

مطالعه اثر ضد باکتریایی گل درخت گردو (*Juglans regia*) علیه باکتری آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) در شرایط آزمایشگاهی

روح اله رحیمی*^۱، پروین محسنی سی سخت^۲، گودرز هاشمی^۳

۱- گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- بخش بهداشت آبزیان، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳- گروه ترکیبات طبیعی و دارویی دریایی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی جندی شاپور، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش: ۲۹ شهریور ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۲۵ فروردین ۱۳۹۶

چکیده

مقاومت‌های دارویی روز افزون علیه باکتری‌های بیماری‌زا و افزایش دوز مصرفی داروهای متداول از یک سو و افزایش عوارض جانبی ناشی از استفاده از این داروها از سوی دیگر، موجب شده است تا در سال‌های اخیر بیشترین توجه به عواملی یا پایه طبیعی مانند گیاهان دارویی معطوف شود که دارای حداقل اثرات سوء ذکر شده می‌باشند. از این رو در این تحقیق، بعد از تهیه عصاره از گل درخت گردو، رقت‌های متوالی از هر گیاه جهت به دست آوردن حداقل غلظت مهار رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) در برابر باکتری آئروموناس هیدروفیلا به روش تهیه رقت متوالی تهیه گردید. همچنین، با استفاده از روش انتشار دیسک، هاله مهار رشد باکتری نیز اندازه‌گیری و مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که، غلظت ۳۷/۵ میلی گرم بر میلی لیتر، عصاره اتانولی اثر باکتری‌سیدی (MBC) در برابر رشد باکتری آئروموناس هیدروفیلا و در غلظت ۱۸/۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر خاصیت باکتریواستاتیک (MIC) و عصاره آبی گل گردو در غلظت ۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر خاصیت باکتری‌سیدی و در غلظت ۳۷/۵ میلی گرم بر میلی لیتر خاصیت باکتریواستاتیک از خود نشان داد. قطر هاله عدم رشد باکتری‌های مورد بررسی در اطراف گوده‌های حاوی هر عصاره نیز این نتایج را تایید نمود. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت با توجه به اثر مناسب عصاره‌ها روی عامل بیماری‌زای ماهی، لازم است امکان استفاده از آن‌ها در درمان و پیشگیری از بیماری‌های باکتریایی ماهی ارزیابی گردد.

کلمات کلیدی: آئروموناس هیدروفیلا، عصاره گل درخت گردو، باکتری.

مقدمه

آثروموناس هیدروفیلا یکی از باکتری‌های مهم در پرورش ماهی بوده و به عنوان یک عامل بیماری‌زا برای بسیاری از گونه‌های مختلف ماهیان آب شیرین و گاهی آب شور محسوب می‌شود (Lee et al., 2000). آثروموناس‌ها، باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری، گرم منفی، اکسیداز و کاتالاز مثبتی هستند و از دو گروه مجزای غیرمتحرک سرمدوست و متحرک مزوفیلیک تشکیل شده‌اند (سلطانی و موسوی، ۱۳۷۵). این باکتری در کپور، مار ماهی، شیر ماهی، گربه ماهی، تیلاپیا و قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث ایجاد سپتی‌سمی هموراژیک می‌شود و بیماری حاصله از این باکتری در سراسر دنیا گسترش دارد (Peyghan et al., 2010). آثروموناس هیدروفیلا یک باکتری همیشه حاضر و فرصت‌طلب است که در مورد پاتوژن اولیه و ثانویه بودن این باکتری اختلاف نظر وجود دارد (Nielsen et al., 2001). آثروموناس از باکتری‌های مهم در صنعت پرورش گرمابی است، ولی گاهی در ماهیان آب‌شور نیز باعث بروز بیماری می‌شود و علاوه بر ماهی، این باکتری در انسان نیز ممکن است بیماری‌هایی از قبیل گاستروانتریت و اسهال مسافرتی می‌شود (اخلاقی، ۱۳۷۹). در ایران در سال ۱۳۷۲ در بررسی علل تلفات آمور، جداسازی آثروموناس‌های متحرک از آبشش و کلیه و کبد این ماهی صورت گرفت (پیغان و اسماعیلی، ۱۳۷۲).

