نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد هشتم، شماره دوم، ۹۵
۹۱-۱۰۶
http://ejfpp.gau.ac.ir

خواص ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و الکلی اسفناج (واریته مشهد) روی شاخص‌های باکتریایی

علی عیسی‌زاده*[1]، مسعود یاورمنش[2] و علی محمدی ثانی[3]

[1]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قوچان، گروه علوم و صنایع غذایی، قوچان، ایران
[2]استادیار، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
[3]دانشیار، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۷/۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۷/۲۰

چکیده

سابقه و هدف: ترکیبات مشتق شده از گیاهان، طی قرن‌ها به‌دلیل داشتن فعالیت ضدمیکروبی، استفاده‌های دارویی داشته‌اند. یکی از راه‌های کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا در مواد غذایی استفاده از نگهدارنده‌ها و ترکیبات ضدمیکروبی است. گسترش داروهای ضدمیکروبی یکی از مهم‌ترین پیشرفت‌ها در امر درمان می‌باشد. عصاره‌های گیاهی به دلیل داشتن منشاء طبیعی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها با ارگانیسم‌های بدن سازگاری بیشتر و عوارض ناشی از آن‌ها نادر است. یکی از منابع گیاهی جدید مورد بررسی گیاه اسفناج است که می‌تواند به‌عنوان عوامل آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی برای مبارزه با رادیکال‌های آزاد و آلودگی‌های میکروبی استفاده شود. هدف از انجام این پژوهش ارزیابی اثر ضدباکتریایی عصاره آبی و الکلی اسفناج (واریته مشهد) بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس*، *اشرشیا کلی* و *لیستریا اینوکوآ* بود.

مواد و روش‌ها: حساسیت باکتری‌های مورد آزمون به روش انتشار دیسک و حداقل غلظت بازدارندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی به روش براث میکرودایلوشن مورد ارزیابی قرار گرفت. از آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، جنتامایسین و کلرامفنیکل به‌عنوان کنترل مثبت به ترتیب روی *لیستریا اینوکوآ*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی* استفاده شد.

یافته‌ها: در روش آزمون انتشاردیسک، باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا اینوکوآ* مقاوم‌ترین و *اشرشیا کلی* حساس‌ترین باکتری بودند. همچنین بر اساس رقت‌های تهیه شده، حداقل غلظت

*مسئول مکاتبه : eng.a.issazadeh@gmail.com

بازدارندگی رشد عصاره آبی اسفناج (واریته مشهد) بر *لیستریا اینوکوآ*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* به‌ترتیب *برابر با* ۴۶۰۰۰ قسمت در میلیون، ۴۸۰۰۰ قسمت در میلیون و ۲۸۰۰۰ قسمت در میلیون تعیین شد. بر همین اساس حداقل غلظت بازدارندگی رشد عصاره الکلی اسفناج (واریته مشهد) برای *لیستریا اینوکوآ*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* به‌طور یکسان ۱۰۳۹۳ قسمت در میلیون تعیین شد.

نتیجه‌گیری: عصاره الکلی اسفناج (واریته مشهد) خاصیت ضدباکتریایی قوی‌تری نسبت به عصاره آبی آن بر باکتری گرم منفی *اشرشیا کلی* از خود نشان داد. هم‌چنین اثر عصاره الکلی آن روی *اشرشیا کلی* توانست با آنتی‌بیوتیک اریترومایسین در آزمون انتشاردیسک روی *لیستریا اینوکوا* برابری کند. وجود درصد بالای ترکیبات فلاونوئیدی و ترپن‌ها، اسیدهای چرب غیر اشباع و مواد معدنی احتمالاً یکی از مهمترین عوامل بازدارندگی اسفناج واریته مشهد روی باکتری گرم منفی *اشرشیا کلی* می‌باشد. در نتیجه این عصاره می‌تواند به‌عنوان یک نگهدارنده و آنتی‌بیوتیک طبیعی در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: فعالیت ضدباکتریایی، عصاره اسفناج، اریترومایسین، کلرامفنیکل

