

مقایسه بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی و هیدرومتانلی برگ گیاه سنبل آبی (*Eichhornia crassipes*)

رودابه روفچائی^۱، علیرضا میرواقفی*^۲، سید حسین حسینی فر^۳، علیرضا ولی پور^۴

۱. دانش آموخته دکتری گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، کرج، ایران.

۲. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۳. استادیار گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۴. استادیار موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، پژوهشکده آبی پروری آبهای داخلی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرانزلی، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۳ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۳/۸

چکیده

گیاه سنبل آبی *Eichhornia crassipes* علی‌رغم این که به سبب قدرت تکثیر بالایش جزو بدترین گیاه هرز دنیا اعلام شده است، از پتانسیل فیتوشیمی خوبی برخوردار است. از آن جایی که رویکرد جدید و نوآورانه محققان، استفاده دارویی از علف‌های هرز است، این مطالعه با هدف ارزیابی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های آبی و هیدرومتانلی گیاه مهاجم سنبل آبی بر عوامل بیماری‌زا انجام پذیرفت. پودر خشک برگ گیاه سنبل آبی با دو حلال متانول ۸۰ درصد و آب به روش خیساندن عصاره‌گیری شد. فعالیت ضد میکروبی بر روی دو گونه بیماری‌زای آبی و سه گونه بالینی مورد بررسی قرار گرفت. قطر هاله عدم رشد از آزمون انتشار در آگار با استفاده از چاهک بر روی غلظت‌های ۵، ۲۰، ۱۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هر کدام از عصاره‌ها بررسی شد. با استفاده از روش رقیق‌سازی آگار حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتری عصاره‌ها (MBC) تعیین گردید. عصاره‌ی هیدروالکلی، بیشترین هاله عدم رشد را بر روی گونه بیماری‌زای آبی *Streptococcus iniae* داشته است. عصاره آبی نیز بر روی گونه *Escherichia coli* بیشترین تاثیر ضد میکروبی را نشان داد ($P \leq 0.05$). مقایسه دوتائی آزمون تی‌تست مستقل بر روی تاثیر نوع حلال بر گونه‌های باکتری مورد بررسی نشان داد که اشرفیا کولی به‌طور معنی‌داری تحت عصاره آبی و استرپتوکوک اینیائی تحت عصاره هیدرومتانلی افزایش فعالیت ضد میکروبی نشان دادند ($P < 0.05$). مقادیر MIC بین ۶۴ تا ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و (MBC) ۱۲۸ تا ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید. عصاره گیاه هرز سنبل آبی به سبب وجود متابولیت‌های ثانویه موثر از گروه ترکیبات فنلی، تانین و آلکالوئیدی دارای اثرات ضد میکروبی می‌باشد و نوع حلال مورد استفاده در میزان فعالیت ضد میکروبی آن موثر است.

واژگان کلیدی: عصاره هیدرومتانلی، عصاره‌ی آبی، فعالیت ضد میکروبی، *Water hyacinth*.

۱. مقدمه

اشرشیاکلی (et al., 2008; Otter et al., 2009). اشرشیاکلی انتروپاتوژنیک، همچنان عامل بیماری اسهال نوزادان و کودکان به صورت تک گیر و همه گیر در کشورهای در حال توسعه دیده می شود (Alikhani et al., 2013). سودوموناس آئروژینوزا سومین عامل عفونت های بیمارستانی بعد از استافیلوکوک اورئوس و اشرشیا کلی است و عفونت های ناشی از این باکتری غالباً در سوختگی ها، عفونت های ادراری فیبروکیستیک گزارش شده است. به علاوه این باکتری با تولید بیوفیلم توانائی محافظت در برابر سیستم ایمنی میزبان و عوامل ضد میکروبی مختلف را ایجاد می کند (Vanhems et al., 2000). آئروموناس هیدروفیلا یک باکتری فرصت طلب و مهم در صنعت پرورش ماهیان گرم آبی است که تحت شرایط استرس زا تبدیل به یک پاتوژن می شود. محیط های آبی به عنوان منبع اصلی باکتری های آیروموناس، مورد توجه هستند و ماهی به عنوان منبع اصلی این میکروارگانیسم می باشد (Sharma et al., 2010). استرپتوکوک اینیائی عامل بیماری استرپتوکوکوزیس بوده که در ماهیان آب شیرین و دریائی و در محیط های گرمایی و سرد در مناطق مختلف دنیا مشکلات و خسارات فراوانی را منجر شده است. این باکتری زئونوز بوده و دامنه متنوع میزبانی آن منجر شده که کنترل آن از اهمیت ویژه ای برخوردار باشد (Soltani et al., 2014). با توجه به گرمای جهانی کره ی زمین گسترش جمعیت سنبل آبی اجتناب ناپذیر است (Shanab et al., 2010). در طی سالیان اخیر بهره برداری از این زیست توده های هرز آبی به عنوان یک منبع داروئی مورد ارزیابی قرار گرفته است (Lata and Dubey, 2010). از این رو در این بررسی برآن شدیم تا با استفاده از قابلیت های مواد موثره در این گیاه مشکلات به وجود آمده از تکثیر بالای این گیاه مهاجم را به بهره برداری داروئی بدل نمائیم. جهت استحصال بهترین کیفیت و کمیت مورد نظر این مواد موثره نوع حلال مصرفی، روش عصاره گیری، بافت انتخابی، فصل و مکان جغرافیایی برداشت گیاه بسیار تاثیر گذار است (Treutter, 2001; Derita et al., 2009). از طرفی با توجه به این که تنوع مواد موثره استحصالی ممکن است اثر هم افزا یا بازدارنده داشته باشد (Suren draraj et al., 2013; Aboul-Enein

