

تأثیر ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و اتانولی میوه درخت سپستان بر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشرشیا کلی* و *سالمونلا تیفی*

مطهره پیرنیا^۱، محمدرضا عدالتیان دوم^{۲*}، فریده طباطبایی یزدی^۳، فخری شهیدی^۴

چکیده

زمینه و هدف: با پیدایش مقاومت‌های روزافزون میکروب‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی، تحقیقات لازم جهت جایگزینی داروهای شیمیایی توسط گیاهان دارویی سنتی صورت گرفته است. این پژوهش با هدف تعیین اثر مهارکنندگی عصاره‌های آبی و اتانولی میوه درخت سپستان روی تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی انجام گرفت.

روش بررسی: اثر ضد میکروبی عصاره با چهار روش: کشت آمیخته، انتشار در دیسک، حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) تعیین گردید. آنالیز و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون Duncan و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح اطمینان $p \leq 0.05$ انجام شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، عصاره‌های آبی و اتانولی میوه سپستان (*Cordia myxa* L.) بر روی باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* مؤثر بود. بالاترین مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی در مورد عصاره آبی به ترتیب ۶۴ و ۲۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر و در مورد عصاره اتانولی به ترتیب ۳۲ و ۲۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر برای سویه *سالمونلا تیفی* به دست آمد، لذا این باکتری به عنوان مقاوم‌ترین سویه نسبت به عصاره‌های آبی و اتانولی میوه سپستان شناخته شد.

نتیجه گیری: در این پژوهش تنها از یک روش استخراج عصاره برای بررسی اثر ضد میکروبی استفاده شد. بنابراین، کاربرد سایر روش‌های عصاره‌گیری و مطالعه اثر ضد میکروبی سایر اندام‌های گیاه برای کسب نتایج دقیق‌تر ضروری به نظر می‌رسد.

کلید واژه‌ها: میوه سپستان؛ عوامل ضدباکتریایی؛ تست‌های حساسیت میکروبی؛ *استافیلوکوکوس اورئوس*.

^۱ دانشجوی کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

^۲ استادیار علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

^۳ دانشیار علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

^۴ استاد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات:

محمدرضا عدالتیان، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

edalatian@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۸

تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۱۹

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Pirnia M, Edalatian Dovom MR, Tabatabaee Yazdi F, Shahidi F. The antibacterial effects of the aqueous and ethanolic extracts of *Cordia myxa* L. Fruit on *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella typhi*. Qom Univ Med Sci J 2015;9(4):39-48. [Full Text in Persian]

مقدمه

داروهای گیاهی به‌علت داشتن منشأ طبیعی و سازگاری بیشتر با ارگانسیم‌های بدن، دارای عوارض کمتری هستند (۱). از طرفی، به‌علت بروز مقاومت‌های میکروبی به آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی؛ استفاده از گیاهان و ترکیبات آنها به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی مورد توجه قرار گرفته است (۲). گیاهان از قرن‌ها پیش مورد توجه پزشکان بوده و اثرات درمانی و بی‌ضرر آنها در طول سالیان متمادی تجربه و به ثبت رسیده است (۳). با پیدایش مقاومت‌های روزافزون میکروب‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه ضرورت دارد. بسیاری از گیاهان، توانایی بالایی علیه پاتوژن‌های باکتریایی و قارچی انسان دارند. در صنایع غذایی به‌علت گرایش منفی مردم به مصرف غذاهایی با نگهدارنده‌های شیمیایی، از منابع گیاهی به‌عنوان طعم‌دهنده و نیز از عوامل ضد میکروبی استفاده می‌شود (۴). بررسی اثرات ضد میکروبی گیاهان طبیعی می‌تواند راه را برای به دست آوردن مواد ضد میکروبی جدید هموار سازد (۵). ترکیبات ضد میکروبی با منبع گیاهی دارای قابلیت درمانی بی‌شماری هستند، لذا نه تنها در درمان بیماری‌های عفونی مؤثرند؛ بلکه به‌طور همزمان نیز تعداد زیادی از اثرات جانبی را که اغلب با آنتی‌بیوتیک‌ها همراه است، کاهش می‌دهند (۶).

