مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۴، تیر ۱۳۹۴، ۲۶۸-۲۵۷

بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره متانولی و آبی میوه گیاه Vaccinium arctostaphylos بر برخی از گونه‌های *سالمونلا* در شرایط آزمایشگاهی

فاطمه معینی[۱]، مریم محمدی‌سیچانی[۲]، کهین شاهانی‌پور[۳]

دریافت مقاله: ۹۳/۶/۲۲ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۳/۱۰/۹ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۴/۲/۲ پذیرش مقاله: ۹۴/۲/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: عفونت‌های ناشی از سالمونلا یا سالمونلوز مانند تیفوئید، باکتریمی، انتروکولیت معضل بزرگ بهداشتی در جهان، به خصوص در کشورهای در حال توسعه از جمله کشور ما محسوب می‌شوند. این مطالعه به منظور بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره متانولی و آبی میوه گیاه واکسینیوم آرکتوستافیلوس بر روی گونه‌هایی از *سالمونلا* انجام شد.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر نوعی مطالعه آزمایشگاهی است. عصاره متانولی و آبی میوه گیاه واکسینیوم آرکتوستافیلوس به دو روش خیساندن و سوکسله تهیه شد. اثر ضد میکروبی عصاره علیه *سالمونلا تیفی* (PTCC: 1609) و ۶ نمونه بالینی *سالمونلا* به روش انتشار در آگار بررسی گردید. با استفاده از روش میکرودایلوشن حداقل غلظت مهار کنندگی [Minimal inhibitory concentration (MIC)] و حداقل غلظت کشندگی [Minimal bactericidal concentration (MBC)] عصاره‌ها تعیین شد.

یافته‌ها: تمام سویه‌های مورد مطالعه نسبت به عصاره متانولی و آبی میوه گیاه واکسینیوم آرکتوستافیلوس حساس بودند. میانگین قطر هاله عدم رشد ناشی از عصاره‌ها بر باکتری‌های مورد آزمون در محدوده ۲۶/۶-۶/۶ میلی‌متر به دست آمد. همچنین، آزمون آماری نشان داد ارتباط معناداری بین افزایش غلظت عصاره‌ها و قطر هاله عدم رشد وجود دارد ($p<0/001$). مقادیر MIC بین ۵۰ تا ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و مقادیر MBC بین ۱۰۰ تا ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: عصاره متانولی و آبی تهیه شده از میوه گیاه واکسینیوم آرکتوستافیلوس بر روی رشد باکتری *سالمونلا* اثر مهار کنندگی دارد.

واژه‌های کلیدی: *سالمونلا*، *واکسینیوم آرکتوستافیلوس*، عصاره آبی، عصاره متانولی، اثر مهارکنندگی

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
۲- (نویسنده مسئول) مربی گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
تلفن: ۰۳۱-۳۷۴۲۰۱۴۰، دورنگار: ۰۳۱-۳۷۴۲۰۱۴۰، پست الکترونیکی: mohamadi_m@iaufala.ac.ir
۳- استادیار گروه بیوشیمی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

مقدمه

آنتی بیوتیک‌ها از اصلی‌ترین داروی تجویزشده در بیماری های عفونی محسوب می‌شوند. آنتی‌بیوتیک‌ها با حذف یا توقف تکثیر میکروب‌ها با عامل بیماریزا مقابله می‌کنند. ایجاد عوارض جانبی جبران‌ناپذیر و بروز و انتشار مقاومت دارویی در بین میکروب‌ها از جمله مشکلات اساسی کاربرد آنتی‌بیوتیک‌ها است. بنابراین استفاده از درمان‌های جدید و یا استفاده از داروهای گیاهی با عوارض کمتر ضروری به نظر می‌رسد [۲-۱]. عصاره‌های گیاهی و ترکیبات فعال موجود در آنها دارای اثرات شناخته شده ضدباکتریایی می‌باشند و کاربرد زیادی در طب سنتی و کنترل رشد باکتری‌های بیماریزا و عامل فساد غذایی دارند [۳]. با توجه به مقاومت دارویی و عوارض جانبی داروهای ضدمیکروبی شیمیایی، در چند دهه اخیر رویکرد تحقیقات علمی به سوی دستیابی به مواد فعال زیستی گیاهی بوده است. گیاهان را می‌توان به عنوان منبعی از مواد شیمیایی بالقوه مفید دانست که تنها بخشی از آنها مورد بهره‌برداری قرار گرفته‌اند [۴].