در سال‌های اخیر شاهد افزایش مقاومت باکتری آثروموناس هیدروفیلا به آنتی‌بیوتیک‌های رایج بوده‌ایم. مقاومت دارویی منجر به افزایش مرگ و میر و افزایش هزینه‌های مراقبت بهداشتی می‌شود که پیشگیری از بروز مقاومت و انتشار میکروارگانسیم

مقاوم می‌تواند منجر به کاهش اثرات زیان‌آور و هزینه‌های وابسته به آنها شود. از جمله راهکارها به منظور مقابله و جلوگیری از بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی، استفاده از عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی می‌باشد که دارای حداقل اثرات سوء در ارتباط با آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند (Tierra, 2007; Pandey and Mishra, 2009). گزارشات زیادی از ایجاد مقاومت‌های شدید دارویی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در آبی‌پروری وجود دارد. عادل و همکاران (۱۳۹۳) با بررسی اثر ضد باکتری عصاره‌های گیاهی بر باکتری آثروموناس هیدروفیلا جداسازی شده از ماهی خاویاری نتیجه‌گیری کردند که اندازه هاله عدم رشد باکتری تحت تاثیر عصاره زیره سیاه به طور معناداری در سطح بالاتری نسبت به عصاره‌های گیاهی نعنا فلفلی، بومادران و درمنه بود. علیشاهی (۱۳۸۹) با بررسی اثر سطوح عصاره گیاه آلوئه‌ورا بر شاخص‌های رشد و میزان مقاومت در برابر عفونت با باکتری آثروموناس هیدروفیلا در ماهی سیچلید گزارش کرد که مناسب‌ترین غلظت آلوئه‌ورا در خوراک برای تحریک رشد و افزایش مقاومت در برابر عفونت‌های باکتریایی، ۰/۵ درصد می‌باشد.

گردو (*Juglans regia*) علاوه بر مصارف تغذیه‌ای در طب سنتی نیز کاربرد دارد و از برگ‌های آن برای درمان دردهای رماتیسمی، تب، دیابت، کم خونی و بیماری‌های تنفسی استفاده می‌شود (Pereira et al., 2007). از ریشه آن برای درمان دیابت و از مغز گردو به خاطر داشتن امگا ۳ برای تقویت حواس و مغز و قوای جنسی استفاده می‌شود (Kasper et al., 2005). از پوست درخت و پوست سبز گردو به عنوان ماده قابض، همچنین جهت درمان ورم مفاصل، شست و شو و التیام زخم‌ها و درمان ترشحات زنانه و بیماری سل

و در نهایت عصاره‌ی نسبتاً غلیظی از گیاهان به دست آمد. به منظور استریل نمودن عصاره‌ها از آلودگی میکروبی همه عصاره‌ها از فیلترهای میکروبی ۰/۴۵ میکرونی عبور داده شدند و برای ادامه کار در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

روش تهیه سوسپانسیون باکتری

باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت؛ این باکتری با روش PCR جنس و گونه آن اثبات شده بود. باکتری در محیط تریپتیکاز سوی برات (TSB) کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در ۲۵ درجه انکوبه گردیدند. سپس در شرایط استریل بذر باکتری به محیط مولر هیتون برات اضافه گردید. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در فاز لگاریتمی رشد باکتری، میزان کدورت ایجاد شده حاصل از رشد باکتری با استفاده از اسپکتروفوتومتر با لوله استاندارد مک فارلند شماره ۰/۵ ($10^8 \times 1/5$) تنظیم گردید. این سوسپانسیون به عنوان ذخیره در نظر گرفته شده و در هنگام مصرف (در همان روز) به نسبت ۱:۱۰۰ در همان محیط رقیق گردید ($10^6 \times 1/5$).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد

(MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) از روش BROTH Micro dilution استفاده گردید. در این روش حداقل غلظت کشندگی (MBC) و بازدارندگی از رشد (MIC) عصاره گل درخت گردو تعیین شد. آزمایش MIC در پلیت ۹۶ خانه استریل و با روش

استفاده می‌شود (Emami *et al.*, 2002). بررسی اثر ضد قارچی برگ درخت گردو علیه قارچ مالاسزیا فورفور در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که می‌توان در آینده از برگ درخت گردو علیه این قارچ استفاده کرد (غلامپور و همکاران، ۱۳۹۴). گل نر گردو به دلیل فراوانی و در دسترس بودن و امکان تهیه ارزان اگر موثر باشد می‌تواند جانشین مناسبی برای داروهای سنتتیک و غیر سنتتیک باشد.