گیاه درختی سپستان با نام علمی *Cordia myxa* L. که رایج‌ترین گونه جنس *Cordia* است از خانواده گاو زبانیان بوده و عموماً در مناطق حاره‌ای، نیمه‌حاره‌ای و جنگل‌های خشک تا مرطوب برگ‌ریز می‌روید. اصل این درخت از هندوستان و از مناطق بومی گرمسیر و مرطوب می‌باشد. به لحاظ مورفولوژی، درختی با ارتفاع حداکثر ۱۲ متر و اندام‌هوایی پوشیده از کرک‌های خشن بوده که در تابستان ثمر می‌دهد (۷). در متون کهن به خواص درمانی گونه‌های جنس *Cordia* اشاره شده است. در سیستم‌های قدیمی جنس *Cordia* را به‌عنوان آنتی‌باکتریال، ضد ویروس و ضد سرفه معرفی کرده‌اند. اندام‌های مختلف این گیاه (مانند برگ، پوست و میوه) نیز دارای خواص درمانی چون کرم‌کش، مسکن، قابض‌آور، ضد سرفه و غیره می‌باشد (۸). در مطالعات، اثرات ضد تشنجی قابل توجهی برای عصاره میوه سپستان در مقایسه با گُنار ذکر شده است (۹)، همچنین تأثیر ضد التهابی این میوه در

موش‌های دچار کولیت نیز به اثبات رسیده است (۱۰). در گزارش‌ها به فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجه گونه‌ای دیگر از جنس سپستان (*Cordia gillettii* De Wild) نیز اشاره شده است (۱۱). تاکنون تنها برخی از ترکیبات میوه سپستان شامل: فلاونوئیدهایی مانند روتین (Rutin)، مشتقات فنلی، ترپن‌ها، کومارین، آلکالوئیدهای پیرولیزیدین (مانند ماکروفیلین، استرول و ساپونین‌ها) که خاصیت ضد میکروبی دارند، مشخص شده است (۸).

باکتری‌هایی نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشرشیا کلی* و *سالمونلا تیفی* در مسمومیت‌های غذایی نقش بسیار مهمی ایفا می‌کنند. *استافیلوکوکوس اورئوس* به دلیل تولید رنگدانه کارتنوئیدی به نام استافیلوزانتین، کلنی‌های زرد رنگی ایجاد می‌کند که این پیگمان در بیماری‌زایی نقش دارد؛ زیرا به‌عنوان ماده آنتی‌اکسیدان عمل کرده و موجب در امان ماندن باکتری در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود (۱۲). باکتری *باسیلوس* عامل ایجاد انتروتوکسین‌های اسهال و تهوع می‌باشد (۱۲). برخی از سروتیپ‌های *اشرشیا کلی* نیز موجب مسمومیت غذایی و اسهال می‌شوند (۱۲). *سالمونلا تیفی* عامل عمده مسمومیت غذایی است (۱۳).

این مطالعه با هدف تعیین اثر عصاره‌های آبی و اتانولی میوه درخت سپستان علیه باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی و گرم مثبت *Staphylococcus aureus* PTCC 1112، *Bacillus cereus* PTCC 1247، *Escherichia coli* PTCC 1330 و *Salmonella typhi* PTCC 1609 انجام گرفت.

روش بررسی

این مطالعه تجربی از آبان ماه ۱۳۹۲ تا بهمن ۱۳۹۲ در آزمایشگاه میکروب‌شناسی صنعتی و فناوری‌های نوین دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. در این بررسی از سویه‌های باکتریایی شامل: *Staphylococcus aureus* PTCC 1112، *Escherichia coli* PTCC 1330، *Bacillus cereus* PTCC 1247 و *Salmonella typhi* PTCC 1609، اهدایی توسط دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد استفاده شد. میوه سپستان از مناطق بومی شهرستان کهنوج واقع در استان کرمان

تهیه گردید. به لحاظ تاکسونومیکی (Taxonomiky) این گیاه دارویی در بخش بیولوژی دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد شناسایی و تأیید شد. پس از حذف هسته، میوه تازه در شرایط مناسب و به دور از آفتاب خشک شده و سپس به وسیله آسیاب آزمایشگاهی (مدل WARING ساخت آلمان) به پودر تبدیل شد.

دو نوع مختلف عصاره (آبی و اتانولی) از میوه سپستان به روش خیساندن (Maceration) تهیه گردید. عصاره‌های آبی و اتانولی با افزودن ۱۰۰ گرم پودر میوه سپستان به ۵۰۰ میلی‌لیتر به ترتیب آب مقطر و اتانول ۹۶٪ (نسبت ۱:۵) درون ارلن مایر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر و قرارگیری ظروف حاوی مخلوط‌های فوق در انکوباتور شیکردار دیجیتال (ساخت ایران) با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴-۴۸ ساعت تهیه گردید. مخلوط‌های آبی و اتانولی به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره ۱، فیلتر و تفاله‌ها جدا شدند. مایع صاف شده جهت حذف ذرات معلق و ناخالصی‌های باقی‌مانده با دور ۳۰۰۰×g در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس عصاره شفاف در پلیت‌های شیشه‌ای بزرگ ریخته شد و در آون تحت خلأ (با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت) قرار گرفت تا حلال موجود در عصاره تبخیر شود. پس از گذشت این مدت زمان، عصاره خشک شده با ظاهری کاملاً پودری، برای انجام آزمایش‌های بعدی درون فویل‌های آلومینیومی ضخیم در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد (۱۵، ۱۴). برای تعیین وزن خشک عصاره‌های آبی و الکلی میوه سپستان، ابتدا وزن یک پلیت آزمایشگاهی خالی اندازه‌گیری شد، سپس ۱۵ میلی‌لیتر از عصاره‌های آبی و اتانولی درون پلیت‌های جداگانه و در دمای اتاق نگهداری شدند تا کاملاً خشک شوند. پس از این مدت، وزن پلیت حاوی عصاره خشک شده یادداشت و از وزن پلیت خالی کسر گردید، میانگین سه بار تکرار به عنوان وزن خشک و یا درصد استخراج عصاره در نظر گرفته شد (۱۵). پس از تهیه سویه‌های گرم مثبت و گرم منفی به منظور فعال‌سازی، باکتری‌ها در شرایط استریل به محیط کشت مایع مولر هینتون (مرک آلمان) انتقال یافتند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس از محیط کشت ۲۴ ساعته بر روی محیط‌های مورب، همچنین بر روی پلیت‌های حاوی محیط