مقدمه

دستگاه گوارش یکی از قسمت‌های آسیب‌پذیر بدن نسبت به عوامل بیماری‌زا است از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زای شاخص در مواد غذایی می‌توان به *اشرشیا کلی*[1]، *استافیلوکوکوس اورئوس*[2] وگونه‌های *لیستریا*[3] اشاره کرد. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها جهت درمان و پیشگیری از بیماری‌های باکتریایی علاوه بر ایجاد مقاومت دارویی می‌تواند سبب تغییر فلور میکروبی طبیعی مفید دستگاه گوارش و نیز مستعد کردن بدن برای ابتلاء به انواع بیماری‌های روده‌ای گردد (۱۶). گسترش داروهای ضدمیکروبی یکی از مهم‌ترین پیشرفت‌ها در امر درمان می‌باشد. عصاره‌های گیاهی به‌دلیل داشتن منشاء طبیعی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها سازگاری بیشتر و عوارض کمتری در بدن دارد (۲). یافتن مواد مؤثر جدید ضدباکتریایی در بین عصاره‌های گیاهی با هدف شناخت ساختار شیمیایی و غلبه بر معایب کاربرد از آنتی‌بیوتیک‌ها در حال گسترش است (۵). گیاه اسفناج یکی از منابع گیاهی جدید مورد بررسی است. عصاره برگ اسفناج می‌تواند به‌عنوان عامل آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی برای مبارزه با رادیکال‌های آزاد و آلودگی‌های میکروبی مورد استفاده قرار گیرد (۷).

بر اساس گزارش هوسان نسیم و همکاران (۲۰۱۲)، عصاره آبی اسفناج تازه تاثیر بازدارندگی کمی بر رشد *پروتئوس ولگاریس*[4]، *میکروکوکوس لوتئوس*[5] و *کلبسیلا پنومونیه*[6] داشت و عصاره آبی اسفناج کهنه هیچ تاثیری بر رشد *سالمونلا تایفی موریوم*[7]، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *میکروکوکوس لوتئوس* نداشت. همچنین عصاره آبی برگ اسفناج تازه و کهنه اثر بازدارندگی زیادی بر *اشرشیا کلی* داشت. هم‌چنین این محققان نشان دادند که عصاره اتانولی برگ اسفناج تازه به روش انتشار دیسک به‌طور قابل توجهی از رشد *سالمونلا تایفی موریوم* جلوگیری می‌کند قدرت بازدارندگی عصاره اتانولی اسفناج تازه بر سایر پاتوژن‌های پستانداران بسیار شاخص است (۱۲). احمد و همکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند که که عصاره انهگزان برگ اسفناج تازه و کهنه بر رشد *سالمونلا تایفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر بازدارندگی داشت ضمن آنکه عصاره حاصل از این روش تفاوت قابل

1. *Escherichia coli*
2. *Staphylococcus aureus*
3. *Listeria*
4. *Proteus vulgaris*
5. *Micrococcus loteus*
6. *Klebsiella pneumoniae*
7. *Salmonella typhimurium*

ملاحظه‌ای در مقایسه با عصاره اتانولی و آبی از خود نشان نداد در حالی‌که عصاره انهگزان اولتراسوند شده بازدارندگی قابل توجهی بر رشد *سالمونلا تایفی موریوم* در مقایسه با سایر باکتری‌های مورد بررسی از خود نشان داد (۱). بر این اساس می‌توان دریافت که ترکیبات موثره عصاره قابل استخراج به نوع حلال مصرفی و نحوه استخراج عصاره بستگی دارد (۱۲).

شرایط اقلیمی و آب و هوایی بر چگونگی رشد گیاه اسفناج و به دنبال آن میزان ترکیبات مختلف گیاه می‌تواند تاثیرگذار باشد. با توجه به تاثیر موارد اشاره شده در فوق بر اثرات بازدارندگی و فقدان اطلاعات در خصوص اثرات ضدباکتریایی برگ اسفناج (واریته مشهد) بر باکتری‌های و تاثیر روش استخراج بر فعالیت ضدمیکروبی هدف از انجام این پژوهش بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و الکلی برگ اسفناج (واریته مشهد) روی پاتوژن‌های شاخص غذایی و مقایسه عصاره‌های مورد آزمون با آنتی‌بیوتیک‌های مختلف (اریترومایسین، جنتامایسین، کلرامفنیکل) بود.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل اتانول (مرک آلمان)، آب مقطر استریل، محیط کشت‌های مولرهینتون آگار[1]، بی اچ آی براث[2] و آگار[3] (مرک آلمان)، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک جنتامایسین[4]، اریترومایسین[5]، کلرامفنیکل[6] (رشد ایران-تهران)، معرف تترازولیوم کلراید[7] (سیگما-ایران) و گیاه اسفناج که از استان خراسان رضوی شهر مشهد با کد هرباریوم ۱۰۷۶ در فصل بهار جمع‌آوری شد و نام علمی آن توسط پژوهشکده گیاه‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد مورد تایید قرار گرفت. باکتری‌های *لیستریا اینوکوآ*[8] (ATCC 33090)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923) و *اشرشیا کلی* (ATCC25922) به‌صورت لیوفیلیزه از بخش باکتری‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید. این پژوهش به روش زیر اجرا گردید:

1. Muller hinton agar
2. BHI broth
3. BHI agar
4. Gentamicin
5. Erythromycin
6. Chloramphenicol
7. Tetrazolium chloride
8. *Listeria innocua*

مراحل عصاره‌گیری الکلی و آبی گیاه اسفناج: گیاه اسفناج با آب معمولی شسته شده سپس در محیط تاریک و بدون رطوبت به‌صورت وارون خشک و به پودر تبدیل شد.

۴۰۰ گرم پودر خشک شده گیاه توزین و برای تهیه عصاره الکلی نسبت ۱به ۵ با حلال الکلی (اتانول) و برای عصاره آبی آب مقطر استریل مورد استفاده قرار گرفت. در ادامه با استفاده از سانتریفیوژ (ساخت شرکت هرائوس مدل ۲۰۰ لابوفیوج)[1] با سرعت ۴۰۰ دور در دقیقه تفاله گیاهی از عصاره جدا و از فاز بالای محلول با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شد (۳). در ادامه فرایند هر یک از مخلوط‌های آماده شده (عصاره الکلی و عصاره آبی) در حمام آب در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌طور غیرمستقیم به‌مدت ۴ ساعت حرارت داده شدند. برای اطمینان از تبخیر کامل فاز الکلی، عصاره حاصل در دمای اتاق قرار داده شد.

تهیه و فعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها: ابتدا هر یک از باکتری‌های لیوفیلیزه مورد آزمون در دو مرتبه متوالی در لوله آزمایش حاوی ۱۰میلی‌لیتر محیط کشت بی اچ آی براث (مرک آلمان) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۸-۱۶ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند تا به حالت رویشی و فعال تبدیل شوند، سپس کشت دوم به میزان پنج به یک با گلیسرول استریل مخلوط و در قسمت‌های مساوی در لوله‌های میکروسانتریفیوژ اپندرف استریل در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت تهیه دوز تلقیح، باکتری از لوله میکروسانتریفیوژ به لوله آزمایش حاوی محیط بی اچ آی براث انتقال داده شد و دو بار متوالی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت کشت داده شد. طی این مدت، باکتری‌ها به تعداد معینی ازدیاد یافتند. سپس مقادیر مختلفی از کشت مذکور پس از مقایسه با نیم مک‌فارلند با استفاده از دستگاه طیف سنج مدل ۲۱۰۰ (ساخت شرکت تریس آمریکا) تعیین گردید. همزمان محتویات هر یک از لوله‌های کووت به روش کشت سطحی شمارش شد. بدین منظور از هر لوله کووت رقت‌های موازی ۱۰ تایی در محیط آب پپتونه تهیه و دو بار کشت سطحی در محیط کشت بی اچ آی آگار انجام گرفت. کشت مذکور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس شمارش شد. بدین ترتیب جذب نوری لوله کووت حاوی $1/5 \times 10^{8}$ cfu/ml باکتری مشخص گردید (۶).

1. Heraus Modei 200 Layofuge

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی: ابتدا جهت تهیه غلظت مادر برای عصاره‌های آبی و الکلی، میزان جرم ماده خشک آن محاسبه گردید. بر این اساس بالاترین غلظت برای عصاره آبی و الکلی اسفناج (واریته مشهد) به‌ترتیب ۵۴۶۸۰ و ۴۱۵۸۰ قسمت در میلیون اندازه‌گیری شد. سپس درون همه چاهک‌ها ۹۵ میکرولیتر محیط کشت مولرهینتون براث ریخته و ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌های آبی و الکلی (غلظت مادر) که بالاترین غلظت عصاره مورد آزمون بود به چاهک اول اضافه گشت. به این ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته و به چاهک دوم منتقل شد. این کار برای همه چاهک‌ها به غیر از چاهک شماره (۱۱) (کنترل مثبت) انجام گرفت. در مرحله بعد به تمام چاهک‌ها به غیر از چاهک شماره ۱۲ (کنترل منفی) ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با غلظت ($1/5 \times 10^{8}$ cfu/ml) اضافه شد. تمام مراحل فوق به‌جز افزودن سوسپانسیون باکتریایی برای دستیابی به مقادیر شاهد مجددا انجام شد. پس از آن میکروپلیت در گرم‌خانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شبانه روز قرار گرفت و سپس کدورت آن توسط دستگاه الایزاریدر (ای ال ایکس ۸۰۸) در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. (نقطه تلاقی جذب عصاره حاوی سوسپانسیون میکروبی با جذب شاهد بعنوان شروع محدوده حداقل غلظت بازدارندگی در نظر گرفته شد). به‌طور مشابه‌ای یک نمونه میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای دیگر آماده و بعد از تلقیح سوسپانسیون میکروبی درون گرم‌خانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر معرف تترازولیوم کلراید (TTC) با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه گردید و مجددا به‌مدت ۳ ساعت درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. یک غلظت بالاتر از آخرین غلظتی که رنگ قرمز تترازولیوم را به خود گرفته بود به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی، عصاره برای باکتری مورد بررسی، در نظر گرفته شد (۱۰).