جنس واکسینیوم، جنسی از خانواده اریکاسه می‌باشد. تعداد ۴۵۰-۱۵۰ گونه برای آن تخمین زده شده است که اکثر آنها در دامنه کوه‌ها و مناطق مرتفع و نقاط شمالی و برخی از گونه‌ها نیز در مناطق گرمسیری می‌رویند. میوه گیاهان این جنس، یک میوه با ارزش و ماده غذایی مفیدی است. گیاهان این جنس از هزاران سال پیش در اروپا و آمریکا استفاده شده‌اند [۵]. گیاهان این جنس به صورت بوته‌ای رشد می‌کنند و ساقه‌های کوتاه دارند. برگ‌های متناوب دارند که در برخی از جنس‌ها برگ‌ها در زمستان می‌ریزد، اما در برخی دیگر برگ‌ها پایدار و همیشه سبز هستند. برگ‌های این گیاهان مضرس و دارای دندانه‌های ظریف می‌باشد. گل‌ها معمولاً محوری یا انتهایی است و ممکن است به صورت منفرد دیده شوند یا این که در پوششی به شکل خوشه و سنبله قرار می‌گیرند. کاسه گل دارای ۵-۴ لوب است که به اشکال لوله‌ای، زنگ مانند و یا بیضی شکل دیده شود. گلبرگ‌ها به صورت پیوسته می‌باشند. میوه به صورت سته‌ای در پوشش قرار گرفته و دارای دانه‌های فراوان است که در بسیاری از گونه‌ها ارزش خوراکی دارند. میوه‌های گیاهان جنس واکسینیوم به رنگ‌های قرمز، آبی، مشکی، ارغوانی و یا سبز متمایل به زرد دیده می‌شوند. در هر ۱۰۰ گرم میوه تازه گیاه، ۷۰۰-۳۰۰ میلی‌گرم آنتوسیانین، ۳ میلی‌گرم ویتامین C و ۲۰ میلی‌گرم کاتچین وجود دارد [۶]. گزارشات بسیاری در مورد اثرات ضدمیکروبی، ضدویروسی، ضدسرطان و ضددیابت و آنتی‌اکسیدانی جنس واکسینیوم منتشر شده‌اند. ترکیبات فنلی، آنتوسیانین، میریستین (Myricetin)، کارواکرول (Carvacrol) و تیمول موجود در عصاره این گیاهان می‌تواند از رشد پاتوژن‌های روده‌ای و عوامل ایجادکننده عفونت ادراری ممانعت کند [۱۰-۷]. همچنین، می‌توانند باعث درمان ناراحتی‌های گوارشی، کاهش فشار خون و کاهش التهاب شوند. اخیراً نیز ثابت گردیده است که گیاهان مربوط به جنس واکسینیوم از رشد و تکثیر تومورها و ایجاد سرطان ممانعت می‌نمایند. فلاونوئید یکی از آنتی‌اکسیدان‌های قوی موجود در این گیاه است که دارای اثر ضدالتهابی، ضدآلرژی، ضد سرطان، و ضدمیکروبی می‌باشد [۱۳-۱۱].

واکسینیوم آرکتوستافیلوس، تنها گونه‌ای از این جنس است که در ایران رشد می‌کند. این گیاه در شمال و شمال شرقی ایران ارتفاعات استان گیلان، ارتفاعات کلاردشت و

خانقاه اردبیل و ارتفاعات آذربایجان غربی می‌روید (شکل۱). میوه‌های این گیاه سته‌ای پر بذر است و بر شاخه‌های جوان و به صورت جانبی یا انتهایی تولید می‌شود و به رنگ‌های قهوه‌ای، قرمز مایل به قهوه‌ای، سیاه و آبی دیده می‌شود [۱۵-۱۴].



شکل ۱- واکسینیوم آرکتوستافیلوس ایرانی در طبیعت

سالمونلاها از مهمترین باکتری‌های مولد بیماری‌های اسهالی، عامل تیفوئید، باکتریمی، انتروکولیت هستند. بیماری‌های ناشی سالمونلاها معضل بزرگ بهداشتی در جهان به خصوص در کشورهای در حال توسعه از جمله کشور ما محسوب می‌شوند. با توجه به مقاومت آنتی‌بیوتیکی گونه‌های مختلف سالمونلا، بررسی اثرات ضدباکتریایی گیاهان خوراکی بومی ایران ضروری است [۱۶].

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر، مطالعه‌ای آزمایشگاهی است. میوه گیاه واکسینیوم آرکتوستافیلوس در تابستان ۱۳۹۲، از رویشگاه‌های اطراف شهر تبریز جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها مورد تأیید هرباریوم گیاه‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان قرار گرفت. سپس میوه‌ها در شرایط مناسب و در سایه خشک گردیده و جهت تهیه عصاره با آسیاب خرد شدند.

