Archive of SID

Downloaded from jmj.jums.ac.ir at 13:45 +0330 on Wednesday January 15th 2020

مقاله پژوهشی

بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی برگ ازگیل علیه برخی از باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی

نویسندگان:

معین صفری*[۱]، سلمان احمدی اسپچین[۲]، مریم کمالی[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

۳- دانش آموخته کارشناسی پرستاری، دانشکده پرستاری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.17, No.2, Summer 2019

چکیده:

مقدمه: امروزه استفاده از ترکیبات طبیعی در صنعت مواد غذایی یکی از بحث های مهم حوزه بیوتکنولوژی است. ازگیل یکی از گیاهانی است که اثرات درمانی آن از زمان‌های بسیار دور مورد توجه بوده است. هدف از این مطالعه تعیین اثرات ضد باکتریایی عصاره متانولی برگ درخت ازگیل علیه برخی از باکتری های بیماری‌زای مواد غذایی در شرایط آزمایشگاهی بود.

روش کار: در این مطالعه آزمایشگاهی، برگ تازه درخت ازگیل از روستای لالم جمع آوری شد. تهیه عصاره برگ ازگیل به روش سوکسله انجام شد. به منظور بررسی اثر ضد باکتریایی از روش انتشار دیسک و برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی از روش رقیق کردن در محیط مایع استفاده شد.

یافته‌ها: بیشترین تاثیر ضدباکتریایی این عصاره روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با میانگین قطر هاله عدم رشد ۳۱/۸۳ میلیمتر مشاهده شد. حداقل غلظت مهارکنندگی موثر روی تمامی باکتری‌ها به استثناء سودوموناس آئروژینوزا ۶۲/۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی در محدوده ۶۲/۵ تا ۵۰۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر متغیر بود.

نتیجه‌گیری: عصاره متانولی برگ ازگیل روی هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بیماری‌زای مواد غذایی دارای اثر ضدباکتریایی مطلوبی است. از این رو، احتمالاً این عصاره می‌تواند به عنوان فرآورده گیاهی طبیعی به صورت یک ترکیب ضد میکروبی یا نگه دارنده برای مواد غذایی مدنظر قرار گیرد.

واژگان کلیدی: ضدباکتریایی، پاتوژن های مواد غذایی، روش انتشار در دیسک، ازگیل

Pars J Med Sci 2019;17(2):15-22

مقدمه:

تغییرات اقتصادی و اجتماعی نوین به همراه تجارت بین المللی غذا در سطح جهانی خطر بروز بسیاری از بیماری‌های منتقل شونده از مواد غذایی را بیش از پیش مطرح ساخته است و در این راستا دست یابی به غذای سالم هم گام با ماندگاری بالا، لزوم استفاده از نگه دارنده‌های غذایی را خاطر نشان می‌سازد[۱]. با وجود تکنیک‌های بسیار متنوع برای نگهداری مواد غذایی، پاتوژن های مواد غذایی هنوز به عنوان یک مشکل بزرگ در صنعت مواد غذایی مطرح می باشند. برخی از این تکنیک‌ها مناسب بوده، اما بسیاری سبب کاهش تمایل مصرف‌کننده به استفاده از این محصولات و نیز افزایش مقاومت پاتوژ ها در محیط شده است [۲]. میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای مواد غذایی یکی از دغدغه‌های مهم بهداشت و سلامت عمومی در سرتاسر جهان هستند و دلایل بسیاری از بیماری ها ناشی از باکتری ها و ویروس های بیماری‌زا در انسان می‌باشند. مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها در

* نویسنده مسئول، نشانی: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.

تلفن تماس: ۰۹۳۶۷۲۶۳۲۴۵ پست الکترونیک:Safari_moein@yahoo.com

دریافت: ۹۸/۱/۲۸ اصلاح: ۹۸/۷/۲۸ پذیرش:۹۸/۷/۲۹

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmj.jums.ac.ir at 13:45 +0330 on Wednesday January 15th 2020

