فعالیت ضدمیکروبی موسیلاژ میوه سپستان بر باکتری‌های بیماری‌زا: مطالعه در شرایط آزمایشگاهی "*in vitro*"

محسن ابراهیمی همتی کیخا[1]،حسین جوینده[2*]، بهروز علیزاده بهبهانی[3]، محمد نوشاد[3]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی،دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

2- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

3- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

(تاریخ دریافت: 98 /11/26 تاریخ پذیرش: 99/01/16)

چکیده

در این پژوهش، موسیلاژ میوه سپستان با استفاده از نسبت آب به دانه 1:6، دمای58 درجه سانتی‌گراد و pH برابر 4 استخراج شد. بعد از استریل کردن موسیلاژ استخراج شده، فعالیت ضدباکتریایی آن بر باکتری‌های *سالمونلا تیفی*، *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *لیستریا اینوکوآ*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سابتلیس* و *استافیلوکوکوساپیدرمیدیس* در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. فعالیت ضدمیکروبی موسیلاژ در غلظت‌های 37/5، 75، 150 و 300 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به روش‌های دیسک دیفیوژن و حفره در آگار ارزیابی شد. برهمکنش موسیلاژ سپستان با آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و کلرامفنیکل نیز بررسی شد. نتایج نشان داد که قطر هاله بازدارندگی مشاهده شده در اطراف دیسک‌ها با افزایش غلظت موسیلاژ میوه سپستان به طور قابل توجهی افزایش یافت. بیشترین قطر هاله بازدارندگی در روش دیسک دیفیوژن در غلظت 300 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای باکتری *استافیلوکوکوساپیدرمیدیس* با قطر 11/10 میلی‌متر مشاهده شد. حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری‌های *سالمونلا تیفی*، *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *لیستریا اینوکوآ*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سابتلیس* و *استافیلوکوکوساپیدرمیدیس* به ترتیب 64، 64، 16، 32، 128، 64، 256 و 64 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج نشان داد که حداقل غلظت کشندگی موسیلاژ میوه سپستان برای تمامی سویه‌های باکتریایی بزرگتر از حداقل غلظت مهارکنندگی بود.

کلید واژگان: موسیلاژ، میوه سپستان، اثر متقابل، باکتری‌کشی.

*مسئول مکاتبات: hosjooy@asnrukh.ac.ir

1- مقدمه

در یک دهه گذشته، مقاومت میکروارگانسیم‌های عامل فساد و مسمومیت مواد غذایی یکی از مشکلات اصلی در صنعت غذابوده است و بنابراین متخصصان علم غذا، سازمان‌های نظارتی و تولید کنندگان مواد غذایی را بر آن داشته که در جهت رفع این مشکلات پژوهش‌های مختلفی را انجام دهند[1 و 2]. گیاهان دارویی از قدیم تا حال مورد توجه انسان بوده است و قسمت‌های مختلف گیاه از جمله ریشه، ساقه، دانه، پوست، گل و حتی کل اندام‌های گیاه برای مصارف دارویی و غذایی مورد استفاده قرار گرفته است. گیاهان دارویی، دارای مواد مؤثری است که به‌عنوان ترکیبات فعال شناخته می‌شوند. این ترکیبات ممکن است دارای اثرات فیزیولوژی و ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی بر میکروارگانیسم‌ها داشته باشند[3]. جوامع بشری به منظور درمان بسیاری از بیماری‌ها و حفظ سلامت خود به مواد گیاهی خام وابسته هستند [4 و 5]. در سالیان اخیر مصرف گیاهان دارویی به دلیل عوارض ناشی از داروهایی شیمیایی به‌طور فزاینده‌ای افزایش یافته است[6].

گیاه دارویی سپستان (چسبانک) با نام علمی *Cordia myxa*L. متعلق به خانواده گاوزبانیان[1] می‌باشد که در مناطق حاره و نیمه‌حاره رشد می‌کند. میوه درخت سپستان در کشورهای آسیایی از جمله ایران و هند به صورت تازه یا ترشی مورد مصرف قرار می‌گیرد[7]. میوه این گیاه در طب سنتی استفاده‌های زیادی داشته و دارای خواص درمانی بسیاری برای بعضی از بیماری‌ها از جمله عفونت‌های ادراری، ضدکرم و آرام‌بخش است[8]. همچنین گزارش‌های وجود دارد که عصاره برگ این گیاه دارای فعالیت ضدمیکروبی بالایی می‌باشد [9]. از عوامل عمده آلوده کننده مواد غذایی می‌توان به میکروارگانیسم‌ها اشاره کرد که علاوه بر فساد مواد غذایی باعث ایجاد مسمومیت و بیماری نیز می‌شوند. از جمله این میکروارگانیسم‌ها می‌توان به *سالمونلا تیفی*، *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *لیستریا اینوکوا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سابتلیس* و *استافیلوکوکوساپیدرمیدیس* اشاره نمود [10-12].