تعیین حداقل غلظت کشندگی: مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر یک از میکروپلیت‌هایی که کدورت آنها از کدورت ستون آخر کمتر بود و یا به عبارتی باکتری در آن رشد نکرده بود را روی محیط کشت مولر هینتون آگار تلقیح و کشت داده و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه، پلیت‌ها از نظر رشد باکتری بررسی گردید و غلظت عصاره که حداقل ۹۹/۹ درصد از سلول‌های میکروبی را کاهش می‌دهد، به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد (۱۴).

تعیین اثر ضدباکتریایی عصاره‌های مورد آزمون به روش انتشاردیسک: ابتدا سوسپانسیون باکتریایی با کدورت معادل نیم مک فارلند تهیه سپس با استفاده از سوآپ استریل روی سطح پلیت‌های حاوی محیط کشت مولرهینتون آگار عمل کشت انجام شد. دیسک‌های کاغذی با قطر ۶ میلی‌متر ساخت شرکت سیگما حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌های مورد مطالعه روی پلیت‌ها منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردید. پس از گرم‌خانه‌گذاری، قطر هاله مهار رشد مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (۱۳).

B A

شکل۱- قطر هاله مهار رشد عصاره آبی (الف) و (ب) عصاره الکلی اسفناج روی *اشرشیاکلی*.

Figure 1. The growth inhibition zone diameter of Aqueous (A) and Alcoholic (B) Extracts of *Spinach* Leaves on *Escherichia coli.*

تعیین قطر هاله آنتی‌بیوتیک (کنترل مثبت): دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (جنتامایسین- اریترومایسین- کلرامفنیکل) به ترتیب حاوی ۱۰ میکروگرم، ۱۵ میکروگرم و ۳۰ میکروگرم آنتی‌بیوتیک از آزمایشگاه پژوهشی و تولیدی رشد ایران-تهران تهیه گردید. پس از انتقال باکتری‌ها در پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار، آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین روی *لیستریا اینوکوآ*، جنتامایسین روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و کلرامفنیکل روی *اشرشیا کلی* به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد و اثر بازدارندگی این آنتی‌بیوتیک‌ها با عصاره‌های مورد آزمون مورد مقایسه قرار گرفت (۱۰).

تجزیه و تحلیل آماری

در روش حداقل غلظت بازدارنده رشد، از طریق مقایسه کدورت کشت‌های انجام شده محدوده اثر ضد باکتریایی هر عصاره بر باکتری‌ها تعیین می‌شود. بعد از سه بار تکرار هر آزمون، از نتایج، میانگین و انحراف معیار گرفته، و سپس نمودارهای تعیین محدوده حداقل غلظت بازدارندگی توسط

نرم افزار اسلاید رایت رسم گردید. در روش انتشار دیسک نیز، پس از سه بار تکرار هر آزمون میانگین نتایج توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح $p< ۰/۰۵$ مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج و بحث

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی عصاره آبی اسفناج (واریته مشهد): با استفاده از نرم افزار اسلاید رایت، محل تلاقی نمودار کدورت مربوط به تیمار (میکروارگانیسم، عصاره، محیط کشت) با نمودار کدورت مربوط به شاهد (عصاره و محیط کشت) حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های مورد نظر را مشخص می‌کند. بر مبنای جدول (۱)، حداقل غلظت بازدارندگی عصاره آبی اسفناج (واریته مشهد) بر روی *لیستریا اینوکوآ* ۴۶۰۰۰ قسمت در میلیون گزارش شد. این مقدار برای *استافیلوکوکوس اورئوس* ۴۸۰۰۰ قسمت در میلیون و برای *اشرشیا کلی* بین ۲۸۰۰۰ قسمت در میلیون بود. حداقل غلظت بازدارندگی عصاره الکلی اسفناج (واریته مشهد) روی *لیستریا اینوکوآ، اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس* ۱۰۳۹۳ قسمت در میلیون تعیین شد.