در مطالعه حاضر، اثرات ضد میکروبی عصاره گل درخت گردو بر باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه

بعد از شناسایی و جمع‌آوری گیاه از قسمت مورد نیاز گیاهان جدا شده و در شرایط مناسب (تاریک و خشک) نگهداری و به طور کامل خشک گردید. بعد از خشک شدن و آسیاب کردن قسمت‌های مورد استفاده عصاره‌گیری انجام شد.

استخراج عصاره از گل درخت گردو

برای تهیه عصاره، ابتدا ۱۰۰ گرم از پودرهای گیاهی تهیه شده را با استفاده از ترازوی دیجیتال توزین نموده و به نسبت ۱ به ۵ با آب مقطر مخلوط گردید. مخلوط حاصل را پس از نگهداری ۲۴ ساعته در دمای آزمایشگاه به وسیله گاز ۴ لایه و قیف صاف کرده و به منظور جدا کردن ناخالصی‌ها، عصاره را به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۲۵۰۰ rpm، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید، سپس عصاره را به منظور خارج کردن آب اضافی به دستگاه تقطیر در خلا منتقل کرده

بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه، هاله عدم رشد باکتری با خط کش اندازه‌گیری و ثبت گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

از آزمون واریانس آنالیز یک‌طرفه برای مقایسه واریانس تیمارها و از آزمون توکی در سطح ۵ درصد برای بررسی وجود و عدم وجود اختلاف معنی‌داری بین میانگین تیمارها در نرم‌افزار SPSS استفاده شد.

نتایج

بر اساس نتایج بدست آمده با روش میکرودايلوشن، غلظت ۳۷/۵ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی گیاه گل درخت گردو اثر باکتری‌سیدی (MBC) و در غلظت ۱۸/۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر خاصیت باکتریواستاتیک (MIC) در برابر رشد باکتری آئروموناس هیدروفیلا از خود نشان داد. عصاره آبی گل درخت گردو در غلظت ۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر، دارای اثر باکتری‌سیدی (MBC) و در غلظت ۳۷/۵ میلی گرم بر میلی لیتر، اثر باکتریواستاتیک (MIC) در برابر رشد باکتری آئروموناس هیدروفیلا داشت.

براث میکرودايلوشن انجام شد. بدین ترتیب که ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری مذکور به چاهک‌های حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره گل درخت گردو و ۱۰۰ میکرولیتر محیط Muller Hinton Brouth اضافه شد. سپس از خانه اول توسط سمپلر، ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و در خانه دوم ریخته شد، به همین ترتیب تا آخرین خانه این کار ادامه پیدا کرد و در نهایت از خانه آخر ۱۰۰ میکرولیتر به بیرون ریخته شد. تنها چاهک اول (کنترل مثبت) حاوی سوسپانسیون میکروبی و محیط Muller Hinton Brouth و چاهک دوم (کنترل منفی) حاوی محیط Muller Hinton Brouth و عصاره‌ها بود.

