

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

نویسندگان:

معین صفری\*<sup>۱</sup>، سلمان احمدی اسبجین<sup>۲</sup>، مریم کمالی<sup>۳</sup>

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

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابل، 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 بحث‌های 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 ازگیل علیه برخی از باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی در شرایط آزمایشگاهی بود.

**روش کار:** در این مطالعه آزمایشگاهی، برگ تازه درخت ازگیل از روستای لالم جمع‌آوری 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 نگه‌دارنده برای مواد غذایی مدنظر قرار گیرد.

**واژگان کلیدی:** ضدباکتریایی، پاتوژن‌های مواد غذایی، روش انتشار در دیسک، ازگیل

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

### مقدمه:

غذایی مطرح می‌باشند. برخی از این تکنیک‌ها مناسب بوده، اما بسیاری سبب کاهش تمایل مصرف‌کننده به استفاده از این محصولات و نیز افزایش مقاومت پاتوژها در محیط شده است [۲]. میکروارگانیزم‌های بیماری‌زای مواد غذایی یکی از دغدغه‌های مهم بهداشت و سلامت عمومی در سرتاسر جهان هستند و دلایل بسیاری از بیماری‌ها ناشی از باکتری‌ها و ویروس‌های بیماری‌زا در انسان می‌باشند. مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها در

تغییرات اقتصادی و اجتماعی نوین به همراه تجارت بین‌المللی غذا در سطح جهانی خطر بروز بسیاری از بیماری‌های منتقل‌شونده از مواد غذایی را بیش از پیش مطرح ساخته است و در این راستا دست‌یابی به غذای سالم هم‌گام با ماندگاری بالا، لزوم استفاده از نگه‌دارنده‌های غذایی را خاطر نشان می‌سازد [۱]. با وجود تکنیک‌های بسیار متنوع برای نگهداری مواد غذایی، پاتوژن‌های مواد غذایی هنوز به عنوان یک مشکل بزرگ در صنعت مواد

\* نویسنده مسئول، نشانی: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.

پست الکترونیک: Safari\_moein@yahoo.com

تلفن تماس: ۰۹۳۶۷۲۶۳۳۴۵

پذیرش: ۹۸/۷/۲۹

اصلاح: ۹۸/۷/۲۸

دریافت: ۹۸/۱/۲۸

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 جنگل‌های شمال ایران می‌رویند. با وجود اثرات درمانی قابل توجه درخت ازگیل بررسی‌ها در مورد خواص ضد میکروبی آن در کشور بسیار محدود است. برای نمونه احمدی اسپچین و همکاران در سال ۱۳۹۲ اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی و اتانولی برگ درخت ازگیل بر باکتری‌های 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 می‌گویند 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 باکتری‌های 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  $25^{\circ}25'37''N$  و  $13^{\circ}49'11''E$  جمع‌آوری شد. پس از تایید 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 اسپچین 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 آن قرار گرفت تا کاملاً رطوبت‌زایی شود. سپس برگ‌ها توسط دستگاه آسیاب برقی به طور کامل پودر شده و درون ظرف‌های شیشه‌ای 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