مولر هینتون آگار (مرک آلمان) کشت خطی داده شد و در گرمخانه با دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت یک شبانه‌روز قرار گرفتند تا به عنوان منبع باکتری از آنها استفاده شود. از کشت ۲۴ ساعته باکتری، سوسپانسیونی در محلول نمکی استریل که در هر میلی‌لیتر حاوی $10^8 \times 1/5$ CFU/ml باکتری بود با استفاده از محلول استاندارد ۰/۵ مک فارلند تهیه گردید (۱۶).

فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی و اتانولی میوه سپستان با استفاده از چهار روش Pour plate، انتشار در دیسک (Disk Agar Diffusion)، کمترین غلظت مهارکنندگی (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) و کمترین غلظت کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) بررسی شد. در روش Pour plate (روش کشت آمیخته)، ۰/۲ گرم از عصاره آبی و اتانولی به ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه گردید و به منظور یکنواخت شدن به کمک دستگاه ورتکس، هم زده شد، سپس یک میلی‌لیتر از این محلول به ظرف‌های پتری استریل اضافه و غلظت نهایی عصاره در این حالت به ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رسید. در مرحله بعد، محیط کشت استریل مولر هینتون آگار (مرک آلمان) به ظرف‌های پتری اضافه شده و در دمای اتاق قرار گرفت تا محیط کشت‌ها ببندد. یک لوپ از کشت استاندارد هر سوش کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. از محیط دارای عصاره و بدون باکتری نیز به عنوان کنترل استفاده گردید (۱۷).

در روش دیسک - پلیت با قرار دادن ۶ دیسک در اطراف و یک دیسک در مرکز به عنوان شاهد منفی (در مورد عصاره‌های آبی، حلال آب مقطر و در مورد عصاره‌های اتانولی، حلال اتانول ۹۶٪) و در دیسک‌های محیطی با افزودن شش غلظت از عصاره‌های مورد نظر (به ترتیب ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت، عمل گرمخانه‌گذاری انجام شد. بعد از طی مدت انکوباسیون، منطقه عدم رشد (Inhibition Zone) در محیط اطراف دیسک‌ها با در نظر گرفتن قطر دیسک (۶ میلی‌متر) به وسیله خط‌کش اندازه‌گیری و به صورت میلی‌متری گزارش شد. قابل ذکر است که اثر ضد میکروبی هر عصاره بر روی هر سوش در سه تکرار انجام گرفت (۱۸).

MBC آن عصاره در نظر گرفته شد (۲۰). داده‌های حاصل از بررسی اثر ضدباکتریایی، همچنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶، آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و اختلاف بین میانگین‌ها با آزمون Duncan در سطح اطمینان $p \leq 0.05$ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

نتایج به دست آمده از روش کشت آمیخته (پخش عصاره)، نشان از تأثیر عصاره‌های آبی و اتانولی در غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر بر باکتری *Bacillus cereus* بود، درحالی که در همین غلظت، دو سویه باکتریایی گرم منفی *Escherichia coli* و *Salmonella typhi* نسبت به دو عصاره آبی و اتانولی میوه سپستان مقاومت نشان دادند و بر سطح محیط کشت رشد کردند. همچنین عصاره اتانولی در غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر، اثر بازدارندگی بر *Staphylococcus aureus* داشت، اما عصاره آبی فاقد هرگونه تأثیری بر آن بود (جدول شماره ۱).

