Archive of SID

مطالعه اثر ضدمیکروبی عصاره آبی برگ گردو و مقایسه روش‌های دیسک دیفیوژن و چاهک‌گذاری

افشین علی محمدی[1]، افشین جوادی[2*]، الهام یغما[3]

۱. عضو انجمن علمی بهداشت مواد غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲. دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۳. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

[*]نویسنده مسئول: *Javadi@iaut.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۵

چکیده

امروزه ایمنی غذا یک مبحث مهم سلامت عمومی جامعه است. یکی از روش‌های تولید غذای سالم استفاده از مواد با ساختار طبیعی است. استفاده از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی به‌عنوان افزودنی‌های ضد باکتری و ضد قارچی یکی از این روش‌ها می‌باشد. ترکیبات ضدمیکروبی به دست آمده از گیاهان با مکانیسم‌هایی متفاوت از آنتی بیوتیک‌ها، باکتری‌ها را حذف می‌کنند که در این میان اثرات مؤثر گردو و اجزای آن قابل توجه است. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر ضد میکروبی عصاره آبی برگ گردو روی *استافیلوکوکوس آرئوس* و *اشریشیاکولای*، تعیین غلظت بهینه عصاره و مقایسه حساسیت هر کدام از باکتری‌ها در مقابل عصاره و تعیین حساس‌ترین روش مطالعه می‌باشد.جهت بررسی در مطالعه حاضر ابتدا عصاره‌گیری از برگ‌های گردو انجام شد و سپس خاصیت ضدمیکروبی عصاره و غلظت‌های بهینه از آن با استفاده از روش‌های دیسک و چاهک بر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* و *اشریشیاکولای* مورد سنجش قرار گرفت. بر اساس نتایج به‌دست آمده عصاره برگ گردو در غلظت‌های ۱۲/۵ درصد به بالا دارای خاصیت ضدمیکروبی بوده و با فزایش یافتن غلظت عصاره میزان رشد باکتری به‌صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد ($p<۰/۰۱$). بیشترین میزان هاله عدم رشد در هر دو روش مربوطه به نمونه شاهد است که حاوی دیسک کلرامفنیکول بر روی باکتری *اشریشیاکولای* می‌باشد (۲۴ میلی‌متر) و بعد از نمونه شاهد نیز نمونه‌ی حاوی ۵۰ درصد عصاره بر روی باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* در روش چاهک با ۱۳/۳۳ میلی‌متر و در روش دیسک نیز نمونه حاوی ۵۰ درصد عصاره بر روی باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* بیشترین هاله عدم رشد را نسبت به بقیه نمونه‌ها دارند (۱۱ میلی‌متر). در واقع باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* حساسیت بیشتری به عصاره برگ گردو نسبت به باکتری *اشریشیاکولای* در هر دو روش بکار رفته نشان داد. ولی در میان دو روش مورد بررسی حساسیت نمونه‌های روش چاهک بیشتر از روش دیسک‌گذاری بود. نتیجه کلی نشان می‌دهد در میان نمونه‌ها بعد از نمونه شاهد (دیسک کلرامفنیکول بر روی باکتری *اشریشیاکولای*) نمونه حاوی ۵۰ درصد عصاره برگ گردو بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین خاصیت ضدمیکروبی را در میان سایر نمونه‌ها دارند.

واژگان کلیدی: عصاره، برگ گردو، دیسک دیفیوژن، چاهک‌گذاری.

مقدمه

در قرن حاضر، حفظ ایمنی ماده غذایی و کیفیت آن در دوره ماندگاری امری است که نه تنها توجه متخصصین صنعت غذا و مسئولین سلامت کشورها را به خود جلب کرده، بلکه بی‌توجهی یا کم‌توجهی به آن می‌تواند صدمات جبران ناپذیری به جامعه وارد کند. امروزه بیماری های ناشی از مصرف غذاهای آلوده در همه جای دنیا حتی در کشورهای پیشرفته ای چون آمریکا هم یک مشکل اساسی به شمار می‌رود. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی بیماری‌های ناشی از مصرف غذا و آب آلوده، سالانه جان میلیون نفر از این / میلیون نفر در جهان را می‌گیرد که قربانیان را کودکان تشکیل می دهند (Burt, 2004). استفاده از داروها و درمان‌های گیاهی و به‌طور کلی فرآورده‌های طبیعی به ویژه در طی سال‌های اخیر رو به افزایش بوده و مهم ترین علت آن، اثبات اثرات مخرب و جانبی داروهای شیمیایی و ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی که کره زمین را تهدید می‌کند، بوده است. مسئله و دغدغه در درمان آنتی‌بیوتیکی، مقاومت دارویی و پس از آن عوارض جانبی می‌باشد. بر این اساس پس از انجام تحقیقات بر روی اثرات گیاهان، بشر اقدام به بهره‌گیری از آن‌ها در

www.SID.ir

این مورد نموده است (Blumenthal et al., 2000). بیش تر باکتری‌ها دارای مکانیسم‌های پیچیده مقاومت دارویی هستند که به عنوان یک مشکل بزرگ مطرح می‌باشند. در واقع این میکروارگانیسم‌ها باکتری‌های فرصت طلب هستند و در بیمارانی که از لحاظ سیستم ایمنی دچار نقص می‌باشند باعث ایجاد عفونت های حاد می شود. با توجه به اینکه حدود ۰۶ درصد از داروهای ضدمیکروبی که در بازار موجود یا در حال آزمایش‌اند، منشا طبیعی دارند توجه گسترده‌ای به این مواد جلب شده است (جامه‌دار و همکاران، ۱۳۹۳). از جمله ترکیبات طبیعی که می‌توانند به‌عنوان نگهدارنده در مواد غذایی بکار روند اسانس‌های گیاهی هستند. عصاره و اسانس‌های گیاهی بدست آمده از گیاهان معطر دارای خاصیت ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضداکسایشی و ضدسرطانی بوده و قادر هستند رشد پاتوژن‌ها و تولید سم توسط ریزسازواره‌ها را کنترل کنند (Tajkarim et al., 2010). امروزه با پیشرفت های حاصل در شیمی آلی و تحولات چشمگیر در روش های استخراج، تخلیص و تعیین ساختمان ترکیبات طبیعی گیاهان، ارزش داروهای حاصل از منابع گیاهی روز به روز آشکارتر شده است (Valnet, 2002). از طرفی ایران به علت تنوع آب و هوایی و وسعت زیاد دارای طیف وسیعی از گیاهان دارویی است که پایه و اساس طب سنتی کشور نیز می‌باشد (قاسمی دهکردی، ۱۳۸۲). مسئله مهم دیگر در خصوص این ترکیبات، نیاز بدن به ترکیبات آنتی‌اکسیدان است، زیرا آنتی‌اکسیدان‌ها تریباتی هستند که مانع فعالیت رادیکال‌های آزاد شده و یا سبب حذف آن‌ها می‌شوندو سلول‌های بدن را از اثرات مخرب این ترکیبات مصون نگه می‌دارند، از این رو با روند پیری و ابتلا به بیماری‌های مختلف مبارزه می‌کنند. این مواد می‌توانند از تشکیل رادیکال‌های آزاد در بدن جلوگیری کنند و در صورت تشکیل، تأثیر آن‌ها را بر بدن کاهش دهند. این ترکیبات از یک طرف باعث کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی و سکته می‌شوند و از طرف دیگر از پیشرفت سرطان‌ها که موجب آسیب به DNA می‌شوند جلوگیری می‌کنند (Noguchi and Niki, 2000).

