ePublishing

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 51, No 4 (2000)

Study of the bacteriostatic activity of an Artemia enrichment compound based on plant extracts from Angelica sp.

F. ATHANASSOPOULOU (Φ. ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΥ), E. KOTOU, E. WATSOS (Ε. ΒΑΤΣΟΣ), M. GIAGNISI (Μ. ΓΙΑΓΝΙΣΗ)

doi: 10.12681/jhvms.15688

Copyright © 2018, F ATHANASSOPOULOU, E KOTOU, E WATSOS, M GIAGNISI

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.

To cite this article:

ATHANASSOPOULOU (Φ. ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΥ) F., KOTOU, E., WATSOS (Ε. ΒΑΤΣΟΣ) E., & GIAGNISI (Μ. ΓΙΑΓΝΙΣΗ) M. (2018). Study of the bacteriostatic activity of an Artemia enrichment compound based on plant extracts from Angelica sp. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *51*(4), 293–296. https://doi.org/10.12681/jhvms.15688

https://epublishing.ekt.gr | **e-Publisher:** EKT | **Downloaded at:** 26/01/2026 03:40:50

ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛ. ΚΤΗΝ. ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 2000, 51(4): 293-296

Μελέτη της βακτηριοστατικής ικανότητας εμπλουτιστικού σκευάσματος ζωντανής τροφής *Artemia* με βάση το φυτό *Angelica sp*. που χορηγείται ως αρχική τροφή λαρβών των θαλάσσιων ψαριών

Φ. Αθανασοπούλου[1], Ε. Κώτου[2], Ε. Βάτσος[1], Μ. Γιαγνίση[2]

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Μελετήθηκε η βακτηριοστατική ικανότητα εμπορικού σκευάσματος στα βακτήρια *Vibrio alginolyticus* and *V. anguillarum* σε συγκεντρώσεις 1, 3, 4, 6.5 και 15 ppm. Η καλύτερη συγκέντρωση για τα μη παθογόνα βακτήρια στις 48 ώρες βρέθηκε μεταξύ 1-3 ppm, ενώ για μεγαλύτερη διάρκεια (72 ώρες) βρέθηκε η συγκέντρωση των 6,5 ppm και για τα δύο βακτήρια. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δεν έδειξαν κανένα πλεονέκτημα ως προς τη βακτηριοστατική ικανότητα.

Λέξεις ευρετηρίασης: *V. alginolyticus, Vibrio anguillarum*, βακτηριοστατικά

ABSTRACT. Athanassopoulou F., Kotou E., Watsos E. and Giagnisi M. Study of the bacteriostatic activity of an Artemia enrichment compound based on plant extracts from *Angelica* sp. *Bulletin of the Hellenic Veterinary Medical Society 2000, 51(4):293-296.* **The bacteriostatic ability of a commercial product was assessed against *Vibrio alginolyticus* and *V. anguillarum* at concentations 1, 3, 4, 6.5 and 15ppm. The best concentration for short term (48hrs) arrestment of the non-pathogenic bacteria was found 1-3ppm whereas for longer effect (72hrs) the best concentration for both species was 6,5ppm. Higher concentrations did not show any advantages.**

[1] *Εθνικό Ιδρυμα Αγροτικής Ερευνας, Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών, Νεαπόλεως 25, Αγία Παρασκευή, Αθήνα 15310. E-mail: FISHLAB.IVRA@NAGREF.GR*

[2] *Εθνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών, Αγ. Κοσμάς, Ελληνικό*

[1] *National Agricultural Research Foundation (NAGREF), Institute of Veterinary Research of Athens, 25 Neapoleos str., Ag. Paraskevi, Athens 153 10*

[2] *National Center for Marine Research, Agios Kosmas, Hellinikon, Athens*

Ημερομηνία υποβολής: 05.01.2000
Ημερομηνία εγκρίσεως: 24.08.2000

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια οι υδατοκαλλιέργειες της Μεσογείου έχουν πετύχει αξιόλογη ανάπτυξη. Η τροφή των ψαριών, ειδικά στα αρχικά στάδια εκτροφής, αποτελεί ενα βασικό παράγοντα διαμόρφωσης του συνολικού κόστους παραγωγής καθώς επηρεάζει και την ποιότητα των παραγομένων ψαριών και σχετίζεται άμεσα με τη δημιουργία δυσπλασιών η ασθενειών. Η ελεγχόμενη παραγωγή των ζωοπλαγκτονικών οργανισμών κοστίζει ακριβά τόσο απο την άποψη της επένδυσης όσο και απο την άποψη λειτουργίας. Επιπλέον δε οι καλλιεργούμενοι ζωοπλαγκτονικοί οργανισμοί δεν περιέχουν αρκετά πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, οπότε δημιουργείται η ανάγκη εμπλουτισμού τους πριν απο τη διανομή τους στα ψάρια.

