مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره نهم، شماره دوازدهم، اسفند ۹٤
صفحه ١٦ الی ٢٤

مقاله پژوهشی
(Original Article)

تأثیر ضدباکتریایی عصاره متانولی و آبی میوه گیاه *واکسینیوم آرکتوستافیلوس* بر *اشرشیاکلی* بیماری‌زای گوارشی در شرایط آزمایشگاهی

فاطمه معینی[1]، مریم محمدی سیچانی[1*]، کهین شاهانی‌پور[2]

[1]گروه میکروب‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

[2]گروه بیوشیمی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سویه‌های انتروپاتوژنیک *اشرشیاکلی* عامل طیف وسیعی از عفونت‌های گوارشی، به‌ویژه در کشورهای درحال توسعه می‌باشند. این تحقیق با هدف تعیین اثر ضدباکتریایی عصاره‌های متانولی و آبی میوه گیاه *واکسینیوم آرکتوستافیلوس* بر روی *اشرشیاکلی* بیماری‌زای گوارشی در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه آزمایشگاهی، عصاره متانولی و آبی از میوه گیاه *واکسینیوم آرکتوستافیلوس* به دو روش خیساندن و سوکسله تهیه گردید. اثر ضدمیکروبی این عصاره‌ها روی دو سویه استاندارد *اشرشیاکلی* (ATCC:۲۵۹۲۲ و ATCC:۸۷۳۹) و ۱۲ سویه بالینی از *اشرشیاکلی* انتروپاتوژنیک با استفاده از روش انتشار در آگار بررسی شد. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) به روش میکرودایلوشن تعیین گردید. از آزمون آنالیز واریانس و تی مستقل برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: تمام سویه‌های مورد مطالعه *اشرشیاکلی* نسبت به عصاره متانولی و آبی میوه گیاه *واکسینیوم آرکتوستافیلوس* حساس بودند. میانگین قطر هاله عدم رشد ناشی از عصاره‌ها در محدوده ۱۸/۸-۶/۱ میلی‌متر به دست آمد. آزمون آماری نشان داد ارتباط معنی‌داری بین افزایش غلظت عصاره‌ها و قطر هاله عدم رشد وجود دارد ($p<۰/۰۰۱$). همچنین مقادیر MIC، بین ۲۰۰-۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و مقادیر MBC، بین ۴۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج این مطالعه، عصاره متانولی و آبی تهیه‌شده از میوه گیاه *واکسینیوم آرکتوستافیلوس* بر روی رشد *اشرشیاکلی* بیماری‌زای گوارشی، اثر مهارکنندگی دارد.

کلید واژه‌ها: *اشرشیاکلی*؛ *واکسینیوم*؛ عصاره گیاهان؛ اثر مهارکنندگی.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
مریم محمدی سیچانی، گروه میکروب‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
mohamadi_m@iaufala.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۱۷

تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۲۱

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Moini F, Mohammadi Sichani M, Shahanipoor K. The Antibacterial effect of methanol and aqueous extracts of vaccinium arctostaphylos fruit on enteropathogenic *Escherichia coli* in vitro. Qom Univ Med Sci J 2016;9(12):16-24. [Full Text in Persian]

مقدمه

اشرشیاکلی بخشی از باسیل‌های گرم منفی فلور طبیعی روده بزرگ انسان و حیوانات را تشکیل می‌دهد و نقش مهمی در فیزیولوژی سیستم گوارشی به عهده دارد. سویه‌های بیماری‌زای *اشرشیاکلی* به‌واسطه عوامل ژنتیکی قابل‌انتقال مانند پلاسمیدها، ترانسپوزن‌ها، باکتریوفاژها و لوکوس‌های پاتوژنیسیتی فاکتورهای بیماری‌زایی را کسب می‌کنند. بروز اسهال، عفونت‌های دستگاه ادراری، مننژیت و سپتی‌سمی از مهم‌ترین عفونت‌های سویه‌های بیماری‌زای *اشرشیاکلی* هستند. سویه‌های *اشرشیاکلی* مولد اسهال براساس خصوصیت ویرولانس، مکانیسم بیماری‌زایی و علائم کلینیکی به پاتوتایپ‌های مختلف تقسیم‌بندی می‌شوند. *اشرشیاکلی* انتروپاتوژنیک، عامل بیماری اسهال نوزادان و کودکان به‌صورت تک‌گیر و همه‌گیر در کشورهای در حال توسعه بوده و از قدیمی‌ترین پاتوتایپ‌های شناسایی‌شده *اشرشیاکلی* می‌باشد. *اشرشیاکلی* انتروپاتوژنیک در روده کوچک تکثیر یافته و باعث اسهال حاد و غیرخونی می‌شود. این ارگانیسم از طریق اتصال به دیواره روده باعث به‌هم‌ریختگی ساختار سلول‌های اپی‌تلیال روده و منجر به ایجاد ضایعات هیستوپاتولوژیک در سطح روده می‌شود که با این عمل پدیده جذب و دفع روده مختل می‌گردد. در صورت بروز اسهال خونی، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، تنها راه درمان محسوب می‌شود، لیکن استفاده نابجا و فراوان از آنتی‌بیوتیک‌ها نه تنها منجر به بروز عوارض جانبی در بیمار می‌شود؛ بلکه ظهور سوش‌های باکتریایی با مقاومت‌های دارویی چندگانه را نیز به همراه دارد (۲،۱). عصاره‌های گیاهی و ترکیبات فعال موجود در آنها، به‌علت داشتن اثرات شناخته‌شده ضدباکتریایی، کاربرد زیادی در طب سنتی و کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا و عامل فساد غذایی دارند. با توجه به مقاومت دارویی و عوارض جانبی داروهای ضدمیکروبی شیمیایی، در چند دهه اخیر رویکرد تحقیقات علمی به‌سوی دستیابی به مواد فعال بیولوژیک گیاهی بوده است. گیاهان را می‌توان به‌عنوان منبعی از مواد شیمیایی بالقوه مفید دانست که تنها بخشی از آنها مورد بهره‌برداری قرار گرفته‌اند (۳). جنس *واکسینیوم*، از خانواده *اریکاسه* به‌صورت درختچه‌هایی با برگهای ساده و معمولاً همیشه سبز می‌باشد.