ایالات متحده آمریکا گزارش کرده است که حدود ۹/۴ میلیون بیماری توسط ۳۱ مورد از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای مواد غذایی شناخته شده می‌باشد و این در حالی است که ۹۰ درصد از همه موارد این بیماری‌های ناشی از گونه‌های سالمونلا، کمپیلوباکتر، اشرشیاکلی O157; H7، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا موسیتوزنز، کلسترییدیوم‌ها، باسیلوس‌ها، نورووایروس‌ها و توکسوپلاسم‌ها است [۳]. اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس عامل بسیاری از آسیب‌های 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 از جمله گوشت، سبزیجات، سوپ، برنج، شیر و سایر فرآورده‌های لبنی توانایی تکثیر و سم‌زایی دارند. رشد این باکتری در فرم رویشی معمولاً در محدوده دمایی ۱۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد رخ می‌دهد و دمای مناسب رشد آن بین ۲۸ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد است. با این حال انواع سرمادوست باسیلوس‌ها که قادر به رشد در دمای زیر ۵ درجه سانتی‌گراد هستند نیز شناسایی شده‌اند [۶]. بین ۱ تا ۲۰ درصد تمامی موارد شیوع مسمومیت‌های غذایی در جهان به دلیل باسیلوس سرئوس بوده است [۷]. باسیلوس سرئوس می‌تواند با ایجاد دو نوع علائم استراژی 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 نگهدارنده‌های شیمیایی نیز در سال‌های اخیر مورد تردید واقع شده است [۹]. از این رو، تقاضا برای استفاده از ترکیبات طبیعی به عنوان محافظت‌کننده‌های 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 ضد میکروبی طبیعی و مؤثر که بتواند هم از لحاظ حفاظتی و هم از لحاظ پیشگیری، در مورد طیف وسیعی از باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی مؤثر 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 طعم‌دهنده مواد غذایی و هم به علت تأثیر ضد میکروبی شان توجه بسیار زیادی را به خود جلب کرده‌اند [۱۰]. ترکیبات ضد میکروبی به دست آمده از گیاهان با سازوکارهایی متفاوت از آنتی‌بیوتیک‌ها، باکتری‌ها را حذف می‌کنند 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

## 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  $5 \times 10^6$  cfu/ml، به هر یک از چاهک‌ها ۵۰ میکرولیتر محیط نوترینت برات 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 آن‌ها 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 از گیل روی باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی در جدول ۱ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که عصاره متانولی برگ از گیل 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 دیسک‌ها در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر علیه این باکتری  $31/83$  میلی متر مشاهده شد. همچنین کمترین تاثیر این عصاره علیه باکتری سالمونلاتیفی با میانگین قطر هاله عدم رشد  $16/16$  بود. نتایج حاصل از بررسی غلظت‌های مختلف عصاره علیه هر یک از باکتری‌ها نشان داد که با افزایش غلظت عصاره میزان اثرات بازدارندگی از رشد به طور معناداری افزایش می‌یابد ( $p \leq 0/01$ ).

گرم پودر برگ از گیل 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 آروژینوزا (PTCC 1430)، باسیلوس سرئوس (PTCC 1247)، باسیلوس پومیلوس (PTCC 1319) و استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1112) از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران و آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایلام تهیه شد. سویه‌های باکتریایی در محیط نوترینت برات تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم خانه گذاری شدند. به منظور انجام آزمون ضدباکتریایی از تمام سویه‌ها به صورت جداگانه با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طوج موج ۶۲۰ نانومتر، استاندارد نیم مک فارلند ( $1/5 \times 10^8$  cfu/ml) تهیه شد [۱۵].

## روش بررسی فعالیت ضدباکتریایی

به منظور بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره متانولی برگ از گیل از روش انتشار دیسک استفاده شد [۱۶]. به طور خلاصه، ابتدا بر اساس مطالعات گذشته و آزمون‌های تعیین حساسیت، رقت‌های مختلف  $62/5$ ،  $125$ ،  $250$ ،  $500$ ،  $1000$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره متانولی برگ از گیل 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 غلظت‌های مختلف عصاره آغشته شده بودند در فاصله استاندارد ( $1/5$  سانتی‌متری) از یک دیگر در محیط کشت‌ها قرار داده شدند. به منظور آزادسازی مواد موثر عصاره در محیط کشت ابتدا پلیت‌ها 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 ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) به عنوان کنترل مثبت و از دی‌متیل سولفوکساید ۱۰ درصد به عنوان کنترل منفی استفاده شد. بررسی فعالیت ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف عصاره با استفاده از اندازه‌گیری قطر هاله‌های عدم رشد اطراف باکتری انجام شد. تمام آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند.

در سطح یک درصد نشان داد که خطای آزمایش برابر صفر است ( $p < 0.01$ ).

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).