تعیین قطر هاله‌های عدم رشد برای مقادیر

MBC و MIC

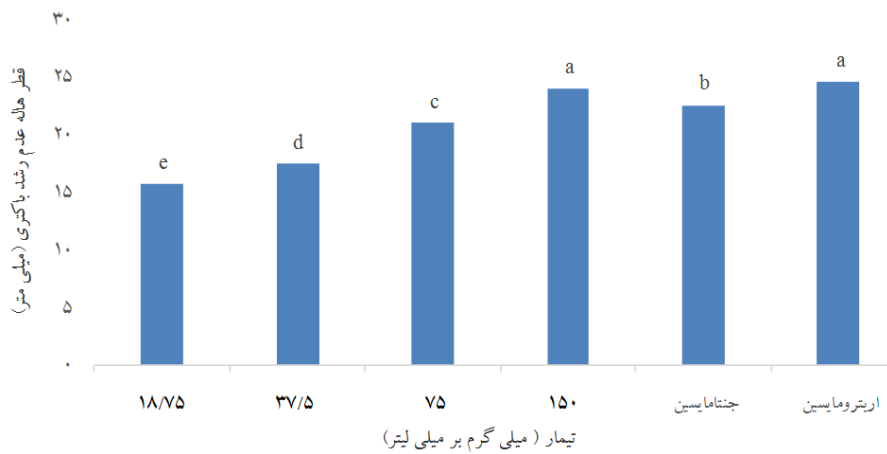
برای تعیین قطر هاله عدم رشد، بوسیله پیت پاستور استریل و پمپ خلا چاهک‌هایی به قطر ۵ میلی متر در شرایط استریل در روی محیط مولر هینتون آگار ایجاد گردید. سپس ذخیره باکتری اولیه با کدورت‌سنجی بوسیله اسپکتوفوتومتر (با غلظت ۰/۵، مک‌فارلند) تهیه شده و به روش کشت سفره‌ای در سه جهت کشت داده شد. میزان ۲۵ میکرولیتر از مقادیر بدست آمده MIC برای هر عصاره در سه تکرار به گوده‌ها اضافه گردید و

جدول ۱: حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌ها علیه باکتری آئروموناس هیدروفیلا.

۲/۳	۴/۶	۹/۳۷	۱۸/۷۵	۳۷/۵	۷۵	۱۵۰	باکتری	میلی گرم بر میلی لیتر
+	+	+	MIC	MBC	-	-	آئروموناس هیدروفیلا	عصاره اتانولی گل درخت گردو
+	+	+	+	MIC	MBC	-	آئروموناس هیدروفیلا	عصاره آبی گل درخت گردو

+ نشان دهنده رشد باکتری در محیط کشت می‌باشد.

- نشان دهنده عدم رشد باکتری در محیط کشت می‌باشد.



شکل ۱: مقایسه اثر ضد باکتریایی عصاره اتانولی گل درخت گردو با آنتی‌بیوتیک‌های رایج علیه باکتری آئروموناس هیدروفیلا.

هاله عدم رشد در ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره با میانگین ۲۴/۲ میلی متری، کم‌تر از قطر هاله عدم رشد اریترومایسین با میانگین هاله عدم رشد ۲۴/۸ میلی متری می‌باشد، که اختلاف معنی‌داری بین این دو یافت نشد ($P > 0.05$). در این غلظت هاله عدم رشد بیشتر از هاله عدم رشد جنتامایسین با میانگین ۲۲/۶ میلی متر بود.

غلظت‌های ۱۵۰، ۷۵ و ۳۷/۵ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی گل درخت گردو با هم اختلاف معنی‌داری به ازای قطر هاله عدم رشد داشتند. با توجه به اختلاف معنی‌دار غلظت‌های مختلف عصاره نتایج بازگوکننده افزایش اثر ضد باکتریایی عصاره به ازای افزایش غلظت آن‌ها می‌باشد، می‌توان گفت با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله بازدارندگی نیز افزایش می‌یابد.



شکل ۲: مقایسه اثر ضد باکتریایی عصاره آبی گل درخت گردو با آنتی‌بیوتیک‌های رایج علیه باکتری آئروموناس هیدروفیلا.

میلی متر کمتر از آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین و جنتامایسین بود.