هدف از این پژوهش بررسی اثر ضدباکتریایی موسیلاژ میوه سپستان با استفاده از روش‌های دیسک دیفیوژن، حفره در آگار، حداقل غلظت بازدارندگی از رشد، حداقل غلظت کشندگی و برهمکنش موسیلاژ میوه سپستان با آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و کلرامفنیکل در شرایط آزمایشگاهی (برون‌تنی) بود.

2- مواد و روش‌ها

این پژوهش تجربی از خرداد ماه 1398 تا آذرماه 1398 در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی و تکنولوژی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان صورت پذیرفت.

2-1- تهیه مواد شیمیایی و محیط‌های کشتمیکروبی

مواد شیمیایی و محیط‌های کشت میکروبی مورد استفاده در این پژوهش شامل توئین 80 (مرک آلمان)، دی متیل سولفوکساید[2] (مرک آلمان)، الکل (زکریا جهرم)، تری فنیل تترازولیوم کلراید (سیگما)، دیسک‌های آنتی بیوتیک جنتامایسین و کلرامفنیکل (پادتن طب)، میکروپلیت 96 خانه‌ای، محیط‌های کشت میکروبی مولر هینتون آگار و مولر هینتون براث (مرک آلمان) بود.

2-2- سویه‌های میکروبی

سویه‌های میکروبی شامل *سالمونلا تیفی*، *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا*،*لیستریا اینوکوآ*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سابتلیس* و *استافیلوکوکوساپیدرمیدیس* بود که از بانک ذخیره موجود در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان تهیه شدند.

1. Boraginaceae

2. Dimethyl sulfoxide

2-3- تهیه میوه سپستان

میوه سپستان در اواخر خردادماه و اوایل تیر ماه 1398 از شهرستان ملاثانی استان خوزستان جمع‌آوری گردید و جنس و گونه آن در گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستانمورد تایید قرار گرفت.

2-4- استخراج آبی موسیلاژ سپستان

استخراج با آب گرم رایج‌ترین روش به منظور استخراج پلی‌ساکاریدها می‌باشد. استخراج موسیلاژ میوه سپستان با استفاده از آب مقطر به نسبت آب به دانه (1:6)، دمای 58 درجه سانتی‌گراد و در pH برابر 4 انجام گردید. پس از استخراج موسیلاژ میوه سپستان و حذف ناخالصی‌های آن به‌وسیله کاغذ صافی شماره 40، موسیلاژ استخراج شده در آون در دمای 45 درجه‌سانتی‌گراد به‌مدت 72 ساعت خشک گردید[13].

2-5- فعال‌سازی سویه‌های میکروبی استاندارد

جهت فعال‌سازی سویه‌های میکروبی از کشت ذخیره موجود در آزمایشگاه میکروبیولوژی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان استفاده گردید. بدین منظور یک لوپ از سویه‌های میکروبی به‌صورت جداگانه برداشته و در لوله‌های حاوی محیط کشت مایع استریل (مولر هینتون براث)، کشت داده شدند. سپس محیط‌های مایع کشت شده در انکوباسیون به‌مدت یک شبانه روز در دمای 37 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از رشد و تکثیر باکتری‌ها در درون محیط کشت مولر هینتون براث مقداری از آن‌ها را برای به‌دست آوردن کلنی‌های خالص برداشته و به صورت جداگانه بر سطح محیط کشت جامد (مولر هینتون آگار) ریخته و به‌صورت خطی کشت داده شد. سپس محیط‌های کشت مولر هینتون آگار به‌مدت یک شبانه روز در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از رشد باکتری‌ها بر سطح محیط‌های کشت مولر هینتون آگار به‌منظور تهیه سوسپانسیون‌های میکروبی معادل استاندارد نیم مک‌فارلند یک لوپ از آن‌ها برداشته و به لوله‌های آزمایش حاوی 10 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل افزوده شدند. در نهایت لوله‌های آزمایش مذکور در دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج 625 نانومتر قرار داده شدند و تا رسیدن به‌جذب مورد نظر (0/8- 0/13) با سرم فیزیولوژی استریل رقیق گردید[14].