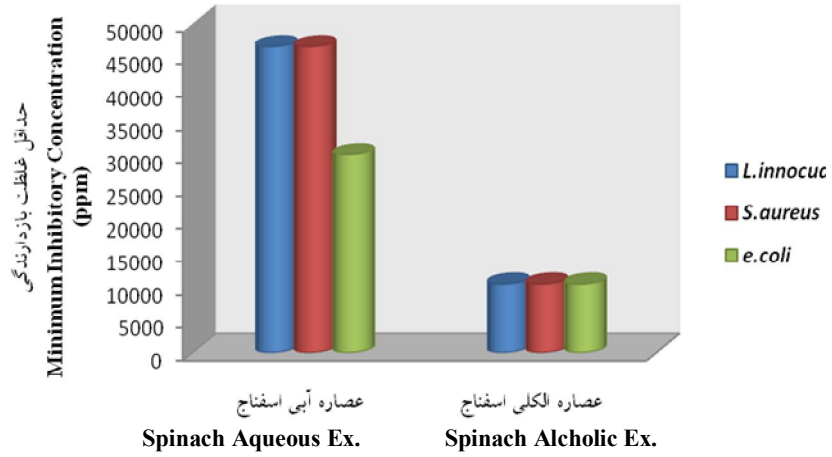
جدول ۱- حداقل غلظت بازدارندگی عصاره آبی و الکلی اسفناج روی باکتری های مورد آزمون

Table 1. Minimum inhibitation concentration of *Spinach* aqueous and alcoholic extracts (Ex) on the examined bacteria

باکتری های آزمون Examined Bacteria	*استافیلوکوکوس اورئوس* *Staphylococcus aureus*	*لیستریا اینوکوآ* *Listeria innocua*	*اشرشیا کلی* *Escherichia coli*
حداقل غلظت بازدارندگی minimum inhibitation concentration	قسمت در میلیون ppm	قسمت در میلیون ppm	قسمت در میلیون ppm
عصاره آبی اسفناج (واریته مشهد) Spinach Aqueous Ex	48000	46000	28000
عصاره آبی اسفناج (واریته مشهد) Spinach Alcholic Ex	10393	10393	10393

مقایسه حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های آبی و الکلی اسفناج (واریته مشهد) روی باکتری‌های مورد آزمون به روش افزودن معرف تترازولیوم کلراید (TTC): طبق نتایج در این روش حداقل غلظت بازدارندگی عصاره آبی اسفناج روی *لیستریا اینوکوآ و استافیلوکوکوس اورئوس* قسمت در میلیون ۴۶۴۸۰ و روی *اشرشیا کلی* ۳۰۰۷۰ قسمت در میلیون مشاهده شد. هم‌چنین حداقل

غلظت بازدارندگی عصاره الکلی اسفناج روی سه باکتری مورد آزمون مقدار ۱۰۳۹۵ قسمت در میلیون بود. به این ترتیب محاسبه حداقل غلظت بازدارندگی به روش جذب نوری (جدول ۱) بسیار دقیق‌تر می‌باشد.



شکل۲- مقایسه اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های آبی و الکلی اسفناج روی باکتری‌های مورد آزمون به روش افزودن معرف.

Figure 2. Comparison of antibacterial effects of *Spinach* aqueous and alcoholic extracts (Ex) on the examined bacteria through addition of reagent method.

تعیین حداقل غلظت کشندگی: طبق آزمون‌های انجام شده در این پژوهش با سه تکرار، عصاره‌های آبی و الکلی اسفناج (واریته مشهد) دارای خاصیت کشندگی نبودند. این احتمال وجود دارد که عصاره آبی در غلظت‌های بالاتر از ۵۴۶۸۰ قسمت در میلیون و همچنین عصاره الکلی در غلظت‌های بالاتر از ۴۱۵۸۰ قسمت در میلیون خاصیت کشندگی داشته باشند.

اثر عصاره آبی و الکلی اسفناج (واریته مشهد) بر قطر هاله مهار رشد: براساس جدول ۱ بیشترین قطر هاله عصاره الکلی اسفناج (واریته مشهد) روی *اشرشیا کلی* ۱۶ میلی‌متر، در غلظت ۱۰۳۹۵ قسمت در میلیون مشاهده شد.

