بررسی مقایسه ای اثر عصاره های میوه درخت کاج و آنتی بیوتیک های انتخابی بر تعدادی از میکروارگانیسم های شاخص عفونت و مسمومیت غذایی در شرایط آزمایشگاهی

هانیه کاشانی[۱]، فریده طباطبایی یزدی[۲*]، سید علی مرتضوی[۲]، فخری شهیدی[۲]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- استاد و عضو هئیت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۲۴)

چکیده

افزایش روز افزون مقاومت دارویی نسبت به آنتی بیوتیک‌ها و حساسیت به ترکیبات شیمیایی ضد میکروبی از جمله دلایل توجه محققین به کشف مواد ضد میکروبی جدید و با منشا گیاهی می باشد. در این مطالعه اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی میوه درخت کاج تهران بر تعدادی از باکتری‌های عامل عفونت و مسمومیت غذایی در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. اثرضد میکروبی عصاره‌ها با استفاده از روش انتشار دیسک در آگار و تعیین حداقل غلظت مهارکننده از رشد میکروب ها (MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتریایی(MBC) با استفاده از روش رقت لوله ای انجام گردید. مقایسه اثر ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی این گیاه نشان داد که بر باکتری های گرم مثبت اثر بهتری نسبت به گرم منفی‌ها دارد. به صورتی که بیشترین هاله ممانعت از رشد مربوط به عصاره اتانولی میوه درخت کاج تهران بر روی سوش *استافیلوکوکوس اورئوس* بود که معادل ۰/۱۴±۱۷/۵محاسبه گردید. از میان دو سوش گرم منفی نیز باکتری اشرشیاکلی به عنوان مقاوم ترین باکتری در مقابل عصاره‌های آبی و اتانولی این میوه بود. با توجه به نتایج حاصل، گیاه مذکور تا حدی دارای اثرات ضد باکتریایی می‌باشد.

کلید واژگان: میوه درخت کاج تهران، اثر ضد باکتریایی، استخراج

* مسئول مکاتبات: tabatabai@um.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

۱- مقدمه

مصرف گیاهان دارویی تنها به کشور های در حال توسعه اختصاص ندارد بلکه طی سه دهه اخیر گیاه درمانی در بسیاری از کشور های اروپایی، ایالات متحده و سایر کشور های پیشرفته رشد شایانی نموده است و مورد استقبال گسترده عموم قرار گرفته و همین فرایند یعنی رویکرد دوباره آدمی به داروهای گیاهی و گیاه درمانی یکی از جنبه های موج سبز به شمار می رود [۱ و ۲]. یکی از مهمترین چالش های درمانی مبارزه با بیماری های عفونی به دلیل شیوع و گسترش بالای آن ها می باشد. پس از شناسایی پنیسلین در دهه ٤٠ میلادی و گسترش استفاده از آن، هر روز آنتی بیوتیک های جدیدی برای مبارزه با عفونت ها ارائه می شد، نتیجه این امر گسترش استفاده بالینی آنتی بیوتیک های طبیعی و سنتتیک در درمان عفونت ها بود. استفاده بی رویه از این داروهای ضد میکروبی منجر به افزایش مقاومت های دارویی در اکثر باکتری هاگردید [۳]. از طرفی درمان با آنتی بیوتیک ها همواره نگرانی عوارض جانبی دارو را به همراه دارد . گیاهان دارویی به دلیل مزایای های متعددی از قبیل ارزان و قابل دسترس بودن و سازگاری با طبع و پذیرش بهتر توسط بیماران، امروزه برای درمان بیماری ها از جمله عفونت ها مورد توجه قرار گرفته اند [٤].

یکی از گیاهان دارویی که از زمان های گذشته تا کنون اثرات درمانی و موثردر مقابله با بیماری های مختلف داشته است، میوه درخت کاج تهران (Pinus elderica) می باشد که زیر گونه ای از جنس *Pinus* است، این جنس متعلق به تیره کاج یا Pinaceae و راسته Pinal است که برخی از گیاه شناسان آن را یک گونه مستقل شناخته وعده ای دیگر آن را یکی از شکل های جغرافیایی کاج بروسیا یا واریته ای از کاج حلب دانسته اند[٥]، میوه مخروطی کاج تهران به شکل تخم مرغی واژگون، نامتقارن و گاهی در قسمت نوک کمی خمیده است. ٥ تا ٦ سانتیمترطول و ٣ تا ٤ سانتیمتر پهنا دارد. معمولا ٢-٣ عدد با هم بر روی پایکی کوتاه، به حالت راست، افقی و گاهی آویزان قرار دارند [٦].

