



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره سوم، شماره دوم، تابستان ۹۴

<http://jair.gonbad.ac.ir>

اثرات ضد میکروبی عصاره الکلی زنجبیل (*Zingiber officinale*) بر برخی باکتری‌های بیماری‌زای آبزیان

طیبه اسدی^۱، نسیم زنگویی^{۲*}، سیدمحمد موسوی^۳، وحید یآوری^۴،
زیبا بتوندی^۴

^۱دانش آموخته کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

^۲استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

^۳دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

^۴مربی گروه علوم پایه، دانشکده اقتصاد، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

تاریخ ارسال: ۹۳/۸/۲۴؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۳۰

چکیده

وقوع بیماری‌ها یک فاکتور محدود کننده در مزارع پرورش ماهی محسوب می‌شود. تعداد زیادی از گیاهان به‌عنوان گیاهان دارویی سنتی برای درمان و کنترل بیماری‌ها به‌کار می‌رود. یکی از این گیاهان زنجبیل است. در این مطالعه اثرات ضد باکتریایی عصاره الکلی گیاه زنجبیل بر شش باکتری شاخص گرم مثبت و گرم منفی *Vibrio alginolyticus*، *Bacillus cereus*، *Staphylococcus epidermicus*، *Micrococcus luteus* و *Stereptococcus zoo epidermicus* بررسی شد. عصاره‌گیری از ریزوم گیاه زنجبیل توسط اتانول ۸۰ درجه در آزمایشگاه انجام گرفت. برای ارزیابی اثرات ضد میکروبی عصاره زنجبیل، تست انتشار در آگار به روش دیسک بر باکتری‌های مورد مطالعه انجام پذیرفت. حداقل غلظت مهار (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC)، توسط روش رقیق‌سازی سریالی و با استفاده از محیط کشت مایع در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای تعیین گردید. نتایج نشان داد که عصاره الکلی زنجبیل بر رشد و همچنین کشندگی تمامی سویه‌های باکتریایی مورد اشاره اثر داشت. بیشترین اثر باکتری‌کشی و بازدارندگی از رشد، بر باکتری *V. alginolyticus* و کمترین اثر بر باکتری *V. parahemolyticus* مشاهده گردید.

واژگان کلیدی: *Z. officinale*، عصاره الکلی، باکتری، آبزیان

*نویسنده مسئول: n_zanguee@yahoo.com

مقدمه

در میان عوامل بیماری‌زا، باکتری‌ها دارای اثرات اقتصادی بسیار مهمی هستند و به‌عنوان عمده‌ترین عامل محدود کننده در تولید، چه در طبیعت و چه در محیط پرورشی آبزیان گزارش شده اند (Robert, 1989 به نقل از Muniruzzaman and Chowdhury, 2004). از بیماری‌های باکتریایی مهم در آبزیان می‌توان به ویبریوزیس اشاره نمود که علت مرگ و میرهای وسیع در مقیاس پرورشی و تفریخگاهی است (Lightner and Redman, 1998). برای مقابله با باکتری‌ها و بیماری‌های ناشی از آنها، آبی‌پروران ناگزیرند در تفریخگاه‌ها و مزارع پرورشی از آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی برای تحریک سیستم ایمنی و افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا استفاده کنند (Düğenci et al., 2003). استفاده بی‌رویه از ترکیبات آنتی‌بیوتیکی دارای معایبی همچون ایجاد مقاومت دارویی در باکتری‌ها، ایجاد مشکلات زیست-محیطی، گران بودن و به‌صرفه نبودن، وجود بقایای دارویی در گوشت آبی و انتقال به مصرف کننده و گاه وجود منع قانونی برای استفاده از آنتی‌بیوتیک می‌باشد (Thanikachalam et al., 2010; FAO, 2005). گزارشی مبنی برمقاوم شدن باکتری‌های درخشنده شامل گونه‌های ویبریو هاروی^۱ و ویبریو اسپلندیدوس^۲ جداسازی شده از لاروهای میگو به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومايسين، کانامایسین، پنی‌سیلین و استرپتومایسین وجود دارد (Baticados et al., 1990) اقتباس از Velmurugan and Citarasu, 2010). از طرفی سیستم ایمنی بی‌مهرگان به مکانیسم‌های ایمنی ذاتی بسیار وابسته بوده و قادر به پاسخگویی به واکسن‌های اختصاصی نیست (Rowley and Powell, 2007). بنابراین استفاده از ترکیبات مؤثرتر از مواد شیمیایی و واکسن‌ها همچون پروبیوتیک‌ها و محرک‌های ایمنی اخیراً مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است (Sakai, 1999) اقتباس از (Yeh et al., 2009). مواد بسیاری به‌عنوان

