

مقایسه اثر ضدباکتریایی عصاره برگ چهار رقم زیتون (*Olea europaea*) بر باسیلوس

سرئوس

مریم عباس والی^{۱*}، محمود اسماعیلی کومهر^۲، حمدالله مشتاقی^۳، محمد هادی اسکندری^۴

۱- استادیار گروه بهداشت و کنترل کیفیت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، ایران

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، ایران

۳- دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفیت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، ایران

۴- دانشیار بخش صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: abbasvali@sci.sku.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۴/۵/۱۹؛ پذیرش نهایی: ۹۴/۷/۷)

چکیده

در سال‌های اخیر عصاره‌های گیاهی به‌عنوان مواد ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. یکی از این عصاره‌ها، عصاره برگ زیتون می‌باشد که ویژگی‌های ضد میکروبی این عصاره به دلیل وجود ترکیب‌های فنولی است. در این پژوهش، عصاره برگ چهار رقم زیتون شیراز، زرد، روغنی و دزفول توسط حلال‌های مختلف (استون، متانول و اتانول) و با کمک مایکروویو استخراج شد و اثر ضد باکتریایی آن‌ها بر باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus*) به دو روش استاندارد و میکروپلیت مورد بررسی قرار گرفت. کمترین غلظتی از عصاره که موجب مهار رشد باکتری گردیده بود (MIC) برای یازده نمونه از عصاره‌ها برابر با ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد و تنها MIC عصاره متانولی رقم روغنی ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در این پژوهش منحنی رشد باکتری باسیلوس سرئوس تحت تأثیر عصاره‌های برگ زیتون در مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس رسم گردید و میانگین درصد مهار رشد هر عصاره بعد از ۲۴ ساعت محاسبه شد. نتایج نشان داد، عصاره متانولی برگ زیتون رقم روغنی با ۹۱/۳ و ۸۷/۸ درصد مهار در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین اثر ضد میکروبی را بر باسیلوس سرئوس نسبت به دیگر ارقام مورد بررسی داشت. این مطالعه نشان داد که عصاره برگ زیتون به دست آمده از ضایعات ارزان قیمت کشاورزی، می‌تواند به‌عنوان یک منبع ارزشمند از ترکیبات فعال زیستی با خاصیت ضدباکتریایی باشد که قابل استفاده به‌عنوان افزودنی سالم در مواد غذایی است.

واژه‌های کلیدی: اثر ضد میکروبی، باسیلوس سرئوس، مهار رشد، برگ زیتون

مقدمه

باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus*) یک باکتری گرم مثبت، متحرک، هوازی اختیاری و هاگ‌زا است و به‌طور معمول در خاک، گرد و غبار و آب یافت می‌شود. در دمای ۴۸-۱۰ درجه سلسیوس رشد می‌کند و دمای مناسب برای رشد آن بین ۲۸-۳۵ درجه سلسیوس می‌باشد. این باکتری انتشار وسیعی در طبیعت دارد و اغلب از خاک و گیاهان در حال رشد جدا می‌شود. اختلالات گوارشی، استفراغ و اسهال در انسان از عوارض وجود این باکتری در مواد غذایی است (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). با توجه به اهمیت باسیلوس سرئوس در مواد غذایی یافتن راه‌های کنترل رشد آن حائز اهمیت است. از جمله راه‌های کنترل این میکروارگانیسم‌ها استفاده از مواد نگهدارنده می‌باشد. اما استفاده از مواد نگهدارنده در مواد غذایی عوارض جانبی متعددی از جمله تولید متابولیت‌های ثانویه مضر و ایجاد مقاومت میکروارگانیسم‌ها را به‌همراه دارد (مهدی‌زاده و رضوی روحانی، ۱۳۷۸)، لذا در سال‌های اخیر نگهدارنده‌های طبیعی از قبیل ادویه‌ها، عصاره گیاهان و اسانس‌ها به‌عنوان افزودنی‌های ایمن غذایی جایگزین استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی با عوارض جانبی خطرناک برای مصرف‌کننده، شده‌اند. هدف از استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی تولید غذایی ایمن است. این افزودنی‌های طبیعی توانایی از بین بردن میکروب‌های بیماری‌زا و مولد فساد را نیز دارند و عمر نگهداری محصول را افزایش می‌دهند (Oonmetta-aree *et al.*, 2006). یکی از این عصاره‌ها، عصاره برگ زیتون (*Olea europaea*) است. زیتون درختچه‌ای است از تیره Oleaceae با برگ‌های سبز دائمی که به‌حالت

وحشی ارتفاعی در حدود ۵ متر دارد. ایران یکی از مهم‌ترین تولیدکننده‌های زیتون در جهان است و در سال‌های اخیر کشت زیتون در ایران در حال گسترش بوده است. رقم‌های متعددی از زیتون در ایران وجود دارد. بیشتر باغ‌های اقتصادی زیتون ایران از ارقام زرد و روغنی محلی تشکیل شده‌اند و ارقام فیشمی، شنگه، دزفول، شیراز، زرد، گلوله و ماری نیز در سطوح کمتری مشاهده می‌گردد (Noormohammadi *et al.*, 2014).