در متون طبی کهن ایران از قسمت های مختلف انواع رده کاج به خصوص صمغ آن برای درمان زخم های کهنه استفاده می شده است [۷]. همچنین در طب سنتی ژاپن از مخروط کاج برای درمان سرطان معده و نیز به عنوان یک ماده محرک سیستم ایمنی در افراد مبتلا به لوسمی و نیز یک ماده ضد تومور استفاده می شده است، علاوه بر این مخروط کاج برخی از گونه های کاج برای سال های بسیاری در درمان بیماری هایی نظیر آسم، برونشیت، سرفه و بیماری های دیگر در طب سنتی چین استفاده می شده است [۸]. مخروط درخت کاج دارای انواع ترکیبات فعال نظیر پلی ساکارید ها، تانن ها، لیگنین ها و انواع مختلفی از ترکیبات فنلی و ترپنوئیدی می باشد.

آثار و همکاران (١٣٨٤) اثر ضد میکروبی صمغ درخت کاج تهران (Pinus elderica) و عصاره الکلی آن را بر روی تعدادی از باکتری های مولد عفونت پوستی از جمله مورد مطالعه قرار دادند و اثرات مهاری آن را با آنتی بیوتیک کوتریموکسازول مقایسه کردند، نتایج نشان داد که صمغ درخت کاج تهران دارای خاصیت ضد میکروبی قوی می باشد که می تواند بر روی رشد با کوتریموکسازول رقابت کند و احتمالا بر روی سوش های مقاوم در برابر کوتریموکسازول موثر است[۹].

کمپلکس های لیگنین – کربو هیدرات از جمله ترکیبات مهم موجود در مخروط کاج به حساب می آیند در مطالعه ای که ساکاگامی و همکاران (۲۰۱۰) بر روی این ترکیبات انجام دادند مشخص شد این ترکیبات فعالیت ضد ویروسHIV مقایسه نشان می دهد، همچنین با مهار فعالیت آنزیم RNA پلی مراز ویروس آنفولانزا از تشکیل پلاک این ویروس ممانعت می کند، علاوه بر این، این ترکیبات از تکثیر ویروسHSV نیز جلوگیری می کنند[۱۰].

تا کنون مطالعات بسیاری در زمینه اثرضد میکروبی عصاره های گیاهی برروی میکروب های بیماریزا صورت گرفته است اما تحقیقات زیادی بر روی اثر ضد میکروبی میوه مخروطی شکل درخت کاج تهران انجام نشده است. بنابراین هدف از این پژوهش استخراج عصاره آبی و اتانولی میوه درخت کاج و بررسی خواص ضد میکروبی آن بر روی بعضی از میکروارگانیسم های شاخص عفونت و مسمومیت مواد غذایی است که می تواند به عنوان یک افزودنی طبیعی فساد از مواد غذایی، را به تاخیر بیاندازد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

۲- مواد و روش ها

۲-۱- جمع آوری و آماده سازی نمونه های گیاهی برای عصاره گیری

در این مطالعه تجربی پس از تهیه میوه درخت کاج تهران جنس و گونه این گیاه در مرکز هرباریوم پژوهشکده گیاهی مشهد تعیین گردید. میوه ها قبل از آسیاب کردن در هوای آزاد و در سایه کاملا خشک گردید تا عمل خرد کردن آنها راحتتر صورت گیرد.

۲-۲- تهیه عصاره های آبی و اتانولی به روش خیساندن

دلیل استفاده از روش خیساندن عدم آسیب به تمام مواد موجود در در عصاره تهیه شده در گیاهان می باشد . جهت تهیه عصاره آبی و اتانولی به طور جداگانه به پودر گیاهی حاصل با رعایت نسبت ۱:۵ حلال (آب و اتانول) اضافه گردید. مخلوط حاصله به مدت ٤٨ ساعت و در دمای اتاق در انکوباتور شیکردار نگه داری گردید تا ترکیبات موثر موجود در گیاه استخراج شود[۱۱]. سپس حذف تفاله ها ومواد جامد غیر محلول با کاغذ صافی واتمن انجام شد. محلول صاف شده به مدت ۱۰ دقیقه با دورrpm ۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید، در مرحله بعد به کمک دستگاه روتاری با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد عصاره حاصله را تغلیظ نموده و در ادامه در آون تحت خلا با همین درجه حرارت عصاره را خشک شد[۱۲].

۲-۳- تعیین درصد استخراج عصاره ها

ابتدا وزن یک پلیت آزمایشگاهی خالی را تعیین کرده و سپس ۱۵ میلی لیتر از عصاره های آبی و اتانولی را در آن ریخته، سپس محتوی پلیت ها در دمای اتاق خشک گردید. پس از خشک شدن عصاره ها پلیت ها را مجددا وزن نموده و از وزن پلیت خالی کم شد، میانگین سه بار تکرار را به عنوان وزن خشک و یا درصد استخراج عصاره در نظر گرفته شد[۱۳].

۲-٤- سوش های میکروبی مورد آزمایش

برای انجام آزمایش ها از سوش های باکتری های پاتوژن ۱) *Escherichia coli O157:H7*-PTCC0157 ۲) *Salmonella thyphi* PTCC1609 ۳) *Staphylococcus aureus*- PTCC1112 ٤) *Bacillus cereus*- PTCC1247 تهیه شده از مرکز کلکسیون کشت میکروبی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران استفاده گردید.