¹-*Vibrio harveyi*

²-*Vibrio splendidus*

محرك ایمنی معرفی شده‌اند که بیشتر آنها ترکیبات سلولی یا مشتقات باکتری‌ها، قارچ‌ها یا حیوانات هستند. از این مواد می‌توان، لیپوپلی ساکاریدها، اینولین، کیتوزان، بتاگلوکان، لامینارین، عصاره‌های گیاهی و غیره را نام برد که به‌عنوان محرك سیستم ایمنی در ماهی و در میگو استفاده شده‌اند (Rajasekar et al., 2011). به همین جهت در سال‌های اخیر جهت پیشگیری یا کنترل بیماری‌های عفونی یا افزایش ایمنی، به گیاهان دارویی توجه بیشتری شده است. زنجبیل گیاهی است که هزاران سال است در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری به‌عنوان داروی گیاهی کشت می‌شود (Jiang et al., 2006). زنجبیل دارای چندین ترکیب شیمیایی از جمله ۵۰ درصد نشاسته، ۹ درصد پروتئین، ۸-۶ درصد لیپید (گلیسریدها، فسفات‌ها، لیسیترین و اسیدهای چرب)، ۶-۲ درصد پروتئازها، ۳-۱ درصد روغن‌های فرار نظیر Zingiberol, Shogoal, Zingiberance, ویتامین A و B3 یا نیاسین است (Murray, 1995) اقتباس از (Abo-Esa, 2008). این گیاه همچنین دارای خواص ضد باکتریایی است (Mascolo et al., 1989) اقتباس از (Chrubasik et al., 2005) و در سال‌های اخیر، گزارشاتی مبنی بر خاصیت ضد میکروبی و تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی گیاه زنجبیل ارائه شده است (Leal et al., 2003; Negi et al., 1999). در این مطالعه اثرات ضد باکتریایی عصاره زنجبیل بر روی تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بررسی گردید. هدف از این تحقیق، بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره ی الکلی زنجبیل (*Zingiber officinale*) بر برخی باکتری‌های بیماری‌زای آبزیان از جمله *Vibrio alginolyticus*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermicus*, *Micrococcus luteus*, *Vibrio parahemolyticus* و *Stereptococcus zoo epidermicus* می‌باشد.

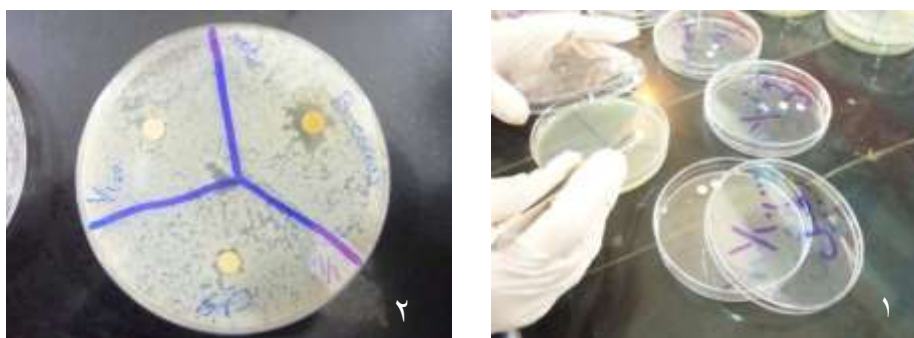
مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری از گیاه مورد آزمایش: گیاه زنجبیل مورد استفاده، از همدان خریداری و به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، انتقال داده شد. ۵۰۰ گرم از آن پس از خرد کردن و خشک نمودن در آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۲۴ ساعت آسیاب شد و پودر حاصل از آن وزن گردید. سپس اتانول ۸۰ درجه به پودر حاصل اضافه شد. این مخلوط در ارلن که با فویل آلومینیوم پوشیده شده بود، به مدت ۳ روز در آزمایشگاه نگهداری گردید. ماده حاصل به وسیله مگنت مغناطیسی با دور ۱۲۰ دور در دقیقه، در دمای اتاق کاملاً مخلوط گردیده و به وسیله کاغذ صافی واتمن (شماره ۱، سایز چشمه ۴۲ میکرون) صاف گردید. ابتدا از یک کاغذ صافی و در مرحله بعد از ۲ کاغذ صافی استفاده شد. به منظور صاف کردن و تهیه عصاره الکلی خام از کیف بوخنر استفاده شد و تمام ذرات ریز آن گرفته شد. سپس مایع بدست آمده در روتاری (۷۸ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد تا تقطیر گردد و الکلی موجود در آن جدا شود. پس از تقطیر، عصاره گیاه مورد نظر در شیشه‌های در بسته اتوکلاو شده ریخته و اطراف شیشه‌ها فویل آلومینیومی پیچیده شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (Zargari, 2005).

بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره گیاه زنجبیل: برای ارزیابی اثرات ضد میکروبی عصاره زنجبیل، تست انتشار در آگار به روش دیسک ۱ بر باکتری‌های مورد مطالعه شامل: *Vibrio*, *Vibrio alginolyticus* و *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermicus*, *Micrococcus luteus*, *parahemolyticus* و *Stereptococcus zoo epidermicus* انجام پذیرفت. بدین صورت که ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی با غلظت حدود 4×10^3 cfu/ml روی محیط کشت آگار (Marin Agar و LB Agar) پخش شد. سپس دیسک‌های استریل شده با قطر ۹ میلی‌متر که یک شبانه روز در سه غلظت عصاره خالص، ۱/۱۰ و ۱/۱۰۰ حجمی قرار داده شده بود، توسط پنس استریل روی محیط کشت باکتریایی قرار داده

¹- Disk diffusion

شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در گرم‌خانه با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای باکتری‌های جنس *Vibrio* و ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای سایر باکتری‌های مورد آزمایش قرار گرفتند. فعالیت ضد باکتریایی با مشاهده هاله‌های ممانعت از رشد در مورد هر باکتری تعیین شد (Murray et al., 1995).



شکل ۱- تأثیر عصاره زنجبیل بر باکتری *Bacillus cereus* (۱) روش دیسک دیفیوژن (۲) هاله عدم رشد باکتری *Bacillus cereus* در غلظت خالص و ۱/۱۰

رقیق‌سازی سریالی: حداقل غلظت مهاری^۲ (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی^۳ (MBC)، توسط روش رقیق‌سازی سریالی و با استفاده از محیط کشت مایع در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای تعیین گردید. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مایع Marin Broth برای باکتری‌های جنس *Vibrio* و LB Broth برای سایر باکتری‌ها، به تمام چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای به غیر از ستون اول اضافه گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از ترکیب اسانس گیاهی به چاهک اول ۳ ردیف اول هر پلیت اضافه شد و تکرار هر رقت ۳ نمونه بود و سپس به صورت سریالی و با ضریب رقیق‌سازی ۱ به ۱ چاهک ۱۲ رقیق گردید. سپس به ۳ ردیف اول هر پلیت، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروارگانیسمی اضافه گردید. ۳ ردیف دوم

^۱- Micro dilution assay

^۲- Minimum Inhibitory Concentration

^۳- Minimum Bactericidal Concentration

هر پلیت تنها با سوسپانسیون میکروارگانیزمی بدون ترکیب اسانس گیاهی لقاح شده (کنترل مثبت) و دو ردیف آخر تنها با محیط مایع لقاح شد (کنترل منفی). میکروپلیت‌ها به مدت یک شب انکوبه شدند (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای باکتری‌های ویبریو و ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای سایر باکتری‌های مورد آزمایش). پس از انکوباسیون، میزان جذب نوری در طول موج ۴۹۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. پایین‌ترین غلظتی که باعث مهار رشد میکروارگانیزم‌ها به صورت مشخص شود، حداقل غلظت مهار (MIC) و پایین‌ترین غلظتی که باعث از بین رفتن میکروارگانیزم‌ها به صورت مشخص شود حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) در نظر قرار گرفته شد. به منظور تأیید نتایج روش رقیق‌سازی سریالی از هر چاهک ۱۰ میکرولیتر به محیط کشت آگار منتقل و کشت صفحه‌ای انجام گرفت و به مدت یک شب انکوبه شدند (Mousavi et al., 2011).



شکل ۲- روش رقیق‌سازی سریالی

نتایج MIC و MBC با استفاده از نرم افزار Excel مورد آنالیز قرار گرفت و به صورت داده در جداول مربوطه قرار داده شد.

