

فعالیت ضد میکروبی موسیلاژ میوه سپستان بر باکتری‌های بیماری‌زا: مطالعه در شرایط آزمایشگاهی "in vitro"

محسن ابراهیمی همتی¹، کیخا¹، حسین جوینده^{2*}، بهروز عزیزاده بهبهانی³، محمد نوشاد³

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

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

3- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، 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، دمای 58 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 اتروژینوزا، لیستریا اینوکوا، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سابتلیس و استافیلوکوکوساپیدرمیدیس در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. فعالیت ضد میکروبی 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 جتتامایسین 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 اتروژینوزا، لیستریا اینوکوا، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سابتلیس و استافیلوکوکوساپیدرمیدیس به ترتیب 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 میکروارگانیسم‌های عامل فساد و مسمومیت مواد غذایی یکی از مشکلات اصلی در صنعت غذا بوده 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 داروهای شیمیایی به‌طور فزاینده‌ای افزایش یافته است [6].

گیاه دارویی سپستان (چسبانک) با نام علمی *Cordia myxa* L. متعلق به خانواده گاوزبانیان¹ 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 ضد میکروبی 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 *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* 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

کشت میکروبی

مواد شیمیایی و محیط‌های کشت میکروبی مورد استفاده در این پژوهش شامل توئین 80 (مرک آلمان)، دی متیل سولفوکساید² (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 هیتتون آگار و مولر هیتتون برات (مرک آلمان) بود.

2-2- سویه‌های میکروبی

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

3-2- تهیه میوه سپستان

میوه سپستان در اواخر خردادماه و اوایل تیر ماه 1398 از شهرستان ملاثنانی 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.

4-2- 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 به وسیله کاغذ صافی شماره 40، موسیلاژ استخراج شده در آن در دمای 45 درجه سانتی‌گراد به مدت 72 ساعت خشک گردید [13].

5-2- 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 به صورت جداگانه برداشته و در لوله‌های حاوی محیط کشت مایع استریل (مولر هیتتون براث)، کشت داده شدند. سپس محیط‌های مایع کشت شده در انکوباسیون به مدت یک شبانه روز در دمای 37 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از رشد و تکثیر باکتری‌ها در درون محیط کشت مولر هیتتون براث مقداری از آن‌ها را برای به دست آوردن کلنی‌های خالص برداشته و به صورت جداگانه بر سطح محیط کشت جامد (مولر هیتتون آگار) ریخته و به صورت خطی کشت داده شد. سپس محیط‌های کشت مولر هیتتون آگار به مدت یک شبانه روز در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از رشد باکتری‌ها بر سطح محیط‌های کشت مولر هیتتون آگار به منظور 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 به جذب مورد نظر (0/8 - 0/13) با سرم فیزیولوژی استریل رقیق گردید [14].

6-2- دیسک دیفیوژن

در طی این روش پس از ریختن و بسته شدن محیط کشت مولر هیتتون آگار در درون پلیت‌های استریل، مقدار 100 میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی معادل استاندارد نیم مک‌فارلند با کمک سمپلر روی سطح آن ریخته و به وسیله میله آل 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 هیتتون آگار قرار داده شدند و برای جلوگیری از حرکت دیسک‌ها با کمی فشار ثابت گردیدند. سپس در درون یخچال در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به منظور عمل پیش انتشار به مدت 15 دقیقه قرار داده شدند. در نهایت محیط‌های کشت مولر هیتتون آگار حاوی غلظت‌های مختلف موسیلاژ میوه سپستان در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه روز در انکوباتور نگهداری شدند. پس از گذشت مدت زمان مذکور قطر هاله عدم رشد به طور دقیق توسط خط‌کش اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر ثبت و گزارش گردید [15].

7-2- حفره در آگار (چاهک آگار)

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

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 رنگ‌پس از اضافه کردن معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید ایجاد نکرده بودند به میزان 100 میکرولیتر برداشته و روی سطح محیط کشت مولر هیتون آگار به صورت سطحی کشت داده شد. محیط‌های کشت مذکور به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد درون گرمخانه قرار داده شدند. پس از سپری شدن زمان گرمخانه‌گذاری محیط‌های کشت از درون گرمخانه خارج و محیط‌هایی که در سطح آن‌ها هیچ گونه کلنی یا پرگنه رشد نکرده باشد، به عنوان حداقل غلظت کشندگی از رشد موسیلاژ میوه سپستان گزارش شد [17-19].

2-10- برهمکنش موسیلاژ میوه سپستان با

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 SPSS¹ 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 ضد میکروبی موسیلاژ میوه سپستان به روش دیسک دیفیوژن بر سال‌مونلا تیفی، اشرشیا کلی، سودوموناس ائروژینوزا، لیستریا اینوکوا، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس

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 به وسیله خط‌کش اندازه‌گیری و به صورت میلی‌متر گزارش گردید [18 و 19].