۲-۵- فعال سازی سوسپانسیون میکروبی

پس از دریافت سوش های مورد نظر به منظور فعال سازی، باکتری ها مطابق با دستورالعمل در شرایط استریل به محیط کشت مایع مولر هینتون منتقل شده و بعد از رشد آنها در این محیط در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ٢٤ ساعت، روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت خطی داده شده و سپس از کلنی های رشد کرده سوسپانسیون باکتریایی تهیه گردید. برای این کار سطح کلنی رشد کرده در محیط مولر هینتون آگار را توسط نرمال سالین ۰/۹٪ شسته و سوسپانسیون غلیظی از باکتری ها را تهیه شد. سپس توسط پیپت استریل مقدار کمی از این سوسپانسیون را داخل لوله های استریل ریخته و با افزودن مقدار اضافه نرمال سالین و مقایسه آن با محلول ۰/۵مک فارلند سوسپانسیونی با غلظت $۱/۵\times ۱۰^{۸}$ CFU/ml از باکتری های مورد نظربه دست آورده شد[١٤]. در این پژوهش بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره های حاصل با روش های انتشار دیسک در آگار و نیز تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی(Minimum Inhibitory Concentration; MIC) وحداقل غلظت کشندگی باکتریایی (Minimum bactericidal Concentration؛MBC) انجام گردید.

۲-٦- روش انتشار دیسک در آگار

این روش جهت ارزیابی مواد ضد میکروبی عصاره مورد استفاده قرار می گیرد و به نام آزمون کربی – بایرنیز معروف می باشد. اساس این روش انتقال ماده ی آنتی باکتریال به درون دیسک است. در این آزمون مهم این است که مشخص کنیم اثر چه غلظتی از عصاره با آنتی بیوتیک برابری می کند یا حتی از آن بیشتر است. حتی اگر این غلظت بیشتر از غلظت آنتی بیوتیک هم باشد به دلیل مزایایی که دارد می تواند جانشین آنتی بیوتیک شود [۱۵]. در این روش ابتدا غلظت های ۵ ، ۳۰ ، ۵۵ و ۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره ها تهیه شد و پس از قرار دادن حجم مشخصی از این محلول ها بر روی هر دیسک، در کنار شعله دیسک ها خشک گردیدند. سپس یک لوپ از کشت استاندارد هر سوش روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و دیسک ها در جای مشخص شده و با رعایت فاصله مناسب قرار گرفتند. در هر پلیت ۵ دیسک قرار می گیرد که ٤ دیسک مربوط به غلظت ها و یک دیسک

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

نیز به عنوان شاهد منفی (دیسک فاقد عصاره) می باشد. لازم به ذکر است که فعالیت آنتی باکتریایی دیسک های آنتی بیوتیک استاندارد (آمپی سیلین، استرپتومایسین، پنی سیلین وونکومایسین) نیز در پلیت های جداگانه بررسی شد. در نهایت پلیت های تلقیح شده در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ ساعت قرار داده شد، پس از این مدت میانگین قطر هاله های عدم رشددر اطراف هر دیسک برحسب میلی متر گزارش شد[١٦].

۲-۷- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره ها

به منظور تعیینMIC به ازای هر میکرو ارگانیسم از یک سری ٦تایی لوله های آزمایش استفاده شد. ۵ لوله برای غلظت های مختلف عصاره ها و یک لوله نیز به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. به هرکدام از لوله ها میزان ٤ میلی لیتر از محیط کشت مولر هینتون مایع همراه با غلظت های مشخص شده از عصاره ها و یک دهم میلی لیتر از سوسپانسیون کشت یک شبه باکتری اضافه گردید. سپس لوله ها به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و پس از طی این مدت از نظر کدورت ناشی از رشد میکروارگانیسم ها بررسی گردیدند. از میان لوله های که باکتری در آن رشد نکرده بود لوله ای که حاوی کمترین غلظت عصاره گیاهی بود به عنوان MIC گزارش گردید[۱۷]. برای تعیین MBC نیز یک میلی لیتر از لوله هایی که باکتری در آن رشد نکرده بود با۱۵ میلی لیتر از محیط کشت مولرهینتون، آگار مذاب در یک پلیت کشت آمیخته داده شده و پس از بسته شدن آگار، در ۳۵درجه سانتی گراد برای ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری شد. سپس پلیتی را که حاوی کمترین غلظت عصاره بود و در آن رشدی مشاهده نشد به عنوان MBC آن عصاره گزارش شد[۱۸].

۳- آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل داده های حاصل و مقایسه میانگین ها از نرم افزار آماری SPSS 16 و آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده گردیدو اختلاف بین میانگین ها با آزمون Tuckey در سطح اطمینان ۰/۰۵ ≥p درصد انجام شد.

٤- نتایج

نتایج مربوط به وزن خشک عصاره‌های آبی و اتانولی میوه درخت کاج به دست آمده توسط روش خیساندن در جدول۱ آورده شده است.