نتایج

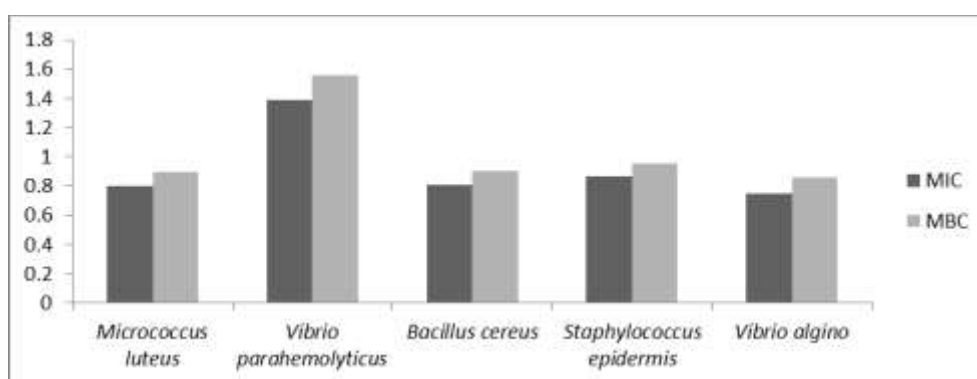
در مطالعه حاضر اثرات ضد میکروبی عصاره زنجبیل بر باکتری‌های *V. parahemolyticus*، *V. alginolyticus*، *M. luteus*، *S. epidermicus* و *S. Zoo epidermicus* مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج بدست آمده از تست انتشار در آگار به روش دیسک بر باکتری‌های مورد مطالعه، بیشترین اثر عصاره زنجبیل و هاله عدم رشد باکتری در غلظت خالص و بعد در غلظت ۱۰/۱ بر باکتری‌های گرم مثبت *Bacillus cereus* مشاهده گردید که به طور مؤثر از رشد این باکتری جلوگیری می‌کند. غلظت ۱ غلظت مؤثر عصاره است. طبق نتایج حاصل از روش رقیق‌سازی سریالی، بیشترین اثر مهارکنندگی و باکتری‌کشی و به عبارتی کمترین میزان MIC و MBC عصاره زنجبیل بر باکتری گرم منفی *V. alginolyticus* و کمترین اثر مهارکنندگی و باکتری‌کشی و بیشترین میزان MIC و MBC عصاره زنجبیل بر باکتری گرم منفی *V. parahemolyticus* مشاهده گردید (جدول ۱). میزان اثرگذاری عصاره زنجبیل بر باکتری‌های مورد مطالعه از بیشترین اثر به کمترین اثر به ترتیب زیر است :

۱- *V. alginolyticus* ۲- *M. luteus* ۳- *B. cereus* ۴- *S. zoo epidermicus* ۵- *S. epidermicus* ۶-

V. parahemolyticus. همچنین نتایج نشان داد که استفاده از عصاره زنجبیل می‌تواند در دو روش رقیق‌سازی سریالی و دیسک دیفیوژن اثرات متفاوتی بر باکتری‌ها داشته باشد. به‌طوری‌که در روش دیسک دیفیوژن، بیشترین اثر عصاره زنجبیل، روی باکتری گرم مثبت *B. cereus* بوده (شکل ۱) ولی در روش رقیق‌سازی سریالی، بیشترین اثر این عصاره روی باکتری گرم منفی *V. alginolyticus* مشاهده گردید (شکل ۳). همچنین در میان سویه‌های باکتریایی گرم منفی بیشترین و کمترین اثر در روش رقیق‌سازی سریالی به ترتیب بر *V. alginolyticus* و *V. parahemolyticus* مشاهده گردید (جدول ۱).

جدول ۱: میزان MIC و MBC عصاره خالص زنجبیل بر باکتری‌های تحت آزمایش

نام باکتری	MIC (درصد/حجمی/حجمی)	MBC (درصد/حجمی/حجمی)
<i>Micrococcus luteus</i>	۰/۸۰۱۰۱۵	۰/۸۹۵۸۸۳
<i>Bacillus cereus</i>	۰/۸۰۵۳۹۲	۰/۹۰۱۰۰۴
<i>Staphylococcus epidermicus</i>	۰/۸۶۶۰۱۹	۰/۹۵۶۸۵۳
<i>Stereptococcus zoo epidermicus</i>	۰/۸۴۰۹۷۶	۰/۹۳۹۱۲۱
<i>Vibrio parahemolyticus</i>	۱/۳۸۸۲۵۸	۱/۵۶۰۱۲۹
<i>Vibrio alginolyticus</i>	۰/۷۴۵۵۱۵	۰/۸۵۸۴۹