جدول۲- اثر نوع عصاره و آنتی بیوتیک بر قطر هاله مهار رشد

Table 2. Effect of the extract type and antibiotic on diameter of growth inhibition zone

نوع پاتوژن Pathogen Type	*لیستریا اینوکوآ* *Listeria innocua*		*استافیلوکوکوس اورئوس* *Staphylococcus aureus*		*اشرشیا کلی* Escherichia coli	
	قطر هاله Zone of inhibition میلی‌متر mm	غلظت Concentration قسمت در میلیون ppm	قطر هاله Zone of inhibition میلی‌متر mm	غلظت Concentration قسمت در میلیون ppm	قطر هاله Zone of inhibition میلی‌متر mm	غلظت Concentration قسمت در میلیون ppm
عصاره آبی اسفناج Spinach Aqueous	0^a	54680	0^a	54680	10^a	54680
	0^a	27340	0^a	27340	9^a	27340
عصاره الکلی اسفناج Spinach Alcoholic	0^a	10395	0^a	10395	16^b	10395
اریترومایسین Erythromycin	12^b	15				
جنتامایسین Gentamicin			22^b	10		
کلرامفنیکل Chloramphenicol					30^c	30

حروف غیر مشترک نشانه معنی‌داری در سطح $p<0.05$ است.

a, b, c Data with the same letter for zone of inhibitions are not significantly different ($p< 0.05$).

آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین فقط روی *لیستریا اینوکوآ*، جنتامایسین روی *استافیلوکوکوس اورئوس*، و کلرامفنیکل روی *اشرشیا کلی* به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

Erythromycin, Gentamicin and chloramphenicol antibiotics were used on *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli,* respectively as a positive control.

طبق نتایج مشاهده شده بیشترین قطر هاله مربوط به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل روی *اشرشیا کلی* با قطر هاله ۳۰ میلی متر و کمترین قطر هاله با ۱۲میلی متر مربوط به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین روی *لیستریا اینوکوآ* بود.

مقایسه عملکرد آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمون با عصاره‌های آبی و الکلی اسفناج (واریته مشهد): براساس داده‌های حاصل از این پژوهش می‌توان نتیجه‌گیری کرد که آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل، جنتامایسین و اریترومایسین فعالیت ضدباکتریایی بیشتری به‌ترتیب روی *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا اینوکوآ* نسبت به عصاره آبی و الکلی اسفناج دارند.

اسفناج دارای مقدار قابل توجهی مواد مغذی ضروری از جمله پتاسیم، کلسیم، منیزیم، فسفر، آهن، مس، روی، پروتئین، فیبر، ترکیبات فنولی و اسیدهای چرب ضروری غیر اشباع به مقدار ۶۶ درصد از جمله اسید لینولنیک و اسید لینولئیک، پالمیتولئیک، هگزادکاتریدیونیک، اسید استئاریک، وهمچنین به مقدار زیادی فلاونوئیدها وترپن‌ها می‌باشد (۷). این ترکیبات دارای خاصیت بازدارندگی روی فعالیت پلیمرازی در پروکاریوت‌ها می‌باشند (۹). همچنین این مواد می‌توانند بر روی دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی که غشاء خارجی آن شامل لایه لیپوپلی‌ساکارید است موثر بوده و از این طریق دیواره سلولی را تخریب و مانع از تکثیر باکتری گرم منفی شوند (۱۱).

طبق پژوهشی که پارخ و همکاران (۲۰۰۷)، روی ۳۴ گونه گیاهان دارویی در هند روی سه گونه مختلف *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام دادند، مشخص شد که خاصیت ضدباکتریایی برای عصاره‌های الکلی بیش از عصاره‌های آبی برای تمام گیاهان می‌باشد (۱۵). در مطالعات دوبی وسینق (۲۰۱۰)، که با روش انتشاردیسک انجام شد، حساسترین باکتری نسبت به عصاره اسفناج *اشرشیا کلی* و کمترین قطر هاله مربوط به *باسیلوس سابتیلیس* بود. آنها مقدار در صد خالص گلیکولیپید در عصاره آبی و متانولی را بررسی و به این نتیجه رسیدند که مقدار گلیکولیپید و گلیسرولیپید در عصاره متانولی اسفناج بیشتر ازعصاره آبی است همچنین تانن خام جداسازی شده از عصاره متانولی آن بیشتر می‌باشد (۶). بر اساس پژوهشی که اوانجلنه (۲۰۱۱)، انجام داد مشخص شد که فلاونوئید، استروئید و CHO در عصاره آبی اسفناج و فنول، ساپونین، تانین، آمینواسید و CHO در عصاره الکلی آن وجود دارد. آنها نشان دادند که عصاره الکلی اسفناج مواد موثره بیشتری از گیاه را در خود حل می‌کند. بنابراین خاصیت ضدمیکروبی بیشتری نسبت به عصاره آبی دارد (۸).