2-6- دیسک دیفیوژن

در طی این روش پس از ریختن و بسته شدن محیط کشت مولر هینتون آگار دردرون پلیت‌های استریل،مقدار 100 میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی معادل استاندارد نیم مک‌فارلند با کمک سمپلر روی سطح آن ریخته و به‌وسیله میله ال شکل پخش گردید. دیسک‌های کاغذی بلانک آغشته به غلظت‌های 37/5، 75، 150 و 300 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر موسیلاژ میوه سپستان با کمک پنس استریل روی سطح محیط‌های کشت مولر هینتون آگار قرار داده شدند و برای جلوگیری از حرکت دیسک‌ها با کمی فشار ثابت گردیدند. سپس در درون یخچال در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به‌منظور عمل پیش انتشار به مدت 15 دقیقه قرار داده شدند. در نهایت محیط‌های کشت مولر هینتون آگار حاوی غلظت‌های مختلف موسیلاژ میوه سپستان در دمای 37 درجه سانتی‌گرادبه‌مدت یک شبانه روز در انکوباتورنگهداری شدند. پس از گذشت مدت زمان مذکور قطر هاله عدم رشد به‌طور دقیق توسط خط‌کش اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر ثبت و گزارش گردید[15].

2-7- حفره در آگار(چاهک آگار)

در این روش در ابتدا میزان 20 میلی‌لیتر از محیط کشت مولر هینتون آگار در درون هر کدام از پلیت‌های استریلریخته شد. پس از سرد و بسته شدن محیط‌های کشت، به کمک انتهای پیپت پاستور استریل حفره‌هایی به قطر 6 میلی‌متر بر سطح آن‌ها ایجاد گردید. برای ممانعت از نفوذ موسیلاژ میوه سپستان به‌کف پلیت‌ها انتهای حفره‌ها ایجاد شدهتوسط آگار مذاب مسدود گردید. سپس میزان 100 میکرولیتر از هر یک از سویه‌های میکروبی معادل استاندارد نیم مک‌فارلند رویسطح هر یک از پلیت‌ها ریخته و کشت داده شد. در نهایت از غلظت‌های 37/5، 75، 150 و 300

میلی‌گرم بر میلی‌لیتر موسیلاژ میوه سپستان مقدار 20 میکرولیتر برداشته و به درون هر یک از حفره‌های ایجاد شده ریخته و یک حفره به عنوان حفره شاهد در نظر گرفته شد. پس از آن پلیت‌های کشت داده شده به مدت یک شبانه روز در دمای 37 درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند. پس از اتمام مراحل گرمخانه‌گذاری قطر هاله‌های بازدارندگی ایجاد شده در اطراف هر یک از چاهک‌ها به‌وسیله خط‌کش اندازه‌گیری و به‌صورت میلی‌متر گزارش گردید[18 و19].

2-8- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (حداقل غلظت مهارکنندگی)

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی مطابق با مطالعه علیزاده بهبهانی و همکاران (2017)، انجام گردید. در این روش ابتدا از موسیلاژ میوه سپستان استریل شده توسط UV استوک مادر به غلظت 512 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس از غلظت مادر، غلظت‌های متوالی از موسیلاژ میوه سپستان تهیه شد. غلظت‌های متوالی موسیلاژ میوه سپستان شامل غلظت‌های 256، 128، 32، 16، 8، 4، 2 و 1میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند. پس از ریختنتمام غلظت‌ها به‌درون میکروپلیت 96 خانه‌ای، به هر کدام از چاهک‌ها مقدار 20 میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی معادل استاندارد نیم مک‌فارلند اضافه شد. در نهایت میکروپلیت 96 خانه‌ایبه‌مدت یک شبانه روز در دمای 37 درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شد. پس از سپری شدن مدت زمان مذکور مقدار 20 میکرولیتر معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید به‌درون تمام چاهک‌ها میکروپلیت 96 خانه‌ای اضافه گردید، سپس دوباره میکروپلیت 96 خانه‌ای به‌مدت 15 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. پس از گذشت مدت زمان مذکور کمترین غلظت از موسیلاژ میوه سپستان که مانع از رشد سویه‌های میکروبی شد و هیچ گونه تغییر رنگی در آن مشاهدهنگردید به‌عنوان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد گزارش شد[16].

2-9- تعیین حداقل غلظت کشندگی

برای تعیین میزان حداقل غلظت کشندگی موسیلاژ میوه سپستان از چاهک‌هایی که در میکروپلیت 96 خانه‌ای هیچ گونه تغییر رنگیپس از اضافه کردن معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید ایجاد نکرده بودند به میزان 100 میکرولیتر برداشته و روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار به‌صورت سطحی کشت داده شد. محیط‌های کشت مذکور به‌مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد درون گرمخانه قرار داده شدند. پس از سپری شدنزمان گرمخانه‌گذاری محیط‌های کشت از درون گرمخانه خارج و محیط‌هاییکه در سطح آن‌ها هیچ گونه کلنی یا پرگنه رشد نکرده باشد، به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی از رشد موسیلاژ میوه سپستان گزارش شد[17-19].