2-8- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد

(حداقل غلظت مهارکنندگی)

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی مطابق با مطالعه عزیزاده 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 1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند. پس از ریختن تمام غلظت‌ها به درون میکروپلیت 96 خانه‌ای، به هر کدام از چاهک‌ها مقدار 20 میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی معادل استاندارد نیم مک‌فارلند اضافه شد. در نهایت میکروپلیت 96 خانه‌ای به مدت 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 به درون تمام چاهک‌ها میکروپلیت 96 خانه‌ای اضافه گردید، سپس دوباره میکروپلیت 96 خانه‌ای به مدت 15 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از گذشت مدت زمان مذکور کمترین غلظت از موسیلاژ میوه سپستان که مانع از رشد سوبه‌های میکروبی شد و هیچ گونه تغییر رنگی در آن مشاهده‌نگردید به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد گزارش شد [16].

1. Statistical package for the social sciences

اشرشیا کلیبود. به طور کلی نتایج حاصل از این آزمون نشان می‌دهد که با افزایش غلظت موسیلاژ میوه سپستان قطر هاله بازدارندگی نیز افزایش یافت. در شکل 1، نمایی از قطر هاله بازدارندگی مربوط به باکتری استافیلوکوکوساپیدرمیدیس نشان داده شده است.

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

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

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

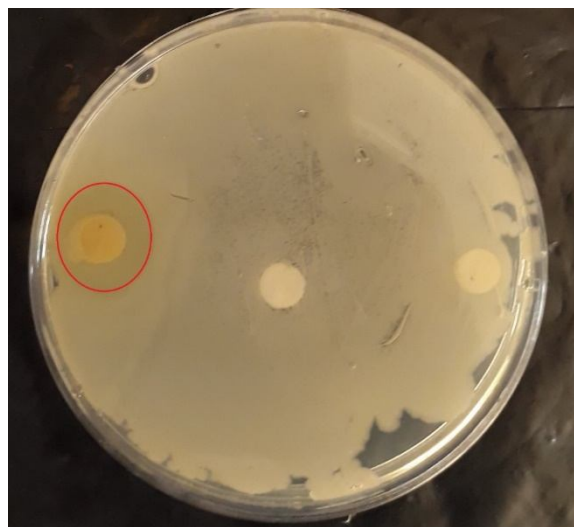


Fig 1 The inhibition zone diameter (mm) of SFM on *Staphylococcus epidermidis*.

سپستان بر تمامی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت (به جزء لیستریا اینوکوا 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.

نتایج بررسی فعالیت ضد میکروبی موسیلاژ میوه سپستان به روش حفره در آگار بر باکتری‌های عامل فساد و مسمومیت غذایی در جدول 2، نشان داده شده است. نتایج نشان داد که فعالیت ضد میکروبی موسیلاژ میوه سپستان بر لیستریا اینوکوا و استافیلوکوکوس اورئوس در تمام غلظت‌ها مؤثر بوده است. نتایج نشان داد که غلظت 37/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر موسیلاژ میوه

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

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

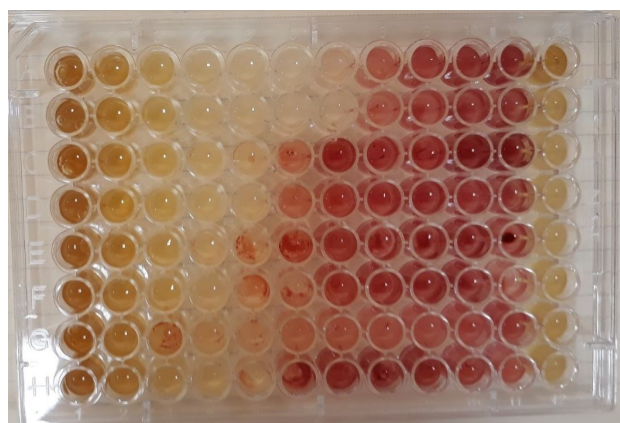
Values are expressed as mean ±standard deviations, n = 3.

64، 256 و 64 میلی گرم بر میلی لیتر بود. شکل 2، نمایی از حداقل غلظت مهارکنندگی موسیلاژ میوه سپستان نشان داده شده است. حداقل غلظت کشندگی موسیلاژ میوه سپستان برای تمامی باکتری ها مورد بررسی بزرگتر از حداقل غلظت مهارکنندگی بود (جدول 3).

نتایج حاصل از آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی موسیلاژ میوه سپستان بر سویه های مورد مطالعه در جدول 3، نشان داده شده است. حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری های سالمونلا تیفی، اشرشیا کلی، سودوموناس اثرورژینوزا، لیستریا اینوکوا، استافیلوکوکوس اورثوس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سابتلیس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به ترتیب 64، 64، 16، 32، 128.

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

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

**Fig 2** The MIC of SFMon some pathogenic microorganisms.

هاله بازدارندگی حاصل از آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل بر سالمونلا تیفی، اشرشیا کلی، سودوموناس اثر و زینوزا، لیستریا اینوکوا، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سابتلیس و استافیلوکوکوساپیدرمیدیس به ترتیب 22/30، 12/20، 20/12، 20/30، 20/20، 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 اثر و زینوزا، لیستریا اینوکوا، 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 12 میلی‌متر بود. در شکل 3، نمونه‌ای از تاثیر همزمان موسیلاژ میوه سپستان با آنتی‌بیوتیک جتتامایسین بر باکتری، باسیلوس سابتلیس نشان داده شده است.