ایالات متحده امریکا گزارش کرده است که حدود ۹/۴ میلیون بیماری توسط ۳۱ مورد از میکروارگانیسم های بیماری زاهای مواد غذایی شناخته شده می باشد و این در حالی است که ۹۰ درصد از همه موارد این بیماری‌های ناشی از گونه‌های سالمونلا، کمپیلوباکتر، اشرشیاکلی O157; H7، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا موسیتوژنز، کلستریدیوم ها، باسیلوس ها، نوروویروس‌ها و توکسوپلاسماها است[۳]. اشرشیاکلی و استافیلوکوس اورئوس عامل بسیاری از آسیب های بهداشتی و یک تهدید برای سلامتی هستند[۴]. سالمونلوزیس عفونتی خطرناک و کشنده است که به وسیله باکتری سالمونلا ایجاد می‌شود[۵]. باکتری‌های جنس باسیلوس باکتری‌های گرم مثبت و اسپوردار هستند که در فرآورده‌های غذایی ازجمله گوشت، سبزیجات، سوپ، برنج، شیر و سایر فراورده های لبنی توانایی تکثیر و سم زایی دارند. رشد این باکتری در فرم رویشی معمولاً در محدوده دمایی ۱۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد رخ می دهد و دمای مناسب رشد آن بین ۲۸ تا ۳۵ درجه سانتی گراد است. با این حال انواع سرمادوست باسیلوس‌ها که قادر به رشد در دمای زیر ۵ درجه سانتی گراد هستند نیز شناسایی شده‌اند[۶]. بین ۱ تا ۲۰ درصد تمامی موارد شیوع مسمومیت های غذایی در جهان به دلیل باسیلوس سرئوس بوده است[۷]. باسیلوس سرئوس می‌تواند با ایجاد دو نوع علایم استفراغی و اسهالی مسمومیت غذایی حادی در انسان ایجاد کند[۷]. عفونت‌های انسانی توسط باسیلوس پومیلوس بسیار نادر است، با این وجود در سال ۲۰۰۶ باسیلوس پومیلوس موجود در برنج عامل ایجاد سه مورد مسمومیت غذایی شناخته شد[۸]. سلامت نگهدارنده های شیمیایی نیز در سال‌های اخیر مورد تردید واقع شده است[۹]، از این رو، تقاضا برای استفاده از ترکیبات طبیعی به عنوان محافظت کننده های جایگزین در مواد غذایی رو به افزایش است، به طوری که امروزه استفاده از ترکیبات طبیعی در صنعت مواد غذایی یکی از بحث‌های مهم در بیوتکنولوژی محسوب می‌شود. بنابراین، جستجو برای کشف عوامل ضدمیکربی طبیعی و مؤثر که بتواند هم از لحاظ حفاظتی و هم از لحاظ پیشگیری، در مورد طیف وسیعی از باکتری های بیماری زای مواد غذایی موثر باشد و همچنین فاقد هرگونه تاثیر احتمالی بر بو و طعم غذا باشد بسیار حائز اهمیت است.

عصاره‌های گیاهی از جمله ترکیبات طبیعی هستند که امروزه هم به عنوان طعم دهنده مواد غذایی و هم به علت تأثیر ضدمیکروبی شان توجه بسیار زیادی را به خود جلب کرده‌اند[۱۰]. ترکیبات ضدمیکروبی به دست آمده از گیاهان با سازوکارهایی متفاوت از آنتی‌بیوتیک‌ها، باکتری‌ها را حذف می کنند که این مسئله در درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم میکروبی از نظر بالینی حائز اهمیت است. با توجه به اقبال دوباره برای مصرف داروها و فرآورده‌های گیاهی، بررسی خواص دارویی گیاهان اندمیک هر منطقه از اهمیت خاصی برخوردار است[۱۱]. ازگیل یکی از گیاهانی است که اثرات درمانی آن از زمان‌های بسیار دور مورد توجه بوده است. این گیاهان به فراوانی در جنگل های شمال ایران می‌رویند. با وجود اثرات درمانی قابل توجه درخت ازگیل بررسی‌ها در مورد خواص ضدمیکروبی آن در کشور بسیار محدود است. برای نمونه احمدی اسبچین و همکاران در سال ۱۳۹۲ اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی و اتانولی برگ درخت ازگیل بر باکتری های جداسازی شده از محیط بیمارستانی را مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که عصاره متانولی این گیاه دارای اثرات ضدباکتریایی قابل توجهی علیه باکتری‌های اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا است[۱۲]. درخت ازگیل با نام علمی «Mespilus germanica» که در گویش گیلکی به آن کونوس یا کُنوس می گویند میوه‌ای است از خانواده گل سرخیان که از حدود سه هزار سال پیش در جنوب دریای خزر و در مناطق گیلان و مازندران کشت می‌شود. این درخت در تمام جنگل‌های شمال ایران و همه ارتفاعات سواحل دریا و در دامنه‌های البرز به طور خودرو عمل می‌آید و با نام محلی هر منطقه شناخته می‌شود. از روزگاران دور خواص دارویی و مفید ازگیل بسیار مورد توجه بوده است[۱۳]. هدف از این مطالعه تعیین اثرات ضد باکتریایی عصاره متانولی برگ درخت ازگیل علیه برخی از باکتری های بیماری‌زای مواد غذایی در شرایط آزمایشگاهی است.

روش کار:

جمع‌آوری و آماده‌سازی گیاه

در این مطالعه آزمایشگاهی، برگ تازه درخت ازگیل از روستای لالم از توابع شهرستان صومعه‌سرا با موقعیت جغرافیایی N″۹۹/۳۷°۴۹′۲۵ و E″۴۶/۱۱°۴۹′۲۵ جمع‌آوری شد. پس از تائید جنس و گونه این گیاه توسط هرباریوم دانشکده علوم دانشگاه گیلان این برگ‌ها برای تهیه عصاره مورد استفاده قرار گرفت.