2-10- برهمکنش موسیلاژ میوه سپستانبا دیسک‌های آنتی‌بیوتیک

ارزیابی اثر ترکیبی میان موسیلاژ میوه سپستان و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مطابق با مطالعه‌های دانشمندی و همکاران (2010) [20] و برزگر و همکاران (2019)[21] انجام پذیرفت.

2-11- آزمون آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌های این پژوهش از نرم افزار آماری SPSS[1] نسخه 22 استفاده گردید، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) جهت مقایسه میانگین‌ها و از آزمون Duncan جهت بررسی اختلاف بین میانگین‌ها در سطح $p< 0/05$ استفاده شد.

3- نتایج و بحث

نتایج بررسی اثر ضدمیکروبی موسیلاژ میوه سپستان به روش دیسک دیفیوژنبرسالمونلا تیفی، اشرشیا کلی، سودوموناس ائروژینوزا، لیستریا اینوکوآ، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس

1. Statistical package for the social sciences

سرئوس، باسیلوس سابتلیس و استافیلوکوکوساپیدرمیدیس در جدول 1، آورده شده است. نتایج نشان داد بیشترین قطر هاله بازدارندگی رشد در غلظت 300 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مربوط به باکتری استافیلوکوکوساپیدرمیدیس بود و کمترین قطر هاله بازدارندگی رشد در همین غلظت مربوط به باکتری گرم منفی اشرشیا کلیبود. به طور کلی نتایج حاصل از این آزمون نشان می‌دهد که با افزایش غلظت موسیلاژ میوه سپستان قطر هاله بازدارنگی نیز افزایش یافت.در شکل 1، نمایی ازقطر هاله بازدارندگی مربوط به باکتری استافیلوکوکوساپیدرمیدیس نشان داده شده است.

Table 1 The mean inhibition zone diameter (mm) of Sepestan fruit mucilage (SFM) on some pathogenic microorganismsby disk diffusion agar (DDA) method.

Antimicrobial substance / Microorganism	37.5 mg/ml	75 mg/ml	150 mg/ml	300 mg/ml
Pseudomonas aeruginosa	7.30 ±0.20	8.30 ±0.26	8.20 ±0.26	9.30 ±0.26
Escherichia coli	7.90 ±0.17	8.20 ±0.26	9.00 ±0.20	9.10 ±0.10
Salmonella typhi	8.10 ±0.36	8.30 ±0.20	9.10 ±0.52	9.20±0.10
Listeria innocua	-	8.60 ±0.34	10.10 ±0.95	10.20±0.17
Staphylococcus aureus	8.10 ±0.60	8.90±0.52	9.20 ±0.26	9.60±0.55
Bacillus cereus	8.60 ±0.36	8.30±0.26	9.60 ±0.36	9.90 ±0.65
Bacillus subtilis	-	-	-	10.20 ±0.10
Staphylococcus epidermidis	7.50 ±0.50	8.10 ±0.10	8.90 ±0.79	11.10 ±0.17

Values are expressed as mean ±standard deviations, n = 3.

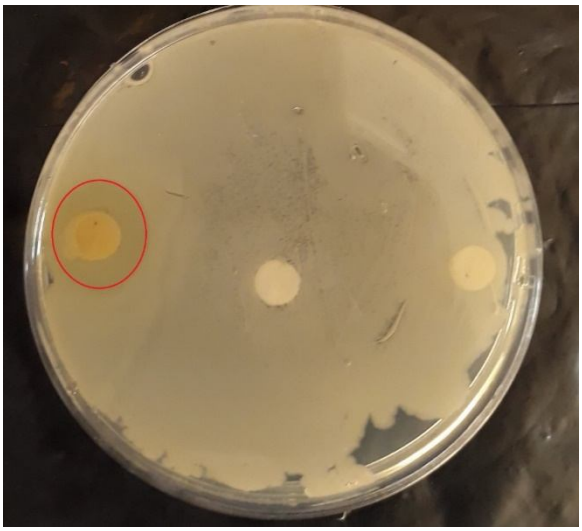

Fig 1 The inhibition zonediameter (mm) of SFMon *Staphylococcus epidermidis*.