تعداد ۴۵۰-۱۵۰ گونه برای این گیاه تخمین زده شده است. گونه‌های مختلف آن در دامنه کوهها و مناطق مرتفع و برخی نیز در مناطق گرمسیری می‌رویند. میوه گیاهان این جنس، ارزش غذایی زیادی دارد (۴). این گیاه دارای برگهای متناوبی است که در برخی از گونه‌ها در زمستان می‌ریزد، اما در برخی دیگر، پایدار و همیشه سبز است. برگهای این گیاه، مضرس و دارای دندانه‌های ظریف می‌باشد. گلها نیز معمولاً محوری یا انتهایی هستند و ممکن است به‌صورت منفرد، در پوششی به شکل خوشه یا سنبله قرار گیرند. میوه‌ها به‌صورت سته‌ای در یک پوشش قرار گرفته و دارای دانه‌های فراوان هستند که در بسیاری از گونه‌ها ارزش خوراکی دارند. میوه گیاهان مربوط به این جنس ممکن است به رنگ‌های قرمز، آبی، مشکی، ارغوانی و یا سبز متمایل به زرد دیده شود (۵). از گیاهانی‌که در جنس *واکسینیوم* قرار دارند اثرات ضدمیکروبی، ضدویروسی، ضدسرطان، ضددیابت و آنتی‌اکسیدانی گزارش شده است. ترکیبات فنلی، آنتوسیانین، میریستین، کاروارکول و تیمول موجود در عصاره این گیاهان می‌تواند از رشد پاتوژن‌های روده‌ای ممانعت کند (۱۰-۶). از دیگر فعالیت‌های ضدمیکروبی این گیاهان، جلوگیری از عفونت مجاری ادراری، درمان ناراحتی‌های گوارشی و کاهش فشار خون است. همچنین ثابت شده است گیاهان جنس *واکسینیوم* از رشد و تکثیر تومورها و ایجاد سرطان ممانعت به عمل می‌آورند (۱۰،۷،۶). فلاونوئید یکی از آنتی‌اکسیدان‌های قوی موجود در گیاه دارای اثرات ضدالتهابی، ضدآلرژی، ضدسرطانی و اثر ضدمیکروبی می‌باشد (۹). گونه‌های *واکسینیوم اکسی کوکوس* و *واکسینیوم ماکروکارپن* در اروپا و امریکا به فراوانی رشد می‌کنند. *واکسینیوم میرتیلوس* در نواحی شمالی اروپا و *واکسینیوم سیمولاتوم*، *واکسینیوم پالادیوم* و *واکسینیوم اوالیفولیوم* در جنوب کشور آمریکا می‌رویند. در چین، گونه *واکسینیوم اولیژینوسوم* و در نواحی غرب آسیا و مالزی نیز گونه‌های *واکسینیوم براکتیتوم* و *واکسینیوم میرتوائیدس* شناسایی شده‌اند. *واکسینیوم آرکتوستافیلوس*، تنها گونه‌ای از این جنس است که در ایران رشد می‌کند. این گیاه در شمال و شمال شرقی ایران، ارتفاعات استان گیلان، کلاردشت، خانقاه اردبیل و آذربایجان غربی می‌روید. میوه‌های این گیاه سته‌ای پر بذر است و به‌صورت جانبی یا انتهایی