روش تهیه عصاره

برای تهیه عصاره از روش احمدی اسبچین و همکاران استفاده شد[۱۴]. به طور خلاصه، ابتدا برگ تازه درخت ازگیل در هوای آزاد و در سایه کاملاً خشک شد و سپس به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار گرفت تا کاملا رطوبت‌زایی شود. سپس برگ ها توسط دستگاه آسیاب برقی به طور کامل پودر شده و درون ظرف های شیشه ای نگهداری شد. برای تهیه عصاره متانولی و اتانولی از روش سوکسله استفاده شد. در این روش از ۵۰ گرم پودر برگ ازگیل استفاده شد و به ازای هر ۱۰

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmj.jums.ac.ir at 13:45 +0330 on Wednesday January 15th 2020

گرم پودر برگ ازگیل ۲۰۰ میلی لیتر حلال (متانول) اضافه شد. عصاره‌گیری به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت و در پایان، حلال با دستگاه روتاری حذف شد. عصاره به دست آمده از آخرین مرحله درون ظرفی ریخته و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و شرایط سترون شده خشک شد.

آماده‌سازی سویه‌های باکتری

باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی مورد استفاده در این پژوهش شامل: اشرشیاکلی O157:H7 (ATCC 700728)، سالمونلا تیفی (PTCC 1609)، سودوموناس آئروژینوزا (PTCC 1430)، باسیلوس سرئوس (PTCC 1247)، باسیلوس پومیلوس (PTCC 1319) و استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1112) از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران و آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایلام تهیه شد. سویه‌های باکتریایی در محیط نوترینت براث تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم خانه گذاری شدند. به منظور انجام آزمون ضدباکتریایی از تمام سویه ها به صورت جداگانه با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طوج موج ۶۲۰ نانومتر، استاندارد نیم مک فارلند (۱/۵ ×۱۰۸ cfu/ml) تهیه شد[۱۵].

روش بررسی فعالیت ضدباکتریایی

به منظور بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره متانولی برگ ازگیل از روش انتشار دیسک استفاده شد[۱۶]. به طور خلاصه، ابتدا بر اساس مطالعات گذشته و آزمون های تعیین حساسیت، رقت‌های مختلف ۶۲/۵ ، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره متانولی برگ ازگیل به وسیله دی‌متیل سولفوکساید ۱۰ درصد تهیه شد[۱۲]. از سوسپانسیون نیم مک‌فارلندی باکتری‌ها با سوآپ استریل برداشته و در محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک آلمان) به صورت چمنی کشت داده شدند. سپس برای هر باکتری به طور مجزا دیسک پیپر بلانک ۶ میلی‌متری (واتمن، شماره ۱) که با حدود ۲۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف عصاره آغشته شده بودند در فاصله استاندارد (۱/۵ سانتی‌متری) از یک دیگر در محیط کشت‌ها قرار داده شدند. به منظور آزادسازی مواد موثر عصاره در محیط کشت ابتدا پلیت ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و سپس تمام کشت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم خانه گذاری شدند. از دیسک آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین (۱۰µg/ml) به عنوان کنترل مثبت و از دی‌متیل‌سولفوکساید ۱۰ درصد به عنوان کنترل منفی استفاده شد. بررسی فعالیت ضدباکتریایی غلظت های مختلف عصاره با استفاده از اندازه‌گیری قطر هاله‌های عدم رشد اطراف باکتری انجام شد. تمام آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی با استفاده از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استریل و به روش رقیق کردن میکرو در محیط مایع انجام شد[۱۷]. به این ترتیب که پس از تهیه سوسپانسیون باکتری معادل ۱۰۶× ۵ cfu/ml ، به هر یک از چاهک‌ها ۵۰ میکرولیتر محیط نوترینت براث به اضافه ۵۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده عصاره (۶۳ تا ۱۰۰۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر) و سپس مقدار ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده باکتری اضافه شد. پلیت‌های به مدت ۲۴–۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، سپس با مقایسه کدورت چاهک‌های تحت تیمار با چاهک‌های شاهد میزان MIC مشخص شد. اولین چاهک بدون کدورت به عنوان حداقل غلظت باز دارنده به صورت میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها با توجه به نتایج MIC تعیین شد. از چاهک‌هایی که رشد باکتری در آن ها کاملاً متوقف شده بود با سوآپ استریل نمونه برداری و روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم خانه‌گذاری شدند. پس از ۲۴ ساعت کمترین غلظتی از عصاره که باکتری‌ها در آن رشد نکرده بودند به عنوان مقادیر MBC گزارش شدند. تمام آزمایش‌ها سه بار تکرار شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده شد. برای توصیف متغیرهای تحقیق از شاخص‌هایی همچون میانگین و انحراف معیار استفاده شد.