جدول ۱ وزن خشک عصاره‌های آبی و اتانولی میوه کاج حاصل از روش خیساندن

وزن خشک عصاره آبی میوه درخت کاج	وزن خشک عصاره اتانولی میوه درخت کاج
٪۷	٪۱۰/۵

این نتایج نشان داد که درصد استحصال عصاره اتانولی میوه درخت کاج در روش خیساندن در مقایسه با عصاره آبی بیشتر است، در نتیجه با توجه به میزان استحصال عصاره توسط اتانول میزان بازدارندگی آن نسبت به عصاره آبی میوه درخت کاج بیشتر بود و در غلظت کمتری از عصاره اثر بازدارندگی نشان داد.

همچنین نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی به منظور تعیین قطر هاله بازداری و مقایسه با آنتی بیوتیک های استانداردبه ترتیب در جدول۲ و ۳ آورده شده است.

نتایج نشان دهنده عدم تاثیر عصاره آبی میوه درخت کاج تهران درکمترین غلظت (۵ میلی گرم بر میلی لیتر) بر روی دو باکتری اشرشیا کلی و سالمونلا تیفی بود، در حالی که عصاره اتانولی میوه درخت کاج در تمامی غلظت های به کار رفته در این آزمایش بر تمامی باکتری ها موثر بوده و با ایجاد هاله بازداری از رشد آنها جلوگیری می نماید. در مورد عصاره آبی با کمترین غلظت (۵ میلی گرم بر میلی لیتر) بیشترین قطر هاله۰/۲۵±۸/۰۳ مربوط به به باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس به دست آمد.

در بالاترین غلظت عصاره آبی(۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر) نیز گونه اشرشیا کلی کمترین قطر هاله بازداری ۰/۳۵ ±۱۱/٤و استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین قطر هاله ۰/٤۵ ±۱۳/۷را نشان داد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

جدول ۲ میانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر عصاره آبی و اتانولی میوه درخت کاج تهران روی میکروارگانیسم های مورد آزمایش (استافیلوکوکوس اورئوس ،باسیلوس سرئوس ، اشرشیا کلی و سالمونلا تیفی) به روش انتشار دیسک در آگار پس از سه بار آزمایش

نام عصاره	غلظت mg/ml	باکتری مورد آزمایش			
		اشرشیاکلی	سالمونلاتیفی	استافیلوکوکوس اورئوس	باسیلوس سرئوس
آبی	۵	–	–	۸/۰۳±۰/۲۵[a]	۷/۸± ۰/۳۶ [a]
	۳۰	۸/۲ ± ۰/۵۲[a]	۸/۸ ± ۰/۲۵[a]	۹/۲±۰ /۱۵ [b]	۹/۲ ±۰/۲[b]
	۵۵	۹/۶ ± ۰/۳۷ [b]	۱۰±۰/۱ [b]	۱۰/۷ ± ۰/٤ [c]	۱۰/۶±۰/۲ [c]
	۸۰	۱۱/٤ ± ۰/۳۵ [c]	۱۲/۵±۰/۵۵[c]	۱۳/۷± ۰/٤۵ [d]	۱۳± ۰/۱۵ [d]
اتانولی	۵	۸/٤ ± ۰/۱۵ [a]	۸/۹ ± ۰/ ۲[a]	۹/۶± ۰/۳۶ [a]	۹/٤± ۰/۲[a]
	۳۰	۱۰/٤ ± ۰/۳۶ [b]	۱۰/۸ ± ۰/٤۵[b]	۱۲/۲± ۰/۹۶ [b]	۱۲±۰ ۰/۹٤ [b]
	۵۵	۱۱/۵ ± ۰/٤ [c]	۱۲/۵ ± ۰/۱۵[c]	۱٤/۳± ۰/٤۹ [c]	۱٤/۲± ۰/٤۹ [c]
	۸۰	۱٤/۷ ± ۰/۲ [d]	۱۵/۵ ± ۰/۳۲[d]	۱۷/۶± ۰/٤[d]	۱۷/٤± ۰/۳۵ [d]

*علامت (–) نشان دهنده‌ی عدم وجود فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی میوه درخت کاج می‌باشد.

* حروف غیر مشابه در یک ردیف نشان دهنده ی وجود تفاوت معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ است.

جدول ۳ میانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد بر روی میکروارگانیسم های مورد آزمایش (استافیلوکوکوس اورئوس ،باسیلوس سرئوس ، اشرشیا کلی و سالمونلا تیفی) به روش انتشار دیسک در آگار پس از سه بار آزمایش

نام آنتی‌بیوتیک	باکتری مورد آزمایش			
	اشرشیاکلی	سالمونلاتیفی	استافیلوکوکوس اورئوس	باسیلوس سرئوس
ونکومایسین	۱۶	۱۹	۲۰	۱۹/۵
آمپی سیلین	۲۰	۲۸	۲۶	۳۱
استرپتومایسین	۱۷	۱۸	۱۹	۱۹
پنی سیلین	۱۸	۱۸/۵	۲۹	۲۸

در مورد عصاره اتانولی نیز در تمامی غلظت های به کار رفته گونه اشرشیا کلی با قطر بازدارندگی اندک از بین سایر گونه های باکتریایی به عنوان مقاوم ترین سویه و باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با بیشترین قطر بازدارندگی در تمامی غلظت ها حساس ترین گونه در برابر عصاره اتانولی شناخته شد. در مجموع تفاوت معنی داری بین دو نوع عصاره بر باکتری ها مشاهده شد. در مقایسه با آنتی بیوتیک ها مورد استفاده مشخص گردید که اثر تمامی غلظت های عصاره آبی و اتانولی در مورد تمامی سوش ها کمتر از اثر ضد میکروبی آنتی بیوتیک های مورد آزمایش می باشد.