گیاه سنبل آبی بومی منطقه آمازون در برزیل بوده و در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۹۳ در تالاب عینک مشاهده گردید (Mozafarian and Yaghoubi, 2015). این گونه به سبب سرعت تکثیر بالایش در مناطق تالابی، تنوع زیستی را به خطر می اندازد. مقاومت بالای این گیاه و تحمل شرایط مختلف زیستی باعث گسترش جهانی آن شده و کنترل آن را سخت کرده است. از این رو به عنوان یکی از ۱۰۰ گونه ی علف هرز مهاجم و جزو بدترین علف هرز آبی جهان توسط اتحادیه بین المللی حفاظت از طبیعت (IUCN) در سال ۲۰۰۸ ثبت شده است (Téllez et al., 2008). از طرفی ساقه و برگ گیاه سنبل آبی از دیر باز برای درمان تورم و زخم مورد استفاده قرار می گرفت (Rorong et al., 2012). در تب سنتی کشور هندوستان و در مکتب درمانی آیورویدا (Ayurveda) از روغن حاصل از گلبرگ این گیاه در درمان زخم های عفونی پوستی، ذات الریه و بیماری گواتر استفاده می شود (Vadlapudi, 2010; Jyoti Das and Pathak, 2013; Kumar et al., 2014). تحقیقات زیادی نیز فعالیت آنتی اکسیدانی را از عصاره های مختلف این گیاه گزارش می دهند (Chantiratikul et al., 2009; Ho et al., 2012; Surendraraj et al., 2013; Kumar et al., 2014; Haggag et al., 2017).

بررسی ها حاکی از آن است که این گیاه به سبب داشتن مواد موثره و متابولیت ثانویه اش در شرایط آزمایشگاهی در کنترل عوامل میکروبی و سلول های سرطانی به عنوان یک گیاه داروئی موثر بوده است (Lenora et al., 2015; Aboul-Enei et al., 2014; Jayanthi and Lata, 2013; Thamaraiselvi and Jayanthi, 2012).

یکی از مشکلات موجود در ارتباط با کنترل باکتری ها، مقاومت داروئی آنها است. از جمله باکتری های بالینی و آبی مورد تحقیق می توان به موارد ذیل اشاره کرد که در این بررسی مورد سنجش قرار گرفت، به طوری که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) در بیش از ۹۰ درصد از بیماران مبتلا به عفونت های استافیلوکوک به پنی سیلین و یا آمپی سیلین پاسخ نمی دهند (Harbarth

جدول ۱- بازده عصاره مورد بهره‌برداری.

بازده (درصد)	عصاره نهائی (گرم)	حجم حلال مورد استفاده (میلی لیتر)	پودر خشک برگ سنبل (گرم)	حلال
۱۲	۱/۲	۱۰۰	۱۰	هیدرو متانل
۲۹	۲/۹	۱۰۰	۱۰	آب

قرار گرفت.

۳.۲. بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌ها-روش انتشار چاهک

فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های مختلف گیاه سنبل آبی در برابر گونه‌های بیماری‌زا از طریق سنجش قطر هاله عدم رشد باکتری و به روش نفوذ چاهک (Well diffusion) مورد بررسی قرار گرفت. در این روش پس از آماده کردن سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل نیم مک‌فارلند ($10^8 \times 1/5$) با استفاده از سوآپ استریل بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار، کشت یکنواختی از باکتری‌ها انجام گرفت. سپس چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر با استفاده از انتهای پیپت پاستور استریل در سطح محیط کشت ایجاد شد کف چاهک‌ها با استفاده از ۲۰ میکرولیتر محیط کشت ذوب شده پوشانده شد و پلیت‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در یخچال قرار گرفتند. سپس ۵۰ میکرولیتر از هر یک از عصاره‌های مختلف در غلظت‌های ۵، ۲۰، ۱۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شده و در چاهک مربوطه ریخته شد. پلیت‌ها به انکوباتور منتقل و به مدت ۲۴ ساعت سویه‌های بالینی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سویه‌های آبی در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرم‌گذاری شدند. با اندازه‌گیری قطر هاله‌های عدم رشد، میزان حساسیت یا مقاومت باکتری‌ها نسبت به عصاره‌های مختلف مورد سنجش قرار گرفت. به‌عنوان شاهد منفی، از حلال‌های عصاره‌گیری به تنهائی و برای شاهد مثبت نتایج آزمون آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل استفاده شد (CLSI, 2012).

۴.۲. تعیین کم‌ترین غلظت مهارکننده رشد باکتری

دستورالعمل تعیین MIC (کم‌ترین غلظتی از ماده‌ی مورد بررسی که سبب مهار رشد باکتری می‌گردد) بر اساس استانداردهای ارائه شده توسط

(et al., 2014)، این تحقیق جهت بررسی تاثیر نوع حلال بر استحصال متابولیت‌های ثانویه گیاه هرز سنبل آبی مهاجم به منابع تالابی شمال ایران انجام شد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. جمع‌آوری و عصاره‌گیری

در پائیز ۱۳۹۵ پس از برداشت برگ گیاه سنبل آبی از تالاب انزلی به ایستگاه تغذیه و غذای زنده واقع در بندر انزلی منتقل شد. پس از تایید گونه گیاه هرز (Holm et al., 1977)، برگ‌ها با آب شسته شده و در آن، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد خشک و سپس آسیاب شد. جهت عصاره‌گیری به پژوهشکده مواد اولیه و گیاهان داروئی دانشگاه شهید بهشتی تهران منتقل شد. جهت استحصال مواد موثره با توجه به بررسی‌های صورت گرفته دو حلال قطبی آب و هیدرومتانل ۸۰ درصد انتخاب شد. پودرهای به‌دست آمده با میانگین قطر ۵ میکرون به‌ازاء هر یک گرم در ۱۰ میلی‌لیتر حلال به مدت ۴۸ ساعت خیس‌انده شد. عمل عصاره‌گیری سه بار تکرار گردید. سپس عصاره توسط کاغذ صافی واتمن فیلتر شد. به کمک دستگاه تقطیر در خلا (آلمان Rotary Evaporator Heidolph) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد (Arabshahi-Delouee and Urooj, 2007). از هر صد گرم ماده خشک این گیاهی همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده به ترتیب ۱۲ و ۲۹ گرم عصاره نیمه جامد از طریق عصاره‌گیری با حلال آبی و هیدروالکلی به‌دست آمد. عصاره‌های به‌دست آمده تا بررسی میکروبی در دمای ۴ درجه نگهداری شدند.