نتایج بررسی فعالیت ضدمیکروبی موسیلاژ میوه سپستان به روش حفره در آگار بر باکتری‌های عامل فساد و مسمومیت غذایی در جدول 2، نشان داده شده است. نتایج نشان دادکه فعالیت ضدمیکروبی موسیلاژ میوه سپستان بر لیستریا اینوکوآ و استافیلوکوکوس اورئوس در تمام غلظت‌ها مؤثر بوده است. نتایج نشان داد که غلظت 37/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر موسیلاژ میوه سپستان بر تمامی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت (به جزء لیستریا اینوکوآ و استافیلوکوکوس اورئوس) فاقد اثر بازدارندگی بود. نتایج نشان داد که غلظت 75 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر موسیلاژ میوه سپستان فاقد اثر ضدباکتریایی بر باکتری‌های اشرشیاکلی و باسیلوس سابتلیس بود.

Table 2 The mean inhibition zone diameter (mm) SFMon some pathogenic microorganismsbywell diffusion agar (WDA) method

Antimicrobial substance / Microorganism	37.5 mg/ml	75 mg/ml	150 mg/ml	300 mg/ml
Pseudomonas aeruginosa	-	8.10 ±0.20	8.20 ±0.26	8.20 ±0.20
Escherichia coli	-	-	8.20 ±0.17	8.30 ±0.26
Salmonella typhi	-	8.20±0.17	8.30 ±0.26	10.30 ±0.17
Listeria innocua	8.10 ±0.26	8.60 ±0.34	10.20 ±0.17	10.20 ±0.10
Staphylococcus aureus	7.30 ±0.34	8.20 ±0.17	9.30 ±0.20	10.30±0.10
Bacillus cereus	-	8.30 ±0.26	9.30 ±0.20	10.30±0.26
Bacillus subtilis	-	-	8.20±0.26	9.20 ±0.26
Staphylococcus epidermidis	-	8.10 ±0.10	8.30 ±0.17	10.10 ±0.17

Values are expressed as mean ±standard deviations, n = 3.

نتایج حاصل از آزمون حداقل غلظت مهارکنندگیموسیلاژ میوه سپستان بر سویه‌های مورد مطالعه در جدول 3، نشان داده شده است. حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری‌های سالمونلا تیفی، اشرشیا کلی، سودوموناس ائروژینوزا، لیستریا اینوکوآ، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سابتلیس و استافیلوکوکوساپیدرمیدیس به ترتیب 64، 64، 16، 32، 128، 64، 256 و 64 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. شکل 2، نمایی از حداقل غلظت مهارکنندگی موسیلاژ میوه سپستان نشان داده شده است. حداقل غلظت کشندگی موسیلاژ میوه سپستان برای تمامی باکتری‌ها مورد بررسی بزرگتر از حداقل غلظت مهارکنندگی بود (جدول 3).

Table 3 The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)of the SFMon some pathogenic microorganisms

Microorganism	MIC	MBC
Pseudomonas aeruginosa	16	>512
Escherichia coli	64	>512
Salmonella typhi	64	>512
Listeria innocua	32	>512
Staphylococcus aureus	128	>512
Bacillus cereus	64	>512
Bacillus subtilis	256	>512
Staphylococcus epidermidis	64	>512