متخصصین عفونی تمایل زیادی به استفاده از داروهای با منشأ گیاهی جهت درمان عفونت‌ها دارند، زیرا عوارض این داروها در مقایسه با داروهای شیمیایی بطور قابل ملاحظه‌ای پایین است (Avijgan et al., 2006). در این میان برخی از گیاهان مانند برگ گردو، بومادران و افسنطین در طب سنتی مصرف فراوان دارند که مطالعات متعددی پیرامون خواص ضدمیکروبی آن‌ها صورت گرفته است. گردو از گروه خانواده گیاهی *Juglandaceae* دارای ۲۱ گونه می‌باشد که همگی خزان‌دار و دارای میوه خوراکی هستند. از برگ و پوست میوه درخت گردو در طب سنتی برای اثرات دارویی گوناگون و مفیدی که دارد مثل داروی قابض و تجزیه کننده بافت‌های شاخی، ضد اسهال و ضد کرم پهن و تصفیه کننده مقوی، ضدقارچ و کاهش دهنده قند خون و غیره استفاده می‌کنند (عزیزشفا و همکاران، ۱۳۹۵). برگ گردو دارای ترکیبات با خاصیت ضدقارچی است. پوسته سبز میوه گردو دارای ترکیب‌ها و اثراتی مشابه با برگ است. فعالیت ضدمیکروبی عصاره برگ و پوست سبز میوه گردو روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و هم‌چنین قارچ‌های *میکروسپورم کانیس*، *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس*، *اپیدرمو فایتون فلوکوزوم*، *آسپرژیلوس نایجر* و *کاندیدا آلبیکنس* اثبات شده است (Santos-Filho et al., 2008; INS, No. 5075). ژوگلون ترکیبی نفت وکینونی است که در برگ تازه و پوست سبز میوه گردو یافت می شود و مهم ترین ترکیب ضدمیکروبی گردو می‌باشد. ژوگلون پیش‌ساز اکسی تتراسایکلین است (عزیزشفا و همکاران، ۱۳۹۵؛ Kamkar et al., 2004). تانین‌ها نیز گروهی از ترکیبات فنولی هستند که در قسمت‌های مختلف گیاه

www.SID.ir

Archive of SID

ممکن است یافت شوند و در برگ گردو نیز وجود دارند. اثر ضدمیکروبی آنها را مربوط به مهار قدرت چسبندگی میکروب و هم چنین مهار فعالیت آنزیمی و پروتئین های ترانسپورتر می‌دانند (Ya et al., 1988; Scalbert, 1991).

گسترش روز افزون سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلاتیفی موریوم* مقاوم به آنتی‌بیوتیک، از معضلاتی است که امروزه پزشکان با آن مواجه هستند و به همین علت روز به روز تعداد آنتی‌بیوتیک‌های موثر و در دسترس برای درمان این عفونت‌ها کاهش می‌یابد *استافیلوکوکوس اورئوس*، به دلیل قدرت بیماری‌زایی بالقوه و مقاومت روز افزون در برابر داروهای ضد میکروبی به یکی از مشکلات بهداشتی مهم در جهان تبدیل شده است. بنابراین جلوگیری از بروز عفونت‌های ناشی از این باکتری و ریشه یابی کانون‌های انتشار آن در بیمارستان‌ها از مسائل ضروری است (Orrt and Land, 2006).

از شروع قرن ۲۱ میلادی با توجه به اثرات جانبی آنتی-بیوتیک‌های تجاری و مقاومت‌های باکتریایی در برابر آنها، توجه به طب سنتی و استفاده از گیاهان دارویی که یکی از منابع با ارزش در پزشکی به شمار می‌آیند، افزایش یافت. از طرفی در پی گسترش بیماری‌های عفونی، شناسایی تعداد گیاهان دارویی و خالص سازی ترکیبات موثره آنها در درمان بیماری‌ها می‌تواند راه‌های درمانی جدیدی علیه بیماری‌های عفونی پیشنهاد دهد (قاسمی دهکردی، ۱۳۸۲).

بر طبق تعریف سازمان بهداشت جهانی (WHO) به بیماری‌های عفونی و یا مسمومیت‌هایی که در اثر ورود عواملی ازطریق غذا به داخل بدن رخ می‌دهند، بیماری‌های غذازاد می‌گویند. اگرچه برآورد کردن میزان بروز این بیماری‌ها در جهان مشکل است ولی گزارش شده است که فقط در سال ۲۰۰۵، نزدیک به ۱/۸ میلیون نفر در اثر اسهال جان خود را ازدست داده‌اند و قسمت عمده‌ای از این موارد را می توان به آلودگی غذا و آب نسبت داد. بر این اساس هدف از مطالعه حاضر بررسی خاصیت ضدمیکروبی عصاره برگ گردو بر روی باکتری‌های *اشریشیاکولای* و *استافیلوکوکوس آرئوس* و سنجش میزان غلظت بهینه عصاره مصرفی جهت نشان دادن خاصیت ضدمیکروبی آن می‌باشد. تحقیق حاضر یک مطالعه کاربردی است که به دنبال مطالعات قبلی در محل آزمایشگاه‌های دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز انجام شده و در آن از دو روش دیسک‌گذاری و روش چاهک استفاده شد که روش چاهک حساسیت بیشتری نسبت به روش دیسک گذاری دارد.