قطر هاله عدم رشد عصاره آبی گل درخت گردو در غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر، با میانگین ۱۸.۸

بحث

آئروموناس هیدروفیلا جز فلور طبیعی دستگاه گوارش اکثر ماهیان می‌باشد که به دنبال بروز شرایط استرس‌زا از قبیل افزایش بار مواد آلی، کمبود اکسیژن و سایر تغییرات فیزیوشیمیایی در آب موجب کاهش مقاومت ماهی نسبت به عوامل بیماری‌زا می‌گردد. در این تحقیق حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی و آبی گل درخت گردو به ترتیب $37/5$ و 75 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی عصاره اتانولی و آبی گل درخت گردو $18/75$ و $37/5$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر علیه باکتری آئروموناس هیدروفیلا تعیین گردید. با توجه به نتایج بدست آمده عصاره اتانولی گل درخت گردو دارای اثر قوی‌تری نسبت به عصاره آبی بوده است. علیشاهی و همکاران (۱۳۸۸) با مطالعه اثرات ضد باکتریایی برخی عصاره‌های گیاهی علیه استرپتوکوکوس اینیایی، یرسینیا راکری و آئروموناس هیدروفیلا دریافتند که بیشترین قدرت باکتری‌سیدی را عصاره پوست انار و آویشن با MIC برابر 25 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر علیه باکتری آئروموناس هیدروفیلا داشتند که در مقایسه با بررسی حاضر دارای اثر ضد باکتریایی قوی‌تری بودند (علیشاهی و همکاران، ۱۳۸۸). خاشی کمال آبادی (۱۳۹۳) با بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های قطبی و غیر قطبی گیاه اسپند بر باکتری‌های ماهی نتیجه‌گیری کرد که، عصاره متانولی و اتانولی گیاه اسپند با میزان 16 میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیشترین اثر ضد باکتریایی را بر روی باکتری آئروموناس هیدروفیلا دارد، که در مقایسه با نتایج حاضر گیاه اسپند دارای اثر ضد باکتریایی بیشتری است (خاشی و قاسم‌زاده، ۱۳۹۳). در تحقیق معصوم‌زاده با بررسی تاثیرات ضد باکتریایی عصاره سیر و آویشن شیرازی بر باکتری

آئروموناس هیدروفیلا جداسازی شده از تاس ماهیان پرورشی بر اساس نتایج حاصل، حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره هیدورالکلی آویشن شیرازی و سیر به ترتیب $0/25$ و 1 میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شد که اثر بالاتری نسبت به عصاره گل درخت گردو داشت (معصوم‌زاده، ۱۳۹۵).

نتایج بازگوکننده افزایش اثر ضد باکتریایی عصاره به ازای افزایش غلظت آن‌ها می‌باشد. قطر هاله عدم رشد در 150 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی گل درخت گردو با میانگین هاله عدم رشد مربوط به آنتی‌بیوتیک اریترومايسين اختلاف معنی‌داری یافت نشد ($P > 0/05$). در این غلظت هاله عدم رشد بیشتر از هاله عدم رشد جنتامایسین بود که شاید بتوان در این غلظت جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک جنتامایسین باشد.

به عنوان نتیجه کلی، با توجه به اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های مورد بررسی، می‌توان با خالص‌سازی مواد موثره و مطالعه روی این عصاره‌ها، به عنوان جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده نمود. امکان استفاده از این عصاره‌ها به صورت خوراکی نیاز به تحقیق بیشتر در مورد اثرات ضد باکتریایی سیستمیک این عصاره‌ها در تجویز خوراکی دارد. استفاده از این عصاره‌ها هم به صورت خوراکی و هم به صورت حمام در ماهی قابل توصیه می‌باشد، مشروط به اینکه کارایی و بی‌خطر بودن عصاره‌ها در ماهی ثابت گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مدیریت گروه شیلات و محیط‌زیست دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین و کارشناس آزمایشگاه شیلات جهت همکاری در راستای انجام تحقیق حاضر سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