عصاره‌گیری از میوه گیاه واکسینیوم آرکتوستافیلوس به دو روش خیساندن و سوکسله با استفاده از متانول ۸۵٪ و آب مقطر استریل صورت پذیرفت. برای تهیه عصاره متانولی و آبی به روش خیساندن صد گرم از پودر میوه واکسینیوم آرکتوستافیلوس به ارلن حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال مورد نظر (آب یا متانول) اضافه گردید و به مدت هفتاد و دو ساعت بر روی شیکر ۹۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس مخلوط حاصله با کاغذ صافی واتمن شماره ۲ صاف شده و عصاره در دمای محیط خشک گردید. به منظور تهیه عصاره متانولی و آبی به روش سوکسله، ۴۰ گرم از پودر میوه واکسینیوم آرکتوستافیلوس در ۲۵۰ میلی‌لیتر حلال مورد نظر، در دمای ۵۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۸ ساعت عصاره‌گیری شد. عصاره‌ها در دمای محیط خشک شده و تا زمان انجام آزمایش، در ظروف تیره در یخچال نگهداری شدند [۱۷].

برای تهیه غلظت‌های مختلف از عصاره‌ها، ۴ گرم از عصاره خشک به ده میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه شد. به این ترتیب غلظت اولیه ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. سپس غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰،

۲۵ و ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هریک از عصاره‌ها به روش سری رقت تهیه گردید.

در این پژوهش از یک نمونه استاندارد سالمونلا تیفی (PTCC: 1609) و ۶ نمونه بالینی سالمونلا استفاده شد. نمونه استاندارد به صورت لیوفیلیزه از مجموعه میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و نمونه‌های بالینی از آزمایشگاه‌ها و بیمارستان‌های شهر اصفهان تهیه شدند. به منظور شناسایی ایزوله‌های بالینی سالمونلا از خصوصیات ماکروسکوپی کلونی بر روی محیط کشت EMB و هکتون انتریک آگار استفاده شد. همچنین، خصوصیات این جنس با آزمایشات بیوشیمیایی اندول، سیترات، حرکت، ژلاتین، اوره، لیزین، کاتالاز، اکسیداز، MR، VP و SH2 تائید گردید. سروتیپ‌های گوناگون سالمونلا به کمک آنتی‌سرم‌های اختصاصی (بهارافشان، ایران) به روش آگلوتیناسیون شناسایی شدند.

به منظور تهیه سوسپانسیون باکتریایی از کشت تازه و جوان باکتری، چند کلنی به محیط کشت مولر هینتون براث منتقل شد. جهت یکسان نمودن کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده مطابق با لوله شماره ۰/۵ استاندارد مک فارلند (کدورت معادل ۱۰۸× ۱/۵ باکتری در هر میلی‌لیتر)، جذب نوری در طول موج ۶۳۰ نانومتر در محدوده ۰/۰۸ تا ۰/۱ تنظیم گردید. برای رسیدن به غلظت ۱۰۷× ۱/۵ باکتری در هر میلی‌لیتر، سوسپانسیون باکتریایی با کدورت ۰/۵ مک فارلند به نسبت ۰/۱ رقیق گردید [۱۹-۱۸].

اثرات ضد میکروبی عصاره‌ها با غلظت‌های ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به روش انتشار در اگار مورد بررسی قرار گرفت. به کمک سواب استریل از کدورت معادل ۱۰۷× ۱/۵ باکتری در هر میلی‌لیتر، روی محیط کشت مولر هینتون آگار به صورت یکنواخت کشت داده شد. سپس در فاصله‌های مناسب، تعدادی چاهک به قطر شش میلی‌متر با عمق ۵ میلی‌متر ایجاد گردید[۲۰]. صد میکرولیتر از هریک از غلظت‌های تهیه شده از عصاره‌ها درون چاهک مربوط به آن ریخته شد. آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین به عنوان شاهد مثبت استفاده گردید. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد نمونه‌های باکتریایی بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. به منظور تأیید نتایج حاصل، آزمایشات برای هر یک از عصاره‌ها و برای هر نمونه باکتریایی، سه بار تکرار گردید [۱۹].

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌ها به روش میکرودایلوشن انجام شد. در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته گرد استریل خانه شماره ۱ تا ۶ مربوط به رقت های ۱۲/۵ تا ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ها در نظر گرفته شد. ردیف ۷، حاوی صد میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث و صد میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی به عنوان کنترل مثبت و ردیف ۸، حاوی دویست میکرولیتر از محیط کشت مولرهینتون براث، کنترل منفی در نظر گرفته شد. در خانه‌های ۱ تا ۶ هر ردیف صد میکرولیتر از غلظت مربوط به هر خانه اضافه شد. در تمام خانه‌ها به استثناء ردیف ۸، صد میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با کدورت معادل ۱۰۷× ۱/۵ باکتری در هر میلی‌لیتر اضافه گردید. بلافاصله بعد از کامل شدن، جذب چاهک‌های میکروپلیت در دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت گردید. سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و مجدداً جذب آن توسط دستگاه الایزا خوانده شد. از مقایسه میزان جذب نوری قبل و بعد