روش کار

روش تهیه عصاره

بعد از جمع‌آوری برگ درخت گردو از باغات اطراف تبریز عصاره‌گیری انجام گرفت. به این صورت که ابتدا برگ‌های جمع‌آوری شده به مدت یک هفته در دمای اتاق خشک و سپس درون آسیاب خرد گردید تا یکنواخت شده و به صورت پودر درآیند. بعد از این مراحل به نسبت ۱ به ۵ آب مقطر استریل به عنوان حلال آبی به آن اضافه شد و به مدت ۳ روز در دمای معمولی اتاق و تاریک به حال خود گذاشته شد. سپس محلول حاصله ابتدا توسط توری با روزنه‌های ریز و در مرحله بعد از درون کاغذ واتمن شماره یک عبور داده شد تا تمام اجزا برگ گرفته شود. در مرحله بعدی ماده حاصله که به رنگ تیره بود درون انکوباتور ۳۷ درجه گذاشته شد تا آب آن تبخیر گردد. در نهایت عصاره باقی مانده به صورت ماده ای با ویسکوزیته بالا شبیه قیر باقی ماند. وزن خالص عصاره تهیه شده از ۳۰ گرم برگ درخت گردو۵/۷ گرم بود که به همان مقدار محلول DMSO (Dimethyl sulfoxide) ۵ درصد (دی متیل سولفو اکساید) به عنوان حلال آبی به آن اضافه شد و سپس از فیلتر ۰/۴۵ استریل شدند بدین ترتیب عصاره ۵۰ درصد از عصاره تهیه گردید (Murray et al., 1995). بازده عصاره گیری از ۳۰

www.SID.ir

ArcJFM ID

گرم برگ درخت گردو ۱۹ درصد بود که غلظت ۵۰ درصد آن حاوی ۵/۷ میلی‌گرم عصاره و ۵/۷ میلی‌لیتر محلول DMSO ۵ درصد بود.

روش های سنجش خاصیت ضدمیکروبی عصاره

روش دیسک

برای تهیه دیسک رقت‌های مختلفی از عصاره برگ گردو تهیه گردید و دیسک های بلانک به مدت یک ساعت در عصاره قرار گرفت تا عصاره جذب دیسک بلانک شود بعد از این اعمال دیسک‌ها در محیط استریل و خشک جهت بررسی اثر ضد میکروبی در داخل ویال‌های استریل نگه داری شد در آزمایش انتی بیوگرام پس از گذاشتن دیسک‌های حاوی عصاره برگ گردو بر روی محیط کشت قطر هاله عدم رشد با استفاده از خط‌کش میلی متری *استافیلو کوکوس اُرئوس* (*Staphylococcus aureus* PTCC 1112) و *اشریشیا کولای* (*Escherichia coli* PTCC 1270) اندازه گیری شد و برای بررسی حساسیت سویه‌ها از دیسک‌های آنتی‌بیوگرام کلرامفینیکول به عنوان کنترل استفاده گردید.

رقت‌سازی در ۶ لوله انجام گرفت، به‌طوری که ابتدا درون لوله اول ۰/۵ سی سی عصاره خالص و درون لوله دوم تا لوله آخر ۰/۵ سی سی محلول DMSO ۵ درصد و ۰/۵ سی سی از عصاره در لوله دوم تهیه شد. از لوله دوم ۰/۵ سی سی برداشته در لوله سوم از لوله سوم به چهارم و الی آخر و از لوله آخر نیم سی سی برداشته شد. به این ترتیب رقت‌سازی انجام شده و رقت‌های ۵۰ درصد، ۲۵ درصد، ۱۲/۵ درصد، ۶/۲۵ درصد، ۳/۱۲ درصد و ۱/۵۶ درصد به ترتیب از لوله اول تا ششم بدست آمد. سپس به هر کدام از این رقت‌ها دیسک‌های بلانک فاقد هر گونه ماده اضافه شد تا عصاره‌ها با غلظت‌های متفاوت جذب دیسک‌ها گردند و در پلیت‌های جداگانه ریخته شد و رطوبت دیسک‌ها جذب گردید سپس دیسک‌ها را خارج گردید و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا خشک گردند. همزمان محیط کشت مولر هینتون آگار از قبل تهیه گردیده و بعد از استریل کردن درون اتوکلاو درون پلیت‌هایی ریخته شد. سپس از سوسپانسیون باکتریایی کشت ۲۴ ساعته قبل که نیم مک فارلند بود روی این محیط ها کشت داده شد. بعد از خشک شدن رطوبت سطح محیط کشت و خشک شدن دیسک‌ها به صورت کامل روی محیط کشت به ترتیب رقت قرار داده شد. و بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد هاله های عدم رشد در اطراف هر دیسک را با خط کش میلیمتری اندازه‌گیری و ثبت گردید.

روش چاهک

برای تعیین قطر هاله‌های عدم رشد، چاهک‌هایی به حجم ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط مولر هپتون آگار به قطر ۴ میلی متر با استفاده از سرسمپلر استریل که وسیله قیچی استریل از مکان مورد نظر که اندازه ۴ میلی‌لیتر را بدست میداد بریده شد، حفر گردید و همچنین برای غلظت‌های مختلف چاهک‌های مختلفی حفر گردید و با حفظ شرایط استاندارد در انجام تست‌های حساسیتی از سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند هر سویه به طور جداگانه به روش کشت سفره‌ای بر روی محیط، کشت داده شد و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون قطر هاله عدم رشد به طور دقیق با استفاده از خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد. از عصاره رقت‌های سریالی همانند کار انجام شده در روش دیسک تهیه گردید و همزمان بعد از تهیه محیط کشت مولر هینتون اگار و استریل کردن آن محیط کشت درون پلیت‌هایی ریخته شد تا ببندند. سپس از سوسپانسیون باکتریایی که قبلاً تهیه گردیده بود روی این محیط کشت‌ها، کشت داده شد. سپس در هر پلیت شش حفره به قطر ۴ میلی‌متر ایجاد گردید تا حجم ۳۰-۲۵ میکرولیتر از عصاره اضافه شود. سپس مقدار۳۰-۲۵ میکرولیتر از رقت‌های عصاره که تهیه گردیده بود درون گوده‌ها ریخته شد تا با محیط کشت

www.SID.ir

Archive of SID

هم سطح شود. بعد از گذشت حدود یک ساعت و جذب کامل عصاره محیط کشت‌ها به انکوباتور انتقال یافت. و در نهایت به مدت ۲۴-۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد هاله‌های عدم رشد باکتری در اطراف هر گوده با دقت با خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری و ثبت گردید.