تولید شده و به رنگ‌های قهوه‌ای، قرمز مایل به قهوه‌ای، سیاه و آبی دیده می‌شود (۱۴-۱۱). این مطالعه با هدف تعیین اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی و آبی میوه گیاه *Vaccinium arctostaphylos* بر *اشرشیاکلی* بیماری‌زای گوارشی در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه، میوه گیاه *واکسینیوم آرکتوستافیلوس* در تابستان سال ۱۳۹۲، از رویشگاه‌های اطراف شهر تبریز جمع‌آوری شد. نمونه‌ها، مورد تأیید هرباریوم گیاه‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان قرار گرفت. میوه‌ها در شرایط مناسب و در سایه خشک و پودر شدند، سپس عصاره‌گیری از میوه گیاه *واکسینیوم آرکتوستافیلوس* به دو روش خیساندن و سوکسله با استفاده از متانول و آب مقطر استریل صورت گرفت. برای تهیه عصاره متانولی و آبی به روش خیساندن، ۱۰۰ گرم از پودر میوه گیاه *واکسینیوم آرکتوستافیلوس* به ارلن حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال مورد نظر اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر ۹۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس مخلوط حاصله با کاغذ صافی واتمن شماره ۲ صاف گردید (۱۵). به‌منظور تهیه عصاره متانولی و آبی به روش سوکسله، ۴۰ گرم از پودر میوه گیاه *واکسینیوم آرکتوستافیلوس* با دستگاه سوکسله همراه با۲۵۰ میلی‌لیتر حلال مورد نظر (آب مقطر یا متانول)، عصاره‌گیری شد. عصاره‌ها به‌منظور حذف حلال در دمای محیط خشک شدند. عصاره‌های خشک‌شده تا زمان انجام آزمایش، در ظروف تیره در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۱۶). سپس غلظت‌های۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هریک از عصاره‌ها تهیه گردید (۸).

در این پژوهش، از دو سویه استاندارد *اشرشیاکلی* (ATCC:۲۵۹۲۲ و ATCC:۸۷۳۹) و ۱۲ نمونه بالینی *اشرشیاکلی* بیماری‌زای گوارشی استفاده شد. نمونه‌های استاندارد به‌صورت لیوفیلیزه از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و نمونه‌های بالینی از آزمایشگاه‌ها و بیمارستان‌های شهر اصفهان تهیه گردید. به‌منظور شناسایی ایزوله‌های بالینی *اشرشیاکلی* از خصوصیات ماکروسکوپی کلنی بر روی محیط کشت EMB، مک‌کانکی آگار و هکتون انتریک آگار استفاده شد. همچنین خصوصیات این جنس با تست‌های بیوشیمیایی اندول، سیترات، حرکت، ژلاتین، اوره، کاتالاز، اکسیداز، MR، VP و تولید H_2S تأیید گردید. به‌منظور تهیه سوسپانسیون باکتریایی از کشت تازه و جوان باکتری، چند کلنی به محیط کشت مولر هینتون براث منتقل شد. جهت یکسان‌نمودن کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه‌شده مطابق با لوله شماره ۰/۵ استاندارد مک‌فارلند (کدورت معادل $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی‌لیتر)، جذب نوری سوسپانسیون در طول موج ۶۳۰ نانومتر در محدوده ۰/۱-۰/۰۸ تنظیم گردید (۱۸،۱۷). همچنین به‌منظور بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره‌ها، غلظت‌های ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هریک از عصاره‌ها در محیط کشت مولرهینتون براث تهیه شد. فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها به روش انتشار در آگار مورد بررسی قرار گرفت. به کمک سواب استریل از کدورت معادل $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی‌لیتر بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار به‌صورت یکنواخت کشت داده شد. سپس چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر در محیط کشت ایجاد گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از هر غلظت از عصاره‌ها در هر چاهک ریخته شد. از آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین به‌عنوان شاهد مثبت استفاده گردید. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد، قطر هاله عدم رشد نمونه‌های باکتریایی برحسب میلی‌متر برای هریک از عصاره‌ها اندازه‌گیری شد (۱۷). حداقل غلظت مهارکنندگی

(Minimal Inhibitory Concentration, MIC) و حداقل غلظت کشندگی

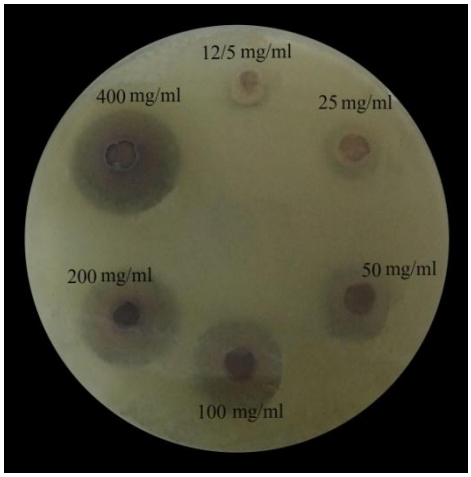
(Minimal Bactericidal Concentration, MBC) عصاره‌ها به روش میکرودایلوشن تعیین گردید. در این روش، میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته گرد استریل خانه شماره ۶-۱، مربوط به رقت‌های ۴۰۰-۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ها بود. ردیف ۷، کنترل مثبت و ردیف ۸، کنترل منفی درنظر گرفته شد. در خانه‌های ۶-۱ هر ردیف، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت مربوط به هر خانه اضافه شد و در ردیف ۷، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث و در ردیف ۸، ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مولرهینتون براث اضافه شد. در تمام خانه‌ها به استثنای ردیف ۸، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با کدورت معادل $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ باکتری