شکل ۳: مقایسه میزان میانگین MIC و MBC عصاره خالص زنجبیل بر باکتری‌های تحت آزمایش

بحث و نتیجه‌گیری

محرك‌های ایمنی عواملی هستند که با هدف قراردادن ایمنی غیر اختصاصی موجود سبب افزایش مقاومت میزبان در برابر بیماری می‌شوند (Rajasekar et al., 2011). یکی از محرك‌های ایمنی مؤثر و قوی، گیاهان هستند. گیاهان و ترکیبات آنها شامل اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی، دارای توان بالقوه‌ای جهت جایگزینی با داروهای شیمیایی هستند (Srinivasan et al., 2001)، این در حالی است که عوارض جانبی این ترکیبات در مقایسه با داروهای شیمیایی کمتر است (Cowan, 1999).

در این تحقیق، عصاره الکلی گیاه زنجبیل بر رشد و همچنین کشندگی شش سویه باکتریایی شامل:

۱- *V. alginolyticus* - ۲ *M. luteus* - ۳ *B. cereus* - ۴ *S. Zoo epidermicus* - ۵ *S. epidermicus* - ۶

V. parahemolyticus اثر داشت. در تحقیق ناناسومبت و لوهاسپتاوی (Nanasombat and Lohasupthawee, 2005) عصاره زنجبیل و ۱۴ گونه گیاهی بر ۲۰ سویه باکتریایی مختلف، حاکی از اثر محدودکنندگی رشد عصاره این گیاه بر تمام باکتری‌های مورد مطالعه بود. همچنین در تحقیق نوراجیت و همکاران (Norajit et al., 2007) گزارش گردید که از پنج خانواده گیاهان راسته زینجیراسه بیشترین اثر ضدباکتریایی مربوط به خانواده زنجبیل بود. در تحقیق نوراجیت و همکاران (Norajit et al., 2007) در روش دیسک دیفیوژن بیشترین اثر ضد باکتریایی عصاره زنجبیل بر باکتری گرم مثبت *B. cereus* گزارش گردید که داده‌های فوق با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. در این تحقیق بیشترین اثر عصاره زنجبیل در روش رقیق‌سازی سریالی بر باکتری *V. alginolyticus* و کمترین اثر بر باکتری *V. parahemolyticus* مشاهده گردید. در تحقیق سووان (Cowan, 1999) اثر عصاره زنجبیل روی دو گونه باکتری‌های گرم منفی *V. alginolyticus* و *V. parahemolyticus* آزمایش گردید و نتایج نشان داد که این عصاره بر باکتری گرم منفی *V. alginolyticus* بیشترین اثر ضد باکتریایی و بر باکتری *V. parahemolyticus* کمترین اثر را داشت که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. طبق نظر سووان (Cowan, 1999) ترکیباتی نظیر ۸، ۱ سینئول و آلفاپنین و ترپنول‌ها با ایجاد روزنه در غشای سلولی و افزایش نفوذپذیری غشای باکتری‌های گرم منفی باعث اثرات ضد باکتریایی می‌شوند با این وجود اختلاف میان دو گونه باکتری‌های گرم منفی آب شور و بی‌ریو می‌تواند ناشی از اختلاف حساسیت گونه‌ای بر ترکیبات ضد باکتریایی موجود در عصاره یا شرایط آزمایش باشد. فعالیت ضد باکتریایی زنجبیل ممکن

است به دلیل وجود ترکیباتی مانند جرانئول^۱، ۱،۸ سینئول^۲، لینالول^۳، آلفا ترپینئول^۴، آلفا پینن^۵، کاریوفیلن اکسید^۶ باشد (Giles et al., 2010; Vagionas et al., 2007 a,b).

منابع

- Abo-Esa J.F.K. 2008. Study on some ectoparasitic diseases of catfish, *Clarias gariepinus* with their control by Ginger, *Zingiber officinal*. Mediterranean Aquaculture Journal, 1(1): 1-9.
- Baticados M.C.L., Lavilla-Pitogo C.R., Cruz-Lacierda E.R., de la Pena L.D., Su 51-4naz N.A. 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *Vibrio splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. Diseases of Aquatic Organisms, 9: 133-139.
- Chrubasik S., Pittler M.H., Roufogalis B.D. 2005. *Zingiberis rhizoma*: a comprehensive review on the ginger effect and efficacy profiles. Phytomedicine, 12: 684–701.
- Cowan M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agent. Clinical Microbiology Review, 12: 564-582.
- Dügenci S.K., Arda N., Cand A. 2003. Some medicinal plants as immuno stimulants for fish. Journal of Ethnopharmacology, 88: 99–106.
- FAO. 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. 469, Rome, 97 p.
- Giles M., Zhao J., An M., Agboola S. 2010. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oil of three Australian *Eucalyptus species*. Food Chemistry, 119(2): 731–737.
- Jiang H., Xie Z., Koo H.J., McLaughlin S.P., Timmermann B.N., Gang R. 2006. Metabolic profiling and phylogenetic analysis of medicinal *Zingiber spp.*:

-
- Geraniol^۱
 - 1,8-cineole^۲
 - linalool^۳
 - a-terpineol^۴
 - a-pinene^۵
 - Caryophyllene oxide^۶

- Tools for authentication of ginger (*Zingiber officinale*). *Phytochemistry*, 67: 1673–1685.
- Leal P.F., Braga M.E.M., Sato D.N., Carvalho J.E., Marques M.O.M., Meireles M.A.A. 2003. Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2520-2525.
- Lightner D.V., Redman R.M. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164: 201–220.
- Mascolo N., Jain R., Jain S.C., Capasso F. 1989. Ethno pharmacologic investigation of ginger (*Zingiber officinale*). *Journal of Ethnopharmacology*, 27(1): 129-140.
- Mousavi S.M., Wilson G., Raftos D., Mirzargar S.S., Omidbaigi R. 2011. Antibacterial activities of a new combination of essential oils against marine bacteria. *Aquaculture International*, 19: 205-214.
- Muniruzzaman M., Chowdhury M.B.R. 2004. Sensitivity of pathogenic bacteria to various medicinal herbs. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 2(1): 75-82.
- Murray M. 1995. *The Healing Power of Herbs*. Three Rivers Press; 2nd edition, 432p.
- Nanasombat S., Lohasupthawee P. 2005. Antibacterial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against salmonellae and other enterobacterial. *Kmitel Science and Technology Journal*, 5(3): 527-538.
- Negi P.S., Jayaprakasha G.K., Jagan M.R.L., Sarariah K.K. 1999. Antibacterial activity of turmeric oil: A byproduct from curcumin manufacture. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47: 4297–4300.
- Norajit K., Laohakunjit N., Kerdchoechuen O. 2007. Antibacterial effect of five zingiberaceae essential oils. *Molecules*, 12: 2047-2060.
- Rajasekar T., Usharani J., Sakthivel M., Deivasigamani B. 2011. Immunostimulatory effects of *Cardiospermum halicacubum* against *Vibrio parahaemolyticus* on tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3(5):501-513.
- Robert R.J. 1989. *Fish Pathology*. 2nd end, Bailliere Tindall, London, 472 p.
- Rowley A.F., Powell A. 2007. Invertebrate immune systems specific, quasi-specific, or nonspecific?. *Journal of Immunology*, 179: 7209-7214.
- Sakai M. 1999. Current research status of fish immunostimulants in aquaculture. *Aquaculture*, 172: 63-92.

- Srinivasan D., Nathan S., Suresh T., perumalsamy P.L. 2001. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in Folkloric medicine. *Jornal of Ethnopharmacology*, 47: 217-220.
- Thanikachalam K., Kasi M., Rathinam X. 2010. Effect of garlic peel on growth, hematological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in African catfish *Clarias gariepinus* (Bloch) fingerlings, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3(8): 614-618.
- Vagionas K., Graikou K., Ngassapa O., Runyoro K., Chinou I. 2007a. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of three *Satureja* species growing in Tanzania. *Food Chemistry*, 103(2): 319–324.
- Vagionas K., Ngassapa O., Runyoro K., Graikou K., Gortzi O., Chinou I. 2007b. Chemical analysis of edible aromatic plants growing in Tanzania. *Food Chemistry*, 105(4): 1711–1717
- Velmurugan S., Citarasu T. 2010. Effect of herbal antibacterial extracts on the gut floral changes in Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(6): 5709-5717.
- Yeh R.Y., Shiu Y.L., Shei S.C., Cheng S.C., Huang S.Y., Lin J.C. 2009. Evaluation of antibacterial activity of leaf and twig extracts of stout camphor tree, *Cinna- momum kanehirae*, and the effects on immunity and disease resistance of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 27: 26-32.
- Zargari A. 2005. Midicinal plants. University Tehran Publication, Vol. 4, 97 p. (In Persian).