تحلیل آماری

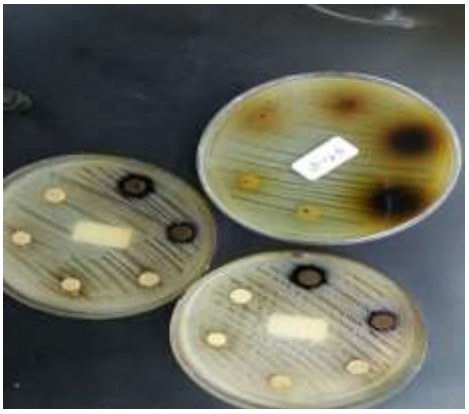
در بررسی حاضر تمامی نتایج حاصل از آزمون‌های چاهک‌گذاری و دیسک دیفیوژن با استفاده از طرح بلوک‌های کامل تصادفی، در سه تکرار توسط نرم‌افزار SPSS مورد جزیه و تحلیل قرار گرفتند و در ادامه نیز مقایسات میانگین با استفاده از آزمون دانکن بررسی شدند.

نتایج

روش دیسک

نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس تأثیر خاصیت ضد میکروبی عصاره به روش دیسک در جدول ۱ نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار روش مذکور در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد. نتایج مقایسه میانگین هاله عدم رشد باکتری با استفاده از روش دیسک در غلظت‌های‌های مختلف عصاره در شکل ۱ آورده شده است. بر اساس نتایج مقایسه میانگین افزودن عصاره میزان رشد باکتری را به‌صورت معنی‌داری کاهش می‌دهد. بیش ترین میزان عدم رشد مربوط به نمونه شاهد است که حاوی دیسک کلرامفنیکول بر روی باکتری *اشرشیاکولای* بوده و میزان عدم رشدی برابر ۲۴ میلی‌متر را نشان می‌دهد. سپس بیشترین میزان عدم رشد مربوط به نمونه‌ای است که عصاره ۵۰ درصد بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* دارد و مقداری برابر ۱۱ میلی‌متر هاله عدم رشد دارد. بعد از آن‌ها نیز نمونه حاوی عصاره ۵۰ درصد بر روی باکتری *اشرشیاکولای* و همچنین نمونه شاهد که حاوی دیسک کلرامفنیکول بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد میزان هاله عدم رشد بیشتری را نشان میدهند (۱۰ میلی‌متر). با کاهش غلظت عصاره شاهد رشد باکتری و کم شدن میزان هاله عدم رشد بودیم به گونه‌ای که کمترین مقدار هاله عدم رشد در هر دو باکتری را دارد. لازم به ذکر است که مقایسه مذکور در میان کل نمونه‌ها بدون احتساب نوع باکتری انجام شده است. در صورتی که مقایسه در میان باکتری‌ها به صورت مجزا انجام گیرد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین هاله عدم رشد را نشان می‌دهد. در *نتیجه* همانطور که مشاهده می‌شود با کم شدن میزان غلظت عصاره از میزان خاصیت ضدمیکروبی نمونه‌ها نیز کاسته شده است. چنانچه نمونه‌های ۱۲/۵ و ۶/۲۵ درصدی با میزان صفر میلی‌متر کمترین هاله عدم رشد و یا به عبارتی کمترین میزان خاصیت ضدمیکروبی را از خود نشان داد.

الف



ب

شکل ۱- هاله عدم رشد به روش دیسک دیفیوژون. الف) باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ب) باکتری *اشریشیا کولای*

www.SID.ir

جدول ۱- تجزیه واریانس بررسی میزان خواص ضدمیکروبی سطوح مختلف عصاره بر روی باکتری‌های *اشریشیاکولای*، *استافیلوکوکوس ارئوس* به روش چاهک‌گذاری و دیسک دیفیوژن

منابع تغییرات	درجات آزادی Df	میانگین مربعات (MC)	
		روش دیسک	روش چاهک
تکرار	۲	۰/۰۳۳^{ns}	۰/۷^{ns}
میزان عصاره با باکتری	۹	۱۷۴/۷۴۴**	۱۴۴/۲۲**
اشتباه آزمایشی	۱۸	۰/۰۳۳	۰/۲۹۳
ضریب تغییرات (CV)	-----	٪ ۲/۵۲	٪ ۵/۹۴

* و ns به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و عدم وجود اختلاف معنی‌دار

نمودار ۱- مقایسه میانگین هاله عدم رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکولای* در غلظت‌های مختلف عصاره برگ گردو با روش دیسک (حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد)