نتایج مربوط به تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) و حداقل غلظت کشندگی (Minimum bactericidal Concentration؛MBC) به ترتیب در جدول ٤و۵آورده شده است.

بررسی حداقل غلظت بازدارنده از رشد عصاره های آبی و اتانولی میوه درخت کاج تهران بیانگر اینست کهMIC عصاره اتانولی برای سویه های باکتری گرم مثبت برابر مقادیرMIC به دست آمده برای عصاره آبی درمورد این باکتری هاست، اما در مورد باکتری های گرم منفی مقادیر MIC عصاره اتانولی کمتر از عصاره آبی است.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

جدول ٤ نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره آبی و اتانولی میوه کاج تهران براستافیلوکوکوس اورئوس ، باسیلوس سرئوس، اشرشیا کلی و سالمونلا تیفی

نام عصاره	غلظت mg/ml	باکتری مورد آزمایش			
		اشرشیاکلی	سالمونلاتیفی	استافیلوکوکوس اورئوس	باسیلوس سرئوس
آبی	٢	–	–	–	–
	٤	–	–	+	+
	٨	–	–	+	+
	١٦	+	+	+	+
	٣٢	+	+	+	+
	٦٤	+	+	+	+
	کنترل	–	–	–	–
تانولی	٢	–	–	–	–
	٤	–	–	+	+
	٨	+	+	+	+
	١٦	+	+	+	+
	٣٢	+	+	+	+
	٦٤	+	+	+	+
	کنترل	–	–	–	–

+:عدم رشد -: رشد

جدول ٥ نتایج حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره های آبی و اتانولی میوه کاج تهران بر استافیلوکوکوس اورئوس ، باسیلوس سرئوس ،اشرشیا کلی و سالمونلا تیفی

نام عصاره	غلظت mg/ml	باکتری مورد آزمایش			
		اشرشیاکلی	سالمونلاتیفی	استافیلوکوکوس اورئوس	باسیلوس سرئوس
آبی	٢	–	–	–	–
	٤	–	–	–	–
	٨	–	–	–	–
	١٦	–	–	–	–
	٣٢	–	–	–	–
	٦٤	–	–	+	+
	١٢٨	–	–	+	+
	کنترل	–	–	–	–
اتانولی	٢	–	–	–	–
	٤	–	–	–	–
	٨	–	–	–	–
	١٦	–	–	–	–
	٣٢	–	–	+	–
	٦٤	–	–	+	+
	١٢٨	+	+	+	+
	کنترل	-	-	-	-

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

به این صورت که MIC عصاره اتانولی برای استافیلو کوکوس اورئوس، باسیلوس سر ئوس، اشرشیا کلی و سالمونلا تیفی به ترتیب مقادیر ٤،٤ ،٨ ،٨ میلی گرم بر میلی لیتر بود در حالی که میزان MIC عصاره آبی برای ترتیب باکتریایی فوق ٤ ،٤ ، ١٦ و ١٦میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد.

این نتایج نشان می دهد که MBC عصاره آبی میوه درخت کاج برای باکتری های گرم مثبت *Staphylococcus aureus* و *Bucillus subtilis* برابر ٦٤ میلی گرم بر میلی لیتر و در مورد باکتری های گرم منفی Escherichia coli و *Salmonella thyphi* برابر ١٢٨میلی گرم بر میلی لیتر بود.

همچنین MBC عصاره اتانولی میوه درخت کاج برای باکتری های *Staphylococcus aureus* و *Bucillus subtilis* به ترتیب برابر٣٢ و ٦٤ میلی گرم بر میلی لیتر و در مورد Escherichia coli و *Salmonella thyphi* برابر ١٢٨میلی گرم بر میلی لیتر بود.

۵- بحث

مقاومت روز افزون باکتری های بیماریزا نسبت آنتی بیوتیک های متداول موجود در بازار و شیوع بیماری های عفونی که جهت درمان نیاز به این داروها دارند و نیز توانایی بالقوه برخی از گیاهان جهت تولید مواد ضد میکروبی باعث گرایش محققان به جایگزینی گیاهان دارویی با آنتی بیوتیک ها شده است.

بر اساس نتایج به دست آمده از این آزمایش عصاره های آبی و اتانولی میوه درخت کاج طیف وسیعی از فعالیت ضد میکروبی را بر علیه میکروارگانیسم های مورد مطالعه بوده است.