یافته‌ها:

نتایج حاصل از تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی برگ ازگیل روی باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی در جدول ۱ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که عصاره متانولی برگ ازگیل در غلظت‌های مختلف دارای اثر ضد باکتریایی علیه هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است. بیشترین تاثیر ضدباکتریایی این عصاره روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بود به طوری که میانگین قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک ها در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر علیه این باکتری ۳۱/۸۳ میلی متر مشاهده شد. همچنین کمترین تاثیر این عصاره علیه باکتری سالمونلاتیفی با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۶/۱۶ بود. نتایج حاصل از بررسی غلظت های مختلف عصاره علیه هر یک از باکتری‌ها نشان داد که با افزایش غلظت عصاره میزان اثرات بازدارندگی از رشد به طور معناداری افزایش می یابد ($p \leq ۰/۰۱$).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmj.jums.ac.ir at 13:45 +0330 on Wednesday January 15th 2020

یافته‌ها همچنین نشان داد که اثر عصاره متانولی برگ از گیل روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است. دیسک آغشته به دی متیل سولفوکساید به عنوان کنترل منفی هیچ‌گونه تاثیری روی رشد باکتری‌ها نداشته و دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۱۰µg/ml) به عنوان کنترل مثبت روی تمامی سویه های مورد بررسی موثر بود. مقایسه قطر هاله‌های عدم رشد حاصل از تاثیر عصاره متانولی ازگیل روی با کتری های اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و باسیلوس پومیلوس نشان داد که اثر این عصاره در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین موثر بر این سویه‌ها بیشتر بوده است ($p<۰/۰۱$). تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها در سطح یک درصد نشان داد که خطای آزمایش برابر صفر است ($p<۰/۰۱$).

نتایج حاصل از تعیین مقادیر مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی نشان داد مقدار حداقل غلظت مهارکنندگی موثر روی تمامی سویه‌های مورد بررسی به استثناء سودوموناس آئروژینوزا ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است. نتایج همچنین نشان داد که حداقل غلظت کشندگی موثر روی سویه‌های مورد بررسی در محدوده ۶۲/۵ تا ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر متغیر است. با توجه به نتایج به دست آمده حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی موثر علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است (جدول ۱).

جدول۱: میانگین قطر هاله عدم رشد و انحراف معیار حاصل از تاثیر عصاره متانولی برگ ازگیل و کنترل های مثبت و منفی علیه باکتری های مورد بررسی بر حسب میلیمتر و مقادیر مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر

	باکتری ها	غلظت های مختلف عصاره متانولی ازگیل (mg/ml)					کنترل مثبت	کنترل منفی	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
		۶۲/۵	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰				
گرم منفی	Escherichia coli O157:H7	۰/۵۷±۱۱/۱۶ c	^{c}۰/۵۷±۱۲/۱۶	^{b}۰/۲۸±۱۵/۳۳	^{a}۰/۵±۱۷/۸۳	^{a}۰/۲۸±۱۹/۱۶	^{c}۰±۱۳	N	۶۲/۵	۲۵۰
	Salmonella typhi	^{F}۰/۵۷±۱۰/۳۳	^{F}۰/۵±۱۱/۵	۰/۵۷±۱۲/۳۳ F	۰/۵۷±۱۴/۶۷ E	^{D}۰/۲۸±۱۶/۱۶	^{G}۰±۲۲	N	۶۲/۵	۵۰۰
	Pseudomonas aeruginosa	^{H}۰/۵۷±۸/۱۶	^{F}۰/۵۷±۹/۶۶	^{F}۰/۲۸±۱۲/۶۶	^{E}۰/۷۶±۱۵/۸۳	^{D}۰/۵۷±۱۷/۱۶	^{i}۰±۲۷	N	۱۲۵	۵۰۰
گرم مثبت	Staphylococcus aureus	^{N}۰/۵۷±۱۷/۱۶	^{M}۰/۵۷±۲۰/۱۶	^{L}۰/۵۷±۲۴/۸۳	^{K}۰/۵۷±۲۸/۱۶	^{J}۰/۵۷±۳۱/۸۳	^{L}۰±۲۵	N	۶۲/۵	۶۲/۵
	Bacillus cereus	^{c}۰/۵۷±۱۲/۱۶	^{b}۱/۰۶±۱۵/۲۵	^{b}۰/۵۷±۱۶/۲۵	^{a}۰/۷۶±۱۷/۸۳	^{a}۰/۳۵±۱۹/۷۵	^{a}۰±۱۸	N	۶۲/۵	۱۲۵
	Bacillus pumilus	^{F}۰/۵۷±۹/۸۳	^{b}۰/۵۷±۱۴/۱۶	^{b}۰/۵۷±۱۵/۲۵	^{a}۰/۵۷±۱۶/۶۶	^{O}۰/۷۶±۱۸/۶۶	^{a}۰±۱۷	N	۶۲/۵	۲۵۰

N : عدم تاثیر

نکته: معنادار بودن یا نبودن نتایج در دو سطح تاثیر غلظت های مختلف برروی هر میکروارگانیسم به صورت جداگانه و همچنین تاثیر یک غلظت مشخص روی همه باکتری های مورد بررسی با حروف (a-o) نشان داده شده است، به این صورت که حروف (a-o) غیرهمسان در هر سطح نشان دهنده معنادارد بودن نتایج ($p\leq ۰/۰۱$) و حروف (a-o) همسان نشان دهنده معنادار نبودن نتایج ($p> ۰/۰۱$) است.