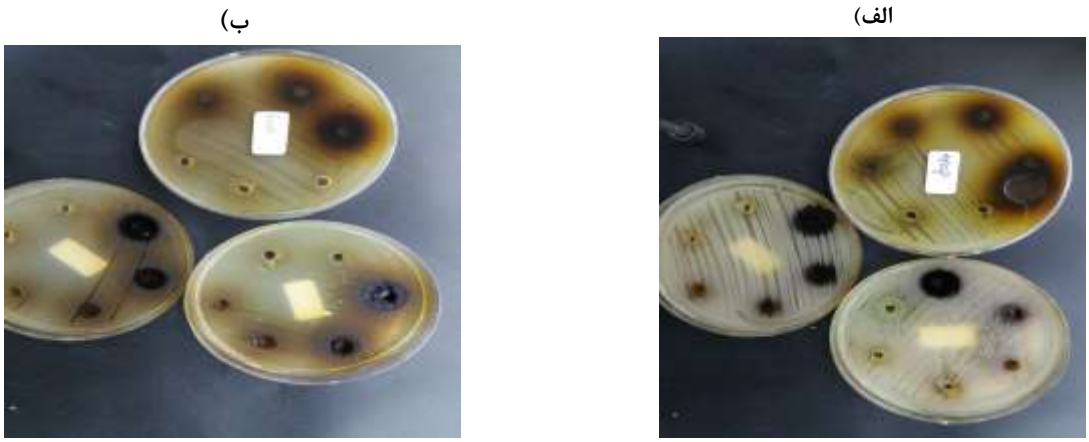
روش چاهک

نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس تأثیر خاصیت ضد میکروبی عصاره به روش چاهک در جدول ۱ نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار روش مذکور در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد نتایج مقایسه میانگین هاله عدم رشد باکتری با استفاده از روش چاهک در غلظت‌های‌های مختلف عصاره در نمودار ۲ آورده شده است. بیشترین میزان عدم رشد مربوط به نمونه شاهد است که حاوی دیسک کلرامفنیکول بر روی باکتری *اشرشیاکولای* بوده و میزان عدم رشدی برابر ۲۴ میلی‌متر را نشان می‌دهد. بعد از نمونه شاهد نمونه‌ای که غلظت عصاره ۵۰ درصد بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را دارد با ۱۳/۳۳ میلی‌متر، هاله عدم رشد بیشتری نسبت به بقیه نمونه‌ها دارند به گونه که این میزان عدم رشد حتی نسبت به نمونه حاوی دیسک کلرامفنیکول بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز بیشتر است. نمونه باکتریایی *اشرشیاکولای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* با مقدار ۶/۲۵ درصد عصاره کمترین مقدار هاله عدم رشد را دارد. لازم به ذکر است که این در صورتی است که مقایسه را در میان کل نمونه‌ها بدون احتساب نوع باکتری انجام دهیم در صورتی که در میان باکتری‌ها، *استافیلوکوکوس اورئوس* تا غلظت ۱۲/۵ درصد عصاره بیشترین عدم رشد را نسبت به *اشریشیاکولای* دارد. همانطور که مشاهده می‌شود با کم شدن میزان غلظت عصاره از میزان خاصیت ضدمیکروبی نمونه‌ها نیز کاسته شده است. چنانچه نمونه ۶/۲۵ درصدی عصاره هاله عدم رشدی نداشته و نمونه ۱۲/۵ درصد عصاره

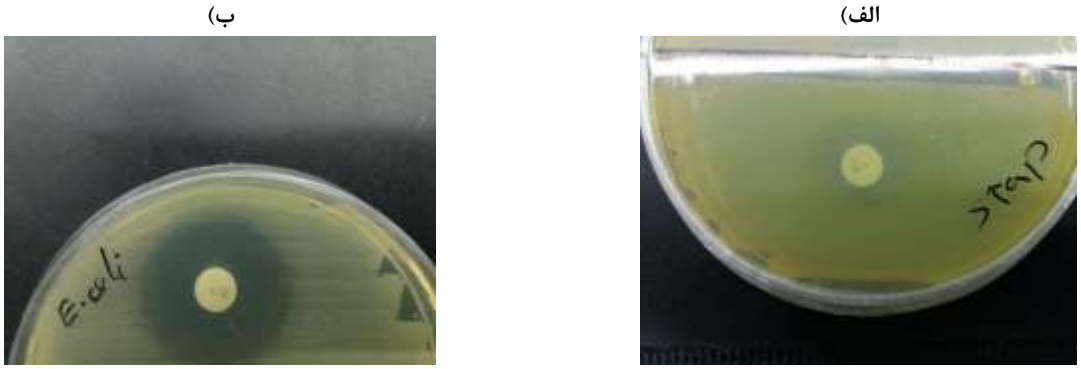
www.SID.ir

Archive of SID

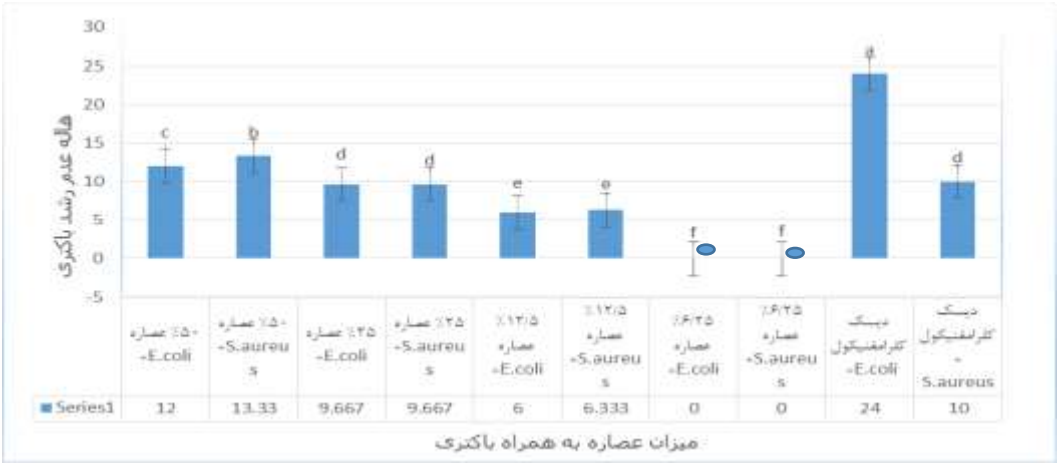
با میزان ۶ میلی متر نسبت به بقیه کمترین هاله عدم رشد را در باکتری *اشرشیاکولای* از خود نشان داد.



شکل ۲- هاله عدم رشد به روش چاهک. الف) باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ب) باکتری *اشریشیا کولای*



شکل ۳- هاله عدم رشد در دیسک کلرامفنیکول. الف) باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ب) باکتری *اشریشیا کولای*



نمودار ۲- مقایسه میانگین هاله عدم رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکولای* در غلظت‌های مختلف عصاره برگ گردو با روش چاهک‌گذاری (حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد)

به عنوان نتیجه کلی می‌توان به این مطلب اشاره کرد که در هر دو روش انجام شده باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به عصاره برگ گردو در مقایسه با باکتری *اشریشیاکولای* حساسیت بالایی داشته است به گونه‌ای که این حساسیت در غلظت ۵۰ درصد عصاره به اوج خود رسیده و هاله عدم رشد ۱۳/۳۳ را نشان داده است. اما در میان دو روش بررسی شده روش چاهک‌گذاری نسبت به روش دیسک‌دیفیوژن بیشترین حساسیت (هاله عدم رشد) را در میان نمونه‌ها نشان داد. تیمارهایی که در آنها غلظت کمتر عصاره بکار رفته

www.SID.ir

Arc JFM ID

است دلیل واضحی بر این ادعا می‌باشد. زیراکه در روش دیسک دیفیوژن از عصاره ۱۲/۵ به پایین عدم رشدی در هیچ کدام از باکتری‌ها مشاهده نشده است. در صورتیکه در روش چاهک‌گذاری در غلظت ۱۲/۵ درصد عصاره نیز هر دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکولای* هاله عدم رشدی برابر ۶/۳۳ و ۶ میلی‌متر را داشته‌اند که این نشان از حساسیت بالای روش چاهک‌گذاری نسبت به روس دیسک دیفیوژن را نشان می‌دهد.