آزمایش کمترین غلظت بازدارندگی با روش رقت - لوله (Macro Dilution Broth) انجام شد، در این روش با استفاده از شش رقت متوالی (دو برابر)، اثرات ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی میوه سپستان در محیط کشت مایع مولر هیتون برات (مرک آلمان) با افزودن سوسپانسیون میکروبی برای چهار میکروارگانیسم باکتریایی به‌طور جداگانه و قرار دادن شاهد مثبت و منفی مورد بررسی قرار گرفت. کمترین غلظت ماده ضد میکروبی که از رشد باکتری جلوگیری کرد و در مقایسه با کنترل منفی به‌طور ظاهری کدورتی نداشت، به‌عنوان حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد تعیین گردید. تمامی این آزمایشها نیز در سه تکرار انجام گرفت (۱۹). به‌منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC)، یک میلی لیتر از لوله‌هایی که باکتری در آن رشد نکرده بود با ۱۲ میلی لیتر از محیط کشت مولر هیتون آگار مذاب (با درجه حرارت ۴۸ درجه سانتیگراد) در یک پلیت مخلوط و پس از بسته‌شدن آگار، در ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. در نهایت، پلیتی که حاوی کمترین غلظت عصاره بود و در آن رشدی مشاهده نشد، به‌عنوان

جدول شماره ۱: اثر ضد میکروبی غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره‌های آبی و اتانولی میوه سپستان بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه (روش پخش در سطح محیط [pour plate])

میکروارگانیسم	عصاره آبی	عصاره اتانولی
<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> PTCC 1112	R	S
<i>باسیلوس سرئوس</i> PTCC 1247	S	S
<i>اشرشیا کلی</i> PTCC 1330	R	R
<i>سالمونلا تیفی</i> PTCC 1609	R	R

R: Resistant

S: Sensitive

کشت و ایجاد هاله‌ای با قطر اندک، به‌عنوان مقاوم‌ترین سویه نسبت به دو نوع عصاره آبی و اتانولی در این مطالعه شناخته شد. همچنین عصاره اتانولی در تمامی غلظت‌ها بجز ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر و عصاره آبی در تمامی غلظت‌ها بجز ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر قادر به مهار رشد *Escherichia coli* بر سطح محیط کشت از طریق ایجاد هاله عدم رشد بود (جدول شماره ۲).

نتایج، حاکی از عدم تأثیر عصاره آبی میوه سپستان در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر بر روی دو باکتری *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* بود، درحالی که عصاره اتانولی در تمامی غلظت‌ها بر روی این دو سویه باکتریایی گرم مثبت تأثیر داشت و با ایجاد هاله بازدارندگی از رشد آنها ممانعت کرد. گونه *Salmonella typhi* نیز با رشد بر سطح محیط

جدول شماره ۲: میانگین قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه در حضور عصاره‌های اتانولی و آبی میوه سپستان (روش انتشار در آگار)

نوع عصاره	میکروارگانیسم‌ها	غلظت‌های عصاره میوه سپستان (میلی گرم بر میلی لیتر)	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰	اتانولی
استافیلوکوکوس اورئوس			۸/۵±۰/۲۵ ^a	۱۰/۹±۰/۱ ^b	۱۲/۵±۰/۱ ^c	۱۴/۱±۰/۱ ^d	۱۵/۷±۰/۲۶ ^e	۱۷/۷±۰/۱۵ ^f	
باسیلوس سرئوس			۱۰/۵±۰/۲۵ ^a	۱۱/۷±۰/۲ ^b	۱۳/۱±۰/۱ ^c	۱۴/۷±۰/۲ ^d	۱۶/۹±۰/۱۵ ^e	۱۸/۴±۰/۲ ^f	
اشرشیا کلی			-	۸/۳±۰/۱۵ ^a	۹/۴±۰/۱ ^b	۱۱/۱±۰/۳ ^c	۱۳/۲±۰/۲۵ ^d	۱۵/۳±۰/۲ ^d	
سالمونلا تیفی			-	-	۷/۲±۰/۲۵ ^a	۹/۲±۰/۲۵ ^b	۱۰/۳±۰/۱۵ ^c	۱۱/۹±۰/۲ ^d	
آبی									
استافیلوکوکوس اورئوس			-	۹/۲±۰/۲۵ ^a	۱۰/۷±۰/۱ ^b	۱۲/۹±۰/۴ ^c	۱۴/۶±۰/۱۵ ^d	۱۶/۴±۰/۱۵ ^e	
باسیلوس سرئوس			-	۹/۴±۰/۱۱ ^a	۱۱/۱±۰/۰۵ ^b	۱۲/۹±۰/۴ ^c	۱۵/۶±۰/۱۱ ^d	۱۷/۵±۰/۳ ^e	
اشرشیا کلی			-	-	۸/۴±۰/۲ ^a	۱۰/۱±۰/۱ ^b	۱۲±۰/۱ ^c	۱۴/۱±۰/۱۵ ^d	
سالمونلا تیفی			-	-	-	۷/۴±۰/۲۵ ^a	۹/۲±۰/۵ ^b	۱۰/۴±۰/۴ ^c	

* علامت (-)، نشان‌دهنده عدم وجود فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی میوه سپستان می‌باشد.