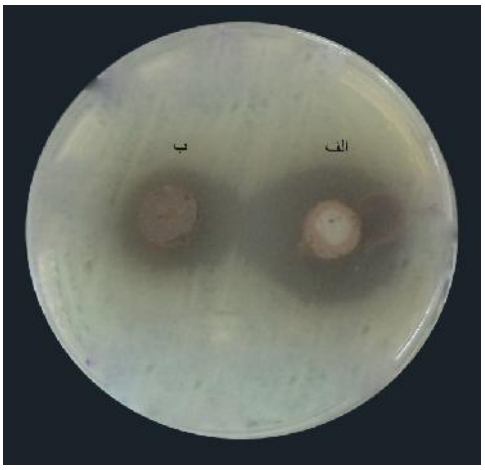
از انکوباسیون در هر چاهک و همچنین، بررسی چشمی کدورت ایجاد شده در آن، کمترین رقت از ماده مورد آزمون که در چاهک مربوط به آن غلظت، کدورتی مشاهده نمی‌شد به عنوان میزان MIC در نظر گرفته شد. به منظور تعیین MBC عصاره‌های مورد آزمایش، ۲۰ میکرولیتر از محتویات چاهک های مربوط به MIC و سه چاهک مربوط به غلظت‌های بیشتر از عصاره مورد آزمایش که کدورت قابل تشخیصی نداشتند، بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار به صورت خطی کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رشد باکتری بر روی پلیت‌ها مورد بررسی قرار گرفت. غلظتی از عصاره مورد آزمایش که بر روی محیط کشت جامد مربوط به آن هیچگونه رشدی از باکتری مشاهده نمی‌شد به عنوان MBC در نظر گرفته شد. به منظور تأیید نتایج حاصل، آزمایشات سه بار تکرار گردید [۱۹].

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ انجام شد. به منظور دستیابی به نتایج آماری دقیق‌تر هر آزمون با سه بار تکرار انجام شد و از آزمون آنالیز واریانس، تی مستقل، دانکن و من‌ویتنی برای مقایسه میانگین‌ها استفاده گردید و اختلاف بین گروه‌ها در سطح معنی‌دار $p<۰/۰۰۱$ تعیین شد.

نتایج

در این مطالعه از یک نمونه استاندارد سالمونلا تیفی (PTCC: 1609) و شش نمونه بالینی سالمونلا استفاده گردید. نمونه‌های بالینی پس از شناسایی به وسیله آزمون‌های سرولوژی تعیین سروتیپ شدند. با آگلوتیناسیون با آنتی‌سرم‌های اختصاصی ۳ سروتیپ سالمونلا تیفی، ۲ سروتیپ سالمونلا کلراسوئیس و یک سروتیپ سالمونلا پاراتیفی B شناسایی شد.

در شکل۲ تأثیر عصاره‌های متانولی و آبی واکسینیوم آرکتواستافیلوس بر سویه‌ای از سالمونلا کلراسوئیس نشان داده شده است، همانگونه که مشاهده می‌شود قطر هاله عدم رشد ایجاد شده عصاره متانولی بیشتر از هاله ایجاد شده توسط عصاره آبی است.



شکل ۲- تأثیر غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی (الف) و عصاره آبی (ب) تهیه شده به روش خیساندن بر سالمونلا کلراسوئیس

در جدول ۱ میانگین قطرهاله عدم رشد سویه‌های مختلف سالمونلا در مجاورت با غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی و آبی (تهیه شده به دو روش خیساندن، سوکسله) نشان داده شده است. آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین هاله عدم رشدی حدود ۳۶ میلی‌متر نشان داد.

جدول ۱- میانگین قطرهاله عدم رشد عصاره‌های مختلف واکسینیوم آرکتوستافیلوس بر روی گونه‌های سالمونلا(میلی‌متر)