نتیجه گیری کلی

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش عصاره آبی اسفناج واریته مشهد در دو روش انتشاردیسک و براث میکرودایلوشن، اثر بازدارندگی یکسانی روی *لیستریا اینوکوآ* و *استافیلوکوکوس اورئوس* داشت اما روی *اشرشیا کلی* اثر بازدارندگی بیشتری از خود نشان داد. عصاره الکلی نیز در روش براث میکرودایلوشن روی هر سه میکروارگانیسم اثر بازدارندگی یکسان و در روش انتشاردیسک، بیشترین اثر مهارکنندگی رشد روی *اشرشیا کلی* مشاهده گردید. درپژوهش پیش رو عصاره الکلی اسفناج احتمالا به علت حضور مقادیر بیشتر گلیسرولیپید و گلیکولیپید خاصیت ضد باکتریایی قوی‌تری نسبت

به عصاره آبی داشت. همچنین اثرعصاره الکلی آن روی *اشرشیا کلی* توانست با آنتی‌بیوتیک اریترومایسین در آزمون انتشاردیسک روی *لیستریا اینوکوا* برابری کند. به این معنی که اثر بازدارنگی عصاره الکلی واریته مشهد روی *اشرشیا کلی* می‌تواند به قدرت بازدارندگی آنتی‌بیوتیک اریترومایسین روی *لیستریا اینوکوآ* باشد. در نهایت می‌توان نتیجه‌گیری کرد وجود ترکیبات فلاونوئیدی و ترپن‌ها، اسیدهای چرب غیر اشباع و مواد معدنی با درصد بالا احتمالا یکی از مهمترین عوامل بازدارندگی بیشتر اسفناج واریته مشهد روی باکتری گرم منفی *اشرشیا کلی* می‌باشد. در نتیجه این عصاره می‌تواند به‌عنوان یک نگهدارنده و آنتی‌بیوتیک طبیعی در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. Ahmad, I., and Aqil, F. 2007. In vitro efficacy of bioactive extracts of 15 medicinal plants against ESBL-producing multidrug-resistant enteric bacteria. Microbial J, 162: 5. 264-275.
2. Ainswort, C. 2000. The Molecular Biology of Dioecious Plants Annals of Botany. Ethnopharmacol Journal. 86: 3. 211-221.
3. Babapour, A., Azami, L. and Garechahi, M. 2012. Antimicrobial effect of aqueous extract of *saffron* petals on some of food borne bacterial pathogen. Journal of Food hygiene. 2: 1. 63-74. (In Persian)
4. Babic, I., Watada, J.G., and Buta, AE. 1997. Growth of *Listeria monocytogenes* restricted by native icroorganisms and other properties of freshcut spinach. Food Protection J. 60: 1. 912-917.
5. Bouamama, H., Noel, T., Villard, J., and Benharref, A. 2006. Antimicrobial activities of the leaf extracts of two *Moroccan cistus* L. Species Ethnopharmacol Journal. 33: 5. 104-107.
6. Dubey, A., Mishra, N., and Singh, N. 2010. Antimicrobial activity some selected vegetables. International. applied biology and pharmaceutical technology J. 3: 1. 994-999.
7. Erfani, F. and hasandokht, M. 2006. Determination and comparison of some nutrients in seven Iranian spinach.Tehran, Journal of food sciences. 27: 1. 27-33. (In persian)
8. Evajelene, V. and Nataragan, D. 2011. Evaluation of free radical sca venging activity and biological properties of *spinacia oleracea* L. Ijest Journal. 3: 1. 25-30.
9. Grossman, S., Berman, M., Varshavsky, L. and Gottlieb, H.E. 2001. The antioxidant activity of aqueous *Spinacia oleracea L.* extract Chemical identification of active fractions. Phytochemistry Journal. 58: 4.143-152.