در هر میلی‌لیتر اضافه شد. بلافاصله بعد از تلقیح چاهک‌ها، میزان جذب در دستگاه ELISA Reader در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت گردید. سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد و مجدداً جذب آن به‌وسیله دستگاه ELISA Reader قرائت گردید. از مقایسه میزان جذب نوری قبل و بعد از انکوباسیون در هریک از چاهک‌ها، همچنین بررسی چشمی کدورت ایجادشده در چاهک‌ها، کمترین رقت از غلظت عصاره‌ها که در چاهک مربوط به آن غلظت، کدورتی مشاهده نمی‌شد، به‌عنوان میزان MIC در نظر گرفته شد. به‌منظور تعیین MBC عصاره‌های مورد آزمایش، ۵۰ میکرولیتر از چاهک‌های مربوط به MIC و ۳ چاهک مربوط به غلظت‌های بیشتر از عصاره مورد آزمایش که کدورت قابل‌تشخیصی نداشتند، بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار به‌صورت خطی کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، رشد باکتری بر روی پلیت‌ها مورد بررسی قرار گرفت. غلظتی از عصاره مورد آزمایش که بر روی محیط کشت جامد مربوط به آن هیچ‌گونه رشدی از باکتری مشاهده نمی‌شد، به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد. به‌منظور تأیید نتایج، آزمایشها ۳ بار تکرار گردید (۱۸). ترکیبات مؤثره گیاهی با استفاده از دستگاه GC/MS شامل ردیاب جرمی *Agilent* 5975 C با منبع یونیزاسیون الکترونی (EI) کوپل‌شده با دستگاه کروماتوگرافی گازی *Agilent* 7890 از ستون HP-5MS با طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر تعیین شد. دمای محل تزریق دستگاه کروماتوگرافی گازی، ۲۸۰ درجه سانتیگراد، دمای منبع یونیزاسیون ردیاب جرمی، ۱۵۰ درجه سانتیگراد، دمای آنالایزر (کوادروپل)، ۲۳۰ درجه سانتیگراد و دمای واسط روی ۲۸۰ درجه سانتیگراد تنظیم گردید. گاز هلیوم با سرعت ثابت ۱/۲ میلی‌لیتر بر دقیقه وارد ستون شد و به‌منظور جداسازی، برنامه‌ریزی، دمای آون بدین صورت انجام گرفت:

دما در ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه ثابت و سپس تا ۲۰۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۸ درجه سانتیگراد بر دقیقه و در نهایت تا ۲۹۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۲۰ درجه سانتیگراد بر دقیقه افزایش و ۳ دقیقه در این دما ثابت نگه داشته شد. برای اندازه‌گیری روغن‌های فَرار ضروری موجود در نمونه از سیستم Head space استفاده گردید که نمونه در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه از دو نمونه استاندارد (ATCC: 8739, ATCC: 25922) و ۱۲ نمونه بالینی *اشرشیاکلی* بیماری‌زای گوارشی استفاده شد. سویه‌های بالینی *اشرشیاکلی*، به‌وسیله تست‌های بیوشیمیایی و کشت بر روی محیط کشت افتراقی انتخابی تأیید گردید. با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله عدم رشد نیز افزایش یافت (شکل).



شکل: تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی تهیه‌شده به روش خیساندن بر سویه‌ای از *اشرشیاکلی*

در جدول شماره ۱ میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۴ سویه آزمایش‌شده از *اشرشیاکلی* در مجاورت با غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی و آبی تهیه‌شده به دو روش خیساندن و سوکسله نشان داده شده است. آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین، هاله عدم رشدی در حدود ۵/۴±۳۱/۹ نشان داد. در روش انتشار در آگار عصاره متانولی و آبی بر روی ۱۴ نمونه *اشرشیاکلی*، بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد، ۱۸/۸ و کمترین قطر هاله عدم رشد، ۶/۱ میلی‌متر بود. قطر هاله عدم رشد در نمونه‌های مورد آزمون با افزایش غلظت عصاره میوه *واکسینیوم آرکتوستافیلوس*، افزایش یافت.