۲.۲. آزمون زیست‌سنجی (ضد باکتری)

در این آزمون عصاره آبی و هیدرومتانلی گیاه سنبل آبی جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی بر روی ۵ باکتری با مشخصات مندرج در جدول ۲ مورد بررسی

جدول ۲- مشخصات ارگانیزم‌های مورد استفاده.

مشخصات ظاهری	شماره استاندارد ATCC	نام باکتری	عامل بیماری
کوکسی گرم مثبت	6538	<i>Staphylococcus aureus</i>	عفونت های بیمارستانی - مسمومیت
کوکوباسیل گرم منفی	8739	<i>Escherichia coli</i>	عفونت دستگاه گوارش
کوکوباسیل گرم منفی	9027	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	عفونت های بیمارستانی و پوستی
باسیل گرم منفی	7966	<i>Aeromonas hydrophila</i>	ایرومونازیس ماهیان گرمابی - زئونوز
کوکسی گرم مثبت	29177	<i>Streptococcus iniae</i>	استرپتوکوکوزیس ماهیان سردابی - زئونوز

از بین رفتن ۹۹/۹ درصد از تعداد میکروارگانیزم مورد بررسی می‌گردد. برای تعیین این غلظت بعد از مشخص شدن MIC $100 \mu\text{l}$ از محتویات هر چاهک بدون رشد، پس از هم‌زدن، بر روی یک پلیت نوترینت آگار به شکل چمنی کشت داده شد. گرماگذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای مناسب انجام شد و کم‌ترین غلظتی از عصاره که هیچ‌گونه رشد باکتریایی برای آن مشاهده نشد، به‌عنوان کم‌ترین غلظت کشنده‌ی باکتری ثبت گردید.

۶.۲. تجزیه و تحلیل آماری

به‌منظور مقایسه اثر ضد میکروبی عصاره‌های مختلف علیه میکروارگانیزم‌های مورد بررسی، آزمایش-ها در سه تکرار انجام شد. از نرم افزار SPSS 18 و آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس از آزمون دانکن و توکی برای بررسی اختلافات بین میانگین‌ها در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد. بعد از بررسی توزیع نرمال داده‌ها از آزمون تی‌تست مستقل جهت بررسی تاثیر نوع عصاره استفاده شد.

۳. نتایج

میانگین قطر هاله عدم رشد میکروارگانیزم‌های مورد آزمایش در برابر عصاره‌های مختلف سنبل آبی در جدول ۳ داده شده است. عصاره‌های آبی و هیدرومتانلی سنبل آبی دارای اثر ضد میکروبی متفاوتی بر روی ۳ گونه‌ی باکتری بیماری‌زای بالینی و دو گونه آبی‌نشان دادند. غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری، تاثیر مهاری بیشتری نشان داد ($P < 0/05$). در تمام سویه‌ها به‌جز باکتری *Pseudomonas aeruginosa* این اختلاف با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل معنی‌دار بود ($P < 0/05$). در بین دو نوع عصاره مورد بررسی تاثیر ضد میکروبی عصاره آبی برای سویه‌ی بالینی *Escherichia coli* با هاله

(Clinical and laboratory standard) CLSI institute)، انجام شد. استوک مناسبی از عصاره‌ها در حلال دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) ساخته و از آن سری رقتی از ۳۲ تا غلظت ۱۰۲۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با استفاده از محیط مولر هینتون براث در پلیت‌های ۹۶ خانه تهیه گردید. سپس سوسپانسیونی از کشت تازه (۱۸-۲۴ ساعته) سویه مورد نظر معادل نیم مک‌فارلند در محلول نمکی نرمال تهیه و از آن سوسپانسیونی به نسبت ۱:۱۰۰ با مولر هینتون براث تهیه و در نهایت به هر چاهک $1 \times 10^6 - 0/5$ CFU/ml از سویه باکتری مورد سنجش اضافه گردید. با اضافه شدن سوسپانسیون باکتری، غلظت نهایی ماده‌ی مورد بررسی در هر چاهک نصف می‌شود. پلیت‌های حاوی سری رقت از نمونه سویه‌های بالینی جهت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سویه‌های آبی در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از گرماگذاری، چاهک‌ها از لحاظ داشتن کدورت بررسی شده و کم‌ترین غلظت مهار کننده‌ی رشد، تعیین و برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ثبت گردید. در مورد عصاره‌هایی که پس از حل شدن در محیط کشت باعث ایجاد کدورت می‌شدند از معرف Resazurine استفاده گردید تا چاهک‌های دارای رشد از چاهک‌های بدون رشد تمیز داده شوند. برای همه‌ی آزمایش‌های تعیین MIC سه تکرار انجام شد. همچنین جهت کنترل کیفی تست، چاهک‌هایی جهت کنترل منفی (چاهکی که تنها حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت مایع)، کنترل مثبت (چاهکی که حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون رقیق شده‌ی باکتری) در نظر گرفته شد.

۵.۲. انجام تست (Minimum Bacterial) MBC (concentration)

تعیین کم‌ترین غلظت کشنده‌ی باکتری MBC به معنای غلظتی از ماده‌ی مورد بررسی است که سبب

جدول ۳- فعالیت ضد باکتری عصاره های سنبل آبی (قطر هاله عدم رشد برحسب میلیمتر) در غلظت های مختلف.