MIC; Minimum inhibitory concentration
MBC; minimum bactericidal concentration

بحث:

امروزه یکی از نگرانی‌های اصلی مصرف کنندگان، تولیدکنندگان مواد غذایی و متولیان بهداشتی سلامت غذا است. گزارش های فراوان در زمینه عفونت‌های حاصل از غذاهای آلوده به باکتری‌های بیماری‌زا و همچنین مضرات ناشی از استفاده نگهدارنده‌های شیمیایی ضرورت ارائه راه‌کاری سازنده برای افزایش امنیت و نیز سلامت مواد غذایی را آشکار می سازد. امروزه یکی از روش‌های نوین کنترل باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی استفاده از ترکیبات مشتق شده از گیاهان و عصاره های گیاهی است[۱۸]. ازگیل یکی از گیاهان دارویی اندمیک شمال ایران است که اثرات مفید برگ، میوه و اندام‌های هوایی آن از زمان‌های بسیار دور تاکنون مورد توجه بوده است[۱۹]. با وجود اثرات قابل توجه درخت ازگیل بررسی‌ها در مورد خواص ضدمیکروبی آن در ایران و سایر نقاط جهان بسیار اندک بوده است. احمدی اسبچین و همکاران اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی و اتانولی برگ درخت ازگیل بر باکتری‌های جداسازی شده از محیط بیمارستانی را مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmj.jums.ac.ir at 13:45 +0330 on Wednesday January 15th 2020

عصاره متانولی این گیاه دارای اثرات ضدباکتریایی قابل توجهی علیه باکتری‌های اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا است[۱۲]. آن‌ها همچنین دریافتند که تاثیر عصاره متانولی برگ این گیاه روی اشرشیاکلی بیشتر از سودوموناس آئروژینوزا است که این یافته‌ها با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. نتایج این مطالعه نیز یه خوبی نشان داد که عصاره متانولی برگ ازگیل دارای اثرات ضدباکتریایی قابل توجهی روی باکتری‌های بیماری زای مواد غذایی است. نتایج مطالعه حاضر همچنین با یافته‌های حاصل از مطالعه داوودی و همکاران مطابقت دارد. آن‌ها در مطالعه خود نشان دادند که عصاره برگ ازگیل دارای خواص ضدباکتریایی علیه اشرشیاکلی، شیگلا دیسانتری، سالمونلا تیفی موریوم کلبسیلا پنومونیه و ویبریوکلرا است[۲۰].