برگ زیتون یکی از فراوان‌ترین محصولات جانبی حاصل از کشت زیتون می‌باشد که می‌تواند به‌عنوان منبعی از ترکیبات فعال زیستی طبیعی محسوب گردد (Rahmanian *et al.*, 2015). برگ زیتون به‌دلیل داشتن محتوای غنی فنولی یکی از منابع قوی پلی‌فنول‌های گیاهی می‌باشد که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و خواص ضد ویروسی است (Markin *et al.*, 2003; Owen *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2007; Sudjana *et al.*, 2009; Aytul, 2010). ترکیبات فعال زیستی موجود در برگ زیتون تحت تأثیر فاکتورهای مختلفی از قبیل رقم زیتون، شرایط آب و هوایی، سن گیاه (Niaounakis and Halvadakis, 2006) و روش‌های استخراج آن‌ها (Fares *et al.*, 2011) قرار می‌گیرد. الئوروپین (Oleuropein) مهم‌ترین ترکیب فنولی برگ زیتون است. این ترکیب و سایر ترکیب‌های فنولی در عصاره برگ زیتون نظیر اسید پاراهیدروکسی بنزوئیک (P-hydroxybenzoic acid)، اسید فرولیک (Ferulic acid)، اسید کافئیک (Caffeic acid)، اسید وانیلیک (Vanillic acid)، اسید پروتوکاتکوئیک (Protocatechuic acid)، اسید سیرینژیک (Syringic acid)، اسید پاراکوماریک (P-coumaric acid)، کوئرستین (Quercetin)، تیروزول (Tyrosol)،

استفاده شد و عصاره‌ها پس از تغلیظ با دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک گردیدند. دوازده نمونه عصاره تهیه شده تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند (Pan et al., 2003).

آماده‌سازی باکتری

در این تحقیق از باکتری *باسیلوس سرئوس* (ATCC 14579) استفاده شد. سوش باکتری در محیط کشت Tryptic Soy Broth (مرک، آلمان) حاوی ۳۰ درصد گلیسرین در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری می‌شد. در موقع آزمایش سوش در دمای محیط انجمادزدایی شد و پس از کشت در TSB و گرمخانه‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در محیط اختصاصی *باسیلوس* (*Bacillus cereus Selective Agar*) (مرک، آلمان) کشت و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. روز قبل از آزمایش یک پرگنه خالص از باکتری به محیط Mueller Hinton Broth (مرک، آلمان) انتقال یافت. پس از یک شب گرمخانه‌گذاری، کدورت سوسپانسیون باکتری معادل استاندارد ۴ مک‌فارلند و تعداد باکتری آن حدود ۹ واحد لگاریتمی در هر میلی‌لیتر بود. در روز آزمایش با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل رقت مورد نیاز از سوسپانسیون باکتری تهیه شد.

آماده‌سازی عصاره‌ها

جهت تهیه محلول عصاره‌های مورد آزمایش، مقدار ۲/۴ گرم پودر خشک شده از هر یک از عصاره‌های برگ زیتون به دقت وزن گردید و به یک استوانه مدرج به حجم ۵۰ میلی‌لیتر انتقال یافت. سپس مقداری آب مقطر به آن افزوده و به خوبی مخلوط گردید. بعد از

هیدروکسی تیروزول (Hydroxytyrosol) و اسید النولیک (Elenolic acid) فعالیت ضد میکروبی دارند (Korukluoglu et al., 2010; Brahmi et al., 2012;) (Kiritsakis et al., 2010; Zafer and Filiz, 2010).

با توجه به میزان بالای کشت زیتون در ایران و تولید حجم زیادی برگ زیتون که منبعی ارزان و در دسترس از ترکیبات فنولی می‌باشد و تقاضای رو به رشد مصرف‌کنندگان مبنی بر مصرف غذاهای حاوی نگه‌دارنده‌ها و مواد ضد میکروبی طبیعی، این مطالعه طراحی گردید. هدف از این پژوهش بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره‌های مختلف برگ چهار رقم زیتون بر *باسیلوس سرئوس* بود.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی و عصاره‌گیری از برگ‌های زیتون

برگ‌های زیتون ارقام زرد، روغنی، دزفول و شیراز در شهریور ماه از باغ زیتون بنیاد جانبازان در حومه شیراز برداشت شد. برگ‌ها در سایه خشک و با استفاده از آسیاب پودر گردیدند. ترکیبات فنولی موجود در برگ چهار رقم زیتون مذکور به وسیله سه حلال متانول، اتانول و استون ۸۰ درصد اسیدی شده با اسید کلریدریک (pH=۲) به نسبت یک به ده (وزنی/حجمی) استخراج شدند. برای این منظور از یک مایکروویو خانگی (سامسونگ ME3410W، مالزی) که کندانسور به آن اضافه گردیده بود، استفاده شد. بعد از پرتودهی (۱۵ دقیقه، ۲۰۰ وات) و سرد شدن بالن، عصاره حاصل با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شد. به منظور خروج حلال، از دستگاه دوار تبخیر در خلاء (Rotary evaporator) با دمای ۴۰ درجه سلسیوس

میلی لیتر بود. سپس به همه لوله‌ها ده میکرولیتر از سوسپانسیون باسیلوس سرئوس با غلظت ۸ واحد لگاریتمی در هر میلی لیتر افزوده شد (غلظت نهایی باکتری ۶ واحد لگاریتمی در هر میلی لیتر) و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سلسیوس، نتایج مورد ارزیابی قرار گرفتند. رقیق‌ترین لوله‌ای که کدورت نداشت و رشد باکتری مشاهده نمی‌شد، به عنوان MIC (کمترین غلظتی از عصاره که موجب مهار رشد باکتری گردیده بود) مد نظر قرار گرفت.