عصاره	میکروارگانیزم	غلظت عصاره (mg/ml)				کنترل*	کنترل**
		۴۰۰	۱۰۰	۵۰	۲۵		
۲۵ ^a	۶	۱۱/۳±۰/۳ ^b	۱۱±۰/۵ ^c	۸±۰/۶ ^d	۷±۰/۳ ^e	Staphylococcus aureus	
۲۲ ^a	۶	۱۱/۶±۰/۳ ^b	۹/۶±۰/۳ ^c	۷±۰/۵ ^d	۶	Escherichia coli	
۱۱ ^a	۶	۱۰/۳±۰/۶ ^a	۶	۶	۶	Pseudomonas aeruginosa	
۳۰ ^a	۶	۱۱/۶±۰/۳ ^b	۱۰±۱ ^c	۶	۶	Aeromonas hydrophila	هیدرومتانلی
۲۵ ^a	۶	۱۲/۳±۰/۶ ^b	۹±۰/۵ ^c	۱۰±۱ ^c	۸±۰/۵ ^e	Streptococcus iniae	
۲۵ ^a	۶	۱۱±۱ ^b	۱۰/۳±۰/۶ ^c	۴±۰/۵ ^d	۶	Staphylococcus aureus	
۲۲ ^a	۶	۱۵/۳±۱ ^b	۱۱/۶±۰/۳ ^c	۹±۰/۵ ^d	۸±۰/۵ ^e	Escherichia coli	
۱۱ ^a	۶	۹/۶±۰/۳ ^a	۶	۶	۶	Pseudomonas aeruginosa	
۳۰ ^a	۶	۱۱/۳±۲ ^b	۸/۳±۱ ^c	۶	۶	Aeromonas hydrophila	آبی
۲۵ ^a	۶	۱۰/۶±۰/۳ ^b	۹/۳±۰/۳ ^c	۶	۶	Streptococcus iniae	

* کنترل مثبت: کلرامفنیکل (۳۰ μg/ml) * کنترل مثبت: کلرامفنیکل (۳۰ μg/ml)، ** کنترل منفی: ۵٪ - DMSO و قطر ۶ میلی متر قطر چاهک است.

جدول ۴- مقادیر MIC و mg/ml (MBC) عصاره های آبی و هیدرومتانلی برگ سنبل آبی.

عصاره آبی		عصاره هیدرومتانلی		میکروارگانیزم
MBC	MIC	MBC	MIC	
۲۵۶	۱۲۸	۲۵۶	۱۲۸	Staphylococcus aureus
۱۲۸	۶۴	۲۵۶	۱۲۸	Escherichia coli
۵۱۲	>۲۵۶	۵۱۲	>۲۵۶	Pseudomonas aeruginosa
۵۱۲	۲۵۶	>۲۵۶	۲۵۶	Aeromonas hydrophila
۲۵۶	۱۲۸	۱۲۸	۶۴	Streptococcus iniae

در گونه *P. aeruginosa* دیده شد، گرچه این مقاومت باکتریایی در مقایسه با آنتی بیوتیک کلرامفنیکل اختلاف معنی داری نشان نداد ($P \geq 0.05$).

۴. بحث و نتیجه گیری

به خاطر پیچیدگی مکانیسم جذب دارو توسط پاتوژن ها، بسیاری از داروها که هوشمندانه نیز طراحی شده اند، در کنترل عوامل میکروبی بی تاثیرند (Cushnie and Lamb, 2005). یکی از راه های کنترل مقاومت دارویی باکتریها استفاده از ترکیبات ضد میکروبی با منشأ طبیعی است که اثرات زیست محیطی کمتری نیز داشته باشد (Fareed et al., 2008) رویکرد جدید و نوآورانه محققان، استفاده دارویی از علف های هرز است، تا چالش ایجاد شده توسط گیاهان هرز به فرصت بدل شود (Haggag et al., 2017). گیاه هرز سنبل آبی گسترش وسیعی بر روی کره زمین پیدا کرده و از مناطق گرمسیری تا نیمه گرمسیری، جنگل های بارانی (Joshi and Kaur, 2013) تا مناطق سردسیری چون کوه های پرو و دریاچه Clair در کانادا را در بر گرفته است (Zhang

عدم رشد $15/3 \pm 1$ میلی متر بیشتر بود. عصاره هیدرومتانلی بیشترین تاثیر را بر روی گونه آبی *Streptococcus iniae* با هاله عدم رشد $12/3 \pm 0/6$ نشان داد. در مقایسه ای که بین تاثیر عصاره هیدرومتانلی نسبت به عصاره آبی بروی ایجاد هاله عدم رشد با آزمون مقایسه دوتائی تی تست مستقل انجام شد اشرشیا کولی به طور معنی داری تحت عصاره آبی برگ سنبل آبی و استرپتوکوک اینیائی تحت عصاره هیدرومتانلی افزایش فعالیت ضد میکروبی نشان دادند ($P < 0.05$). در سایر موارد نوع عصاره تاثیر معنی داری را نشان نداد. در این بررسی *E. coli*، *S. iniae* و *S. aureus* حساسیت بیشتری را در برابر عصاره های مختلف از خود نشان دادند.

بررسی جدول های ۳ و ۴ نشان می دهد که کمترین MIC در بررسی عصاره هیدرومتانلی مربوط به غلظت ۶۴ میلی گرم بر میلی لتر برآورد گردید و گونه *S. iniae* و کمترین MIC این بررسی در عصاره آبی مربوط *E. coli* با همین میزان بود. کمترین MBC برآورد شده نیز در این راستا مربوط به گونه های *E. coli* و *S. iniae* بود. بیشترین مقاومت باکتریایی

جدول ۵- مروری بر عوامل میکروبی کنترل شده با عصاره های گیاه سنبل آبی.