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 تأثیری روی رشد باکتری‌ها نداشته و دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) به عنوان کنترل مثبت روی تمامی سویه‌های مورد بررسی موثر بود. مقایسه قطر هاله‌های عدم رشد حاصل از تأثیر عصاره متانولی از گیل روی با کتری‌های اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و باسیلوس پومیلوس نشان داد که اثر این عصاره در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین موثر بر این سویه‌ها بیشتر بوده است ( $p < 0.01$ ). تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

جدول ۱: میانگین قطر هاله عدم رشد و انحراف معیار حاصل از تأثیر عصاره متانولی برگ از گیل و کنترل‌های مثبت و منفی علیه باکتری‌های مورد بررسی بر حسب میلی‌متر و مقادیر مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	کنترل منفی	کنترل مثبت	غلظت‌های مختلف عصاره متانولی از گیل (mg/ml)					باکتری‌ها	
				۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵	۶۲٫۵		
۲۵۰	۶۲٫۵	N	$c_0 \pm 13$	$a_0.28 \pm 19.16$	$a_0.57 \pm 17.83$	$b_0.28 \pm 15.33$	$c_0.57 \pm 12.16$	$d_0.57 \pm 11.16$	Escherichia coli O157:H7	گرم منفی
۵۰۰	۶۲٫۵	N	$G_0 \pm 22$	$D_0.28 \pm 16.16$	$E_0.57 \pm 14.67$	$F_0.57 \pm 12.33$	$F_0.57 \pm 11.5$	$F_0.57 \pm 10.33$	Salmonella typhi	گرم منفی
۵۰۰	۱۲۵	N	$i_0 \pm 27$	$D_0.57 \pm 17.16$	$E_0.76 \pm 15.83$	$F_0.28 \pm 12.66$	$F_0.57 \pm 9.66$	$H_0.57 \pm 8.16$	Pseudomonas aeruginosa	گرم مثبت
۶۲٫۵	۶۲٫۵	N	$L_0 \pm 25$	$J_0.57 \pm 21.83$	$K_0.57 \pm 28.16$	$L_0.57 \pm 24.83$	$M_0.57 \pm 20.16$	$N_0.57 \pm 17.16$	Staphylococcus aureus	گرم مثبت
۱۲۵	۶۲٫۵	N	$a_0 \pm 18$	$a_0.35 \pm 19.75$	$a_0.76 \pm 17.83$	$b_0.57 \pm 16.25$	$b_1.06 \pm 15.25$	$c_0.57 \pm 12.16$	Bacillus cereus	گرم مثبت
۲۵۰	۶۲٫۵	N	$a_0 \pm 17$	$O_0.76 \pm 18.66$	$a_0.57 \pm 16.66$	$b_0.57 \pm 15.25$	$b_0.57 \pm 14.16$	$F_0.57 \pm 9.83$	Bacillus pumilus	گرم مثبت

N: عدم تأثیر

نکته: معنادار بودن یا نبودن نتایج در دو سطح تأثیر غلظت‌های مختلف بر روی هر میکروارگانیسم به صورت جداگانه و همچنین تأثیر یک غلظت مشخص روی همه باکتری‌های مورد بررسی با حروف (a-O) نشان داده شده است. به این صورت که حروف (a-O) غیرهمسان در هر سطح نشان دهنده معنادار بودن نتایج ( $p \leq 0.01$ ) و حروف (a-O) همسان نشان دهنده معنادار نبودن نتایج ( $p > 0.01$ ) است.