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 جتتامایسین بر سالمونلا تیفی، اشرشیا کلی، سودوموناس اثر و زینوزا، لیستریا اینوکوا، 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 جتتامایسین برای سویه‌های باکتریایی سالمونلا تیفی، اشرشیا کلی، سودوموناس اثر و زینوزا، لیستریا اینوکوا، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سابتلیس و استافیلوکوکوساپیدرمیدیس به ترتیب 14/10، 18/30، 14/20، 20، 18/20، 24/30 و 32/10 میلی‌متر بود. نتایج نشان داد قطر

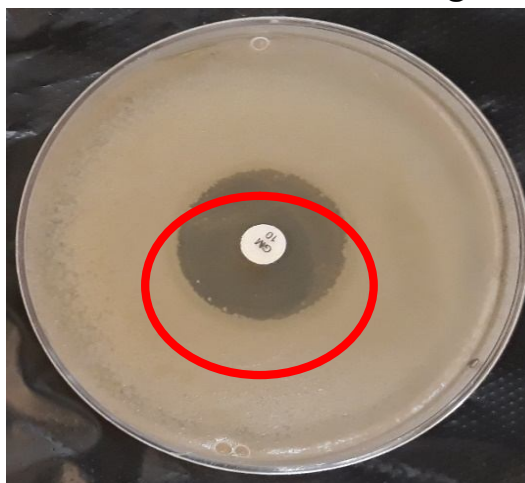


Fig. 3. The interaction of SFM with gentamicin antibiotics on *Bacillus subtilis*.

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 فسفولپیدی خارجی نسبت داد. پیرنیا و همکاران (1394)، اثر ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و اتانولی میوه درخت سپستان بر استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، اشرشیا کلی و سالمونلا تیفی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که عصاره‌های آبی و اتانولی میوه سپستان روی باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس مؤثرتر بود. بالاترین مقادیر حداقل غلظت

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 ضد میکروبی 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 به عمل آورد. در پژوهش حاضر نتایج به دست آمده از آزمون‌های میکروبی نشان داد که باکتری‌های گرم مثبت حساسیت

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, Kroon PA, Linsalata V, Cardinali A. Globe artichoke: a functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*. 2009;1(2):131-144.
- [2] Negi PS. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal 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] Afzal M, Obuekwe C, Shuaib N, Barakat H. Photosynthetic pigment profile of *Cordia myxa* L. and its potential in folklore medicinal application. *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] Ficarra R, Ficarra P, Tommasini S, Calabro ML, Ragusa S, Barbera R, Rapisarda A. Leaf extract of some *Cordia* species; analgesic and anti-inflammatory activities as well as their

مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی برای سالمونلا تیپی 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 ضد میکروبی 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 ضد میکروبی و برهمکنش عصاره‌های آبی و اتانولی برگ درخت سپستان بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در شرایط برون‌تنی مورد مطالعه قرار دادند. نتایج حاصل از مطالعه آن‌ها نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی عصاره آبی برگ سپستان بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه با توجه به نوع میکروارگانیسم از 128 تا 256 میلی گرم بر میلی لیتر متفاوت بود. همچنین نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد حداقل غلظت بازدارندگی عصاره اتانولی از 64 تا 256 میلی گرم بر میلی لیتر بود. در مطالعه آن‌ها بیشترین مقاومت در برابر عصاره‌های آبی و اتانولی سپستان مربوط به باکتری گرم منفی *سودوموناسا ترورینوزا* بود [24]. نارویا و همکاران (2011)، اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی پوست درخت گونه‌ای از درخت سپستان را مورد بررسی و مطالعه قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که پوست این گونه دارای فعالیت ضد قارچی و ضد باکتریایی بود [25]. نتایج این پژوهشگران با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی داشت.

4- نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که موسیلاژ میوه سپستان دارای فعالیت ضد میکروبی 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

- 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 and antibacterial activity of *Ocimumbasilicum* essential oil and the effects of its interaction with 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: *Medical Microbiology*. 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 to susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe and the Western region for the SENTRY pacific antimicrobial surveillance program, 1997-1999. *Clin Infect*. 2001; 32: S114-S132.
- [13] JoukiM. Production 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* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1): 73-81.
- [15] Alizadeh Behbahani B, Tabatabaee Yazdi F, Fakhri S, Mortazavi SA, Mohebbi M. Investigation of chemical compounds and antibacterial activity of tarragon (*Artemisia dracuncululus*) 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 SFM with gentamicin and chloramphenicol antibiotics was assessed. Results shown that by increasing the SFM concentrations, the inhibition zone diameter (IZD) around the discs were noticeably increased. In the disk diffusion agar method, the highest IZD was 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@asnruk.ac.ir