سنجش نتایج به‌دست‌آمده با اثر ممانعت‌کنندگی آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین، نشان داد میانگین قطر هاله عدم رشد در رابطه با آنتی‌بیوتیک بیشتر از میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره‌ها می‌باشد؛ زیرا میانگین قطر هاله عدم رشد ناشی از آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین بر روی *اشرشیاکلی*، ۳۱/۹ میلی‌متر به دست آمد. آزمون واریانس یک‌طرفه، اختلاف بین قطر هاله عدم رشد ناشی از عصاره و آنتی‌بیوتیک را معنی‌دار نشان داد ($p<۰/۰۰۱$). هیچ‌یک از غلظت‌های عصاره آبی، فعالیت کشندگی نشان ندادند. همچنین بیشترین مقدار MBC، ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. کمترین مقدار MIC و بیشترین مقدار آن نیز به ترتیب ۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

جدول شماره ۱: میانگین قطرهاله عدم رشد عصاره‌های مختلف میوه *واکسینیوم آرکتوستافیلوس* بر روی *اشرشیاکلی* (برحسب میلی‌متر)

غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	عصاره			
	متانولی		آبی	
	خیساندن	سوکسله	خیساندن	سوکسله
۴۰۰	۱۸/۸ ± ۳/۲	۱۵/۳ ± ۲/۴	۱۷/۶ ± ۲/۶	۱۵/۳ ± ۳/۳
۲۰۰	۱۳/۶ ± ۴/۲	۱۱/۱ ± ۲/۱	۱۳/۱ ± ۲/۰	۱۰/۶ ± ۳/۳
۱۰۰	۹/۷ ± ۳/۴	۸/۰ ± ۲/۷	۸/۰ ± ۲/۷	۱۰/۶ ± ۳/۳
۵۰	۶/۸ ± ۲/۱	۶/۱ ± ۰/۵	۶/۲ ± ۰/۸	۶/۱ ± ۰/۴
۲۵	۶/۲ ± ۰/۹	----	----	----
۱۲/۵	----	----	----	----

ترکیبات شناسایی‌شده *Vaccinium arctostaphylos* توسط شاخص بازداری کواتس و طیف جرمی به ترتیب مقادیر ۳۵/۶ و ۸/۴٪ را به خود اختصاص داد که به‌طورکلی آلفا- بیس آبولول اکسید A، بیشترین مقدار را نسبت به سایر ترکیبات شناسایی‌شده داشت و کمترین مقدار شناسایی‌شده نیز مربوط به گاما- ترپینن بود (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: ترکیبات شناسایی‌شده در میوه *واکسینیوم ارکتوستافیلوس* براساس شاخص بازداری کواتس

ردیف	نام ترکیب	زمان بازداری	درصد	شاخص بازداری کواتس
۱	**آلفا فلاندرن**	۸/۲	٪۵/۱	۱۰۰۵
۲	**بتا فلاندرن**	۸/۷	٪۱/۲	۱۰۳۰
۳	**گاما- ترپینن**	۹/۳	٪۰/۸	۱۰۶۱
٤	**آلفا بیس آبولول اکسید**	۲۰/۶	٪۲۸/۶	۱۷۴۲

بحث

در دهه‌های اخیر، مقاومت میکروبی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، تلاش‌های جدی را برای کشف داروهای جدید به همراه داشته است. همچنین تحقیقات بسیاری در زمینه شناسایی و استفاده از ترکیبات فعال گیاهی صورت گرفته است.

در واقع، استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌های عفونی، از هزاران سال پیش کاربرد داشته است؛ زیرا ترکیبات موجود در گیاهان می‌توانند مانند یک آنتی‌بیوتیک عمل کنند (۱۹،۲۰). طاهرپور (سال ۲۰۱۱) طی گزارشی بیان کرد گیاه *Vaccinium arctostaphylos* *به‌عنوان* یک گیاه دارویی مفید، در علم پزشکی اهمیت فراوانی برای درمان بیماری‌ها و افزایش سلامت افراد دارد؛ زیرا این گیاه دارای ترکیبات مفیدی می‌باشد. از جمله بیماری‌هایی که ممکن است با این گیاه درمان شوند شامل: بیماری‌های قلبی، بیماری‌های دهان، عفونت ادراری، سنگ کلیه، سرطان، بیماری‌های گوارشی و... می‌باشد (۱۳). از آنجایی‌که تاکنون تحقیقی در ارتباط با فعالیت ضدمیکروبی *واکسینیوم آرکتوستافیلوس* بر روی باکتری *اشرشیاکلی* بیماری‌زای گوارشی انجام نشده، لذا این پژوهش به بررسی آزمایشگاهی فعالیت مهاری این گونه از *واکسینیوم* بر باکتری *اشرشیاکلی* بیماری‌زای گوارشی پرداخت. نتایج نشان داد در باکتری *اشرشیاکلی*، عصاره آبی به روش خیساندن و سوکسله، همچنین عصاره متانولی به روش سوکسله (در غلظت‌های ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و عصاره متانولی به روش خیساندن علاوه بر این غلظت‌ها، در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نیز دارای اثر مهاری بر *اشرشیاکلی* می‌باشد. تجزیه و تحلیل نتایج حاصله از تأثیر عصاره متانولی و آبی تهیه‌شده به دو روش خیساندن و سوکسله گیاه *واکسینیوم آرکتوستافیلوس* بر باکتری *اشرشیاکلی* بیماری‌زای گوارشی نشان داد اثر مهاری عصاره تهیه‌شده به روش خیساندن بیش از اثر مهاری همان نوع عصاره به روش سوکسله است ($p<۰/۰۰۱$). به‌طورکلی، اثر مهاری عصاره‌های متانولی، بیشتر از عصاره‌های آبی تهیه‌شده با استفاده از روش یکسان بود. نتایج به‌دست‌آمده از روش MIC، نتایج چاهک را تأیید کرد. همچنین میانگین قطر هاله عدم رشد در تمامی غلظت‌هایی که اثر مهاری داشتند، به‌طور معنی‌داری نسبت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین کمتر بود ($p<۰/۰۰۱$). سایر گونه‌های جنس *واکسینیوم* نیز گیاهان مفیدی هستند که در طب سنتی و علم پزشکی کاربرد داشته و تحقیقات متعددی نیز بر روی آنها انجام شده است. Puupponen-Pimiä و همکاران (سال ۲۰۰۱) ثابت کردند *V. myrtillus*، *V. vitisidaea* و *V. oxycoccos* دارای ترکیباتی مانند فلاونوئید و اسیدهای فنلی بوده و به‌علت داشتن همین ترکیبات دارای اثر ضدباکتریایی بر روی باکتری‌های بیماری‌زای گوارشی مانند *اشرشیاکلی* می‌باشند (۹). همچنین Cesoniene و همکاران (سال ۲۰۰۹) به اثبات ویژگی‌های ضدمیکروبی *V.oxycoccos* به روش انتشار چاهک برعلیه باکتری‌های گرم منفی مانند *اشرشیاکلی* پرداختند و به نتایج مثبتی دست یافتند. در این تحقیق، قطر هاله عدم رشد بین ۲۰-۱۳ میلی‌متر گزارش شد (۲۱). لازم به ذکر است در تحقیق حاضر میانگین قطر هاله عدم رشد ناشی از عصاره‌های متانولی و آبی *V.arctostaphylos* بر *اشرشیاکلی* بین ۲۹/۳-۶/۳ میلی‌متر به دست آمد. بنابراین، تفاوت در مقادیر قطر هاله عدم رشد می‌تواند به‌علت متفاوت بودن نوع حلال مورد استفاده جهت تهیه عصاره و متفاوت بودن نوع ترکیبات فعال شیمیایی موجود در گیاه به دلیل شرایط آب و هوایی متفاوت برای رشد، تازگی عصاره تهیه‌شده و روش مورد استفاده برای تعیین اثر ضدباکتریایی باشد. Kylli و همکاران (سال ۲۰۱۱) آزمایشهایی بر روی *V. macrocarpon*، *V. vitisidaea* و *V. myrtillus* انجام دادند. آنها گزارش کردند این گیاهان دارای اثر ضدمیکروبی بر روی باکتری *اشرشیاکلی* می‌باشند (۲۲). نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق نیز تأییدکننده اثر ضدمیکروبی *V. arctostaphylos* بر روی *اشرشیاکلی* بیماری‌زای گوارشی بوده که رشد آن را مهار می‌کند. همچنین طی تحقیقی توسط Lacombe و همکاران (سال ۲۰۱۲)، اثر ضدمیکروبی *V. angustifolium* بر مهار رشد برخی از باکتری‌های بیماری‌زا از جمله *E.coli* O157:H7 ثابت گردید و این محققان دلیل آن را ناشی از وجود ترکیباتی مانند فنل‌های مونومریک، پروآنتوسیانیدین و آنتوسیانیدین در گیاه دانستند، همچنین در این تحقیق، قطر هاله عدم رشد، تقریباً بین ۲۲-۱۰ میلی‌متر گزارش شد (۲۳). در تحقیق حاضر نیز اثر ضدمیکروبی *V. arctostaphylos* بر مهار رشد *اشرشیا کلی* بیماری‌زای گوارشی ثابت گردید و