یکی از عواملی که ممکن است اثرات ضد میکروبی عصاره یک گیاه را تحت تاثیر قرار دهد روش عصاره گیری و نوع حلال مورد استفاده می باشد. عصاره هایی که با روش ها و حلال های متفاوت از یک گیاه استخراج می شوند می توانند اثرات ضد میکروبی متفاوتی را بر روی یک گونه خاص از میکروارگانیسم ها نشان دهند [۱۹]. در این مطالعه تجربی یافت شد که سویه های باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس در مقایسه با سوش های گرم منفی سالمونلا تیفی و اشرشیاکلی از حساسیت بیشتری در برابر عصاره های مورد استفاده برخوردار بودند و در غلظت کمتری از عصاره های آبی و اتانولی میوه درخت کاج رشد آنها متوقف شد، و در این بین بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و کمترین قطر هاله مربوط به اشرشیا کلی بود. پس اثر ضد میکروبی هر دو عصاره آبی و اتانولی تا حدودی بسته به نوع میکروارگانیسم متفاوت می باشد. همانند مطالعه پیش رو دیگر محققین نیز به حساسیت های متفاوت گونه های باکتریایی و قارچی بر علیه مواد ضد میکروبی مشابه اشاره کرده اند.

در مطالعه (سمنانی و همکاران، ١٣٨٦)، مقایسه اثر مهارکنندگی عصاره متانولی دو جنس از گیاهان گونه گیاه استخیس (Stachys) و فلومیس(Phlomis)، نشان داد که این عصاره بر روی باکتری های گرم مثبت اثر بهتری نسبت به گرم منفی ها دارد(۲۰). طباطبایی یزدی و همکاران (۱۳۹۳) تاثیر عصاره آبی و اتانولی گیاه کلپوره را علیه تعدادی از باکتری های گرم مثبت و منفی مورد بررسی قرار دادند و اظهار داشتند که سویه های گرم منفی اشرشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا بیشترین مقاومت را نسبت به عصاره کلپوره داشتند در حالی که رشد باکتری های گرم مثبت در غلظت های کمتری از هر دو عصاره متوقف گردید [۲۱].

طاهری و همکاران(۲۰۱۳)نیز در مطالعه خود نشان دادند که عصاره هیدرو الکلی برگ گیاه مورد بیشترین تاثیر را بر باکتری بر استافیلوکوکوس اورئوس در میان دیگر باکتری های مورد مطالعه داشت [۲۲].

احتمالا تفاوت حساسیت میکروارگانیسم های متفاوت به مواد ضد میکروبی به علت ساختار متفاوت میکروارگانیسم ها می باشد. علت حساسیت بیشتر باکتری های گرم مثبت نسبت به عصاره میوه درخت کاج تهران از اختلاف ساختمانی دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت نسبت به سوش های گرم منفی ناشی می شود، به طوری که باکتری های گرم مثبت در دیواره سلولی خود دارای ترکیب موکوپپتیدی به نام مورن بوده در حالی که باکتری های گرم منفی فقط لایه نازکی از موکوپپتیدمورن دارند و قسمت اعظم ساختار دیواره در آنها لیپو پروتئین و لیپو پلی ساکارید است در نتیجه مقاومت بیشتر باکتری های گرم منفی را می توان به حضور غشای فسفولیپیدی خارجی تقریبا غیر قابل نفوذ به ترکیبات چربی دوست نسبت داد[۲۳].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

نتایج پژوهش اخیر نشان داد که عصاره اتانولی میوه درخت کاج تهران دارای وزن خشک به مراتب بالاتر و نیز اثرات ضد میکروبی بیشتر نسبت به عصاره آبی بود که این موضوع را می توان اینگونه بیان کرد که مواد با اثرات ضد میکروبی در هر گیاه وابسته به ساختمان خود می توانند قطبی یا غیر قطبی باشند و قطبیت حلال مورد استفاده برای استخراج ماده موثره گیاه بسیار مهم است [٢٤]. بنابراین می توان اظهار داشت که عمده ترکیبات با اثرات ضد میکروبی در این گیاه قطبیت خیلی بالایی ندارند که بتوانند توسط حلال های قطبی مثل آب استخراج شوند و به احتمال قوی توسط حلال های غیر قطبی مثل اتانول استخراج شوند. (حیدری سورشجانی و همکاران ،٢٠١٣) اثر ضد میکروبی عصاره های آبی و اتانولی مرزه بختیاری را بر اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس بررسی و به این نتیجه رسیدند که عصاره اتانولی مرزه اثر بازدارندگی بیشتری بر سوش های مورد مطالعه نشان داد. این نتیجه با یافته های این پژوهش مشابه می باشد[٢٥].