Ένα επιθυμητό εμπλουτιστικό προϊόν θα πρέπει να στοχεύει στις ακόλουθες απαιτήσεις της παραγωγής, ώστε να επιτυγχάνεται χαμηλότερο κοστολόγιο, λόγω χρήσης λιγότερης ποσότητας προϊόντος, λιγότερων δεξαμενών, χώρου και εργατικών: 1. Να επιτρέπει μεγαλύτερη πυκνότητα ναυπλίων κατά τη διάρκεια της εκκόλαψης και του εμπλουτισμού. 2. Να καταστέλλει τη βακτηριακή έξαρση κυρίως απο σαπρόφυτα ή δυνητικά παθογόνα που αποτελεί πρόβλημα στις δεξαμενές εκκόλαψης *Artemia* και ειδικότερα των βακτηρίων του γένους *Vibrio* που αποτελούν και το μεγαλύτερο ποσοστό του βακτηριακού φορτίου.

Το προτεινόμενο έργο έχει ως αντικείμενο τη διερεύνηση *in vitro* της βακτηριοστατικής ικανότητας ενος εμπορικού εμπλουτιστικού σκευάσματος ("Rich Series") με δραστική ουσία το *Angelica sp.* σε καθαρές αποικίες δύο βακτηρίων ενός προαιρετικού παθογόνου (*Vibrio alginolyticus*) και ενός παθογόνου βακτηρίου (*Vibrio anguillarum*) των εκτρεφόμενων θαλάσσιων ψαριών: *Dicentrarchus labrax L.* (λαβράκι), *Sparus aurata L.* (τσιπούρα) και *Puntazzo puntazzo C.* (χιόνα).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Εμπορικό σκεύασμα -Πειραματισμοί

Η ουσία περιείχε εκχύλισμα του φυτού *Angelica* sp σε διάλυση με γαλακτωματοποιητή και ήταν εμπλουτισμένο

με λιπίδια. Ανάλογη ποσότητα του διαλύματος αυτού χρησιμοποιήθηκε για την επίτευξη της επιθυμητής συγκέντρωσης (ppm) καθαρής δραστικής ουσίας. Έγιναν δύο πειραματισμοί, ο πρώτος με μεγάλες δόσεις (6,5 & 15 ppm) και ο δεύτερος με μικρότερες συγκεντρώσεις (1, 3 & 4 ppm) δραστικής ουσίας [1,2,3,4].

Βακτηριακά στελέχη

Χρησιμοποιήθηκαν δύο βακτηριακά στελέχη (*Vibrio alginolyticus* & *Vibrio anguillarum*), που απομονώθηκαν για πρώτη φορά απο εκτρεφόμενο λαβράκι Dicentrarchus labrax με κλινικά συμπτώματα πριν από 5 περίπου μήνες και ταυτοποιήθηκαν με κλασικές μεθόδους [5]. Τα στελέχη ανακαλλιεργήθηκαν απο λοξό άγαρ διατηρημένο υπο ψύξη σε 4°C σε υπόστρωμα TSA (Tryptone Soy Agar). Πριν από τους πειραματισμούς τα στελέχη ανακαλλιεργήθηκαν πρώτα σε άγαρ TSA (23°C) και μετά σε TSA broth με προσθήκη άλατος NaCl 2%. 24 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε TSA broth, η πυκνότητα κάθε ενός βακτηριακού στελέχους μετρήθηκε με το μηχάνημα Coulter counter και αμέσως η ανάλογη ποσότητα βακτηριακού διαλύματος προστέθηκε στις φιάλες των 400 ml ούτως ώστε η αρχική συγκέντρωση των βακτηρίων σε κάθε φιάλη να είναι 100.000 CFU/ml.

Έλεγχος βακτηριοστατικής ικανότητας

Η μελέτη της βακτηριοστατικής ικανότητας της ουσίας έγινε σε 200 ml θρεπτικού υποστρώματος TSA broth και 200 ml αποστειρωμένου νερού σε φιάλες ενος λίτρου.

Το υπόστρωμα και νερό παρασκευάστηκαν και αποστειρώθηκαν 12-24 ώρες πριν από τον ενοφθαλμισμό με τα βακτηριακά στελέχη και την ουσία και διατηρήθηκαν στους 4°C. Μετα τον ενοφθαλμισμό με τα βακτηριακά στελέχη και την ουσία, οι φιάλες διατηρήθηκαν στους 23°C καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματισμών και μετρήσεων.

Η υπό εξέταση ουσία (στη μορφή και διάλυση που παραχωρήθηκε απο την εταιρεία) προστέθηκε σε συγκεντρώσεις 6,5 ppm και 15 ppm κατα τον πρώτο πειραματισμό, ενω σε μία φιάλη, με όλες τις άλλες συνθήκες ίδιες, δεν προστέθηκε ουσία και θεωρήθηκε ως μάρτυρας. Κατα το δεύτερο πειραματισμό που έγινε 20 ημέρες αργότερα απο ανακαλλιέργειες των ίδιων στελεχών, οι συνθήκες ήταν πανομοιότυπες εκτός απο τις συγκεντρώσεις της υπό εξέταση ουσίας που αυτή τη φορά προστέθηκαν σε συγκεντρώσεις 1, 3 και 4 ppm. Η προσθήκη της ανάλογης ποσότητας βακτηριακού στελέχους και των συγκεντρώσεων της υπο εξέταση ουσίας έγινε ταυτόχρονα. Οι μετρήσεις και στους δύο πειραματισμούς έγιναν με το μηχάνημα Coulter counter σε 60 ml υγρού απο κάθε φιάλη στους 23°C στις 24, 48 και 72 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό του βακτηρίου και ουσίας και εκφράστηκαν σε βακτηριακά κύτταρα ανα ml (counts/ml).

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα SPSS για Windows. Η κανονική κατανομή (normal distribution) των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με τη μέθοδο Kolmogorov-Smirnov. Για την εύρεση σημαντικά στατιστικών διαφορών μεταξύ των συγκεντρώσεων εφαρμόστηκε η μέθοδος της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) με επίπεδο σημαντικότητας $p = 0,05$. Περαιτέρω εφαρμόστηκαν post hoc έλεγχοι (multiple comparison tests). Dunnett για εύρεση των διαφορών από το control (0 ppm) και Tukey για εύρεση διαφορών μεταξύ των συγκεντρώσεων [7].

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το φυτό *Angelica sinensis* ή *polymorpha* (Umbelliferae) -κοινό όνομα: Chinese angelica, ding quai - είναι γνωστό για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες και κυρίως τις ανοσοενισχυτικές και αντιμικροβιακές [8,9,10]. Οι αντιβακτηρικές ιδιότητες αφορούν τόσο τα Gram αρνητικά όσο και θετικά βακτήρια [9]. Επιπλέον δε, το φυτό έχει και ανοσοενισχυτικές ιδιότητες που οφείλονται κυρίως στην ουσία κουμαρίνη που περιέχει και η οποία έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιεί τα λευκά αιμοσφαίρια σε περιπτώσεις καρκίνου [10].

Στα αποτελέσματα του πρώτου πειράματος (Πίνακας 1) παρατηρείται στατιστικά σημαντική αναστολή της ανάπτυξης των *V. anguillarum* & *V. alginolyticus* και στις δύο συγκεντρώσεις (6,5 & 15 ppm) για όλες τις ώρες έκθεσης (24 - 48 - 72) σε σχέση με τους μάρτυρες (0 ppm) ($p<0,05$).

Το *V. alginolyticus* παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία στη βακτηριοστατική ουσία, ενώ το *V. anguillarum* εμφανίζεται ανθεκτικότερο. Η αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης κυμαίνεται από 43% έως 81% για το *V. anguillarum*, και από 85% έως 97% για το *V. alginolyticus* (Πίνακας 1).

Η μεγαλύτερη βακτηριοστατική δραστικότητα της ουσίας απέναντι στο V. anguillarum σημειώνεται στα 15 ppm μετά από 72 ώρες έκθεσης με αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης 81%. Αντίθετα, για το *V. alginolyticus* η μεγαλύτερη δραστικότητα σημειώνεται στα 6,5 ppm για τον ίδιο χρόνο έκθεσης με 97% αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης.

Στα αποτελέσματα του δεύτερου πειράματος (Πίνακας 2), όπου τα ίδια βακτηριακά στελέχη εκτέθηκαν τις ίδιες ώρες, αλλά σε μικρότερες συγκεντρώσεις της βακτηριοστατικής ουσίας (1 - 3 - 4 ppm), η αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης είναι διαφορετική στα δύο στελέχη. Εμφανέστατη είναι η ευαισθησία του *V. alginolyticus* και η ανθεκτικότητα του *V. anguillarum*.

Ιδιαίτερα για το *V. anguillarum* η αναστολή είναι στατιστικά σημαντική σε ορισμένες μόνο συγκεντρώσεις και ώρες έκθεσης σε σχέση με τους μάρτυρες (0 ppm) ($p<0.05$) (Πίνακας 2). Δεν παρουσιάζεται αναστολή με-

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Βακτηριακή ανάπτυξη (αριθμός κυττάρων/ ml) των *Vibrio anguillarum* και *Vibrio alginolyticus* μετά από έκθεση σε βακτηριοστατικό σκεύασμα που περιέχει εκχύλισμα του γένους *Angelica*. (n=3, μέσος όρος±τυπικό σφάλμα)-Πείραμα 1.

TABLE 1. Bacterial growth (number of cells/ml) of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio alginolyticus* after treatment with antibacterial substance containing extract of the plant *Angelica*. (n=3, mean±SE) -Experiment 1.

	Vibrio anguillarum			*Vibrio alginolyticus*		
	Ώρες έκθεσης					
Συγκέντρωση ουσίας (ppm)	**24**	**48**	**72**	**24**	**48**	**72**
0 (control)	77.336.667±3.274.840	77.126.667± 1.430.027	168.333.333± 3.480.102	261.000.000±4.556	296.000.000±2.889	486.466.666±3.567
6,5	34.543.333± 1.022.030 *	24.700.000± 1.069.268 *,+	33.933.333± 3.544.029 *	14.240.000± 5.447	28.000.000±1.068	13.320.000±4.332
15	43.836.667± 1.435.576 *	35.843.333± 452.007 *,+	31.656.667± 2.444.138 *	14.226.666± 6.88*	43.466.666±2.854	25.560.000±1.007

* στατιστικά σημαντική διαφορά από το control (0 ppm).
\+ στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Βακτηριακή ανάπτυξη (αριθμός κυττάρων/ ml) των *Vibrio anguillarum* και *Vibrio alginolyticus* μετά από έκθεση σε βακτηριοστατικό σκεύασμα που περιέχει εκχύλισμα του γένους *Angelica*. (n=3, μέσος όρος±τυπικό σφάλμα))-Πείραμα 2

TABLE 2. Bacterial growth (number of cells/ml) of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio alginolyticus* after treatment with antibacterial substance containing extract of the plant *Angelica*. (n=3, mean±SE σφάλμα)) -Experiment 2.

	Vibrio anguillarum			*Vibrio alginolyticus*		
	Ώρες έκθεσης					
Συγκέντρωση ουσίας (ppm)	**24**	**48**	**72**	**24**	**48**	**72**
0 (control)	4.420.000±103.602	18.850.000±3.579.688	101.250.000±478.714	27.425.000±1.116.822	91.750.000±2.926.175	203.000.000±10.244.592
1	4.290.000±34.156 +	4.037.500±68.845 +	12.245.000±568.397 *,+	2.825.000±17.559 *,+	3.225.000±528.165 *,+	16.450.000±417.333 *,+
3	10.450.000±301.385 *,+	9.325.000±731.864 +	25.130.000±620.873 *,+	6.625.000±75.000 *,+	5.600.000±441.588 *,+	27.547.500±1.947.286 *,+
4	9.225.000±370.529 *,+	8.175.000±495.606 +	20.335.000±598.519 *,+	8.925.000±205.649 *,+	7.950.000±170.783 *,+	38.475.000±1.615.227 *,+

* στατιστικά σημαντική διαφορά από το control (0 ppm).
\+ στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων.

τά από έκθεση 24 ώρων. Αναστολή μεγαλύτερη του 50% παρουσιάζεται μετά από 48 ώρες έκθεσης και μόνο στις συγκεντρώσεις των 3 ppm και 4 ppm καθώς επίσης και σε όλες τις συγκεντρώσεις μετά από έκθεση 72 ωρών. Η μεγαλύτερη δραστικότητα της ουσίας με αναστολή 88% εμφανίζεται στη συγκέντρωση του 1 ppm μετά από 72 ώρες έκθεσης. Αντίθετα, για το *V. alginolyticus* η αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης είναι στατιστικά σημαντική για όλες τις συγκεντρώσεις και σε όλες τις ώρες έκθεσης σε σχέση με τους μάρτυρες ($p<0.05$). Κυμαίνεται δε από 68% έως 97%. Η μεγαλύτερη δραστικότητα της ουσίας εμφανίζεται στη συγκέντρωση του 1 ppm μετά από 48 ώρες έκθεσης με αναστολή 97% της βακτηριακής ανάπτυξης.

Με βάση την καλύτερη εμπορική και οικονομική αξιοποίηση της ουσίας και για συγκεκριμένη χρονική διάρκεια τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών είναι ενθαρρυντικά και μπορούν να προταθούν τα παρακάτω για χρήση του σκευάσματος σε εκτροφή λαρβών:

Αν σκοπός είναι η μείωση του βακτηριακού φορτίου των σαπροφύτων (μέχρι και 48 ώρες) της Artemia πριν από τη χορήγησή τους στα εκτρεφόμενα ιχθύδια, τότε προτείνεται η δόση 1 - 3 ppm max., η οποία επιτρέπει μείωση του βακτηριακού φορτίου ακόμη και δυνητικά παθογόνων βακτηρίων (όπως το *V. alginolyticus*) μεγαλύτερη του 90-97% σε σχέση με τους μάρτυρες.

Αν σκοπός είναι η παρατεταμένη μείωση του βακτηριακού φορτίου (πάνω απο 72 ώρες) της *Artemia*, τότε προτείνεται η δόση των 6,5 ppm max, η οποία επιτρέπει μία μείωση του βακτηριακού φορτίου κατα 45-50% σε σχέση με το μάρτυρα. Στην περίπτωση αυτή προτείνεται η μελέτη σταδιακά αυξανόμενων δόσεων >15 ppm και ανα 12 ώρες για να βρεθεί αφ' ενός μεν η LD50/LC50 της ουσίας (αν υπάρχει), αφ'ετέρου δε, η μέγιστη διάρκεια της βακτηριοστατικής ή βακτηριοκτόνου δράσης της ουσίας.

Σε συνθήκες εκτροφής πάντως, οι ναύπλιοι *Artemia* προσφέρονται στα ιχθύδια συνήθως σε 48 ώρες απο την

εκκόλαψή τους και επομένως, για την περίπτωση αυτή, το σκεύασμα έχει πολύ καλά αποτελέσματα. Σε κάθε περίπτωση πάντως, τα αποτελέσματα αυτά είναι προκαταρκτικά και οι τελικές δόσεις του ανωτέρω σκευάσματος που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για εμπορικούς σκοπούς στην εκτροφή λαρβών θαλασσινών ψαριών θα πρέπει να μελετηθούν και σε πειράματα με δοκιμή της ουσίας και απ' ευθείας σε *Artemia*.

Για την αντιμετώπιση παθογόνων στελεχών, όπως φάνηκε και απο τους δύο πειραματισμούς, χρειάζεται μεγαλύτερη δόση της υπο μελέτη ουσίας (>3-4ppm για μία σημαντική μείωση στις 48 ώρες ή 6,5 ppm για μεγαλύτερη διάρκεια). Στην περίπτωση αυτή όμως, πιθανότατα θα ήταν απαραίτητη παράλληλα και γενικότερη θεραπεία με κλασικά αντιβιοτικά σκευάσματα στα ψάρια.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Austin B, Morgan DA & Alderman DJ (1982). Comparison of antimicrobial agents for control of vibriosis in marine fish. Aquaculture, 26,1-12.
2. Cipriano R, Ford L, Starliper CE, Tesca J, Nelson J. & Jensen B (1996). Control of external Aeromonas salmonicida: Topical disinfection of Salmonids with Chloramine T. Journal of Aquatic Animal Health, 8: 52-57.
3. Elston R, Drum A & Bunnell P (1995). Furunculosis injection model for drug efficacy testing of seawater adapted Atlantic Salmon. Comparison of antimicrobial agents for control of vibriosis in marine fish. Aquaculture, 26, 1-12.
4. Stoffregen D, Bowser P & Babish J (1996). Antibacterial chemotherapeutants for finfish Aquaculture: A synopsis of laboratory and field efficacy studies. Journal of Aquatic Animal Health, 8,181-193.
5. Mercedes A & Blanch A (1994). A set of keys for biochemical identification of environmental Vibrio species. Journal of Applied Bacteriology, 76, 79-85.
6. Meinert C. (1980). Clinical trials. Oxford University Press, New York.
7. SPSS (1997). SPSS Advanced Statistics ™ 7.5. Copyright© 1997 by SPSS Inc., 444 North Michigan Avenue, Chicago, IL, 60611.
8. Duke JA (1985). Handbook of Medicinal Herbs. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 43-44.
9. Zhu DPQ (1987). Dong quai. American Journal of Chinese Medicine 15, 117-125.
10. Kumazawa Y, Mizunoe K and Otsula Y (1982). Immunostimulating polysaccharide separated from hot water extract of Angelica acutiloba Kitagawa. Immunology, 47, 75-83.