میانگین قطر هاله عدم رشد برای باکتری *اشرشیاکلی* در محدوده ۱۸/۸-۶/۱ میلی‌متر تعیین شد. Vucic و همکاران (سال ۲۰۱۳) در مطالعه خود با استفاده از سه حلال اتیل استات، اتانول و آب جهت عصاره‌گیری از برگ و میوه دو گیاه *V. myrtillus* و *V.erythrocarpum*، خاصیت ضدمیکروبی عصاره این گیاهان را بر مهار رشد *اشرشیاکلی* بیماری‌زای گوارشی نشان دادند. نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق، اثر ضدباکتریایی برعلیه باکتری *اشرشیاکلی* بیماری‌زای گوارشی عصاره *V. erythrocarpum* و *V. myrtillus* را ثابت کرد و نشان داد عصاره اتانولی دارای بیشترین اثر ممانعت‌کنندگی می‌باشد. همچنین در این تحقیق اثر مهاری عصاره‌ها نسبت به اثر مهاری آنتی‌بیوتیک مقایسه گردید که با استفاده از آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین به‌عنوان شاهد مثبت، نشان داده شد آنتی‌بیوتیک به‌طور میانگین اثر مهاری بهتری نسبت به عصاره‌های گیاهی دارد، همچنین مقدار MIC با استفاده از دو روش ماکرودایلوشن و میکرودایلوشن، مشخص و بین ۴۰-۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تخمین زده شد (۲۴). در تحقیق حاضر نیز مقدار MIC و MBC با استفاده از روش میکرودایلوشن مشخص گردید و مقدار MIC برای باکتری *اشرشیاکلی* در مورد عصاره متانولی، بین ۲۰۰-۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در مورد عصاره آبی بین ۲۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد که این مقادیر نسبت به مقدار MIC مشخص‌شده در تحقیق Vucic، بالاتر بود. شاید علت این اختلاف، متفاوت بودن عواملی چون نـوع و میـزان ترکیبات ضدمیکروبی موجود در گونه گیاهی، حلال مورد استفاده جهت عصاره‌گیری، بخش مورد استفاده گیاه و یا زمان ماندگاری عصاره در اختلاف مشاهده‌شده بوده است. مقدار MBC برای *اشرشیاکلی* در رابطه با عصاره متانولی بین ۴۰۰-۱۰۰ گزارش شد. عصاره آبی در مورد باکتری *اشرشیاکلی* فاقد خاصیت کشندگی بود. از مقایسه مقادیر MIC و MBC استنباط می‌گردد عصاره متانولی دارای اثر ضدمیکروبی قوی‌تری نسبت به عصاره آبی این گیاه می‌باشد. عصاره متانولی یک حلال قطبی است و آلکالوئیدها و فلاونوئیدها، از جمله فلاون‌ها، فلاونول‌ها و ایزوفلاون‌ها با حلال قطبی متانول، بهتر استخراج می‌شوند. به‌علاوه، عصاره‌های متانولی قادر به استخراج تانن نیز هستند (۲۳،۲۱).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، خاصیت ضدباکتریایی عصاره متانولی و آبی میوه *واکسینیوم آرکتوستافیلوس* بر روی *اشرشیاکلی* بیماری‌زای گوارشی بررسی شد. یافته‌های حاصل در این پژوهش پس از انجام ۳ بار تکرار به روش انتشار در آگار و روش میکرودایلوشن، نشان داد به‌طور میانگین عصاره متانولی در مقایسه با عصاره آبی، اثر مهاری بیشتری بر باکتری *اشرشیاکلی* دارد. همچنین به‌طور میانگین، اثر مهاری عصاره تهیه‌شده به روش خیساندن، بیشتر از اثر مهاری همان نوع عصاره (تهیه‌شده به روش سوکسله) می‌باشد.

References:

1. Kalantar E, Soheili F, Salimi H, Soltan Dallal M. Frequency, antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of Escherichia coli pathotypes obtained from children with acute diarrhea. Jundishapur J Microbiol 2011;4(1):23-8.

2. Alikhani M, Hashemi S, Aslani M, Farajnia S. Prevalence and antibiotic resistance patterns of diarrheagenic Escherichia coli isolated from adolescents and adults in Hamedan, Western Iran. Iran J Microbiol 2013;5(1):42-7.

3. Aliporyegane M, Tajik H, Zadehashem E, Farkhondeh T, Sadighara P, Sabah S. Inhibitory Effect of garlic extract on the growth of Salmonella typhimurium and Shigella dysenteric. J Knowl Health 2008;4(2):6-9. [Full Text in Persian]

4. Luby JJ, Ballington JR, Draper AD, Pliszka K, Austin M. Blueberries and cranberries (Vaccinium). J Genet Res Temp Fruit Nut Crops 1991;2(20):617-23.

5. Uttal L. The Genus Vaccinium L (Ericaceae) in virginia. J South Appalach Bot Soc Stable 1987;52(4):231-55.

6. Guha S, Cao M, Kane RM, Savino AM, Zou S, Dong Y. The longevity effect of cranberry extract in Caenorhabditis elegans is modulated by daf-16 and osr-1. Age 2013;35(5):1559-74.

7. Pervin M, Hasnat MA, Lim BO. Antibacterial and antioxidant activities of Vaccinium corymbosum L. leaf extract. Asian Pac J Trop Dis 2013;3(6):444-53.

8. Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Hartmann-Schmidlin S, Kähkönen M, Heinonen M, Määttä-Riihinen K, et al. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. J Appl Microbiol 2005;98(4):991-1000.

9. Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Meier C, Kähkönen M, Heinonen M, Hopia A, et al. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. J Appl Microbiol 2001;90(4):494-507.

10. Benzie I, Wachtel-Galor S. Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press; 2011.

11. Khalili A, Khosravi MB, Nekooeian AA. The effects of aqueous extract of vaccinium arctostaphylos leaves on blood pressure in renal hypertensive rats. Iran Red Cres Med J 2011;13(2):123-7.