* حروف غیرمشابه در یک ردیف، نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است.

* واحد اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد، میلی‌متر می‌باشد.

بحث

Escherichia coli, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*

و *Salmonella typhi* به ترتیب ۱۶، ۸ و ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر بود، درحالی که MIC عصاره آبی برای ترتیب باکتریایی فوق ۱۶، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد (جدول شماره ۳).

مقادیر MIC عصاره اتانولی برای همه سویه‌های باکتریایی مورد بررسی بجز *Staphylococcus aureus* (MIC عصاره آبی برابر با MIC عصاره اتانولی است) کمتر از مقادیر MIC به دست آمده برای عصاره آبی بود. MIC عصاره اتانولی برای

جدول شماره ۳: نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره‌های اتانولی و آبی عصاره میوه سپستان بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه

نوع عصاره	میکروارگانیسم	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	کنترل
استافیلوکوکوس اورئوس		+	+	+	-	-	-	+
باسیلوس سرئوس		+	+	-	-	-	-	+
اشرشیا کلی		+	+	+	-	-	-	+
سالمونلا تیفی		+	+	+	+	-	-	+
آبی								
استافیلوکوکوس اورئوس		+	+	+	-	-	-	+
باسیلوس سرئوس		+	+	+	-	-	-	+
اشرشیا کلی		+	+	+	+	-	-	+
سالمونلا تیفی		+	+	+	+	+	-	+

- عدم رشد

مقادیر MBC دو عصاره اتانولی و آبی در مورد برخی از باکتری‌ها یکسان به دست آمد که این فاکتور در مورد *Salmonella typhi* و *Staphylococcus aureus* به ترتیب ۶۴ و ۲۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر بود (جدول شماره ۴).

جدول شماره ۴: نتایج حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های اتانولی و آبی عصاره میوه سپستان بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه

نوع عصاره	میکروارگانیسم‌ها	غلظت عصاره میوه سپستان (میلی گرم بر میلی لیتر)									
اتانولی		۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	کنترل	
	<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	+	
	<i>باسیلوس سرئوس</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	
	<i>اشرشیا کلی</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	
	<i>سالمونلا تیفی</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
آبی		۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	کنترل	
	<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	+	
	<i>باسیلوس سرئوس</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	
	<i>اشرشیا کلی</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
	<i>سالمونلا تیفی</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	

-: عدم رشد

+: رشد

بحث

گیاهان مختلف، مکانیسم‌های دفاعی متفاوتی را در برابر پاتوژن‌ها و ارگانیسم‌های مختلف از خود نشان می‌دهند و در محیط نیز بقای خود را حفظ می‌کنند. یکی از مکانیسم‌های مؤثر دفاعی، تولید ترکیبات شیمیایی مختلف و مؤثر بوده که تحت عنوان کمپلکس‌های شیمیایی ممکن است انواعی از اسید، باز و ترکیبات آلی دیگر باشد. در روش‌های مختلف عصاره‌گیری، از این ترکیبات جدا شده می‌توان به منظورهای مختلفی استفاده کرد. کمیت و کیفیت این مواد در ارتباط با گیاهان گوناگون و روش‌های مختلف عصاره‌گیری متفاوت است (۲۱). در این پژوهش براساس نتایج به دست آمده، عصاره‌های آبی و اتانولی میوه سپستان، طیف وسیعی از فعالیت ضد میکروبی را علیه میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه از خود نشان دادند و اثر ضد میکروبی هر دو عصاره (اتانولی و آبی) تا حدودی بسته به نوع میکروارگانیسم متفاوت بود. همچنین در این مطالعه، باکتری‌های گرم منفی *Salmonella typhi* و *Escherichia coli* به وسیله هر دو عصاره آبی و اتانولی در غلظت‌های بالاتری از عصاره، مهار و از رشد آنها در سطح محیط کشت ممانعت شد و مشخص گردید سویه‌های گرم مثبت *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* در مقایسه با سوش‌های گرم منفی