منبع	عوامل باکتریائی کنترل شده
Fareed <i>et al.</i> , 2008	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>klebsiella pneumonia</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i>
Shanab <i>et al.</i> , 2010	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Streptococcus faecalis</i>
Baral <i>et al.</i> , 2011	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>S. typhi</i> , <i>Schigella dysenteriae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae*</i> , <i>Salmonella Paratyphi*</i>
Jayanthi and Lalitha, 2013	<i>Staphylococcus albus</i>
Joshi and kaur, 2013	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Kumar <i>et al.</i> , 2014	<i>Proteus vulgaris</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Bordetella bronchiseptica*</i> , <i>Bacillus cereus*</i>
Haggag <i>et al.</i> 2017	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Isebe, 2016	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>salmonella typhimurium</i> , <i>Escherichia coli*</i>
Rehman <i>et al.</i> , 2016	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Shigella flexenar</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi*</i>

*مقاوم نسبت به عصاره سنبل

نزدیک به دیسک آنتی بیوتیک کلرامینیکل برآورد گردید و این اختلاف معنی دار نبود.

مواد فیتوشیمیائی موجود در برگ عصاره آبی گیاه فوق پتانسیل از بین بردن باکتری های گرم منفی را دارد و به طور معنی داری قادر به کنترل باکتری های گرم مثبتی چون *Bordetella bronchiseptica* و *Bacillus cereus* نیست. در این تحقیق ترکیبات فیتوشیمیائی غربال شده موجود در عصاره برگ سنبل آبی را دارای خاصیت ضد میکروبی قوی و آنتی اکسیدانی گزارش کرده است (Kumar *et al.*, 2014). در تحقیق حاضر این نتیجه گیری در باره آئروژینوزا و اشرشیا کولی صادق بود، اما باکتری های گرم مثبت استرپتوکوک اینیائی و استافیلوکوک اورئوس نیز هاله های عدم رشد متاثر از عصاره های استخراجی داشتند. از آن جایی که خاصیت داروئی و ضد میکروبی گیاهان به خاطر وجود متابولیت های ثانویه و تاثیر این مواد موثره بر روی سلول های هدف است (Kumar *et al.*, 2014). کمیت و کیفیت این مواد، به عواملی چون زمان و مکان برداشت گیاه، حلال مصرفی، اندامی از گیاه که مورد استفاده قرار می گیرد، وابسته است (Fareed *et al.*, 2008)، تغییر این عوامل محیطی و آزمایشگاهی در غربالگری فیتوشیمیائی گیاه سنبل آبی در جدول ۶ نشان داده شده است، می تواند منشا این تفاوت ها باشد. تفاوت جغرافیای زیستی و عوامل محیطی بر روی میزان عصاره دهی توسط حلال های یکسان نیز موثر است به طوری که میزان بازده عصاره-دهی در بررسی ما همان طور که در جدول ۱ نشان داده شد، با حلال آب ۲۸ درصد و این میزان با حلال

(et al., 2010; Adebayo *et al.*, 2011).

در بررسی حاضر، عصاره هیدرومتانلی و آبی سنبل آبی توانسته هاله عدم رشد برای گونه های بیماری-زائی بالینی و آبی ایجاد کند. در مورد بررسی تاثیر ضد میکروبی عصاره گیاه سنبل آبی بر روی گونه های آبی تاکنون بررسی انجام نشده است و بررسی فوق حاکی از آن است که عصاره های استحصالی از برگ این گیاه بر روی هر دو گونه گرم منفی و مثبت بیماری زای آبی اثر مهاری دارد. این تاثیر بر روی گونه های گرم مثبت استرپتوکوک اینیائی نسبت به سویه گرم منفی آیروموناس هیدروفیلا بیشتر بود. نتایج نشان داد که این اثر مهاری تحت عصاره هیدرومتانلی نسبت به عصاره آبی به طور معنی داری بر روی باکتری استرپتوکوک بیشتر است.

همان طور که جدول مروری بررسی های انجام شده بر روی گونه های بیماری زای بالینی (جدول ۵) نشان می دهد به جز بررسی (Rehman *et al.*, 2016; Isebe, 2016)، در مورد اشرشیا کولی در سایر بررسی ها تاثیر ضد میکروبی عصاره های گیاه سنبل آبی بر روی سه گونه های بیماری زای بالینی با تحقیق فوق مشابه بوده است. در مرور بررسی های سایر محققین در مقایسه اثر مهاری عصاره های الکلی و آبی بر روی اشرشیا کولی، تاثیر عصاره الکلی بیشتر بوده هر چند این افزایش معنی دار گزارش نشده است (Haggag *et al.*, 2017; Fareed *et al.*, 2008). در حالی که در این بررسی به طور معنی داری هاله عدم رشد در عصاره آبی بیشتر مشاهده شد. میزان هاله عدم رشد در دوز حداکثر عصاره بر روی گونه گرم منفی آئروژینوزا

جدول ۶- مروری بر تحقیقات غربالگری فیتوشیمی گیاه سنبل آبی با حلال متانل و آب در جغرافیای متفاوت زیستی.

منبع	متابولیت ثانویه	جغرافیا	اندام	عصاره
Fareed <i>et al.</i> , 2008	Flav, Sterol, Terp, Alka, Gli	مصر	برگ	آبی و متانلی
Shanab <i>et al.</i> , 2010	Phe, Alka, Ter, Phatalat	مصر	کل گیاه بدون	متانل
Rorong <i>et al.</i> , 2012	Flav, phe, Tan	اندونزی	برگ	متانل
Joshi and kaur, 2013	Alk, Phen, Steroied, Tan	هند	برگ	متانل
Jayanthi and Lalitha, 2013	Phen, Flav, Antra	هند	کل گیاه بدون ریشه	اتانل
Kumar <i>et al.</i> , 2014	Phe, Alka, Ter, Sap	هند	برگ	آب
Ho <i>et al.</i> , 2012	Alk, Terp, Flav, Tan	مصر	برگ	متانل
Isebe <i>et al.</i> , 2016		کنیا		آب
Haggag <i>et al.</i> , 2017	Flav, Alk, Terp, Tan	مصر	برگ	متانل - آب

فنل (Phe)، فلاونوئید (Flav)، آلکالوئید (Alk)، کوئینون (Qui)، آنتراکوئینون (Antra)، ساپونین (Sap)، گلیکوزید (Gli).