غلظت های متفاوت عصاره نیز در میزان اثر ضد میکروبی موثر است و در مطالعات متعددی نیز به این موضوع اشاره شده است که با افزایش میزان غلظت عصاره ، اثرات ضد میکروبی گیاه و هاله عدم رشد نیز افزایش می یابد .این امر را می توان به مقدار ماده موثره موجود در عصاره ها نسبت داد. در مطالعه جلالی و همکاران(١٣٨٦) در مورد بررسی عصاره های مختلف میوه سگ دندان خار (Pycnocycla Spinosa Decne) نیز بیان شد که اثر ضد میکروبی عصاره ها با افزایش غلظت افزایش می یابد[٢٦]. همچنین نتایج مطالعه ابراهیمی و همکاران(١٣٩٠) نیز نشان داد که اثرعصاره متانولی اجزای مختلف بلوط ایرانی (*Quercus Persica*)بر روی باکتری اشرشیا کلی وابسته به غلظت است[١٥].

مقایسه هاله های عدم رشد آنتی بیوتیک های مورد استفاده در این آزمایش با عصاره های آبی و اتانولی میوه درخت کاج تهران نشان می دهد که اثر این گیاه به صورت عصار ه های تام که مخلوط بیشماری از مواد است بسیار کمتر از آنتی بیوتیک های مورد استفاده است و اگر ترکیبات با اثرات ضد میکروبی این عصاره ها جداسازی و خالص گردند اثرات قابل مقایسه تری باآنتی بیوتیک های استاندارد خواهد داشت. همانطور که مهدوی و همکاران (١٣٨٨) به بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره متانولی ١٢ گونه گیاهی بر روی ٦ گونه میکروبی به روش سیلندر-پلیت پرداختندوازآنتی بیوتیک جنتامایسین به عنوان شاهد مثبت استفاده کردند، آزمون ANOVA در این بررسی، معنی دار بودن تفاوت بین میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره این گیاهان را در غلظت ٥٠ میلی گرم بر میلی لیتر (بالاترین غلظت) را در مقایسه با جنتامایسین نشان میدهد که هاله های عدم رشد این آنتی بیوتیک برای تمام سوش ها بیشتر از عصاره های گیاهی بود[٢٧].

در جمع بندی می توان گفت نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده تاثیر ضد میکروبی عصاره آبی و اتانولی میوه درخت کاج تهران بر روی برخی از باکتری های بیماری زا و شاخص عفونت ومسمومیت غذایی به ویژه استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس می باشد، که می تواند به عنوان آنتی بیوتیک گیاهی با عوارض کمتر از آنتی بیوتیک های معمول راهکار مناسبی برای درمان بیماری های حاصل از این سویه های باکتریایی باشد. و همچنین پیشنهاد می شود مطالعات بیشتری از قبیل استفاده از سوش های متفاوت باکتریایی، استفاده از متدهای دیگری در آزمایشات آنتی بیوگرام و همچنین بررسی اثر ضد باکتریایی این گیاه در مدل های حیوانی و نیز به عنوان نگهدارنده های طبیعی در مدل های غذایی انجام شود.

٦- سپاس و قدردانی

بدین وسیله از زحمات جناب آقای مهندس بهروز علیزاده بهبهانی، خانم مهندس شهناز افشاریان و خانم مهندس مطهره پیرنیا که در انجام آزمایش ها ما را یاری نمودند، صمیمانه قدردانی می شود. نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد جهت یاری رساندن در انجام طرح با کد ٣/٣٠١٠٧ صمیمانه سپاسگذاری نمایند.

٧- منابع

[1] Klink B. Alternative medicine: is natural really better. *Drug Top*1997 ; 141: 99-100.

[2] Clark AM. Nutural products as a resource from new drugs. *Pharmaceutical Research* 1996.; 13: 44-1133.

[3] Weinstine R.A. Controlling antimicrobial resistance in hospitals: Infection control and use of antibiotics. *Emerging Infectious Disease* 2001;7: 188-192.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

[4] Mosaddegh M, Naghibi F. Iran Traditional Medicine: Past & Present. *Traditional Medicine & Materia medica, TMRC* 2002; 1: 2-20.(Persian)

[5] Zare H. Native and non-native spices of conifers in Iran. 1th ed. *Research Insituation of Forest and Ranges in Iran*. (Persian)

[6] Zaki zadeh.Ornamental trees. *Gillan University Publication*.2011. (Persian)

[7] Zargari A. *Medical Plants.* 5th ed . Tehran:Tehran UniversityPress 1992; p:3-6. (Persian)

[8] Sakagami H, Kawazoe Y, Oh-hara T, Kitajima K, Inoue Y, Tanuma S, Ichikawa S, Konno K .Stimulation of human peripheral blood polymorphonuclear cell iodination by lignin-related substances. *J. Leuk. Biol*. 1991; 49:277.

[9] Asar Sh.A, Jafar zade A, Mohagheghi M, Bahram abadi R. Antimicrobial effect of *Pinus elderica gum and alcoholic extract on several skin infection bacteria. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*2005;*4(3):186-191*. (Persian)

[10] Sakagami H, Kushida T , oizumi T. Distribution of lignin–carbohydrate complex in plant kingdom and its functionality as alternative medicine. *Pharmacology & Therapeutics* 2010;128:91-105.

[11] Ahmad I, Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogen. *Journal Ethnopharmacol* 2001*; 74:*113-123.