غلظت (mg/mL)	عصاره			
	متانولی		آبی	
	خیساندن	سوکسله	خیساندن	سوکسله
	انحراف معیار±میانگین	انحراف معیار±میانگین	انحراف معیار±میانگین	انحراف معیار±میانگین
۴۰۰	۲۰/۶۲±۲/۱۷	۱۴/۱۹±۳/۰۴	۱۷/۷۲±۴/۳۴	۱۴/۵۲±۲/۷۲
۲۰۰	۱۵/۵۲±۱/۶۲	۸/۷۶±۲/۴۷	۱۲/۱۹±۳/۳۳	۷/۸۱±۲/۷۴
۱۰۰	۱۲/۱۰±۲/۰۶	۶/۷۱±۱/۶۱	۸/۴۳±۳/۱۰	۶/۵۲±۱/۳۹
۵۰	۷/۸۱±۱/۷۴	۶/۰۰±۰/۰۰	۶/۴۸±۱/۲۶	۶/۰۰±۰/۰۰
۲۵	۶/۱۹±۰/۵۰	۶/۰۰±۰/۰۰	۶/۰۰±۰/۰۰	۶/۰۰±۰/۰۰
۱۲/۵	۶/۰۰±۰/۰۰	۶/۰۰±۰/۰۰	۶/۰۰±۰/۰۰	۶/۰۰±۰/۰۰

به منظور مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های مختلف عصاره متانولی به روش خیساندن و سوکسله بر علیه گونه‌های مختلف سالمونلا از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه استفاده شد. در باکتری سالمونلا فرض برابری میانگین قطر هاله عدم رشد در شش غلظت رد شد ($p<۰/۰۰۱$). نتایج آزمون تعقیبی دانکن در مقایسه دو به دو میان غلظت‌ها نشان داد میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های ۱۲/۵ و ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با یکدیگر اختلاف معناداری نداشت ($p>۰/۰۵$) همچنین، بین میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اختلاف معناداری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$)، ولی میانگین قطر هاله در غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بطور معناداری کمتر از غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود ($p<۰/۰۵$). همچنین، از غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به بعد قطر هاله عدم رشد با افزایش غلظت به طور معناداری افزایش می‌یافت ($p<۰/۰۵$). ضمن اینکه میانگین قطر هاله عدم رشد در هر شش غلظت به طور معناداری نسبت به آنتی‌بیوتیک کمتر بود ($p<۰/۰۵$) (جدول ۱). برای مقایسه مقادیر قطر هاله در غلظت‌های مختلف بین نمونه استاندارد و بالینی از آزمون ناپارامتری من‌ویتنی استفاده شد و در باکتری سالمونلا در هیچ یک از غلظت‌ها اختلاف معناداری بین نمونه استاندارد و نمونه‌های بالینی مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$).

همچنین، مقایسه میانگین قطر هاله در غلظت‌های مختلف عصاره آبی به روش خیساندن و سوکسله برعلیه گونه‌های مختلف سالمونلا از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه استفاده شد. در باکتری سالمونلا فرض برابری میانگین قطر هاله عدم رشد در شش غلظت رد شد ($p<۰/۰۰۱$، $f\ (۵/۳۶)=۲۲/۳۷۹$). نتایج ازمون تعقیبی دانکن در مقایسه

دو به دو میان غلظت‌ها نشان داد بین میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اختلاف معناداری وجود ندارد (p>۰/۰۵). لیکن ازمون تعقیبی دانکن در مقایسه دو به دو میان غلظت‌ها نشان داد که قطر هاله عدم رشد در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره آبی که به روش سوکسله تهیه شد به طور معناداری نسبت به سایر غلظت‌ها بیشتر بود (p<۰/۰۵)، ولی بین میانگین قطر هاله عدم رشد در سایر غلظت‌ها اختلاف معناداری دیده نشد (p>۰/۰۵) (جدول ۱). مقایسه مقادیر قطر هاله در غلظت‌های مختلف بین نمونه استاندارد و بالینی با آزمون ناپارامتری من‌ویتنی نشان داد در هیچیک از غلظت‌ها اختلاف معناداری بین نمونه استاندارد و نمونه‌های بالینی وجود ندارد (p>۰/۰۵).

در جدول ۲ مقادیر MIC و MBC عصاره‌های واکسینیوم آرکتوستافیلوس به نمایش گذاشته شده است، همانگونه که مشاهده می‌شود هیچیک از غلظت‌های عصاره آبی فعالیت کشندگی نشان نداده‌اند. همچنین، مقادیر MIC و MBC در سویه استاندارد از سویه‌های بالینی کمتر است.

جدول ۲- مقادیر MIC ***و*** MBC (mg/mL) ***عصاره‌های واکسینیوم آرکتوستافیلوس***

سویه‌های سالمونلا	عصاره آبی		عصاره متانولی	
	MIC	**MBC**	**MIC**	**MBC**
***Salmonella typhi* (PTCC: 1609)**	۲۰۰	-	۵۰	۱۰۰
***S.typhi* 1**	۲۰۰	-	۲۰۰	۴۰۰
***S.typhi* 2**	۲۰۰	-	۵۰	۱۰۰
***S.typhi* 3**	۱۰۰	-	۱۰۰	-
***S. choleraesuis* 1**	۲۰۰	-	۲۰۰	۴۰۰
***S. choleraesuis* 2**	۱۰۰	-	۱۰۰	-
S.paratyphi B	۲۰۰	-	۱۰۰	۲۰۰