عامل این تاثیر بیان می‌کند. محققین این بررسی‌ها مواد موثره‌ی یاد شده را عامل فعالیت ضد میکروبی عصاره این گیاه بیان نمودند.

بررسی‌ها بر روی مکانیسم ضد میکروبی این متابولیت‌ها نشان می‌دهد، تانین‌ها با اتصال به پروتئین باکتری و توقف سنتز مانع تکثیرشان می‌شوند و فعالیت ضد میکروبی خود را اعمال می‌کنند (Thamaraiselvi and Jayanthi, 2012; Patel, 2012). ساپونین‌ها به‌عنوان سم موجود در اندام‌های مختلف گیاهی نقش آنتی بیوتیک و قارچ‌کش را دارا می‌باشند (Ncube *et al.*, 2011). ترکیبات فنلی که در گیاهان، جهت دفاع در برابر عوامل بیماری‌زا و استرس محیطی تولید می‌شوند (Treutter, 2001) اثرات چندگانه زیستی داشته و باعث حذف رادیکال‌های آزاد و بروز خواص آنتی اکسیدانی است (Chantiratikul *et al.*, 2009; Surendraraj *et al.*, 2013). بررسی‌ها همچنین گزارش از حضور ترکیبات فاتالاتی و آلکالوئید Yohimbine می‌دهد (Shanab *et al.*, 2010)

عمده فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی متأثر از فلاونوئید، تری‌ترپنوئید و ترکیبات پلی‌فنلی طبیعی و گروه‌های هیدروکسیل آزاد است (Baral *et al.*, 2010). متابولیت ثانویه چون فنل، پلی فنل‌ها، نقش مهم در مهار رشد میکروبی ایفا می‌کنند (Joshi *et al.*, 2013).

فلاونوئیدها گروهی از مواد پلی‌فنلی هستند که باعث فعالیت ضد میکروبی بوده و از طریق جذب رادیکال آزاد و حفاظت از غشاء سلولی در این راستا اثر گذارند (Kumar *et al.*, 2014). به‌طوری‌که در جدول مروری غربالگری فیتوشیمیایی سنبل آبی نشان داده

هیدرومتانلی ۱۲ درصد برابر می‌باشد. در نپال، بازده عصاره دهی با حلال آبی و متانلی به ترتیب ۳۲ و ۳ درصد گزارش شده است (Baral *et al.*, 2011). در کشور تایلند باحلال متانلی ۱۶/۹ (Chantiratikul *et al.*, 2009) و در کشور هند با حلال آبی و اتانلی به-ترتیب ۲۲/۲ و ۷/۹ برآورد گردید (Surendraraj *et al.*, 2013).

اثر ضد میکروبی نه تنها به گونه و حلال مورد استفاده در استخراج مواد موثره گیاهی وابسته است، بلکه به اندامی از گیاه که مورد استفاده قرار می‌گیرد نیز مربوط می‌شود. به‌طوری‌که مطالعات نشان داد که برگ گیاه سنبل آبی تاثیر ضد میکروبی بیشتری نسبت به ریشه دارد (Fareed *et al.*, 2008). در سایر بررسی‌ها این تفاوت بین برگ گیاه و دیگر اندام‌ها چون ساقه و گل نیز گزارش شده است (Joshi and Kaur, 2013; Kumar *et al.*, 2014; Haggag *et al.*, 2017). بررسی بر روی گیاهان ماکروفیتی نیز نشان داده است که عموماً عصاره‌های حاصل از برگ در مقایسه با بقیه قسمت‌های گیاهان بیشترین خاصیت ضد میکروبی را نشان می‌دهد (Ncube *et al.*, 2011).

عصاره متانلی بیشترین خاصیت میکروبی را در بین بررسی‌های مروری نشان داده است (Jayanthi and Lalitha, 2013; Joshi and Kumar, 2013). غربالگری‌های فیتوشیمیایی انجام شده بر روی گیاه سنبل آبی حضور ترکیبات فنلی (اسیدهای فنلیک و فلاونوئیدها)، آلکالوئید، تانین و ساپونین و ترپنوئید را بیان می‌دارد (جدول ۶). بررسی‌های انجام شده بر روی میکروارگانیزم‌های کنترل شده با عصاره‌های سنبل آبی، حضور متابولیت‌های ثانویه مستخرج را

شد، این ترکیبات در اکثر بررسی‌ها گزارش شده است. فلاوونوئیدها و رابطه هم افزایی بین این گروه از متابولیت‌های ثانویه با سایر عوامل ضدباکتری مخصوصاً در برابر گونه‌های مقاوم نشان داده که تاثیر این گروه از مواد موثره قابل توجه است. حضور فلاوونوئیدهایی چون کوئرستین، مایرستین و نارنجین در گیاه سنبل آبی (Nyananyo *et al.*, 2007; Chantiratikul *et al.*, 2009) به ترتیب از طریق مهار دی ان ای جیراز پاتوژن و افزایش نفوذپذیری غشاء باکتری، تکثیرش را متوقف می‌کند (Cushnie and Lamb, 2005). در بررسی مقایسه‌ای ماکروفیت‌های دریاچه‌ای در نزدیک رود نیل در مصر اثر ضد میکروبی عصاره سنبل آبی به‌خاطر حضور فلاوونوئید بالاتر از سایر ماکروفیت‌های که فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری داشتند، گزارش شد (Sharshar and Haroon, 2006).