بحث

متخصصین عفونی تمایل زیادی به استفاده از داروهای با منشأ گیاهی جهت درمان عفونت‌ها دارند، زیرا عوارض این داروها در مقایسه با داروهای شیمیایی طور قابل ملاحظه ای پایین است (Avijgan et al., 2006). در این میان برخی از گیاهان مانند برگ گردو، بومادران و افسنطین در طب سنتی مصرف فراوان دارند که مطالعات متعددی پیرامون خواص ضد میکروبی آنها صورت گرفته است. در میان گیاهان بومی ایران، برگ خشک گردو است که در مجموع تا ۷۳ گرم در هر کیلوگرم دارای ترکیبات فنولی می‌باشد و حدود ۶۳٪ از این ترکیبات فلاونون‌ها هستند. ترکیبات فنولی در بسیاری از گیاهان دیگر نیز وجود دارند و اثر ضد میکروبی آنها بستگی به محل و تعداد گروه‌های هیدروکسیل روی حلقه فنولی دارد و ادعا شده است که ارتباط مستقیمی بین تعداد گروه‌های هیدروکسیل و سمیت آنها روی میکروارگانیسم‌ها وجود دارد (Geissman, 1962). تانین‌ها نیز گروهی از ترکیبات فنولی هستند که در قسمت‌های مختلف گیاه ممکن است یافت شوند و در برگ گردو نیز وجود دارند. اثر ضدمیکروبی آنها را مربوط به مهار قدرت چسبندگی میکروب و همچنین مهار فعالیت آنزیمی و پروتئین‌های ترانسپورتر می دانند (Ya et al., 1988; Scalbert, 1991).

نتایج مطالعه شرافتی چالشتری و همکاران (۱۳۹۰) نشان داد که عصاره متانولی برگ درخت گردو بر رشد باکتری پروپیونی باکتریوم آکنه دارای اثر مهاری بود. در مطالات دیگری اثرات ضدمیکروبی عصاره برگ درخت گردو بر روی باکتری های گرم مثبت نظیر *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و باکتری‌های گرم منفی از جمله *اشریشیاکولای*، *پزودوموناس آیروژینوزا*، *کلبسیلا پنومونیا* صورت گرفته، اثرات ضدباکتریایی آن به اثبات رسیده است (Andrade, 2004; Pereiraa et al., 2007).

نائینی و همکاران در تحقیق به دست آمده خود گزارش دادند که بر اساس نتایج MIC به دست آمده از اثرات ضدمیکروبی گیاهان، می‌توان آنها را به سه دسته تقسیم بندی کرد. به طوری که گیاهانی با MIC ۵۰۰ µg/ml دارای ممانعت از رشد قوی، گیاهان با MIC بین ۱۵۰۰ - ۶۰۰ µg/ml دارای ممانعت از رشد متوسط و گیاهان دارای MIC ۱۶۰۰ µg/ml به بالا دارای ممانعت از رشد ضعیف طبقه بندی می‌شوند (Naeini et al., 2010).

در مطالعه حبیبیان دهکردی و همکاران (۱۳۹۲) که اثرات ضدباکتریایی عصاره الکلی مرزه بختیاری را بر باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد به روش‌های دیسک و چاهک‌گذاری و تعیین مقادیر MIC و MBC بررسی کردند به این نتیجه رسیدند که عصاره مرزه بختیاری علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* در این تحقیق ml/mg ۱/۵۶ و در مورد *اشریشیاکلی* برابر ml/mg ۳/۲۵ بود. نتایج جهت تعیین MBC نیز نشان داد که عصاره مرزه بختیاری در غلظت ml/mg ۱۲/۵ قادر به از بین بردن باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد. عصاره مرزه بختیاری در هیچ غلظتی قادر به از بین بردن باکتری *اشریشیا کلی* نبود و این باکتری در همه غلظت‌های مورد استفاده رشد کرد بنابراین MBC برای عصاره مرزه بختیاری بر علیه *اشریشیاکلی* به دست نیامد.

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین طبق بررسی‌های قربان محمدحنفی و همکاران (۱۳۹۱) نتایج حاکی از آن است که اسانس الکلی شیره بنه بر روی باکتری‌های *کلوستریدیوم اسپوروژنس*، *اشریشیاکولای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نه تنها خاصیت بازدارندگی داشته است، بلکه خاصیت ضد باکتریایی نیز دارند. با مطالعه اثرات ارگانولپتیک اسانس شیره بنه در غذا، از آن می‌توان به عنوان یک ماده محافظت کننده استفاده نمود.

همچنین تارا و همکاران فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی سیر را در برابر بعضی از باکتری‌های گرم منفی گزارش کرده است (Taura et al., 2004). نتایج به دست آمده از مطالعه سعیدی و همکاران نشان داد که سیر این قابلیت دارد که به عنوان یک داروی ضدمیکروبی به خصوص برای درمان بیماریهای ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد استفاده قرار بگیرد. هر چند آزمایش‌های کلینیکی بر روی بیماران بعد از مصرف عصاره گیاهی سیر برای تأیید این داده ها توصیه می‌شود تا در نهایت بتوان آن را در رده داروهای گیاهی فرموله شده در داروخانه در دسترس بیماران قرار داد (بکائیان و همکاران، ۱۳۹۴).

در تحقیقی دیگر رئیسی و همکاران (۱۳۹۴) خاصیت ضدباکتریایی هشت عصاره گیاهی (چای کوهی، مریم گلی، درمنه کوهی، بومادران کلاری، مرزه بختیاری، زیره، بابونه و مورد) را بر روی باکتری *ویبریوپاراهمولیتیکوس* بررسی نمودند. طبق نتایج آنها عصاره و اسانس گیاه مرزه بختیاری دارای بیشترین اثرات ضدباکتریایی بود و سه گیاه مورد، بابونه و زیره نیز دارای اثرات ضدباکتریایی نسبی بر *ویبریوپاراهمولیتیکوس* بودند، لذا تفاوت‌هایی بین اثرات ضدباکتریایی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی بر روی باکتری‌های بیماری‌زا وجود دارد. همچنین قاسمی پیربلوطی (۱۳۸۶) اثرات عصاره مورد را بروی سه باکتری *اشریشیاکولای*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* در شرایط آزمایشگاهی را به روش دیسک‌گذاری مورد بررسی قرار دادند و نتایج حاکی از آن بود که عصاره الکلی مورد اثرات ضدباکتریایی مناسبی در مقایسه با سه داروی جنتامایسین، تتراسایکلین و کلرامفنیکل بر باکتری‌های مورد بررسی داشت.