مطالعات فراوانی در زمینه کاربرد گیاهان دارویی و مشتقات آن‌ها در کنترل و از بین بردن باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی و سایر باکتری‌های بیماری‌زا انجام شده است[۴، ۲۱، ۲۲]. نورول ایسلام و همکاران در سال ۲۰۱۸ گزارش دادند که گیاه سرخدار برگ‌ریز دارای فعالیت ضدباکتریایی قابل توجهی علیه باکتری‌های بیماری‌زا است[۳]. همچنین جاناکات و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش دادند که عصاره متانولی روغن زیتون آموراکا حاصل از درختان خانواده Oleaceae دارای خواص ضدباکتریایی علیه باکتری‌های گرم منفی اشرشیاکلی O157:H7 و سالمونلا انتریتیدیس و همچنین باکتری‌های گرم مثبت لیستریا مونوسیتوژنز و استافیلوکوکوس اوروس است[۲۳]. با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر بیشترین تاثیر عصاره متانولی برگ ازگیل روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با قطر هاله ۳۱/۸۳ بود که یکی از باکتری های مهم در ایجاد مسمومیت های غذایی در انسان است[۴]. این نتایج با داده های به دست آمده از مطالعه صفری و احمدی اسبچین (۲۰۱۹) کاملاً مطابقت دارد. آن‌ها نیز در مطالعه خود نشان دادند که بیشترین تاثیر عصاره متانولی برگ ازگیل روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با قطر هاله ۳۰/۸۳ است[۲۴]. همچنین این نتایج با داده های به دست آمده از مطالعه زندی و همکاران مطابقت دارد[۲۵]. در مطالعه حاضر همچنین مشخص شد که تاثیر عصاره متانولی برگ ازگیل روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است. این نتایج با یافته‌های صفری و احمدی اسبچین و احمدی اسبچین و همکاران کاملاً مطابقت دارد[۲۴]. همچنین در مطالعات مشابه‌ای صفری و همکاران و طالبی ورنوسفادرانی نشان دادند که اثر عصاره‌های مختلف گیاهان دارویی روی باکتری های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است[۲۶، ۱۵]. یک توضیح احتمالی برای حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی احتمالاً مربوط به اختلاف در ساختار دیواره سلولی و اجزای غشای سلولی است. باکتری‌های گرم مثبت دارای یک لایه پپتیدوگلیکان هستند که یک مانع نفوذپذیری غیر موثر است، درحالی که باکتری‌های گرم منفی دارای غشای خارجی و فضای پری پلاسمی هستند که یک مانع برای نفوذ مولکول‌های متعددی از آنتی بیوتیک‌ها و ترکیبات ضدباکتریایی محسوب می‌شود[۲۷]. بر اساس نتایج این مطالعه رابطه مستقیمی بین افزایش غلظت عصاره و میزان اثرات بازدارندگی از رشد آن وجود دارد. این نتایج با یافته‌های صفری و احمدی اسبچین، حیدری سورشجانی و همکاران و همچنین زندی و همکاران مطابقت دارد که افزایش غلظت‌های مختلف عصاره منجر به افزایش فعالیت ضدباکتریایی و افزایش قطرهاله عدم رشد می‌شود [۲۸، ۲۴،۲۵]. طبق بررسی‌های انجام شده توسط پژوهشگران خاصیت ضدمیکروبی بسیاری از گیاهان دارویی احتمالاً به دلیل وجود متابولیت‌های ثانویه فراوان از جمله ترکیبات فنولی و فلاونوئیدهایی است که در برگ این گیاهان وجود دارد[۲۹]. فلاوونوئیدها از جمله ترکیباتی که وجود آن به فراوانی در برگ ازگیل توسط پژوهشگران تایید شده است[۳۰]. این ترکیبات در تمام سلول‌های فتوسنتزی و از این رو در تمام گیاهان و به طور گسترده‌ای در میوه، ساقه، گل و برگ گیاهان وجود دارند[۲۹]. مطالعات فراوانی نشان داده‌اند که ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره برگ گیاهان دارویی دارای خاصیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های بیماری‌زا هستند[۳۲-۳۱]. برای نمونه، میتانی و همکاران نشان دادند که ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدهای موجود در عصاره زردآلوی چینی دارای اثرات ضدباکتریایی بر علیه باکتری‌های سیتروباکتر فرئوندی، انتروباکتر آئروژنز، انتروباکتر کلاسه، اشرشیاکلی، کلبسیلا اوکسیتوکا، پروتئوس میرابلیس و سالمونلا انتریکا است[۳۳]. همچنین بشیر و همکاران نشان دادند که فلاوونوئیدهای موجود در عصاره گیاهان دارویی دارای اثرات مهارکنندگی علیه اشرشیاکلی، سودوموناس آئروجینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد[۳۴]. ترکیبات فنولی و به ویژه فلاونوئیدها از طریق سازوکارهای مختلفی می توانند به عنوان یک عامل ضدمیکروبی عمل کنند. از جمله این سازوکارها می توان به مهار سنتز اسید نوکلئیک، مهار عملکرد غشای سیتوپلاسمی، جلوگیری از متابولیسم انرژی، مهار پورین‌ها روی غشای سلولی باکتری و همچنین تغییر نفوذپذیری غشاء که منجر به تخریب سلول می‌شود اشاره کرد[۳۵]. صفری و احمدی اسبچین با بررسی هم زمان خواص آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی عصاره متانولی برگ ازگیل دریافتند که عصاره متانولی برگ این گیاه ضمن اثرات ضدباکتریایی قوی علیه باکتری‌های مورد بررسی دارای بیشترین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها در

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmj.jums.ac.ir at 13:45 +0330 on Wednesday January 15th 2020

مقایسه با سایر گیاهان دارویی مطالعه شده تاکنون و نیز دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی هستند[۲۴]. از این رو، به نظر می‌رسد فعالیت ضدباکتریایی عصاره متانولی برگ ازگیل می‌تواند به دلیل وجود ترکیبات فلاونوئیدی فراوان موجود در برگ این گیاهان باشد که نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد.

نتیجه‌گیری:

عصاره گیاهان به دلیل اثرات ضدباکتریایی فراوانی که از خود نشان می‌دهند دارای پتاسیل بالایی در استفاده به عنوان نگهدارنده جهت افزایش ماندگاری و عمر مفید مواد غذایی در صنعت غذا می‌باشند. تاثیر ضدباکتریایی ازگیل به عنوان یکی از گیاهان دارویی اندمیک شمال ایران روی باکتری‌های بیماری زای مواد غذایی تاکنون بررسی نشده است. در این مطالعه برای اولین بار تاثیر عصاره متانولی برگ این گیاه روی شش باکتری مهم بیماری‌زای مواد غذایی مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین اثر این گیاه دارویی روی باسیلوس پومیلوس نیز برای نخستین بار گزارش می‌شود. نتایج مطالعه حاضر به خوبی نشان داد که عصاره متانولی برگ ازگیل روی باکتری‌های بیماری زای مواد غذایی دارای اثر ضدباکتریایی مطلوبی است و این عصاره می‌تواند به عنوان فرآورده گیاهی طبیعی به صورت یک ترکیب ضد میکروبی یا نگه دارنده برای مواد غذایی مدنظر قرار گیرد. با این وجود، پژوهش‌های بیشتری در زمینه جداسازی ترکیبات موثر این عصاره و همچنین بررسی نحوه عمل این مواد موثره علیه باکتری ها و سایر عوامل بیماری‌زا به منظور دستیابی به یک ترکیب نگهدارنده جدید پیشنهاد می شود.

