مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره نهم، شماره چهارم، تیر ۹۴
صفحه ۳۹ الی ۴۸

مقاله پژوهشی
(Original Article)

تأثیر ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و اتانولی میوه درخت سپستان بر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشرشیا کلی* و *سالمونلا تیفی*

مطهره پیرنیا[۱]، محمدرضا عدالتیان دوم[۲*]، فریده طباطبایی یزدی[۳]، فخری شهیدی[۴]

چکیده

زمینه و هدف: با پیدایش مقاومت‌های روزافزون میکروب‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی، تحقیقات لازم جهت جایگزینی داروهای شیمیایی توسط گیاهان دارویی سنتی صورت گرفته است. این پژوهش با هدف تعیین اثر مهارکنندگی عصاره‌های آبی و اتانولی میوه درخت سپستان روی تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی انجام گرفت.

روش بررسی: اثر ضدمیکروبی عصاره با چهار روش: کشت آمیخته، انتشار در دیسک، حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) تعیین گردید. آنالیز و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون Duncan و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح اطمینان $p\leq ۰/۰۵$ انجام شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، عصاره‌های آبی و اتانولی میوه سپستان *(Cordia myxa L.)* بر روی باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* مؤثر بود. بالاترین مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی در مورد عصاره آبی به ترتیب ۶۴ و ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در مورد عصاره اتانولی به ترتیب ۳۲ و ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای سویه *سالمونلا تیفی* به دست آمد، لذا این باکتری به‌عنوان مقاوم‌ترین سویه نسبت به عصاره‌های آبی و اتانولی میوه سپستان شناخته شد.

نتیجه‌گیری: در این پژوهش تنها از یک روش استخراج عصاره برای بررسی اثر ضدمیکروبی استفاده شد. بنابراین، کاربرد سایر روش‌های عصاره‌گیری و مطالعه اثر ضدمیکروبی سایر اندام‌های گیاه برای کسب نتایج دقیق‌تر ضروری به‌نظر می‌رسد.

کلید واژه‌ها: میوه سپستان؛ عوامل ضدباکتریایی؛ تست‌های حساسیت میکروبی؛ *استافیلوکوکوس اورئوس*.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Pirnia M, Edalatian Dovom MR, Tabatabaee Yazdi F, Shahidi F. The antibacterial effects of the aqueous and ethanolic extracts of Cordia myxa L. Fruit on *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Escherichia coli*, and *Salmonella typhi*. Qom Univ Med Sci J 2015;9(4):39-48. [Full Text in Persian]

[۱]دانشجوی کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

[۲]استادیار علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

[۳]دانشیار علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

[۴]استاد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
محمدرضا عدالتیان، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
edalatian@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۸

تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۱۹

www.SID.ir

مقدمه

داروهای گیاهی به‌علت داشتن منشأ طبیعی و سازگاری بیشتر با ارگانیسم‌های بدن، دارای عوارض کمتری هستند (۱). از طرفی، به‌علت بروز مقاومت‌های میکروبی به آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی؛ استفاده از گیاهان و ترکیبات آنها به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی مورد توجه قرار گرفته است (۲). گیاهان از قرن‌ها پیش مورد توجه پزشکان بوده و اثرات درمانی و بی‌ضرر آنها در طول سالیان متمادی تجربه و به ثبت رسیده است (۳). با پیدایش مقاومت‌های روزافزون میکروب‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه ضرورت دارد. بسیاری از گیاهان، توانایی بالایی علیه پاتوژن‌های باکتریایی و قارچی انسان دارند. در صنایع غذایی به‌علت گرایش منفی مردم به مصرف غذاهایی با نگهدارنده‌های شیمیایی، از منابع گیاهی به‌عنوان طعم‌دهنده و نیز از عوامل ضدمیکروبی استفاده می‌شود (۴). بررسی اثرات ضدمیکروبی گیاهان طبیعی می‌تواند راه را برای به دست آوردن مواد ضدمیکروبی جدید هموار سازد (۵). ترکیبات ضدمیکروبی با منبع گیاهی دارای قابلیت درمانی بی‌شماری هستند، لذا نه تنها در درمان بیماری‌های عفونی مؤثرند؛ بلکه به‌طور همزمان نیز تعداد زیادی از اثرات جانبی را که اغلب با آنتی‌بیوتیک‌ها همراه است، کاهش می‌دهند (۶).

گیاه درختی سپستان با نام علمی *Cordia myxa L.* که رایج‌ترین گونه جنس *Cordia* است از خانواده گاو زبانیان بوده و عموماً در مناطق حاره‌ای، نیمه‌حاره‌ای و جنگل‌های خشک تا مرطوب برگ‌ریز می‌روید. اصل این درخت از هندوستان و از مناطق بومی گرمسیر و مرطوب می‌باشد. به لحاظ مورفولوژی، درختی با ارتفاع حداکثر ۱۲ متر و اندام هوایی پوشیده از کرک‌های خشن بوده که در تابستان ثمر می‌دهد (۷). در متون کهن به خواص درمانی گونه‌های جنس *Cordia* اشاره شده است. در سیستم‌های قدیمی جنس *Cordia* را به‌عنوان آنتی‌باکتریال، ضدویروس و ضدسرفه معرفی کرده‌اند. اندام‌های مختلف این گیاه (مانند برگ، پوست و میوه) نیز دارای خواص درمانی چون کرم‌کش، مسکن، قابض‌آور، ضدسرفه و غیره می‌باشد (۸). در مطالعات، اثرات ضدتشنجی قابل‌توجهی برای عصاره میوه سپستان در مقایسه با کُنار ذکر شده است (۹)، همچنین تأثیر ضدالتهابی این میوه در موش‌های دچار کولیت نیز به اثبات رسیده است (۱۰). در گزارشها به فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجه گونه‌ای دیگر از جنس سپستان (*Cordia gilletii De Wild*) نیز اشاره شده است (۱۱). تاکنون تنها برخی از ترکیبات میوه سپستان شامل: فلاونوئیدهایی مانند روتین (Rutin)، مشتقات فنلی، ترپن‌ها، کومارین، آلکالوئیدهای پیرولیزیدین (مانند ماکروفیلین، استرول و ساپونین‌ها) که خاصیت ضدمیکروبی دارند، مشخص شده است (۸).

باکتری‌هایی نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشرشیاکلی* و *سالمونلا تیفی* در مسمومیت‌های غذایی نقش بسیار مهمی ایفا می‌کنند. *استافیلوکوکوس اورئوس* به دلیل تولید رنگدانه کارتنوئیدی به نام استافیلوزانتین، کلنی‌های زرد رنگی ایجاد می‌کند که این پیگمان در بیماری‌زایی نقش دارد؛ زیرا به‌عنوان ماده آنتی‌اکسیدان عمل کرده و موجب در امان ماندن باکتری در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود (۱۲). باکتری باسیلوس عامل ایجاد انتروتوکسین‌های اسهال و تهوع می‌باشد (۱۲). برخی از سروتیپ‌های *اشرشیا کلی* نیز موجب مسمومیت غذایی و اسهال می‌شوند (۱۲). *سالمونلا تیفی* عامل عمده مسمومیت غذایی است (۱۳).

این مطالعه با هدف تعیین اثر عصاره‌های آبی و اتانولی میوه درخت سپستان علیه باکتری‌های بیماریزای گرم منفی و گرم مثبت *Staphylococcus aureus* PTCC 1112، *Bacillus cereus* PTCC 1247، *Escherichia coli* PTCC 1330 و *Salmonella typhi* PTCC 1609 انجام گرفت.

روش بررسی

این مطالعه تجربی از آبان ماه ۱۳۹۲ تا بهمن ۱۳۹۲ در آزمایشگاه میکروب‌شناسی صنعتی و فناوری‌های نوین دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. در این بررسی از سویه‌های باکتریایی شامل: *Staphylococcus aureus* PTCC 1112، *Bacillus cereus* PTCC 1247، *Escherichia coli* PTCC 1330 و *Salmonella typhi* PTCC 1609، اهدایی توسط دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد استفاده شد.

میوه سپستان از مناطق بومی شهرستان کهنوج واقع در استان کرمان

Archive of SID

www.SID.ir

تهیه گردید. به لحاظ تاکسونومیکی (Taxonomiky) این گیاه دارویی در بخش بیولوژی دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد شناسایی و تأیید شد. پس از حذف هسته، میوه تازه در شرایط مناسب و به دور از آفتاب خشک شده و سپس به‌وسیله آسیاب آزمایشگاهی (مدل WARING ساخت آلمان) به پودر تبدیل شد.

دو نوع مختلف عصاره (آبی و اتانولی) از میوه سپستان به روش خیساندن (Maceration) تهیه گردید. عصاره‌های آبی و اتانولی با افزودن ۱۰۰ گرم پودر میوه سپستان به ۵۰۰ میلی‌لیتر به ترتیب آب مقطر و اتانول ۹۶٪ (نسبت ۵:۱) درون ارلن مایر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر و قرارگیری ظروف حاوی مخلوط‌های فوق در انکوباتور شیکردار دیجیتال (ساخت ایران) با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت تهیه گردید. مخلوط‌های آبی و اتانولی به‌وسیله کاغذ صافی واتمن شماره ۱، فیلتر و تفاله‌ها جدا شدند. مایع صاف‌شده جهت حذف ذرات معلق و ناخالصی‌های باقی‌مانده با دور g×۳۰۰۰ در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس عصاره شفاف در پلیت‌های شیشه‌ای بزرگ ریخته شد و در آون تحت خلأ (با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت) قرار گرفت تا حلال موجود در عصاره تبخیر شود. پس از گذشت این مدت زمان، عصاره خشک‌شده با ظاهری کاملاً پودری، برای انجام آزمایشهای بعدی درون فویل‌های آلومینیومی ضخیم در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد (۱۵،۱۴). برای تعیین وزن خشک عصاره‌های آبی و الکلی میوه سپستان، ابتدا وزن یک پلیت آزمایشگاهی خالی اندازه‌گیری شد، سپس ۱۵ میلی‌لیتر از عصاره‌های آبی و اتانولی درون پلیت‌های جداگانه و در دمای اتاق نگهداری شدند تا کاملاً خشک شوند. پس از این مدت، وزن پلیت حاوی عصاره خشک‌شده یادداشت و از وزن پلیت خالی کسر گردید، میانگین سه بار تکرار به‌عنوان وزن خشک و یا درصد استخراج عصاره درنظر گرفته شد (۱۵). پس از تهیه سویه‌های گرم مثبت و گرم منفی به‌منظور فعال‌سازی، باکتری‌ها در شرایط استریل به محیط کشت مایع مولر هینتون (مرک آلمان) انتقال یافتند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس از محیط کشت ۲۴ ساعته بر روی محیط‌های مورب، همچنین بر روی پلیت‌های حاوی محیط مولر هینتون آگار (مرک آلمان) کشت خطی داده شد و در گرمخانه با دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت یک شبانه‌روز قرار گرفتند تا به‌عنوان منبع باکتری از آنها استفاده شود. از کشت ۲۴ ساعته باکتری، سوسپانسیونی در محلول نمکی استریل که در هر میلی‌لیتر حاوی $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$CFU/ml باکتری بود با استفاده از محلول استاندارد ۰/۵ مک فارلند تهیه گردید (۱۶).

فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی و اتانولی میوه سپستان با استفاده از چهار روش Pour plate، انتشار در دیسک (Disk Agar Diffusion)، کمترین غلظت مهارکنندگی (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) و کمترین غلظت کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) بررسی شد. در روش Pour plate (روش کشت آمیخته)، ۰/۲ گرم از عصاره آبی و اتانولی به ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه گردید و به‌منظور یکنواخت‌شدن به کمک دستگاه ورتکس، هم زده شد، سپس یک میلی‌لیتر از این محلول به ظرف‌های پتری استریل اضافه و غلظت نهایی عصاره در این حالت به ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رسید. در مرحله بعد، محیط کشت استریل مولر هینتون آگار (مرک آلمان) به ظرف‌های پتری اضافه شده و در دمای اتاق قرار گرفت تا محیط کشت‌ها ببندد. یک لوپ از کشت استاندارد هر سوش کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. از محیط دارای عصاره و بدون باکتری نیز به‌عنوان کنترل استفاده گردید (۱۷).

در روش دیسک - پلیت با قرار دادن ۶ دیسک در اطراف و یک دیسک در مرکز به‌عنوان شاهد منفی (در مورد عصاره‌های آبی، حلال آب مقطر و در مورد عصاره‌های اتانولی، حلال اتانول ۹۶٪) و در دیسک‌های محیطی با افزودن شش غلظت از عصاره‌های مورد نظر (به ترتیب ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت، عمل گرمخانه‌گذاری انجام شد. بعد از طی مدت انکوباسیون، منطقه عدم رشد (Inhibition Zone) در محیط اطراف دیسک‌ها با در نظر گرفتن قطر دیسک (۶ میلی‌متر) به‌وسیله خط‌کش اندازه‌گیری و به‌صورت میلی‌متری گزارش شد. قابل ذکر است که اثر ضدمیکروبی هر عصاره بر روی هر سوش در سه تکرار انجام گرفت (۱۸).

Archive of SID

www.SID.ir

آزمایش کمترین غلظت بازدارندگی با روش رقت – لوله (Macro Dilution Broth) انجام شد، در این روش با استفاده از شش رقت متوالی (دو برابر)، اثرات ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی میوه سپستان در محیط کشت مایع مولر هینتون براث (مرک آلمان) با افزودن سوسپانسیون میکروبی برای چهار میکروارگانیسم باکتریایی به‌طور جداگانه و قرار دادن شاهد مثبت و منفی مورد بررسی قرار گرفت. کمترین غلظت ماده ضدمیکروبی که از رشد باکتری جلوگیری کرد و در مقایسه با کنترل منفی به‌طور ظاهری کدورتی نداشت، به‌عنوان حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد تعیین گردید. تمامی این آزمایشها نیز در سه تکرار انجام گرفت (۱۹). به‌منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC)، یک میلی‌لیتر از لوله‌هایی که باکتری در آن رشد نکرده بود با ۱۲ میلی‌لیتر از محیط کشت مولر هینتون آگار مذاب (با درجه حرارت ۴۸ درجه سانتیگراد) در یک پلیت مخلوط و پس از بسته‌شدن آگار، در ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. در نهایت، پلیتی که حاوی کمترین غلظت عصاره بود و در آن رشدی مشاهده نشد، به‌عنوان MBC آن عصاره در نظر گرفته شد (۲۰). داده‌های حاصل از بررسی اثر ضدباکتریایی، همچنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶، آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و اختلاف بین میانگین‌ها با آزمون Duncan در سطح اطمینان $p\leq ۰/۰۵$ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

نتایج به دست آمده از روش کشت آمیخته (پخش عصاره)، نشان از تأثیر عصاره‌های آبی و اتانولی در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر باکتری *Bacillus cereus* بود، درحالی‌که در همین غلظت، دو سویه باکتریایی گرم منفی *Escherichia coli* و *Salmonella typhi* نسبت به دو عصاره آبی و اتانولی میوه سپستان مقاومت نشان دادند و بر سطح محیط کشت رشد کردند. همچنین عصاره اتانولی در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، اثر بازدارندگی بر *Staphylococcus aureus* داشت، اما عصاره آبی فاقد هرگونه تأثیری بر آن بود (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: اثر ضدمیکروبی غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های آبی و اتانولی میوه سپستان بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه (روش پخش در سطح محیط [pour plate])

میکروارگانیسم	عصاره آبی	عصاره اتانولی
استافیلوکوکوس اورئوس **PTCC 1112**	R	S
باسیلوس سرئوس **PTCC 1247**	S	S
اشرشیا کلی **PTCC 1330**	R	R
سالمونلا تیفی **PTCC 1609**	R	R

R: Resistant
S: Sensitive

نتایج، حاکی از عدم تأثیر عصاره آبی میوه سپستان در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی دو باکتری *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* بود، درحالی‌که عصاره اتانولی در تمامی غلظت‌ها بر روی این دو سویه باکتریایی گرم مثبت تأثیر داشت و با ایجاد هاله بازدارندگی از رشد آنها ممانعت کرد. گونه *Salmonella typhi* نیز با رشد بر سطح محیط کشت و ایجاد هاله‌ای با قطر اندک، به‌عنوان مقاوم‌ترین سویه نسبت به دو نوع عصاره آبی و اتانولی در این مطالعه شناخته شد. همچنین عصاره اتانولی در تمامی غلظت‌ها بجز ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و عصاره آبی در تمامی غلظت‌ها بجز ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قادر به مهار رشد *Escherichia coli* بر سطح محیط کشت از طریق ایجاد هاله عدم رشد بود (جدول شماره ۲).

www.SID.ir

جدول شماره ۲: میانگین قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه در حضور عصاره‌های اتانولی و آبی میوه سپستان (روش انتشار در آگار)

نوع عصاره	میکروارگانیسم‌ها	غلظت‌های عصاره میوه سپستان (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)					
اتانولی		۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰
	استافیلوکوکوس اورئوس	۸/۵±۰/۲۵^{a}	۱۰/۹±۰/۱ ^{b}	۱۲/۵±۰/۱^{c}	۱۴/۱±۰/۱۱^{d}	۱۵/۷±۰/۲۶^{e}	۱۷/۷±۰/۱۵^{f}
	باسیلوس سرئوس	۱۰/۵±۰/۲۵^{a}	۱۱/۷±۰/۲^{b}	۱۳/۱±۰/۱۱^{c}	۱۴/۷±۰/۲^{d}	۱۶/۹±۰/۱۵^{e}	۱۸/۴±۰/۲^{f}
	اشرشیا کلی	–	۸/۳ ±۰/۱۵^{a}	۹/۴±۰/۱۱^{b}	۱۱/۱±۰/۳^{c}	۱۳/۲±۰/۲۵^{d}	۱۵/۳±۰/۲^{d}
	سالمونلا تیفی	–	–	۷/۲±۰/۲۵^{a}	۹/۲±۰/۲۵^{b}	۱۰/۳±۰/۱۵^{c}	۱۱/۹±۰/۲^{d}
آبی							
	استافیلوکوکوس اورئوس	–	۹/۲±۰/۲۵^{a}	۱۰/۷±۰/۱^{b}	۱۲/۹±۰/۴^{c}	۱۴/۶±۰/۱۵^{d}	۱۶/۴±۰/۱۵^{e}
	باسیلوس سرئوس	–	۹/۴±۰/۱۱^{a}	۱۱/۱±۰/۰۵^{b}	۱۲/۹±۰/۴^{c}	۱۵/۶±۰/۱۱^{d}	۱۷/۵±۰/۳^{e}
	اشرشیا کلی	–	–	۸/۴±۰/۲^{a}	۱۰/۱±۰/۱^{b}	۱۲±۰/۱^{c}	۱۴/۱±۰/۱۵^{d}
	سالمونلا تیفی	–	–	–	۷/۴±۰/۲۵^{a}	۹/۲±۰/۵^{b}	۱۰/۴±۰/۴^{c}

*** علامت (–)، نشان‌دهنده عدم وجود فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی میوه سپستان می‌باشد.**

*** حروف غیرمشابه در یک ردیف، نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $p\leq ۰/۰۵$ است.**

*** واحد اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد، میلی‌متر می‌باشد.**

بحث

مقادیر MIC عصاره اتانولی برای همه سویه‌های باکتریایی مورد بررسی بجز *Staphylococcus aureus* (MIC عصاره آبی برابر با MIC عصاره اتانولی است) کمتر از مقادیر MIC به دست‌آمده برای عصاره آبی بود. MIC عصاره اتانولی برای *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus*، *Escherichia coli* و *Salmonella typhi* به ترتیب ۱۶، ۸، ۱۶ و ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، درحالی‌که MIC عصاره آبی برای ترتیب باکتریایی فوق ۱۶، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ میلی گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳: نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره‌های اتانولی و آبی عصاره میوه سپستان بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت‌های عصاره میوه سپستان (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)						
اتانولی		۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	کنترل
	استافیلوکوکوس اورئوس	+	+	+	–	–	–	+
	باسیلوس سرئوس	+	+	–	–	–	–	+
	اشرشیا کلی	+	+	+	–	–	–	+
	سالمونلا تیفی	+	+	+	+	–	–	+
آبی								
	استافیلوکوکوس اورئوس	+	+	+	–	–	–	+
	باسیلوس سرئوس	+	+	+	–	–	–	+
	اشرشیا کلی	+	+	+	+	–	–	+
	سالمونلا تیفی	+	+	+	+	+	–	+

– :عدم رشد

www.SID.ir

مقادیر MBC دو عصاره اتانولی و آبی در مورد برخی از باکتری‌ها یکسان به دست آمد که این فاکتور در مورد *Staphylococcus aureus* و *Salmonella typhi* به ترتیب ۶۴ و ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (جدول شماره ۴).

جدول شماره ٤: نتایج حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های اتانولی و آبی عصاره میوه سپستان بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه

نوع عصاره	میکروارگانیسم‌ها	غلظت عصاره میوه سپستان (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)							
		۲	٤	۸	١٦	٣٢	٦٤	١٢٨	٢٥٦	کنترل
اتانولی										
	استافیلوکوکوس اورئوس	+	+	+	+	+	−	−	−	+
	باسیلوس سرئوس	+	+	+	−	−	−	−	−	+
	اشرشیا کلی	+	+	+	+	+	+	−	−	+
	سالمونلا تیفی	+	+	+	+	+	+	+	−	+
آبی										
	استافیلوکوکوس اورئوس	+	+	+	+	+	−	−	−	+
	باسیلوس سرئوس	+	+	+	+	−	−	−	−	+
	اشرشیا کلی	+	+	+	+	+	+	+	−	+
	سالمونلا تیفی	+	+	+	+	+	+	+	−	+

- : عدم رشد

+ : رشد

بحث

گیاهان مختلف، مکانیسم‌های دفاعی متفاوتی را در برابر پاتوژن‌ها و ارگانیسم‌های مختلف از خود نشان می‌دهند و در محیط نیز بقای خود را حفظ می‌کنند. یکی از مکانیسم‌های مؤثر دفاعی، تولید ترکیبات شیمیایی مختلف و مؤثر بوده که تحت عنوان کمپلکس‌های شیمیایی ممکن است انواعی از اسید، باز و ترکیبات آلی دیگر باشد. در روش‌های مختلف عصاره‌گیری، از این ترکیبات جداشده می‌توان به‌منظورهای مختلفی استفاده کرد. کمّیت و کیفیت این مواد در ارتباط با گیاهان گوناگون و روش‌های مختلف عصاره‌گیری متفاوت است (۲۱). در این پژوهش براساس نتایج به دست آمده، عصاره‌های آبی و اتانولی میوه سپستان، طیف وسیعی از فعالیت ضدمیکروبی را علیه میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه از خود نشان دادند و اثر ضدمیکروبی هر دو عصاره (اتانولی و آبی) تا حدودی بسته به نوع میکروارگانیسم متفاوت بود. همچنین در این مطالعه، باکتری‌های گرم منفی *Salmonella typhi* و *Escherichia coli* به‌وسیله هر دو عصاره آبی و اتانولی در غلظت‌های بالاتری از عصاره، مهار و از رشد آنها در سطح محیط کشت ممانعت شد و مشخص گردید سویه‌های گرم مثبت *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* در مقایسه با سوش‌های گرم منفی *Salmonella typhi* و *Escherichia coli*، از حساسیت بیشتری در برابر عصاره‌های مورد استفاده برخوردارند و در غلظت کمتری از عصاره‌های آبی و اتانولی میوه سپستان رشد آنها متوقف می‌شود. به‌طورکلی باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی، حساسیت بیشتری نسبت به عصاره میوه سپستان از خود نشان می‌دهند که علت آن می‌تواند اختلاف ساختمانی دیواره باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی باشد، به‌طوری‌که باکتری‌های گرم مثبت در دیواره سلولی خود دارای ترکیب موکوپپتید بوده، درحالی‌که باکتری‌های گرم منفی فقط لایه نازکی از موکوپپتید دارند و قسمت اعظم ساختمان دیواره در آنها لیپوپروتئین و لیپوپلی‌ساکارید است. به‌همین دلیل باکتری‌های گرم منفی مقاوم‌ترند. در نتیجه مقاومت بالاتر باکتری‌های گرم منفی را می‌توان به حضور غشای فسفولیپیدی خارجی تقریباً غیرقابل نفوذ به ترکیبات چربی‌دوست نسبت داد که این امر با نتایج دیگر مطالعات مطابقت داشت (۲۳،۲۲). Nariya و همکاران طی انجام مطالعه‌ای بر روی فعالیت ضدقارچی و باکتریایی پوست درخت *C. dichotoma* (از انواع گونه‌های *Cordia*) علیه تعدادی از قارچ‌ها و باکتری‌های گرم منفی و مثبت؛ قطر هاله بازداری قابل‌توجهی برای باکتری‌ها و قارچ‌ها گزارش کردند (۲۴). اخیراً نتایج پژوهش دیگری نیز نشان داده است عصاره اتانولی

www.SID.ir

میوه سپستان با توجه به درصد استحصال کمتر (وزن خشک کمتر)، مؤثرتر از عصاره آبی می‌باشد. با توجه به اینکه عصاره آبی میوه سپستان دارای وزن خشک به مراتب بالاتری بوده است، این پدیده را این‌گونه می‌توان توجیه کرد که احتمالاً ترکیبات مؤثره و دارای اثر بازدارنده در حلال‌های نیمه‌قطبی تا غیرقطبی مانند اتانول، حلالیت بیشتری یافته که همین امر باعث شده است تا در حلال آبی به میزان کمتری وارد شده و در نتیجه اثر ضدمیکروبی کمتر عصاره آبی را در مقایسه با عصاره اتانولی موجب گردد (۸). محققی ثمرین و همکاران (سال ۱۳۹۰) نیز در مطالعه خود، راندمان عصاره‌گیری از پوست زمینی را با حلال‌های مختلف (آب، اتانول، متانول، استن و هگزان) ارزیابی کردند و دریافتند از میان حلال‌های مورد استفاده برای عصاره‌گیری از پوست سیب‌زمینی؛ حلال آب دارای بیشترین راندمان عصاره‌گیری بوده و حلال‌های متانول، اتانول، استن و هگزان به ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار دارند (۲۵). با توجه به نتایج به دست‌آمده در مطالعه حاضر، به‌نظر می‌رسد بازده عصاره‌گیری با افزایش قطبیت حلال افزایش می‌یابد، به‌عنوان مثال از بین دو حلال آب و اتانول مورد استفاده؛ آب بالاترین شاخص قطبیت را دارد که این امر ممکن است در بالا بودن راندمان عصاره‌گیری با آب مؤثر باشد. نتایج حاصل از بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره‌های اتانولی و آبی میوه سپستان به روش انتشار در آگار در این پژوهش حاکی از آن است که با افزایش غلظت عصاره‌های آبی و اتانولی میوه سپستان، فعالیت ضدمیکروبی علیه چهار سویه باکتریایی افزایش می‌یابد و رابطه مستقیمی بین افزایش غلظت عصاره و افزایش اثر مهارکنندگی وجود دارد. چنین اتفاقی در دیگر تحقیقات نیز صادق است (۲۶). در مطالعه حاضر، بالاترین میانگین قطر هاله بازداری در سطح معنی‌داری $p\leq ۰/۰۵$ مربوط به سویه‌های گرم مثبت *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* بود. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نیز نشان داد قطر هاله عدم رشد به‌طور معنی‌داری در سطح $p\leq ۰/۰۵$ با افزایش غلظت عصاره افزایش می‌یابد. همچنین در مطالعه حاضر باکتری‌های گرم منفی، به‌ویژه *Salmonella typhi*، بیشترین مقاومت را نسبت به دو عصاره آبی و اتانولی نشان دادند، به‌طوری‌که *Salmonella typhi* در غلظت‌های بالاتری از عصاره‌های آبی و اتانولی مهار و از رشد آن ممانعت شد. طباطبایی یزدی و همکاران با بررسی "تأثیر عصاره آبی و اتانولی گیاه کلپوره علیه تعدادی از باکتری‌های گرم منفی و مثبت" گزارش کردند سویه‌های گرم منفی *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa*، بیشترین مقاومت را نسبت به عصاره کلپوره داشته‌اند، درحالی‌که رشد باکتری‌های گرم مثبت در غلظت‌های کمتری از هر دو عصاره متوقف شده است (۲۷). برخی از ترکیبات ضدمیکروبی که تاکنون در اندام‌های مختلف درخت سپستان، به‌خصوص میوه شناسایی شده است شامل ترپن‌ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدهای پیرولیزیدین، ساپونین و استرول می‌باشد که این ترکیبات از جمله ترکیبات اصلی موجود در این گیاه محسوب شده و در واقع می‌توان خصوصیات ضدمیکروبی میوه سپستان را به‌وجود این ترکیبات نسبت داد (۸).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این مطالعه، از آنجا که برخی از ترکیبات عصاره تهیه‌شده دارای اثر ضدمیکروبی بوده و مقدار آنها در عصاره کم می‌باشد، لذا با تخلیص و تغلیظ می‌توان به اشکال مختلف دارویی از آنها برای درمان عفونت‌های باکتریایی، به‌خصوص باکتری‌های گرم مثبت استفاده کرد. اساساً در این پژوهش فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی میوه سپستان علیه باکتری‌های گرم منفی در خور توجه نبود. این موضوع تا حدودی می‌تواند به‌علت وجود میزان ناکافی مواد مؤثره و دارای اثر مهارکنندگی بر رشد در میوه سپستان باشد. از طرفی، این موضوع تا حدودی به نحوه استخراج عصاره نیز مربوط است. به‌طوری‌که ممکن است استفاده و به کارگیری سایر روش‌های کارآمد و پربازده، به استحصال بیشتر ترکیبات مؤثره منجر شود. به‌همین منظور بررسی اثر ضدمیکروبی سایر اندام‌های گیاه مانند پوست، برگ و ریشه نیز حایز اهمیت است و ذکر این نکته ضروری است که در فرآیند بررسی اثر ضدمیکروبی، از سایر روش‌های عصاره‌گیری که تأثیر بیشتری داشته و طبعاً بر درصد استخراج مواد مؤثره نیز تأثیرگذارند، استفاده گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات جناب آقای مهندس بهروز علیزاده بهبهانی و خانم مهندس هانیه کاشانی که در انجام آزمایشها ما را یاری کردند، صمیمانه قدردانی می‌شود. مقاله علمی- پژوهشی حاضر مستخرج از پایان‌نامه دانشجویی با عنوان "بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی میوه سپستان علیه میکروارگانیسم‌های عامل عفونت و مسمومیت مواد غذایی" در شرایط آزمایشگاهی (با کد شماره ۳۰۰۳۷) در گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهشی، دانشگاه فردوسی مشهد جهت یاری رساندن در انجام طرح صمیمانه سپاسگزاری نمایند.

References:

1. Kasra Kermanshahi RH, Moattar F, Soleimanimanesh AR. Antibacterial effects of Carthamus tinctorius alcoholic and aqueous extracts on number of bacteria. J Shahid Chamran Univ Sci, 2006;15:18-26. [Full Text in Persian]

2. Mitscher L, Leu RP, Bathala M, Wu WN, Beal JL. Antimicrobial agents from higher plants. I. Introduction, rationale, and methodology. Lloydia 1972;35(2):157-66.

3. Nazemi A, Hashemi M, Khatamineghad MR, Pourshamsian K. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of Heracoleum Persicum. Med Sci J Islamic Azad 2005;15(2):91-4. [Full Text in Persian]

4. Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. Int J Food Microbiol 2004;94(3):223-53.

5. Talei Gr, Meshkat Alsadat M, Delfan B. Antibacterial activity of fruit, leaves extracts of artemisia persica boiss, rhus coriaria, ephedra intermedia and daphne mucronata royle of lorestan. J Lorestan Univ Med Sci 2004;5(3):19-54. [Full Text in Persian]

6. Kokoska L, Polesny Z, Rada V, Nepovim A, Vanek T. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. J Ethnopharmacol 2002;82(1):51-3.

7. Amin GHR. Most common traditional medicinal plants of Iran. Tehran: Tehran University of Medical Scinces; 2005. p. 184. [Text in Persian]

8. Jamkhande PG, Barde SR, Patwekar SL, Tidke PS. Plant profile, phytochemistry and pharmacology of Cordia dichotoma (Indian cherry): A review. Asian Pac J Trop Biomed 2013;3(12):1009-16.

9. Loraki S, Bolouki A, Khandan S, Najafzade-varzi H. Comparision extract effect of Cordia myxa and Ziziphus spina-christii on induced seizures of Stricknin in rat. Tehran: 15th ed. Iran Veterinary Congress; 2008. [Text in Persian]

10. Al-Awadi FM, Srikumar TS, Anim JT, Khan I. Antiinflammatory effects of Cordia myxa fruit on experimentally induced colitis in rats. Nutrition 2001;17(5):391-6.

11. Okusa PN, Penge O, Devleeschouwer M, Duez P. Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of Cordia gilletii De Wild (Boraginaceae). J Ethnopharmacol 2007;112(3):476-81.

12. Safavi F, Ebrahimi P, Mighani H. In vitro antibacterial activity of root and aerial parts of Scrophularia striata bioss on Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Bacillus cereus. Armaghane-danesh 2013;18(8):603-14. [Full Text in Persian]

13. Jay MJ, Loessner MJ, Golden DA. Modern food microbiology. 5th ed. New York: Springer; 2000.

14. Vokou D, Bessiere JM. Volatile constituents of Teucrium polium. J Nat Product 1985;48(3):498-9.

Archive of SID

www.SID.ir

15. Behbahani BA, Yazdi FT, Mortazavi A, Zendeboodi F, Gholian MM. Effect of aqueous and ethanolic extract of Eucalyptus camaldulensis L. J Paramed Sci 2013;4(3).89-99.

16. Jalali M, Abedi D, Asghari G, Rezaie Z. A study of anti-microbial effect of pycnocycla spinosa's fruit extracts. J Mazandaran Univ Med Sci 2007;17(59):76-86. [Full Text in Persian]

17. Babayi H, Kolo I, Okogun JI, Ijah U. The antimicrobial activities of methanolic extracts of Eucalyptus camaldulensis and Terminalia catappa against some pathogenic microorganisms. Biokemistri 2004;16(2):106-11.

18. Perumal Samy R, Ignacimuthu S, Sen A. Screening of 34 Indian medicinal plants for antibacterial properties. J Ethnopharmacol 1998;62(2):173-81.

19. Moshafi MH, Mehrabani M, Zolhasab H. Antibacterial activity studies of Salvia Mirzayanii and Salvia atropatana against six standard gram-positive and gram-negative bacteria. J Kerman Univ Med Sci 2004;11(2):109-18. [Full Text in Persian]

20. Sindambiwe JB, Calomme M, Cos P, Totté J, Pieters L, Vlietinck A, et al. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. J Ethnopharmacol 1999;65(1):71-7.

21. Özçelik B, Aslan M, Orhan I, Karaoglu T. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of the lipophylic extracts of Pistacia vera. Microbiol Res 2005;160(2):159-64.

22. Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Peter J, Rinaldi M, Walsh T. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for Aspergillus spp: NCCLS collaborative study. J Clin Microbiol 2002;40(9):3204-8.

23. Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mortazavi A. Antimicrobial effects of Lavandula stoechas L. and Rosmarinus officinalis L. extracts on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Sci J Microbiol 2013;2(1):15-22.

24. Nariya PB, Bhalodia NR, Shukla VJ, Acharya RN. Antimicrobial and antifungal activities of Cordia dichotoma (Forster F.) bark extracts. Ayu 2011;32(4):585-9.

25. Mohagheghi Samarin A, Poorazarang H, Elhamirad AH, Dezashibi Z, Hematyar N. Extraction of phenolic compounds from potato peel (Ramus variety) with solvent and ultrasound-assisted methods and evaluation of its antioxidant activity in soybean oil. Iran J Food Sci Technol 2010;8(1):81-91. [Full Text in Persian]

26. Neef H, Declercq P, Laekeman G. Hypoglycaemic activity of selected European plants. Phytother Res 1995;9(1):45-8.

27. Tabatabaei Yazdi F, Alizadeh Behbahani B, Heidari Soureshjani M, Mortazavi A. The in vitro study of antimicrobial effect of Teucrium polium extract on infectious microorganisms. Sci J Hamadan Univ Med Sci 2014;21(1):16-24. [Full Text in Persian]

Archive of SID

www.SID.ir

The Antibacterial Effects of the Aqueous and Ethanolic Extracts of Cordia myxa L. Fruit on Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Escherichia coli, and Salmonella typhi

Motahareh Pirnia[1]; Mohammad Reza Edalatian Dovom[2*]; Farideh Tabatabaee Yazdi[3]; Fakhri Shahidi[4]

[1]MSc Student of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

[2]Assistant Professor of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

[3]Associate Professor of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

[4]Professor of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

[*]Corresponding Author: **Mohammad Reza Edalatian,** Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Email: edalatian@um.ac.ir

Received: 30 Jul, 2014

Accepted: 10 Sep, 2014

Abstract

Background and Objectives: With the advent of increasing resistance of microorganisms to synthetic antibiotics, researches has been carried out to replace chemical drug by traditional medicinal plants. This study has been conducted with the purpose of determining the inhibitory effect of aqueous and ethanolic extracts of Cordia myxa on a number of gram-positive and gram-negative bacteria.

Methods: Antimicrobial activity of extract was determined by four methods: pour plate, disk agar diffusion, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Analysis and mean comparison were performed using Duncan's test and one-way analysis of variance at a confidence level of α=95% ($p<0.05$).

Results: In this study, aqueous and ethanolic extracts of Cordia myxa fruit were effective on gram-positive bacteria Staphylococcus aureus and Bacillus cereus. The highest values of MIC and MBC for aqueous extract were obtained 64 and 256mg/ml, respectively, and for ethanolic extract were 32 and 256mg/ml, respectively, for Salmonella typhi, so this bacterium has been known as the most resistant strain against the aqueous and ethanolic extract of Cordia myxa fruit.

Conclusion: In this research, only one method of extraction was used for the evaluation of antimicrobial effect, so application of other methods of extraction and study of antimicrobial effect of other organs of the plant are necessary to obtain more precise results.

Keywords: *Cordia myxa L.*; Anti-Bacterial Agents; Microbial Sensitivity Tests; *Staphylococcus aureus.*

www.SID.ir