۱. اخلاقی، م.، ۱۳۷۹. ایمنی‌زایی باکتری آئروموناس هیدروفیلا در ماهی کپور معمولی. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۵۵(۱)، ۶۲-۵۷.
۲. پیغان، ر، اسماعیلی، ف.، ۱۳۷۲. آلودگی ماهی کپور علفخوار به ارگانسیم‌های شبیه آئروموناس‌های متحرک. مجله علمی شیلات ایران، ۶(۲)، ۸-۱.
۳. خاشی کمال‌آبادی، ح.، ۱۳۹۳. بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های قطبی و غیر قطبی گیاه اسپند بر باکتری‌های ماهی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار. ۱۳۴ صفحه.
۴. سلطانی، م، ابراهیم زاده موسوی، ح.، ۱۳۷۵. جداسازی آئروموناس ورونی و آئروموناس هیدروفیلا از تلفات امور ماهیان پرورشی در دو کارگاه پرورش ماهی واقع در استان‌های گیلان و تهران. مجله علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، ۳(۴)، ۲۹-۲۲.
۵. علیشاهی، م.، ۱۳۸۹. بررسی اثر سطوح عصاره گیاه آلوئه ورا بر شاخص‌های رشد و میزان مقاومت در برابر عفونت با باکتری آئروموناس هیدروفیلا در ماهی سیکلید. مجله علمی پژوهشی بیولوژی دریا، ۲(۸)، ۴۶-۴۱.
۶. عادل، م.، نعمت الهی، ا.، عباسی دهکردی، ح.، ۱۳۹۴. بررسی اثر ضد باکتریایی برخی از عصاره‌های گیاهی بر باکتری آئروموناس هیدروفیلا جداسازی شده از ماهیان خاویاری. اولین همایش ملی گیاهان دارویی و داروهای گیاهی، تهران، ایران.
۷. علیشاهی، م.، قربانپور نجف آبادی، م.، نجف زاده، ح.، پشم فروش، م.، ۱۳۸۸. مطالعه اثرات ضد باکتریایی برخی عصاره‌های گیاهی علیه استرپتوکوکوس اینیایی، یرسینیا راکری و آئروموناس هیدروفیلا. مجله دامپزشکی ایران، ۶(۲)، ۳۰-۲۱.
۸. غلامپور، ع.، روحی، س.، نوری، ب.، ۱۳۹۴. بررسی اثر ضد قارچی عصاره برگ درخت گردو بر قارچ
- ملاسیزیا فورفور در شرایط آزمایشگاهی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان، ۲۰(۱)، ۳۹-۳۰.
۹. معصوم زاده، م.، شریف روحانی، م.، شناورماسوله، ع.، ۱۳۹۵. تاثیرات ضد باکتریایی عصاره‌های سیر و آویشن شیرازی بر باکتری آئروموناس هیدروفیلا جداسازی شده از تاسماهیان پرورشی. نشریه توسعه آبی پروری، ۱۰(۴)، ۱۳۱-۱۲۵.
10. Emami, A., Shams-Ardekani, M.R., Nekoeinaeini, N., Valnet, J., 2002. Phytotherapy, treatment of disease by plants. Tehran: Rahe-Kamal press. 375 P.
11. Kasper, D.L., Braunwald, E., Fauci, A.S., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L., 2005. Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th ed. USA: McGraw-Hill Companies.
12. Lee, S., Kim, S., Oh, Y., Lee, Y., 2000. Characterization of *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trouts in Korea. The Journal of Microbiology, 38(1), 1-7.
13. Nielsen, M.E., Høi, L., Schmidt, A.S., Qian, D., Shimada, T., Shen, J.Y., Larsen, J.L., 2001. Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile aeromonas species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang province of China. Disease of Aquatic Organisms, 46(22), 23-29.
14. Pandey, R., Mishra, A., 2010. Antibacterial Activities of Crude Extract of *Aloe barbadensis* to Clinically Isolated Bacterial Pathogens, Applied Biochemistry and Biotechnology, 160(5), 1356-1361.
15. Peyghan, R., Khadjeh, G.H., Mozarmnia, N., Dadar, M., 2010. Effect of intraperitoneal and intramuscular injection of killed *Aeromonas hydrophila* on lymphocytes and serum proteins of common carp, *Cyprinus carpio*. Advances in Bioscience and Biotechnology, 1(1), 26-29.
16. Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentao, P., Andrade, P., Ferreira, I., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R.M., Estevinho, L., 2007. Walnut (*Juglans regia*) leaves: phenolic compound, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food and Chemical Toxicology, 45(11), 2287-2295.
17. Tierra, M., 2007. Echinacea: An effective alternative to antibiotics. Journal of Herbal Pharmacotherapy, 7(2), 79-89.