بحث

در دهه‌های اخیر، مقاومت میکروبی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها تلاش‌های جدی را برای کشف داروهای جدیدتر موجب شده است، به همین دلیل علاقه زیادی به استفاده از گیاهان دارویی نشان داده می‌شود و تحقیقات بسیاری در این زمینه صورت پذیرفته است. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد عصاره‌های واکسینیوم آرکتوستافیلوس با حداقل غلظت مهارکننده در محدوده ۲۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تأثیر بازدارندگی مناسبی بر روی گونه‌های سالمونلا دارد.همچنین، نتایج نشان دادند ترکیبات فعال موجود در عصاره آبی از رشد گونه‌های سالمونلا جلوگیری می‌کند لیکن توانایی حذف

آنها را ندارند. Taherpour نیز طی گزارشی بیان نمود گیاه واکسینیوم آرکتوستافیلوس یک گیاه دارویی مفید می‌باشد و در علم پزشکی نیز اهمیت فراوانی برای درمان بیماری‌هایی مانند بیماری‌های قلبی، بیماری‌های دهان، عفونت ادراری، سنگ کلیه، سرطان، بیماری‌های گوارشی برخوردار می‌باشد[۲۱]. تجزیه و تحلیل نتایج به دست آمده از اثر ممانعت از رشد عصاره متانولی و آبی واکسینیوم آرکتوستافیلوس بر روی گونه‌های سالمونلا به روش انتشار چاهک مشخص نمود عصاره‌های تهیه شده به روش خیساندن اثر مهارکنندگی بیشتری نسبت به عصاره‌های تهیه شده به روش سوکسله همان نوع عصاره دارند. این احتمال وجود دارد که واکسینیوم آرکتوستافیلوس حاوی ترکیبات فعال ضدباکتریایی حساس به حرارتی باشد که هنگام عصاره‌گیری به روش سوکسله از دست می‌روند. همچنین، اثر مهاری عصاره‌های متانولی واکسینیوم آرکتوستافیلوس بیشتر از عصاره‌های آبی تهیه شده با روش عصاره‌گیری یکسان بود. نتایج به دست آمده از تعیین مقدار MIC نیز نتایج انتشار در آگار را تأیید نمود. گونه‌های مختلف جنس کاربرد زیادی در طب سنتی و علم پزشکی دارند و تحقیقات متعددی در مورد آنها انجام شده است. Puupponen و همکارانش اعلام نمودند که V.myrtillus، V.vitisidaea و V.oxycoccos دارای ترکیبات فلاونوئیدی و اسیدهای فنلی می‌باشند. وجود این ترکیبات اثر ضدباکتریایی این گونه‌های گیاهی را بر روی باکتری‌های بیماریزای گوارشی مانند سالمونلا انتریکا و سالمونلا تیفی موریوم تأیید می‌کند[۱۰]. آنها در مطالعه دیگری نشان دادند که عصاره V.myrtillus، V.vitisidaea و V.macrocarpon در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثر ممانعت کنندگی قوی بر روی رشد باکتری‌های گرم منفی مانند سالمونلا دارد [۹]. همچنین، Cesoniene و همکاران ویژگی های ضد میکروبی V.oxycoccos به روش انتشار چاهک بر علیه باکتری‌های گرم منفی مانند سالمونلا تیفی موریوم را گزارش نمودند. آنها قطر هاله عدم رشد حاصل از غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره اتانولی را بین ۱۳ تا ۲۰ میلی‌متر گزارش کردند[۲۲]. Kylli و همکارانش اثر ضد باکتریایی V.vitisidaeaو V.macrocarpon را اثبات کرده و به تشخیص و شناسایی پروآنتوسیانیدین موجود در این گیاهان پرداختند. آنها گزارش دادند پروآنتوسیانیدین موجود در این گیاهان یک ممانعت‌کننده قوی بر علیه باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم می‌باشد [۲۳]. Lacombe و همکاران ثابت کردند که گیاه V.angustifolium (بلوبری) دارای ترکیباتی مانند فنل‌های مونومریک، پروآنتوسیانیدین و آنتوسیانیدین می‌باشد که به خاطر داشتن این ترکیبات در غلظت های ۲ تا ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی دارای اثر ضد میکروبی بر علیه برخی از باکتری‌های بیماریزا از جمله سالمونلا تیفی‌موریوم است. [۲۴]. Pervin و همکارانش نیز با بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره برگ‌های گیاه V.corymbosom بر روی سویه استاندارد سالمونلا تیفی موریوم، قطر هاله عدم رشد را ۲۳ میلی‌متر برای غلظت ۱۰ میلی‌گرم در هر دیسک گزارش کردند [۸]. همچنین، Shen و همکاران ثابت کردند عصاره بلوبری (V.corymbosom) دارای فعالیت ضد باکتریایی بر روی رشد سالمونلا انتریتیدیس می‌باشد و علت آن داشتن ترکیبات فنلی مانند کلروژنیک اسید، الاژیک اسید، کوئرستین و کوئرستین-۳ گالاکتوزید می‌باشد. آنها مقدار MIC را برای سویه‌های سالمونلا انتریتیدیس بین ۴۵۰ تا