سحرخیز و همکاران (۱۳۸۷) در پژوهشی اثر ضدباکتریایی اسانس بابونه را بررسی کردند و دریافتند که اسانس بابونه بیشترین اثر ضدباکتریایی را بر روی باکتری *اشریشیاکولای* و کمترین اثر را بر باکتری سودوموناس دارد. در بررسی در سانفرانسیسکو و کالیفرنیا، اثر مغز گردو بر روی *اشریشیاکلی* مورد ارزیابی قرار گرفته که جمعیت باکتری‌های *اشریشیاکلی* را به میزان ۹۹٪ کاهش داده است. همچنین در این مطالعه تأثیر عصاره تانین گردو بر روی *اشریشیاکلی* نشان دهنده از بین رفتن باکتری ها بوده است (Kokal, 1965). در مطالعه دیگری که توسط نریمان و همکاران در ایران انجام شد فعالیت ضد باکتریایی شش گیاه بومی ایران از جمله گردو علیه *هلیکوباکتر پیلوری* بر روی ۷۰ نمونه کلینیکی با استفاده از تست حساسیت ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوژن به اثبات رسیده است (Nariman et al., 2004).

ایتگلو و آلتانلر در سال ۲۰۰۳ تاثیر عصاره آبی برگ درخت گردو را بر روی باکتری *سودوموناس آئروژینورا* مورد مطالعه قرار دادند که مشخص شد هاله عدم رشد این عصاره برای مهار رشد باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در غلظت mg/ml ۱۳۳ معادل ۱۰ میلی‌متر است. اما در این مطالعه میانگین هاله عدم رشد بدست آمده در غلظت (mg/ml)۵۰ برای روش آبی با چاهک این هاله صفر میلی‌متر بود (Itoglu and Altanlar, 2003).

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از طرح پژوهشی شماره ۱۳/۱۱/۵/۸۹۷۱۰ دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز می‌باشد که حامی مالی این طرح بوده و همچنین از

www.SID.ir

Arc JFM ID

حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه و تمامی همکاران محترم آن حوزه که ما را در انجام این پروژه یاری نمودند کمال تشکرو قدردانی را داریم.

منابع

۱. بکائیان، محمد.، فرازمند، راضیه.، کی قبادی، سمانه. و سعیدی، سعیده. ۱۳۹۴. بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی سیر (*Allium Sativum*) بر روی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی-بیوتیک‌های مختلف. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران). جلد ۲۸، شماره ۱صفحات: ۴۱-۳۴.

۲. جامه‌دار، صالح.، ضرابی، مهدی.، مهرنژاد، فرامرز. و یاور پور کردستانی، وحید. ۱۳۹۳. بررسی اثر ضد باکتری عصاره‌های آبی گیاهان بومی ایران بر روی سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا. جله میکروب‌شناسی پزشکی ایران، دوره ۸، شماره ۲، صفحات ۵۱-۵۴.

۳. حبیبیان دهکردی، سعید.، قلی‌پور، ساجده.، مشتاقی بروجنی، حمداله. و فلاح، عزیزاله. ۱۳۹۳. ارزیابی اثرات ضدباکتریایی عصاره الکلی مرزه بختیاری بر برخی باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد در گوشت قرمز. مشریه دامپزشکی در ژوهش و سازندگی، شماره ۱۰۴، صفحات ۳۷- ۲۸.

۴. حنفی، قربانمحمد.، درویشی، شعله.، درویشی، نازیلا.، سیدین اردبیلی، سید مهدی. و میراحمدی، فردین. ۱۳۹۱. بررسی خواص ضدباکتریایی اسانس شیره درخت بنه بر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *کلوستریدیوم اسپوروژنس*. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان، دوره ۱۷، بهار ۹۱، صفحات ۱۱-۱.

۵. رئیسی، مهدی.، دغاغله، علی.، علیشاهی، مجتبی.، رحیمی، مهدی. ۱۳۹۴. بررسی اثر ضدباکتریایی برخی عصاره و اسانس‌های گیاهی بر باکتری *ویبریوپراهمولیتیکوس*. مجله میکروب‌شناسی مواد غذایی، دوره دوم، تابستان ۹۴، صفحات ۵۵-۶۵.

۶. سحرخیز، محمدجمال.، ستاری، مرتضی.، گودرزی، غلامرضا.، امیدبیگی، رضا. ۱۳۸۷. تعیین اثر ضدباکتریایی اسانس *Tancetum purthenium L.*، مجله گیاهان دارویی و معطر ایران، جلد ۲۴، شماره ۱، صفحات ۴۷-۵۵.

۷. شرافتی چالشتری، رضا.، شرافتی چالشتری، فرهاد.، شرافتی چالشتری، علی. و اشرفی، کورش. ۱۳۹۰. بررسی اثر ضدمیکروبی و تعیین میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و فلاونولی عصاره اتانولی گل میمونی (*Scrophularia striata*). مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، زمستان ۸۸، صفحات ۳۷-۳۲.

۸. عزیزی شفا، مهدی.، قدیمی، صباح. و حشمتی، علی. ۱۳۹۵. اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی و متانولی برگ و پوست سبز میوه گردو علیه *ساکارومایسس سرویزیه*، *باسیلوس لچنی فرمیس* و *آسپرژیلوس نایجر* در شیره خرما، مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، دوره ۱۱، شماره ۴، صفحات ۸۸-۸۱.

۹. قاسمی دهکردی، نصراله.، سجادی، ابراهیم.، قنادی، علیرضا.، امن زاده، یعقوب ۱۳۸۲. فارماکوپه گیاهی ایران، مجله پژوهشی حکیم، سال ۶، شماره ۳، صفحات ۶۳-۷۴.

۱۰. قاسمی پیربلوطی، عبداله. ۱۳۸۶. گزارش نهایی طرح پژوهشی، بررسی وضعیت خواب، جوانه‌زنی و برخی خصوصیات کیفی بذر گونه مرتعی و دارویی کلوس یا کرفس معطر بختیاری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد.