MIC; Minimum inhibitory concentration

MBC; minimum bactericidal concentration

## بحث:

گیاهی است [۱۸]. از گیل 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 از گیل بررسی‌ها در مورد خواص ضد میکروبی آن در ایران و سایر نقاط جهان بسیار اندک بوده است. احمدی اسپچین و همکاران اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی و اتانولی برگ درخت از گیل بر باکتری‌های جداسازی شده از محیط بیمارستانی را مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که

امروزه یکی از نگرانی‌های اصلی مصرف‌کنندگان، تولیدکنندگان مواد غذایی و متولیان بهداشتی سلامت غذا است. گزارش‌های فراوان در زمینه عفونت‌های حاصل از غذاهای آلوده به باکتری‌های بیماری‌زا و همچنین مضرات ناشی از استفاده نگرهدارنده‌های شیمیایی ضرورت ارائه راه‌کاری سازنده برای افزایش امنیت و نیز سلامت مواد غذایی را آشکار می‌سازد. امروزه یکی از روش‌های نوین کنترل باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی استفاده از ترکیبات مشتق شده از گیاهان و عصاره‌های

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 اسپچین، حیدری سورشجانی و همکاران و همچنین زندگی و همکاران مطابقت دارد که افزایش غلظت‌های مختلف عصاره منجر به افزایش فعالیت ضدباکتریایی و افزایش قطر هاله عدم رشد می‌شود [۲۸، ۲۵، ۲۴]. طبق بررسی‌های انجام شده توسط پژوهشگران خاصیت ضد میکروبی بسیاری از گیاهان دارویی احتمالاً به دلیل وجود متابولیت‌های ثانویه فراوان از جمله ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها است که در برگ این گیاهان وجود دارد [۲۹]. فلاونوئیدها 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 [۳۱-۳۲]. برای نمونه، میتانی و همکاران نشان دادند که ترکیبات فنولی و فلاونوئیدهای موجود در عصاره زردآلوی چینی دارای اثرات ضدباکتریایی بر علیه باکتری‌های سیتروباکتر فرئوندی، انتروباکتر آئروژنز، انتروباکتر کلاسه، اشرشیاکلی، کلسیلا اوکسیتوکا، پروتئوس میرابلیس و سالمونلا انتریکا است [۳۳]. همچنین بشیر و همکاران نشان دادند که فلاونوئیدهای موجود در عصاره گیاهان دارویی دارای اثرات مهارکنندگی علیه اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد [۳۴]. ترکیبات فنولی و به ویژه فلاونوئیدها از طریق سازوکارهای مختلفی می‌توانند به عنوان یک عامل ضد میکروبی عمل کنند. از جمله این سازوکارها می‌توان 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 اسپچین با بررسی هم‌زمان خواص آنتی‌اکسیدانی 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

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 به خوبی نشان داد که عصاره متانولی برگ ازگیل دارای اثرات ضدباکتریایی قابل توجهی روی باکتری‌های بیماری‌زای 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 کلسیلا پنومونیه و ویبریولا 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 مونوسیتوزنز 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 باکتری‌های مهم در ایجاد مسمومیت‌های غذایی در انسان است [۴]. این نتایج با داده‌های به دست آمده از مطالعه صفری و احمدی اسپچین (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 داده‌های به دست آمده از مطالعه زندگی 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 اسپچین و احمدی اسپچین و همکاران کاملاً مطابقت دارد [۲۴]. همچنین در مطالعات مشابه‌ای صفری و همکاران و طالبی ورنوسفادانی نشان دادند که اثر عصاره‌های مختلف گیاهان دارویی روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است [۲۶، ۱۵]. یک توضیح احتمالی برای حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به

نخستین بار گزارش می‌شود. نتایج مطالعه حاضر به خوبی نشان داد که عصاره متانولی برگ ازگیل روی باکتری‌های بیماری‌زای 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 باکتری‌ها و سایر عوامل بیماری‌زا به منظور دستیابی به یک ترکیب نگهدارنده جدید پیشنهاد می‌شود.

### 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 منافی وجود ندارد.

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 پتانسیل 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 بیماری‌زای 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

## 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.

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 *Echium amoenum* 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, Makhoulfi 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 Toloobehdasht Sci* 2015; 15(4): 22-33.
26. Talebi Varnosfaderani F, Mohammadi Sichani M, Anjad 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 Infection 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.

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

Moein Safari<sup>1\*</sup>, Salman Ahmady-Asbchin<sup>2</sup>, Maryam Kamali<sup>3</sup>

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