۱۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش نمودند که بیشتر از مقادیر MIC مطالعه حاضر می‌باشد [۲۵]. با توجه به مقادیر بالای MIC بدست آمده در تحقیق حاضر و سایر موارد گزارش شده لازم به ذکر است که واکسینیوم گیاهی گروه Berry هاست که به شکل میوه و چاشنی در سبد غذایی انسان جا دارد. مصرف خوراکی واکسینیوم دوز بالایی از مواد مؤثره را در روده‌ها در معرض سالمونلا قرار خواهد داد و با ممانعت از رشد و تکثیر این باکتری، از شروع عفونت‌های مختلف آن در روده جلوگیری خواهد نمود. پس بررسی و تأیید خواص ضد سالمونلایی آنها حتی در دوزهای بالا مفید خواهد بود. احتمالاً برخی از تفاوت‌ها در نتایج این پژوهش در مقایسه با دیگر تحقیقات ممکن است به علت تفاوت در نوع گونه گیاهی، روش عصاره‌گیری یا نوع حلال مورد استفاده باشد. لیکن نتایج به دست آمده از این پژوهش، با تحقیقات سایر محققان همسو بوده و فعالیت ضدمیکروبی واکسینیوم آرکتوستافیلوس را تأیید می‌کند.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه مشخص گردید عصاره‌های استخراج شده از واکسینیوم آرکتوستافیلوس در ممانعت از رشد گونه‌های سالمونلا مؤثر می‌باشند، لیکن در غلظت‌های مورد آزمایش توانایی حذف این گونه‌ها را نداشته‌اند. اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها با کاهش غلظت عصاره کاهش می‌یافت. به طور کلی عصاره‌های تهیه شده به روش خیساندن با دو حلال آب و متانول نتایج بهتری نسبت به روش عصاره‌گیری سوکسله همان حلال‌ها نشان داد.

References

[1] Jalali M, Jafari H, Oulia P, Falah N, Davati A. In vivo antibacterial effects of garlic aqueous extract on Salmonella typhimurium infected rabbits. *Iran J Med Arom Plants* 2008; 23(4): 453-7.

[2] Lin J, Opoku A, Geheeb-Keller M, Hutchings A, Terblanche S, Jager A, et al. Preliminary screening of some traditional zulu medicinal plants for. *J Ethnopharmacol* 1999; 15(68): 267-74.

[3] Aliporyegane M, Tajik H, Zadehashem E, Farkhondeh T, Sadighara P, Sabah S. Inhibitory Effect of Garlic Extract on the Growth of Salmonella Typhimurium and Shigella Dysenteric. *Knowl Health J* 2008; 4(2): 6-9. [Farsi]

[4] Weinstein R. Controlling antimicrobial resistance inhospitals: Infection control and use of antibiotics. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(2): 188− 92.

[5] Luby J, Ballington J, Draper A ,Pliszka K, Austin M. Blueberries and Cranberries (Vaccinium). *Jo Genet Res Temp Fruit Nut Crops* 1991; 2(20): 617-23.

[6] Sedaghathoor S. Seed Dormancy and Germination of Vaccinium arctostaphylos L. *Int J Bot* 2007; 3(3): 307-11.

[7] Guha S, Cao M, Kane R, Savino A, Zou S, Dong Y. The longevity effect of cranberry extract in Caenorhabditis elegans is modulated by daf-16 and osr-1. *AGE* 2013; 35(5): 1559-74.

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

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

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

[11] Hasanloo T, Sepehrifar R, Hajimehdipoor H. Levels of phenolic compounds and their effects on antioxidant capacity of wild Vaccinium arctostaphylos L. (Qare-Qat) collected from different regions of Iran. *Turk J Biol* 2011; 35: 371.

[12] Khalili A, Khosravi MB, Nekooeian AA. The Effects of Aqueous Extract of Vaccinium Arctostaphylos Leaves on Blood Pressure in Renal Hypertensive Rats. *Iran Red Cres Med J* 2011; 13(2): 123-7.