11. Andrade, O., Munoz, G., Galdames, R., Duran, P. and Honorato, R. 2004. Characterrization, In Vitro Culture, and Molecular Analysis of Thecaphora solani, the Causal Agent of Potato Smut. Phytopathology, 94(8): 875-882.

12. Avijgan, M., Saadat, M., Nilforoosh-Zadeh, M.A. and Hafizi, M. 2006. Anti-fungal effect of *Echinophora platyloba* extract on some common dematophytes. Journal of Medical Plants, 5(18): 10-16.

www.SID.ir

Archive of SID

13. Blumenthal, M., Goldberg, A. and Brinckmann, J. 2000. Sage leaf. In: Blumenthal, M., Goldberg, A., Brinckmann, J. Eds. Herbal medicine. Newtown: Integrative Medicine Communications, 330-332.
14. BURT, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods Areview. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.
15. Institute of standards and industrial research of Iran, The Iranian National Standard No. 5075.
16. Itoglu, G.S. and Altanlar, N. 2003. Antimicrobial activity of some plants used in folk medicine. Turkish Journal of Pharm, 32(3): 159- 163.
17. Kamkar, J., Rezaei, M.B., Bagheri, P., Abolfazl, S.S. and Malihe, N. 2004. Determination of juglone from leaves and fresh peels of juglans regia l. By high performance liquid chromatography. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 20(4): 323-331.
18. Kokal, D. 1965. Viability of Esherichia Coli on English Walnut Meats (Juglans regia). Journal of Food Science, 30(2): 325-332.
19. Murry, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A. and et al. 1995. Manual of clinical microbiology. ASM, Washington D.C. (editors).
20. Naeini, A., Khosravi, A., Tadjbakhsh, H., Ghazanfari, T., Yaraee, R., Shokri, H. 2010. Evaluation of the immunostimulatory activity of Ziziphora tenuior extracts. Com Clin Pathol, 19(5):459-463.
21. Nariman, F., Eftekhar, F., Habibi, Z., Falsafi, T. 2004. Anti-helcobacter pylori activities of six Iranian plants. Helicobacter, 9(2): 146-151.
22. Noguchi, N. and Niki, E. 2000. Phenolic antioxidants: A rationale for design and evaluation of novel antioxidant drug for atherosclerosis. Free Rad Biol Med, 28(10): 1538-1546.
23. Pereiraa, J.A., Oliveiraa, I., Sousaa, A., Valentaob, P., Andrade, P.B., Ferriraa, I.C.F.R. and et al. 2007. Walnut (*Juglans regia L.*) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food Chemistry Toxicology, 45: 2287-2295.
24. Santos-Filho, S.D., Diniz, C.L., Carmo, FSd., Fonseca, AdSd. and Bernardo-Filho, M. 2008. Influence of an extract of *Juglans regia* on the growth of *Escherichia coli*, on the electrophoretic profile of plasmid DNA and on the radiolabeling of blood constituents. Brazilian Archives of Biology and Technology. 51(SPE):163-68
25. Scalbert, A. 1991. Antimicrobial Properties of Tannins. Phytochemistry, 30(12): 3875- 3883.
26. Shahidi B. 2004. Evaluation of antibacterial properties of some medicinal plants used in Iran. Journal of Ethnopharmacol. 94: 301–305.
27. Orrt, F.A., Land, M. 2006. Meteicillin resistant Staphylococus aureus prevalence: Current susceptibility patterns in Trinidad. BMC Infect Dis. 6(1): 83.
28. Tajkarim, M.M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control, 21: 1199-18.
29. Taura, D.W., Okoli, A.C. and Bichi, A.H. 2004. Invitro antibacterial activity of ethanolic extract of Anona cosmosus (L.), Allium sativum (L.) and Aloe barbadensis (L.) in comparison with Ciprofloxin. Journal of Research and Production, 4(4): 196-201.
30. Valnet, J. 2002. Phytotherapy, treatment of disease by plants. Translated to Persian by: Emami, A., Shams-Aedekani, M.R. and Nekoei- naeini, N. Tehran: Rahe-kamal Pub. pp: 358-361.
31. Wright, G.D. 2000. Resisting resistance; new chemical strategies for battling superbugs. Chemistry biology, 7: 127-132.
32. Ya, C., Gaffnet, S.H., Lilley, T.H. and Haslam, E. 1988. Carbohydrate-polyphenol complexation, In: Chemistry and significance of condensed tannins. New York NY Plenum Press; p. 553.

www.SID.ir

Antimicrobial effect of *walnut* leaves aqueous extract and comparison of disc diffusion and wells methods

Alimohammadi A[1], Javadi A[2*], Yaghma E[3]

1. Member of Scientific Association of Food Hygiene, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

2. Department of Food Hygiene, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

3. MSc Graduated, Department of Food Science and Technology, Tabriz University, Tabriz, Iran.

***Corresponding author:** *javadi@iaut.ac.ir*

Received: 6 November 2018 Accepted: 5 February 2019

Abstract

Today food safety is a public health issue. One of the methods of healthy food production is the use of natural materials. The use of essential oils and plant extracts as antibacterial and antifungal additives is one of these methods. Antimicrobial compositions obtained from plants were removed by different mechanisms of antibiotics, in which the effective influences of *walnut* and its components are significant. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial effect of walnut leaf extract on *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Escherichia coli* (*E. coli*), determine the optimal amount of extract and sensitivity to each of the bacteria against the extract and determine the most sensitive method of the study. In this study, the leaves was extracted from the walnut and then the antimicrobial properties of the extract and its optimal concentrations were measured using disc and well methods on *S. aureus* and *E. coli*. Based on the results, the extract of *walnut* leaves in the concentrations of 12.5% up to the above has antimicrobial effect. By increasing the amount of extract, the growth rate of the bacteria significantly decreases ($p<0.01$). The highest non-growth halo in both methods was obtained from the control sample containing chloramphenicol disk on the *E. coli* (24 mm) and after it, the sample that contain 50% extract on *S. aureus* had 13.33 non-growth halo in the well method, and in the disc method, the 50% extract of *S. aureus* had the highest non-growth halo (11 mm). In fact, *S. aureus* was more susceptible to walnut leaves extract than *E. coli* in both methods. However, between the two methods, the sensitivity of the wells samples was more than the discontinuation method. The overall result shows that the sample containing 50% walnut leaf extract on *S. aureus* has the most antimicrobial activity among other samples after the control sample (chloramphenicol disc on *E. coli*).

Keywords: Extract, *Walnut* leaves, Disc diffusion, Well method.

www.SID.ir