[12] Sotillo R. D, Hadley M, Holm E. T. Potato peel waste: Stability and antioxidant activity of a Freeze- Dried Extract. *J Food Sci* 1994*;* 59(5): 1031-1033.

[13] Sattari M, Shahbazi A, Najarpyrayh SH . Antibacterial effect of aqueous and alcoholic extracts of eucalyptus on *pseudomonas aeruginosa. Moderes Journal Medical Science*2005*;*8(1):19-23. (Persian)

[14] Valero M, salmeron M. Antibacterial activit of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broch . *International Journal of Food Microbiology* 2003; 85(1):73-81.

[15] Ebrahimi A, Khayami M, Nejati V. Comparison of antimicrobial effect of different parts of Querqus persica against *Escherichia coli*. Ofogh-e-Danesh;*Journal of Gonabad University of Medical Sciences.* 2012;18(1):6-12. (Persian)

[16] Mahon C. R, Manuselis G. Textbook of Diagnostic Microbiology, Saunders, 2000.

[17] Benger S, Townsend P, Ashford RL, Lambert P. An in vitro study to determine the minimum inhibitory concentration of Melaleuca alternifolia against the dermatophyte Trichophyton rubrum. *The Foot* 2004*;14*: 86 - 91.

[18] Sindambiwe J, Calomme M, Cos P, Totte J, Pieters L, Vlietinck A. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. Journal of Ethnopharmacology. 1999*;*65(1):71-7.

[19] Nostro A, Gernano MP, Angelo VA, Marino A, Cannatelli MA. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett Appl Microbiol* 2000 ; 30: 379-384.

[20] Morteza semnani K, Saidi M, Mahdavi M.R , Rahimi F. Study and comparision antimicrobial effect of methanolic extracts from several plant species of *Stachys* and *Phlomis*. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences2007;7(57):57-66. (Persian)

[21] Tabatabaei Yazdi F, Alizadeh Bhbahani B, Heidari Soureshgani M, Mortazavi A. HMUJ1393 . The in vitro study of antimicrobial effect of *Teucrium polium* extract on infectious Microorganisms.
21(1). (Persian)

[22] Taheri A, Seyfan A , Jalalinezhad S , Nasery F. Antibacterial effect of *myrtus communishydro*-alcoholic extract on pathogenic bacteria. *Zahedan Jornal of Research in Medical Sciences*2013*;*
15(6):19-24. (Persian)

[23] Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Peter J, Rinaldi M, Walsh T. 2002 . Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus spp.*:NCCLS collaborative study.*Journal of Clinical Microbiology* ؛40(9):3204-8.

[24] Eloff JN. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants. *J Ethnopharmacol* 1998 ; 60(1): 1-8.

[25] Heidari Soureshjani M , Tabatabaei Yazdi F , Mortazavi A , Shahidi F , Alizadeh Behbahani B. Antimicrobial effect of Satureja bacteria extracts aqueous and ethanolic on *Esheerichia coli* and *Staphylococcus aureus* . *Scientific Journal of*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

Biological Sciences 2013 ; 2(2):24-31. (Persian)

[26] Jalali M, Abedi D, Asghari G, Rezaie Z. MMUJ. A study of anti-microbial effect of *pycnocycla spinosa's* fruit extracts. *Mazandaran Jornal of Research in Medical Sciences*2007, 17(59):76-86. (Persian)

[27] Mahdavi meymand Z, Moshafi M.H ,Forootanfar H. antimicrobial effect study of methanolic extracts from 12 species of plant on 6 species of bacteria with cyclinder-plate method. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences 2009 ;*8(3):227-238.* (Persian)

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

Study of comparative antimicrobial effects of *Pinus elderica* extracts and selective antibiotics on some of food infection and intoxication microorganisms *"in vitro"*

Kashani, H. [1], Tabatabaei Yazdi, F. [2*], Mortazavi, S. A. [2], Shahidi, F. [2]

1. M.Sc. Student of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

(Received: 93/6/28 Accepted: 93/9/24)

Researchers give some reasons to discover new antimicrobial substances of plant origin; they are consisted of increseaing bacterial resistance to antibiotics, and susceptibility to antimicrobial. The present study examines the effect of aqueous and ethanolic extract of *Pinus elderica* fruit on infection and poisoning of food microorganisms "in vitro". Antimicrobial effect of the extracts using agar disk diffusion method and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of microbial growth and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of bacteria was performed using serial dilution method.Comparison of antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of this plant showed better effect on Gram-positive bacteria than Gram-negative bacteria.Such maximum growth of inhibition zone showed at ethanol extract from *Pinus elderica* fruit on strains of *staphylococcus aureus*, which was 17.5 + 0.14 mm. From two strains of Gram-negative bacteria, *E.coli* was the most resistant against aqueous and ethanolic extracts of this fruit. Accordingto the results, *Pinus elderica* have some what antibacterial effects.

Keywords: *Pinus elderica fruit,* Antibacterial effect, Extraction

* Corresponding Author E-Mail Address: tabatabai@um.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]