تشکر و قدردانی:

بدین وسیله نویسندگان مقاله از جناب آقای نادر صفری برای کمک در جمع آوری نمونه‌ها کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع:

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ نوع تعارض منافعی وجود ندارد.

References:

1. WHO. (2015).WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015.
2. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: Part 1: Causes and threats. Pharmacy Ther J 2015; 40: 277-83.
3. Nurul Islam N, Choi J, Baek KH. Antibacterial Activities of Endophytic Bacteria Isolated from *Taxus brevifolia* Against Foodborne Pathogenic Bacteria. Foodborne Pathogens and Disease 2018; 15(5): 269-276.
4. Das G, Patra JK, Baek KH. Antibacterial Properties of Endophytic Bacteria Isolated from a Fern Species *Equisetum arvense* L. against Foodborne Pathogenic Bacteria Staphylococcus aureus and Escherichia coli O157:H7 Foodborne Pathogens and Disease 2016; 14(1): 1-9.
5. Wan MLY, Forsythe SJ, El-Nezami H. Probiotics interaction with foodborne pathogens: a potential alternative to antibiotics and future challenges, Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2018; 5: 1-14.
6. Rusul G, Yaacob NH. Prevalence of *Bacillus cereus* in selected foods and detection of enterotoxin using TECRA-VIA and BCET-RPLA. *Int. J. Food Microbiol* 1995; 25: 131 - 9.
7. Kramer JM, Gilbert RJ. *Bacillus cereus* and other *Bacillus species*. In M. P. Doyle (ed.), Foodborne bacterial pathogens. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. 1989, pp: 21 - 70.
8. From C, Hormazabal V, Granum P. "Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice". *International Journal of Food Microbiology* 2007; 15: 319-324.
9. Jay J.M, Loessner MJ, Golden DA. (2005). *Bacillus cereus* gastroenteritis. In: Modern food microbiology, 7th edition, Springer Science, Inc., New York, USA. pp: 583-590.
10. Ultee, A., Bennik H J, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology 2002; 68: 1561-1568.
11. Mohammadi-Sichani M, Amjad L, Mohammadi-Kamalabadi M. Antibacterial activity of methanol extract and essential oil of *Achillea wilhelmsii* against pathogenic bacteria. Zahedan J Res Med Sci 2011; 13(3): 9-14.
12. Ahmady-Asbchin S, Safari M, Moradi H, Sayadi V. Antibacterial effects of methanolic and ethanolic leaf extract of Medlar (Mespilus germanica) against bacteria isolated from hospital environment. Arak Medical University Journal. 2013; 16(75): 1-13.
13. Yolmeh M, Sadeghi Mahoonak A. Characterization of Polyphenol Oxidase and Peroxidase from Iranian Medlar (*Mespilus germanica* L.) Fruit. J. Agr. Sci. Tech 2016; 18: 1187-1195.
14. Ahmady-Asbchin S, Safari M, Soltani N, Kamali M. In vitro Antibacterial Activity of Methanol, Ether and Aqueous Extracts in Some Species of Cyanobacteria. J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(117): 39-54.
15. Safari M, Ahmady-Asbchin S, Soltani N. In Vitro Assessment of Antimicrobial Activity from Aqueous and Methanolic Extracts of Some Species of Cyanobacteria. Biological Journal of Microorganism 2015; 4(14): 111-130.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmj.jums.ac.ir at 13:45 +0330 on Wednesday January 15th 2020