Salmonella typhi و *Escherichia coli*، از حساسیت بیشتری در برابر عصاره‌های مورد استفاده برخوردارند و در غلظت کمتری از عصاره‌های آبی و اتانولی میوه سپستان رشد آنها متوقف می‌شود. به‌طور کلی باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی، حساسیت بیشتری نسبت به عصاره میوه سپستان از خود نشان می‌دهند که علت آن می‌تواند اختلاف ساختمانی دیواره باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی باشد، به‌طوری‌که باکتری‌های گرم مثبت در دیواره سلولی خود دارای ترکیب موکوپتید بوده، درحالی‌که باکتری‌های گرم منفی فقط لایه نازکی از موکوپتید دارند و قسمت اعظم ساختمان دیواره در آنها لیپوپروتئین و لیپوپلی ساکارید است. به‌همین دلیل باکتری‌های گرم منفی مقاوم‌ترند. در نتیجه مقاومت بالاتر باکتری‌های گرم منفی را می‌توان به حضور غشای فسفولیپیدی خارجی تقریباً غیرقابل نفوذ به ترکیبات چربی دوست نسبت داد که این امر با نتایج دیگر مطالعات مطابقت داشت (۲۲، ۲۳). Nariya و همکاران طی انجام مطالعه‌ای بر روی فعالیت ضدقارچی و باکتریایی پوست درخت *C. dichotoma* (از انواع گونه‌های *Cordia*) علیه تعدادی از قارچ‌ها و باکتری‌های گرم منفی و مثبت؛ قطر هاله بازداری قابل توجهی برای باکتری‌ها و قارچ‌ها گزارش کردند (۲۴). اخیراً نتایج پژوهش دیگری نیز نشان داده است عصاره اتانولی

میوه سپستان با توجه به درصد استحصال کمتر (وزن خشک کمتر)، مؤثرتر از عصاره آبی می‌باشد. با توجه به اینکه عصاره آبی میوه سپستان دارای وزن خشک به مراتب بالاتری بوده است، این پدیده را این گونه می‌توان توجیه کرد که احتمالاً ترکیبات مؤثره و دارای اثر بازدارنده در حلال‌های نیمه‌قطبی تا غیرقطبی مانند اتانول، حلالیت بیشتری یافته که همین امر باعث شده است تا در حلال آبی به میزان کمتری وارد شده و در نتیجه اثر ضد میکروبی کمتر عصاره آبی را در مقایسه با عصاره اتانولی موجب گردد (۸). محققان ثمرین و همکاران (سال ۱۳۹۰) نیز در مطالعه خود، راندمان عصاره‌گیری از پوست زمینی را با حلال‌های مختلف (آب، اتانول، متانول، استن و هگزان) ارزیابی کردند و دریافتند از میان حلال‌های مورد استفاده برای عصاره‌گیری از پوست سیب‌زمینی؛ حلال آب دارای بیشترین راندمان عصاره‌گیری بوده و حلال‌های متانول، اتانول، استن و هگزان به ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار دارند (۲۵). با توجه به نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد بازده عصاره‌گیری با افزایش قطبیت حلال افزایش می‌یابد، به عنوان مثال از بین دو حلال آب و اتانول مورد استفاده؛ آب بالاترین شاخص قطبیت را دارد که این امر ممکن است در بالا بودن راندمان عصاره‌گیری با آب مؤثر باشد. نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی و آبی میوه سپستان به روش انتشار در آگار در این پژوهش حاکی از آن است که با افزایش غلظت عصاره‌های آبی و اتانولی میوه سپستان، فعالیت ضد میکروبی علیه چهار سویه باکتریایی افزایش می‌یابد و رابطه مستقیمی بین افزایش غلظت عصاره و افزایش اثر مهارکنندگی وجود دارد. چنین اتفاقی در دیگر تحقیقات نیز صادق است (۲۶). در مطالعه حاضر، بالاترین میانگین قطر هاله بازداری در سطح معنی‌داری $p \leq 0.05$ مربوط به سویه‌های گرم مثبت *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* بود. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نیز نشان داد قطر هاله عدم رشد به طور معنی‌داری در سطح $p \leq 0.05$ با افزایش غلظت عصاره افزایش می‌یابد. همچنین در مطالعه حاضر باکتری‌های گرم منفی، به ویژه *Salmonella typhi*، بیشترین مقاومت را نسبت به دو عصاره آبی و اتانولی نشان دادند، به طوری که *Salmonella typhi* در