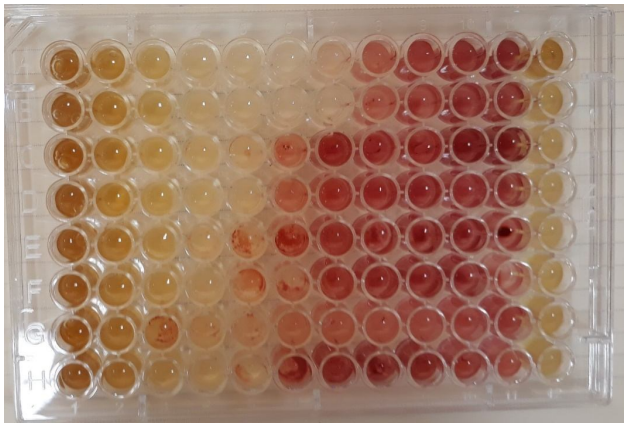

Fig 2 The MIC of SFMon some pathogenic microorganisms.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که موسیلاژ میوه سپستان توانایی ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را در شرایط آزمایشگاهی داشت. نتایج نشان داد قطر هاله بازدارندگی حاصل از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین بر سالمونلا تیفی، اشرشیا کلی، سودوموناس ائروژینوزا، لیستریا اینوکوآ، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سابتلیس و استافیلوکوکوساپیدرمیدیس به ترتیب 22/30، 22/30، 16/10، 26/10، 24/10، 22/20، 20/20 و 22/20 میلی‌متر بود. نتایج حاصل از ترکیب موسیلاژ میوه سپستان با آنتی‌بیوتیک رایج جنتامایسین برای سویه‌های باکتریاییسالمونلا تیفی، اشرشیا کلی، سودوموناس ائروژینوزا، لیستریا اینوکوآ، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سابتلیسو استافیلوکوکوساپیدرمیدیس به ترتیب 14/10، 18/30، 14/20، 20، 18/20، 24/30، 32/10 و14/20 میلی‌متر بود. نتایج نشان داد قطر هاله بازدارندگی حاصل از آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل بر سالمونلا تیفی، اشرشیا کلی، سودوموناس ائروژینوزا، لیستریا اینوکوآ، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سابتلیس و استافیلوکوکوساپیدرمیدیسبه ترتیب 12/20، 22/30، 10/20،20/12، 20/30، 24/20، 26/20 و 24/30 میلی‌متر بود. نتایج حاصل از ترکیب موسیلاژ میوه سپستان با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل برای سویه‌های باکتریایی سالمونلا تیفی، اشرشیا کلی، سودوموناس ائروژینوزا، لیستریا اینوکوآ استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سابتلیس و استافیلوکوکوساپیدرمیدیس به ترتیب 8/10، 14/10، 12/30، 18/20، 20/30، 20/20، 20/10 و 12میلی‌متر بود..در شکل 3، نمونه‌ای از تاثیر همزمان موسیلاژ میوه سپستان با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین بر باکتری، باسیلوس سابتلیس نشان داده شده است.

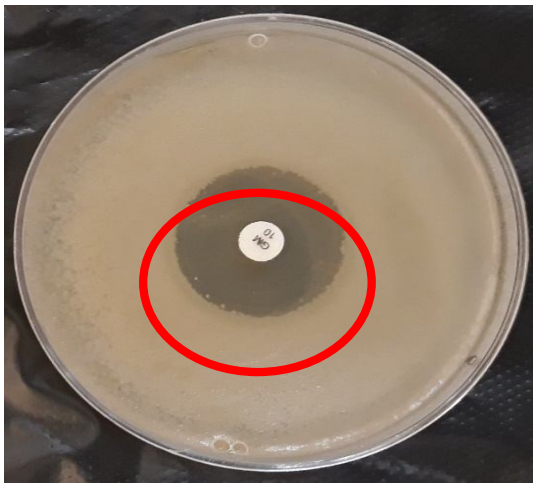

Fig. 3. The interaction of SFMwith gentamicin antibiotics on *Bacillus subtilis*.

در چندین دهه گذشته استفاده از گیاهان دارویی بسیار مورد توجه جوامع بشری قرار گرفته است و تا حدودی زیادی توانسته است بسیاری از اثرات و مشکلات ناشی از مصرف داروهای شیمیایی را بر طرف نماید. در این پژوهش اثر ضدمیکروبی موسیلاژ میوه سپستان بر 8 سویه‌ی گرم منفی و گرم مثبت باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج به دست آمده از این پژوهش موسیلاژ میوه سپستان تا حدود زیادی توانست از رشد باکتری‌های بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی ممانعت به‌عمل آورد. در پژوهش حاضر نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های میکروبی نشان داد که باکتری‌های گرم مثبت حساسیت بیشتری به موسیلاژ میوه سپستان نسبت به باکتری‌های گرم منفی دارند که علت آن را می‌توان در نوع ساختار باکتری‌های گرم مثبت و منفی دانست. مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی را می‌توان به وجود غشای فسفولیپیدی خارجی نسبت داد. پیرنیا و همکاران (1394)، اثر ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و اتانولی میوه درخت سپستان بر *استافیلوکوکوساورئوس*، *باسیلوسسرئوس*، *اشرشیا کلی* و *سالمونلا تیفی* را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که عصاره‌های آبی و اتانولی میوه سپستانروی باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* مؤثرتر بود. بالاترین مقادیرحداقل غلظت

مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی برای *سالمونلا تیفی* به ترتیب 64 و 256 میلی گرم بر میلی لیتر و در مورد عصاره اتانولی نیز به ترتیب 32 و 256 میلی گرم بر میلی لیتر بود[22]. پیرنیا و همکاران (1395)، کارایی روش سطح پاسخ در بهینه‌سازی شرایط استخراج عصاره اتانولی میوه سپستان و بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره علیه تعدادی از میکروارگانیسم‌های پاتوژن را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد اثر بازدارندگی عصاره اتانولی بهینه علیه سویه‌های باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* و سویه قارچی *کاندیدا آلبیکنس* قابل ملاحظه بود[23]. جوینده و همکاران (1396)، فعالیت ضدمیکروبی و برهمکنش عصاره‌های آبی و اتانولی برگ درخت سپستان بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در شرایط برون‌تنی مورد مطالعه قرار دادند. نتاج حاصل از مطالعه آن‌ها نشان دادکه حداقل غلظت بازدارندگی عصاره آبی برگ سپستانبر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه با توجه به نوع میکروارگانیسماز128 تا 256 میلی‌گرم برمیلی‌لیتر متفاوت بود. همچنین نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد حداقل غلظت بازدارندگی عصاره اتانولی از 64 تا 256 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در مطالعه آن‌ها بیشترین مقاومت در برابر عصاره‌های آبی و اتانولی سپستان مربوط به باکتری گرم منفی*سودوموناسائروژینوزا* بود[24]. ناریوا و همکاران(2011)، اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی پوستدرختگونه‌ای از درخت سپستان را مورد بررسی و مطالعه قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن نشان داد که پوست این گونه ادارای فعالیت ضدقارچی و ضدباکتریایی بود[25]. نتایج این پژوهشگران با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی داشت.

4- نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که موسیلاژ میوه سپستان دارای فعالیت ضدمیکروبی قابل توجهی بر سویه‌های مورد بررسی داشت. همچنین با افزایش غلظت میوه سپستان قطر هاله عدم رشد نیز افزایش یافت. با توجه به مصرف سنتی از میوه سپستان در برخی نقاط ایران و همچنین استفاده از آن در درمان بیماری‌های به نظر می‌رسد بتوان از پتانسیل بالقوه موسیلاژ میوه سپستان چه در صنایع داروسازی و چه در صنایع غذایی بهره‌مند شد. هر چند انجام آزمون‌های تکمیلی همانند شناسایی ترکیبات، اثر سمیت سلولی و ... نیز پیشنهاد می‌گردد.

5- تقدیر و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد می‌باشد، لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

6- منابع

[1] Lattanzio V, KroonPA, LinsalataV,Cardinali A.Globe artichoke: afunctional food and source of nutraceuticalingredients. Journal of Functional Foods. 2009;1(2):131-144.

[2] NegiPS. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stabilityand safety issues for food application.InternationalJournal of Food Microbiology. 2012;156(1): 7-17.

[3] Phillipson JD. Phytochemistry and medicinal plants.Phytochemistry. 2001;56(3):237-43.

[4] Jack DB. One hundred years of aspirin. Lancet.1997;350(9075):437-9.

[5] Rasool Hassan BA. Medicinal plants (importance and uses).Pharmaceut Anal Acta. 2012;3:139.

[6] Akhondzadeh Basti A, Misaghi A, Gheibi S. Effect of *Zataria multiflora*Boiss essential oil on log probability percentage of growth of *Bacillus cereus* in Brain & Heart Infusion Broth. The Journal of Medicinal Plants. 2005; 4 (16): 48-55.

[7] AfzalM, ObuekweC, ShuaibN, BarakatH. Photosyntheticpigment profile of *Cordia myxa* L. and its potential in folklore medicinalapplication. Food, Agriculture and Environment.2004; 2(2):114-120.

[8] Inas, ZA, Abdallah Hala, AH, Khattab Gehan, H. Heeba. Gastroprotective Effect of *Cordia Myxa* L. Fruit Extract against Indomethacin-Induced Gastric Ulceration in Rats. Life Science Journal, 2011; 8(3): 433-445.

[9] FicarraR, Ficarra P, Tommasini S, Calabro ML, Ragusa S, BarberaR, RapisardaA. Leaf extract of some Cordia species; analgesic and anti-inflammatory activities as well as their