16. Bajalan I, Rouzbahani R, Ghasemi Pirbalouti A, Maggi F. Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils obtained from seven Iranian populations of *Rosmarinus officinalis*. Industrial Crops & Products 2017; 107: 305–311.
17. Baczek KB, Kosakowska O, Przybyl J, Pióro-Jabrucka E, et al. Antibacterial and antioxidant activity of essential oils and extracts from costmary (*Tanacetum balsamita* L.) and tansy (*Tanacetum vulgare* L.). Industrial Crops and Products 2017; 102: 154–163.
18. Shariatifar N, Ebadi Fathabad A, Madihi S. Antibacterial activity of aqueous and ethanolic extracts of Echiumamoenum on food-borne pathogens. J Food Safe & Hyg 2016; 2(3-4): 63-66.
19. Habibi-Bibalani G, Mosazadeh-Sayadmahaleh F. Medicinal benefits and usage of medlar (*Mespilus germanica*) in Gilan Province (Roudsar District), Iran. Journal of Medicinal Plants Research 2012; 6(7):1155-1159.
20. Davoodi A, Ebrahimzadeh M.A, Fathalinezhad F, Khoshvishkaie E. Antibacterial Activity of Mespilus germanica Leaf Extract, J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 16(146): 173-178.
21. Pouremadi F, Mohammadi Sichani M, Tavakoli M. Antibacterial activity of *Rumex cyprius* Seeds against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Qom Univ Med Sci J 2017; 11(2):56-65.
22. Lefahal M, Zaabat N, Ayad R, Makhloufi E, et al,. Contents, Antioxidant and Photoprotective Activities of Crude Methanolic Extract of Aerial Parts of *Capnophyllum peregrinum* (L.) Lange (Apiaceae) Growing in Algeria. Medicines 2018; 5(26): 1-10.
23. Sana Janakat S, Al-Nabulsi AAR, Allehdan S, Dlaimat AN, Hdlley RA. Antimicrobial activity of amurca (olive oil lees) extract against selected foodborne pathogens. Food Sci. Technol, Campinas 2015; 35(2): 259-265.
24. Safari M & Ahmady-Asbchin S, Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extract of medlar (*Mespilus-germanica* L.) leaves, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2019; DOI: 10.1080/13102818.2019.1577701
25. Zandi H, Hajimohammadi B, Amiri A, Ranjbar A.M, Mozaffari khosravi H, Fallah-zadeh H, Vahidi AR, Dehghan A. Antibacterial Effects of (Mentha X Piperita L.) Hydroalcoholic Extract on the Six Food-Borne Pathogenic Bacteria. Journal Tolooebehdasht Sci 2015; 15(4): 22-33.
26. Talebi Varnosfaderani F, Mohammadi Sichani M, Amjad L. Antibacterial activity of essential oil and extracts of Achillea tenuifolia against pathogenic bacteria. Qom Univ Med Sci J 2017; 11(7):30-37.
27. Shan B, Cai YZ, Brooks JD, Corke H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. International Journal of Food Microbiology 2007; 117(1): 112-9.
28. Heidari Sureshjani M, Mortazavi SA, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F. The Antimicrobial effect of aqueous and ethanolic extracts of *Kelussia odoratissima* on *Enterococcus faecalis* and *Salmonella typhi* in vitro. Qom Univ Med Sci J 2015; 8(5):34-41.
29. Naderinasab M, shahfarhat A, Tajzadeh P, Soroush S, Amiri M, Vahedian M. Survey Infeetion agent in Nosocomial infection with blood culture results. Daneshvar 2006; 14(65): 69 –75.
30. Gruz J, Ayaz FA, Torun H, Strnad M. Phenolic acid content and radical scavenging activity of extracts from medlar (*Mespilus germanica L.*) fruit at different stages of ripening. Food Chemistry 2011; 124: 271–277.
31. Xie Y, Yang W, Tang F, Chen X, Ren L. Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism. Current Medicinal Chemistry 2015; 22: 132-149.
32. Mandal S.M, Dias R.O, Franco O.L. Phenolic Compounds in Antimicrobial Therapy. J Med Food. 2017; 20(10):1031-1038.
33. Mitani T, Ota K, Inaba N, Kishida K, Koyama H.A. Antimicrobial Activity of the Phenolic Compounds of *Prunus mume* against Enterobacteria Biol. Pharm. Bull. 2018; 41: 208–212.
34. Bashir AK, Abdalla AA, Wasfi IA, Hassan ES, Amiri MH, Crabb TA. Flavonoids of Limonium axillare. Int J Pharmacogn 1994; 32: 366–72.
35. Xie Y, Yang W, Tang F, Chen X, Ren L. Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism. Current Medicinal Chemistry. 2015; 22: 132-149.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmj.jums.ac.ir at 13:45 +0330 on Wednesday January 15th 2020

Original Article

Antibacterial Effects of Methanolic Extract of Medlar (*Mespilus Germanica*) Leaves against Some of Foodborne Pathogenic Bacteria

Moein Safari[1*], Salman Ahmady-Asbchin[2], Maryam Kamali[3]

Received: 2019.04.17 Revised:2019.10.20 Accepted: 2019.10.21

1. MSc in Microbiology, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Ilam University, Ilam, Iran
2. Associate Professor, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
3. BSc in Nursing, School of Nursing, Islamic Azad University, Tehran Medical Branch, Tehran, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.17, No.2, Summer 2019

Pars J Med Sci 2019;17(2):15-22

Abstract:

Introduction:
Today, the use of natural ingredients in the food industry is one of important considerations in biotechnology. Medlar is one of herbs that its therapeutic effects has been considered from the past years. The aim of this study was to determine of the antibacterial effects of methanolic extract of medlar leaves against some of foodborne pathogenic bacteria in vitro.

Material and Methods:
In this in vitro study, the fresh leaves of the Medlar were collected from the Lalam village. Soxhlet method was used to preparation of the medlar leaf extract. Disk diffusion method was used to evaluate of the antibacterial effect and broth micro-dilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC).

Results:
The maximum antibacterial activity of this extract was against Staphylococcus aureus that inhibitory zone diameter around it was 31.83 millimeters. MIC for all tested bacteria except Pseudomonas aeruginosa was 62.5 mg/ml and MBC value of the leaves extract was variable from 62.5 to 500 mg/ml.

Conclusion:
Methanolic extract of medlar leaves has a strong antibacterial effect on both gram positive and gram negative foodborne pathogenic bacteria, therefore this extract probably can be considered as a natural herbal ingredient in the form of antimicrobial or food preservative agent.

Keywords: Antibacterial, Foodborne Pathogens, Disk Diffusion, Medlar

* Corresponding author Email: Safari_moein@yahoo.com

www.SID.ir