این تحقیق نشان داد که گیاه هرز سنبل آبی که جهت مبارزه با گسترش آن در منابع آب شیرین و تالاب‌ها از جمله تالاب عینک و تالاب انزلی، حجم زیادی از آن به‌صورت زباله برداشت و دور ریز می‌شود می‌تواند جهت بررسی فعالیت‌های ضد میکروبی مورد بررسی قرار گیرد. با توجه به این که بخش اعظم بازار گیاهان دارویی دنیا، به تولید و عرضه متابولیت‌های ثانویه مشتق از گیاهان مربوط می‌شود (Matkowski, 2008)، با توجه به گسترش اجتناب‌ناپذیر گیاه سنبل آبی، ارزیابی‌های دارویی و جداسازی احتمالی مواد ضد میکروبی آن می‌تواند چشم انداز تحقیقات آینده باشد.

باید در نظر داشت علاوه بر موارد موثر بر شمرده شده، اثر هم افزایی این مواد موثره در کنترل عوامل میکروبی قابل تامل است (Chu *et al.*, 2010).

باید در نظر داشت علاوه بر موارد موثر بر شمرده شده، اثر هم افزایی این مواد موثره در کنترل عوامل میکروبی قابل تامل است (Chu *et al.*, 2010).

References

- Adebayo, A. A., Briski, B., Kalaci, O., Hernandez, M., Ghabooli, S., Beric, B., Chan, F. T., Zhan, A., Fifield, E., Leadley, T., Hugh J. MacIsaac, H. J., 2011. Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and water lettuce (*Pistia stratiotes*) in the Great Lakes: playing with fire. *Aquatic Invasions* 6(1), 91–96.
- Aboul-Enein, A.M., Sanaa, A.M., Shanab, M.M., Emad, M.M., Shalaby, A., Malak, M., Zahran, M., Lightfoot, D.A., El-Shemy, H.A., 2014. Cytotoxic and antioxidant properties of active principals isolated from water hyacinth against four cancer cells lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14(1), 397-407.
- Alikhani, M., Tabar, Y., karimi, Z., Mihani, M., Kalantar, F., Karami, E., Sadeghi, P., Khosroshahi, M., Ahdi, S.H., Farajnia, S., 2014. Antimicrobial resistance patterns and prevalence of bla_{PER-1} and bla_{VEB-1} genes among ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in West of Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology* 7(1), 1-5.
- Arabshahi-delouee, S., Urooj, A., 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry* 102(4), 1233-1240.
- Baral, B., Vaidya, G.S and Bhattarai, N., 2011. Bioactivity and biochemical analysis of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Botanica Orientalis – Journal of Plant Science*, 8, 33–39.
- Chantiratikul, P., Meechai, P., Nakbanpotec, W., 2009. Antioxidant activities and phenolic contents of extracts from *Salvinia molesta* and *Eichornia crassipes*. *Research Journal of Biological Sciences* 4(10), 1113-1117.
- Chu, W.L.L., Radhakrishnan, Y.W., Lim, A.K., Eem, P., 2010. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 10(1), 53.
- CLSI. 2012. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing: Approved standard: *National Committee for Clinical Laboratory Standards* 29(1), 1–76.

- Cushnie, T.P., Lamb, A.J., 2005. Review; Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26(2005), 343–356.
- Derita, M.G., Leiva, M.L., Zacchino, S.A., 2009. Influence of plant part, season of collection and content of the main active constituent, on the antifungal properties of *Polygonum acuminatum* Kunth. *Journal of Ethnopharmacology* 124(3), 377–383.
- El-Shoubary, M.E.E. 2010. The antimicrobial activity of some seaweeds collected from Alexandria coast. M.Sc. Thesis. Botany and Microbiology department. *Faculty of Science. Tanta University, Tanta, Egypt* 155 p.
- Fareed, M.F., Haroon, A.M., Rabeh, S.A., 2008. Antimicrobial activity of some macrophytes from Lake Manzalah (Egypt). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11(21), 2454-2463.
- Haggag, M.W., Abou El Ella, S.M., Abouziena, H., 2017. Phytochemical analysis, antifungal, antimicrobial activities and applications of *Eichhornia crassipes* against some plant pathogens. *Planta Daninha, Sociedade Brasileira Da ciencia Das Plantas daninhas* 35, DOI: 10.1590/S0100-83582017350100026.
- Harbarth, S., Fankhauser, C., Schrenzel, J., Christenson, J., Gervaz, P., Bandiera-Clerc, C., Renzi, G., Vernaz, N., Sax, H., Pittet, D., 2008. Universal screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at hospital admission and nosocomial infection in surgical patients. *Journal of the American Medical Association*, 299(10), 1149-1157.
- Ho, T. Tham., 2012. Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) Biomass reduction, Ensilability and Feeding Value to Growing Cattle. PhD Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae* 64 p.
- Ho, Y.L., Huang, S.S., Deng, J.S., Lin, Y.H., Chang, Y.S.C., Huang, G.H., 2012. In vitro antioxidant properties and total phenolic contents of wetland medicinal plants in Taiwan. *Botanical Studies* 53(1), 55-66.
- Holm, L.R.G., Plucknett, D.L., Pancho, J.V., Herberger, J. P. 1977. The world's worst weeds. Distribution and biology. East- west center, university of Hawaii, Honolulu, Hawaii, USA, 621 p.
- Isebe, T. I., 2016. Phytochemical composition and antibacterial activity of *Eichhornia Crassipes* in Lake Victoria, Kisumu. *International Journal of Scientific and Technology Research* 5(8), 45- 52.
- Jayanthi, P., Lalitha, P., 2013. Antimicrobial activity of solvent extracts of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. *Der Pharma Chemica* 5(3), 135-140.
- Joshi, M., Kaur, S., 2013. In vitro evaluation of antimicrobial activity and phytochemical analysis of *calotropis procera*, *Eichhornia crassipes* and *datura innoxia* leaves. *Asian journal of pharmaceutical and clinical research*, 6(5), 25-28.
- Kumar, SH., Kumar, R., Dwivedi, A., Pandey, A., 2014. Activity and In Vivo Effect of *Syngonium podophyllum* and *Eichhornia crassipes* Leaf Extracts on Isoniazid Induced Oxidative Stress and Hepatic Markers. *BioMed Research International* 2014(1), 1-11.
- Lata, N., Dubey, V. 2010. Quantification and identification of alkaloids of *Eichhornia crassipes*: the world's worst aquatic plant. *Journal of Pharmacy Research* 3(6), 1229-123.
- Lenora, L.M., Senthil Kumar, J., Murugesan, S., Senthilkumar, N., 2015. Anticancer Activity of Water Hyacinth [*Eichhornia Crassipes* (Mart) Solms] On Human Cervical Cancer Cell Line. *Octa Journal of Environmental Research* 3(4), 327-331.
- Matkowski A., 2008. Plant in vitro culture for the production of antioxidants: A review. *Biotechnology Advance* 26(6), 548–560.
- Mozafarian, V., Yaghoubi, B., 2015. New record of *Eichhornia crassipes* (Water Hyacinth) from north of Iran. *Rostaniha* 16(2), 208-211.
- Ncube, B., Finnie, J.F., Van Staden, J., 2011. Seasonal variation in antimicrobial and phytochemical properties of frequently used medicinal bulbous plants from South Africa. *South African Journal of Botany*, 77(1), 387–396.
- Nyananyo, B.L., Gijo, A.H., Ogamba, E.N., 2007. The Physico-chemistry and Distribution of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) on the river Nun in the Niger Nelta. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* 11(3), 133–137.
- Otter, J.A., Havill, N.L., Boyce, J.M., French, G.L., 2009. Comparison of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from teaching hospitals in London and the USA, 2004–2006: where is USA300 in the UK. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 28(7), 835-839.
- Patel, S., 2012. Threats, management and envisaged utilizations of aquatic weed *Eichhornia crassipes*: an overview. *Reviews Environmental Science and Biotechnology*, 11(3), 249–259.
- Jyoti Das, R., Pathak, K., 2013. Use of Indigenous Plants in Traditional Health Care Systems by Mishing Tribe of Dikhowmukh, Sivasagar