غلظت‌های بالاتری از عصاره‌های آبی و اتانولی مهار و از رشد آن ممانعت شد. طباطبایی یزدی و همکاران با بررسی "تأثیر عصاره آبی و اتانولی گیاه کلپوره علیه تعدادی از باکتری‌های گرم منفی و مثبت" گزارش کردند سویه‌های گرم منفی *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa*، بیشترین مقاومت را نسبت به عصاره کلپوره داشته‌اند، درحالی که رشد باکتری‌های گرم مثبت در غلظت‌های کمتری از هر دو عصاره متوقف شده است (۲۷). برخی از ترکیبات ضد میکروبی که تاکنون در اندام‌های مختلف درخت سپستان، به خصوص میوه شناسایی شده است شامل ترپن‌ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدهای پیرولیزیدین، ساپونین و استرول می‌باشد که این ترکیبات از جمله ترکیبات اصلی موجود در این گیاه محسوب شده و در واقع می‌توان خصوصیات ضد میکروبی میوه سپستان را به وجود این ترکیبات نسبت داد (۸).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این مطالعه، از آنجا که برخی از ترکیبات عصاره تهیه‌شده دارای اثر ضد میکروبی بوده و مقدار آنها در عصاره کم می‌باشد، لذا با تخلیص و تغلیظ می‌توان به اشکال مختلف دارویی از آنها برای درمان عفونت‌های باکتریایی، به خصوص باکتری‌های گرم مثبت استفاده کرد. اساساً در این پژوهش فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی میوه سپستان علیه باکتری‌های گرم منفی در خور توجه نبود. این موضوع تا حدودی می‌تواند به علت وجود میزان ناکافی مواد مؤثره و دارای اثر مهارکنندگی بر رشد در میوه سپستان باشد. از طرفی، این موضوع تا حدودی به نحوه استخراج عصاره نیز مربوط است. به طوری که ممکن است استفاده و به کارگیری سایر روش‌های کارآمد و پربازده، به استحصال بیشتر ترکیبات مؤثره منجر شود. به همین منظور بررسی اثر ضد میکروبی سایر اندام‌های گیاه مانند پوست، برگ و ریشه نیز حایز اهمیت است و ذکر این نکته ضروری است که در فرآیند بررسی اثر ضد میکروبی، از سایر روش‌های عصاره‌گیری که تأثیر بیشتری داشته و طبعاً بر درصد استخراج مواد مؤثره نیز تأثیر گذارند، استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات جناب آقای مهندس بهروز عزیزاده بهبهانی و خانم مهندس هانیه کاشانی که در انجام آزمایشها ما را یاری کردند، صمیمانه قدردانی می‌شود. مقاله علمی- پژوهشی حاضر مستخرج از پایان‌نامه دانشجویی با عنوان "بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی میوه سپستان علیه

میکروارگانیزم‌های عامل عفونت و مسمومیت مواد غذایی" در شرایط آزمایشگاهی (با کد شماره ۳۰۰۳۷) در گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهشی، دانشگاه فردوسی مشهد جهت یاری رساندن در انجام طرح صمیمانه سپاسگزاری نمایند.

References:

1. Kasra Kermanshahi RH, Moattar F, Soleimanimanesh AR. Antibacterial effects of *Carthamus tinctorius* alcoholic and aqueous extracts on number of bacteria. J Shahid Chamran Univ Sci, 2006;15:18-26. [Full Text in Persian]
2. Mitscher L, Leu RP, Bathala M, Wu WN, Beal JL. Antimicrobial agents from higher plants. I. Introduction, rationale, and methodology. Lloydia 1972;35(2):157-66.
3. Nazemi A, Hashemi M, Khatamineghad MR, Pourshamsian K. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Heracleum Persicum*. Med Sci J Islamic Azad 2005;15(2):91-4. [Full Text in Persian]
4. Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. Int J Food Microbiol 2004;94(3):223-53.
5. Talei Gr, Meshkat Alsadat M, Delfan B. Antibacterial activity of fruit, leaves extracts of *artemisia persica* boiss, *rhus coriaria*, *ephedra intermedia* and *daphne mucronata* royle of lorestan. J Lorestan Univ Med Sci 2004;5(3):19-54. [Full Text in Persian]
6. Kokoska L, Polesny Z, Rada V, Nepovim A, Vanek T. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. J Ethnopharmacol 2002;82(1):51-3.
7. Amin GHR. Most common traditional medicinal plants of Iran. Tehran: Tehran University of Medical Sciences; 2005. p. 184. [Text in Persian]
8. Jamkhande PG, Barde SR, Patwekar SL, Tidke PS. Plant profile, phytochemistry and pharmacology of *Cordia dichotoma* (Indian cherry): A review. Asian Pac J Trop Biomed 2013;3(12):1009-16.
9. Loraki S, Bolouki A, Khandan S, Najafzade-varzi H. Comparison extract effect of *Cordia myxa* and *Ziziphus spina-christii* on induced seizures of Stricknin in rat. Tehran: 15th ed. Iran Veterinary Congress; 2008. [Text in Persian]
10. Al-Awadi FM, Srikumar TS, Anim JT, Khan I. Antiinflammatory effects of *Cordia myxa* fruit on experimentally induced colitis in rats. Nutrition 2001;17(5):391-6.
11. Okusa PN, Penge O, Devleeschouwer M, Duez P. Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). J Ethnopharmacol 2007;112(3):476-81.
12. Safavi F, Ebrahimi P, Mighani H. In vitro antibacterial activity of root and aerial parts of *Scrophularia striata* bioss on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. Armaghane-danesh 2013;18(8):603-14. [Full Text in Persian]
13. Jay MJ, Loessner MJ, Golden DA. Modern food microbiology. 5th ed. New York: Springer; 2000.
14. Vokou D, Bessiere JM. Volatile constituents of *Teucrium polium*. J Nat Product 1985;48(3):498-9.