[13] Saral O, Ölmez Z, Sahin H. Comparison of Antioxidant Properties of Wild Blueberries (Vaccinium arctostaphylos L. and Vaccinium myrtillus L.) with Cultivated Blueberry Varieties (Vaccinium corymbosum L.) in Artvin Region of Turkey Artvin. *Turk J Agr-Food Sci Tech* 2015; 3(3): 40-4.

[14] Hasanloo T, Sepehrifar R, Sedaghathoor SH. Antioxidant activity and anthocyanin content in Vaccinium arctostaphylos L. from Iran. *Planta Med* 2008; 74(09): PA297.

[15] Mahboubia M, Kazempoura N, Taghizadeh M. In vitro Antimicrobial and Antioxidant Activity of Vaccinium arctostaphylos L. Extracts. *J Bio Act Prod Nat* 2013; 3(4): 241-7.

[16] Nordmann P, Poirel L, Mak JK, White PA, McIver CJ, Taylor P. Multidrug-Resistant Salmonella Strains Expressing Emerging Antibiotic Resistance Determinants. *Clin Infect Dis* 2008; 46(2): 324-5.

[17] Gupta A, Naraniwal M, Kothari V. modern extraction methods for preparation of bioactive plants extracts. *Int J Appl Nat Sci* 2012; 1: 8-26.

[18] Kumar S, Joseph L, George M. Phytochemical analysis of leaf extracts of Rumex nepalensis. *Int J Pharm Med Innov* 2011; 1(1): 16-21.

[19] Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protocols* 2008; 3(2): 163-75.

[20] Bonev B, Hooper J, Parisot J. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar

diffusion method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008; 61(6): 1295-301.

[21] Taherpour A. Effect Investigation of Aqueous Cranberry (Vaccinium arctostaphylos L.) Extract in Accompanied with Antibiotics on Urinary Tract Infections (UTI) Created by Escherichia coli in Vitro. *J Clin Manag Compl UTI* 2011; 65: 265-80.

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

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

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

[25] Shen X, Sun X, Xie Q, Liu H, Zhao Y, Pan Y, et al. Antimicrobial effect of blueberry (Vaccinium corymbosum L.) extracts against the growth of Listeria monocytogenes and Salmonella Enteritidis. *Food Control* 2014; 35(1): 159-65.

Evaluation of the Antibacterial Effect of Methanol and Aqueous Extracts of *Vaccinium Arctostaphylos* Fruit against *Salmonella spp in vitro*

F. Moeini[1], M. Mohammadi-Sichani[2], K. Shahanipoor[3]

Received: 13/09/2014 Sent for Revision: 30/12/2014 Received Revised Manuscript: 22/04/2015 Accepted: 03/05/2015

Background and Objective: *Salmonella* infections, or salmonellosis such as typhoid, bacteremia, enterocolitis are the major health problem worldwide, especially in developing countries including Iran. This study aimed to evaluate the antibacterial effect of methanol and aqueous extracts of *Vaccinium arctostaphylos* fruit against *Salmonella* spp.

Materials and Methods: The present study is an experimental one Methanol and aqueous extracts of *Vaccinium arctostaphylos* fruit were prepared by maceration and Soxhlet method. Antimicrobial effects of the extracts were evaluated by agar diffusion method against *Salmonella typhi* (PTCC: 1609) and six clinical strains of *Salmonella*. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) were determined by micro-dilution method.

Results: All of the studied strains were sensitive to the aqueous and methanol extracts of *Vaccinium arctostaphylos* fruit. The mean zones of inhibition were obtained in ranging from 6.6 to 26.6 mm. Statistical analysis showed a significant difference between the mean diameters of inhibition zone and increased extracts concentrations ($p<0.001$). The MIC values were ranged from 50-200 mg/ml, whereas the MBC values from 100-400 mg/ml.

Conclusion: Methanol and aqueous extracts of *Vaccinium arctostaphylos* fruit had inhibitory activity against *Salmonella spp*.

Key words: *Salmonella*, *Vaccinium arctostaphylos*, Methanol extract, Aqueous extract, Inhibitory effect

Funding: This research was funded by Falavarjan Branch, Islamic Azad University.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: This article does not need permission from the Ethics Committee because the information in this article was derived from a non-animal research.

How to cite this article: Moeini F, Mahammadi-Sichani M, Shahanipoor K. Evaluation of the Antibacterial Effect of Methanol and Aqueous Extracts of *Vaccinium Arctostaphylos* Fruit against *Salmonella spp in vitro*. *J RafsanjanUniv Med Sci* 2015; 14(4): 257-68. [Farsi]

1- MSc in Microbiology, Dept. of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
2- Instructor, Dept. of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
(Corresponding Author) Tel: (031) 37420140, Fax: (031) 37420140, E-mail: mohamadi_m@iaufala.ac.ir
3- Assistant Prof., Dept. of Biochemistry, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran