئیدها، ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها موثر می‌باشد. لیکن لزوما استخراج بیشترین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمی‌شود. برای نمونه در مطالعات مختلف متانول بیشترین بازده استخراج ترکیبات فنولی را نشان داده است (۳۰). اما فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن از عصاره استونی کمتر بوده است. دلیل این پدیده استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی غیر فعال توسط متانول می‌باشد. استخراج این ترکیبات غلظت ترکیبات با فعالیت آنتی‌اکسیدانی را کاهش می‌دهد و نتیجه آن کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی یک عصاره گیاهی مزیتی رقابتی برای استفاده از آن به عنوان یک محرک ایمنی در آبزی‌پروری محسوب می‌شود. زیرا سطح بالای گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در بی مهرگان دریایی حیات آبزی را تهدید می‌کند. به همین دلیل ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجود در عصاره گارم زنگی می‌تواند نقش موثری در خنثی سازی سطح بالای ROS ایفا نماید (۳۱). اگرچه میزان این تاثیر احتمالی در تقویت سیستم ایمنی آبزی را می‌توان در مطالعات درون‌تنی آینده بررسی کرد.

ارزیابی فعالیت سیتوتوکسیک و سمیت عصاره اتانولی استخراج شده در مقابل دو ارگانیسم مدل و هدف در آبزی‌پروری بیانگر عدم

سمیت عصاره مذکور بود. گونه *Artemia salina* به عنوان یک مدل پذیرفته شده سنجش سمیت و لارو میگو به عنوان ارگانیسم هدف انتخاب شدند (۳۲-۳۴). نتایج نشان داد در هیچکدام از غلظت‌های مورد استفاده تراکم ناپلی های آرتمیا و پست لاروهای میگو تغییر معنی‌داری نسبت به کنترل ایجاد نکرد. این نتیجه ایمنی زیستی عصاره را برای مطالعات درون‌تنی در غلظت‌های مورد آزمون تایید نمود.

نتیجه‌گیری

در مجموع از نتایج بدست آمده در این مطالعه می‌توان نتیجه‌گیری نمود که عصاره اتانولی استخراج شده از برگ گیاهان گارم زنگی جمع آوری شده از استان هرمزگان بدلیل فعالیت ضد میکروبی در مقابل باکتری‌های ویبریو عامل زئونوز بیماری‌های AHPND و EMS و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا، بدون ایجاد سمیت در آبزی هدف، می‌تواند گزینه بالقوه‌ای برای مطالعات درون‌تنی ارزیابی یک تقویت‌کننده ایمنی در پرورش میگوی وانامی مطرح گردد. نتایج این مطالعه همچنین قابلیت گیاهان بومی به عنوان ابزاری جهت تغییر رویکرد به فراورده‌های طبیعی در مدیریت بهینه آبزی‌پروری و فعالیت‌های مسئولانه به منظور توسعه پایدار این صنعت و پیشگیری از انتشار سویه‌های زئونز به کارکنان مزارع پرورش میگو را ارائه می نماید.

تشکر و قدردانی: این مقاله پژوهشی بخشی از نتایج پایان نامه کارشناسی ارشد با عنوان " ارزیابی تأثیر استفاده از جیره‌های غذایی حاوی عصاره برگ گیاه گاروم‌زنگی (*Terminalia catappa*) بر عملکرد رشد، سیستم ایمنی – آنتی‌اکسیدانی و برخی از باکتری‌های بیماری‌زای گونه ویبریو در میگوی پاسفید غربی (*Penaeus vannamei* Boone 1931) " مصوب دانشگاه هرمزگان می‌باشد.

نقش نویسندگان: ازم: کار آزمایشگاهی، متدولوژی، نگارش مقاله. گذری: کار آزمایشگاهی، آنالیز داده ها و ویرایش مقاله نیرومند: نویسنده مسئول، .ایده پردازی، ویرایش مقاله و کار آزمایشگاهی. همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله یا بازنگری آن سهیم بوده‌اند و همه با تایید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مندرجات در آن را می پذیرند.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می کنند که هیچ گونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع

1. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. 2020.
2. Liu L, Shan L-P, Zhou Y, Chen J. Small molecule inhibitors of white spot syndrome virus: promise in shrimp seedling culture. International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22(7):3450. doi:10.3390/ijms22073450
3. Muthukrishnan S, Defoirdt T, Ina-Salwany M, Yusoff FM, Shariff M, Ismail SI, et al. Vibrio parahaemolyticus and Vibrio harveyi causing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Penaeus vannamei (Boone, 1931) isolated from Malaysian shrimp ponds. Aquaculture. 2019; 511:734227. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.734227
4. Serwecińska L. Antimicrobials and antibiotic-resistant bacteria: a risk to the environment and to public health. Water. 2020; 12(12):3313. doi:10.3390/w12123313
5. Ben Y, Fu C, Hu M, Liu L, Wong MH, Zheng C. Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. Environ Res. 2019; 169:483-93. doi:10.1016/j.envres.2018.11.040
6. Li P, Gatlin III DM. Nucleotide nutrition in fish: current knowledge and future applications. Aquaculture. 2006; 251(2-4):141-52. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.01.009
7. Awad E, Awaad A. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. Fish Shellfish Immunol. 2017; 67:40-54. doi:10.1016/j.fsi.2017.05.034
8. Ghosh AK, Panda SK, Luyten W. Anti-vibrio and immune-enhancing activity of medicinal plants in shrimp: A comprehensive review. Fish Shellfish Immunol. 2021; 117:192-210. doi:10.1016/j.fsi.2021.08.006
9. Zhao X, Chen L, Wu Je, He Y, Yang H. Elucidating antimicrobial mechanism of nisin and grape seed extract against Listeria monocytogenes in broth and on shrimp through NMR-based metabolomics approach. Int J Food Microbiol. 2020; 319:108494. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108494
10. Seethalakshmi P, Rajeev R, Kiran GS, Selvin J. Shrimp disease management for sustainable aquaculture: innovations from nanotechnology and biotechnology. Aquacult Int. 2021; 29:1591-620. doi:10.1007/s10499-021-00698-2
11. Adeshina I, Abdel-Tawwab M, Tijjani ZA, Tiamiyu LO, Jahanbakhshi A. Dietary Tridax procumbens leaves extract stimulated growth, antioxidants, immunity, and resistance of Nile tilapia, Oreochromis niloticus, to monogenean parasitic infection. Aquaculture. 2021; 532:736047. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.736047
12. Tadese DA, Song C, Sun C, Liu B, Liu B, Zhou Q, et al. The role of currently used medicinal plants in aquaculture and their action mechanisms: A review. Reviews in Aquaculture. 2022; 14(2):816-47. doi:10.1111/raq.12626
13. Li H, Qiang J, Song C, Xu P. Transcriptome profiling reveal Acanthopanax senticosus improves growth performance, immunity and antioxidant capacity by regulating lipid metabolism in GIFT

(Oreochromis niloticus). Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics. 2021;37:100784. doi:10.1016/j.cbd.2020.100784
14. Verma VK, Prakash O, Kumar RSR, Rani KV, Sehgal N. Water hyacinth (Eichhornia crassipes) leaves enhances disease resistance in Channa punctata from Vibrio harveyi infection. The Journal of Basic and Applied Zoology. 2021; 82:1-11. doi:10.1186/s41936-020-00203-w
15. Raphaël B, Rony MA, Célestine NL, Louis-Clément OE, Jacques L, Jean-Maurille O. Phytochemical study and antioxidant activities of Terminalia catappa L. and Mitragyna ciliata Aubrev and Pellegr medicinal plants of Gabon. Journal of Medicinal Plants. 2019; 7(1):33-8.
16. Terças AG, Monteiro AdS, Moffa EB, Santos JRd, Sousa EMd, Pinto AR, et al. Phytochemical characterization of Terminalia catappa linn. Extracts and their antifungal activities against candida spp. Frontiers in Microbiology. 2017; 8:595. doi:10.3389/fmicb.2017.00595
17. Krishnaveni M. In vitro antioxidant activity of Terminalia catappa nuts. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 2014:33-5.
18. Kumar V, Sharma N, Sourirajan A, Khosla PK, Dev K. Comparative evaluation of antimicrobial and antioxidant potential of ethanolic extract and its fractions of bark and leaves of Terminalia arjuna from north-western Himalayas, India. Journal of traditional and complementary medicine. 2018; 8(1):100-6. doi:10.1016/j.jtcme.2017.04.002doi:10.1016/j.jtcme.2022.01.002
19. Nugroho R, Aryani R, Anggraini W, Hardi E, Rudianto R, Kusumawati E, et al., editors. Dietary Terminalia catappa leaves reduced growth performance but increased hematological profiles and survival rate of Pangasianodon hypophthalmus. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science; 2019: IOP Publishing. doi:10.1088/1755-1315/348/1/012033
20. Sung YY, Abol-Munafi A. Terminalia catappa leaf extract is an effective rearing medium for larviculture of gouramis. J Appl Aquacult. 2020; 32(2):175-85. doi:10.1080/10454438.2019.1614509
21. Mariita R, Ogol C, Oguge N, Okemo P. Methanol extract of three medicinal plants from Samburu in Northern Kenya show significant antimycobacterial, antibacterial and antifungal properties. Research Journal of Medicinal Plant. 2011; 5(1):54-64. doi:10.3923/rjmp.2011.54.64
22. Leong L, Shui G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. Food Chem. 2002; 76(1):69-75. doi:10.1016/S0308-8146(01)00251-5
23. Wayne P. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically M7-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA. 2015.
24. Atta-ur-Rahman CM, Thomsen WJ. Bioassay Techniques for Drug Development. Harwood Academic Publishers, Australia; 2001. doi:10.3109/9780203304532
25. Gozari M, Mortazavi M, Bahador N, Jahromi S, Rabbaniha M. Isolation and screening of antibacterial and enzyme producing marine actinobacteria to approach probiotics against some pathogenic vibrios in shrimp Litopenaeus vannamei. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 2016; 15(1):630-44.
26. Prathiviraj R, Rajeev R, Fernandes H, Rathna K, Lipton AN, Selvin J, et al. A gelatinized lipopeptide diet effectively modulates immune response, disease resistance and gut microbiome in Penaeus vannamei challenged with Vibrio parahaemolyticus. Fish Shellfish Immunol. 2021; 112:92-107. doi:10.1016/j.fsi.2021.02.018
27. Babayi H, Kolo I, Okogun J, Ijah U. The antimicrobial activities of methanolic extracts of Eucalyptus camalctulensis and Terminalia catappa against some pathogenic microorganisms. 2004. doi:10.4314/biokem.v16i2.32578
28. Sudhakaran G, Guru A, Haridevamuthu B, Murugan R, Arshad A, Arockiaraj J. Molecular properties of postbiotics and their role in controlling aquaculture diseases. Aquacult Res. 2022; 53(9):3257-73. doi:10.1111/are.15846
29. Balashahri MS, Davari A, Nasab BF. Effect of the Solvent Type on Phenolic and Flavonoid Substances and Antioxidant Properties of Leaves of 15 Medicinal Plants in Roodān Region of Southern Iran. Journal of Ilam University of Medical Sciences: Volume. 2022; 29(5). doi:10.52547/sjimu.29.5.1
30. Fazeli-nasab B, Moshtaghi N, Forouzandeh M. Effect of solvent extraction on phenol, flavonoids and antioxidant activity of some Iranian native herbs. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2019; 27(3):14-26. doi:10.29252/sjimu.27.3.14
31. Velho-Pereira S, Parvatkar P, Furtado IJ. Evaluation of antioxidant producing potential of halophilic bacterial bionts from marine invertebrates. Indian journal of pharmaceutical sciences. 2015; 77(2):183. doi:10.4103/0250-474X.156572
32. Okumu MO, Mbaria JM, Gikunju JK, Mbuthia PG, Madadi VO, Ochola FO, et al. Artemia salina as an animal model for the preliminary evaluation of snake venom-induced toxicity. Toxicon: X. 2021; 12:100082. doi:10.1016/j.toxcx.2021.100082
33. Rajabi S, Ramazani A, Hamidi M, Naji T. Artemia salina as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences. 2015; 23:1-6. doi:10.1186/s40199-015-0105-x
34. Gozari M, Tamadoni Jahromi S, Pourmozaffar S, Karimzadeh R. Isolation and Evaluation of Cytotoxic and Antioxidant activity of the isolated Actinobacteria from the two Species of Persian Gulf Sea Cucumber (Holothuria scabra and Holothuria leucospilota). Journal of Marine Biology. 2020; 11(4):35-46. doi:10.52547/joc.11.41.39