12. Sedaghathoor S. Seed dormancy and germination of vaccinium arctostaphylos L. Int J Bot 2007;3(3):307-11.

13. Taherpour A. Effect investigation of Aqueous Cranberry (Vaccinium arctostaphylos L.) Extract in accompanied with Antibiotics on Urinary Tract Infections (UTI) Created by Escherichia coli in vitro. In: Nikibakhsh A, Editor. Clinical management of complicated urinary tract infection. New York: InTech; 2011;65:265-80.

14. Trehane J. Reviews of Blueberries, Cranberries and other vacciniums. USA: Timber Press; 2004.

15. Moosavian M, Siahpoosh A, Abbasi E, Darabifar H. The effects of hydro-ethanolic Albizzia lebbeck extract on enteric gram-negative and aerobic gram-positive bacilli. Arak Uni Med Sci J 2010;13(1):119-26. [Full Text in Persian]

16. Sadeghian A, Rakhshande H, Sadeghian M, Sadeghian H. Effect of methanolic extract of Plumbago Europaea on Candida albicans. Iran J Med Arom Plants 2007;22(1):60-4. [Full Text in Persian]

17. Kumar S, Joseph L, George M, Bharti V. Antimicrobial activityof methanolic extract of Rumex nepalensis. Int J Pharm Pharmaceut Sci 2011;3:240-2.

18. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nat Protocols 2008;3(2):163-175.

19. Singh A, Duggal S, Kaur N, Singh J. Berberine: Alkaloid with wide spectrum of pharmacological activities. J Nat Products 2010; 3(2010):64-75.

20. Tagoe D, Gbadago F. A comparison of the antimicrobial effectiveness of aqueous extracts of garlic, ginger and lime and two conventional antibiotics on Escherichia coli, Salmonella spp, Shigella spp, and Bacillus cereus. Int J Microbiol 2010;8(2):1-6.

21. Cesoniene L, Jasutiene I, Sarkinas A. Phenolics and anthocyanins in berries of European cranberry and their antimicrobial activity. Medicina 2009;45(12):992-9.

22. Kylli P, Nohynek L, Puupponen-Pimia R, Westerlund-Wikstrom B, Leppanen T, Welling J, et al. Lingonberry (Vaccinium vitis-idaea) and European Cranberry (Vaccinium microcarpon) Proanthocyanidins: Isolation, identification, and bioactivities. J Agr Food Chem 2011;59(7):3373-84.

23. Lacombe A, Wu VCH, White J, Tadepalli S, Andre EE. The antimicrobial properties of the lowbush blueberry (Vaccinium angustifolium) fractional components against foodborne pathogens and the conservation of probiotic Lactobacillus rhamnosus. Food Microbiol 2012;30(1):124-31.

24. Vucic D, Petkovic M, Grabovac B, Stefanovic O, Vasic S, Comic L. Antibacterial and antioxidant activities of bilberry (Vaccinium myrtillus L) in vitro. Afr J Microbiol Res 2013; 7(45):5130-36.

The Antibacterial Effect of Methanol and Aqueous Extracts of Vaccinium arctostaphylos Fruit on Enteropathogenic Escherichia coli In Vitro

Fatemeh Moini[1], Maryam Mohammadi Sichani[1*], Kahin Shahanipoor[2]

[1]*Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.*

[2]*Department of Biochemistry, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.*

[*]***Corresponding Author:*** **Maryam Mohammadi Sichani,** Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Email: mohamadi_m@iaufala.ac.ir

Received: 7 May, 2015

Accepted: 11 Jun, 2015

Abstract

Background and Objectives: Enteropathogenic *Escherichia coli* strains cause a wide range of gastrointestinal infections, especially in developing countrirs. The aim of this study was to evaluate of the antibacterial effect of methanol and aqueous extracts of *Vaccinium arctostaphylos* fruit on entropathogenic *Escherichia coli* in vitro.

Methods: In this experimental study, methanol and aqueous extracts of *Vaccinium arctostaphylos* fruit were prepared by two methods, maceration and soxhlet. Antimicrobial effects of these extracts were examined by agar diffusion method on two strains of *Escherichia coli* (ATCC: 8739, ATCC: 25922) and 12 clinical strains of enteropathogenic *Escherichia coli*. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined by microdilution method. Analysis of variance and t-independent tests wee used to comoare the means.

Results: All of the studied strains of *Escherichia coli* were sensitive to the methanol and aqueous extracts of *Vaccinium arctostaphylos* fruit. The mean zones of inhibition produced by the extracts were obtained in the range of 10.6-18.8 mm. Statistical analysis showed that there is a significant relationship between the increase in extracts' concentrations and inhibition zone diameters ($p<0.001$). Also, the values of MIC and MBC were determined to be 50-200mg/ml and 100-400mg/ml, respectively.

Conclusion: According to the results of this study, methanol and aqueous extracts of *Vaccinium arctostaphylos* fruit had inhibitory effect on enteropathogenic *Escherichia coli.*

Keywords: *Escherichia coli*; *Vaccinium*; Plants extract; Inhibitory effect.