15. Behbahani BA, Yazdi FT, Mortazavi A, Zendeboodi F, Gholian MM. Effect of aqueous and ethanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* L. J Paramed Sci 2013;4(3):89-99.
16. Jalali M, Abedi D, Asghari G, Rezaie Z. A study of anti-microbial effect of *pycnocycla spinosa*'s fruit extracts. J Mazandaran Univ Med Sci 2007;17(59):76-86. [Full Text in Persian]
17. Babayi H, Kolo I, Okogun JI, Ijah U. The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. Biokemistri 2004;16(2):106-11.
18. Perumal Samy R, Ignacimuthu S, Sen A. Screening of 34 Indian medicinal plants for antibacterial properties. J Ethnopharmacol 1998;62(2):173-81.
19. Moshafi MH, Mehrabani M, Zolhasab H. Antibacterial activity studies of *Salvia Mirzayanii* and *Salvia atropatana* against six standard gram-positive and gram-negative bacteria. J Kerman Univ Med Sci 2004;11(2):109-18. [Full Text in Persian]
20. Sindambiwe JB, Calomme M, Cos P, Totté J, Pieters L, Vlietinck A, et al. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. J Ethnopharmacol 1999;65(1):71-7.
21. Özçelik B, Aslan M, Orhan I, Karaoglu T. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of the lipophylic extracts of *Pistacia vera*. Microbiol Res 2005;160(2):159-64.
22. Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Peter J, Rinaldi M, Walsh T. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp: NCCLS collaborative study. J Clin Microbiol 2002;40(9):3204-8.
23. Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mortazavi A. Antimicrobial effects of *Lavandula stoechas* L. and *Rosmarinus officinalis* L. extracts on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Sci J Microbiol 2013;2(1):15-22.
24. Nariya PB, Bhalodia NR, Shukla VJ, Acharya RN. Antimicrobial and antifungal activities of *Cordia dichotoma* (Forster F.) bark extracts. Ayu 2011;32(4):585-9.
25. Mohagheghi Samarin A, Poorazarang H, Elhamirad AH, Dezashibi Z, Hematyar N. Extraction of phenolic compounds from potato peel (Ramus variety) with solvent and ultrasound-assisted methods and evaluation of its antioxidant activity in soybean oil. Iran J Food Sci Technol 2010;8(1):81-91. [Full Text in Persian]
26. Neef H, Declercq P, Laekeman G. Hypoglycaemic activity of selected European plants. Phytother Res 1995;9(1):45-8.
27. Tabatabaei Yazdi F, Alizadeh Behbahani B, Heidari Soureshjani M, Mortazavi A. The in vitro study of antimicrobial effect of *Teucrium polium* extract on infectious microorganisms. Sci J Hamadan Univ Med Sci 2014;21(1):16-24. [Full Text in Persian]

The Antibacterial Effects of the Aqueous and Ethanolic Extracts of Cordia myxa L. Fruit on Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Escherichia coli, and Salmonella typhi

Motahareh Pirnia¹; Mohammad Reza Edalatian Dovom^{2*}; Farideh Tabatabaee Yazdi³; Fakhri Shahidi⁴

¹MSc Student of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

²Assistant Professor of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

³Associate Professor of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

⁴Professor of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

***Corresponding Author:**
Mohammad Reza Edalatian, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Email:
edalatian@um.ac.ir

Received: 30 Jul, 2014

Accepted: 10 Sep, 2014

Abstract

Background and Objectives: With the advent of increasing resistance of microorganisms to synthetic antibiotics, researches has been carried out to replace chemical drug by traditional medicinal plants. This study has been conducted with the purpose of determining the inhibitory effect of aqueous and ethanolic extracts of *Cordia myxa* on a number of gram-positive and gram-negative bacteria.

Methods: Antimicrobial activity of extract was determined by four methods: pour plate, disk agar diffusion, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Analysis and mean comparison were performed using Duncan's test and one-way analysis of variance at a confidence level of $\alpha=95\%$ ($p<0.05$).

Results: In this study, aqueous and ethanolic extracts of *Cordia myxa* fruit were effective on gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. The highest values of MIC and MBC for aqueous extract were obtained 64 and 256mg/ml, respectively, and for ethanolic extract were 32 and 256mg/ml, respectively, for *Salmonella typhi*, so this bacterium has been known as the most resistant strain against the aqueous and ethanolic extract of *Cordia myxa* fruit.

Conclusion: In this research, only one method of extraction was used for the evaluation of antimicrobial effect, so application of other methods of extraction and study of antimicrobial effect of other organs of the plant are necessary to obtain more precise results.

Keywords: *Cordia myxa* L.; Anti-Bacterial Agents; Microbial Sensitivity Tests; *Staphylococcus aureus*.