10. Hatami, S., Yavarmanesh, M. and Mohamadisani, A. 2014. Evaluation and comparison of the antibacterial effects of seed aqueous extract from *Ricinuscommunis* (two varieties) on food borne Pathogens.Tehran, Journal of food sciences.46: 12. 89-97. (In Persian)
11. Hogo, W., 1980. Eros Pharmaceutical Sciences, Dr.fazli. translater, Publication Mashhad University of Medical Sciences, pp: 320-344.
12. Hussan nasim, F., Andleeb, S., Iqbal, M., Ghous, T., Nisar khan, A., and Akhtar, K. 2012. Evaluation of antimicrobial activity of extracts of fresh and spoiled spinacia oleracea against some mammalian pathogens. Pakistan, Journal of ethnopharmacol. 74: 7.173-179.
13. Naini, A., Naseri, M., kamalnezhad, M., Khoshzaban, F., Ragabian, T., Esmaeelzadeh, H., Mansouri, S. and Zavieh, D. 2011. Evaluation effect of herbal essential oil and extract of 50 standard strains of *Candida Albicans* in vitro.Tehran, Journal of herbal plants. 10: 2. 163-172. (In Persian)
14. Nasirpour, M., Yavarmanesh, M. and Mohamadisani, A. 2014. Antibacterial effect of agueous extract of *Artemisia aucheri*, *Artemisia sieberi* and *Hyssopus officinalis* L. on the food borne pathogenic bacteria. Tehran, Journal of food sciences. 46: 12.73-84. (In persian)
15. Parekh, J., Gedega, D., and Chanda, S. 2007. Antibacterial activity of aqueous and alcoholic extracts of 34 indian medicinal plants against some *staphylococcus species*. Turkish Biology Journal. 32: 3. 63-71.
16. Tenover, F.C., and Arbiet, R.D. 1996. Interpreting chromosal DNA restriction patterns produced by pulced- field gel electrophoresis. Clinical Microbial Journal. 33:6. 2233-2239.

Iranian Association of Food Scientists and Technologists

EJFPP, Vol. 8 (2): 91-106
http://ejfpp.gau.ac.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Antibacterial effects of aqueous and alcoholic extracts from *Spinacia Oleracea* L. (varieties Mashhad) on bacterial indicators

A. Issazadeh[*1], M. Yavarmanesh[2] and A. Mohammadi Sani[3]

[1]M.Sc, Department of Food Science & Technoligy, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.

[2]Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

[3]Associate Professor, Young Researchers and Elite Club, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.

Received: 2014/09/30; Accepted: 2015/10/12

Abstract

Background and objectives: Compounds drived from Plants have been used for medicinal purposes for centuries because of their antimicrobial activity. The use of preservatives and anti-microbial materials is an approach for controlling pathogen bacteria in food stuff. Developing anti-microbial drugs is one of the most important advances in the treatment assumes. Due to their natural origin, herbal extracts are more compatible with body organism than antibiotics and their side effects are very scarce. *Spinach* as a source of new plant maybe used as an anti-oxidant and anti-microbial agent to deal with free radicals and microbial pollutions. The aim of this study was to evaluate the antibacterial effect of aqueous and alcoholic extracts of *Spinach* (varieties Mashhad) on pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC2592 and, *Listeria innocua* ATCC33090.

Materials and methods: The susceptibility testing of bacteria was performed by disc diffusion method, and minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the extract were determined using broth micro dilution method. In disc diffusion method, Erythromycin, Gentamicin and chloramphenicol were used as a positive control for *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, respectively.

[*]Corresponding author; eng.a.issazadeh@gmail.com

Results: According to disc diffusion method, gram positive bacteria (*Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*) were the most resistant and *Escherichia coli* was the most sensitive bacteria. Also, MIC valuese of the aqueous extract of *Spinach* (varieties Mashhad) toward *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were determined as 46000 PPM, 48000 PPM and 28000 PPM, respectively, whereas MIC for the alcoholic extract was comparable (10393 PPM), on all tested bacteria. The both aqueous and alcoholic extracts of Spinach (varieties Mashhad) had antibacterial properties.

Conclusion: Alcoholic extract of *Spinach* (varieties Mashhad) showed more potent antibacterial activity than aqueous extract on *Escherichia coli*. Also, the effect of its alcoholic extract on *Escherichia coli* was comparable with Erythromycin on *Listeria innocua* at disc diffusion test. Finally, it can be concluded that high amounts of flavonoids and terpenes, unsaturated fatty acids and inorganic materials are probably the most important inhibitory agents of *spinach* on gram-negative bacteria such as *Escherichia coli*. As a result, *Spinach* extract can be used as a natural antibiotic and preservative in food industries and pharmaceuticals.

Keywords: antibacterial activity of *Spinach* extract, Erythromycin, Chloramphenicol