ارزیابی اثر مهارتی عصاره‌ها به روش میکروپلیت

از عصاره‌های استریل شده در پلیت‌های مخصوص ۹۶ خانه‌ای، رقت متوالی دو دویسی (Two-fold serial dilution) در محیط کشت Mueller Hinton Broth در حجم ۱۰۰ میکرولیتر تهیه شد. به این صورت که در چاهک اول ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت با غلظت دو برابر و در چاهک‌های بعدی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت با غلظت متعارف ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره استریل شده با غلظت ۸۰ میلی گرم در هر میلی لیتر به چاهک اول اضافه و همگن گردید و رقت‌سازی تا رسیدن به رقت‌های مورد نظر از عصاره‌ها ادامه یافت. در پایان ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات آخرین چاهک دور ریخته شد. سپس به هر چاهک مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باسیلوس سرئوس با غلظت ۷ واحد لگاریتمی در هر میلی لیتر انتقال یافت. در این صورت غلظت نهایی باکتری در هر چاهک، ۶ واحد لگاریتمی در هر میلی لیتر گردید (CLSI, 2006). هم‌زمان برای هر آزمایش سه کنترل به شرح زیر در نظر گرفته شد: کنترل منفی حاوی ۵۰ میکرولیتر عصاره و ۵۰ میکرولیتر محیط کشت با غلظت دو برابر؛ کنترل

قرارگیری الکتروود pH متر در داخل استوانه مدرج، با افزودن سود ۰/۱ نرمال pH روی ۷ تنظیم گردید. حجم مخلوط با آب مقطر به ۳۰ میلی لیتر رسانده شد. در این حالت عصاره‌ای با غلظت ۸ درصد (یا ۸۰ میلی گرم در هر میلی لیتر) تهیه گردید. عصاره به دست آمده ابتدا با فیلتر ۰/۸ میکرون و مجدداً جهت استریل‌سازی با فیلتر ۰/۲ میکرون صاف گردید. در نهایت عصاره تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس و دور از نور) نگه‌داری شد.

ارزیابی اثر مهارتی عصاره‌ها به روش استاندارد (Broth dilution-method)

برای هر عصاره ۳ سری ۷ تایی لوله آزمایش استریل انتخاب گردید. لوله‌های ۱ تا ۷ جهت رقیق‌سازی سری ۳ و لوله نیز برای کنترل‌ها که شامل یک لوله حاوی ۱ میلی لیتر محیط کشت Mueller Hinton Broth (کنترل محیط کشت)، لوله دوم حاوی ۰/۵ میلی لیتر عصاره و ۰/۵ میلی لیتر محیط کشت با غلظت دو برابر (۴۲ گرم در لیتر) (کنترل منفی) و لوله سوم حاوی ۱ میلی لیتر محیط کشت و ۱۰ میکرولیتر باکتری (کنترل مثبت) بود. در لوله اول مقدار ۱ میلی لیتر محیط کشت با غلظت دو برابر ریخته شد و به ۶ لوله بعدی ۱ میلی لیتر محیط کشت با غلظت متعارف (۲۱ گرم در لیتر) انتقال یافت. سپس ۱ میلی لیتر از عصاره ۸ درصد استریل شده به لوله اول اضافه گردید و به خوبی مخلوط شد، سپس ۱ میلی لیتر برداشته و به لوله دوم اضافه گردید. این کار تا لوله هفتم ادامه یافت، در پایان ۱ میلی لیتر از لوله آخر دور ریخته شد و حجم تمامی لوله‌ها برابر گردید. در این حالت غلظت عصاره از لوله اول تا هفتم به ترتیب ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵ و ۰/۶۲۵ میلی گرم بر

E = جذب نمونه حاوی عصاره و باکتری در ساعت ۲۴
منهای جذب در ساعت صفر

آنالیز آماری

مطالعه در سه تکرار انجام شد و نتایج به دست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($p < 0/05$) انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار (SPSS 16 for windows, SPSS Inc., SPSS Chicago, IL, USA) انجام گرفت.

یافته‌ها

نتایج ارزیابی مهار رشد باکتری باسیلوس سرئوس توسط عصاره‌ها به روش استاندارد

مطابق نتایج به دست آمده، MIC یازده نمونه از عصاره‌ها برابر با ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین گردید و تنها عصاره متانولی رقم روغنی MIC برابر با ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

نتایج ارزیابی مهار رشد باکتری باسیلوس سرئوس توسط عصاره‌ها به روش میکروپلیت

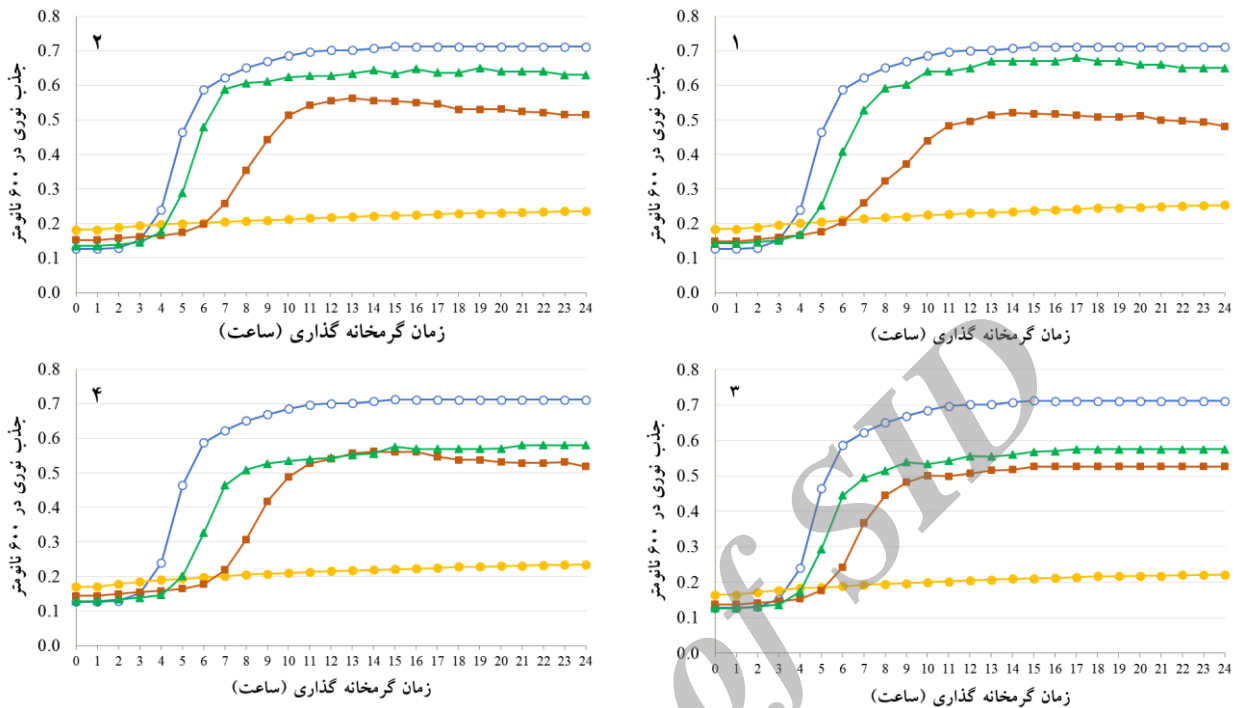
نمودار (۱) اثر غلظت‌های مختلف عصاره استونی برگ چهار رقم زیتون بر مهار رشد باکتری باسیلوس سرئوس را نشان می‌دهد.

محیط کشت حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت و کنترل مثبت، حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت و ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری. غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۵ و ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر هر عصاره مورد آزمایش قرار گرفت.

میکروپلیت‌ها بلافاصله پس از آماده شدن در دستگاه پلیت ریدر (Bio Tek, PowerWave XS2, USA) قرار داده شدند و دمای دستگاه روی ۳۷ درجه سلسیوس تنظیم گردید و میزان جذب نور هر چاهک در طول موج ۶۰۰ نانومتر و در فاصله‌های زمانی یک ساعت تا مدت ۲۴ ساعت ثبت گردید. دستگاه طوری تنظیم می‌شد که قبل از هر بار قرائت محتویات چاهک‌ها به مدت ۸ ثانیه به هم زده شوند. سپس علاوه بر رسم منحنی رشد باکتری در مدت ۲۴ ساعت تحت تأثیر غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۵ میلی گرم در میلی لیتر عصاره‌های استونی، متانولی و اتانولی برگ چهار رقم زیتون، با استفاده از فرمول زیر درصد مهار رشد هر یک از عصاره‌ها محاسبه گردید (Casey et al., 2004):

$$\text{درصد مهار رشد} = \frac{(O-E)}{O} \times 100$$

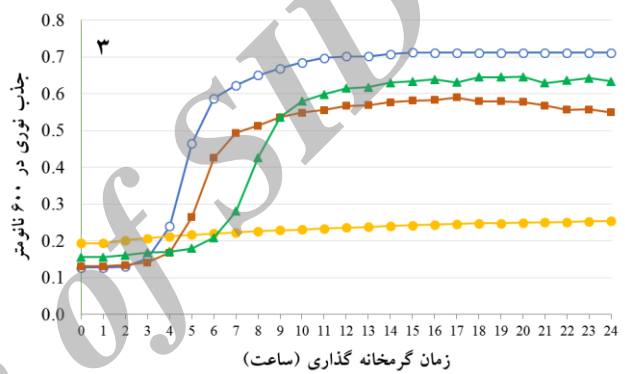
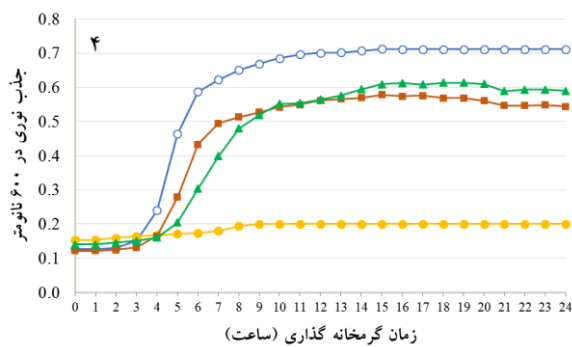
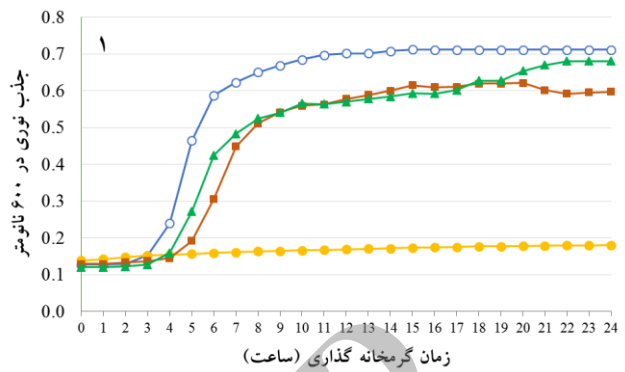
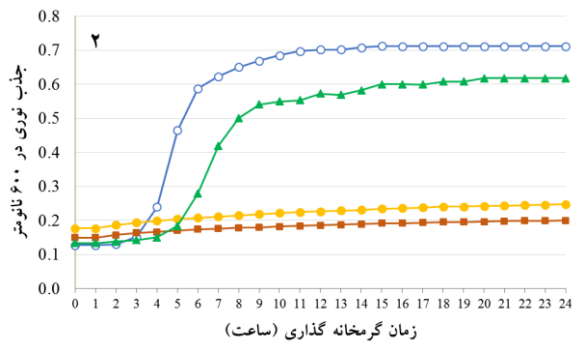
O = جذب نوری کنترل مثبت در ساعت ۲۴ منهای جذب در ساعت صفر



نمودار (۱)- اثر غلظت‌های مختلف عصاره استونی برگ چهار رقم زیتون بر مهار رشد باکتری باسیلوس سرئوس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس. ۱- رقم دزفول، ۲- رقم روغنی، ۳- رقم زرد، ۴- رقم شیراز. کنترل (○)، غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (▲)، غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (■) و غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (●).

میلی‌لیتر فقط رقم روغنی قادر به مهار رشد باکتری بود (نمودار ۲).

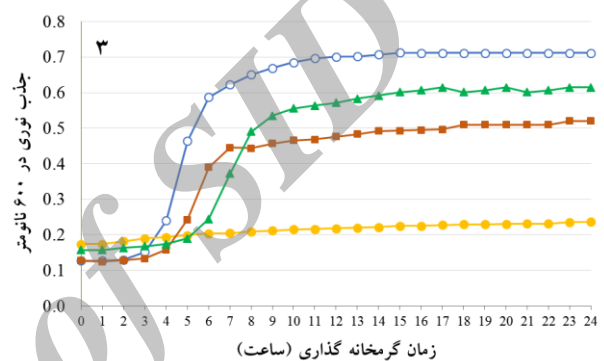
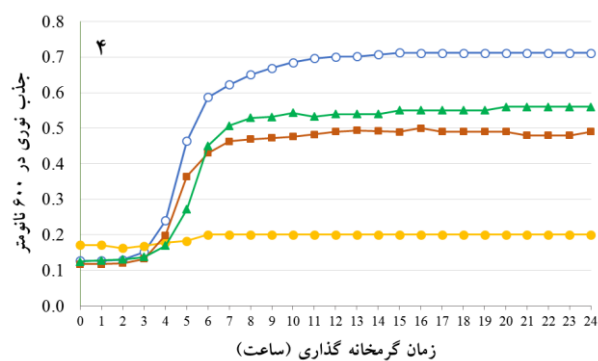
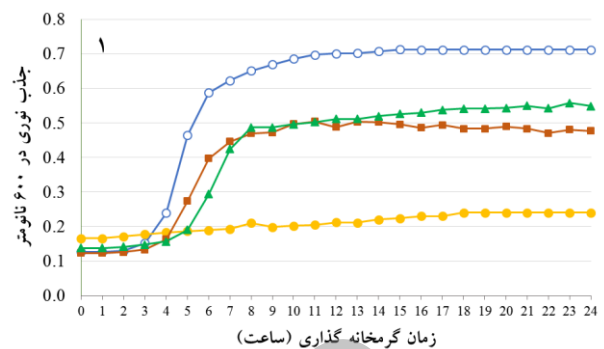
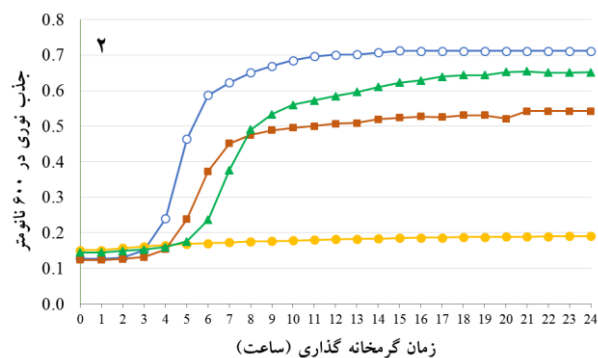
عصاره‌های متانولی برگ هر چهار رقم زیتون در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر رشد باکتری را به‌طور کامل مهار نموده است ولی در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در



نمودار (۲)- اثر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی برگ چهار رقم زیتون بر مهار رشد باکتری باسیلوس سرئوس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس. ۱- رقم دزفول، ۲- رقم روغنی، ۳- رقم زرد، ۴- رقم شیراز. کنترل (○)، غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (▲)، غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (■) و غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (●).

از چهار رقم مورد بررسی اثر مهاری قابل توجهی نداشتند.

بر اساس نتایج نمودار (۳)، عصاره اتانولی فقط در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر قادر به مهار رشد باسیلوس سرئوس بود و در غلظت‌های کمتر هیچ‌کدام



نمودار (۳)- اثر غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی برگ چهار رقم زیتون بر مهار رشد باکتری باسیلوس سرئوس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس. ۱- رقم دزفول، ۲- رقم روغنی، ۳- رقم زرد، ۴- رقم شیراز. کنترل (○)، غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (▲)، غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (■) و غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (●).

میلی‌لیتر دیده نشد ($p > 0/05$). اما در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رقم روغنی به طور معنی‌داری درصد مهار رشد بیشتری ($91/3 \pm 1/0$) در مقایسه با ارقام دیگر عصاره متانولی از خود نشان داد ($p < 0/05$). در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی رقم دزفول به طور معنی‌داری ($p < 0/05$) از بقیه ارقام درصد مهار رشد کمتری ($3/1 \pm 2/5$) را نشان داد. درصد مهار رشد عصاره اتانولی رقم روغنی در غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به طور معنی‌داری ($p < 0/05$) کمتر از عصاره اتانولی ارقام دیگر بود ($4/0 \pm 9/3$) ولی در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، رقم

مطابق نتایج ارائه شده در جدول (۱)، در تمامی نمونه‌های مورد بررسی با افزایش غلظت عصاره‌ها فعالیت ضد میکروبی افزایش یافت. تفاوت آماری معنی‌داری بین درصد مهار رشد عصاره‌های استونی ارقام مورد بررسی در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده نشد ($p > 0/05$). اما غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره استونی رقم دزفول به طور معنی‌داری ($p < 0/05$) درصد مهار رشد کمتری ($6/3 \pm 7/1$) نسبت به عصاره استونی ارقام دیگر داشت. تفاوت آماری معنی‌داری بین درصد مهار رشد عصاره‌های متانولی ارقام مورد بررسی در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر

روغنی با درصد مهار ۹۱/۳ و ۸۷/۸ در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بهترین اثر ضد میکروبی را بر باسیلوس سرئوس داشت.

دزفول به طور معنی‌داری ($p < 0/05$) درصد مهار رشد کمتری ($11/0 \pm 79/0$) را نشان داد. از نتایج به دست آمده می‌توان چنین نتیجه گرفت که نسبت به دیگر ارقام مورد بررسی، عصاره متانولی رقم

جدول (۱) - درصد مهار رشد غلظت‌های مختلف عصاره‌های استونی، متانولی و اتانولی برگ چهار رقم زیتون بر باکتری باسیلوس سرئوس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس

رقم زیتون	غلظت عصاره* (mg/ml)			نوع عصاره
	۲۰	۱۰	۵	
دزفول	$88/0 \pm 2/8^a$	$42/7 \pm 7/5^a$	$6/3 \pm 7/1^a$	استونی
روغنی	$90/7 \pm 1/4^a$	$37/5 \pm 2/2^a$	$19/5 \pm 7/1^b$	
زرد	$90/2 \pm 0/3^a$	$37/7 \pm 4/4^a$	$32/1 \pm 2/1^c$	
شیراز	$88/9 \pm 0/6^a$	$35/3 \pm 0/3^a$	$29/0 \pm 1/7^c$	
دزفول	$92/9 \pm 0/2^a$	$19/2 \pm 0/3^a$	$3/1 \pm 2/5^a$	متانولی
روغنی	$87/8 \pm 0/5^a$	$91/3 \pm 0/1^b$	$19/6 \pm 2/6^b$	
زرد	$89/7 \pm 0/9^a$	$27/6 \pm 1/0^c$	$17/8 \pm 2/7^b$	
شیراز	$91/3 \pm 0/4^a$	$24/7 \pm 0/5^c$	$17/2 \pm 1/9^b$	
دزفول	$79/0 \pm 11/0^a$	$39/2 \pm 5/8^a$	$29/1 \pm 8/5^a$	اتانولی
روغنی	$93/1 \pm 0/9^b$	$22/6 \pm 3/1^b$	$9/3 \pm 4/0^b$	
زرد	$89/2 \pm 0/3^b$	$37/2 \pm 0/2^a$	$25/2 \pm 0/3^a$	
شیراز	$94/8 \pm 0/7^b$	$35/2 \pm 2/9^a$	$28/4 \pm 3/1^a$	

* حروف غیرمشابه در هر ستون و هر نوع عصاره نشانگر تفاوت آماری معنی‌دار ($P < 0/05$) می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

هستند. برگ‌های زیتون یک منبع طبیعی غنی از ترکیبات فنولی می‌باشند که اثرات ضد میکروبی آن‌ها در تحقیقات تأیید شده‌اند. لی و همکاران در مطالعه‌ای بیان داشتند که عصاره برگ زیتون می‌تواند به‌عنوان یک افزودنی

نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که عصاره برگ ارقام مختلف زیتون استخراج شده با حلال‌های متفاوت دارای فعالیت ضدباکتریایی متفاوتی

بر میزان ترکیبات فنولی و هم‌چنین ویژگی‌های ضد میکروبی عصاره‌ها اثر دارد (Korukluoglu et al., 2010). عزیزاللهی علی‌آبادی و همکاران اثر ضد میکروبی عصاره آبی برگ زیتون را بر مهار رشد استافیلوکوکوس آرنئوس، باسیلوس سرئوس، سالمونلا تیفی موریوم، اشریشیا کولای و کلبسیلا نومونیا مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها بیان داشتند که عصاره آبی بیشترین اثر را در مهار رشد سالمونلا تیفی موریوم دارد (Azizollahi Aliabadi et al., 2012). در مطالعه دیگری رفیعی و همکاران ضمن تأیید خاصیت ضد میکروبی عصاره برگ زیتون رقم زراعی میشن نشان دادند که روش استخراج و نوع حلال بر میزان ترکیبات فنولی موجود در عصاره و در نتیجه اثر ضد میکروبی آن تأثیر دارد. در مطالعه آن‌ها عصاره متانولی استخراج شده به کمک مایکروویو بیشترین میزان ترکیبات فنولی و کمترین غلظت کشندگی در برابر اشریشیا کولای و استافیلوکوکوس آرنئوس را به خود اختصاص داد (رفیعی و همکاران، ۱۳۹۱). رفیعی و همکاران در مطالعه دیگری بیشترین فعالیت ضد میکروبی بین ارقام کرونایکی، روغنی و میشن را مربوط به رقم کرونایکی گزارش کردند (رفیعی و همکاران، ۱۳۸۹). در مطالعه اخیر عصاره متانولی رقم روغنی نسبت به دیگر ارقام مورد بررسی بیشترین اثر ضد میکروبی را بر باسیلوس سرئوس نشان داد. به علاوه، تفاوت‌هایی که در نتایج این پژوهش در مهار رشد باکتری به وسیله عصاره‌های مورد بررسی در مقایسه با مطالعات دیگر موجود است می‌تواند به علت تفاوت در غلظت عصاره‌های مورد مطالعه، ارقام زیتون، روش استخراج عصاره‌ها، نوع

غذایی فراسودمند و منبع بسیار خوبی از ترکیبات فنولی مطرح باشد که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی قابل توجهی است. نتایج حاصل از تحقیق آن‌ها نشان داد که اُلئورپین (Oleuropein) موجود در برگ زیتون اثر مهاری قوی بر رشد باکتری سالمونلا انتریتیدیس دارد. آن‌ها گزارش کردند که اسید کافئیک موجود در عصاره برگ زیتون به ترتیب اثر مهاری خوبی بر رشد باسیلوس سرئوس، اشریشیا کولای و سالمونلا انتریتیدیس دارد (Lee et al., 2009). مارکین و همکاران در مطالعه‌ای اثر ضد میکروبی عصاره آبی برگ زیتون را در شرایط آزمایشگاهی بر مهار رشد چهار باکتری باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس آرنئوس، کلبسیلا نومونیا و سودوموناس آئروژینوزا بررسی نمودند. در مطالعه آن‌ها همه باکتری‌های مورد مطالعه به غیر از باسیلوس سوبتیلیس در غلظت ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره، در مدت زمان سه ساعت از بین رفتند (Markin et al., 2003). در مطالعه حاضر میزان رشد باسیلوس سرئوس با افزایش غلظت عصاره برگ زیتون کاهش یافت. پری‌پرا و همکاران در مطالعه‌ای که روی اثر ضد میکروبی عصاره آبی برگ زیتون بر تعدادی باکتری گرم مثبت و گرم منفی انجام دادند، بیان داشتند که در نمونه‌های مورد بررسی با افزایش غلظت عصاره مهار رشد باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس آرنئوس افزایش یافت (Preira et al., 2007).

میزان ترکیبات فنولی موجود در برگ زیتون تحت تأثیر عوامل مختلفی از قبیل رقم زیتون، شرایط آب و هوایی، سن گیاه (Niaounakis and Halvadakis, 2006) و روش‌های استخراج (Fares et al., 2011) قرار می‌گیرد. نوع حلال به کار رفته جهت استخراج نیز

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد به خاطر حمایت‌های مالی این تحقیق اعلام می‌دارند. هم‌چنین از بنیاد جانبازان فارس به جهت تأمین برگ زیتون از باغ زیتون شیراز، جناب آقای مهندس جعفری مسئول طرح زیتون سازمان جهاد کشاورزی استان فارس به جهت شناسایی ارقام زیتون، جناب آقای دکتر محمدتقی گل‌مکانی استادیار محترم بخش صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز به جهت همکاری در عصاره‌گیری با میکروویو و جناب آقای دکتر سیدشهرام شکر فروش استاد محترم گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز به جهت همکاری در انجام آزمایش‌های میکروپلیت‌قردانی می‌گردد.

حلال مصرفی جهت استخراج عصاره‌ها و روش‌های بررسی مهار رشد باکتری‌ها باشد. در این مطالعه، با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت، عصاره برگ زیتون ارقام مورد بررسی اثر ضدباکتریایی بر مهار رشد باکتری باسیلوس سرئوس داشتند. بنابراین با توجه به این‌که برگ زیتون در تمامی فصول سال به آسانی در دسترس است و در ایران به شکل صنعتی استفاده دارویی و خوراکی ندارد، می‌توان از ارقام مختلف آن برای تهیه عصاره غنی از ترکیبات فنولی جهت استفاده به‌عنوان یک نگه‌دارنده طبیعی در صنایع غذایی و یک ترکیب ضد میکروبی طبیعی در کرم‌ها، پمادها و دیگر داروها بهره جست.

منابع

- رفیعی، زهرا؛ جعفری، سیدمهدی؛ اعلمی، مهران و خمیری، مرتضی (۱۳۹۱). ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره برگ زیتون (*Olea Europaea L.*) رقم زراعی میشن به روش الیزا. فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، دوره ۲۸، شماره ۲، صفحات: ۲۹۲-۲۸۰.
- رفیعی، زهرا؛ جعفری، سیدمهدی؛ خمیری، مرتضی و اعلمی، مهران (۱۳۸۹). تاثیر وارپته و روش استخراج بر ویژگیهای آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره برگ‌های زیتون. نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، دوره ۶، شماره ۴، صفحات: ۳۰۷-۲۹۷.
- مهدی‌زاده، تورج و رضوی‌روحانی، سیدمهدی (۱۳۷۸). بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره روغن‌های اسانسی سه نوع پیاز مختلف بر روی باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس و اشیرشیا کلی. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. دوره ۱۵، شماره ۲، صفحات: ۱۵۴-۱۴۷.
- Aytul, K.K. (2010). Antibacterial and antioxidant activities of olive leaf extract and its food applications. Turkey, MSc. Thesis, Graduate School of Engineering and Sciences of Izmir Institute of Technology.
- Azizollahi Aliabadi, M., Kazemi Darsanaki, R., Laleh Rokhi, M., Nourbakhsh, M. and Raeisi, G. (2012). Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract *Annals of Biological Research*, 3(8): 4189-4191.

- Brahmi, F., Mechri, B., Dabbou, S., Dhibi, M. and Hammami, M. (2012). The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. *Industrial Crops and Products*, 38: 146-152.
- Casey, J., O'Clairigh, C., Walsh, P. and O'Shea, D. (2004). Development of a robust microtiter plate-based assay method for assessment of bioactivity. *Journal of microbiological methods*, 58: 327-334.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2006). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard*. 7thed. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Fares, R., Bazzi, S., Baydoun, S.E. and Abdel-Massih, R.M. (2011). The antioxidant and anti-proliferative activity of the lebanese *olea europaea* extract. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66: 58-63.
- Kiritsakis, K., Kontominas, M.G., Kontogiorgis, C., Hadjipavlou-Litina, D., Moustakas, A. and Kiritsakis, A. (2010). Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from Greek olive cultivars. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87: 369-376.
- Korukluoglu, M., Sahan, Y., Yigit, A., Ozer, E.T. and Gucer, S. (2010). Antibacterial activity and chemical constitutions of *olea europaea* L. leaf extracts. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34 (3): 383-396.
- Lee, O.H., Lee, B.Y., Lee, J., Lee, H.B., Son, J.Y., Park, C.S., *et al.* (2009). Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Journal of Bioresource Technology*, 100(23): 6107-6113.
- Markin, D., Duek, L. and Berdicevsky, I. (2003). *In vitro* antimicrobial activity of olive leaves: Blackwell Publishing Ltd. *Mycoses*, 46: 132-136.
- Niaounakis, M. and Halvadakis, C.P. (2006). Olive processing waste management: literature review and patent survey. 2nd Edition, Elsevier, London, pp.54-61.
- Noormohammadi, Z., Trujillo, I., Belaj, A., Ataieid, S. and Hosseini-Mazinand, M. (2014). Genetic structure of Iranian olive cultivars and their relationship with Mediterranean's cultivars revealed by SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 178: 175-183.
- Oonmetta-aree, J., Suzuki, T., Gasalucka, P. and Eumkebc, G. (2006). Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT- Food Science and Technology*, 39: 1214-1220.
- Owen, R.W., Haubner, R., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W.E., Spiegelhalder, B., *et al.* (2003). Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and Chemical Toxicology*, 41: 703-717.
- Pan, X., Niu, G. and Liu, H. (2003). Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing*, 42: 129-133.
- Pereira, A.P., Ferreira, I.C.F.R., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P.B., Seabra, R., *et al.* (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Journal of Molecules*, 12: 1153-1162.
- Rahmanian, N., Jafari, S.M. and Wani, T.A. (2015). Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. *Trends in Food Science & Technology*, 42(2): 150-172.
- Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A. and Granum, P.E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *Journal of Federation of European Microbiological Societies*, 32: 579-606.
- Sudjana, A.N., D'Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., *et al.* (2009). Antibacterial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33: 461-463.
- Zafar, E. and Filiz, I. (2010). The importance and potential uses of olive leaves. *Food Reviews International*, 26: 319-334.