- District, Assam. *International Journal of Herbal Medicine* 1(3), 50-57.
- Rehman, R., Aslam, M.S., Choudhary, B.A., Uzair, M., Ijaz, A., Ahmad, M.S., 2016. Biological screening of *Eichornia crassipes* against different pathogenic microbes: An in vitro study. *Recent Advances in Biology and Medicine* 2, 79-82.
- Rorong, A.R., Diarso, S., Polii-Mandang, J., Suryanto, E., 2012. Phytochemical analysis of water hyacinth (*Eichornia crassipes*) of agriculture waste as biosensitizer for ferri photoreduction. *Agritativa* 34(2), 152-160.
- Shanab, S., Shalaby, E., Lightfoot, D., El-shemy, H., Allelopathic., 2010. Effects of water hyacinth (*Eichornia crassipes*). *PLoS ONE* 5(10), 1-8.
- Sharma, A., Deo, A. D., Riteshkumar, T., Ibemcha Chanu, T., Das, A., 2010. Effect of *Withania somnifera* (L. Dunal) root as a feed additive on immunological parameters and disease resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. *Fish & Shellfish Immunology* 29, 508-512.
- Sharshar, K.M., Haroon, A., 2009. Comparative investigations on some biological and biochemical aspects in freshwater crayfish (*Procambarus clarkii*) fed on *Eichornia crassipes*, *Echinochloa stagnina* L. and *Polygonum tomentosum* L.: American-Eurasian. *Journal of Agricultural and Environmental Science* 5(4), 579-589.
- Soltani, M., Mazandarani, M., Mirzargar, S., Ebrahimzade Mousavi, H.A., Taheri-Mirghaed, A., Khoshbavar-Rostami, H.A., 2014. Pathogenicity of *Streptococcus iniae* in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fingerling. *Journal of Veterinary Research* 69(2), 119-125. (In Persian)
- Surendraraj, A., Farvin, K.H., Sabeena Anandan, R., 2013. Antioxidant potential of water hyacinth (*Eichornia crassipes*): In vitro antioxidant activity and phenolic composition. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 22(1), 11-26.
- Téllez, T.R., Rodrigo López, E., Granado, G., Pérez, E., Morán López, L., Juan Guzmán, M., 2008. The Water Hyacinth, *Eichornia crassipes*: an invasive plant in the Guadiana River Basin (Spain). *Aquatic Invasions* 3(1), 42-53.
- Thamaraiselvi, P., Lalitha, P., Jayanthi, P., 2012. Preliminary studies on phytochemicals and antimicrobial activity of solvent extracts of *Eichornia crassipes* (Mart.) Solms. *Asian Journal of Plant Science and Research* 2(2), 115-122.
- Treutter, D., 2001. Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regulation*, 34(1), 71-89.
- Vadlapudi, V., 2010. In vitro antimicrobial activity of methanolic extract of selected Indian medicinal plants. *Pharmacophore* 1(3), 214-219.
- Vanhems, P., lepape, A., Savey, A., Jambou, P., Fabry, J., 2000. Nosocomial pulmonary infection by antimicrobial resistant bacteria of patients hospitalized in intensive care units risk factors and survival. *Journal of Hospital Infection* 45(2), 98-106.
- Zhang, Y.Y., Zhang, D.Y., Barrett, S.C.H., 2010. Genetic uniformity characterizes the invasive spread of water hyacinth (*Eichornia crassipes*), a clonal aquatic plant. *Molecular Ecology* 19(9), 1774-1786.