pathogens. Microbial Pathogenesis. 2018; 114:299-303.
[19] Sureshjani MH, Yazdi FT, Mortazavi SA, Alizadeh Behbahani B, Shahidi F. Antimicrobial effects of *Kelussiaodoratissima* extracts against food borne and food spoilage bacteria" in vitro. Journal of Paramedical Sciences. 2014;5(2):115-20.
[20] Daneshmandi S, Soleimani N, Pourfathollah AA, Sattari M. Evaluation of the drug synergistic and antibacterial effects of cuminumcyminum essential oil. Journal of Arak University of Medical Sciences. 2010;13(2): 75-82. [Full Text in Persian].
[21] BarzegarH, Alizadeh Behbahani B, Mehrnia MA.Identification of the chemical compounds andantibacterial activity of *Ocimumbasilicum*essential oil and the effects of its interactionwith tetracycline and chloramphenicol antibiotics on some pathogenic microorganisms causing infection and food poisoning. Journal of Food Science and Technology. 2019;90(16): 113-124.[Full Text in Persian].
[22] Pirnia M, EdalatianDovom, MR, TabatabaeeYazdi 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 University of Medical Sciences Journal.2014; 9(4):39-48. [Full Text in Persian].
[23] Pirnia M, Edalatian MR, TabatabaeeYazdi F, Shahidi, F. Efficiency of response surface methodology to optimization ethanolic extract from *Cordia myxa* and evaluation of antimicrobial activity of extract against a number of pathogenic microorganisms. Journal of Food Science and Technology. 2016; (55)13: 55-67. [Full Text in Persian].
[24] Jooyandeh H, Noshad M, Barzegar H. Antimicrobial activity and interaction of aqueous and ethanolic extracts Leaf *Cordia myxa* on pathogenic microorganisms in In vitro conditions. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2016; 22(79): 41-50.[Full Text in Persian].
[25] Nariya PB, Bhalodia NR, Shukla VJ, Acharya RN. Antimicrobial and antifungal activities of *Cordia dichotoma* (Forster F.) bark extracts. An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda. 2011;32(4):585-9.
chromatographic analysis. Farmaco. 1995; 50:245-256.
[10] Razavilar, D. Pathogenic microorganisms in foods and epidemiology food poisoning. University of Tehran press. *2rd, 2431*, 1-103.
[11] Jawetz E, Melnick GL, Adelberg EA. In:MedicalMicrobiology. 24th ed, Mc Graw Hill Inc.Columbus, OH, USA. 2007; 224-230.
[12] Dieckema DJ, Pfaller M, Schmitz FJ, SmeyevskyJ, Jones RN. Survey of infections due tosusceptibility of isolates collected in theUnites States, Canada, Latin America, Europeand the Western region for the SENTRY pacificantimicrobial surveillance program, 1997-1999.Clin Infect. 2001; 32: S114-S132.
[13] JoukiM. Produchtion of antimicrobial edible films based on quince seed mucilage containing oregano or thyme essential oil and their effects on shelf life extension of rainbow trout fillets. Ph.D. Dissertation, Ferdowsi University of Mashhad Faculty of Agriculture. 2014.[Full Text in Persian].
[14] Valero, M., & Salmeron, M. 2003. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* intyndallized carrot broth. International Journal of Food Microbiology, 85(1): 73-81.
[15] Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Fakhri S, Mortazavi SA, Mohebbi M. Investigation of chemical compounds and antibacterial activity of tarragon (*Artemisia dracunculus*) essential oil on some pathogenic bacteria in vitro. Qom University of Medical Sciences Journal. 2017;11(9):42-51. [Full Text in Persian].
[16] Alizadeh Behbahani B, Yazdi FT, Shahidi F, Mortazavi SA, Mohebbi M. Principle component analysis (PCA) for investigation of relationship between population dynamics of microbial pathogenesis, chemical and sensory characteristics in beef slices containing Tarragon essential oil. Microbial Pathogenesis. 2017;105:37-50.
[17] Alizadeh Behbahani B, Shahidi F. *Melissa officinalis* essential oil: Chemical compositions, antioxidant potential, total phenolic content and antimicrobial activity. Nutrition and Food Sciences Research. 2019;6(1):17-25.
[18] Alizadeh Behbahani B, Imani Fooladi AA. Evaluation of phytochemical analysis and antimicrobial activities Allium essential oil against the growth of some microbial

Antimicrobial potential of Sepestan fruit on pathogenic bacteria: A study "*in vitro*"

Ebrahimi Hemmati Kaykha, M. [1], Jooyandeh, H. [2*], Alizadeh Behbahani, B. [3], Noshad, M. [3]

1. MSc. student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

(Received: 2020/02/15 Accepted:2020/04/04)

In this investigation, the Sepestan fruit mucilage (SFM) was extracted by water to seed ratio 1:6, extraction temperature 58 °C, and pH 4. After sterilization of extracted mucilage, its antibacterial activity was assessed on pathogenic bacteria including *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus epidermidis*"*in vitro*". Antimicrobial potential of mucilage, at the different SFM levels: 37.5, 75, 150 and 300 mg/ml was evaluated using disk diffusion agar and well diffusion agar methods. Furthermore, the interaction of SFMwith gentamicin and chloramphenicol antibiotics was assessed. Results shown that by increasing the SFMconcentrations, the inhibition zone diameter (IZD) around the discs were noticeably increased. In the disk diffusion agar method, the highest IZDwas observed at the concentration of 300 mg/ml SFM for *Staphylococcus epidermidis* with 11.10 mm. The minimum inhibitory concentration (MIC) for *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus epidermidis* was 64, 64, 16, 32, 128, 64, 256 and 64 mg/ml, respectively. Results shown that the minimum bactericidal concentration (MBC) of SFM for the all tested bacterial strains was greater than their MIC.

Keywords: Mucilage, Sepestan fruit, Interaction effect, Bactericidal.

* Corresponding Author E-Mail Address: hosjooy@asnrukh.ac.ir